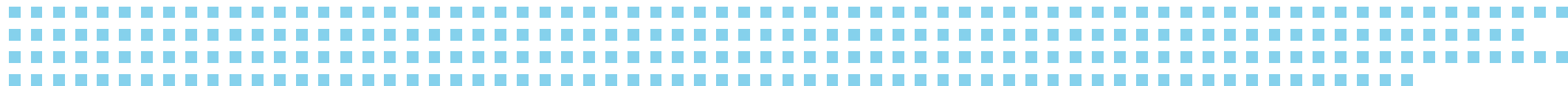


NIPT JAKO POWSZECHNY SKRYNING – DOSWIADCZENIA Z NIDERLANDOW

dr. n. med. Małgorzata Ilona Srebniak
Specjalista Laboratoryjnej Genetyki Medycznej
Erasmus MC, Rotterdam



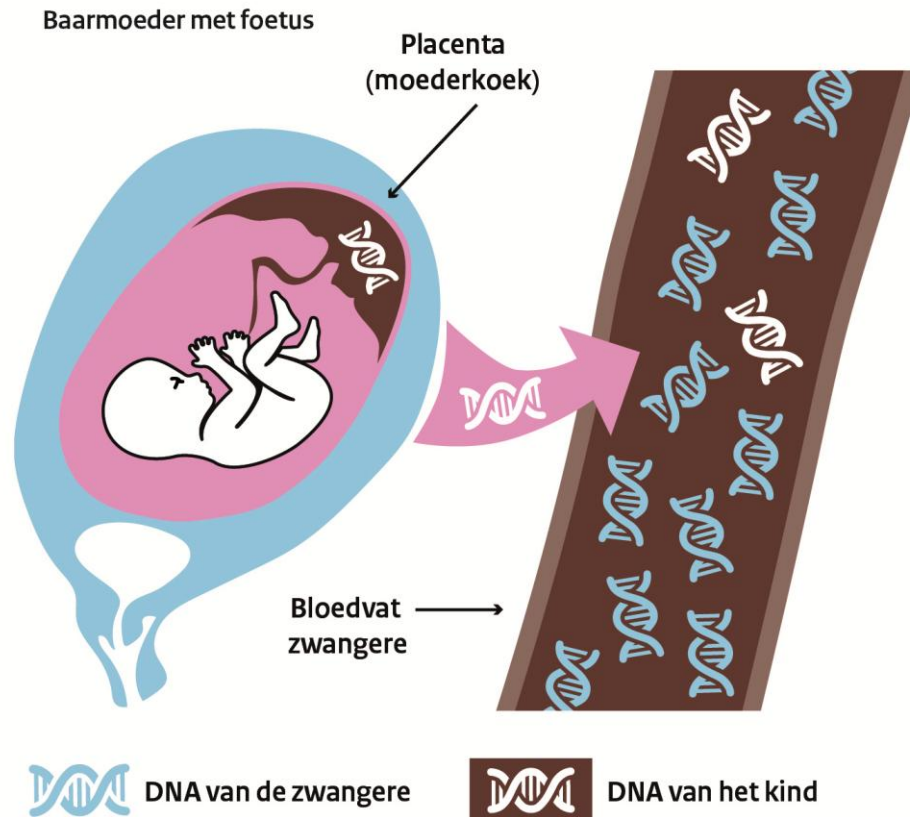
NON-INVASIVE PRENATAL TEST (NIPT)

cfDNA – pozakomórkowe DNA

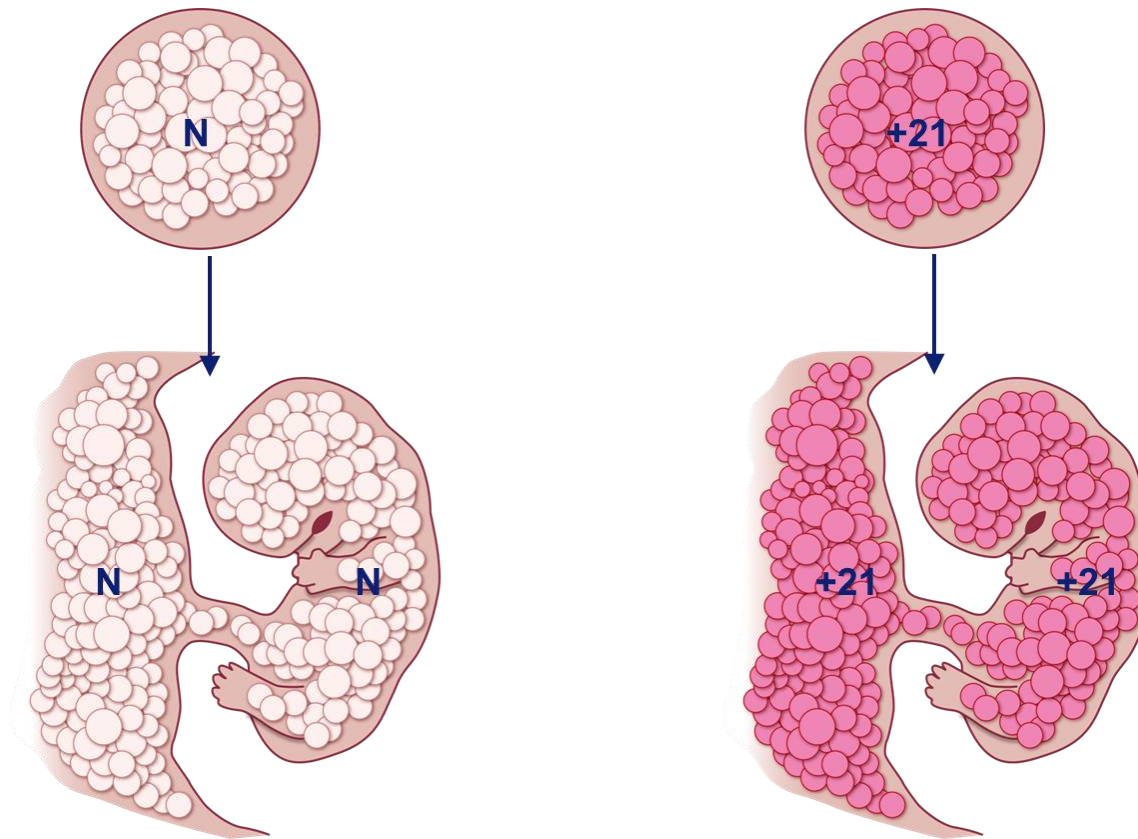
Co tak naprawdę jest badane w cfDNA z krwi ciężarnej?

~10% DNA pochodzi z łożyska
~90% to matczyne DNA

cfDNA ≠ płodowe DNA



U ~98% CIĘŻARNYCH KARIOTYP ŁOŻYSKA JEST IDENTYCZNY Z KARIOTYPEM PŁODU

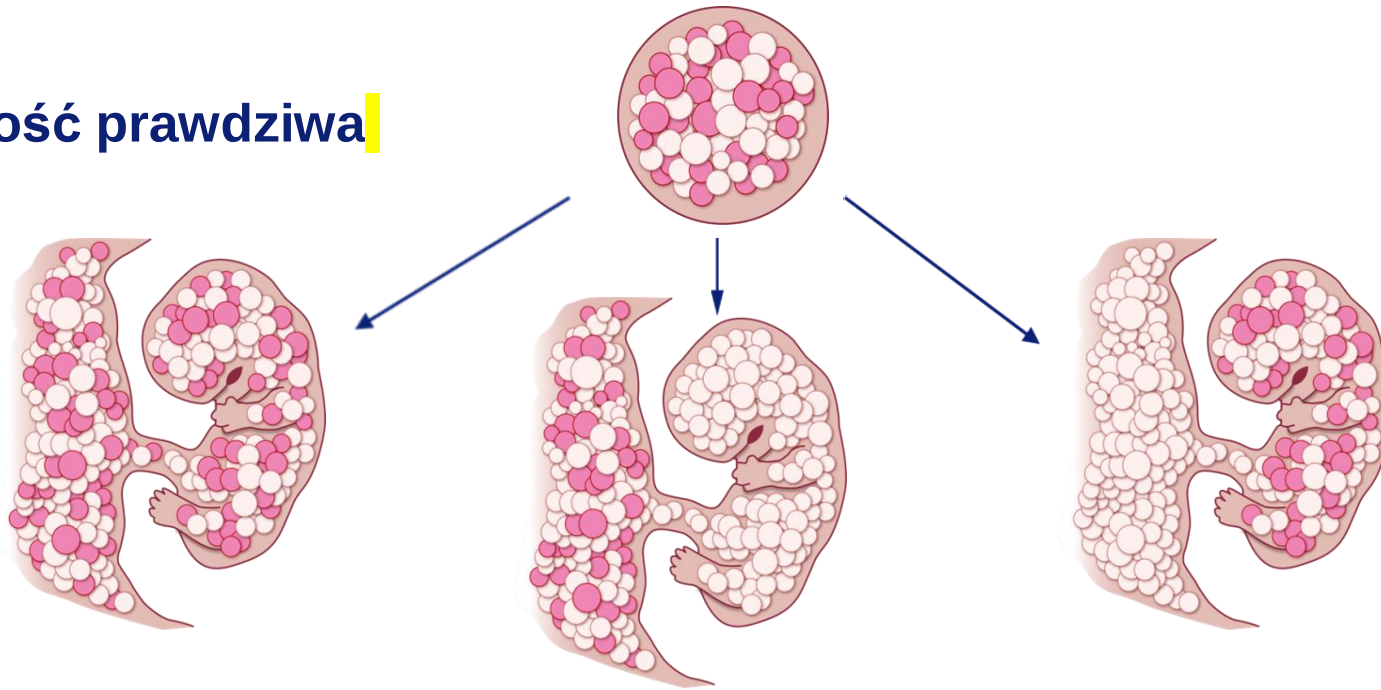


MOZAIKOWOŚĆ KOŚMÓWKOWA

~1-2% ciężarnych ze zwiększonym ryzykiem trisomii

- Kariotyp prawidłowy
- Trisomia

Mozaikowość prawdziwa



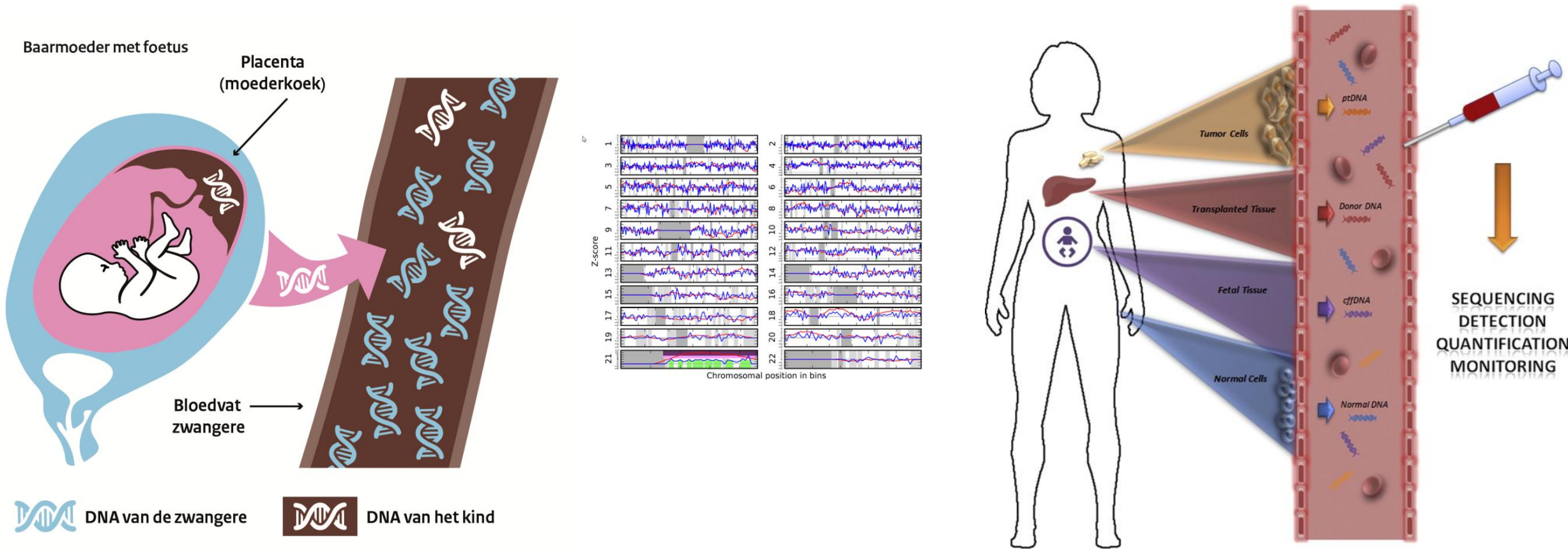
Mozaikowość ograniczona do płodu
("fałszywie" negatywny wynik NIPT)

