

Vývoj a parametre neinvazívneho prenatalného testovania na Slovensku

RNDr. Michaela Hýblová, PhD.¹, MSc. Andrej Gnip², Mgr. Dominik Hadžega, PhD.¹, RNDr. Marianna Jagelková, PhD.¹, Mgr. Michaela Forgáčová Jakúbková, PhD.¹, RNDr. Gabriel Minárik, PhD.¹

¹TRISOMYtest, s. r. o, Nitra

²Medirex, a. s., Bratislava

Detekcia chromozómových numerických a štrukturálnych zmien pomocou neinvazívneho prenatalného testovania (NIPT) sa v poslednom desaťročí vyvinula na veľmi účinný skriningový nástroj používaný v klinickej praxi na celom svete. Optimálna implementácia do národných skriningových programov by mala byť spojená s presným opisom jeho parametrov, aby z neho mohli mať čo najväčší úžitok lekári aj tehotné ženy, berúc do úvahy jeho kritické obmedzenia a lokálne špecifiká.

Naša retrospektívna, monocentrická observačná štúdia založená na využití jednej laboratórnej metódy (Trisomy test®) hodnotí vzorce používania, výber testov, časy analýzy (TAT) a analyzuje výsledky NIPT v rokoch 2016 až 2024 na kohorte 27 237 tehotných žien zo Slovenska. Analyzovali sme trendy vo využívaní NIPT, získali sme typy výsledkov a faktory, ako je vek, gestačný vek, hmotnosť tehotných žien z anamnestických údajov a fetálne frakcie stanovené v analyzovaných vzorkách ako parametre ovplyvňujúce výsledok testu. Priemerný vek žien podstupujúcich NIPT sa znížil z 36,9 roka v roku 2016 na 33,6 roka v roku 2024 a priemerný čas analýzy sa zvýšil zo 4,2 dňa v roku 2016 na 4,8 dňa v roku 2024. Štúdia zistila nárast podielu slovenských žien, ktoré podstúpili NIPT v našich laboratóriách, zo 4,0 % v roku 2016 na 8,43 % v roku 2024. Okrem toho sa gestačný vek pri NIPT teste znížil z 15,1 na 14,5 týždňa a hmotnosť tehotných žien sa počas hodnoteného obdobia významne zvýšila zo 67,3 kg na 68,1 kg. Medzi vysoko rizikovými výsledkami boli hodnotené detekcie najčastejších trizómií (T21, T18 a T13), aneuploidii pohlavných chromozómov (SCA), zriedkavých autozomálnych aneuploidii (RAT) a variantov počtu subchromozómových kópií (CNV). Podiel tehotenstiev s vysokorizikovými výsledkami bol 1,45 %, 0,54 %, 0,31 % a 0,50 %. Celková miera zlyhania (neinformatívne výsledky) bola 1,31 %.

Zavedenie NIPT do systému verejného zdravotníctva na Slovensku by mohlo ďalej zlepšiť spravodlivý prístup k najmodernejšej prenatalnej starostlivosti európskeho štandardu.

Kľúčové slová: prenatalný skrining, NIPT, cffDNA, chromozómové poruchy, NGS, celogenómové sekvenovanie s nízkym pokrytím

Development and parameters of non-invasive prenatal testing in Slovakia

The detection of chromosomal numerical and structural changes using non-invasive prenatal testing (NIPT) has evolved over the last decade into a highly effective screening tool used in clinical practice worldwide. Optimal implementation into national screening programs should be accompanied by a precise description of its parameters, allowing both physicians and pregnant women to benefit from it to the greatest extent possible, while taking into account its critical limitations and local specificities.

Our retrospective, single-center observational study, based on the utilization of a single laboratory method (Trisomy test®), evaluates usage patterns, test selection, turnaround times (TAT), and analyzes NIPT results from 2016 to 2024 in a cohort of 27,237 pregnant women from Slovakia. We analyzed trends in NIPT utilization, obtained result types, and assessed factors such as the age, gestational age, and weight of pregnant women from historical data, as well as fetal fractions determined in the analyzed samples as parameters influencing the test outcome. The average age of women undergoing NIPT decreased from 36.9 years in 2016 to 33.6 years in 2024, and the average turnaround time increased from 4.2 days in 2016 to 4.8 days in 2024. The study found an increase in the proportion of Slovak women who underwent NIPT in our laboratories, from 4.0% in 2016 to 8.43% in 2024. Furthermore, the gestational age at NIPT decreased from 15.1 to 14.5 weeks, and the weight of pregnant women significantly increased from 67.3 kg to 68.1 kg during the evaluated period. Among the high-risk results, we evaluated the detection of the most common trisomies (T21, T18, and T13), sex chromosome aneuploidies (SCA), rare autosomal aneuploidies (RAT), and subchromosomal copy number variations (CNV). The proportion of pregnancies with high-risk results was 1.45%, 0.54%, 0.31%, and 0.50%, respectively. The overall failure rate (non-informative results) was 1.31%.

The introduction of NIPT into the public healthcare system in Slovakia could further improve equitable access to state-of-the-art prenatal care.

Key words: prenatal screening, NIPT, cffDNA, chromosomal abnormalities, NGS, low coverage whole genome sequencing

Lek. genet. diagn., 2025;2(2): 77-85

Úvod

Detekcia voľnej fetálnej DNA (cffDNA) v materskej krvi v roku 1997 umožnila rozvoj novej éry neinvazívneho prenatalného testovania (NIPT) (1). Hoci

sa termín „voľná fetálna DNA“ bežne používa v literatúre, ako aj v klinickej praxi, je potrebné dodať, že táto voľná fetálna DNA má placentárny pôvod, čo má významný vplyv na korektné hodnotenie

a interpretáciu výsledkov. Okrem toho použitá metodika na spracovanie cffDNA a meranie kritických parametrov analýzy sa môže medzi metódami a laboratóriami líšiť (2). Prvý komerčný neinvazívny

prenatálny test analyzujúci cffDNA na skrining najbežnejších aneuploidii bol zavedený v roku 2011 v Hongkongu a následne sa ruka v ruke s rozšírením sekvenovania novej generácie (NGS) stal široko implementovanou súčasťou prenatálneho skriningu v mnohých krajinách. Práve metódy vychádzajúce z NGS sú v súčasnosti v rutinnom NIPT najpoužívanejšie, so špecifickejšou diferenciáciou konkrétnych protokolov založených na cielenom resekvenovaní s vysokým pokrytím alebo sekvenovaní celého genómu s nízkym pokrytím (3). V niektorých európskych krajinách, napr. v Anglicku, Dánsku, Nórsku, Švédsku a Fínsku sa NIPT realizuje s národným financovaním pre tehotné ženy s vysokým rizikom aneuploidii ako druholíniový test, zatiaľ čo v Belgicku a Holandsku sa zaviedol NIPT pre všetky tehotné ženy ako prvolíniový skriningový test. Na Slovensku, podobne ako vo väčšine krajín, nie sú NIPT testy zahrnuté do národných programov prenatálnej starostlivosti, ale sú komerčne dostupné v súkromných zdravotníckych zariadeniach s rôznymi cenami a rozsahom vyšetrovaných chromozómových abnormalít (aneuploidii a/alebo aberácií). Čo sa týka rozsahu testovania, najbežnejšie sa vyšetrujú trizómie chromozómov 21, 18 a 13 (T21, T18 a T13). Menej často sú už potom vyšetrované aneuploidie pohlavných chromozómov (SCA – sex chromosome aneuploidy) či aneuploidie, resp. trizómie ostatných autozómov (RAT – rare autosomal trisomies). Samostatnou kategóriou sú subchromozómové aberácie typu zmeny počtu kópií (CNV – copy number variation), ktoré sú spojené s deléciami alebo duplikáciami častí chromozómov.

