

Journal für

# Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik  
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



## Update der AG Reproduktionsgenetik der DGRM: Nicht-invasive Pränataltests aus mütterlichem Blut

Stumm M, Harasim T, Klein HG, Eichenlaub-Ritter U

Tüttelmann F

*J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 2014; 11 (4), 186-188

[www.kup.at/repromedizin](http://www.kup.at/repromedizin)

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

# Update der AG Reproduktionsgenetik der DGRM: Nicht-invasive Pränataltests aus mütterlichem Blut

M. Stumm<sup>1\*</sup>, T. Harasim<sup>2</sup>, H.-G. Klein<sup>2\*</sup>, U. Eichenlaub-Ritter<sup>3\*</sup>, F. Tüttelmann<sup>4\*</sup>

Die Entwicklung von nicht-invasiven pränatalen Analyseverfahren an zellfreier fetaler DNA aus maternalem Blut haben die Pränataldiagnostik in den vergangenen beiden Jahren stark verändert. In unserem kurzen Update wollen wir Sie über die aktuellen Entwicklungen informieren und Ihnen einige praktische Tipps für den klinischen Alltag mit auf den Weg geben.

**Schlüsselwörter:** zellfreie fetale DNA (cffDNA), nicht-invasive pränatale Diagnostik und Tests (NIPD/NIPT), next generation sequencing (NGS)

**Non-invasive Prenatal Analysis from Maternal Blood: A DGRM-Update.** The development of non-invasive prenatal analysis based on cell-free fetal DNA from maternal blood changed prenatal diagnosis massively during the last two years. Our short Update informs you about the actual developments and gives you some practical tips for your daily clinical work. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2014; 11 (4): 186–8.**

**Key words:** cell-free fetal DNA (cffDNA), non-invasive prenatal diagnostic and tests (NIPD/ NIPT), next generation sequencing (NGS)

Die zellfreie fetale DNA (cffDNA) im mütterlichen Blut bietet neue Möglichkeiten der nicht-invasiven pränatalgenetischen Testung (NIPD und NIPT). Im Gegensatz zu den etablierten invasiven Techniken der Chorionzottenbiopsie, der Amniozentese und der Chordozentese, die alle mit dem Risiko einer eingriffsbedingten Fehlgeburt (0,3–3 %) einhergehen [1, 2], ist die Grundlage für die Gewinnung der cffDNA eine venöse Blutentnahme der Mutter, die keinerlei methodisch bedingtes Risiko für den Feten darstellt. Die ursprüngliche Idee einer nicht-invasiven Pränataldiagnostik basierte auf der Entdeckung von intakten Zellen fetalen Ursprungs im mütterlichen Blut [3].

Nach aufwendiger, aber ineffizienter Anreicherung dieser Zellen wurden diese im Hinblick auf fetales Geschlecht und Chromosomenanzahl analysiert. Es zeigte sich jedoch, dass die Sensitivität und Spezifität dieser Verfahren zu gering war, um in der klinischen Praxis eingesetzt zu werden [4]. Erst die Entdeckung der cffDNA erlaubte die Wiederaufnahme der Entwicklung von nicht-invasiven pränatal-diagnostischen Testverfahren [5]. Diese umfassen molekulargenetische Techniken zum qualitativen Nachweis von spezifischen fetalen Sequenzen, wie z. B. paternal vererbten oder neu entstandenen (*de novo*) Mutationen

(noninvasive prenatal diagnosis, NIPD) [6].

Durch den Einsatz der digitalen PCR und speziellen Next-Generation-Sequencing- (NGS-) Technologien gelingt mittlerweile aber auch der zuverlässige quantitative Nachweis der klinisch relevanten Trisomien-13, -18 und -21, sowie von gonosomalen Aneuploidien und Triploidien (noninvasive prenatal testing, NIPT). Damit ermöglicht die Analyse von cff-DNA aus mütterlichem Blut sowohl quantitative (Aneuploidien) als auch qualitative Veränderungen (Mutationen) des fetalen Genoms, ohne eine invasive Diagnostik festzustellen. Die technische Herausforderung der NIPT besteht darin, dass durchschnittlich nur ca. 10 % der fragmentierten zellfreien DNA vom Feten oder besser gesagt aus der Plazenta stammt. Die restlichen 90 % sind mütterliche DNA-Fragmente.

