PRÄNATALDIAGNOSTIK

Ein neuer nichtinvasiver Pränataltest

B. Eiben[1], M. Hall[2], M. Ludwig[3], P. Kozlowski[4], E. Merz[5]

Seit einigen Jahren werden zunehmend nichtinvasive Methoden der Pränataldiagnostik, die mittels der direkten Bestimmung fetaler DNA arbeiten, zur Erkennung von Aneuploidien diskutiert und seit 2012 auch in vielen Ländern als neues Screeningverfahren eingesetzt. Da sich alle diese Verfahren als fortgeschrittene Screeningverfahren und nicht als direkte pränatale Diagnostik definieren, müssen sie in ihrer Wertigkeit mit den herkömmlichen Screeningkonzepten wie dem Ersttrimesterscreening verglichen werden: So auch der neue* Panorama-Test*, der einen Test der zweiten Generation darstellt.

Neben der bekanntesten und am häufigsten vorkommenden Trisomie 21 können auch die Trisomie 18 und die Trisomie 13 auftreten, wobei Letztere überwiegend in einer Fehlgeburt enden. Aus diesem Grund beziehen sich Verfahren zur Risikoanalyse von Aneuploidien auch hauptsächlich auf diese drei Trisomien.

Das gegenwärtig am häufigsten genutzte Verfahren ist das Ersttrimesterscreening, das auf der Analyse der Nackentransparenz (NT) und der Bestimmung von freiem β-hCG und von PAPP-A unter Berücksichtigung der Scheitel-Steiß-Länge als Maß des Schwangerschaftsalters und des maternalen Alters beruht. Das Zeitfenster der Messungen liegt zwischen 11+0 und 14+0 SSW. Da eine stark erhöhte Nackentransparenz (ebenso wie ein zystisches Hygrom) und erniedrigte PAPP-A-Konzentrationen auch beim 45,X-Karyotyp zu finden sind, können pathologische Monosomie-X-Fälle beim Ersttrimesterscreening in Form eines erhöhten Trisomie-21-Risikos auffallen.

[1] amedes Institut für Labormedizin und Klinische Genetik Rhein/Ruhr, Essen
[2] Natera Inc., San Carlos (USA)
[3] amedes Hamburg
[4] praenatal.de, Düsseldorf
[5] Nordwest Krankenhaus, Frankfurt

Möglichkeiten und Grenzen des Ersttrimesterscreenings

Die Einführung des Ersttrimsterscreenings hat zu einer deutlich verbesserten pränatalen Versorgung und auch Ultraschallversorgung der Schwangeren geführt. Verglichen mit der maternalen Altersindikation stellt dies einen gewaltigen Fortschritt dar, denn heute sind etwa 23 % der Schwangeren 35 Jahre und älter (damit entspräche die Falsch-positiv-Rate dieser Indikation 23 %) und diese Altersgruppe müsste sich bei alleiniger Anwendung der maternalen Altersindikation mit einem invasiven Eingriff auseinandersetzen.

Durch die Standardisierung des Ersttrimesterscreenings sowohl durch die FMF-England als auch durch die FMF-Deutschland ist diese Methodik heute sehr verbreitet und es liegen große Erfahrungen damit vor. Durch die aktuelle Programmversion PRC 2.0 der FMF-Deutschland konnte die Erkennungsrate für die Trisomie 21 auf 87 % gesteigert und die Falsch-positiv-Rate auf 3,5 % gesenkt werden (1). Zu ähnlichen Detektionsraten kommt auch der Algorithmus der FMF-England (2).

Auffällige Screeningergebnisse (etwa 3,5–5 %) erfordern gegebenenfalls auch eine invasive Folgeuntersuchung wie Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese. Jedoch führen diese invasiven Eingriffe je nach Erfahrung der Untersucher bei 0,3–1 % der Frauen zu einer eingriffsinduzierten Fehlgeburt. Da methodisch bedingt über 10 % der Morbus-Down-Fälle durch das Ersttrimesterscreening nicht erkannt werden, muss auch die Möglichkeit falsch negativer Befunde vor einem solchen Test mit der Schwangeren in einer genetischen Beratung nach Gendiagnostikgesetz besprochen werden. Aus diesen Gründen muss sich immer noch eine beträchtliche Anzahl von Frauen mit einer Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie auseinandersetzen.