Mozaikowość ograniczona do łożyska (CPM – confined placental mosaicism)
("fałszywie" pozytywny wynik NIPT)

NON-INVASIVE PRENATAL TEST (NIPT)

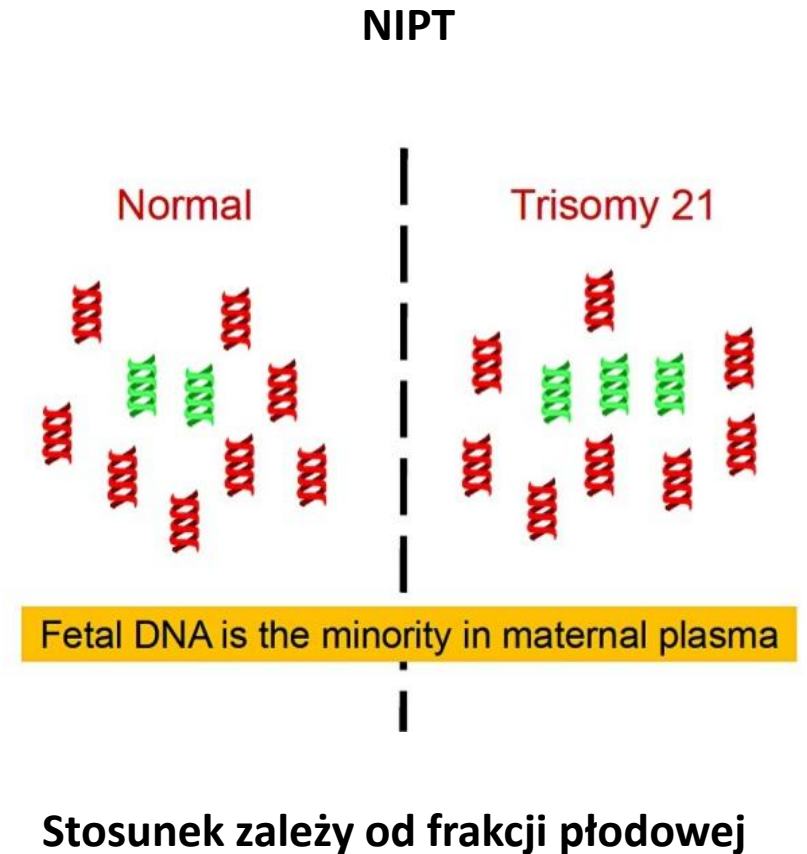
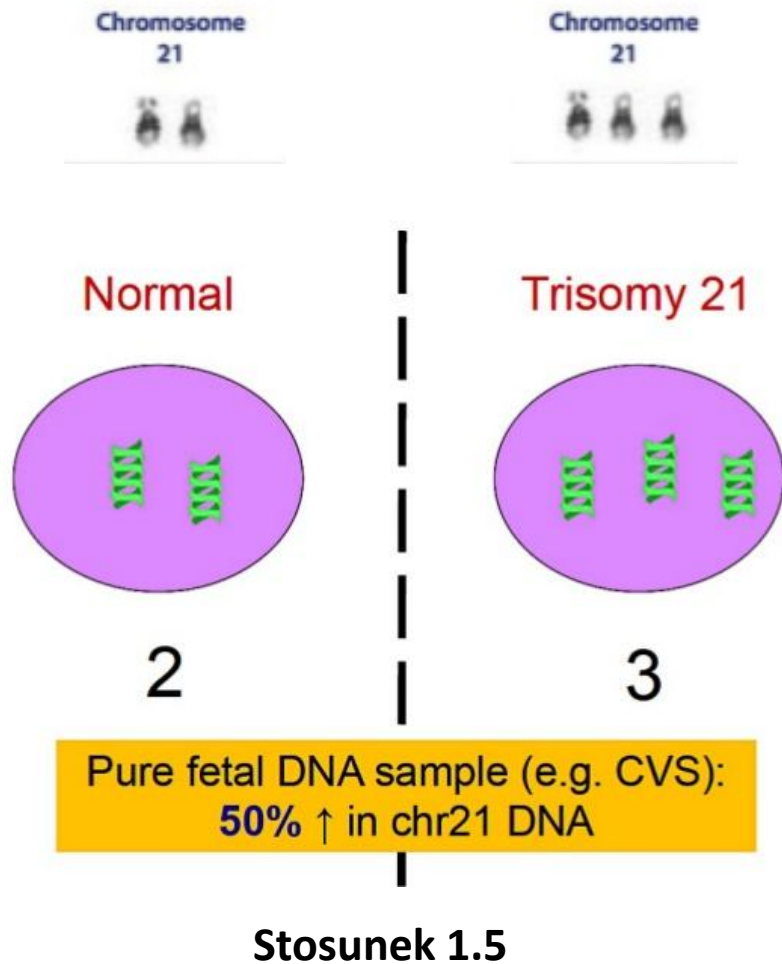
cfDNA $\neq$ płodowe DNA

=> wymagany jest test potwierdzający obecność aberracji u płodu

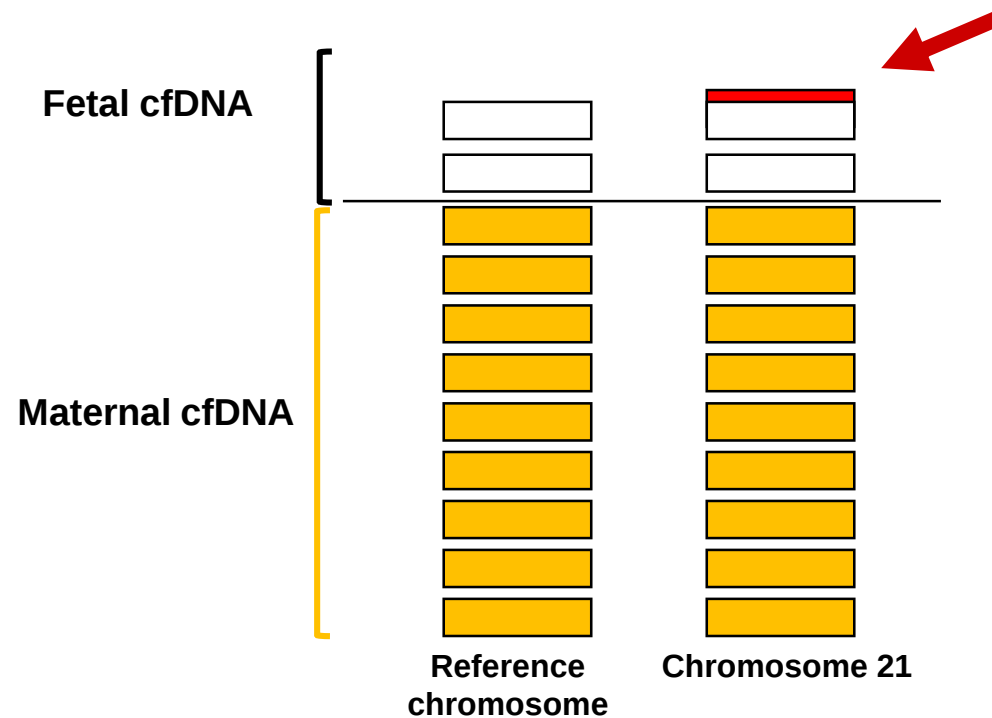


Jeśli wynik amniopunkcji jest ujemny, należy spodziewać się, że aberracja może dotyczyć kosmówki lub organizmu matki

WYKRYWANIE TRISOMII 21

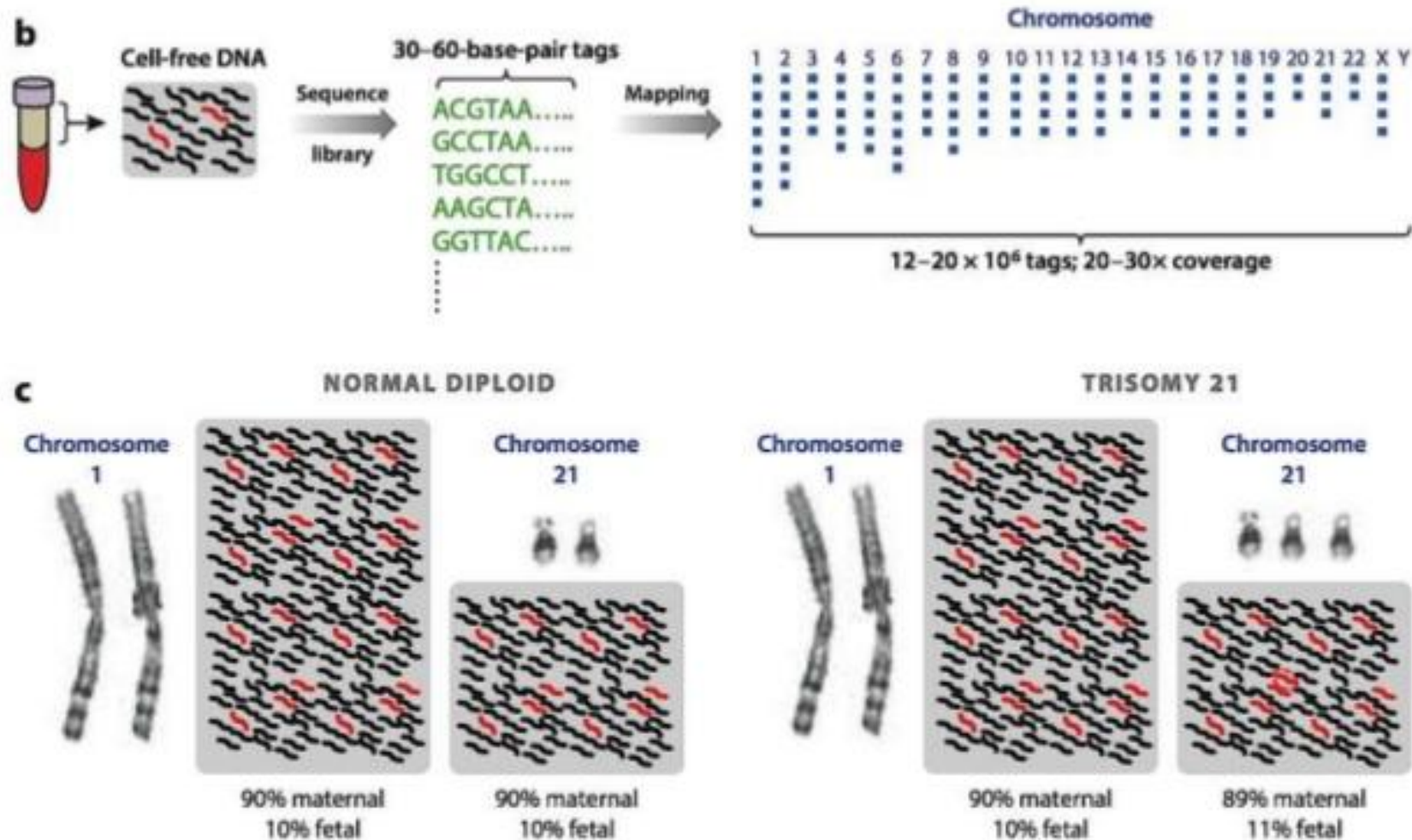


JAK WAŻNA JEST FRAKCJA PŁODOWA?