V prípade Slovenska sa v poslednom desaťročí neinvazívne prenatálne testovanie (NIPT) systematicky vyvíjalo. Od detekcie chromozómových trizómií chromozómov 21, 18 a 13 (od septembra 2015) sa rozsah testovania rozšíril postupne o detekciu 5 vybraných mikrodencií (od februára 2017), aneuploidii pohlavných chromozómov (od októbra 2017), iných zriedkavých autozómových aneuploidii (od októbra 2017), a vo finále aj o subchromozómové aberácie typu CNV (> 3 Mb pri 10 % fetálnej frakcii) na úrovni celého genómu (od decem-

bra 2019). Dynamiku rozsahu testovania je potrebné zohľadniť pri porovnávaní a hodnotení rôznych laboratórií a rôznych metód, napr. preto, že celková miera zlyhania testov sa s rozšírením rozsahu testovania výrazne zvýši. Pritom je dobre známe, že pre rôzne typy aneuploidii alebo aberácií má NIPT test rôznu senzitivitu, špecificitu, mieru detekcie, ako aj zodpovedajúce pozitívne a negatívne prediktívne hodnoty (pre väčšinu málo častých aneuploidii a subchromozómalných aberácií nie je aktuálne možné reprezentatívne vypočítať senzitivitu a špecificitu, a teda ani stanoviť PPV a NPV).

Cieľom práce je posúdiť frekvenciu testovania, výber testov, rozdelenie vysoko rizikových a neúspešných výsledkov testov a analýzu fetálnej frakcie ako najdôležitejšie parametre pre výkonnosť testu. Hodnotíme tiež parametre, ako je čas obratu (TAT) a oneskorenia, a ďalšie relevantné faktory spojené s NIPT ako súčasťou prenatálneho skriningového programu, napr. vek matky, gestačný vek a hmotnosť matky. Preskúmaním týchto aspektov sa štúdia snaží poskytnúť podrobný a komplexný prehľad o súčasnom stave NIPT na Slovensku, ako aj o jeho špecificitách, ktoré možno v budúcnosti porovnať a použiť pri plánovaní zmien v praxi prenatálnej starostlivosti, politikách a klinických usmerneniach a odporúčaniach na zlepšenie prenatálneho skriningu a diagnostiky.

Súbor vzoriek a metódy

Návrh štúdie a odber vzoriek

Štúdia bola vykonaná v súlade s Helsinskou deklaráciou a protokol bol schválený Etickou komisiou Bratislavského samosprávneho kraja 30. júna 2015 (03899/2015/HF), 25. marca 2020 (05006/2020/HF/2) a 17. januára 2023 (4530/2023/HF). Všetci zaradení účastníci poskytli písomný informovaný súhlas so zaradením do tejto štúdie. Vzorky periférnej krvi boli odobraté od 27 237 tehotných žien na Slovensku v rámci rutinného NIPT v období od 1. júla 2016 do 31. decembra 2024. Vzorky boli odobrané do skúmaviek obsahujúcich EDTA (S-Monovette, Sarstedt, Nemecko alebo BD Vacutainer, BD, Spojené kráľovstvo),

alebo do skúmaviek cell free DNA BCT (Streck, USA). Vzorky boli získavané z celého Slovenska prostredníctvom gynekologických a klinicko-genetických ambulancií. Počas tejto štúdie sa na NIPT používali rôzne typy NIPT testov, pričom typ testu si vybrali tehotné ženy a lekári, ktorí test objednávali.

Laboratórne spracovanie a analýza údajov

Všetky vzorky boli spracované s použitím funkčne identického a technologicky porovnateľného protokolu a typu sekvenačnej platformy a laboratória. Vzorky plazmy tehotných žien boli odobraté a spracované na analýzu podľa protokolu opísaného v našej predchádzajúcej práci (4). Sekvenovanie celého genómu s nízkym pokrytím (0,1x pre Trisomy test a Trisomy test XY a 0,3x pre Trisomy test + a Trisomy test Complete) bolo realizované na platformách Illumina MiSeq, Illumina NextSeq500/550 a Illumina NextSeq 1000/2000 ako súčasť rutinného NIPT protokolu akreditovaného podľa ISO 15189:2012 a ISO 15189:2022. Sekvenačné údaje boli mapované na referenčný ľudský genóm GRCh37 (hg19) pomocou algoritmu Bowtie2 (4) a mapované čítania boli použité ako vstup pre analýzy pomocou proprietárnych algoritmov v Trisomy test SW certifikovanom podľa ISO 13485:2016.

Vyhodnotenie výsledkov a štatistická analýza

Po analýze údajov boli výsledky hlásené lekárom ako nízkorizikové, vysokorizikové alebo neinformatívne pre cielené a necielené nálezy (v závislosti od typu objednaného typu testu). Na ďalšie spracovanie údajov, ich vyhodnotenie, vizualizáciu a štatistické analýzy bola použitá platforma KNIME Analytics.

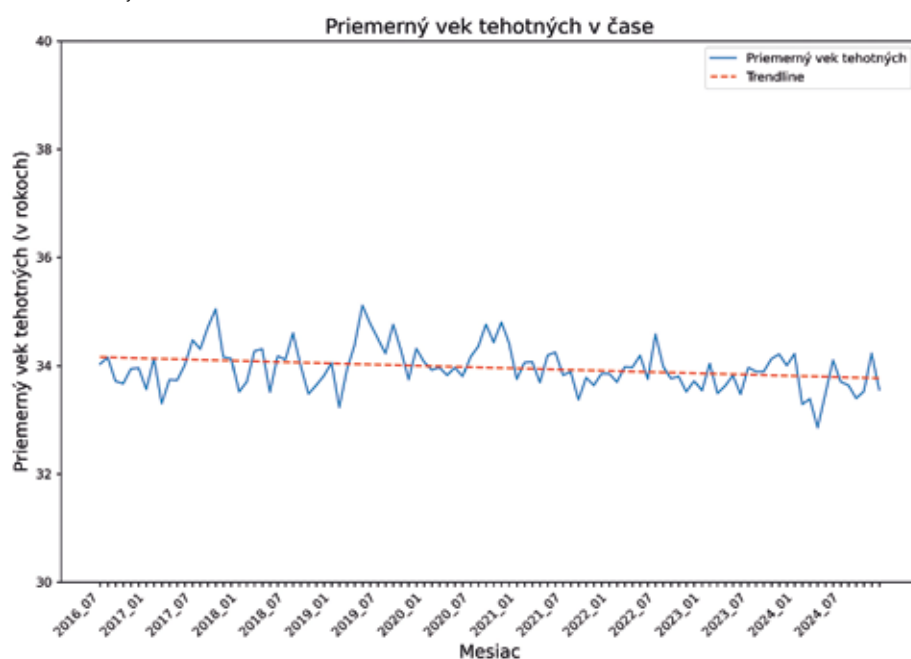
Výsledky

Celkovo v hodnotenom období od 1. júla 2016 do 31. 12. 2024 podstúpilo niektorý z Trisomy testov 27 237 tehotných žien zo Slovenska. Priemerný vek všetkých účastníčok štúdie bol 33,9 roka, minimálny vek bol 18 a maximálny vek 54 rokov (tabuľka 1). Zároveň bol zaznamenaný pokles veku tehotných, u ktorých sa NIPT realizoval, pričom tento pokles

Tabuľka 1. Priemerný vek tehotných, ktoré boli testované v sledovanom období, vrátane štandardnej odchýlky a minimálnych a maximálnych hodnôt

Polrok	Priemerný vek	Štandardná odchýlka	Minimum	Maximum
2016_2	33,91919192	4,732636194	18	48
2017_1	33,74808511	4,562404062	18	47
2017_2	34,47959184	4,415197063	21	48
2018_1	33,88877446	4,760012523	19	44
2018_2	33,89675516	4,916552223	20	49
2019_1	34,24939467	4,829394468	19	47
2019_2	34,3256607	5,015810975	21	48
2020_1	33,93728928	4,76273546	18	52
2020_2	34,50068587	4,851996123	19	53
2021_1	34,01185984	4,828769136	18	54
2021_2	33,73079145	5,04124886	18	48
2022_1	33,90537328	4,82018084	19	51
2022_2	33,87086614	4,996965102	18	50
2023_1	33,66074229	5,059107831	18	50
2023_2	34,01232394	5,036143073	18	53
2024_1	33,52823409	5,095464973	18	50
2024_2	33,65899455	4,844929491	19	48
SPOLU	33,9295965	4,890119313	18	54

Obrázok 1. Trend poklesu priemerného veku tehotných za sledované obdobie. Červená prerušovaná čiara zobrazuje trendovú čiaru.



bol štatisticky signifikantný ($p = 0,0066$, obrázok 1).

