

Genetische Diagnostik in der Frühschwangerschaft

Arne M. Willruth

Abteilung für Geburtshilfe und Pränatale Medizin,
Universitätsklinikum Bonn

Reviewer: Peter Kozlowski, Düsseldorf,
und Boris Tutschek, Frankfurt

Zusammenfassung

Die Einführung der nichtinvasiven, auf dem Nachweis zellfreier fetaler DNA (cffDNA) im maternalen Serum basierenden pränatalen Testverfahren leitet eine neue Ära in der Pränataldiagnostik ein. In der Literatur wird dieses Verfahren synonym auch als Test («non-invasive prenatal test», NIPT) oder als Diagnose («non-invasive prenatal diagnosis», NIPD) bezeichnet. Es ist zu erwarten, dass der derzeit angewendete nichtinvasive – sonografische und/oder biochemische – Screeningalgorithmus bezüglich fetaler Aneuploidien, ggf. gefolgt von einer invasiven Diagnostik, sich grundlegend ändern wird. Kernpunkte des derzeitigen Ersttrimester-Screenings werden zukünftig in Frage gestellt: Ist beispielsweise weiterhin eine maternale Serum-biochemie erforderlich, und welchen Stellenwert hat die Nackentransparenzmessung? Die cffDNA-Verfahren sind bereits heute allgemein verfügbar, aufgrund des noch relativ hohen Preises kommen sie jedoch derzeit nicht für alle prinzipiell interessierten Schwangeren infrage. Ab der siebten Schwangerschaftswoche (SSW) ist es theoretisch möglich, die cffDNA im maternalen Serum nachzuweisen, wobei sämtliche Tests derzeit frühestens ab der 9+0 Schwangerschaftswoche angeboten werden. Die cffDNA-Methoden weisen eine hohe Sensitivität und Spezifität bezüglich einer fetalen Aneuploidie, insbesondere für Trisomie 21 und Trisomie 18, auf, sind aber bisher überwiegend im Hochrisiko-Kollektiv untersucht. Mittlerweile gibt es auch erste Studien an Low-risk-Kollektiven, die die cffDNA-basierten NIPT genauso effektiv mit ähnlicher Detektions- bzw. Falsch-positiv-Rate in der Allgemeinbevölkerung einsetzen konnten.

Durch zunehmenden Einsatz der cffDNA-Verfahren wird zukünftig die Zahl der invasiven Eingriffe (Chorionzottenbiopsie, Amniozentese) und die Zahl der punktionsbedingten Fehlgeburten nochmals reduziert werden.

Aktuell gibt es in Deutschland drei kommerziell angebotene Testverfahren. Sie beruhen auf dem Prinzip der unselektierten (PraenaTest®, LifeCodexx AG, Konstanz, Deutschland) oder zielgerichteten Hochdurchsatz-Sequenzierung (Harmony™ Prenatal Test, Ariosa, San Jose, CA, USA) der gesamten maternalen und fetalen cfDNA; der Panorama™ Prenatal Test (Natera, San Carlos, CA, USA) nutzt hingegen das »Single nucleotid polymorphism« (SNP)-Verfahren, bei dem Unterschiede in den Genregionen zwischen maternalen und fetaler DNA aufgedeckt werden.

Die derzeitige Herausforderung besteht darin, die Technologie in die Praxis sinnvoll zu implementieren, sodass sie in einer medizinisch, aber besonders auch ethisch korrekten Weise allen Patientinnen, als Entscheidungsgrundlage für werdende Eltern, zugänglich gemacht wird, wobei jedoch die zusätzlich entstehenden Kosten nicht außer Acht gelassen werden sollten.

Genetische Diagnostik in der Frühschwangerschaft

Aktuell gilt das Ersttrimester-Screening, bestehend aus fetaler Sonografie mit Messung der Nackentransparenz (NT-Messung) und maternaler Serumbiochemie (Bestimmung der Konzentrationen von PAPP-A und freiem β -HCG) zwischen 11 + 0 und 13 + 6 SSW bzw. einer Scheitelsteißlänge von 45 bis 84 mm entsprechend, als Goldstandard zur nichtinvasiven Risikoevaluation im Hinblick auf fetale numerische Chromosomenaberrationen (Benn et al. 2013). Durch das mittlerweile flächendeckend in Deutschland angebotene Screening lassen sich im ersten Trimenon unter optimalen Bedingungen in spezialisierten Schwerpunktpraxen und -zentren bereits über 90 % der Trisomien (T13, T18, T21) bei einer Falsch-positiv-Rate von 5 % detektieren (Avgidou et al. 2005; Merz et al. 2008; Spencer et al. 2003). Durch zusätzliche Beurteilung des Nasenbeins, Pulsatilität des Flussgeschwindigkeitsprofils des Ductus venosus oder Vorliegen einer Trikuspidalklappenregurgitation (erweitertes Ersttrimester-Screening) ist es theoretisch möglich, die Detektionsrate der Trisomien auf 96 % zu steigern oder die Falsch-positiv-Rate zu halbieren (Kagan et al. 2009a, b; Maiz et al. 2009). Bei Schwangeren mit einem deutlich auffälligen Ersttrimester-Screening (Cut-off der FMF London $\geq 1 : 50$; FMF: The Fetal Medicine Foundation) erfolgt zur definitiven Abklärung des erhöhten Aneuploidierisikos unmittelbar das Angebot einer invasiven Diagnostik mittels Chorionzottenbiopsie (CVS) oder Amniozentese (AC), deren Sensitivität über 99 % liegt, die jedoch mit einem ca. 0,5–1 % punktionsbedingten Abortrisiko behaftet sind (Mujezinovic u. Alfirevic 2007). Nach landesweiter Implementierung des Ersttrimester-Screenings in die Schwangerenvorsorge konnte in England in den letzten Jahren die Rate an invasiver Diagnostik sukzessive von 6 % auf 3,1 % reduziert werden (Morgan et al. 2013). Einer der Hauptnachteile des Ersttrimester-Screenings ist jedoch, dass sämtliche sonografische Messungen sehr stark von Genauigkeit und Erfahrung des Untersuchers abhängig sind.