Fetal Fraction	Expected ratio for trisomy
4%	1.02
10%	1.05
20%	1.10
40%	1.20
100%	1.50

JAK PRZEPROWADZA SIĘ NIPT?

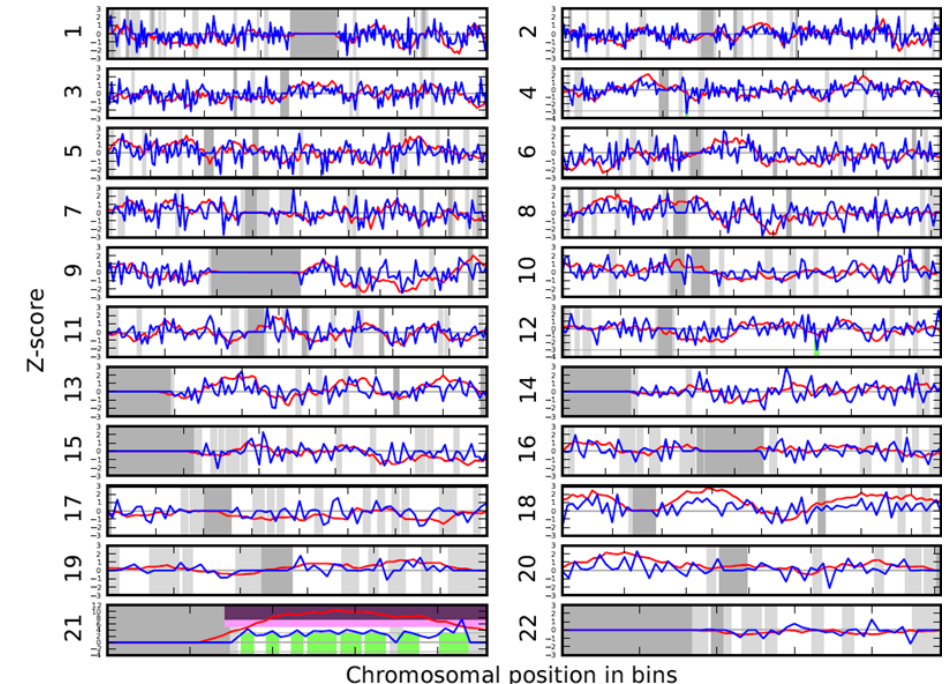
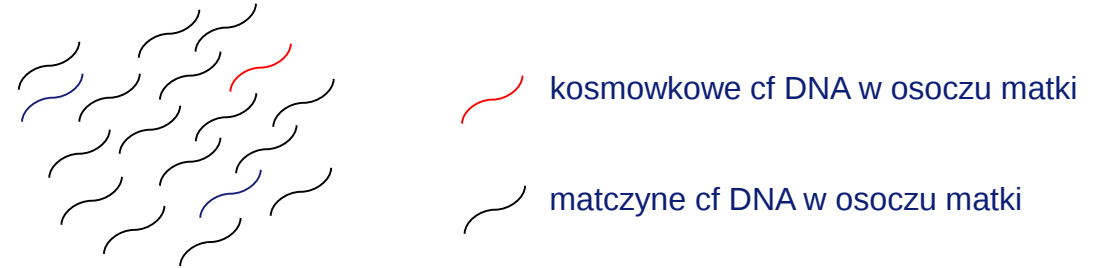


Zliczanie sekwencjonowanych fragmentów: w przypadku występowania trisomii 21 w krwi matki znajduje się relatywnie więcej fragmentów pochodzących z chromosomu 21 w porównaniu do próbek kontrolnych.

Bioinformatyka!!!

PŁYTKIE SEKWENCJONOWANIE CAŁOGENOMOWE

- Wirowanie krwi w celu oddzielenia osocza
- Izolacja pozakomórkowego cfDNA z osocza (plasma)
- Przygotowanie próbki



BADANIE TRIDENT 1: NIPT DLA CIĘŻARNYCH Z WYSOKIM RYZYKIEM TRISOMII



- Kwiecień 2014
- CT ryzyko $> 1:200$ lub poprzednia ciąża z trisomią
- 65 próbek/tydzień
- 5 laboratoriów
- Konsultacje genetyczne i kontrola we wszystkich jednostkach uniwersyteckich
- Koszty opłacane przez ubezpieczycieli

Wybór: NIPT lub amniopunkcja/CVS

NIPT = 2nd-tier screening test

BADANIE TRIDENT 2: NIPT DLA WSZYSTKICH CIĘŻARNYCH



- Kwiecień 2017 – marzec 2023
- 2000 próbek/tydzień
- 3 laboratoria
- Konsultacja przed testem – położne i ginekolodzy po obowiązkowym szkoleniu (~3000)
- Konsultacja po teście przez ginekologa w przypadku T13, 18, 21 lub lekarza genetyka w przypadku innych aberracji we wszystkich ośrodkach akademickich
- Koszt własny ciężarnej: 175 EUR, reszta finansowana z dotacji rządowej

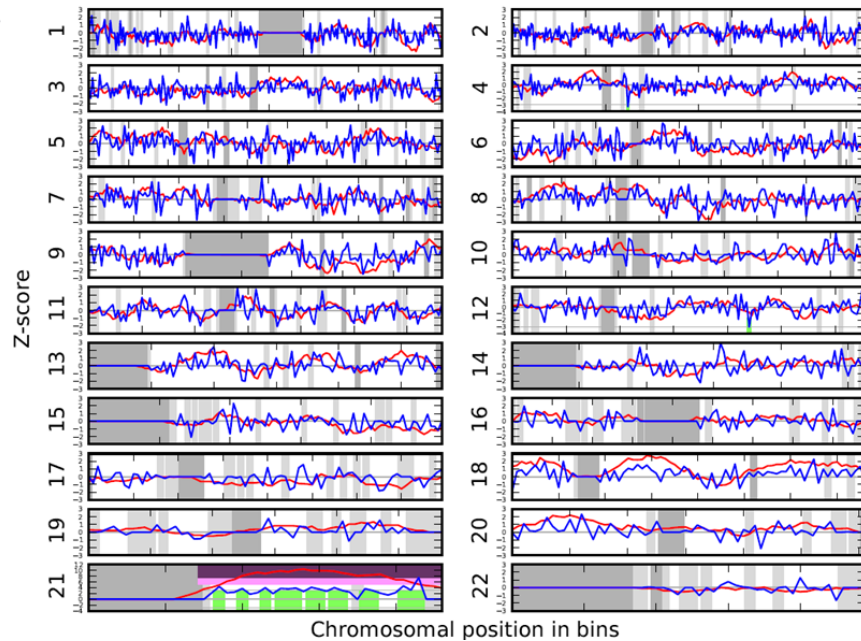
Wybór: test zintegrowany lub NIPT (do października 2021)
NIPT- 1st tier screening test

BADANIE TRIDENT 2

WYBÓR: ANALIZA CAŁOGENOMOWA LUB CELOWANA NA NAJCZĘSTSZE TRISOMIE?

- WISECONDOR (Straver et al., 2014, Nucleic Acids Research, Vol. 42, No. 5, e31doi:10.1093/nar/gkt992)

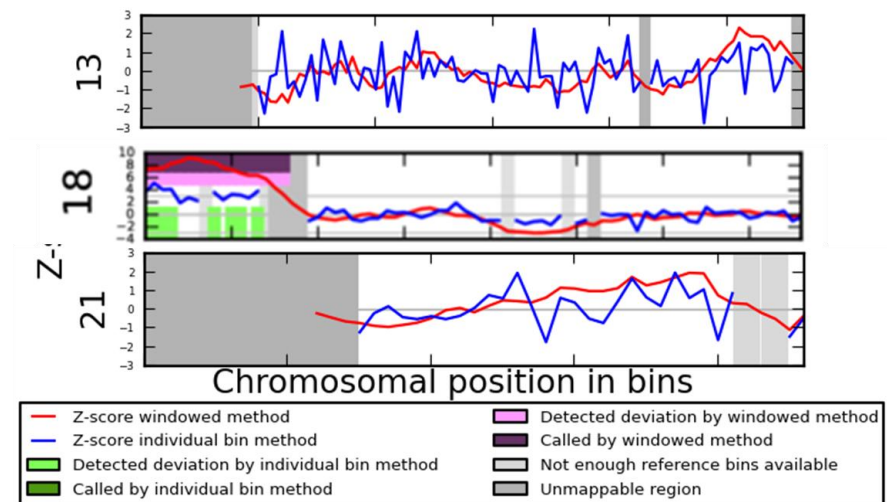
Całogenomowe (rozdzielczość ~ 10-20 Mb)



78%

Bez aberracji chromosomów płciowych
Bez chorób monogenowych
Bez mikrodelecji/mikroduplikacji
Bez triploidii

Celowane na chr 13, 18 i 21 – najczęstsze trisomie



22%

OD KWIETNIA 2023: OGÓLNOKRAJOWY PROGRAM PRZESIEWOWY NIPT

- Nadzorowany poprzez RIVM
- W 2021: przetarg na wykonywanie badań NIPT
- → wygrany przez 3 laboratoria uniwersyteckie
- NIPT bezpłatny dla każdej ciężarnej (dotacja rządowa)
- NIPT możliwy od 10 tygodnia ciąży
- Od 2024 nie raportowane są RATs

*decyzja ministerstwa zdrowia



National Institute for Public Health
and the Environment
Ministry of Health, Welfare and Sport



JAK ANALIZUJE SIĘ NIPT W ERASMUS MC

NIPT test – VeriSeq 2.0. genome wide + Wisecondor visualisation

GENESIS

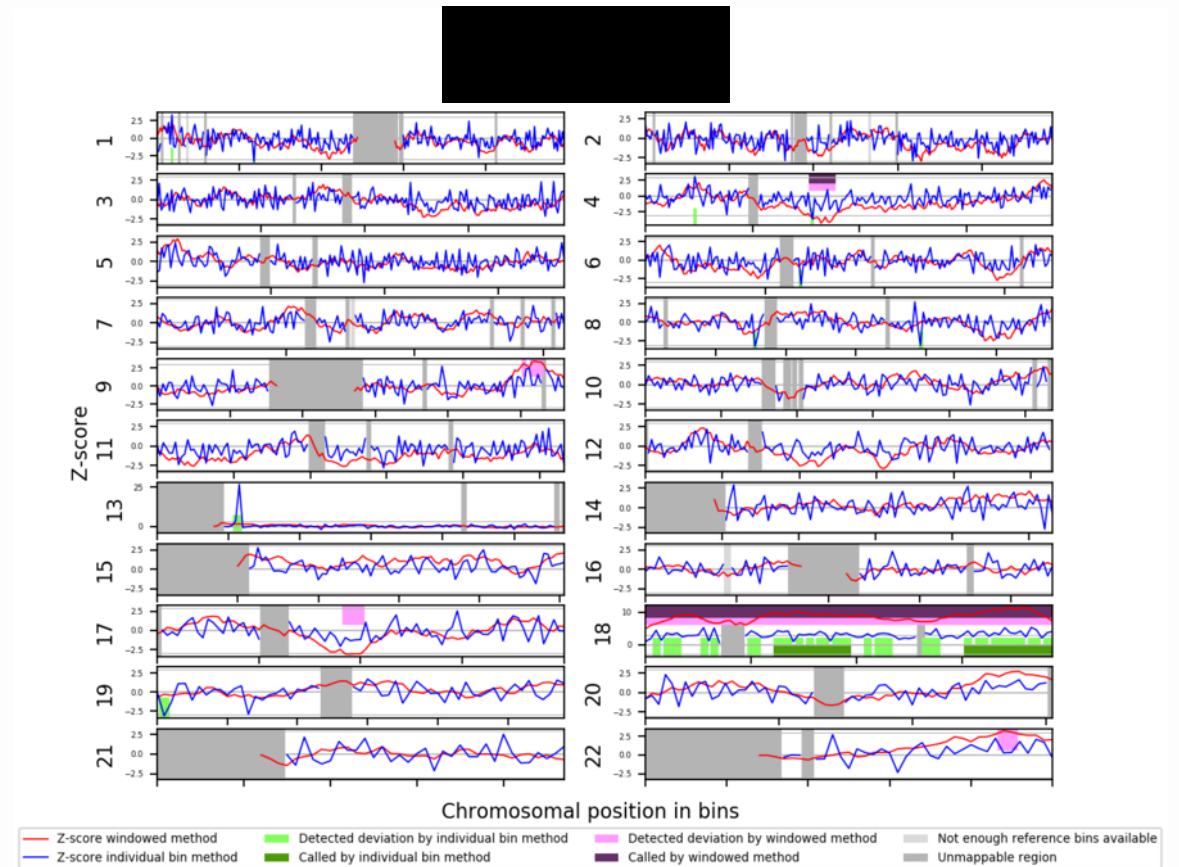
3 Gosia Srebnik (M793766)