Priemerný gestačný vek plodov v čase testovania bol 14,64 týždňov, pričom minimálny gestačný vek bol 9 a maximálny 33 týždňov (tabuľka 2). Podobne ako pri priemernom veku tehotných aj pri priemernom gestačnom veku došlo v sledovanom období k poklesu zaznamenaných hodnôt, pričom tento pokles bol tiež štatisticky signifikantný ($p < 0,0001$, obrázok 2A). Zároveň bolo možné zaznamenať biapikálnu distribúciu, ktorej maximá boli v gestačnom veku 12 a 16 týždňov (obrázok 2B).

Priemerná hmotnosť tehotných bola 68,1 kg, pričom minimálna zaznamenaná hodnota bola 34 a maximálna 175 kg (tabuľka 3). Pri hmotnosti bol zaznamenaný signifikantný nárast zaznamenaných hodnôt ($p < 0,0001$, obrázok 3).

Priemerný čas spracovania vzoriek bola 4,51 pracovného dňa s minimom 3 a maximom 18 pracovných dní. Pri vzorkách, ktoré boli reportované ako „s nízkym rizikom“ na vyšetrované aneuploidie a/alebo aberácie bolo do 5 pracovných dní vydaných 90,65 % výsledkov analýzy vzoriek. Pri vzorkách bez ohľadu na typ vydaného výsledku bolo do

5 pracovných dní reportovaných 88,96 % výsledkov analyzovaných vzoriek. Pri celkovom hodnotení bol pozorovaný rozdiel, resp. mierny nárast v dĺžke trvania spracovania vzoriek, no tento nebol štatisticky signifikantný (obrázok 4).

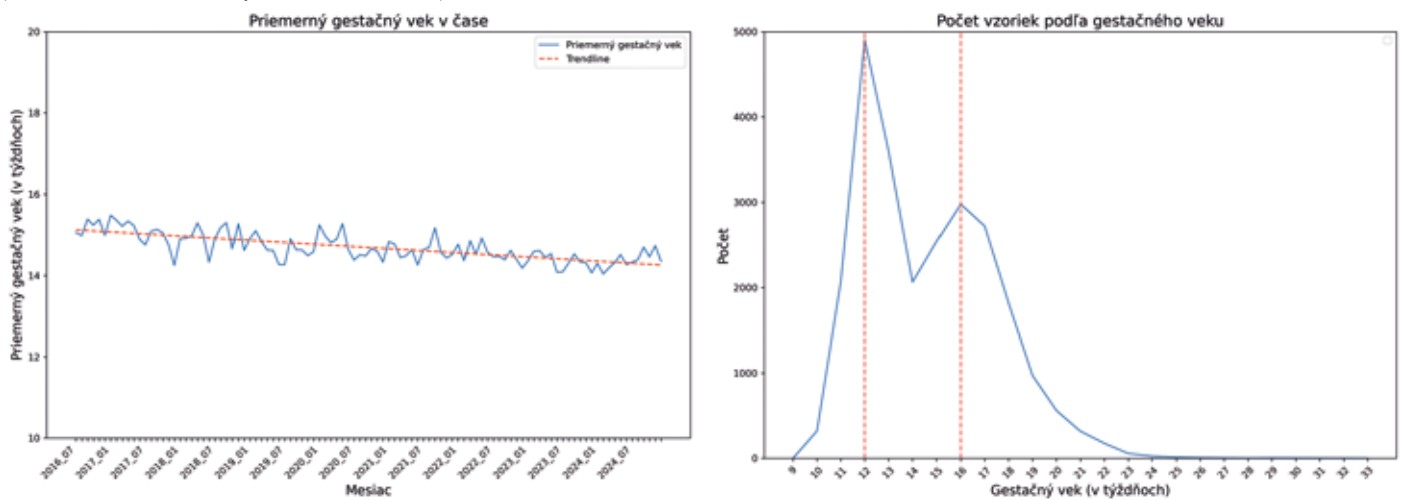
Priemerná hodnota fetálnej frakcie zistená v analyzovaných vzorkách v rámci sledovaného obdobia bola na úrovni 12,51 % (tabuľka 5), z pohľadu štatistickej signifikancie nebol zistený rozdiel, hoci v grafe zobrazujúcom priebeh hodnôt v čase bolo možné sledovať trend poklesu hodnôt fetálnej frakcie v úvodnej a nárastu v záverečnej časti hodnoteného obdobia. Zároveň bol zaznamenaný nárast fetálnej frakcie s nárastom gestačného veku, pričom tento nárast bol štatisticky signifikantný ($p < 0,0001$). Výrazne štatisticky signifikantný je aj pokles fetálnej frakcie v nadväznosti na nárast hmotnosti tehotnej ($p < 0,0001$). Rovnako štatisticky signifikantná je aj negatívna korelácia medzi fetálnou frakciou a vekom tehotnej ($p < 0,0001$). Výsledky hodnotení fetálnej frakcie sú sumarizované aj graficky na obrázku 5.

Len 1,131 % výsledkov bolo vydaných ako definitívne neinformatívnych (tzv. „no call“ alebo „failed“). Za neinformativnosť bola najčastejšie zodpovedná podlimitná fetálna frakcia, a to v 1,032 %, teda takmer v 90 % prípadov. Vo zvyšných 10 % prípadov bola dôvodom neinformativnosti neidentifikovaná technická príčina (0,099 %), nasledovali ju výsledky reportované ako neinformatívne pre nevyhodnotiteľné nálezy na úrovni SCA, CNV, CNV/SCA a RAT (0,022 %, 0,011 %, 0,007 % a 0,004 %).

Z pohľadu regionálnych rozdielov využívania NIPT v rámci Slovenska nie je na prvý pohľad možné identifikovať rozdiel pri porovnaní relatívnych početností vzoriek analyzovaných Trisomy testom, ak sa hodnotia podiely vzoriek zozbierané prostredníctvom dvoch hlavných zberných centier v Bratislave a Košiciach a trend ich nárastu je v oboch centrách porovnateľný (obrázok 6).

Pri sumarizácii výsledkov vydaných ako „s vysokým rizikom“ boli identifikované najčastejšie T21, T18 a T13, ktoré boli v analyzovanom súbore detegované kumulatívne v 1,45 % prípadov. Individuálne bola najčastejšia T21 (72,66 %), nasledovaná

Obrázok 2. Hodnoty priemerného gestačného veku plodov v čase testovania, A – trend poklesu priemerného gestačného veku v testovaných vzorkách za sledované obdobie, B – biapikálna distribúcia gestačného veku v sledovanej kohorte vzoriek zo Slovenska s vyznačenými lokálnymi maximami. Červená prerušovaná čiara zobrazuje trendovú čiaru, resp. lokálne maximum.