Fetale zellfreie DNA im maternalen Blut

Einen Ausweg aus diesem Dilemma kann die Bestimmung der im maternalen Plasma zirkulierenden zellfreien fetalen DNA (cfDNA) sein. Diese neue Screeningmethode auf fetale Aneuploidien wird auch als nichtinvasiver Pränataltest (NIPT) bezeichnet. Die fetale cfDNA stammt aus Trophoblastzellen, die in die mütterliche Zirkulation übergegangen sind und dort kontinuierlich abgebaut werden. Dadurch ist es durch eine einfache Blutentnahme bei der Mutter möglich, die Kopienzahl der fetalen Chromosomen zu bestimmen und so gleichzeitig größtenteils die Risiken invasiver Eingriffe zu vermeiden. Die fetale cfDNA hat mit durchschnittlich 10 % nur einen geringen Anteil an der gesamten freien DNA im Plasma einer Schwangeren, denn der größte Teil stammt direkt von der Schwangeren. Der fetale Anteil steigt mit dem Gestationsalter an und sinkt nach vorläufigen Erkenntnissen mit zunehmendem BMI der Mutter. Die

korrekte Bestimmung der Kopienzahl der fetalen Chromosomen mithilfe der aus dem maternalen Plasma isolierten cfDNA erfordert eine Amplifizierung der cfDNA und eine nachfolgende sehr komplexe bioinformatische Analyse.

Bis jetzt gibt es zwei wichtige bioinformatische Ansätze: die „quantitative" Methode bzw. die Auszählmethode der ersten Generation, die in den meisten cfDNA-basierten Tests genutzt wird, und die Methode der zweiten Generation, die als *Panorama-Test* erhältlich ist und die genotypischen Informationen aus der Analyse von Polymorphismen einbezieht.

NIPT-Techniken der ersten Generation

NIPT-Technologien der ersten Generation nutzen eine rein quantitative „Auszählmethode", um die Kopienzahl der fetalen Chromosomen zu bestimmen, und sie unterscheiden nicht zwischen den maternalen und fetalen Genotypen in der cfDNA. Diese Methoden vergleichen die relative Zahl der Sequenz-Auslesungen von einem entsprechenden Chromosom, z. B. Chromosom 21 (wo Trisomie zum Down-Syndrom führt), mit einem Referenzchromosom, von dem angenommen wird, dass es euploid ist. Während dieser Ansatz für das Erkennen von Trisomie 21 effektiver ist als biochemische und ultraschallbasierte Testmethoden, weist er bei Trisomie 18, Trisomie 13 oder Geschlechtschromosom-Aneuploidien keine vergleichbare Effektivität auf (3–5). Zusätzlich verschlechtert sich die Genauigkeit, wenn die fetalen Anteile gering sind; bei einem fetalen Anteil von weniger als 8 % können die Erkennungsraten der quantitativen Tests auf nur 75 % sinken (6). Forschungsergebnisse zeigen, dass etwa ein Viertel der schwangeren Frauen, die sich in der 9. bis 14. Schwangerschaftswoche befinden, fetale cfDNA-Anteile von 4 % bis 8 % aufweist (7). Außerdem reicht die Sensitivität bei der Erkennung von Trisomie 13 nur von 80 % bis 91,7 %.

Der *Panorama-Test*

NIPT-Techniken der zweiten Generation wie der *Panorama-Test* von Natera basieren auf der Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs). Der *Panorama-Test* untersucht 19.500 solcher Polymorphismen, die größtenteils auf den fünf zu untersuchenden Chromosomen lokalisiert sind (12). Diese SNPs werden amplifiziert und sequenziert. Damit kann zwischen maternalen und fetalen Genotypen unterschieden werden kann. Dieser Test verwendet einen eigenen, patentierten „Next Generation Aneuploidy Test Using SNPs"-Algorithmus (NATUS). *Panorama* ist der einzige NIPT, der die Leukozyten der Mutter nutzt, um ihre DNA zu isolieren und zu identifizieren. Diese Information wird benötigt, um den maternalen Genotyp „herauszurechnen", was zu einem verlässlicheren fetalen Genotyp und somit zu einer höheren Genauigkeit selbst bei geringem fetalem Anteil von 4 % führt. Da bei dieser Methode kein Referenzchromosom erforderlich ist, kann sie neben den Trisomien 21, 18 und 13 sowie der Monosomie X auch Triploidien nachweisen.