Durch den 1997 erstmalig erbrachten Nachweis fetaler zellfreier DNA (cell free fetal DNA, cffDNA) im Plasma schwangerer Patientinnen wurde eine neue Ära des nichtinvasiven Screenings eingeleitet (Lo et al. 1997). Mit zunehmendem Gestationsalter findet sich im mütterlichen Serum neben zellfreier maternaler DNA (cell free maternal DNA, cfmDNA) eine ansteigende Fraktion von cffDNA, die bereits in kleine Bruchstücke (< 450 Basenpaare) degradiert ist (Bianchi 2004).

Kürzlich ist es zwei Arbeitsgruppen gelungen, aus der cffDNA das gesamte fetale Genom zu sequenzieren (Fan et al. 2012; Kitzman et al. 2012). Ab der siebten SSW ist die fetale DNA sicher im Serum detektierbar und macht ca. 5–15 % der gesamten cfDNA im ersten Trimenon aus (Lun et al. 2008). Für sämtliche Testverfahren muss die cffDNA mindestens 4–5 % der gesamten cfDNA ausmachen (Ashoor et al. 2013b; Kitzman et al. 2012). Mit fortschreitendem Gestationsalter nimmt der Anteil der cffDNA im maternalen Serum signifikant zu (0,1 % pro Woche zwischen 10.–21. SSW bzw. 1 % pro Woche $> 21.$ SSW; Wang et al. 2013), darüber hinaus korreliert das maternale Gewicht negativ mit dem fetalen Anteil an der cfDNA im maternalen Serum (Ashoor et al. 2013b). In drei prospektiven Studien wurde aufgrund der zu geringen cffDNA in 0,7 % (unizentrische chinesische Studie an einem Pränatalzentrum, unselektiertes Kollektiv, $n = 567$; Lau et al. 2012), 0,9 % (chinesische Multizenterstudie an einem gemischten Risikokollektiv, $n = 11\,105$; Dan et al. 2012) und 1,9 % (US-amerikanische Studie an einem nicht klassifizierten Kollektiv, $n = 22\,384$; Wang et al. 2013) eine erneute Blutabnahme erforderlich. Bei der cffDNA handelt es sich streng genommen um DNA aus abgestorbenen Trophoblastzellen placentaren Ursprungs (Bianchi 2004), sodass, ähnlich der CVS, Diskrepanzen zwischen Embryo- und Trophoblast nicht detektierbar sind.

Um dieser Problematik gerecht zu werden, wird daher seit mehreren Jahren versucht, aus frei im maternalen Blut zirkulierenden fetalen Zellen eine nichtinvasive Diagnostik zu etablieren; leider ist dieser Ansatz bisher nicht über das Stadium klinischer Machbarkeitsstudien (»proof of concept studies«) hinausgekommen (Hatt et al. 2013). Dies hängt hauptsächlich mit der sehr niedrigen Zellzahl im mütterlichen Blut (1–2 Zellen/ml; Kolvraa et al. 2005), aber auch mit der begrenzten Kenntnis und dem Stellenwert der detektierten unterschiedlichen fetalen Zellen zusammen (Hatt et al. 2013).

Seit zwei Jahren besteht jetzt die nichtinvasive Möglichkeit, aus der cffDNA numerische Chromosomenstörungen (Trisomie 21, 18, 13) und teilweise auch gonosomale Chromosomenstörungen des Feten nachzuweisen. In der aktuellen Literatur wird diese Methode auch als »non-invasive prenatal testing« (NIPT) oder auch als »non-invasive prenatal diagnosis« (NIPD) bezeichnet; sie fällt in Deutschland unter das Gendiagnostikgesetz (GenDG) und unterliegt somit besonderen Anforderungen der Beratung, Aufklärung, Durchführung, Probenasservierung und Befundmitteilung. Die NIPT-Verfahren werden im Vergleich zum Goldstandard der pränataldiagnostischen Diagnoseverfahren (CVS, AC) am treffendsten als »diagnostische Tests« bezeichnet (Scharf u. Stumm 2013).

Aktuell existierende NIPD-Screeningmethoden

Shotgun massive parallel sequencing (sMPS)

Das zugrunde liegende Prinzip des sMPS basiert auf dem Hochdurchsatz-Sequenzieren (Sequenzierung: Ablesen der Nukleotidfolge), bei dem simultan unselektiert im »Schrot-schussverfahren« Millionen DNA-Fragmente der gesamten maternalen und fetalen zellfreien DNA aus dem mütterlichen Serum analysiert werden. Mit diesem Verfahren ist es möglich, jedes DNA-Bruchstück seinem Ursprungs-chromosom, nach Vergleich mit einem Referenzchromosomensatz, zuzuordnen. Bei Vorliegen einer fetalen Aneuploidie sollte bei Trisomien ein relativer Überschuss oder im Falle einer Monosomie ein relatives Defizit der cffDNA des entsprechenden Chromosoms vorliegen; der absolute Unterschied, z. B. bei Vorliegen einer fetalen Trisomie 21 (cffDNA-Fraktion: 20 % im maternalen Serum), im Vergleich zu einem euploiden Feten ist jedoch klein ($0,8 \times 2 + 0,2 \times 3 = 2,2$ versus $0,8 \times 2 + 0,2 \times 2 = 2$) und beträgt beispielsweise 10 % (Benn et al. 2013; Simpson 2013). Darüber hinaus können einzelne Gene, größere Genomabschnitte oder das gesamte fetale Genom (15–20 Genomäquivalente pro ml maternalem Plasma) (Lo et al. 1999; Lo 2013) ausgelesen und neben Aneuploidien auch Punktmutationen, Insertionen, Deletionen oder Duplikationen nachgewiesen werden (Bartholdi u. Miny 2013).

Obwohl es möglich ist, das endgültige Testergebnis in ein patientinnenspezifisches Risiko umzurechnen, geben die meisten kommerziellen Anbieter die Ergebnisse basierend auf Z-Scores, die einen vorgegebenen Grenzwert überschreiten, lediglich als positiv oder negativ an. Zwei der Anbieter in Deutschland (Ariosa, Natera) geben hingegen individuelle Risiko-Scores an.