Basierend auf diesem hohen maternalen Hintergrund muss eine zuverlässige Analyse erfolgen. Für rein qualitative Parameter, die nur im Feten und nicht in der Mutter vorkommen (z. B. Rhesus D, Y-chromosomale Sequenzen, paternal vererbte Mutationen), gelang dies mit NIPD sehr schnell [7–9]. Bei quantitativen Analysen zum Nachweis der am häufigsten vorkommenden Trisomien (NIPT) gestaltete sich die Testetablierung jedoch

schwieriger [10, 11]. Gerade der Nachweis einer Trisomie-13, -18 oder der Monosomie X war aufgrund einer stark differierenden Basenzusammensetzung der entsprechenden chromosomalen DNA großen Sensitivitätsschwankungen unterworfen [12]. Zusätzlich wurde festgestellt, dass bei Vorliegen einer Trisomie-13 und -18 bzw. einer Monosomie X der durchschnittliche cffDNA-Gehalt pro Blutprobe signifikant niedriger ist als bei Trisomie-21 [13].

Da jedoch dieser fetale Anteil der zellfreien DNA entscheidend für eine hohe Testsensitivität ist, musste dies mit Hilfe ausgefeilter bioinformatischer Algorithmen für den zuverlässigen Nachweis der Trisomie-13, -18 und der Monosomie X kompensiert werden. Diese Algorithmen prozessieren millionenfach parallel sequenzierte, amplifizierte, genomische DNA-Fragmente (massively parallel sequencing = MPS) und quantifizieren diese für die Chromosomen 13, 18, 21 und X. Dazu wird entweder das gesamte Genom analysiert (= gesamtgenomische Assays) oder es werden spezifische Regionen auf den zu testenden Chromosomen angereichert (sog. „targeted“-Assays). Nach einer quantitativen Analyse der Ergebnisse werden diese nun mit Werten von euploiden Chromosomen verglichen. Schließlich erfolgt eine statistische Beurteilung, ob eine gefundene

\* Vorstandsmitglieder der AG Reproduktionsgenetik

Eingegangen und akzeptiert: 12. August 2014

Aus dem <sup>1</sup>Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik Kudamm-199, Berlin; dem <sup>2</sup>Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik, Martinsried; dem <sup>3</sup>Institut für Gentechnologie/Mikrobiologie, Universität Bielefeld und dem <sup>4</sup>Institut für Humangenetik, Universität Münster.

**Korrespondenzadresse:** PD Dr. rer. nat. Markus Stumm, Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik Kudamm-199, D-10719 Berlin, Kurfürstendamm 199; E-Mail: stumm@kudamm-199.de

Dosis-Differenz signifikant ist oder nicht.

Bei der Anwendung in Hochrisiko-Patientenkollektiven (z. B. Schwangere mit erhöhtem mütterlichen Alter) zeigen alle NIPT-Verfahren hohe Detektionsraten (> 99 %) und wenige falsch positive Ergebnisse (< 1 %) [14]. Erste Ergebnisse von Studien in Patientenkollektiven mit „normalem“ Risiko (z. B. Schwangere mit niedrigem mütterlichen Alter) weisen sehr hohe negativ prädiktive und hohe positiv prädiktive Werte auf [15–17]. Mittlerweile werden von einigen Anbietern auch Aneuploidie-Analysen mittels NIPT bei Mehrlingsschwangerschaften und Schwangerschaften nach assistierten reproduktiven Techniken (ART) durchgeführt [18].

Nichtsdestotrotz treten in allen Patientenkollektiven immer wieder falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse auf. Diese können in letzter Konsequenz zur ungewollten Geburt eines betroffenen Kindes bzw. zum ungewollten Abbruch einer nicht betroffenen Schwangerschaft führen. Da das NIPT-Untersuchungsmaterial aus Trophoblastzellen stammt, besteht ähnlich wie bei der Chorionzotendiagnostik immer ein Restrisiko, dass der NIPT-Befund nicht den fetalen Chromosomensatz repräsentiert [19]. Auf die Plazenta begrenzte Mosaik können daher zu Fehlbefunden führen. Diese Befunde sind aber biologisch gesehen nicht als falsch-positiv oder falsch-negativ zu werten, da sie ja den chromosomalen Status der Plazenta korrekt wiedergeben. Dieses Phänomen wird besser als eine Diskrepanz zwischen plazentarem und fetalem Chromosomensatz beschrieben.