< Terug Autoriseren NIPT uitslagen van experiment: 113485

Aanvraagsectie Aanvraagtype Onderzoektype Alleen openstaande

Staf ✓ Per ✓

?	VS	WC	fractienr ↑≡	ext.ref.	type	total	used	13	18	21	rest	mrl	opm	lab	chk	staf	per
☐	A4.1.2	A4.1.2			W	30,377	24,265		23			☐	☐	☒	☒	☒	
☐	A1	A1			T	25,528	21,268					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	23,291	19,085					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	24,126	19,996					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			T	19,650	16,232					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	28,870	24,210					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	26,361	21,903					☐	☐	☒	☒	☐	☐
☐	A1	NNP			W	11,385	9,296					☐	☐	☒	☒	☒	☐
☐	☒	A1			T	18,128	14,820					☐	☐	☒	☒	☒	☒
☐	A1	A1			W	24,089	19,697					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			T	19,033	15,557					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	19,902	16,403					☐		☒	☒	☐	☐
☐	☒	FIF			W	17,599	14,613					☐	☐	☒	☒	☒	☐
☐	A1	A1			W	25,267	20,974					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	27,152	22,565					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	26,267	21,811					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	23,816	19,737					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	20,284	16,897					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	22,875	19,035					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	21,438	18,052					☐		☒	☒	☐	☐
☐	A1	A1			W	26,393	22,029					☐	☐	☒	☒	☐	☐



JAK ANALIZUJE SIĘ NIPT W ERASMUS MC



Soort	NIPTSCREEN
Onderzoek	NIPT

VeriSeq:	
NIPT-VSQCFF	PASS
QC-flag	PASS
Failure	NONE
%FF	14

Foetale Fractie:	
Defrag SubY	0
Defrag WholeY	-2.3976
Defrag Gender	V
seqFF	10.4262

Metingen:	
Lengte	169
Gewicht	67
BMI	23.5

Autorisaties:	
Lab	EPT op 05-11-2024 12.55
Check	EPT op 05-11-2024 12.55
Staf	

793766) 🔍 ↺ ↻ 📄

VeriSeq (v2.1.0): normaal [A1]

	Chr	Start	Eind	Build	Lengte	PrbN	Software	Lab	Zygotie	Klasse	Verbijz.	Origine	K.N.	Z-score	Type	Nevenb.?	Opm.	Meetw.	
	-	0	0	HG19	1	1	? - Onbe	? - Onbe	? - onbe	? - Onbe	? - Onbe	? - onbe			-	Nee	+		

Toelichting: CLASS_AUTO: NO ANOMALY DETECTED, ANOMALY_DESC: NO ANOMALY DETECTED, #SOFTWAREVERSION:V2.1.0

WiseCondor (v2.0.1): normaal [A1]

	Chr	Start	Eind	Build	Lengte	PrbN	Software	Lab	Zygotie	Klasse	Verbijz.	Origine	K.N.	Z-score	Type	Nevenb.?	Opm.	
	-	0	0	HG19	1	1	? - Onbe	? - Onbe	? - onbe	? - Onbe	? - Onbe	? - onbe		0	?	Nee	+	

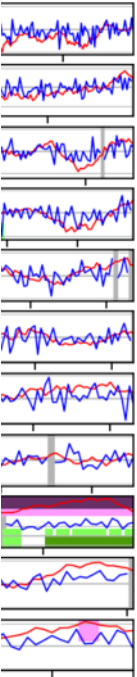
Toelichting naar Peridos (druk op het groene vinkje naast de toelichting om eventuele wijzigingen op te slaan):

Toelichting:

Opmerkingen (druk op het groene vinkje naast de opmerking om eventuele wijzigingen op te slaan):

VeriSeq:

WiseCondor:



■ Not enough reference bins available
■ Unmappable region

Order

Ruwe data

Maak herhaling ★

Naar MD Moeder

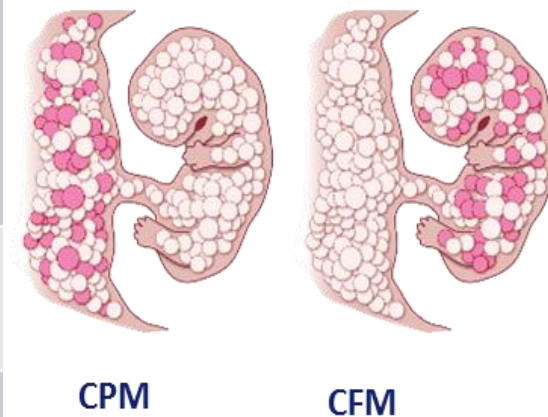
Naar aanvraag

CHARAKTERYSTYKA NIPT DLA T13, T18 I T21

N=73,239 przebadanych ciąż (wskaźnik sukcesu 99,7%) N=343 (0.5%) najczęstsze trisomie

		Cases with confirmatory diagnostic testing					
NIPT	N (%)	N with FU	True positive, n	Dicordant positive, n	Discordant negative, n	Sensitivity, = Czułość testu %TPR (95% CI)	Dodatnia wartość predykcyjna PPV, % (95% CI)
T21	239 (0.33)	224	215	9	5**	98 (95-99)	96 (93-98)
T18	49 (0.07)	48	47	1	5***	90 (79-97)	98 (87-100)
T13	55 (0.08)	51	27	24	0	100 (87-100)	53 (43-63)

No FU in 21: 17 cases of IUFD and 4 cases of TOP
 ** 3 born and 2 IUFD
 *** all detected with ultrasound



Biologiczna przyczyna rozbieżnych wyników dodatnich i ujemnych!

CHARAKTERYSTYKA NIPT DLA INNYCH ABERACJI

N=149,318 przebadanych ciąż

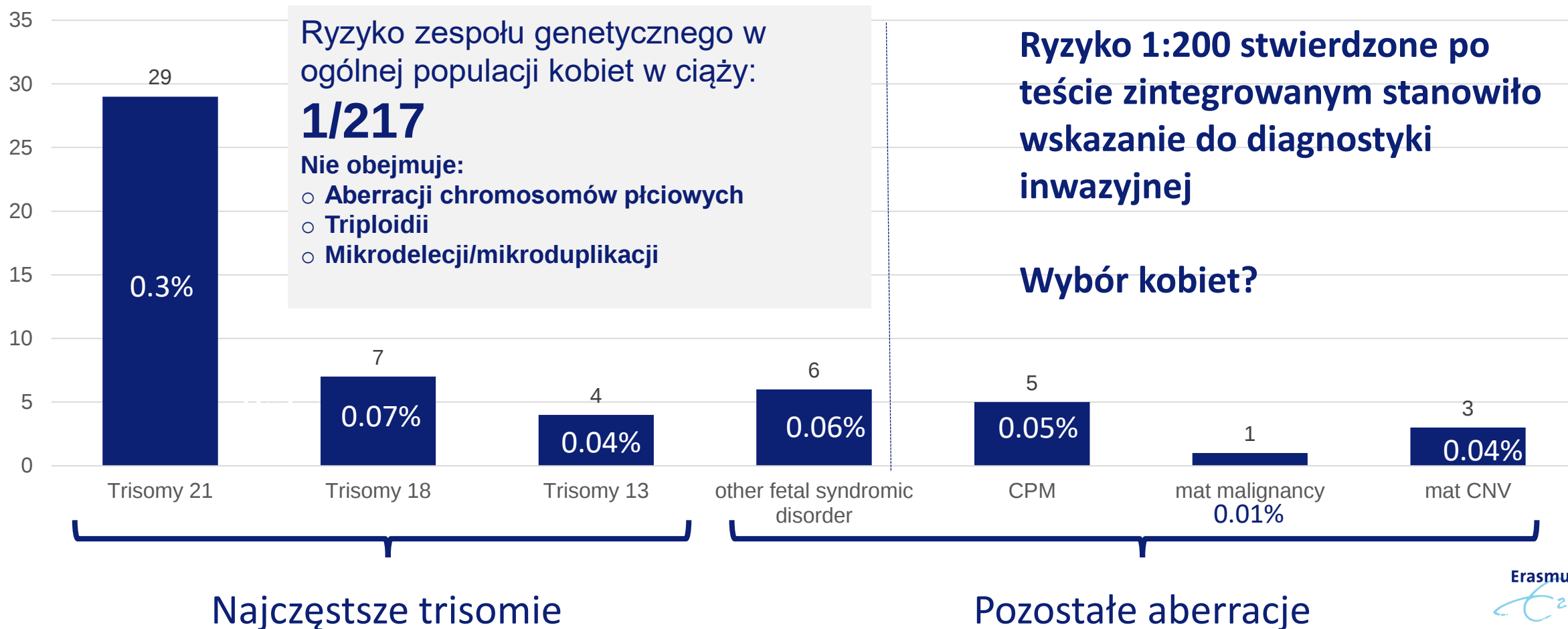
			Cases with confirmatory diagnostic testing				
NIPT	N (%)	N with FU	True positive = fetal, n	CPM	Maternal	Unresolved	Dodatnia wartość predykcyjna PPV, %
Inne trisomie	196 (0.18%)	196	15	179	2	0	7.7%
Aberracje strukturalne	188 (0.17%)	145	64	8	73	43	44.1%
Complex profiles	15 (0.02%)	15		0	12 maternal malignancy 2x uterine fibrosis	1 ukn	

Van Prooyen Schuurman, 2022, Am J Hum Genet, 109, 1140-1152

Biologiczna przyczyna rozbieżnych wyników dodatnich i ujemnych!

KLINICZNIE ZNACZĄCY EFEKT GW-NIPT W OGÓLNEJ POPULACJI POŁOŻNICZEJ: WYŁĄCZNIE POTWIERDZONE WYNIKI PATOLOGICZNE

N= 10.000 ciąż



The role of confined placental mosaicism in fetal growth restriction: A retrospective cohort study

Geerke M. Eggenhuizen¹ | Attie T. J. I. Go¹ | Zoë Sauter¹ | Mariëtte J. V. Hoffer² |
Monique C. Haak³ | Geert Geeven⁴ | Karin E. M. Diderich⁴ | Marieke Joosten⁴ |
Myrthe van den Born⁴ | Malgorzata I. Srebniak⁴ | Diane Van Opstal⁴

TABLE 2 Comparing the prevalence of fetal growth restriction and birthweight below the 10th, 5th and 3rd percentile according to the trisomy origin.