In ersten Studien konnten bei den autosomalen Trisomien 21, 18 und 13 eine Sensitivität von über 99 % und eine Spezifität von 99 % errechnet werden. Hinsichtlich des Nachweises der Monosomie X (Turner-Syndrom) lag die Sensitivität bei 91,7 % und die Spezifität bei etwa 99 % (13). Grundsätzlich ist jedoch bei allen Methoden des NIPT anzumerken, dass die Datenlage noch weiter verbessert werden sollte.

In etwa 5 % der Fälle können wegen geringer DNA-Qualität keine Ergebnisse mitgeteilt werden. In der klinischen Praxis führt das in den meisten Fällen dazu, dass eine zweite Blutentnahme angefordert wird, und vorläufige klinische Daten zeigen, dass mehr als 90 % dieser nochmaligen Blutentnahmen die Qualitätskontrolle bestehen und ein verlässliches Ergebnis liefern; dies führt zu einer Rate der nicht auswertbaren Ergebnisse von unter 1 % (10).

Kein „Stand-alone-Test"

In einer gerade erschienenen klinischen Studie der Gruppe um Prof. Nicolaides wurde der *Panorama-Test* ausführlich untersucht und die oben genannten Ergebnisse bestätigt. Nicolaides et al. (9) kommen zu dem Schluss, dass der NIPT in seiner Performance allen gegenwärtig erhältlichen Methoden, die auf dem maternalen Alter, der Ultraschalluntersuchung und der Serumbiochemie beruhen, weit überlegen ist. Das bedeutet nicht, dass sich Nicolaides gegen eine detaillierte fetale Ultraschalluntersuchung ausspricht. Er sieht jedoch einen Wechsel hin zur Einbindung des NIPT in zukünftige Screeningstrategien. Wie schon einleitend erwähnt, steht in Deutschland jeder Schwangeren ein hochwertiges Angebot an pränatalem Ultraschall zu Verfügung. Es besteht bei Manchen die Befürchtung, dass durch eine Anwendung des NIPT als „Stand-alone-Test" dieses hervorragende Angebot zunehmend abgebaut werden könnte. Unser Ansicht nach sollte der Test obligat nur in Kombination mit einer aussagekräftigen fetalen Ultraschalluntersuchung angeboten werden. „Stand-alone-Tests", initiiert von Ärzten, die nicht regelmäßig mit der Versorgung von Schwangeren betraut sind, sind aus unserer Sicht abzulehnen.

Panorama kann bereits ab der Schwangerschaftswoche 9+ angewendet werden. Da die Analyse jedoch etwa 15 Arbeitstage benötigt, steht das Ergebnis dann frühestens ab der SSW 12+ zur Verfügung.

Kosten und Vorgehen

Der Test kostet momentan in Deutschland 595 Euro (635 Euro in-

klusive der Triploidie-Diagnostik) und ist als individuelle Gesundheitsleistung anzusehen. Inwieweit private Kassen diesen Test übernehmen, bleibt abzuwarten. Der *Panorama-Test* besteht aus einer einfachen Blutentnahme (2x 10 ml) mit einem speziellen Abnahmeset und einem optionalen Wangenabstrich beim Vater. Die Probe des Vaters ist bei etwa 2 % der Fälle hilfreich, um Ausfälle des Tests aufgrund mangelnder DNA-Qualität zu minimieren. Jedoch ist diese nicht obligat erforderlich, da sie die Genauigkeit der Ergebnisse nicht beeinflusst. Daten zur Paternalität werden nicht gespeichert oder mitgeteilt.

Für die Probeentnahme werden spezielle Blutentnahmeröhrchen verwendet, die die cfDNA schützen. Eine eventuelle Lagerung erfolgt bei Zimmertemperatur. Die Probe wird dann per Kurier an das amedes-Labor in Essen geschickt und von dort an das CLIA-zertifizierte DNA-Labor von Natera in San Carlos (Kalifornien/USA) geschickt. Nach Probenaufbereitung und Analyse wird ein Bericht erstellt, der die individuelle Risikolage für jedes der beurteilten Chromosomen enthält (Hinweis oder kein Hinweis auf eine entsprechende Aneuploidie). Wenn gewünscht, wird das Geschlecht des Fetus nach der entsprechenden Frist mitgeteilt. Bei Patienten, deren NIPT einen deutlichen Hinweis auf fetale Chromosomenanomalien gibt, wird eine invasive Pränataldiagnostik zur Abklärung nach einer genetischen Beratung empfohlen.