Aus diesem Grund sollten alle aneuploiden Befunde der nicht-invasiven pränatalen Diagnostik aus cfDNA durch einen Amniozentese bestätigt werden. Eine alleinige Chorionzottenbiopsie ist dabei nicht zu empfehlen, da diese ja zum selben diskrepanten Ergebnis führen kann. Auf die Plazenta begrenzte Mosaik sind auch klinisch nicht zu vernachlässigen, da sie in spezifischen Situationen einen direkten Einfluss auf die fetale Entwicklung haben können (z. B. fetale Wachstumsretardierung). Das heißt: Auch bei diskrepanten Ergebnissen zwischen der NIPT und der invasiven Diagnostik aus Fruchtwasserzellen sollten Schwanger-

schaften mit plazentabegrenzten Mosaiken engmaschig überwacht werden, um auf mögliche plazentare Komplikationen reagieren zu können.

Des Weiteren sind folgende Sachverhalte zu beachten, die im Rahmen einer genetischen Beratung der Schwangeren durch einen für die genetische Beratung qualifizierten Facharzt vor der Durchführung einer NIPT vermittelt werden sollten:

1. Durch die gezielte Untersuchung auf Aneuploidien der Chromosomen 13, 18, 21 und der Gonosomen werden nicht alle möglichen chromosomalen Aberrationen detektiert. Klinisch relevante strukturelle Aberrationen, wie unbalancierte Translokationen, Deletionen und Duplikationen werden momentan noch nicht routinemäßig erfasst. Des Weiteren darf eine Geschlechtsmitteilung laut Gendiagnostikgesetz §15 Abs. 1 nicht vor Ablauf der 12. Schwangerschaftswoche erfolgen.
2. Die NIPT kann nicht zwischen unterschiedlichen Formen von Aneuploidien unterscheiden. Das heißt, es bleibt nach der Untersuchung unklar, ob es sich um eine freie Trisomie, eine Translokationstrisomie oder um ein hochprozentiges chromosomales Mosaik handelt. Da diese Informationen aber für die Einschätzung der Prognose der Schwangerschaft sowie zur Einschätzung des Wiederholungsrisikos wichtig sind, sollte dieser Sachverhalt durch eine konventionelle zytogenetische Diagnostik an Fruchtwasserzellen weiter abgeklärt werden. Steht kein fetales Material zur weiteren Abklärung zur Verfügung, sollte zum Ausschluss einer balancierten parentalen Translokation immer eine Chromosomenanalyse aus dem Blut beider Eltern erfolgen.
3. Ist der fetale DNA-Gehalt im maternalen Blut zu niedrig, kann keine NIPT durchgeführt werden. Dies betrifft ungefähr 1–3 % aller Schwangeren. Biologische Faktoren, die zu einem geringen fetalen DNA-Gehalt führen können, sind ein hoher Bodymass-Index (BMI) der Schwangeren, die Plazentagröße sowie frühe Schwangerschaftswochen. Starke körperliche Belastungen der Schwangeren führen ebenfalls zu einer Reduktion des fetalen DNA-Gehalts im mütterlichen Blut [20]. Grenzwerte für die diagnostische Sicherheit der meisten

NIPT-Verfahren liegen bei > 4 % für Einlingsschwangerschaften und > 8 % für Mehrlingsschwangerschaften.

4. Insgesamt ist zu berücksichtigen, dass das Ergebnis der NIPT momentan noch später vorliegt (Expressanalysen 3–5 Tage, Standardanalysen 5–10 Tage) als das Ergebnis der Serumanalyse oder die ersten Ergebnisse der invasiven Pränataldiagnostik. Die Ergebnisse der Chorionzotten-Kurzzeitkultur und des pränatalen Schnelltests an nativen Amnionzellen können bereits 12–24 Stunden nach Biopsie oder Punktion der Schwangeren mitgeteilt werden und bieten damit eine akute Handlungsoption.
5. Mit der NIPT werden keine Neuralrohrdefekte erkannt und sie ersetzt auch nicht das Ersttrimester-Screening.
6. Eine Ultraschalluntersuchung vor der NIPT ist unseres Erachtens erforderlich, um das exakte Schwangerschaftsalter, Mehrlingsschwangerschaften oder „Vanishing Twins“ zu erfassen. Ein zu frühes Schwangerschaftsalter kann in einer zu niedrigen Sensitivität des NIPT-Verfahrens resultieren. Der Status der Mehrlingsschwangerschaften muss vor der NIPT-Untersuchung bekannt sein, um das diagnostische Vorgehen anzupassen (> 8 % cfDNA erforderlich) und um die NIPT-Ergebnisse korrekt interpretieren zu können. „Vanishing Twins“ können zu falschen Ergebnissen führen, wenn noch plazentare DNA des untergegangenen Zwillings im maternalen Blutkreislauf zirkuliert. Das ist eine Problematik, die speziell auch bei Patientinnen nach ART berücksichtigt werden sollte [18].