T18 (16,96 %) a T13 (10,38 %). Za nimi nasledovali výsledky reportované ako „s vysokým rizikom“ SCA kumulatívne v 0,55 % prípadov, nasledovali výsledky reportované s CNV nálezmi kumulatívne v 0,50 % prípadov a najmenej časté boli reporty s nálezmi RAT, kumulatívne v 0,30 % prípadov. Spolu boli teda výsledky reportované ako „s vysokým rizikom“ na ktorúkoľvek z detegovaných typov aneuploidii a/alebo aberácií v 2,80 % prípadov (obrázok 7).

V nadväznosti na obmedzenú klinickú naliehavosť overenia nálezov reportovaných ako „s vysokým rizikom“ pri iných ako najčastejších trizómiách T21, T18 a T13 bolo realizované retrospektívne a systematizované hodnotenie správnosti vydaných výsledkov len s ohľadom na reportovanie týchto trizómií. Z tohto hodnotenia, ktoré sa realizovalo na subkohorte s výsledkami 20 288 analýz, boli vypočítané hodnoty senzitivity, špecificity, pozitívnej a negatívnej prediktívnej hodnoty (PPV a NPV) a miery detekcie (DR), ktoré sú zosumarizované v tabuľke 6.

Diskusia

Naše dáta zo Slovenska ukazujú, že priemerný vek žien, ktoré podstupujú NIPT, je 33,9 rokov. Od začiatku sledovaného obdobia zaznamenávame postupný pokles veku z 36,9 na 33,6 rokov. Tento trend je v súlade s publikovanými údajmi zo zahraničia. V Holandsku, kde je NIPT využívaný ako prvolíniový prenatálny skriningový test pre chromozómové poruchy, bol priemerný vek tehotných na úrovni 32 rokov (5). Recentná štú-

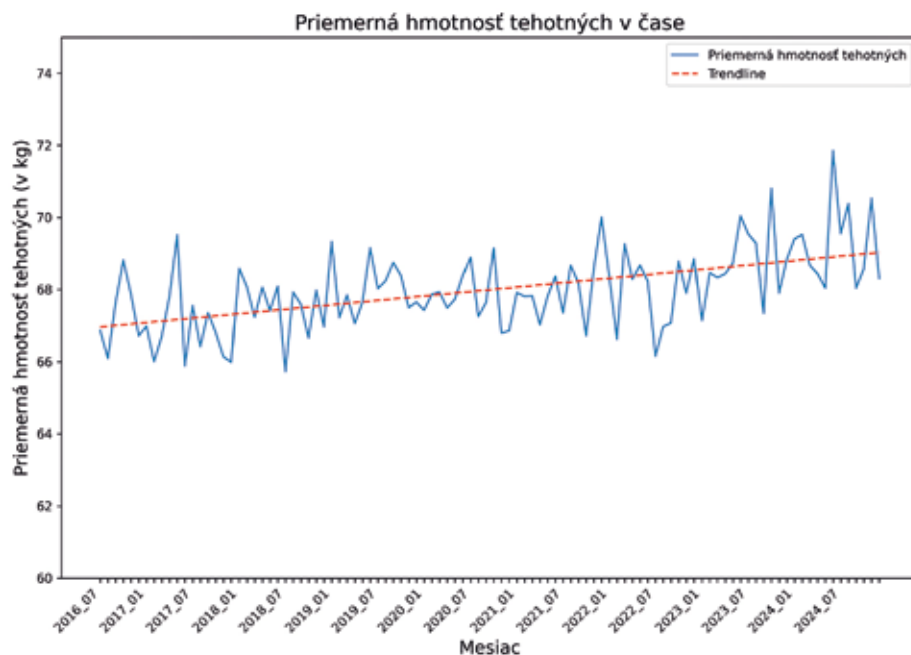
Tabuľka 2. Priemerný gestačný vek plodov pri vzorkách od tehotných, ktoré boli testované v sledovanom období, vrátane štandardnej odchýlky a minimálnych a maximálnych hodnôt

Polrok	Priemerný gestačný vek	Štandardná odchýlka	Minimum	Maximum
2016_2	15,17241379	2,976006065	9	32
2017_1	15,2585034	2,908449169	10	33
2017_2	14,8622449	2,847575364	10	26
2018_1	14,94438723	2,849669344	10	26
2018_2	14,96165192	2,80561869	10	24
2019_1	14,73709677	2,700296452	10	27
2019_2	14,58404075	2,639510904	10	26
2020_1	14,99057873	2,740624435	10	29
2020_2	14,48695055	2,739773495	10	29
2021_1	14,57065804	2,70358278	10	31
2021_2	14,66397229	2,735017151	10	29
2022_1	14,67284831	2,728511725	10	26
2022_2	14,41942257	2,623011588	10	25
2023_1	14,43857815	2,621027871	10	26
2023_2	14,27464789	2,641582738	10	25
2024_1	14,27361396	2,682205985	10	30
2024_2	14,4863719	2,777228111	10	28
SPOLU	14,64123351	2,746760066	9	33

Tabuľka 3. Priemerná hmotnosť tehotných, ktoré boli testované v sledovanom období, vrátane štandardnej odchýlky a minimálnych a maximálnych hodnôt

Polrok	Priemerná hmotnosť	Štandardná odchýlka	Minimum	Maximum
2016_2	67,31423895	13,02223048	41	135
2017_1	67,13294314	13,04712611	42	145
2017_2	66,7232581	12,4651167	40	134
2018_1	67,90322581	13,33219113	41	139
2018_2	67,20822622	13,03229927	44	139
2019_1	68,09200603	13,07697892	41	145
2019_2	68,10108865	13,76921674	44	152
2020_1	67,76842752	13,45432523	43	151
2020_2	67,70745698	12,81985473	40	129
2021_1	67,80230729	12,93734335	42	145
2021_2	68,32216639	14,00437103	42	175
2022_1	68,2734375	13,83884761	44	172
2022_2	67,67450179	13,17678401	38	129
2023_1	68,52711607	13,56129125	40	149
2023_2	69,00331492	14,35828327	42	167
2024_1	69,25232274	13,97988843	43	168
2024_2	69,18777056	14,34545261	34	149
SPOLU	68,10896988	13,51838834	34	175

Obrázok 3. Trend nárastu priemernej hmotnosti tehotných v sledovanom období. Červená prerušovaná čiara zobrazuje trendovú čiaru.



Tabuľka 4. Priemerný čas spracovania vzoriek, vrátane štandardnej odchýlky a minimálnych a maximálnych hodnôt

Polrok	Priemerný čas spracovania	Štandardná odchýlka	Minimum	Maximum
2016_2	4,218166384	1,062583392	3	9
2017_1	4,201376936	0,983445137	3	9
2017_2	4,675510204	1,111189373	3	14
2018_1	4,710729614	0,963026033	3	12
2018_2	4,545617174	1,176148184	3	14
2019_1	4,436744561	1,040814061	3	18
2019_2	4,593642612	1,165863319	3	11
2020_1	4,57884097	0,91137104	3	10
2020_2	4,403448276	1,027900216	3	13
2021_1	4,078420768	0,931538837	3	18
2021_2	4,269454123	0,966304259	3	11
2022_1	4,162175168	0,976455364	3	11
2022_2	4,515485564	1,014027967	3	18
2023_1	4,749085206	0,845725438	3	13
2023_2	4,82629108	0,946788049	3	12
2024_1	4,94661191	0,92237151	3	15
2024_2	4,800364078	0,994618117	3	15
SPOLU	4,513438874	1,026917309	3	18

dia zo Španielska uvádza priemerný vek tehotných na úrovni 35,5 rokov (6). Naším podmienkam sa podobajúca štúdia z Chorvátska sledovala porovnateľne sa znižujúci priemerný vek tehotných podstupujúcich NIPT medzi rokmi 2013 a 2023 z 36,1 na 33,01 rokov (7).

