

Aktuelle grundlegende Informationen für die Schwangerenberatung

Nichtinvasiver pränataler Test (NIPT)

Im Sommer 2012 war in der Schweiz der erste Test zur Detektion einer Trisomie 21 basierend auf der Sequenzierung freier DNA im maternalen Blut verfügbar. Seitdem bieten nun vier Firmen einen solchen Test mit zum Teil verschiedenen Varianten bzw. Optionen an. Die Firmen werben mit der Durchführung der Tests ab 10 Schwangerschaftswochen und einer Sensitivität von 99% für die Detektion einer Trisomie 21. Jährlich nehmen in der Schweiz vermutlich mehrere tausend Schwangere einen solchen Test in Anspruch. Genaue Zahlen hierzu sind nicht verfügbar.



En été 2012, le premier test pour détecter l'ADN fœtale libre dans le sang maternel devenait disponible permettant ainsi la recherche de la trisomie 21 sans prélèvement invasif. Depuis et à ce jour, 4 laboratoires offrent ce genre de tests qui se distinguent par quelques variations voire options. Les laboratoires proposent activement ces tests à partir de 10 semaines de gestation avec une sensibilité de 99% pour la détection d'une trisomie 21. On estime à plusieurs milliers par an les femmes en Suisse qui à présent recourent à ce genre de tests. Des chiffres exacts ne sont pas disponibles.

Als Überbegriff für diese neue Methode in der Pränataldiagnostik wird der Terminus nichtinvasiver pränataler Test (NIPT) oder zellfreie fetale DNA-Test verwendet. Genau genommen ist der Begriff fetale DNA nicht ganz korrekt, da die freie DNA nicht direkt fetalen Ursprungs ist. In diesem Artikel werden die Tests allgemein mit der Abkürzung NIPT bezeichnet.

Alle verfügbaren NIPT-Tests basieren prinzipiell auf der Sequenzierung freier DNA-Fragmente im mütterlichen Blut, welche in ca. 90% mütterlichen und nur zu einem geringen Prozentsatz plazentaren Ursprungs sind. Es werden jeweils nur kurze Abschnitte (sogenannte „reads“) dieser DNA-Fragmente sequenziert. Das gesamte Verfahren erzeugt Millionen dieser reads und ordnet diese anschliessend eindeutig der Sequenz eines Referenzgenoms zu. Je nach Chromosomengrösse variiert die Anzahl der eindeutigen Zuordnungen. Sind zugeordnete reads von einem Chromosom entsprechend seiner Grösse überrepräsentiert, so muss ein überzähliges Chromosom angenommen werden. Von den verfügbaren Tests lassen sich drei Varianten in den Testverfahren unterscheiden.

Eine Variante sequenziert nichtselektiv DNA Fragmente des gesamten Genoms (Praena Test®, Prendia Test). Eine andere Testvariante ist die gezielte Sequenzierung, hierbei werden zuerst bestimmte Abschnitte der interessierenden Chromosomen amplifiziert und anschliessend sequenziert. Dadurch kann der Sequenzie-



Dr. med. Tilo Burkhardt
Zürich

rungsaufwand reduziert werden (z.B. Harmony Test). Eine Variante dieser gezielten Sequenzierung ist die dritte Methode. Mit dieser werden single-nucleotid Polymorphismen (SNPs) der zu untersuchenden Chromosomen amplifiziert und sequenziert. Mit dieser Technik kann die fetale von der mütterlichen DNA unterschieden werden und es wird kein Referenzgenom benötigt (Panorama-Test).

Anfänglich war die Detektion einer Trisomie 21 das Ziel der NIPT-Tests. Im Verlauf wurde das Spektrum auf die Detektion einer Trisomie 18, Trisomie 13 und gonosomale Aneuploidien erweitert. Die drei Methoden sind vergleichbar bzgl. Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung dieser genannten Chromosomenstörungen (1).

