

Non-invasiv prænatal test for føtale trisomier

Non-invasive prænatale screeninger er et felt i rivende udvikling. Screeningen mindsker brugen af moderkagebiopsier og fostervandsprøver og derved den medfølgende abortrisiko, ved at undersøge en blodprøve fra den gravide.

I 1997 blev det bevist, at der findes frit føtalt DNA cirkulerende i moderens blod under graviditeten (1). Det føtale DNA i den gravide kvindes blod stammer dog ikke direkte fra fostret, men fra det yderste celleglag af moderkagen (cytotrophoblastlaget) (2) side om side med frit DNA fra den gravide selv. Det cellefrie DNA (cfDNA) i plasma er allerede nedbrudt til kortere stykker. Endvidere er det føtale DNA kortere end det maternelle med middellængder på 150 bp og 180 bp respektivt (3). Man kan derfor ved hjælp af en simpel blodprøve fra den gravide undersøge for unormale bidrag fra fosters kromosomale DNA og derved screene for føtale trisomier, uden at den gravide skal undergå et invasivt indstik samt den medfølgende abortrisiko.

NIPT i Region Hovedstaden

Non-invasiv prænatal test (NIPT) er taget i brug i Region Hovedstaden fra 1. september 2015, og der er på nuværende tidspunkt kørt flere end 500 analyser. I Danmark tilbydes alle gravide en første trimester screening (omkring graviditetsuge 12) af deres foster. Screeningen består af en måling af nakkefoldens tykkelse ved ultralyd samt niveauet af proteinerne Pregnancy Associated Plasma Protein A (PAPP-A) og Choriongonadotropin beta-kæde (β -hCG) i en blodprøve. Kombineret med den gravides alder bruges målingerne til at estimere risikoen for Downs syndrom hos fostret. Viser resultatet forhøjet risiko, tilbydes den gravide en moderkagebiopsi for at klarlægge fostrets kromosomer nærmere. Højrisikogruppen er defineret ved en føtal trisomi risiko $> 1:300$ baseret på første trimester screeningen. NIPT bliver tilbudt som alternativ til moderkagebiopsien til gravide med en høj risiko for føtal Downs syndrom samt til enkelte mindre grupper som gravide med tidligere trisomi 13, 18 eller 21 undtagen gravide med særlig høj risiko (ved føtale misdannelser, nakkefold $> 3,5$ mm, meget lav PAPP-A eller β -hCG, meget høj β -hCG, kvinder > 45 år) som tilrådes en invasiv prøve. NIPT har dog den ulempe i forhold til invasive prøver, at man analyserer en blanding af moderens DNA og DNA frigivet fra fostret/moderkagen, hvor moderens bidrag typisk udgør 90 %. Det giver nogle helt særlige udfordringer, da man ikke kan adskille de to komponenter, og NIPT baserer sig derfor på "optælling" af hvert kromosoms bi-

drag til den samlede prøve. Er der f.eks. en statistisk relevant forhøjelse i mængden af data observeret på kromosom 21 i en prøve i forhold til referencen (figur 1), må man konkludere, at der er en væsentlig forhøjet sandsynlighed for, at det ekstra materiale kommer fra moderkagen, og at der derfor er en stærk indikation for, at fostret har Downs syndrom (trisomi 21).

