

INSTYTUT CENTRUM ZDROWIA MATKI POLKI
W ŁODZI

ZAKŁAD GENETYKI

Anna Nykel

Komentarz do cyklu publikacji

**„Wykorzystanie technologii digital PCR do detekcji aneuploidii u płodu
- opracowanie i implementacja nowego narzędzia diagnostycznego”**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor dr hab. n. med. Agnieszka Gach

Łódź, październik 2021

I. Wykaz prac z cyklu publikacji

Poniższy cykl publikacji obejmuje trzy prace oryginalne opublikowane w recenzowanych czasopismach. Badania zostały pozytywnie zaopiniowane przez Komisję Bioetyczną przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki (11.09.2018, nr opinii 74/2018).

1. **Nykel A**, Kaszkowiak M, Fendler W, Gach A. Chip-Based Digital PCR Approach Provides A Sensitive and Cost-Effective Single-Day Screening Tool for Common Fetal Aneuploidies—A Proof of Concept Study. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(21):5486; doi:10.3390/ijms20215486 (IF 4.556, MNiSW 140).

Indywidualny wkład: stworzenie koncepcji i projektu badania, wykonywanie eksperymentu, analiza i interpretacja wyników, analiza statystycznej, zapewnienie integralności całego badania, napisanie finalnej wersji manuskryptu. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy – 70%.

2. **Nykel A**, Woźniak R, Gach A. Clinical Validation of Novel Chip-Based Digital PCR Platform for Fetal Aneuploidies Screening. *Diagnostics.* 2021; 11(7):1131; doi.org/10.3390/diagnostics11071131 (IF 3.706, MNiSW 70).

Indywidualny wkład: stworzenie koncepcji i projektu badania, wykonywanie eksperymentu, analiza i interpretacja wyników, analiza statystycznej, zapewnienie integralności całego badania, napisanie finalnej wersji manuskryptu. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy – 70%.

3. **Nykel A**, Woźniak R, Gach A. The Influence of Maternal Cell Contamination on Fetal Aneuploidy Detection Using Chip-Based Digital PCR Testing. *Diagnostics.* 2021; 11(9):1607; doi.org/10.3390/diagnostics11091607 (IF 3.706, MNiSW 70).

Indywidualny wkład: stworzenie koncepcji i projektu badania, wykonywanie eksperymentu, analiza i interpretacja wyników, analiza statystycznej, zapewnienie integralności całego badania, napisanie finalnej wersji manuskryptu. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy – 70%.

Łączny Impact Factor cyklu publikacji: 11.968

Łączna punktacja MNiSW cyklu publikacji: 280

II. Wstęp

Szacuje się, że u około 3 – 5% wszystkich rozpoznanych klinicznie ciężych występują wady wrodzone spowodowane nieprawidłowościami chromosomowymi [1]. Najczęściej występującymi liczbowymi autosomalnymi nieprawidłowościami są trisomia chromosomu 21 pary (zespół Downa), trisomia chromosomu 18 pary (zespół Edwardsa) oraz trisomia chromosomu 13 pary (zespół Patau) [1]. Wady wrodzone mogą być również spowodowane nieprawidłowościami chromosomów płci (sex chromosomal aneuploidies, SCA), czyli nieprawidłową liczbą chromosomów X oraz Y. Aneuploidie chromosomów 13, 18, 21, X oraz Y odpowiadają za około 80% istotnych klinicznie nieprawidłowości chromosomowych diagnozowanych w okresie prenatalnym [2]. Podstawowym celem standardowej opieki prenatalnej jest identyfikacja kobiet z podwyższonym ryzykiem występowania aneuploidii u płodu za pomocą markerów biochemicznych i ultrasonograficznych w I i II trymestrze ciąży [3, 4].

Złotym standardem w inwazyjnej diagnostyce prenatalnej jest metoda cytogenetyki klasycznej. Jednak wiąże się ona z długim oczekiwaniem na wynik, dużym nakładem pracy i wysokimi kosztami. W praktyce klinicznej są również dostępne szybkie testy molekularne do oceny najczęstszych aneuploidii, jednak wykazują pewne ograniczenia. Obecnie najbardziej popularną szybką metodą jest real-time PCR [2, 5].