Targeted next generation sequencing (syn. »targeted MPS«; Panel-Analyse)

Hierbei beschränkt sich das DNA-Hochdurchsatzverfahren zielgerichtet auf DNA-Regionen einzelner Chromosomen (z. B. Chromosom 21, 13, 18, X, Y), um zu beurteilen, ob eine Abweichung auf Basis der relativen Anzahl der DNA-Fragmente des entsprechenden Chromosoms im Vergleich zum euploiden Referenzchromosomensatz vorliegt.

Es kann sich bei diesem Ansatz aber auch um eine zielgerichtete simultane Untersuchung mehrerer bekannter, für eine spezifische Erkrankung verantwortlichen Gene handeln (Panel-Analyse). Dieses Verfahren eignet sich besonders dann, wenn Mutationen in unterschiedlichen Genen (genetische Heterogenität) der Erkrankung zugrunde liegen (z. B. Epilepsie, Kardiomyopathie oder Muskeldystrophie) (Lemke et al. 2012). Aber auch bei Erkrankungen mit Mutationen in besonders großen Genen (z. B. Bindegewebserkrankungen, Muskeldystrophien, mitochondriale Erkrankungen) ist die Panel-Analyse ein sehr geeignetes Verfahren, da diese deutlich schneller und preiswerter als die herkömmliche Gensequenzierung ist (Bartholdi u. Miny 2013).

Single-nucleotid-polymorphism(SNP)-Verfahren

Ein Nukleotid, bestehend aus einem Phosphat-, Zucker- und Basenbestandteil, ist der Grundbaustein von Nukleinsäure bzw. Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA).

! Als Polymorphismus bezeichnet man das Vorkommen einer oder mehrerer Genvarianten (bzw. eines oder mehrerer Allele), wobei das Vorkommen der Genvariante (Allelfrequenz) $> 1\%$ in der Bevölkerung betragen muss, andernfalls spricht man von einer Mutation. !

Bei diesem Verfahren werden häufig vorkommende SNPs genutzt, um das Gemisch der cffDNA und cfDNA im mütterlichen Serum mit der maternalen DNA, z. B. aus den Leukozyten derselben Blutprobe, zu vergleichen, um so den Unterschied der fetalen Fraktion in den entsprechenden Genen bzw. Allelen zu detektieren.

Die SNP-Methode kann Informationen über den elterlichen Ursprung einer Aneuploidie, Rekombination (Verteilung und Neuordnung der DNA) und Vererbung einer Mutation liefern (Benn et al. 2013). SNPs machen jedoch nur ca. 1,6 % des menschlichen Genoms aus, sodass eine massive Anreicherung, tiefere Sequenzierung oder eine höhergradige Amplifizierung (gezielte Vermehrung der DNA-Abschnitte) der fetalen DNA zur einwandfreien Identifizierung der betroffenen Schwangerschaften mit eben nur geringen Unterschieden erforderlich wird (Liao et al. 2012). Werden bei der Analyse nur wenige SNP-Loci verwendet, muss beim Ausschluss von Bereichen mit seltenen benignen Strukturvarianten (»copy number variations«, CNVs) besondere Aufmerksamkeit walten. Auch kann das SNP-Verfahren unbeabsichtigt eine Vaterschaftsdiskrepanz oder eine Konsanguinität nachweisen (Benn et al. 2013).

DNA-Methylierung

Diese Methode macht sich epigenetische Unterschiede des gesamten Genoms zunutze, was sich in unterschiedlichen Genexpressionen – abhängig vom verwendeten Gewebe – zeigt (Poon et al. 2002). Die Unterschiede plazerarer Trophoblastzellen und maternalen Zellen betreffen auch Hyper- oder Hypomethylierung einzelner Gene. Methylierte DNA kann chemisch modifiziert werden, sodass die Abgrenzung zur nichtmethylierten DNA gelingt (Tong et al. 2006). Hypermethylierte DNA kann alternativ durch Restriktionsenzyme, die DNA mit fehlendem Methylierungsmuster erkennen und schneiden können, separat analysiert werden. Zusätzlich kann diese Methodik bei gestörter Allelen-Ratio auch fetale Trisomien detektieren (Tong et al. 2006, 2010).

Durch die Identifizierung spezifischer hypermethylierter DNA-Sequenzen auf dem Chromosom 21 gelingt es, selektiv die cffDNA im maternalen Plasma anzureichern (Papa-georgiou et al. 2009); mittels quantitativer Realtime-PCR (»polymerase chain reaction«, qPCR) kann dann bei Vorlie-

gen einer fetalen Trisomie 21 ein messbarer Unterschied der DNA-Fragmente von Chromosom 21 im Vergleich zu einem euploiden Fetus nachgewiesen werden (Papageorgiou et al. 2011).

Bisher ist dieses Verfahren nur in »proof of principle studies« angewendet worden. Sollte es gelingen, diese Verfahren bis zur Marktreife weiterzuentwickeln, wäre es deutlich billiger als sämtliche Sequenzierungsverfahren (Benn et al. 2013).

RNA-basierte Methoden

Die Identifizierung von Genen, die fetal bzw. plazentar und nicht von mütterlichen Zellen exprimiert werden, führt zum Nachweis entsprechender zellfreier fetaler RNA (cffRNA) im maternalen Plasma. Weist die cffRNA Polymorphismen auf, die die fetalen Allele kennzeichnen, kann eine Aneuploidie durch ein Abweichen von der normalen 1:1-Allel-Ratio eines euploiden Chromosomensatzes abgeleitet werden (Lo et al. 2007). Allerdings wurde diese Methodik bisher nur in vorklinischen Studien angewendet (Benn et al. 2013).