Implementering af NIPT på Rigshospitalet

På Rigshospitalet har vi valideret og implementeret NIPT for føtal trisomi 13, 18 og 21, som er de mest hyppigt observerede. Da metoden baserer sig på screening af det samlede DNA, vil man også kunne identificere trisomier fra andre kromosomer, men da disse er yderst sjældne er en egentlig validering ikke mulig. Validering og implementering samt en detaljeret beskrivelse af vores analyse er publiceret for nylig (4). Selvom man længe har vidst, at der i plasma findes frit (ikke cellebundet) føtalt og maternelt DNA, er det den teknologiske udvikling med massiv parallel sekventering eller next-generation sequencing (NGS), der har drevet udvikling af analysen. Sekventering benyttes til at bestemme basesammensætningen i DNA'et, og NGS har efterhånden overtaget den traditionelle Sanger-sekventering på mange afdelinger. Forskellen er, at man i stedet for kun at kunne sekventere et eller to gener ad gangen, nu kan sekventere flere hundrede af gener eller hele genomet samtidigt. Metoden kom frem i 2004 og var revolutionerende, da man med denne metode pludseligt kunne kortlægge det fulde humane genom på ca. et døgn, hvor det førhen tog år. Med NGS kan man bestemme basesammensætningen af de millioner af maternelle (ca 180 bp) og føtale (ca 150 bp) cfDNA-fragmenter, og de enkelte kromosomers bidrag til den samlede prøve kan derfor bestemmes. En typisk NGS datafil vil indeholde ca. 15.000.000 fragmenter (reads), og vi har derfor en stor mængde observationer, der kan benyttes til den videre analyse.

Prøvegang

Arbejdet fra modtagelsen af prøven til sekventering er tidskrævende (Figur 2). Forberedelsen af prøverne deles op i forskellige trin, som kort gennemgås her.



Af
Bioanalytiker // **Karina Nørgaard**

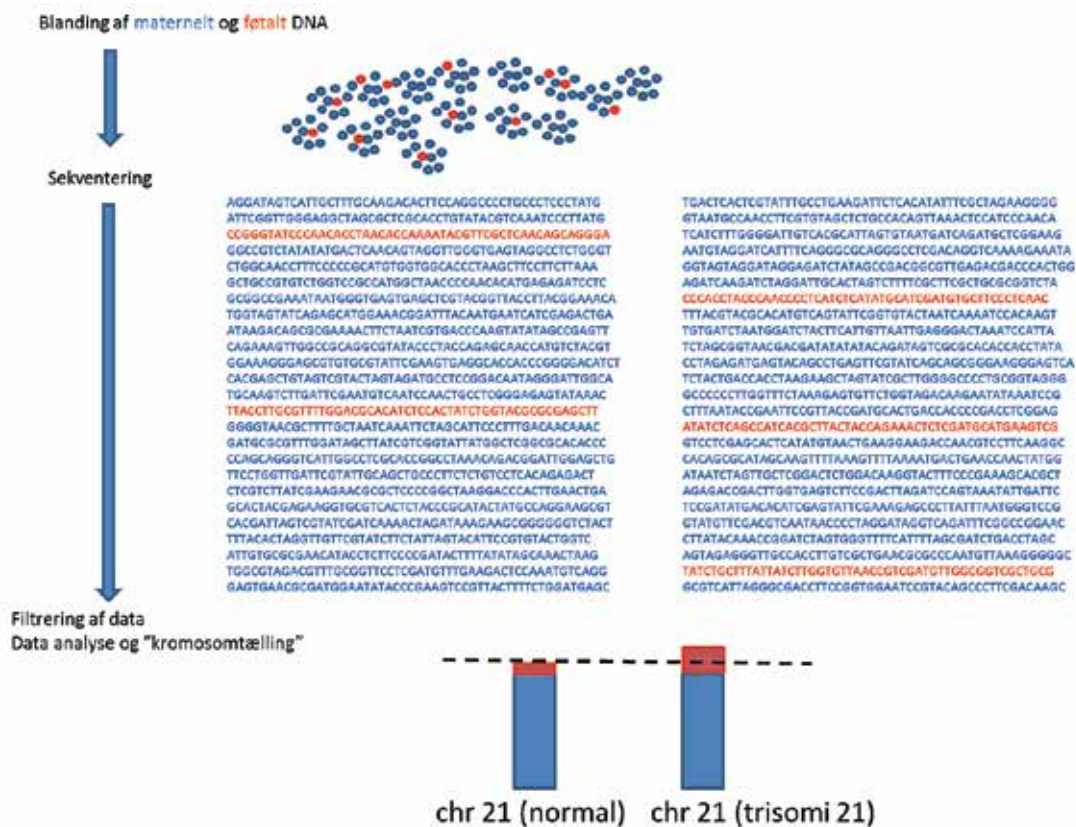
M.Sc, Ph.D // **Marie Balslev-Harder**

Overlæge dr. med // **Susanne Kjærgaard**

M.Sc, Ph.D // **Peter Johansen**

Kromosomlaboratoriet, Klinisk Genetisk Klinik, Rigshospitalet, København.