	Origin of trisomy		Sign (p)
	Mitotic N = 50	Meiotic N = 25	
FGR	12/47 (25.5%)	15/24 (62.5%)	0.002
Birthweight < p10	8/48 (16.7%)	13/24 (54.2%)	0.001
Birthweight < p5	5/48 (10.4%)	10/24 (41.7%)	0.002
Birthweight < p3	4/48 (8.3%)	10/24 (41.7%)	0.001

Note: Bold format indicates p values below 0.05, that is, significant difference was there between a meiotic and mitotic origin of the trisomy.

- Wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrastania płodu (FGR) **34%**
- Niska masa urodzeniowa (poniżej 10th percentyla (BW<p10) **23,1%**
- Aberracje mejotyczne są związane z wyższym ryzykiem patologii ciąży, a nie tylko przypadki trisomii 16, jak kiedyś uważano.

Dlatego przypadki z pozytywnym wynikiem NIPT są wskazaniem do intensywnej opieki nad ciążarną

W latach 2008-2019 stwierdzono 215 przypadków CPM

POWIKŁANIA W PRZEBIEGU CIAŻY I ZABURZENIA WZRASTANIA PŁODU

Powikłania	(Assumed) CPM	Perined * (general population)
Preeklampsja	8,5%	0,5%
HELLP	2,1%	Not registered
Nadciśnienie indukowane ciążą	5,3%	5,4%
Masa urodzeniowa < 2,3 centyla	13,6%	2,3%
Masa urodzeniowa 2,3 -10 centyla	13%	7,7%
Spontaniczny poród przedwczesny < 37 t.c.	4,5%	3,4%
Cukrzyca ciężarnych	4,2%	4,2%

CPM wiąże się z niekorzystnym przebiegiem okołoporodowym w ogólnej populacji kobiet ciężarnych

Van Prooyen Schuurman et al., 2022, AJHG

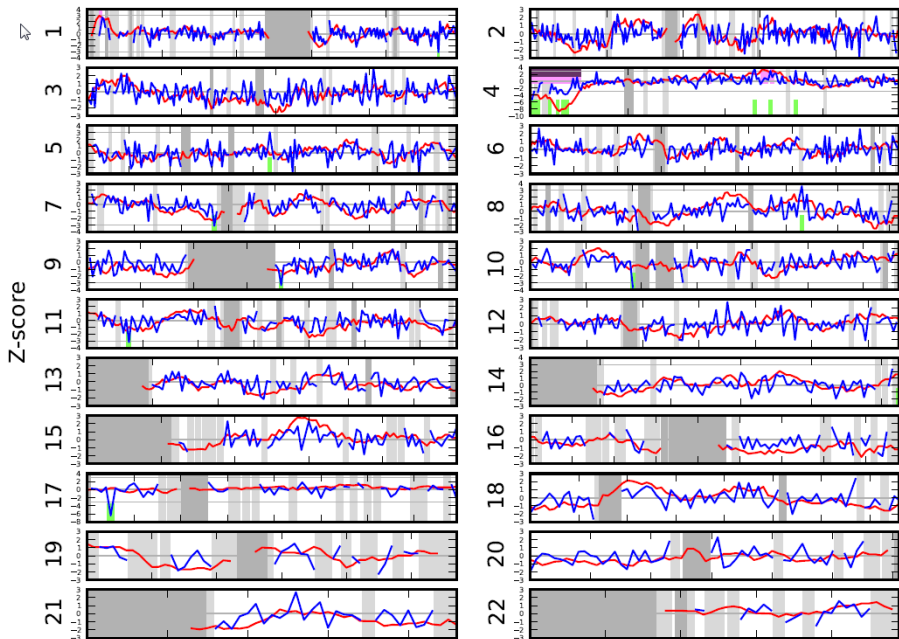
Ogólnokrajowy protokół prowadzenia kontroli w przypadkach (przypuszczalnej) CPM:

- pogłębione badania USG (ryzyko MCA 11.6% (4.2 dużych i 7.4% małych anomalii))
- kontrola USG wzrastania płodu co 4 tygodnie od 26 tygodnia ciąży
- ?? stosowanie kwasu acetylosalicylowego w celu obniżenia ryzyka preeklampsji

Ryzyko masy urodzeniowej <10th centyla wynosi 1:4

*Data from the Dutch national obstetric outcome registration Perined

NIPT JAKO SCREENING W KIERUNKU ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH

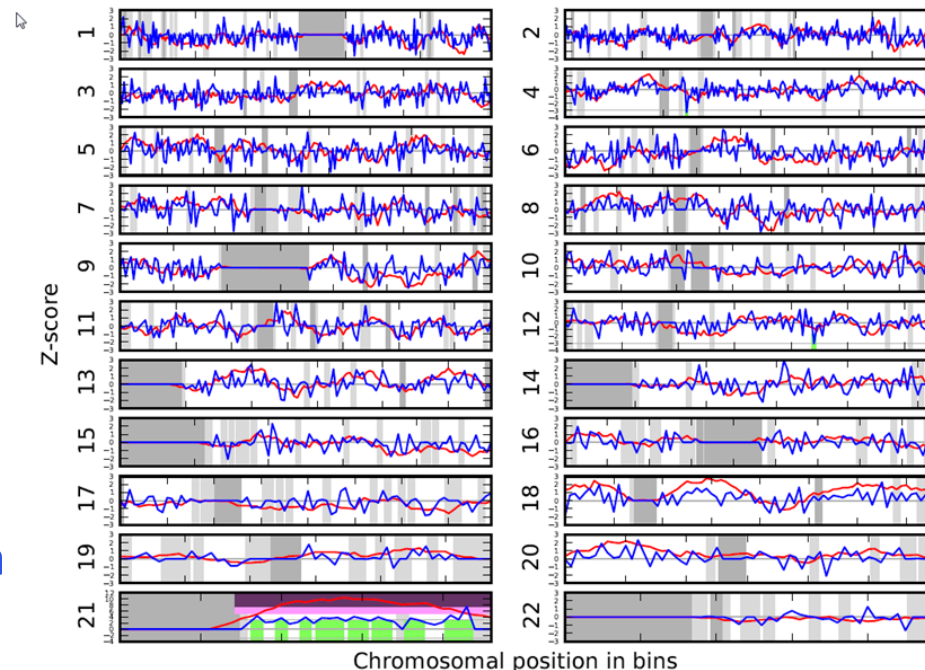


Który zespół jest cięższy
- zespół Downa czy
Wolfa-Hirschhorna?

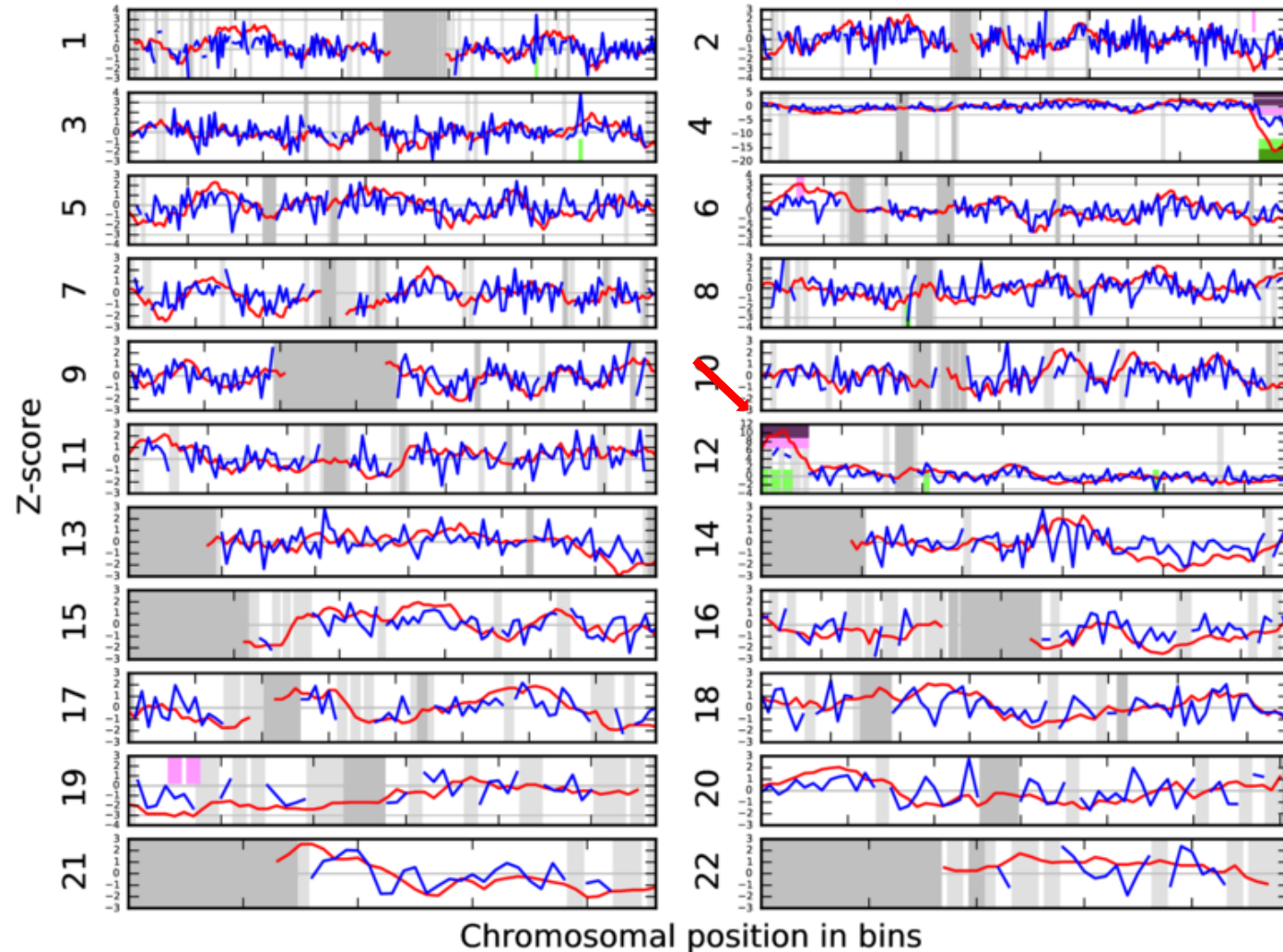
Dlaczego badania
przesiewowe w
kierunku zespołu Downa
są ogólnie dostępne?



A tymczasem badanie
całogenomowe NIPT nie
jest?



TRANSLOKACJE NIEZRÓWNOWAŻONE



12 Mb utrata w prążku 4q

8 Mb przyrost w prążku 12p

13.1 t.c.

13% FF/frakcja płodowa (SeqFF)

14 mln odczytów

der(4)t(4;12)(q34.3;p13.31)mat



CZY MOŻNA PROPONOWAĆ NIPT NOSICIELOM TRANSLOKACJI? - ANALIZA RETROSPEKTYWNA

Received: 4 May 2021 | Revised: 10 August 2021 | Accepted: 16 August 2021

DOI: 10.1111/aogs.14256

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE



Non-invasive prenatal diagnosis for translocation carriers—YES please or NO go?

Malgorzata I. Srebniak¹ | Fernanda S. Jehee¹ | Marieke Joosten¹ | Marjan Boter¹ |
Walter G. de Valk¹ | Robert van der Helm¹ | Erik A. Sistermans² | Els Voorhoeve³ |
Shama Bhola³ | Mariette J. V. Hoffer⁴ | Nicolette den Hollander⁴ |
Merryn V. E. Macville⁵ | Diane Van Opstal¹

Conclusions: This study supports the hypothesis that routine NIPS may be used for prenatal diagnosis of unbalanced inheritance of familial translocations, especially with prior knowledge of the translocation allowing focused examination of the involved chromosomal regions. Our study showed that routine shallow sequencing designed for aneuploidy detection in cell free DNA may be sufficient for higher resolution NIPS, if specialized copy number software is used and if sufficient fetal fraction is present.