Digitale PCR (dPCR)

Bei der dPCR handelt es sich um eine Weiterentwicklung der quantitativen PCR, wobei der Vorteil dieses Verfahren in der hohen Robustheit und Reproduzierbarkeit liegt. Das Verfahren basiert auf der Dilution der zu analysierenden Probe, sodass die DNA-Fragmente, die von besonderem Interesse sind (z. B. Fragmente des Chromosoms 21), isoliert amplifiziert und ausgelesen werden können. Theoretische Modelle der Anzahl der erforderlichen Amplifikationen zur Detektion einer Aneuploidie wurden entwickelt, jedoch muss der Einsatz der Methode noch auf die zukünftige Entwicklung zuverlässiger Anreicherungsverfahren der cffDNA warten (Evans et al. 2012; Fan u. Quake 2007).

Exom-Sequenzierung

Als Exom wird in der Genetik die Gesamtheit aller Exons eines Organismus, d. h. alle Abschnitte, die potenziell Proteine codieren, bezeichnet. In der medizinischen Diagnostik ist es sinnvoll, nur das Exom (und nicht das gesamte Genom) zu sequenzieren, da es nur ca. 5 % des menschlichen Genoms ausmacht und dort alle Gene auf krankheitsrelevante Mutationen untersucht werden können (Ng et al. 2009). Dieses Verfahren kann zukünftig zur Identifizierung der genetischen Grundlage, des Erkrankungsmechanismus, biologischer Signalwege und eines möglichen Therapiekonzeptes bei seltenen monogenetischen Erkrankungen herangezogen werden (Ng et al. 2010). Aber auch bei relativ häufigen postnatalen Entwicklungsstörungen mit ähnlichem Phänotyp (z. B. nichtsyndromale geistige Retardierung, Störungen aus dem Formenkreis des Autismus), bei denen eine große genetische Heterogenität mit hunderten krankheitsverursachenden Genen diskutiert wird, kann die Exom-Sequenzierung zukünftig diagnostisch eingesetzt werden (Bartholdi u. Miny 2013).

Aktuelle kommerzielle Testverfahren

Derzeit gibt es weltweit vier amerikanische und zwei chinesische kommerzielle Anbieter, die pränatal cffDNA-Screeningtests aus dem maternalen Blut anbieten (Petheirik 2013). In Deutschland ist seit August 2012 der Praena-Test® (LifeCodexx AG, Konstanz, Deutschland) als erstes kommerziell verfügbares nichtinvasives Testverfahren auf dem Markt, der das MPS (»massive parallel sequencing«) nutzt; seit 2013 sind zwei weitere kommerzielle Tests hinzugekommen: seit Mai 2013 der SNP-basierte Panorama™ Prenatal Test (Natera, San Carlos, CA, USA) und seit September 2013 der targeted-MPS-basierte Harmony™ Prenatal Test (Ariosa, San Jose, CA, USA). Eine Übersicht zu den aktuell erhältlichen cffDNA-Tests liefern die Tabellen 1a und b.

Tabelle 1a: Kommerzielle nichtinvasive pränatale Tests

Name	Hersteller	Erhältlich in	Nachweisbare Chromosomenstörungen	Testverfahren	Auswertungszeitraum	Frühestes Schwangerschaftsalter (SSW)	Nachteile/Vorteile	Studien
PraenaTest express	LifeCodexx (Anbieter in Deutschland)	D	T13, T18, T21	MPS	14 Tage 7 Tage	9+0	nicht für Gemini	n/a
Harmony	Ariosa (Enders)	D (USA)	T13, T18, T21, X, Y	MPS	14 Tage	10+0	auch für Gemini und nach IVF (inkl. Eizellspende)	Norton et al. 2012 (high-risk)
Panorama	Natera (Amedes)	D (USA)	T13, T18, T21, Turner, Triploidie	SNP	14 Tage	9+0	nicht für Gemini; ca. 5 % initiale Versagerquote	Nicolaides et al. 2013b (high-risk)
Verifi	Verinata	USA	T13, T18, T21, gonosomale Aneuploidien (Turner, XXX, XXY, XYY) X-linked Erkrankungen (Hämophilie, Muskeldystrophie Duchenne, Intersex)	MPS	14 Tage	10+0	auch für Gemini und nach IVF (inkl. Eizellspende)	Bianchi et al. 2012 (high-risk)
MaterniT21	Sequenom	USA	T13, T18, T21, X, Y ausgewählte Mikrodeletionen*	MPS	8–10 Tage	10+0	auch für Gemini und nach IVF (inkl. Eizellspende)	Palomaki et al. 2011, 2012 (high-risk)
NIFTY	BGI Health	China	T13, T18, T21, X, Y ausgewählte Mikrodeletionen**	MPS	14 Tage (Mikrodeletion: 4 Wochen)	10+0	auch nach IVF (inkl. Eizellspende); ca. 2 % initiale Versagerquote	Dan et al. 2012 (non-high risk)
PreDna	Genesupport	CH	T13, T18, T21, Turner, Trisomie X, Trisomie 22, Trisomie 16, Trisomie 7	MPS	14 Tage	10+0	n/a	Guex et al. 2013 (high-risk)

* MaterniT21: Mikrodeletion 22q11.2 (DiGeorge), 5p minus (Cri-du-Chat-Syndrom), Prader-Willi-Syndrom, Mikrodeletionssyndrom 1p36, Trisomie 16, Trisomie 22

** NIFTY: Mikrodeletion 22q11.2 (DiGeorge), 5p minus (Cri-du-Chat-Syndrom), Mikrodeletion 2q33.1

CH: Schweiz; D: Deutschland; IVF: In-vitro-Fertilisation; MPS: »massive parallel sequencing«; n/a: nicht verfügbar