Figur 1 Oversigt over princippet bag NIPT. Blå repræsenterer det materielle bidrag. Rød repræsenterer det føtale. Hvis man til slut observerer en væsentligt forhøjet mængde af observeret kromosom 21, konkluderes det, at fostret har høj sandsynlighed for trisomi 21.



Plasmaisolering: Blodprøver på de gravide tages i to til 10 mL Streck rør. Til disse rør er der tilsat et cellestabiliserende stof, der stabiliserer cellefrit DNA (cfDNA) og holder leukocytter intakte, derved undgås tilblending af maternelt DNA fra leukocytter. Blodprøven kan holde sig op til 14 dage ved stuetemperatur i disse glas inden isolering. Det første trin er at isolere plasma, dette gøres ved to centrifugeringer på henholdsvis 1600 g og 15.500 g. For at få tiltrækkelig føtal DNA bruges 4 mL plasma til oprensning.

Oprensning: Oprensningen af cfDNA foregår automatiseret (QiaSymphony, Qiagen). Der benyttes et Virus/Pathogen kit baseret på magnetiske kugler. Den store inputmængde forlænger oprensningstiden. Ti prøver tager ca. to timer, og der elueres i 60 µL.

Adaptorligering: Som tidligere sagt findes det frie føtale DNA i fragmenter på 150-180 bp, dvs. så korte at ingen yderligere fragmentering er nødvendig. Der liggeres en adaptor på i hver ende af de dobbeltstrengede DNA-fragmenter. Inden ligation repareres enderne enzymatisk. En adaptor er et oligonucleotid, hvor base-rækkefølgen er kendt. Adapteren har i den ene ende yderligere 6 nukleotider, der kan variere, en form for DNA "stregkode", der gør det muligt at sekventere flere prøver samtidigt, da man kan adskille dem fra hinanden igen bioinformatisk.

Adaptorligeringen og reparation af enderne samt fjernelse af lange og ekstremt korte fragmenter foregår automatisk (Library Builder, Applied Biosystems). Her tilsættes de 60 µl oprenset cfDNA, adaptorer med forskellige stregkoder samt Ampure XP kugler. Library Builderen har en kapacitet til 13 prøver, og en kørsel tager 2,5 time.

Amplificering med PCR: Da udbyttet er lavt efter adaptorligeringen, amplificeres efterfølgende med en PCR på 6 cykler, her benyttes adaptorssekvensen som primer bindingssted. Antallet af cykler holdes på et minimum for at minimere antallet af PCR-duplikater. Herefter fjernes overskydende primer og primer-dimerer med Ampure XP kugler.

Kvantitering af library DNA: Mængden af DNA, som påføres sekventeringschippet, er meget vigtig. Koncentrationen af det amplificerede library bestemmes ved en kvantitativ PCR (qPCR). Fordelen ved at lave en qPCR frem for at benytte en fluorescens eller spektroskopisk metode er, at kun koncentrationen af fragmenter med lignede adaptorer bestemmes. qPCR udføres med kittet "Ion library Quantitation Kit".