Fazit

Ein NIPT darf nach Gendiagnostikgesetz nur nach einer entsprechenden genetischen Beratung durch die verantwortliche ärztliche Person angewandt werden. Der *Panorama-Test* bietet hinsichtlich des Nachweises der Trisomie 21, Trisomie 18, Trisomie 13, Monosomie X, der Triploidie und des Geschlechts des Fetus eine hohe Genauigkeit. Durch die niedrige Falsch-positiv-Rate wird im Vergleich zu biochemischen und ultraschallbasierten Screeningmethoden die Zahl der unnötigen invasiven diagnostischen Verfahren verringert und eine frühzeitige Beruhigung geboten. Zudem bedeutet die niedrige Falsch-negativ-Rate, dass mehr betroffene Schwangerschaften früher erkannt werden und so die Mütter/Eltern und die betreuenden Gynäkologen mehr Zeit haben, sich vorzubereiten.

Die rasche Annahme der cfDNA-basierten Tests deutet auf einen Paradigmenwechsel im Pränatalscreening hin. Viele Fachverbände wie das American College of Obstetricians und Gynecologists, die Fetal Medicine Foundation, die FMF-Deutschland (11) und die International Society of Prenatal Diagnosis befürworten, dass cfDNA-basierte Tests für das nichtinvasive Screening auf fetale Aneuploidien bei Frauen mit hohem Risiko eingesetzt werden sollten. Unserer Meinung nach wird der NIPT das etablierte Ersttrimesterscreening nicht verdrängen, sondern ergänzen. Da im *Panorama-Test* die SNPs untersucht werden, können in naher Zukunft auch subchromosomale Veränderungen wie Mikrodeletionen effizient erkannt werden, sodass der klinische Anwendungsbereich erweitert und der klinische Wert des Tests weiter vergrößert wird.

Literatur

1. Merz E, Thode C, Alkier A et al.: Individualized correction for maternal weight in calculating the risk of chromosomal abnormalities with first trimester screening data. Ultraschall Med 32 (2011) 33–39.
2. Lüthgens K, Merz E, Hackelöer BJ et al.: Comparison of three first trimester screening algorithms for trisomy 21 with and without adjustment for maternal characteristics. Ultraschall Med (2012) 172-4614
3. Palomaki GE et al.: DNA sequencing of maternal plasma reliably identified trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. Genet Med 3 (2012) 296–305.
4. Bianchi DW et al.: Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. Obstet Gynecol 5 (2012) 890–901.
5. Ashoor G et al.: Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DBA analysis method. Untrasound Obstet Gynecol 41 (2013) 21–25.
6. Palomaki GE et al.: DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome, an international clinical validation study. Genet Med 13 (2011) 913–920.
7. Norton M, et al.: Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. Am J Obstet Gyneco 207 (2012) 137. e1-137.e8.
8. Interne Daten Natera (www.panorama-test.com).
9. Nicolaides KH, Syngelaki A, Gil M, et al.: Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. Prenatal Diagnosis 33 (2013) 1–5.
10. Levy B, Hill M, Zimmermann B et al.: Massively multiplexed targeted amplification and sequencing of SNPs as a method for identifying fetal chromosome disorders from cell-free DNA in maternal plasma. Annual Clinical Medical Genetics Meeting, March 19-23 2013, in Phoenix, AZ.
11. Eiben B, Thode C, Merz E: Nichtinvasive Pränataldiagnostik – Serumtestsyteme zur Erfassung von Chromosomenanomalien. Gynäkologie + Geburtshilfe 18 (2013) 2–4.
12. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G et al.: Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X and Y using targeted sequencing of polymorphic loci. Prenat Diagn 32 (2012) 1–9.
13. Levy B, Hill M, Zimmermann B et al.: Massively multiplexed targeted amplification and sequencing of SNPs as a method for identifying fetal chromosome disorders from cell-free DNA in maternal plasma. Annual Clinical Medical Genetics Meeting, March 19–23 2013, in Phoenix, AZ.

Für die Autoren

Prof. Dr.
Bernd Eiben
amedes Institut für Labormedizin und Klinische Genetik Rhein/Ruhr
Willy-Brandt-Platz 4
45127 Essen
eiben.bernd@amedes-group.com