Tabelle 1b: Statistische Aussagekraft der Testverfahren

		PraenaTest (n/a)	Harmony (Norton et al. 2012; Ashoor et al. 2012, 2013a)	Panorama (Nicolaidis et al. 2013b)	Verifi (Bianchi et al. 2012)	MaterniT21 (Palomaki et al. 2011, 2012)	NIFTY (Dan et al. 2012)	PrenDia (Guex et al. 2013)
Trisomie 21	Sensitivität	98,7 %	> 99 %	> 99 %	> 99,9 %	99,1 %	99,7 %	100 %
	Falsch-positiv- Rate	0 %	0,03 %	0 %	0,2 %	(0,2 %)	0,01 %	0,01 %
	Testversager- quote	n/a	4,6 %	5,4 %	4,3 %	0,8 %	0,9 %	0,7 %
Trisomie 18	Sensitivität	100 %	97,4 %	> 99 %	97,3 %	99,9 %	99,9 %	98,8 %
	Falsch-positiv- Rate	0,2 %	0,07 %	0,1 %	0,4 %	0,3 %	0,02 %	n/a
Trisomie 13	Sensitivität	100 %	80 %	> 99 %	87,5 %	91,7 %	99,9 %	100 %
	Falsch-positiv- Rate		0,05 %	0 %	0,1 %	0,9 %	0,02 %	n/a
Monosomie X	Sensitivität	n/a	96,7 %	91,7 %	95 %	94,7 %	ja	100 %
	Falsch-positiv- Rate		n/a	0,1 %	1,0 %	0,5 %		n/a
gonosomale Trisomien	Sensitivität	n/a	67–100 %	> 99 %	67–100 %	> 99,9 %	ja	
Geschlechts- bestimmung								
weiblich	Sensitivität	n/a	> 99 %	> 99 %	97,6 %	97,9 %	ja	n/a
	Falsch-positiv- Rate		n/a	0 %	0,8 %	0,5 %		
männlich	Sensitivität	n/a	> 99 %	> 99 %	99,1 %	99,4 %	ja	n/a
	Falsch-positiv- Rate		n/a	0 %	1,1 %	2,1 %		
Triploidie	Sensitivität	n/a	n/a	> 99 %	n/a	n/a	n/a	n/a
	Falsch-positiv- Rate			n/a				

Nachteile und Grenzen der NIPT aus zellfreier DNA im maternalen Blut

Für die derzeit verfügbaren nichtinvasiven NIPT muss die cffDNA-Konzentration im maternalen Serum mindestens 4 % betragen. Dabei hat den größten Einfluss das mütterliche Gewicht; bei einem maternalen Gewicht von 100 kg ist aufgrund einer beispielsweise zu geringen cffDNA-Konzentration in ca. 7 % der Untersuchungen keine Auswertung möglich, gegenüber nur 0,3 % der Untersuchungen bei einem Gewicht von 50 kg (Ashoor et al. 2013b). Eine kleine aktuelle Studie (n = 30) konnte aufgrund einer erhöhten Nekrose und Apoptose der Adipozyten bei 16 übergewichtigen Patientinnen (BMI > 30 kg/m²) in der

Anmerkung: Sämtliche Angaben beruhen einerseits auf den zitierten Studien und andererseits auch auf direkten Herstellerangaben aus den Internetpräsentationen, die nicht durchgehend durch Publikationen zu belegen sind.

38.–40. SSW eine erhöhte cfmDNA-Freisetzung nachweisen, was eine erniedrigte Konzentration von cffDNA im maternalen Blut zur Folge hat (Haghiac et al. 2012). In diesen Fällen wird von den Anbietern eine für die Patientinnen kostenlose zweite Probenanalyse angeboten.

Die aktuell hohen Sensitivitäten und Spezifitäten der unterschiedlichen cffDNA-Tests, die auf vorklinischen Fall-Kontroll-Studien basieren, könnten zukünftig etwas abnehmen, da z. B. Mosaik (maternale, fetale oder plazentare Mosaik unterschiedlicher Ausprägung), Gemini mit »vanishing aneuploid twin« und technische Limitationen der aufwendigen Verfahren zu berücksichtigen sind.

Zum Einsatz der cffDNA-basierten NIPD bei Zwillingen gibt es derzeit keine validierten prospektiven Studien; in einer kleineren Studie an 68 Zwillingsschwangerschaften konnten jedoch drei Fälle einer fetalen Trisomie, einen falsch positiven Fall, korrekt detektiert werden (Gil et al. 2013).

Obwohl sämtliche cffDNA-Tests sich durch eine hohe Präzision auszeichnen, die Detektionsrate allerdings nicht 100 % und die Falsch-positiv-Raten nicht 0 % erreichen, handelt es sich bei dieser Form der NIPT statistisch gesehen um einen diagnostischen Test, der als Screeningverfahren eingesetzt wird und bei einem positiven Ergebnis der Bestätigung durch eine invasive Diagnostik (CVS, AC) bedarf (Petherik 2013).

Ausblick

Durch den zunehmenden Einsatz dieser neuen nichtinvasiven Screeningmethoden ist es zukünftig möglich, die genetische Grundlage einzelner Erkrankungen bereits im ersten oder frühen zweiten Trimenon nachzuweisen; darüber hinaus werden neben dem Verständnis der Pathomechanismen dadurch Wege für potenziell neue Therapie-konzepte ermöglicht.

Trotz der momentan anhaltenden Euphorie und der mit Macht auf den kommerziellen Markt drängenden »Next generation sequencing«-Methoden ist es wichtig, festzuhalten, dass es sich um Screeningmethoden handelt, die das menschliche Erbgut bisher relativ ungezielt und ungenau beleuchten. Auch Zufallsbefunde und Varianten unklarer Signifikanz (»variants of unknown significance«, VUS) machen ihren Einsatz im Einzelfall zu einer Herausforderung. Die schwangere Patientin sollte daher bereits im Vorfeld detailliert über die Methodik und deren Grenzen aufgeklärt werden.