Hybridisering af fragmenter til kugler, emPCR og loading af chip: På en fuldautomatiseret robot (Ion Chef, Life Technologies) hybridiseres DNA-fragmenter til sekventeringskugler. Efter hybridisering separeres hver sekventeringsbead med bundet DNA fragment i mikroskopiske oliedråber, og fragmenterne amplificeres ved emulsions-PCR (emPCR). Ved senere sekventering er det vigtigt, at kun ét DNA-fragment er hybridiseret til én bead, ellers mislykkes sekventeringen af fragmentet, da den pågældende sekventeringsbead bliver polyklonal. Koncentration er derfor nøgleordet. Tilsættes for meget DNA, fås for mange polyklonale sekventeringskugler, tilsættes for lidt DNA spildes en masse plads på chippen med kugler uden DNA-fragmenter. Ved en kort centrifugering udplades sekventeringskugler i en sekventeringschip, der i teorien fungerer som en PCR-plade med mere end 150.000.000 brønde. Hver sekventeringsbead passer præcist i en brønd på sekven-

teringschippen. Efter udpladningen er sekventeringschippen klar til sekventering. Hele denne proces (emPCR og udpladning) tager omkring 14 timer, typisk startes robotten om eftermiddagen, og chippen er klar til sekventering næste dag. Ion Proton benytter sig af halvleder-sekventering, der foregår ved, at de 4 nucleotider (ATP, TTP, GTP, CTP) også kaldet baser skylles i et bestemt flow igennem chippen; passer basen komplementært til et DNA-fragment bundet til en sekventeringsbead, frigives en hydrogenion, hvilket medfører en pH-ændring. Denne ændring indebærer en ændring i ledningsevne, der kan måles, og derved kan den nøjagtige baserækkefølge bestemmes. Alle brøndene aflæses på samme tid, heraf navnet massiv parallel sekventering. Der køres to chip ad gangen på Ion Chef, og hver chip har plads til en pool med fem prøver i hver. Efter sekventering adskilles prøverne på baggrund af deres unikke DNA strekkode og kortlægges til det humane genom.

Analyse af NGS-data

Analysen af sekvensdata i denne størrelsesorden er meget krævende både tids- og IT-mæssigt. En typisk datafil vil være i størrelsesordenen 8-15 GB alt efter opsætningen, og der kræves derfor en god IT infrastruktur. Det første skridt er at fjerne overflødig data, der kan give støj i analysen. Da analysen baserer sig på at "tælle" kromosomer, er det vigtigt, at man kun beholder data af høj kvalitet. Herudover er der to PCR step involveret, og man skal derfor have fjernet duplikater, så disse ikke påvirker datamængden på de enkelte kromosomer. Når dette er gjort, har man typisk 50-60 % af sit datasæt tilbage.

Herefter følger selve trisomianalysen. Det næste skridt er at inddelle sit DNA i stykker. I praksis "tæller" man, hvor mange DNA-stykker der findes pr 1.000.000 baser i sit genom. Dette gøres, fordi man i denne metode har sit data spredt udover hele det menneskelige genom, man kan derfor ikke bestemme andet end kvantitative variationer med NIPT.

Når alle stykker er talt op, korrigerer man for indholdet af GC-baser. Dette skal gøres, fordi man på grund af de tidligere PCR step vil observere en lavere mængde data i områder, der har et fattigt eller et rigt indhold af GC-baser. Hvis dette ikke gøres, vil man i disse områder observere en lavere mængde data, der kan fejlfortolkes som deletioner. Når man nu har sine opdeltede GC-korrigerede data, sammenligner man indholdet af data for hver 1.000.000 baser med et referencesæt bestående udelukkende af prøver, hvor der er født børn uden trisomier. Ved denne analyse vil man få en Z-score, der benyttes til at indikere, om der er en forøget mængde data i den analyserede prøve. Derudover kigger man på, hvor stor en del af kromosomet der har en Z-score over grænseværdien. Hvis en vis del af kromosomet har en Z-score, samt den samlede kromosomale Z-score er større end grænseværdien, konkluderes det, at der er forhøjet risiko for, at fostret har trisomi.