Trotz dieser Besonderheiten liefert die NIPT im Vergleich zur Serumanalytik des Ersttrimesterscreenings die höheren Detektionsraten und weniger Fehlbefunde [17, 21]. Dies hat den Vorteil, dass es deutlich weniger invasive Eingriffe aufgrund falsch-positiver Ergebnisse gibt. Zum momentanen Zeitpunkt kann die NIPT nach unserer Meinung vor allem für Frauen, die nach dem Ersttrimester-Screening weder ein eindeutig auffälliges noch ein eindeutiges unauffälliges Ergebnis vorliegen haben, empfohlen werden. Mit dem Ergebnis der NIPT kann in diesem Patientenkollektiv das Risiko eines unnötigen invasiven Eingriffes vermieden werden.

Mittelfristig besteht die Möglichkeit, dass die NIPT die Serumanalyse des Ersttrimester-Screenings ersetzt. Dabei ist auf der einen Seite zu berücksichtigen, dass bei einer NIPT deutlich höhere Kosten im Vergleich zu einer Serumanalytik anfallen. Auf der anderen Seite entfallen aber auch die hohen Kosten für die unnötigen Amniozentesen nach falsch-positiven Befunden der Serumanalytik. Mittlerweile übernehmen deshalb bereits viele private wie auch gesetzliche Krankenkassen die Kosten der NIPT, wenn die Schwangeren bei entsprechenden Risikokonstellationen nach unauffälligem NIPT-Ergebnis auf eine Amniozentese verzichten. Nach Meinung der Autoren ist dies der richtige Weg, und entspricht auch der Stellungnahme der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (gfh) vom 12.11.2012, in der postuliert wird, dass „die Untersuchung keiner Schwangeren vorenthalten werden kann, bzw. allen Schwangeren verfügbar gemacht werden sollte“.

#### ■ Interessenkonflikt

Die Autoren haben keine Interessenkonflikte.

#### Literatur:

- Rost I, Schiessl B, Heinrich U, Rupprecht W, Wagner A, et al. Invasive Pränataldiagnostik/Invasive methods in prenatal diagnostics. *LaboratoriumsMedizin* 2007; 31: 171–85.
- Stumm M, Entezami M. Pränataldiagnostik: Aktuelle medizinische Aspekte. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 2013; 56: 1662–9.
- Douglas GW, Thomas L, Carr M, Cullen NM, Morris R. Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1959; 78: 960–73.
- Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn* 2002; 22: 609–15.
- Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 1997; 350: 485–7.
- Lo YMD, Chan KCA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FMF, et al. Maternal Plasma DNA Sequencing Reveals the Genome-Wide Genetic and Mutational Profile of the Fetus. *Sci Transl Med* 2010; 2: 61ra91.
- Lo YD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998; 339: 1734–8.
- Reed W, Kong DZ, Lee TH, Cowan MJ, Busch MP, et al. Non-invasive determination of the paternal HLA haplotype of a fetus using kinetic PCR to detect fetal microchimerism in maternal plasma. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 527–9.
- Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *Br Med J* 2008; 336: 816–8.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 16266–71.
- Chiu RW, Chan KA, Gao Y, Lau VY, Zheng W, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 20458–63.
- Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012; 14: 296–305.
- Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem* 2013; 60: 243–50.
- Liao GJW, Gronowski AM, Zhao Z. Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation. *Clin Chim Acta* 2014; 428: 44–50.
- Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 374: e1–e6.
- Song Y, Liu C, Qi H, Zhang Y, Bian X, Liu J. Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat Diagn* 2013; 33: 700–6.
- Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med* 2014; 370: 799–808.
- Grömminger S, Yagmur E, Erkan S, Nagy S, Schöck U, et al. Fetal aneuploidy detection by cell-free DNA sequencing for multiple pregnancies and quality issues with vanishing twins. *J Clin Med* 2014; in press.
- Grati FR, Malvestiti F, Ferreira JCPB, Bajaj K, Gaetani E, et al. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genet Med* 2014; 16: 620–4.
- Schlütter JM, Hatt L, Bach C, Kirkegaard I, Kolvraa S, et al. The cell-free fetal DNA fraction in maternal blood decreases after physical activity: Decreased fetal fraction in maternal blood after physical activity. *Prenat Diagn* 2014; 34: 341–4.
- Nicolaides KH, Wright D, Poon LC, Syngelaki A, Gil MM. First-trimester contingent screening for trisomy 21 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing: First-trimester contingent screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 42: 41–50.