CZY MOŻNA ZIDENTYFIKOWAĆ NOSICIELI TRANSLOKACJI W BADANIU NIPT?

- ANALIZA RETROSPEKTYWNA

W naszym badaniu wykazaliśmy, że większość (**98,7%**, 95% CI 97,1–99,5%) translokacji zrównoważonych potencjalnie prowadzi do wystąpienia niezrównoważenia u płodu o wielkości > 10 Mb, co jest możliwe do wykrycia metodą GW-NIPT, jeśli badanie zostało wykonane w trakcie poronienia.

van Zutven et al. *Molecular Cytogenetics* (2023) 16:26
<https://doi.org/10.1186/s13039-023-00657-x>

Molecular Cytogenetics

RESEARCH

Open Access



What proportion of couples with a history of recurrent pregnancy loss and with a balanced rearrangement in one parent can potentially be identified through cell-free DNA genotyping?

Laura J. C. M. van Zutven¹, Jona Mijalkovic¹, Monique van Veghel-Plandsoen¹, Margaret Goense¹, Marike Polak², Maarten F. C. M. Knapen³, Sabina de Weerd⁴, Marieke Joosten¹, Karin E. M. Diderich¹, Lies H. Hoefsloot¹, Diane Van Opstal¹ and Malgorzata I. Srebniak^{1*}

NIPT W PORONIENIACH

Pacjentka (37 lat) z nawracającymi poronieniami o nieznanej etiologii, kariotypy obojga rodziców prawidłowe.

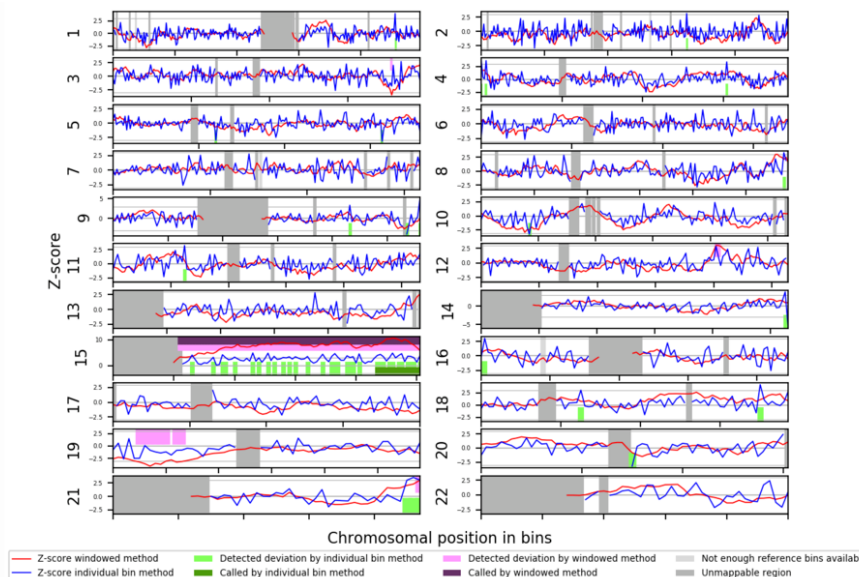
Wewnątrzmaciczne obumarcie płodu w 9 tygodniu (poronienie)

Badanie NIPT: trisomia 15

- 23,4 mln odczytów,
- VeriSeq (v2.0.0): 9% FF
- SeqFF 8.6%

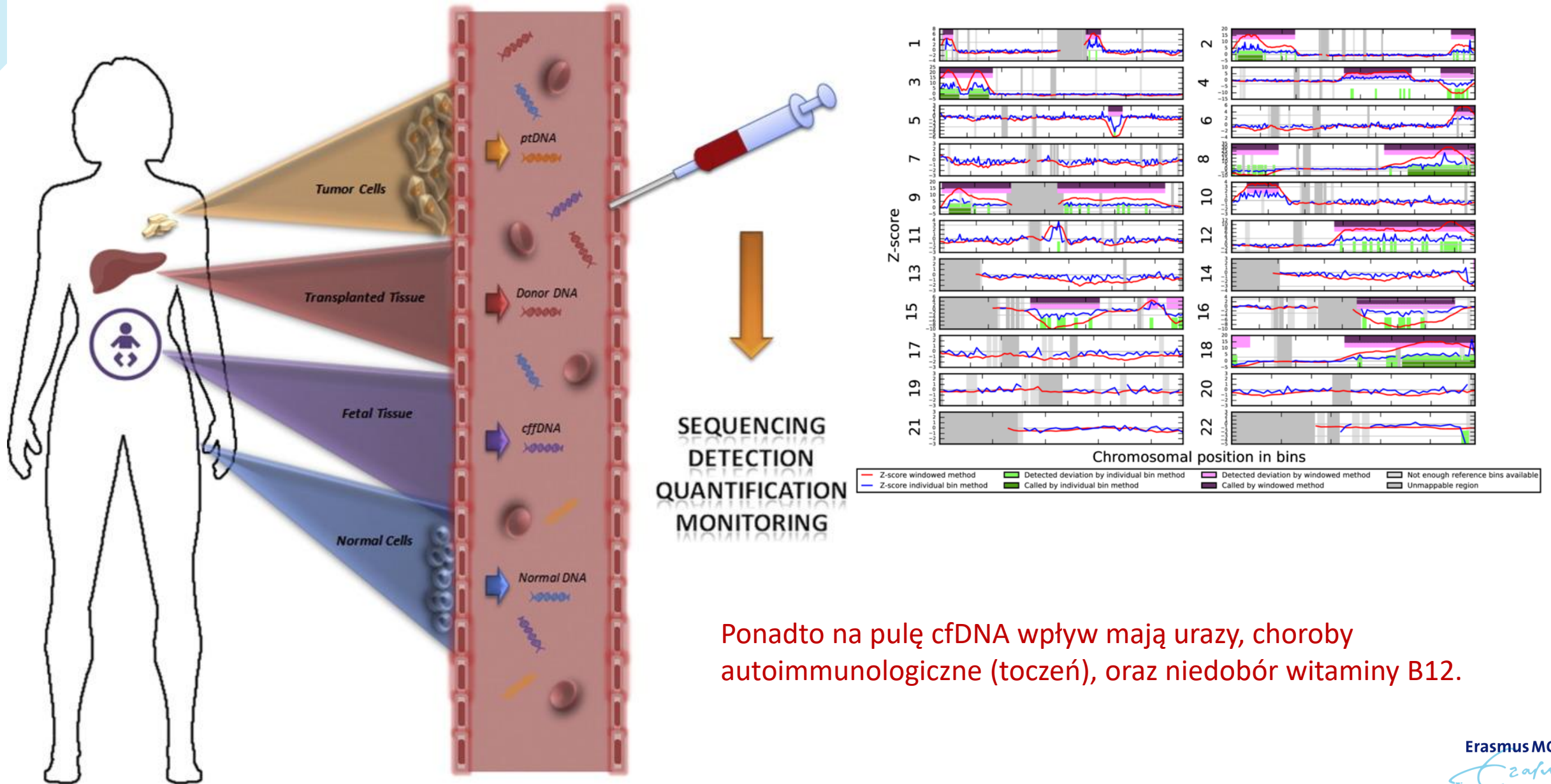
Trisomia 15 została następnie potwierdzona w badaniu metodą mikromacierzy w materiale płodowym.

Konkluzja: nie ma konieczności dalszych badań, pozytywny wpływ na stan psychiczny pacjentki – po wyjaśnieniu przyczyny poronienia pacjentka lepiej radzi sobie z utratą ciąży.



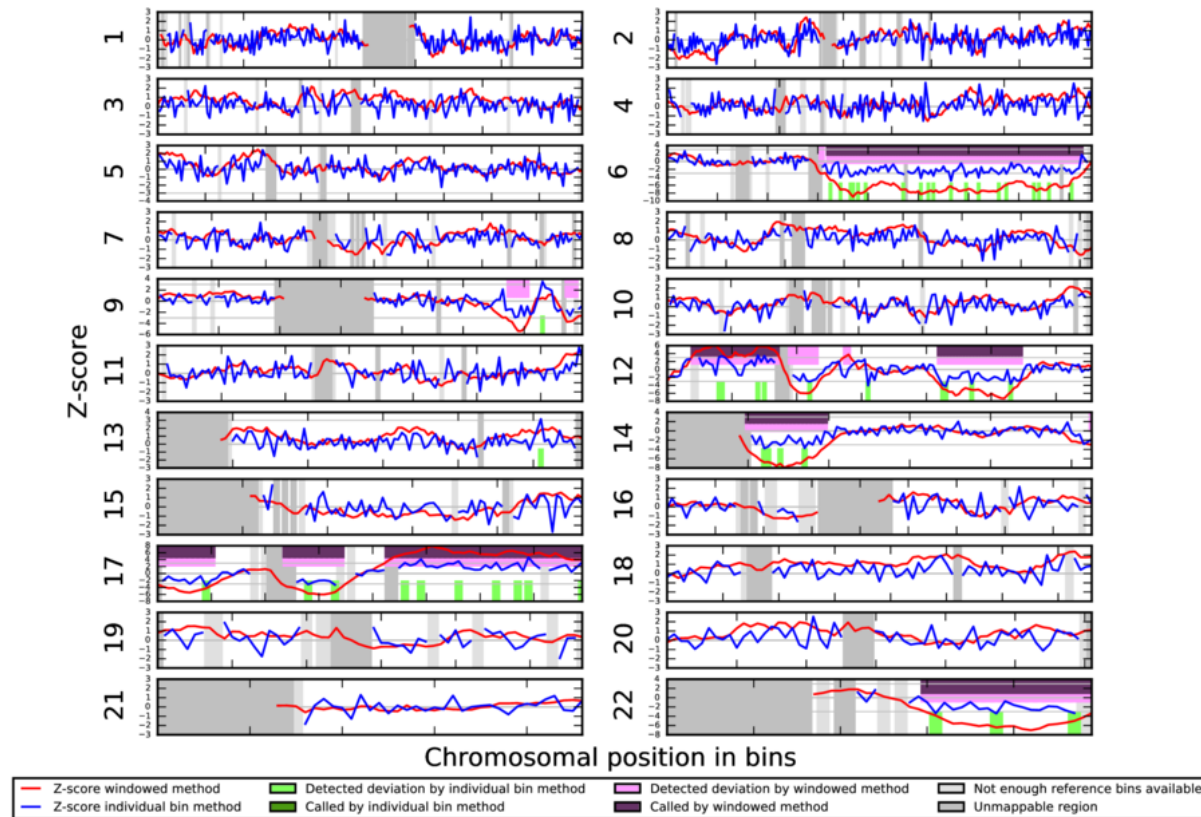
PROJEKT ORIGAMI – origin and genetic causes of recurrent miscarriage