Priemerný gestačný vek je v našom súbore približne 14,6 týždňov, čo je v súlade s údajmi zo štúdií z iných krajín. Za sledované obdobie bol v našom súbore sledovaný trend postupného poklesu z 15,1 na 14,4 týždeň, tento údaj je však relevantný len do určitej miery, pretože NIPT je technicky možné realizovať už od 8. týž-

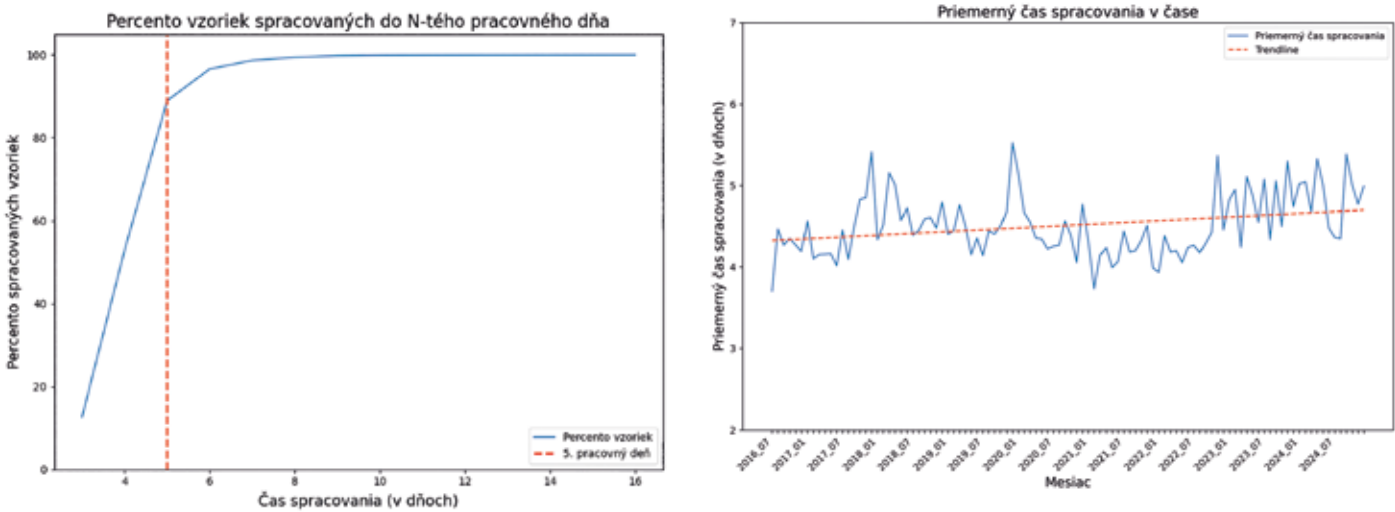
dňa, keď sa v krvi väčšiny tehotných už nachádza dostatočné množstvo cffDNA. Z praktických a etických dôvodov sa však pri využívaní NIPT na skríningové účely pristupuje k testovaniu najskôr medzi 10. a 12. týždňom, keď je možné nastaviť skríningový algoritmus tak, aby bolo možné kombinovať výsledky NIPT s inými skríningovými a diagnostickými prístupmi a zároveň bol dostatočný čas na realizáciu konfirmačných vyšetrení z materiálu získaného invazívnym spôsobom v prípade pozitívnych výsledkov. V rámci Európy sa NIPT napríklad v Chorvátsku realizoval u tehotných s priemerným gestačným

týždňom na úrovni 12,6 (7), v Španielsku na úrovni 13,5 (6) a v najrozsiahlnejšej štúdií z Holandska to bolo na úrovni 11,9 týždňa (8), opäť však treba upozorniť na to, že v tejto štúdií bol NIPT aplikovaný ako prvolíniový test určený pre celú populáciu. V našej štúdií, rovnako ako v štúdiách z Chorvátska a Španielska, išlo o NIPT realizovaný ako druholíniový test, kde sa dá očakávať, že NIPT bude realizovaný neskôr a vo zvýšenej miere aj až na základe predchádzajúceho biochemického alebo ultrazvukového skríningu v 1. a 2. trimestri vyhodnoteného ako s vysokým rizikom alebo s nejednoznačne nízkorizikovým výsledkom. Tejto alternatíve nasvedčuje aj biapikálny priebeh zastúpenia tehotných sledovaných v našej štúdií, keď sú tehotné na Slovensku analyzované v najväčšom zastúpení v 12. a 16. týždni tehotenstva. Porovnateľný biapikálny profil početností tehotných vo vzťahu ku gestačnému veku bol zaznamenaný aj na rozsiahlej kohorte vzoriek z USA (9). Gestačný vek je jedným z dôležitých parametrov využiteľných ako významný prediktor úspešnosti dosiahnutia informatívneho výsledku, keďže preukázateľne koreluje s fetálnou frakciou a so zvyšujúcim sa gestačným týždňom fetálna frakcia štatisticky významne narastá (9), čo preukázali aj nami prezentované výsledky.

Priemerná hmotnosť tehotných v našom súbore bola 68,1 kg. Táto je v súlade s dátami z iných európskych štúdií, kde je však hmotnosť tehotných väčšinou sledovaná formou hodnoty BMI. Súčasne je zaznamenaný trend nárastu hmotnosti tehotných, čo reflektuje všeobecný nárast hmotnosti vo väčšine populácií. Tento parameter je v kontexte s NIPT veľmi dôležitý, pretože so zvyšujúcou sa hmotnosťou (špecificky nad 90 kg) významne narastá podiel neinformatívnych výsledkov NIPT v dôsledku signifikantne sa znižujúcej fetálnej frakcie vo vzorke krvi takýchto tehotných (9), čo potvrdzujú aj nami prezentované výsledky. Pri manažmente skríningu typu NIPT je možné v prípadoch tehotných s vysokou hmotnosťou aplikovať odporúčanie týkajúce sa posunu odberu do vyššieho gestačného veku (10).

Dĺžka spracovania vzoriek (TAT) v našej štúdií bola v priemere 4,5 pracovného dňa. V rámci sledovaného obdobia

Obrázok 4. Sumarizácia hodnotenia dĺžky trvania spracovania vzoriek v laboratóriu, A – podiel vzoriek a počet pracovných dní na ich spracovanie pri sledovaní vzoriek, ktoré boli reportované ako „s nízkym rizikom“, B – trend mierneho nárastu priemerného času spracovania vzoriek v sledovanom období. Červená prerušovaná čiara zobrazuje trendovú čiaru.



sme zaznamenali mierny nárast tejto hodnoty, a to zo 4,2 na 4,8 pracovného dňa, pričom podiel vzoriek vyhodnotených do 5 pracovných dní presahoval 90 % a len cca 1 % vzoriek presahovalo hodnotu 8 pracovných dní. Tento parameter je kľúčový pre klinickú efektivitu, pretože ovplyvňuje načasovanie výsledku a následné rozhodnutia. Vzhľadom na dostupné informácie z publikovaných štúdií ide o plne kompetitívny výsledok, keď napríklad v Holandsku bol priemerný čas dodania spracovania vzoriek na úrovni 6,5 pracovného dňa, pričom 97,4 % výsledkov bolo reportovaných do 10 pracovných dní (8). V štúdií z Chorvátska mapujúcej obdobie medzi rokmi 2013 a 2023 bol TAT 8,1 dňa (bez špecifikácie, či ide o pracovné alebo kalendárne dni), pričom sa priemerný čas skrátil z 12,4 v 2013 na 7,1 v 2023 (7). A v Belgicku, kde je aktuálne test dostupný a prakticky plne preplácaný pre všetky tehotné ako prvolíniový v jedinej krajine Európy, je dĺžka trvania spracovania vzoriek 7 – 10 kalendárnych dní pre väčšinu prípadov (11). Tu je ešte potrebné podotknúť, že do tejto dĺžky spracovania sa nezapočítava čas potrebný na prípadné opakované odbery.