Dennoch wird der Einsatz der cffDNA in Zukunft die pränatale Diagnostik und die gesamte pränatale Medizin verändern. Es ist zu erwarten, dass mit zunehmendem Preisverfall der cffDNA-basierten Sequenziermethoden das etablierte Ersttrimester-Screening (NT-Messung in Kombination mit maternaler Serumbiochemie: PAPP-A und β -HCG) zwar weiterhin zur Identifizierung von Hochrisikoschwangerschaften für Trisomie 13, 18 oder 21 oder gonosomaler Aneuploidien genutzt werden kann, aber zunehmend eine andere Zielrichtung haben wird. Die Bedeutung der sonografischen Ersttrimesterdiagnostik wird dann nicht mehr in der Risikokalkulation bezüglich

der oben angegebenen Aneuploidien, sondern im Ausschluss bzw. Nachweis fetaler Fehlbildungen bestehen. Ferner wird der Einsatz der cffDNA-Verfahren die Zahl der invasiven Eingriffe (Chorionzottenbiopsie, Amniozentese) und die daraus resultierenden Fehlgeburten auf ein Minimum reduzieren. Möglicherweise wird zukünftig erst nach Vorliegen des Ergebnisses der NIPT das Ersttrimester-Screening (11 + 0 bis 13 + 6 SSW) durchgeführt, wobei dann bereits die Fragen zum Chromosomensatz, aber auch zu einer Reihe von genetischen Syndromen und Erkrankungen (Mikrodeletionen, monogene Erkrankungen, CNV, SNP) beantwortet sind.

Nach Ansicht der internationalen Fachgesellschaften erfolgte die Einführung sämtlicher Tests jedoch verfrüht. Überwiegend basieren die hohen Sensitivitäten und Spezifitäten der Tests auf retrospektiven Analysen asservierter Blutproben mit bereits bekannten Chromosomensätzen aus High-risk-Kollektiven. Die Datenlage im Low-risk-Kollektiv ist bisher nicht ausreichend, sodass der klinische Nutzen für die Normalbevölkerung derzeit nicht abschließend bewertet werden kann. Daher gibt es keine allgemeingültige Empfehlung, die cffDNA-Verfahren in der Routine im Low-risk-Kollektiv einzusetzen (Morain et al. 2013). Grundsätzlich hängt die Detektion einer fetalen Aneuploidie mittels cffDNA-Verfahren jedoch eher von der Präzision des verwendeten Assays und der fetalen DNA-Konzentration in der maternalen Serumprobe als von der Prävalenz der Erkrankung in der Studienpopulation ab. Daher ist es wahrscheinlich, dass die cffDNA-basierte NIPT auch im Low-risk-Kollektiv angewendet werden kann.

Aktuell ist weiterhin bei positivem NIPT ein invasiver Bestätigungstest (AC, CVS) zwingend erforderlich, bevor, nach eingehender, gesetzlich vorgeschriebener Beratung, weitere Konsequenzen daraus gezogen werden können.

Bezüglich der Integration der cffDNA-basierten NIPT in das derzeitige Ersttrimester-Screening liegen bereits Berechnungen vor (Nicolaidis et al. 2013a). Die Anwendung des cffDNA-basierten NIPT als generelles »First-line«-Screening, gefolgt von einem kombinierten Ersttrimester-Screening (»combined test«: mütterliches Alter, maternale Serumbiochemie, NT-Messung, Ductus venosus) in Fällen mit nicht auswertbarem Testergebnis, würde zu einer 99%-Detektionsrate für Trisomie 21 (falsch positive Rate 0,18 %) führen; die CVS-Rate zur Bestätigung bei positivem Testergebnis oder einem auffälligen Ersttrimester-Screening (Cut-off $\geq 1:100$) läge bei 0,47 % (Nicolaidis et al. 2013a). Würde das cffDNA-Verfahren hingegen nachgeschaltet nach einem Ersttrimester-Screening (mütterliches Alter, Nackentransparenzmessung, β -HCG, PAPP-A) mit einem definierten Cut-off ($\geq 1:3000$) als »Second-line«-Screening durchgeführt und die CVS entweder zur Bestätigung bei positivem NIPT oder in Fällen mit nicht auswertbarem Test und positivem Ersttrimester-Screening (Cut-off $\geq 1:100$) durchgeführt werden, würde

eine 96,9%ige Detektionsrate für Trisomie 21 (falsch positive Rate 0,11 %) bei einer 0,39 %igen CVS-Rate erzielt werden (Nicolaidis et al. 2013a).

Die erhöhte fetale Nackentransparenz (»nuchal translucency«, NT) im Ersttrimester-Screening dient aber nicht nur als Marker für Trisomie 21, sondern auch für weitere klinisch relevante numerische und nichtnumerische Chromosomenanomalien, Herzfehler, Skelettdysplasien und genetische Syndrome (Souka et al. 2005). Daher würde sich in Fällen mit erhöhter Nackentransparenz eher direkt eine invasive Diagnostik (CVS), ggf. gefolgt von einer Array-CGH (CGH: komparative genomische Hybridisierung), anschließen. Der zukünftige Schwerpunkt der Ultraschalluntersuchung zwischen 11. und 13. SSW wird nicht nur in der Bestimmung des Gestationsalters und NT-Messung liegen, sondern insbesondere in der frühzeitigen Detektion von (Begleit-)Fehlbildungen (Syngelaki et al. 2011) und Identifizierung anderer möglicher Schwangerschaftsrisiken (z. B. einer sich später entwickelnden Präeklampsie) liegen (Nicolaidis et al. 2013a).

Derzeit wird die frühzeitige Durchführung der cffDNA-basierten NIPT vor dem Ersttrimester-Screening (»First-line«-Screening) kritisch gesehen (Scharf u. Stumm 2013), da u. a. vermehrt Chromosomenstörungen, die spontan in einem Abort geendet hätten, oder falsch positive Testergebnisse, die auf »vanishing twins« oder Plazentamosaik basieren, detektiert würden. Darüber hinaus besteht potenziell die Gefahr eines Schwangerschaftsabbruchs nur aufgrund eines auffälligen Screeningbefunds, ohne dass ein invasiver Bestätigungstest erfolgt wäre (Scharf u. Stumm 2013). Auch würde der unselektierte »First-line«-Einsatz der cffDNA-Tests zu einer Kostenexplosion (aktuelle Preise der cffDNA-basierten NIPT in Deutschland: 485,- bis 825,- Euro) im Bereich der Pränataldiagnostik führen, wobei allerdings ein weiterer Preisverfall der cffDNA-Tests zu erwarten ist.