Bardziej nowoczesnym podejściem, umożliwiającym bezwzględną ocenę ilościową kwasów nukleinowych z wysoką czułością i specyficznością, jest technologia digital PCR (dPCR). Metoda jest oparta na partycji cząsteczek DNA na dziesiątki tysięcy dołków reakcyjnych. Koncepcja digital PCR została po raz pierwszy opisana w latach '90 [6]. Od tego czasu, technologia digital PCR jest używana do ilościowego oznaczania DNA w szerokim zakresie w testach genetycznych. Podstawą technologii digital PCR jest podział cząsteczki na partycje, reakcja amplifikacji jednocześnie w tysiącach dołków reakcyjnych oraz statystyka Poissona. Analiza danych jest oparta na oznaczeniu bezwzględnej liczby kopii sekwencji DNA w jednostce kopie/ μ L reakcji, obliczonej na podstawie liczby pozytywnych i negatywnych sygnałów [7].

W porównaniu do powszechnie używanej metody *real-time* PCR, digital PCR umożliwia bezwzględną ocenę liczby kopii z dużą precyzją, czułością i specyficznością bez odniesienia do krzywej standardowej [8, 9]. Ponadto, analiza oparta na dPCR jest niezależna od występowania alleli w populacji, co znacznie zwiększa uniwersalny charakter testu molekularnego.

Digital PCR jest relatywnie nową technologią. Dokładność, czułość i specyficzność sprawiają, że cyfrowa metoda jest coraz częściej wykorzystywana zarówno do celów naukowych, jak i diagnostyki medycznej. Opracowanie nowej molekularnej metody analizy z wykorzystaniem nowoczesnej technologii może poszerzyć dostępną ofertę diagnostyczną, tym samym wpływając na polepszenie opieki nad pacjentem.

III. Cel pracy

1. Opracowanie i walidacja nowej metody z wykorzystaniem nowoczesnej technologii digital PCR do szybkiej analizy najczęstszych aneuploidii u płodu.
2. Określenie użyteczności klinicznej nowego narzędzia diagnostycznego digital PCR do detekcji aneuploidii na podstawie czułości i specyficzności.
3. Zdefiniowanie dokładności metody digital PCR do detekcji aneuploidii u płodu w przypadku występowania kontaminacji komórkami maczynymi.

IV. Omówienie publikacji składających się na cykl publikacyjny

Publikacja nr 1. Nykel A, Kaszkowiak M, Fendler W, Gach A. Chip-Based Digital PCR Approach Provides A Sensitive and Cost-Effective Single-Day Screening Tool for Common Fetal Aneuploidies—A Proof of Concept Study. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(21):5486

Cykl publikacji otwiera praca dokumentująca wyniki opracowania i walidacji nowej metody digital PCR do szybkiej identyfikacji najczęstszych aneuploidii u płodu. Jest to pierwsza opublikowana praca prezentująca wykorzystanie nowoczesnej technologii QuantStudio 3D Digital PCR w diagnostyce prenatalnej.

Celem badania było opracowanie i optymalizacja nowego narzędzia diagnostycznego do szybkiej oceny najczęstszych aneuploidii u płodu.

Grupę badaną stanowiły 133 kobiety w ciąży z podwyższonym ryzykiem wystąpienia aneuploidii u płodu, objęte diagnostyką inwazyjną w Poradni Genetycznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki. W każdym przypadku badanie przeprowadzono metodą cytogenetyki klasycznej oraz z wykorzystaniem digital PCR. Materiałem do badania było genomowe DNA izolowane z płynu owodniowego lub komórek trofoblastu.

Wyniki

1. Opracowanie protokołu badania z wykorzystaniem technologii digital PCR

Opracowano i zwalidowano nową metodę do jednoznacznego rozróżnienia próbek euploidalnych i aneuploidalnych w trzech reakcjach duplex z wykorzystaniem sond TaqMan komplementarnych do sekwencji na chromosomach 13, 18, 21, X oraz Y. Opracowana metoda umożliwia precyzyjną kwantyfikację pojedynczej cząsteczki bez odniesienia do krzywej standardowej. Protokół opiera się na sześciu etapach: ekstrakcji DNA, umieszczeniu mieszaniny reakcyjnej PCR na chipie, amplifikacji PCR w termocyklerze, detekcji sygnału fluorescencji oraz analizy danych za pomocą oprogramowania Cloud Software. Dla każdego chromosomu obliczono liczbę kopii poprzez dzielenie liczby kopii analizowanego chromosomu przez liczbę kopii chromosomu referencyjnego. Protokół badania jest łatwy w wykonaniu, wyniki można otrzymać w ciągu 4 godzin, a analiza danych nie wymaga zaawansowanych obliczeń i nie generuje dodatkowych problemów interpretacyjnych. Ponadto, koszty aparatu są dwa razy niższe niż innych dostępnych platform, co umożliwia łatwą i relatywnie taną implementację metody w laboratoriach o małej lub średniej przepustowości.