Fetálna frakcia je najdôležitejším parametrom určujúcim všeobecne informatívnosť NIPT a má dosah aj na senzitivitu a špecifickú a potenciálne aj aplikovateľný rozsah testovania. Na základe publikovaných štúdií bolo preukázané, že na predikciu fetálnej frakcie je možné

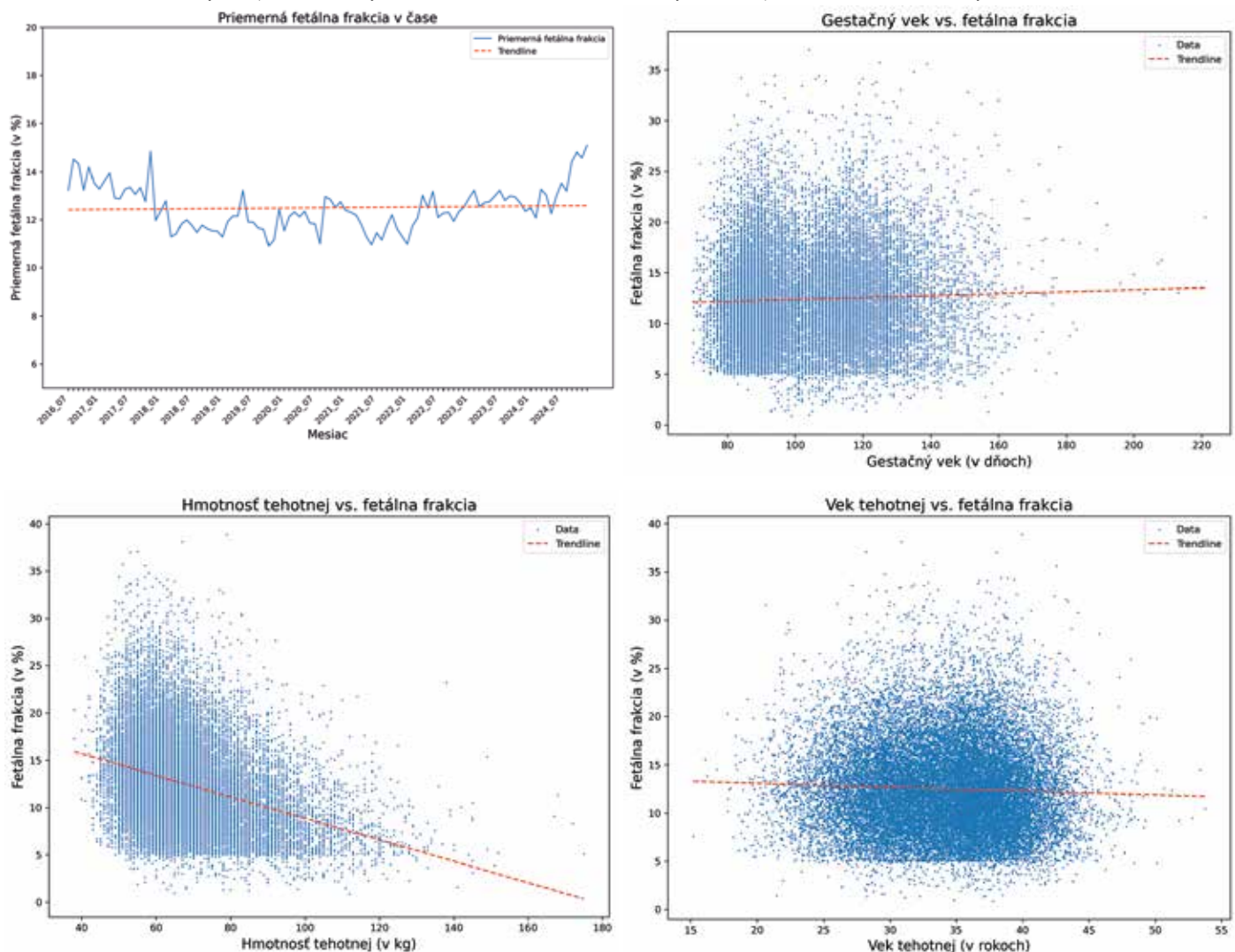
Tabuľka 5. Priemerné hodnoty fetálnej frakcie zistenej vo vzorkách v rámci hodnoteného obdobia

Polrok	Priemerná fetálna frakcia	Štandardná odchýlka	Minimum	Maximum
2016_2	13,85 %	4,95 %	3,64 %	33,17 %
2017_1	13,33 %	4,73 %	3,29 %	38,10 %
2017_2	13,24 %	4,68 %	5,00 %	38,88 %
2018_1	11,94 %	4,07 %	2,10 %	33,40 %
2018_2	11,60 %	3,92 %	2,60 %	30,16 %
2019_1	12,07 %	4,28 %	2,63 %	32,50 %
2019_2	11,61 %	4,39 %	1,34 %	34,40 %
2020_1	12,05 %	4,55 %	2,07 %	31,83 %
2020_2	12,36 %	4,69 %	1,28 %	34,10 %
2021_1	11,84 %	4,57 %	2,03 %	36,98 %
2021_2	11,56 %	4,35 %	0,88 %	30,30 %
2022_1	12,22 %	4,74 %	1,35 %	34,80 %
2022_2	12,25 %	4,76 %	1,45 %	31,41 %
2023_1	12,85 %	4,67 %	1,60 %	34,10 %
2023_2	12,85 %	4,71 %	2,59 %	33,90 %
2024_1	12,68 %	4,72 %	2,70 %	35,72 %
2024_2	14,22 %	4,95 %	2,80 %	32,80 %
SPOLU	12,51 %	4,68 %	0,88 %	38,88 %

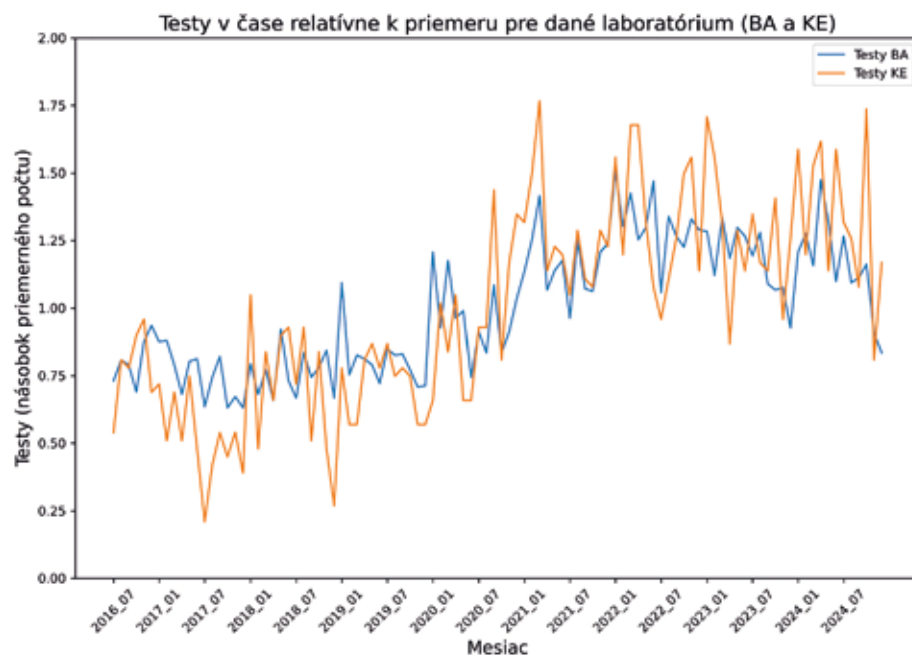
využiť anamnestické informácie tehotnej, konkrétne jej vek, gestačný vek a jej hmotnosť (alebo BMI). Bolo preukázané, že kým gestačný vek a fetálna frakcia spolu pozitívne korelujú, tak vek tehotnej a predovšetkým jej hmotnosť korelujú s fetálnou frakciou negatívne. V prípade korelácie s vekom tehotnej však existujú kontroverzné výsledky v publikovaných štúdiách a aj stále aktuálna metaanalýza (12) uvádza, že v tomto ohľade nie je možné vydať definitívne stanovisko a je potrebné v hodnotení tejto potenciálnej korelácie pokračovať. Naopak pri gestačnom veku aj hmotnosti tehotných už je korelácia jednoznačne preukázaná a je potrebné ich brať do úvahy nielen pri výbere a plánovaní zaradenia NIPT do skrí-