Ein Review von insgesamt 24 Studien mit fast 23 000 Schwangerschaften gibt eine Sensitivität für die Erfassung einer Trisomie 21 bei Einlingsschwangerschaften von 99.2% (95% Konfidenzintervall: 98.5–99.6%) an bei einer falsch positiven Rate von 0.09% (2). Der positive prädiktive Wert für eine Trisomie 21 im NIPT-Test beträgt in einer häufig zitierten Studie von Bianchi et al. 45.5% (3). Ein Kritikpunkt an dieser Studie ist allerdings, dass die falsch positiven Resultate postpartal nicht nachverfolgt wurden. Es erfolgten keine Abklärungen bzgl. Mosaiken beim Neugeborenen, der Plazenta oder der Mütter. Neuere Studien ergeben einen positiven prädiktiven Wert für eine Trisomie 21 von 94.4% (4) bzw. 97.9% (5). Der Vergleich des positiven prädiktiven Wertes zwischen den verschiedenen Studien ist allerdings schwierig aufgrund der unterschiedlichen Trisomie 21 Prävalenz in den untersuchten Kollektiven.

Die Sensitivität für die Erfassung einer Trisomie 18 beträgt 96% (95% Konfidenzintervall: 94.3–97.9%) bei einer falsch positiven Rate von 0.13%. Nochmals geringer ist die Sensitivität bei der Erfassung einer Trisomie 13, in dem bereits erwähnten Review von Gil et al. wird diese mit 91.7% (95% Konfidenzintervall: 86.9–95.5%) angegeben mit einer falsch positiven Rate von 0.13% (2). Wang et al. haben den konventionellen Karyotyp mit den Resultaten der fetalen DNA-Tests verglichen und berechneten einen positiven prädiktiven Wert für die Trisomie 18 von 64% und für die Trisomie 13 von 44% (4).

Neben der Bestimmung des fetalen Geschlechts bieten fast alle verfügbaren Tests die Möglichkeit der Untersuchung auf gonosomale Chromosomenstörungen (45, X; 47, XXX; 47 XXY; 47 XYY). Für die Erfassung der Monosomie X geht man entsprechend dem Review von Gil et al. von einer Sensitivität von 90.3% (95% Konfidenzintervall: 85.7–94.2%) aus bei einer falsch positiven Rate von 0.14% [2]. Für die übrigen gonosomalen Chromosomenstörungen (47, XXX; 47 XXY; 47 XYY) wird eine Sensitivität von 93% (95% Konfidenzintervall: 85.8–97.8%) bei einer falsch positiven Rate von 0.14% angenommen. Ernüchternd ist der von Wang et al. berechnete positive prädiktive Wert von 38% für eine gonosomale Chromosomenstörung.

Diese Zahlen verdeutlichen, dass die NIPT Tests aktuell noch nicht die Zuverlässigkeit einer invasiven Diagnostik besitzen und jedes auffällige Resultat weiterhin durch eine invasive Diagnostik (idealerweise eine Amniozentese) bestätigt werden muss.

Welche Faktoren führen zu einem „inkorrekten“ Testresultat bzw. zu einer Diskrepanz zwischen dem fetalen DNA-Test und einer konventionellen Karyotypisierung? Zum einen führt der Ursprung der freien DNA aus Trophoblastzellen unweigerlich auch zum Nachweis von Auffälligkeiten der Plazenta. Sogenannte Plazentamosaiken können falsch positive Resultate verursachen, eine Verifizierung mittels Amniozentese würde einen unauffälligen Karyotyp ergeben. Grati et al. berechneten eine Wahrscheinlichkeit von 0.091% für das Vorliegen eines falsch positiven Resultats aufgrund eines Plazentamosaiks aller potentiell mit einem NIPT-Test erkennbaren Chromosomenstörungen. Für ein Plazentamo-

saik betreffend der Chromosomen 21, 18, 13 geben diese Autoren eine Wahrscheinlichkeit von 0.033% an (6). Chorionzottenbiopsien ergeben in ca. 1% aller Resultate den Verdacht auf ein Plazentamosaik. Im Gegensatz dazu ergibt ein fetales Mosaik ein falsch negatives Resultat, eine Amniozentese würde einen auffälligen Karyotyp zeigen. Auch ein früh abgestorbener Zwilling mit aneuploidem Karyotyp kann Ursache eines falsch positiven Testergebnisses sein. Die Ursache für ein falsch positives Testresultat kann auch auf der maternalen Seite bestehen z.B. in Form eines Mosaiks bei der Mutter oder eines Tumors.

Hauptursache für einen Testausfall (kein Resultat) ist ein zu geringer Anteil der fetalen DNA (fetale DNA-Fraktion) an der gesamten freien DNA. Je höher diese fetale DNA Fraktion ist, desto zuverlässiger ist ein NIPT-Test. Wesentliche negative Einflussgrößen auf die fetale DNA-Fraktion sind ein zu frühes Gestationsalter und ein erhöhtes mütterliches Gewicht ($\geq 100\text{kg}$).