Unsere Hauptaufgabe als Frauenärzte und Pränataldiagnostiker ist es daher, die weiteren Entwicklungen der NIPT-Verfahren sehr aufmerksam zu verfolgen, um die Schwangeren adäquat gemäß der aktuellen Datenlage über die Vor- und Nachteile dieser Verfahren im Allgemeinen und zugeschnitten auf die individuelle Situation der Schwangeren im Besonderen zu beraten.

Summary

Genetic diagnosis in early pregnancy

The availability of cell-free fetal DNA (cffDNA) non-invasive prenatal analysis for aneuploidy presents a paradigm shift, since it changes the algorithm of first trimester screening followed by invasive testing. All aspects of current standard protocol are being questioned: Do we still need to measure maternal serum biochemical markers

and what is the status of nuchal translucency measurement? Currently, there is no doubt that tests based on cffDNA provide a readily accessible and safe option for prenatal testing from 9 + 0 weeks of gestation onward. The cffDNA analysis is a new promising method with high sensitivity and specificity for the prediction of fetal aneuploidy, particularly for trisomy 21 and 18, when used as an advanced screening method in high-risk pregnancies. This new technology has the potential to reduce the number of invasive procedures (CVS, AC) markedly, with their associated risk of fetal loss. Further studies have to prove the use of cffDNA as a primary screening test for trisomy 13 in high-risk pregnancies and especially its implementation into general screening protocols for fetal aneuploidy in low-risk women.

Currently, in Germany there are three companies offering non-invasive screening tests: PraenaTest® (LifeCodexx AG, Konstanz, Germany) using shotgun massive parallel sequencing (s-MPS), Harmony™ Prenatal Test (Ariosa, San Jose, CA, USA) using targeted MPS, and Panorama™ Prenatal Test (Natera, San Carlos, CA, USA) using single nucleotide polymorphism (SNP) technology which compares genetic loci on the mix of maternal and fetal DNA from maternal serum. The challenge now is to implement this new technique into clinical practice that is accessible to all women in early first trimester and in an medical and especially ethical way that preserves informed parental choice, while not exceed the total costs to the healthcare sector.

CME Prakt Fortbild Gynakol Geburtsmed Gynakol Endokrinol 2014; 10(1): 34–47

Keywords

Non-invasive prenatal diagnosis, NIPD, NIPT, cell-free fetal DNA, fetal aneuploidy

Literaturverzeichnis

- ASHOOR G, SYNGELAKI A, WAGNER M, BIRDIR C, NICOLAIDES K.** Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206(4): 322.e1–5.
- ASHOOR G, SYNGELAKI A, WANG E, STRUBLE C, OLIPHANT A, SONG K, NICOLAIDES K.** Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013a; 41(1): 21–25.
- ASHOOR G, SYNGELAKI A, POON L, REZENDE J, NICOLAIDES K.** Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013b; 41(1): 26–32.
- AVGIDOU K, PAPAGEORGHIOU A, BINDRA R, SPENCER K, NICOLAIDES KH.** Prospective first-trimester screening for trisomy 21 in 30.564 pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192(6): 1761–7.