ningového algoritmu, ale aj optimálneho termínu odboru krvi za týmto účelom (10). V našom sledovanom súbore bola zistená priemerná fetálna frakcia 12,5 %, pričom za sledované obdobie nebola zaznamenaná štatisticky významná zmena v tejto hodnote, hoci bolo možné pozorovať pokles a nárast v prvej a druhej polovici sledovaného časového rozsahu. Je dôležité dodať, že hodnoty priemernej fetálnej frakcie zistenej v populačne špecifických štúdiách nie sú, resp. nemusia byť porovnateľné. Je to spôsobené nielen už vyššie spomenutými preukázanými koreláciami medzi fetálnou frakciou a hmotnosťou (BMI) tehotných, ale aj tým, ako je organizované zaradenie NIPT do prenatalného skriningového

Obrázok 5. Sumarizácia analýz zameraných na hodnotenie fetálnej frakcie v analyzovaných vzorkách. A – evaluácia zistených priemerných hodnôt fetálnej frakcie v sledovanom období, B – sledovaný nárast fetálnej frakcie pri zvyšujúcom sa gestačnom veku, C – pokles fetálnej frakcie v nadväznosti na nárast hmotnosti tehotnej, D – pokles fetálnej frakcie v nadväznosti na vek tehotnej. Červená prerušovaná čiara zobrazuje trendovú čiaru.



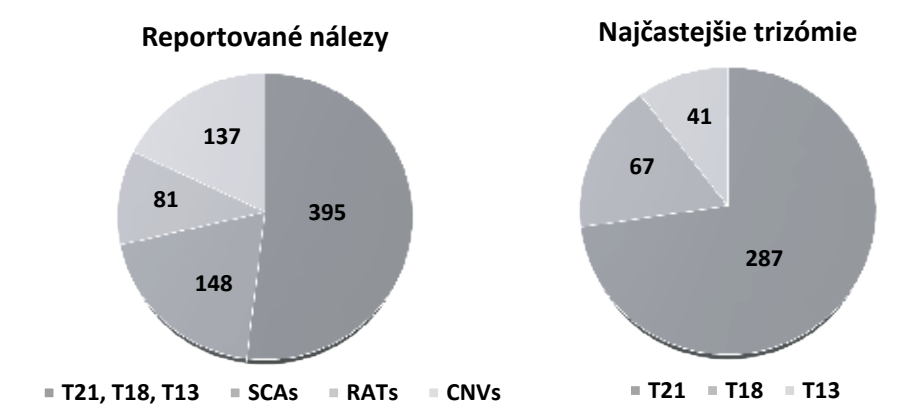
Obrázok 6. Porovnanie relatívneho zastúpenia podielov vzoriek zozbieraných v regionálnych zberných centrách v Bratislave a Košiciach



algoritmu v danej krajine, ak sa na NIPT zaraďujú tehotné v rôznych krajinách v rôznom gestačnom veku. Zároveň bolo vo viacerých štúdiách preukázané, že na fetálnu frakciu môžu vplyvať aj ďalšie anamnestické alebo klinické parametre, ktoré môžu byť regionálne špecifické. Medzi ne patrí napríklad etnická príslušnosť, terapia nízkomolekulovými heparínmi, IVF, intenzívne cvičenie, autoimunitné ochorenie u tehotnej (12).

Nízka fetálna frakcia je najčastejšou príčinou neinformatívneho výsledku v rámci NIPT. V dvoch rozsiahlych populačných štúdiách bola podlimitná hodnota (zvyčajne pod 4 %) zodpovedná za 78,9 % alebo 79,4 % všetkých neinformatívnych výsledkov, pričom v našej kohorte bolo zastúpenie tejto príčiny 87,8 %. Za zvyšné neinformatívne výsledky boli v týchto dvoch rozsiahlych publikova-

Obrázok 7. Relatívne zastúpenie podielov a počtov kategórií výsledkov vzoriek reportovaných ako „s vysokým rizikom“



Tabuľka 6. Hodnoty sumarizujúce typ spätnej väzby pre vydané výsledky, senzitivity, špecificity, pozitívnej a negatívnej prediktívnej hodnoty a miery detekcie pre tri najčastejšie reportované trizómie

Výsledok/Parameter	Trizómia 21	Trizómia 18	Trizómia 13	Spolu
Správne pozitívny	218	48	25	291
Falošne pozitívny	2	1	4	7
Správne negatívny	18 938	19 109	19 130	18 859
Falošne negatívny	1	1	0	2
Senzitivita	99,54 %	97,96 %	100,00 %	99,32 %
Špecificita	99,99 %	99,99 %	99,98 %	99,96 %
PPV	99,09 %	97,96 %	86,21 %	97,65 %
NPV	99,99 %	99,99 %	100,00 %	99,99 %
DR	1,14 %	0,25 %	0,13 %	1,52 %

ných štúdiách uvádzané technické dôvody, bez ich ďalšej špecifikácie (8, 13).

V rámci hodnotenia klinicky relevantných štatistických parametrov testov boli sledované parametre senzitivita, špecificita, pozitívna a negatívna prediktívna hodnota (PPV a NPV) a detekčná schopnosť (DR) špecificky pre najčastejšie a najrozšírenejšie testovanie trizómií chromozómov 21, 18 a 13. Nami prezentované parametre sú v zhode s publikovanými výsledkami obdobných štúdií a metanalýz, pričom však je potrebné brať do úvahy špecifiká daných štúdií a neporovnávať výsledky medzi štúdiami nekriticky, ale s uvedením si relevantných a rozhodujúcich detailov. Napríklad pri porovnaní výbehu hodnôt senzitivity a PPV s rozsiahlou populačnou štúdiou z Belgicka (14) bola senzitivita pre detekciu T21, 18 a 13 na úrovni 98,91 %, 97,47 % a 100 % pri PPV 92,39 %, 84,62 % a 43,90 %, kým v nami prezentovanej štúdii je senzitivita pre detekciu T21, 18 a 13 na úrovni 99,54 %, 97,96 % a 100 % pri PPV 99,09 %, 97,96 % a 86,21 %. Na prvý pohľad by sme teda mohli uvažovať nad tým, že náš test je

významne lepší pri predikcii vysokého rizika ako T18, tak aj T13. No zároveň je dôležité si uvedomiť, že kým belgická štúdia bola skutočne realizovaná na populačnej úrovni, tak naša štúdia nebola populačne reprezentatívna, čo je zrejme z celkového podielu prípadov reportovaných ako s vysokým rizikom pre niektorú z hodnotených trizómií. Kým v belgickej štúdii bola táto hodnota na úrovni 0,45 %, tak v našej štúdii bola až na úrovni 1,46 % vyšetrených vzoriek. Tento rozdiel jednoznačne ukazuje na to, že v našej štúdii nemáme kohortu tehotných zodpovedajúcu populačnej, ale je obohatená o prípady suspektné na vysoké riziko, čo spôsobuje následne rozdiely aj v iných klinicky relevantných štatisticky hodnotených parametroch aj pri ostatných typoch detegovaných aneuploidií a/alebo aberácií. Obdobný, resp. ešte väčší a výraznejší rozdiel v podiele prípadov reportovaných „s vysokým rizikom“ bolo možné sledovať pri porovnaní štúdií TRIDENT-1 a TRIDENT-2 realizovanými v Holandsku, pričom tieto dve štúdie sa líšili práve tým, že v prvej bola analyzovaná kohorta tehotných identifi-