Udover trisomianalysen rapporteres også fosterkønnet, der baseres på en analyse af Y-kromosomalt indhold i prøven. Da der i NGS data altid vil være sekvenser, der kortlægges til Y-kromosomet grundet den repetitive struktur af dette kromosom, er kønsanalysen groft sagt; højt indhold af Y data = dreng, lavt indhold af Y = pige. Der er desuden flere kvalitetsparametre, der skal være opfyldt for, at man kan afgive et gyldigt svar. Den samlede mængde data skal være over en vis grænse. Vi bestemmer det føtale DNA-bidrag til den samlede prøve (føtal fraktion), som skal være over en grænseværdi, for at analysen

kan svares. Herudover vurderer vi også, om længden af fragmenter i prøven opfylder en vis fordeling. Hvis der er mange lange fragmenter, kan det skyldes en øget frigivelse af DNA fra moderen, der i sidste ende kan maskere DNA-bidraget fra moderkagen, hvilket ugyldiggør analysen. Fra oprensning til færdig analyse tager fire laboratoriedage. Men da vi skal køre ti prøver i en kørsel, loves svar inden for ti hverdage.

Erfaringer

Der er mange aspekter, der skal tænkes igennem, inden opstart af NIPT. NGS er i konstant udvikling, og udbuddet af forskellige platforme er stort. NGS producerer enorme mængde af data, der skal bearbejdes og lagres. Der skal tages stilling til alle dele af processen. I følgende afsnit beskriver vi erfaringer og overvejelser, vi har gjort os på vejen mod implementering.

Blodprøveglas: I opstartsfasen blev blodprøverne taget i almindelig EDTA-rør, hvor plasmaisoleringen skal foretages inden for to timer, da der ellers vil observeres lysning af maternelle celler (5). For at øge fleksibiliteten samt være i stand til at modtage prøver fra andre hospitaler, valgte vi at gå over til de væsentligt dyrere celledestabiliserende blodprøveglas, her var det vigtigt at oplyse afdelingerne om, hvordan disse glas skal behandles for at undgå hæmolyse (ingen kraftige ryst eller køl). Da kun 10 % af det DNA, der sekventeres, er føtalt, er det vigtigt at behandle blodprøverne korrekt og sørge for at minimere sprængningen af hvide blodlegemer. Det føtale DNA må ikke drukne i maternelt DNA.

Centrifugering af blodprøver: Det er vigtigt at være opmærksom på, at isolationen af plasma typisk foregår i to trin. En centrifugering på 1600g. Herefter udtages plasma, som så centrifugeres ved 15.500g. Det er vigtigt at være opmærksom på, at ikke alle rotorer kan klare større glas ved 15.500g, det kan derfor være en nødvendighed at anskaffe en sådan.

Oprensning af DNA: Manuel oprensning af cfDNA er absolut en mulighed, og udbyttet af DNA er godt, dog er metoden tidskrævende og involverer mange pipetteringer, hvilket gør den mindre velegnet til et stort prøveflow. Vi valgte en Qiasymphony, DNA-udbyttet er pt lidt lavere end ved den manuelle oprensning, til gengæld er den føtale fraktion den samme. Da vi benytter 4 mL plasma er markedet for oprensningsrobotter begrænset. Ønskes det kun at benytte 1 mL plasma til DNA-oprensning, er der flere muligheder. Qiasymphonyen har en kapacitet op til 48 prøver ved oprensning af 4 mL plasma.

Konstruktion af sekventeringsbiblioteker: Med kittet Ion Plus Fragment Library kit kan sekventeringsbiblioteket konstrueres manuelt, men ligesom ved DNA-oprensningen er det tidskrævende. Allerede fra start anskaffede vi os den automatiserede Library Builder. Dels for at undgå alle pipetteringer, men også for at få et mere ensartet output materiale.