2. Walidacja metody na próbkach klinicznych

Wyniki uzyskane z 133 próbek wskazują, że technologia oparta na metodzie digital PCR umożliwia istotne statystycznie rozróżnienie pomiędzy próbkami euploidalnymi i aneuploidalnymi. Wyniki zostały uzyskane z każdej próbki, niezależnie od jakości i stężenia DNA. Ponadto, analiza krzywej ROC wykazała potencjalną użyteczność testu jako dobrego testu przesiewowego. Wyniki z badania wstępnego sugerują również, że uzyskanie wyniku właściwie klasyfikującego próbki jako prawidłowe lub nieprawidłowe jest możliwe nawet w przypadkach niskiego poziomu mozaikowości. Wszystkie uzyskane wyniki zostały potwierdzone metodą cytogenetyki klasycznej.

Wnioski

- 1. Digital PCR zapewnia statystycznie istotne rozróżnienie między próbkami euploidalnymi i aneuploidalnymi, zapewniając krótki protokół badania, niskie koszty, dużą precyzję oceny liczby kopii oraz łatwą implementację w praktyce klinicznej.**

2. Digital PCR jest dokładną metodą do szybkiej identyfikacji najczęstszych aneuploidii u płodu, nawet w przypadkach niskiego poziomu mozaikowości.

Publikacja nr 2. Nykel A, Woźniak R, Gach A. Clinical Validation of Novel Chip-Based Digital PCR Platform for Fetal Aneuploidies Screening. *Diagnostics*. 2021; 11(7):1131

Implementacja nowej metody w praktyce klinicznej wymaga określenia klinicznej użyteczności i identyfikacji kluczowych czynników wpływających na wyniki.

Celem pracy było sprawdzenie skuteczności i użyteczności diagnostycznej nowej metody analizy aneuploidii u płodu.

Badanie przeprowadzono w Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki u 505 kobiet w ciąży z podwyższonym ryzykiem występowania aneuploidii u płodu, poddających się inwazyjnej diagnostyce prenatalnej na podstawie nieprawidłowych wyników biochemicznych i/lub wyników badania USG. Materiałem do badania były płyn owodniowy oraz komórki trofoblastu, pobierane podczas rutynowej procedury diagnostycznej. Badanie przeprowadzono na 382 (75,6%) próbkach płynu owodniowego oraz 123 (24,4%) próbkach komórek trofoblastu. Z analizy wykluczono próbki, dla których nie uzyskano wyników kariotypu oraz próbki zanieczyszczone komórkami matki.

Wyniki

Jest to pierwsze badanie dokumentujące skuteczność kliniczną metody digital PCR w badaniu na dużą skalę. Kilkuletnie doświadczenie kliniczne w ocenie aneuploidii z wykorzystaniem metody digital PCR potwierdza przydatność tego rozwiązania w szybkiej diagnostyce prenatalnej.

Wyniki wskazują, że czułość i specyficzność wykrywania aneuploidii chromosomów 21, 18 i 13 pary wyniosły 100% (95% CI, 99,26–100%). Wyniki uzyskano dla każdej analizowanej próbki, co potwierdza czułość badania niezależnie od jakości DNA. Najczęstszą chromosomową nieprawidłowością była trisomia chromosomu 21 pary identyfikowana w 52% nieprawidłowych wyników. Trisomie chromosomu 18 i 13 pary stwierdzono odpowiednio w 24% i 11,2% wszystkich nieprawidłowych wyników. Uzyskane wyniki były zgodne z częstością trisomii raportowaną w populacyjnych bazach danych. W tym badaniu ryzyko autosomalnych aneuploidii wzrastało wraz z wiekiem matki. Jest to zjawisko dobrze udokumentowane i opisywane w wielu publikacjach. Częstość aneuploidii była wyższa w próbkach z komórek trofoblastu niż w próbkach płynu owodniowego, najprawdopodobniej ze względu na korelację aneuploidii z nieprawidłowymi wynikami USG, co było podstawą do wykonania inwazyjnego badania w pierwszym trymestrze ciąży.