Alle NIPT Tests, welche nicht auf der Sequenzierung von single-nucleotid Polymorphismen (SNPs) basieren, sind auch für Zwillingschwangerschaften verfügbar (Harmony Test, PraenaTest®, Prendia Test). Die Tests sind unabhängig von der Chorionizität einsetzbar. Die Sensitivität bzgl. einer Trisomie 21 wird in der Metaanalyse von Gil et al. mit 93.7% (30 von 31 Schwangerschaften mit einer Trisomie 21 erkannt) angegeben mit einer falsch positiven Rate von 0.23%. Insgesamt entspricht die Datenlage bei Zwillingschwangerschaften noch nicht der von Einlingsschwangerschaften, weshalb eine Beurteilung über die Zuverlässigkeit der NIPT-Tests für eine Trisomie 21 bei Zwillingschwangerschaften noch nicht definitiv möglich ist. Für andere Trisomien (Trisomie 18, Trisomie 13) liegen bisher praktisch kaum aussagekräftige Daten vor. Alle bisherigen Studien zeigen allerdings eine höhere Testausfallsrate bei Zwillingschwangerschaften (3.1% vs. ca. 1% bei Einlingen). Gesicherte Risikofaktoren für einen Testausfall sind das erhöhte mütterliche Gewicht und eine IVF induzierte Zwillingschwangerschaft (7). Es wurden auch häufigere Testausfälle bei dichorialen Gemini im Vergleich zu monochorialen Gemini beobachtet. In der Studie von Bevilacqua et al. war die Chorionizität allerdings kein signifikanter Risikofaktor.

Mit jeder Schwangeren sollte zu Beginn der Schwangerschaft geklärt werden, ob und in welchem Umfang eine Pränataldiagnostik gewünscht ist. Dabei müssen die verschiedenen Methoden in der Pränataldiagnostik, und dazu gehören jetzt neu die fetalen DNA-Tests, besprochen werden. Einer der wichtigsten Punkte bei der Beratung der Schwangeren über einen fetalen DNA-Test ist die Darlegung der Möglichkeiten und Limite dieser Tests. Ein unauffälliges Testergebnis bedeutet nicht, dass beim Feten ein numerisch und strukturell normaler Karyotyp vorliegt. Speziell bei Zwillingschwangerschaften muss die aktuell noch schlechte Datenlage und das dreimal höhere Testausfallrisiko thematisiert werden.

Wenn die Entscheidung zur Durchführung eines NIPT-Tests getroffen ist, stellt sich die Frage, bei welchem Gestationsalter die entsprechende Blutentnahme durchgeführt werden soll. So früh wie möglich, somit ab 9+0 SSW, oder nach Durchführung des Ersttrimesterultraschalls? Viele Argumente sprechen für eine Blutentnahme im Rahmen des Ersttrimesterultraschalls. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich durch den Ultraschall letale Fehlbildungen (z.B. Anencephalus) sowie Fehlbildungen, bei denen eher eine invasive Pränataldiagnostik sinnvoller erscheint, erfassen (z.B. Nackentransparenz $\geq 3.5\text{mm}$, Bauchwanddefekte, Hydrops fetalis, Megavesica). Voraus-

Take-Home Message

- ◆ NIPT Tests sind inzwischen ein etablierter Bestandteil des Portfolios der Pränataldiagnostik
- ◆ Durchführung eines NIPT Tests über die Grenzen und Möglichkeiten dieser Methode aufgeklärt werden
- ◆ anderem ein unauffälliger Ersttrimesterultraschall sein
- ◆ Die Zuverlässigkeit der in der Schweiz verfügbaren Tests ist vergleichbar in Bezug auf den Nachweis der häufigsten autosomalen Chromosomenstörungen
- ◆ Auffällige Testresultate müssen weiterhin mit einer invasiven Diagnostik verifiziert werden (idealerweise mittels Amniozentese)
- ◆ Ein Teil der falsch negativen oder falsch positiven Resultate beruht auf genetischen Mechanismen und nicht auf der Technik der Tests