Valg af sekventeringsprincip: Det er vigtigt at gøre sig overvejelser omkring, hvilket sekventeringsprincip man ønsker at benytte, dvs. helgenomsekventering (alle kromosomer, med lav dækning) kontra targeteret sekventering (kromosom 13,18 og 21 med dyb dækning). Vi har valgt helgenomsekventeringsprincippet, hvilket har højere omkostninger end targeteret se-

Figur 2 Oversigt over arbejdsgangen til NIPT



kventering, men samtidig er mere fremtidsikkert og en hypotesefri undersøgelse, da alle kromosomer sekventeres på samme tid. Ved helgenomsekventering vil man generere væsentligt mere data end ved en targeteret tilgang, og man skal derfor have en korrekt IT infrastruktur på plads, hvis man vælger helgenomsekventering. Vi havde store udfordringer med den enorme mængde af data, dette blev løst med anskaffelsen af en virtuel server.

Platform til NGS: Der findes flere forskellige platforme til NGS med forskellige sekventeringsprincipper. Vi har valgt Ion Proton™ fra Life Technologies til NIPT, da det på købstidspunktet var den platform med den hurtigste turn-around tid, hvilket er vigtigt, da de gravide skal have svar på analysen så hurtigt som muligt. Derudover passede mængden af produceret data godt til vores forventede prøveindtag.

Dataanalyse: Det er naturligvis vigtigt at validere sin analyse. Det er vigtigt at have prøver, man kan teste, inden man udbyder NIPT. Både trisomi- og normalprøver er vigtige. For NIPT er det meget vigtigt at analysere et større antal normale prøver, både til udarbejdelse af referencemateriale, og fordi en stor del af de prøver, man vil give svar på, vil være negative. Prøver med føtal trisomi er naturligvis uvurderlige for at teste om ens analyse virker, jo flere jo bedre. Det kan være en god ide at begynde prøveopsamlingen lang tid før, man planlægger at validere, da man derved kan opbygge et stort antal prøver her til. Selve den bioinformatiske analyse er naturligvis et meget vigtigt punkt. Vi har valgt at benytte os af publicerede open-source analysemetoder (6, 7) for at have fuld kontrol over analyse og udvikling. Men der er også mange kommercielle løsninger, der kan benyttes, hvis man ønsker det. Det er vigtigt at kigge på, om der er laboratorier, man kan opnå metodefællesskab med, så der kan udveksles prøver og erfaringer. En komplet NIPT-analyse inkluderer, efter vores mening, trisomi-analyse, føtalt køn samt føtal DNA-fraktion som kvalitetsparameter.

Konklusion

Det er bestemt muligt at sætte NIPT-analysen op laboratoriemæssigt og kun ved hjælp af offentligt tilgængelige analysemetoder til dataanalyse. Det kræver dog erfaring med optimering af laboratorieprocesser samt adgang til personer med erfaring i Linux/Unix systemer. Som ved enhver laboratorieanalyse er det vigtigt at tænke hvert skridt igennem inden opsætningen. Dette er specielt vigtigt for NIPT, da de enkelte skridt (hvilke der er mange af) påvirker arbejdsgangen og den kvalitet data, man kan forvente at få ud. Det er desuden yderst vigtigt at have adgang til et større antal prøver til validering. □

Referencer:

1. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 1997; **350**, 485–487.
2. Faas BH, de Ligt J, Janssen, I, *et al.* Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012; **12**, S19–S26
3. Tsui, NBY, Jiang P, Chow KCK., *et al.* High Resolution Size Analysis of Fetal DNA in the Urine of Pregnant Women by Paired-End Massively Parallel Sequencing. *PLoS ONE* 2012; **7**, e48319.
4. Johansen P, Richter SR, Balslev-Harder M, *et al.* Open source non-invasive prenatal testing platform and its performance in a public health laboratory. *Prenat. Diagn.* 2016. doi:10.1002/pd.4819.
5. Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, *et al.* Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin. Biochem.* 2013; **46**, 1099–1104.
6. Straver R, Sistermans EA, Holstege H, *et al.* WISECONDOR: detection of fetal aberrations from shallow sequencing maternal plasma based on a within-sample comparison scheme. *Nucleic Acids Res.* 2013 doi:10.1093/nar/gkt992.
7. Kim SK, Hannum G, Geis J, *et al.* Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat. Diagn.* 2015; **35**, 810–815.