W porównaniu z **Publikacją nr 1**, dotyczącą opracowania i walidacji metody, obecne badanie koncentruje się na optymalizacji i ocenie skuteczności klinicznej. Wyniki badań oraz kilkuletnia praktyka kliniczna potwierdzają przydatność wykorzystania digital PCR w diagnostyce prenatalnej.

Wnioski

1. Metoda digital PCR jest niezawodną i czułą metodą identyfikacji nieprawidłowości chromosomowych u płodu oraz jest łatwa w implementacji w rutynowej praktyce klinicznej.
2. Czułość i specyficzność amplifikacji, prosty protokół oraz możliwość istotnej statystycznie precyzyjnej oceny liczby kopii chromosomów powodują, że rozwiązanie oparte na digital PCR jest niezawodnym, opłacalnym szybkim testem przesiewowym.

Publikacja nr 3. Nykel A, Woźniak R, Gach A. The Influence of Maternal Cell Contamination on Fetal Aneuploidy Detection Using Chip-Based Digital PCR Testing. *Diagnostics*. 2021; 11(9):1607

W przypadku amniopunkcji oraz biopsji trofoblastu istnieje ryzyko kontaminacji próbki materiałem pochodzenia matczynego. Występowanie komórek matczynek w próbce zwiększa ryzyko występowania błędu przedanalizy, co może skutkować błędną interpretacją uzyskanych wyników. Określenie wpływu kontaminacji na wyniki jest szczególnie ważne w przypadku metod molekularnych opartych na reakcji amplifikacji, w których nawet mała ilość komórek pochodzenia matczynego może wpływać na wynik.

Wstępne wyniki opublikowane w **Publikacji nr 1** wskazują, że nowa metoda digital PCR umożliwia detekcję aneuploidii nawet w przypadku niskiego poziomu mozaikowości dając podstawę do założenia, że wysoki poziom kontaminacji nie powinien wpływać na wykrywanie aneuploidii u płodu.

Celem badania było określenie dokładności nowej metody digital PCR do detekcji aneuploidii u płodu w obecności kontaminacji oraz określenie dokładnego progu, dla którego mimo zanieczyszczenia, można otrzymać wiarygodne wyniki.

Badanie było podzielone na dwa etapy. Pierwszym etapem było przeprowadzenie seryjnych rozcieńczeń prawidłowych próbek żeńskich z nieprawidłowymi męskimi, symulując kontaminację na różnym poziomie, celem określenia wpływu kontaminacji na wyniki uzyskane metodą digital PCR. Następnie zweryfikowano ustalone progi w praktyce klinicznej z wykorzystaniem próbek prenatalnych zarchiwizowanych w naszym laboratorium. Grupę badaną stanowiły kobiety w ciąży ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia aneuploidii u płodu, podobnie jak w poprzednich publikacjach. Próbkę z zidentyfikowaną kontaminacją będącą przedmiotem badania były wykluczone z analizy w **Publikacji nr 2**.

Wyniki

Wyniki wskazują, że nowa metoda digital PCR umożliwia detekcję aneuploidii u płodu w obecności kontaminacji materiałem matczynym na wysokim poziomie (90%, 85%, 92% odpowiednio dla trisomii 21, 18 i monosomii X). Ponadto, opracowana metoda wykrywa sygnał sekwencji z chromosomu Y nawet w 5%, umożliwiając wykrycie materiału płodowego w obecności ponad 95% kontaminacji. Digital PCR jest znakomitym narzędziem diagnostycznym jako badanie wstępne do identyfikacji najczęstszych aneuploidii u płodu.

W praktyce klinicznej zidentyfikowano 10 przypadków z kontaminacją na różnym poziomie (60 – 93%), 8 zostało zakwalifikowanych jako prawidłowe i 2 jako trisomia

chromosomu 21 pary. Dodatkowo, zidentyfikowano 4 przypadki z mozaikowością (1 przypadek z trisomią chromosomu 21, 3 przypadki z monosomią chromosomu X i 1 przypadek w układzie mozaikowym X0/XY). Wszystkie uzyskane wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi metodą cytogenetyki klasycznej. Ponadto, poprzez porównanie liczby kopii chromosomów X z Y oraz X z chromosomem autosomalnym, metoda umożliwiła rozróżnienie próbek z kontaminacją od próbek z mozaikowością. Wyniki potwierdzają, że opracowany algorytm może być wystarczający do oceny ryzyka kontaminacji i nie wymaga dodatkowych testów, co znacznie redukuje koszty i usprawnia procedury diagnostyczne.