POZOSTAŁE ŹRÓDŁA CF-DNA

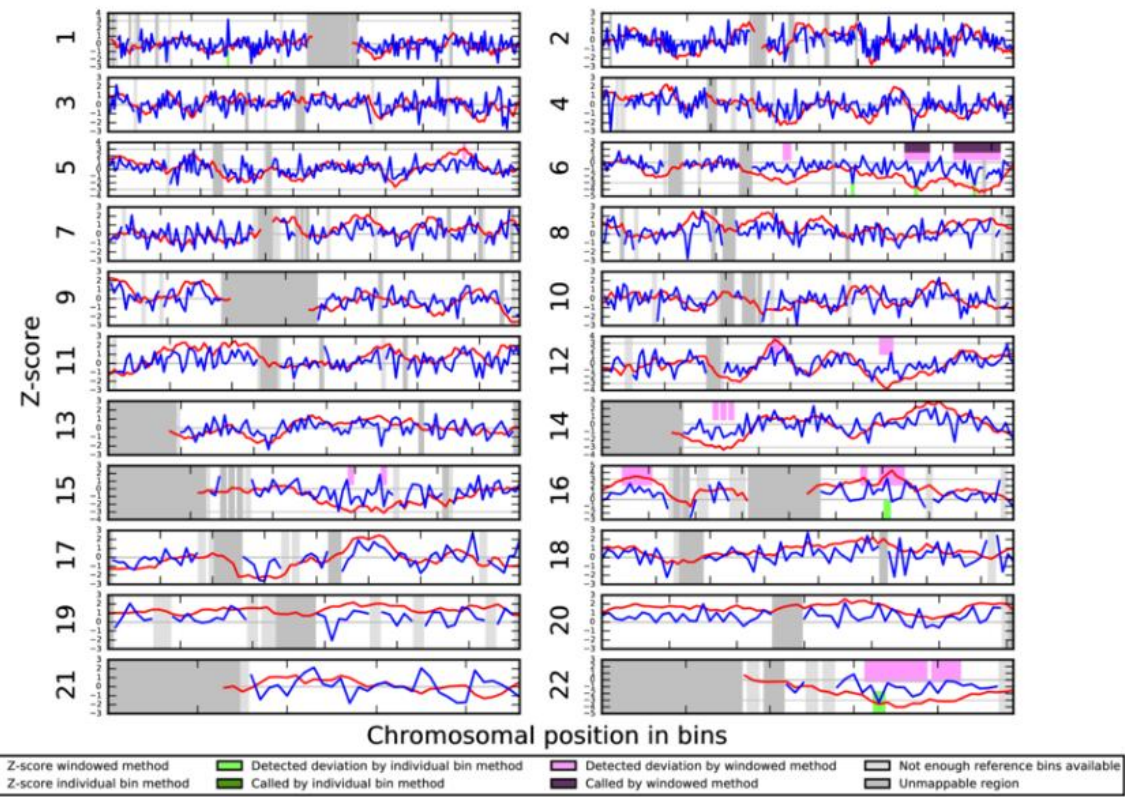


Ponadto na pulę cfDNA wpływ mają urazy, choroby autoimmunologiczne (toczeń), oraz niedobór witaminy B12.

MIĘŚNIAKI MACICY

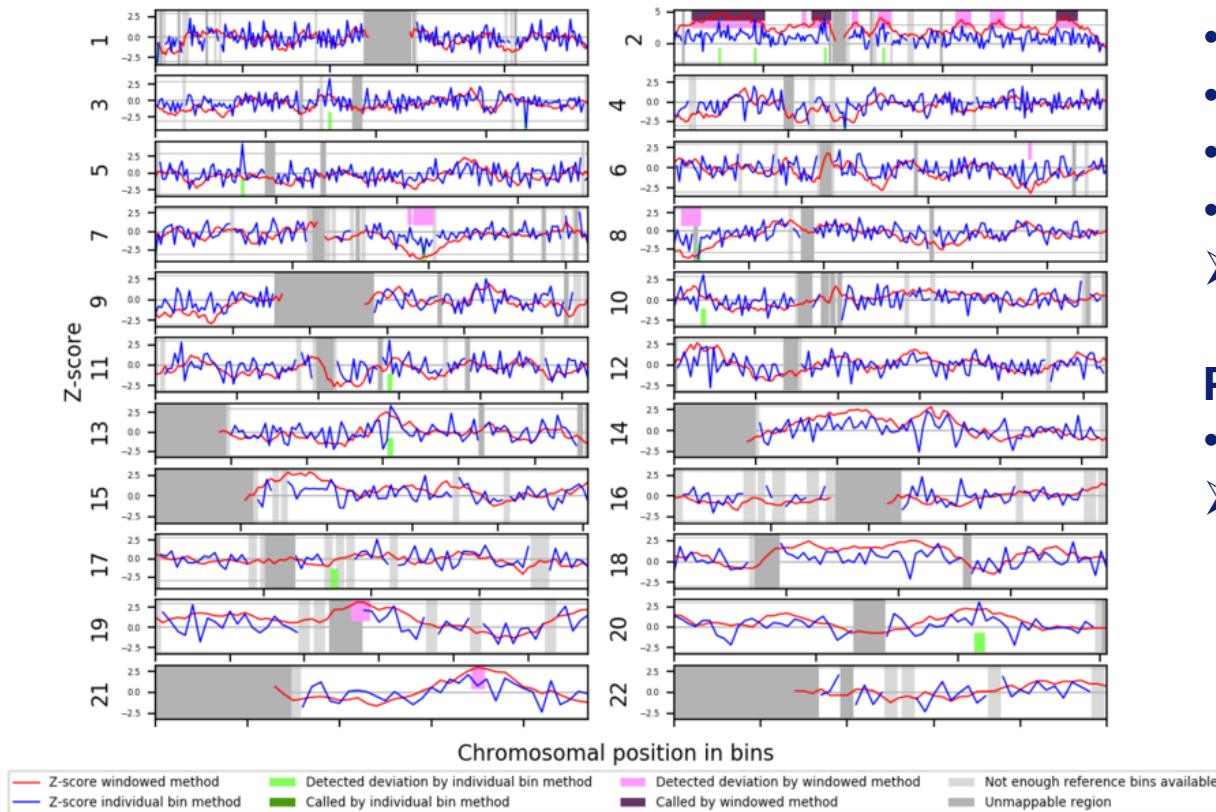


W trakcie ciąży (11,5 t.c. i 13,6 t.c.)



1 dzień po porodzie

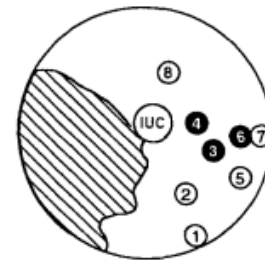
RZADKIE TRISOMIE CHROMOSOMÓW AUTOSOMALNYCH, NIE ZAWSZE MOZAIKOWOŚĆ OGRANICZONA DO ŁOŻYSKA



- Amniopunkcja 15w5d: prawidłowa
- Mikromacierz SNP w niehodowanych amniocytach
- Kariotyp z hodowli klonalnej: 46,XX[30]
- Badanie z krwi matki prawidłowe
- Mozaikowość ograniczona do łożyska (CPM)?

PO PORODZIE:

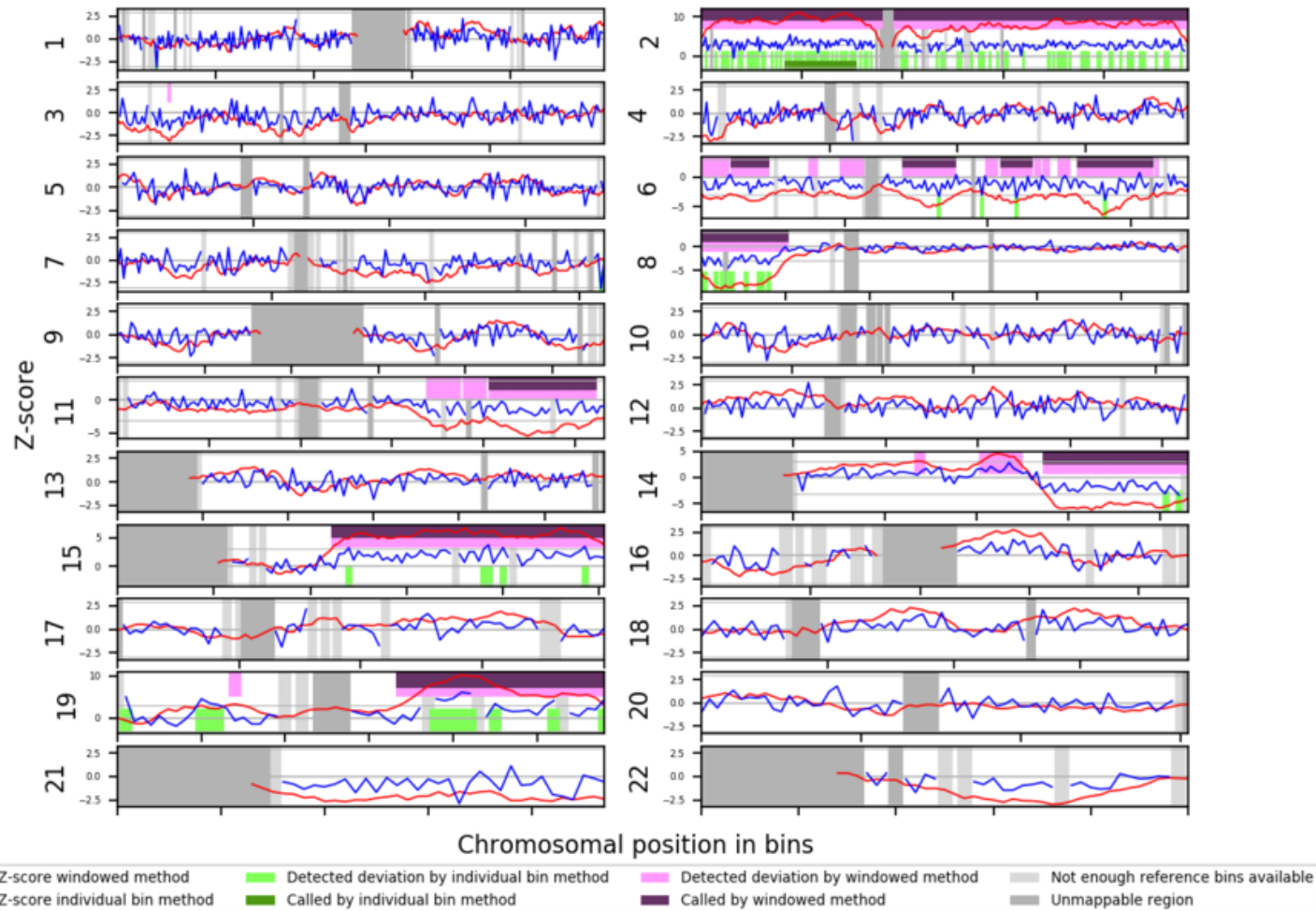
- Łożysko prawidłowe (4 biopsje)
- Powtórzyć badanie z cfDNA



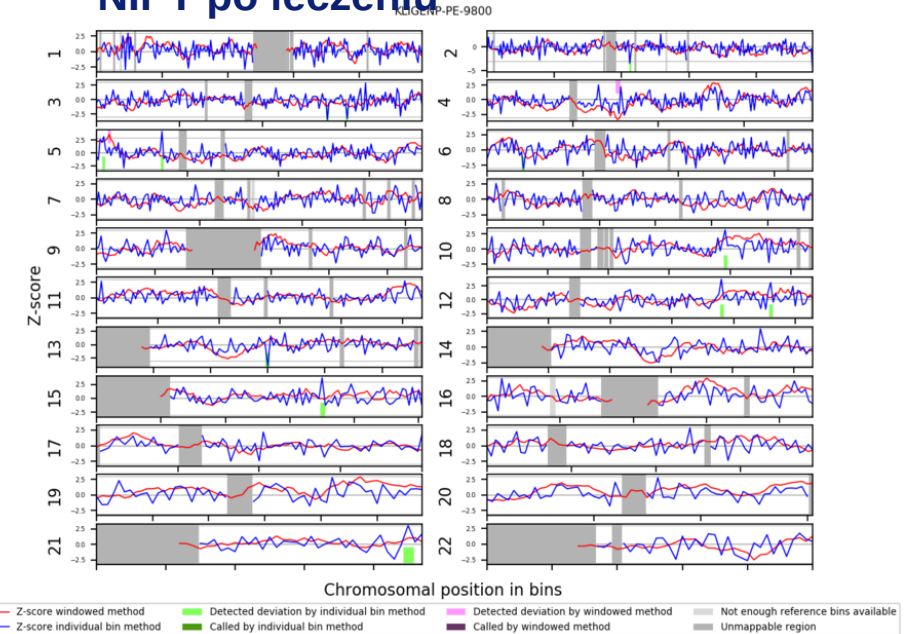
Różnorodność
lokalizacji w łożysku

NIPT PO PORODZIE

Diagnoza:
Chłoniak



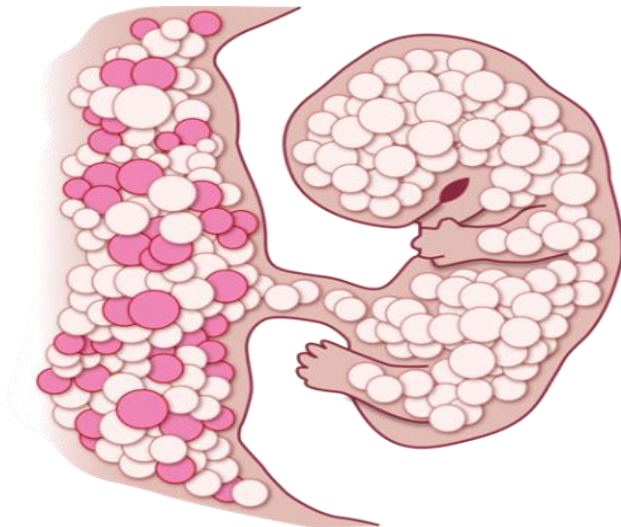
NIPT po leczeniu



“FAŁSZYWIE POZYTYWNE” WYNIKI NIPT?