Messages à retenir

- ◆ Les tests prénataux non-invasifs (TPNI) sont devenus une part établie de l'éventail diagnostique prénatal
- ◆ possibilités et limites de cette méthode avant qu'un prélèvement sanguin en vue d'un TPNI ne soit effectué
- ◆ Avant un prélèvement en vue d'un TPNI, on devrait disposer d'une ultrasonographie du premier trimestre qui soit normale
- ◆ La fiabilité des TPNI, actuellement disponibles en Suisse, est comparable en terme de détection des aberrations chromosomiques autosomiques les plus courantes
- ◆ Un résultat anormal d'un TPNI doit être vérifié par un diagnostic prénatal invasif (de préférence l'amniocentèse)
- ◆ Une partie des résultats faussement négatifs ou positifs des TPNI repose sur des mécanismes génétiques et n'est pas imputable à la technique des tests

setzung für die Durchführung eines NIPT-Tests sollte immer ein unauffälliger Ersttrimesterultraschall sein. Bereits jetzt kann das Testergebnis in 4 bis 10 Tagen erhältlich sein. Eine evtl. notwendige Chorionzottenbiopsie ergibt ein Kurzzeitresultat in ein bis drei Tagen, sodass eine Diagnose vor 15 Schwangerschaftswochen möglich ist. Gegen eine zu frühe Durchführung sprechen die Abortrate zwischen 9 und 11 SSW, eine höhere Ausfallrate aufgrund der geringeren fetalen DNA-Fraktion und das wichtigste Argument: die Möglichkeit der Detektion von Fehlbildungen im Ersttrimesterultraschall und somit die Vermeidung von unnötigen oder doppelten Untersuchungen.

Die Durchführung eines Ersttrimestertests (ETT, Risikoevaluierung mittels mütterlichem Alter, Nackentransparenz, PAPP-A, freies β -HCG) vor einem NIPT wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Dies würde Sinn machen, wenn der ETT eine ähnlich hohe Sensitivität eines NIPT erreichen würde mit einer meist daraus resultierenden hohen Anzahl an falschpositiven Fällen, welche dann mittels eines NIPT überprüft werden müssten. Auch mit einer Verringerung des cut-off Wertes eines ETT für ein erhöhtes Risiko, z.B. auf bis zu 1:3000, wird nicht die Sensitivität von 99% für eine Trisomie 21 eines NIPT erreicht, wie eine Modellrechnung an einem grossen Screeningkollektiv ergab (8). Basierend auf diesen Daten wäre eine primäre Risikoevaluierung und Durchführung

eines NIPT-Tests in Abhängigkeit des errechneten Risikos nicht sinnvoll.

Zum nichtinvasiven Ausschluss der häufigsten Trisomien sind die fetalen DNA-Tests aktuell die geeignetste Methode. Ein Teil der falsch negativen oder falsch positiven Resultate beruhen auf genetischen Mechanismen und nicht auf der Technik der Tests. Die Möglichkeiten und Limite der fetalen DNA-Tests müssen der Schwangeren erläutert werden. Als Zeitpunkt für die Blutentnahme zur Durchführung eines fetalen DNA-Tests bietet sich der Ersttrimesterultraschall an, denn ein auffälliger Ultraschall ist meist eine Indikation zur invasiven Pränataldiagnostik.

Dr. med. Tilo Burkhardt

Klinik für Geburtshilfe
UniversitätsSpital Zürich
8091 Zürich
tilo.burkhardt@usz.ch

Literatur:

1. Boon EMJ, Faas BHW. Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2013 Jun;33(6):563–8
2. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015
3. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med.* 2014 Mar 27;370(9):799–808
4. Wang J-C, Sahoo T, Schonberg S, Kopita K a, Ross L, Patek K, et al. Discordant noninvasive prenatal testing and cytogenetic results: a study of 109 consecutive cases. *Genet Med.* 2014;17(August):2–4
5. Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, Marusiak B, Ehrich M, van den Boom D, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am J Obstet Gynecol.* Elsevier Inc; 2014;211(4):365.e1–365.e12
6. Grati FR, Malvestiti F, Ferreira JCPB, Bajaj K, Gaetani E, Agrati C, et al. Feto-placental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2014;16(8):1–5
7. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierckx H, et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):61–6
8. Petersen OB, Vogel I, Ekelund C, Hyett J, Tabor a. Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: Population-based study from a country with existing first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(3):265–71