kovaných ako vysokorizikových pre T21, T18 alebo T13 už pred NIPT a v druhej kohorta populačného charakteru, teda vo všeobecnosti s nízkym rizikom. Kým v TRIDENT-1 štúdii boli detegované a reportované výsledky NIPT „s vysokým rizikom“ v 3,0 % vyšetovaných vzoriek, tak v TRIDENT-2 štúdii to bolo v 0,47 %. Podobne a logicky boli zaznamenané aj výraznejšie rozdiely v PPV, kde v rámci TRIDENT-1 štúdie boli pre T21, T18 a T13 stanovené hodnoty na úrovni 94 %, 80 % a 67 % a v rámci TRIDENT-2 štúdie na úrovni 96 %, 98 % a 53 % (15, 8, 5).

Posledným zo sledovaných parametrov bol podiel tehotných využívajúcich NIPT testy. S ohľadom na demografické informácie sme sledovali pozvoľný nárast tejto hodnoty, keď sme Trisomy testom vyšetrili v rokoch 2016 – 2024 vzorky od 4,02 %, 3,92 %, 4,28 %, 4,65 %, 5,62 %, 6,59 %, 7,89 %, 7,79 % a 8,43 % tehotných (16). Na porovnanie, v krajinách, kde je NIPT využívaný ako prvoliniový prenatálny skriningový test pre chromozómové poruchy preplácaný v plnej výške alebo čiastočne aj zdravotnými poisťovňami, akými sú napríklad Belgicko a Holandsko, je podiel tehotných využívajúcich NIPT na úrovni 80 % (14, 17).

Záver

Na základe prehľadu našich dát a porovnania s rozsiahlymi zahraničnými štúdiami je jasné, že parametre a efektivita NIPT realizovaného na Slovensku sú v súlade so svetovými štandardmi. Zaznamenali sme trend poklesu priemerného veku tehotných, znižovanie gestačného veku, nárast hmotnosti tehotných, no napriek tomu nebol zaznamenaný potenciálne očakávateľný pokles priemernej fetálnej frakcie v rámci sledovaného obdobia. Štatistické klinicky relevantné parametre, ako senzitivita, špecificita, PPV, NPV a miera detekcie, korešpondujú s údajmi z Európy, resp. sveta. Do budúca je možné očakávať pokračovanie trendu rozširovania využívania testov z kategórie NIPT aj na Slovensku, je ale otázne, ako bude tento typ plošne aplikovateľného skriningového testu hrađený aj z verejného zdravotného poistenia. V takomto prípade je možné očakávať

postupný nárast podielu tehotných žien, ktoré sa rozhodnú pre NIPT až na úroveň 80 %, ako ukazujú dáta z iných európskych krajín.

PodĎakovanie: Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Programu Slovensko pre projekt: *Translačný výskum a komplexné hodnotenie biomedicínskych údajov zo širokospektrálneho skríningu zameraného na implementáciu inovatívnych prístupov na zlepšenie zdravotnej starostlivosti od počatia až po novorodenca*, kód ITMS: 401101C006, spolufinancovaný zo zdrojov EÚ.

Autori čestne vyhlasujú, že nemajú žiadny potenciálny konflikt záujmov.

Literatúra

1. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997 Aug 16;350(9076):485-7.
2. Poulton A, Hui L. Noninvasive prenatal testing: an overview. *Aust Prescr*. 2025 Apr;48(2):47-53.
3. Benn P, Cuckle H. Overview of Noninvasive Prenatal Testing (NIPT) for the Detection of Fetal Chromosome Abnormalities; Differences in Laboratory Methods and Scope of Testing. *Clin Obstet Gynecol*. 2023 Sep 1;66(3):536-556.
4. Sekelska M, Izsakova A, Kubosova K, et al. Result of Prospective Validation of the Trisomy Test® for the Detection of Chromosomal Trisomies. *Diagnostics (Basel)*. 2019 Oct 2;9(4):138.
5. Skojo M, Srebniak MI, Henneman L, et al. Implementing non-invasive prenatal testing in a national screening program: Lessons learned from the TRIDENT studies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2024 Dec;97:102543.
6. Pedrola Vidal L, Roselló Piera M, Martín-Grau C, et al. Prenatal Genome-Wide Cell-Free DNA Screening: Three Years of Clinical Experience in a Hospital Prenatal Diagnostic Unit in Spain. *Genes (Basel)*. 2024 Apr 28;15(5):568.
7. Podobnik P, Meštrović T, Đorđević A, et al. A Decade of Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) for Chromosomal Abnormalities in Croatia: First National Monocentric Study to Inform Country's Future Prenatal Care Strategy. *Genes (Basel)*. 2024 Dec 11;15(12):1590.
8. van der Meij KRM, Sijtermans EA, Macville MVE, et al; and Dutch NIPT Consortium. TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands. *Am J Hum Genet*. 2019 Dec 5;105(6):1091-1101.
9. Wang E, Batey A, Struble C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2013 Jul;33(7):662-6.
10. Livergood MC, LeChien KA, Trudell AS. Obesity and cell-free DNA „no calls”: is there an optimal gestational age at time of sampling? *Am J Obstet Gynecol*. 2017 Apr;216(4):413.
11. Non-invasive prenatal test (NIPT) – UZ Leuven 2025. URL <https://www.uzleuven.be/en/non-invasive-prenatal-test-nipt>
12. Deng C, Liu S. Factors Affecting the Fetal Fraction in Non-invasive Prenatal Screening: A Review. *Front Pediatr*. 2022 Jan 27;10:812781.
13. Liu S, Liu H, Liu J, et al. Follow-up in Patients With Non-invasive Prenatal Screening Failures: A Reflection on the Choice of Further Prenatal Diagnosis. *Front Genet*. 2021 May 19;12:666648.
14. Van Den Bogaert K, Lannoo L, Brison N, et al. Outcome of publicly funded nationwide first-tier noninvasive prenatal screening. *Genet Med*. 2021 Jun;23(6):1137-1142.
15. Oepkes D, Page-Christiaens GC, Bax CJ, et al; and for the Dutch NIPT Consortium. Trial by Dutch laboratories for evaluation of non-invasive prenatal testing. Part I-clinical impact. *Prenat Diagn*. 2016 Dec;36(12):1083-1090.
16. Demografia – Vývoj počtu obyvateľov 2024. URL https://slovak.statistics.sk/wps/wcm/connect/2ea96b50-86e4-4e5e-a2fd-fe20f417a9e1/Demografia_Vyvoj_poctu_obyvatelov_2024.zip?MOD=AJPERES&CVID=pns3VTZ
17. Prenatal screening: NIPT and structural ultrasound scan Monitor 2023 – Radboud UMC. URL https://www.pns.nl/sites/default/files/2025-01/Monitor%202023%20screening-sprogramma%20de%20NIPT%20en%20het%20SEO_ENG.pdf#:~:text=In%2093.6%25%20of%20the%20170%2C721%20pregnancies%2C%20a,46.6%25%20in%202019%20to%2057%2C8%25%20in%202022

Korešpondujúci autor:
RNDr. Gabriel Minárik, PhD.
TRISOMYtest, s. r. o
Novozámocká 67, 949 05 Nitra
gabriel.minarik@trisomytest.sk