Niemal nie istnieją, jeśli:

- Laboratorium posiada niezbędne doświadczenie oraz polega na co najmniej 2 różnych algorytmach do analizy,
- Powtarzane są wyniki wątpliwe lub pokazujące sprzeczny wynik w dwóch algorytmach
- Przeprowadza się niezbędne badania w materiale pochodzącym z kosmówki, od płodu oraz matki



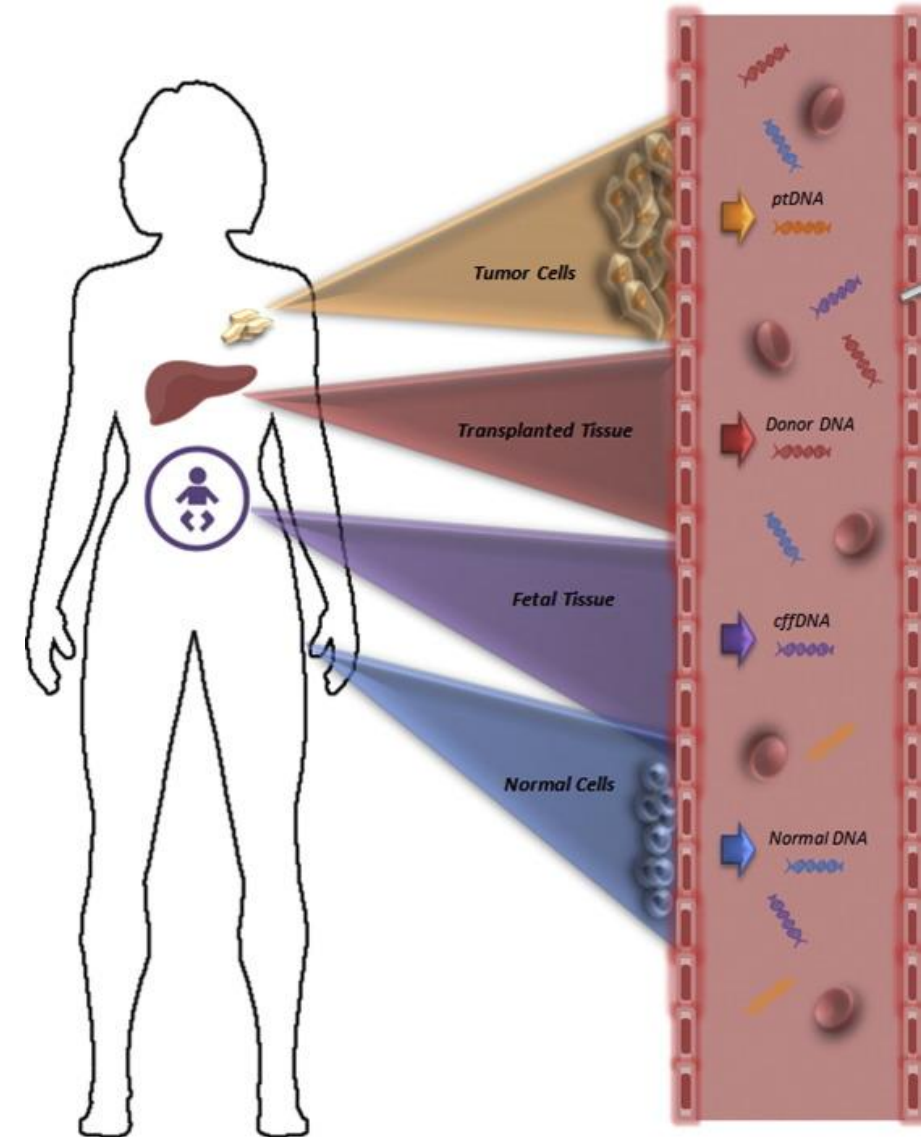
Znikający bliźniak???

*Rezultat fałszywie pozytywny
(z ang. false-positive result) - test, w
którym zaraportowano defekt, który nie
występuje w przedmiocie testów.*

INTERPRETACJA POZYTYWNEGO WYNIKU NIPT

NIPT może wykazać pozytywny wynik z różnych powodów, gdy aberracja chromosowa występuje:

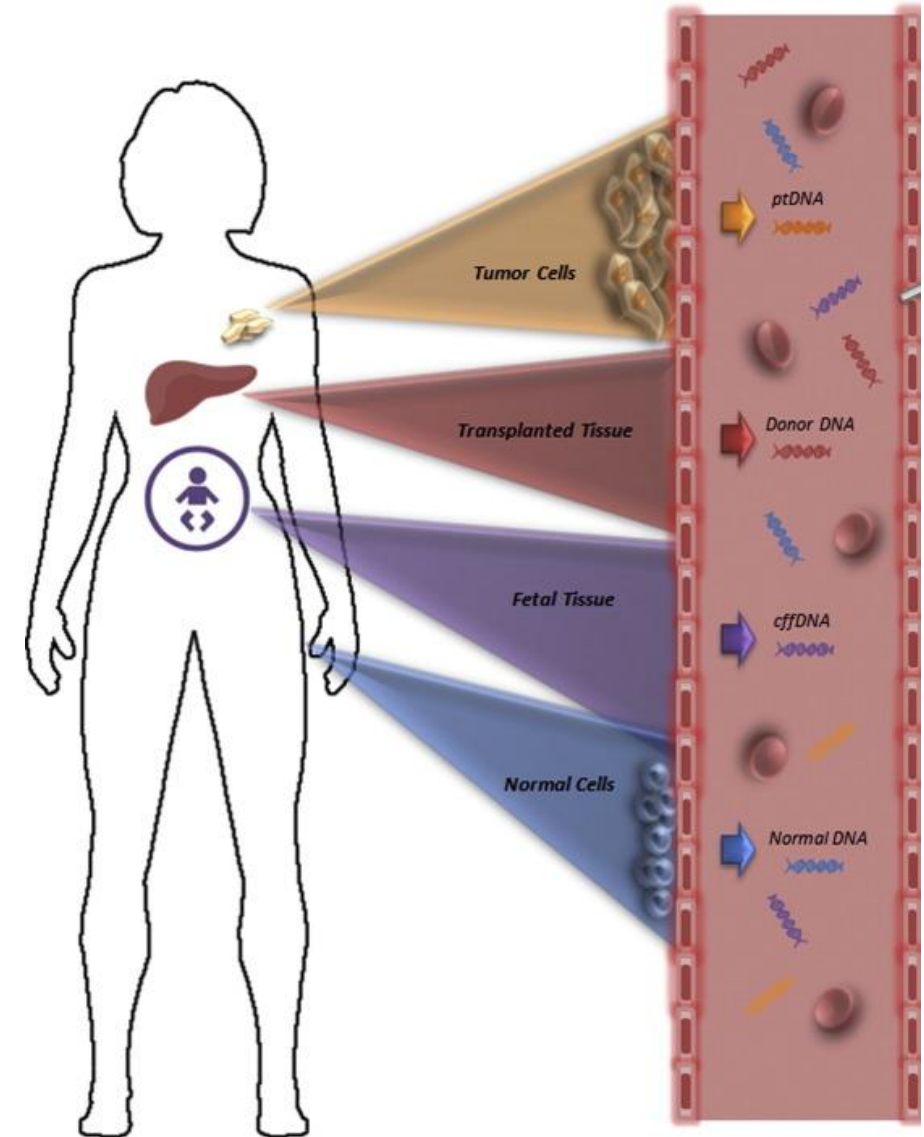
- 1) u płodu i w łożysku
- 2) występuje tylko w łożysku
- 3) wynika z obecności znikającego bliźniaka (vanishing twin)
- 4) dotyczy mięśniaków macicy
- 5) występuje w formie mozaikowej w genomowym DNA ciążarnej
- 6) występuje w formie mozaikowej w innych narządach ciążarnej (np. w postaci nowotworu)



INTERPRETACJA POZYTYWNEGO WYNIKU NIPT

Do interpretacji wyniku NIPT mogą być niezbędne:

- 1) Badanie inwazyjne w ciąży (biopsja kosmówki lub amniopunkcja)
- 2) Jeśli pacjentka nie decyduje się na badanie inwazyjne – badanie z krwi pępowinowej po porodzie
- 3) Badanie genomowego DNA matki
- 4) Badanie próbek z łożyska po porodzie
- 5) Analiza (hemato) onkologiczna



UWAGI KOŃCOWE

Genome-wide NIPT nie jest badaniem wyłącznie płodu:

- Aberracje płodowe lub kosmówkowe
- Aberracje matczyne – tzw. konstytucyjne, dotyczące genomowego DNA
- Somatyczne aberracje matczyne – powstające w trakcie rozwoju w tkankach po urodzeniu, mogące wskazywać na obecność np. nowotworów

Rozbieżne wyniki dodatnie = “fałszywie” pozytywny wynik NIPT może wskazywać na:

- u ciężarnej ryzyko powikłań np. preeklampsji
- u płodu ryzyko niskiej masy urodzeniowej / zaburzeń wzrostu płodu z powodu aberracji łożyskowych

GW-NIPT to dobry test przesiewowy wykrywający translokacje niezrównoważone u płodu

GW-NIPT to dobry test wykrywający aberracje chromosomowe w przypadku poronienia

ACKNOWLEDGEMENTS

Erik Sistermans
Robert-Jan Galjaard
Merryn Macville
Lidewij Henneman
Caroline Bax
Mireille Bekker
Jeanine van der Ven
Mijntje Pieters
Elles Boon
Servi Stevens
Karuna van der Meij
Lisanne van Prooyen
Karin Heesterbeek
Sandra van 't Padje
...

- All members of the NIPT Consortium
- All employees of NIPT-laboratories:
Elles Boon (Amsterdam UMC, VUmc),
Servi Stevens (Maastricht)
Diane Van Opstal (Erasmus MC)
- RIVM Centrum voor
Bevolkingsonderzoek
- Regionale Centra voor prenatale
screening
- Erfocentrum
- VSOP

My lab, counseling and
fetal medicine colleagues
at Erasmus MC

Thanks to:
All members of the NIPT Consortium



Dziękuję za uwagę



Erasmus MC
University Medical Center Rotterdam