Wnioski

1. Digital PCR jest dokładną metodą do detekcji aneuploidii u płodu nawet w przypadku kontaminacji materiałem matczynym na wysokim poziomie.
2. Opracowany algorytm eliminuje konieczność przeprowadzania dodatkowych testów w celu identyfikacji kontaminacji, co znacznie redukuje koszty i usprawnia procedury diagnostyczne.

V. Znaczenie praktyczne i naukowe badań

Ze względu na brak dostępnych gotowych testów opartych o technologię digital PCR opracowanie, zwalidowanie oraz wykorzystanie w praktyce klinicznej nowej metody do szybkiej analizy aneuploidii u płodu stanowi istotny wkład zarówno w rozwój nauki, jak i poprawę opieki prenatalnej. Opublikowane wyniki badań są pierwszym na świecie doniesieniem z wykorzystania platformy QuantStudio 3D Digital PCR do detekcji aneuploidii. Wprowadzenie nowego rozwiązania do szybkiej analizy nieprawidłowości chromosomowych u płodu ma innowacyjny charakter, wykorzystując zarówno wiedzę z zakresu genetyki, metod biologii molekularnej, statystyki oraz bioinformatycznej analizy danych. Nowatorskie wykorzystanie nowoczesnej technologii digital PCR oraz wyniki uzyskane podczas kilkuletniej praktyki klinicznej mogą stanowić istotny wkład w poszerzanie wiedzy z zakresu molekularnej i cyfrowej metody PCR.

Wyniki badania stwarzają realną szansę implementacji szybkiej diagnostyki prenatalnej dającej możliwość otrzymania wyniku w kilka godzin w wielu laboratoriach o małej lub średniej przepustowości. Opracowana metoda jest wdrożona w Zakładzie Genetyki Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki i wykorzystania od kilku lat jako badanie wstępne, umożliwiające uzyskanie wyniku w zakresie najczęstszych aneuploidii w ciągu kilku godzin od pobrania materiału. Badanie stanowi znakomite uzupełnienie diagnostyki metodą cytogenetyki klasycznej, w przypadku której czas oczekiwania na wynik ze względu na niezbędną hodowlę komórek wynosi do 21 dni. Podejście opierające się na połączeniu szybkiego testu z klasycznym badaniem cytogenetycznym znacznie zmniejsza stres i skraca niepokój kobiet w ciąży związany z oczekiwaniem na pełny wynik badania. W niektórych przypadkach może również wskazywać kierunek terapii w okresie prenatalnym. Ponadto, opracowana metoda umożliwia analizę liczby kopii w każdym przypadku, niezależnie od jakości próbki DNA, co jest szczególnie istotne w przypadku materiału prenatalnego. Wyniki badania potwierdzają użyteczność kliniczną metody digital PCR w detekcji aneuploidii z dużą dokładnością oraz łatwą implementacją

w praktyce klinicznej. Wprowadzenie nowej, szybkiej metody nie tylko poszerza wiedzę z wykorzystania nowoczesnej technologii, lecz także pozwala na doskonalenie procedur diagnostycznych przyczyniając się tym samym do poprawy opieki prenatalnej.

VI. Referencje

1. Carlson, L.M.; Vora, N.L. Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstet. Gynecol. Clin. N. Am.* **2017**, *44*, 245–256.
2. Driscoll, D.A.; Gross, S. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2556–2562.
3. Cuckle, H. Prenatal Screening Using Maternal Markers. *J. Clin. Med.* **2014**, *3*, 504–520.
4. Kagan, K.O.; Wright, D.; Spencer, K.; Molina, F.S.; Nicolaides, K.H. First-trimester screening for trisomy 21 by free beta- human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: Impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **2008**, *31*, 493–502.
5. Faas, B.H.; Cirigliano, V.; Bui, T.H. Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2011**, *16*, 81–87.
6. Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9236–9241.
7. Dong, L.; Meng, Y.; Sui, Z.; Wang, J.; Wu, L.; Fu, B. Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. *Sci Rep.* **2015**, *5*, 13174.
8. Whale, A.S.; Huggett, J.F.; Cowen, S.; Speirs, V.; Shaw, J.; Ellison, S.; Foy, C.A.; Scott, D.J. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e82.
9. Mao, X.; Liu, C.; Tong, H.; Chen, Y.; Liu, K. Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 7209–7222.