- BARTHOLDI D, MINY P.** Genetische Untersuchungen während der Schwangerschaft und beim Kind. *Ther Umsch* 2013; 70(11): 621–31.
- BENN P, BORELL A, CHIU R, CUCKLE H, DUGOFF L, FAAS B, GROSS S, JOHNSON J, MAYMON R, NORTON M, ODIBO A, SCHIELEN P, SPENCER K, HUANG T, WRIGHT D, YARON Y.** Position statement from the aneuploidy screening committee on behalf of the board of the international society for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2013; 33(7): 622–9.
- BIANCHI D.** Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential – a review. *Placenta* 2004; 25 Suppl A: S93–101.
- BIANCHI D, PLATT L, GOLDBERG J, ABUHAMAD A, SEHNERT A, RAVA R.** Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012; 119(6): 890–901.
- DAN S, WANG W, REN J, LI Y, HU H, XU Z, LAU T, XIE J, ZHAO W, HUANG H, XIE J, SUN L, ZHANG X, WANG W, LIAO S, QIANG R, CAO J, ZHANG Q, ZHOU Y, ZHU H, ZHONG M, GUO Y, LIN L, GAO Z, YAO H, ZHANG H, ZHAO L, JIANG F, CHEN F, JIANG H, LI S, LI Y, WANG J, WANG J, DUAN T, SU Y, ZHANG X.** Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn* 2012; 32(13): 1225–32.
- EVANS M, WRIGHT D, PERGAMENT E, CUCKLE H, NICOLAIDES K.** Digital PCR for noninvasive detection of aneuploidy: power analysis equations for feasibility. *Fetal Diagn Ther* 2012; 31(4): 244–7.
- FAN H, QUAKE S.** Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal Chem* 2007; 79(19): 7576–9.
- FAN H, GU W, WANG J, BLUMENFELD Y, EL-SAYED Y, QUAKE S.** Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature* 2012; 487(7407): 320–4.
- GIL M, QUEZADA M, BREGANT B, SYNGELAKI A, NICOLAIDES K.** Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first-trimester twin pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 2013 Nov 15, [Epub ahead of print].
- GUEx A, ISELI C, SYNGELAKI A, PESCIA G, NICOLAIDES K, XENARIOS I, CONRAD B.** A robust second-generation genome-wide test for fetal aneuploidy based on shotgun sequencing cell-free DNA in maternal blood. *Prenat Diagn* 2013; 33(7): 707–10.
- HAGHIAC M, VORA N, BASU S, JOHNSON K, PRESLEY L, BIANCHI D, HAUGUEL-DE MOUZON S.** Increased death of adipose cells, a path to release cell free DNA into systemic circulation of obese women. *Obesity* 2012; 20(11): 2213–9.
- HATT L, BRINCH M, SINGH R, MØLLER K, LAURIDSEN R, ULDBJERG N, HUPPERTZ B, CHRISTENSEN B, KØLVRAA S.** Characterization of Fetal cells from the maternal circulation by microarray gene expression analysis – could the extravillous trophoblasts be a target for future cell-based non-invasive prenatal diagnosis? *Fetal Diagn Ther* 2013 Nov 9, [Epub ahead of print].
- KAGAN KO, VALENCIA C, LIVANOS P, WRIGHT D, NICOLAIDES K.** Tricuspid regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009a; 33(1): 18–22.
- KAGAN KO, CICERO S, STABOULIDOU I, WRIGHT D, NICOLAIDES K.** Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009b; 33(3): 259–64.
- KITZMAN J, SNYDER M, VENTURA M, LEWIS A, QIU R, SIMMONS L, GAMMILL H, RUBENS C, SANTILLAN D, MURRAY J, TABOR H, BAMSHAD M, EICHLER E, SHENDURE J.** Non-invasive whole-genome sequencing of a human fetus. *Sci Transl Med* 2012; 4(137): 137ra76.
- KLOPSTOCK T, PROTT E, LORENZ R, SPAICH C, RONA S, LAKSHMINARASIMHAN M, KRÖLL J, DORN T, KRÄMER G, SYNOFFZIK M, BECKER F, WEBER Y, LERCHE H, BÖHM D, BISKUP S.** Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia* 2012; 53(8): 1387–98.
- KOLVRAA S, CHRISTENSEN B, LYKKE-HANSEN L, PHILIP J.** The fetal erythroblast is not the optimal target for non-invasive prenatal diagnosis: preliminary results. *J Histochem Cytochem* 2005; 53(3): 331–6.
- LAU T, CHAN M, LO P, CHAN H, CHAN W, KOO T, NG H, POOH R.** Clinical utility of noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test – early experience. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(10): 1856–9.
- LEMKE J, RIESCH E, SCHEURENBRAND T, SCHUBACH M, WILHELM C, STEINER I, HANSEN J, COURAGE C, CALLATI S, BÜRKI S, STROZZI S, SIMONETTI B, GRUNT S, STEINLIN M, ALBER M, WOLFF M, LIAO G, CHAN K, JIANG P, SUN H, LEUNG T, CHIU R, LO Y.** Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *PLoS One* 2012; 7(5): e38154.
- LIAO GJ, CHAN KC, JIANG P, SUN H, LEUNG TY, CHIU RW, LO YM.** Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *PLoS One* 2012; 7(5): e38154.
- LO Y, CORBETTA N, CHAMBERLAIN P, RAI V, SARGENT I, REDMAN C, WAINSCOAT J.** Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350(9076): 485–7.
- LO Y, LAU T, ZHANG J, LEUNG T, CHANG A, HJELM N, ELMES R, BIANCHI D.** Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999; 45(10): 1747–51.
- LO Y, TSUI N, CHIU R, LAU T, LEUNG T, HEUNG M, GEROVASSILI A, JIN Y, NICOLAIDES K, CANTOR C, DING C.** Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007; 13(2): 218–23.
- LO Y.** Noninvasive fetal whole-genome sequencing from maternal plasma: feasibility studies and future directions. *Clin Chem* 2013; 59(4): 601–3.

- LUN F, TSUI N, CHAN K, LEUNG T, LAU T, CHAROENKWAN P, CHOW K, LO W, WANAPIRAK C, SANGUANSEMSRI T, CANTOR C, CHIU R, LO Y.** Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(50): 19920–5.
- MAIZ N, VALENCIA C, KAGAN KO, WRIGHT D, NICOLAIDES KH.** Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11–13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 33(5): 512–7.
- MERZ E, THODE C, ALKIER A, EIBEN B, HACKELÖER B, HANSMANN M, HUESGEN G, KOZLOWSKI P, PRUGGMAIER M, WELLEK S.** A new approach to calculating the risk of chromosomal abnormalities with first-trimester screening data. *Ultraschall Med* 2008; 29(6): 639–45.
- MORAIN S, GREENE M, MELLO M.** A new era in noninvasive prenatal testing. *N Engl J Med* 2013; 369(6): 499–501.
- MORGAN S, DELBARRE A, WARD P.** Impact of introducing a national policy for prenatal Down syndrome screening on the diagnostic invasive procedure rate in England. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41(5): 526–9.
- MUJEZINOVIC F, ALFIREVIC Z.** Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007; 110(3): 687–94.
- NG S, TURNER E, ROBERTSON P, FLYGARE S, BIGHAM A, LEE C, SHAFFER T, WONG M, BHATTACHARJEE A, EICHLER E, BAMSHAD M, NICKERSON D, SHENDURE J.** Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009; 461(7261): 272–6.
- NG S, BUCKINGHAM K, LEE C, BIGHAM A, TABOR H, DENT K, HUFF C, SHANNON P, JABS E, NICKERSON D, SHENDURE J, BAMSHAD M.** Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat Genet* 2010; 42(1): 30–5.
- NICOLAIDES K, WRIGHT D, POON C, SYNGELAKI A, GIL M.** First-trimester contingent screening for trisomy 21 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013a; 42(1): 41–50.
- NICOLAIDES K, SYNGELAKI A, GIL M, ATANASOVA V, MARKOVA D.** Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn* 2013b; 33(6): 575–9.
- NORTON M, BRAR H, WEISS J, KARIMI A, LAURENT L, CAUGHEY A, RODRIGUEZ M, WILLIAMS J, MITCHELL M, ADAIR C, LEE H, JACOBSSON B, TOMLINSON M, OEPKES D, HOLLEMON D, SPARKS A, OLIPHANT A, SONG K.** 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 Gynecol* 2012; 207(2): 137.e1–8.
- PALOMAKI G, KLOZA E, LAMBERT-MESSERLIAN G, HADDOW J, NEVEUX L, EHRlich M, VAN DEN BOOM D, BOMBARD A, DECIU C, GRODY W, NELSON S, CANICK J.** DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011; 13(11): 913–20.
- PALOMAKI G, DECIU C, KLOZA E, LAMBERT-MESSERLIAN G, HADDOW J, NEVEUX L, EHRlich M, VAN DEN BOOM D, BOMBARD A, GRODY W, NELSON S, CANICK J.** 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(3): 296–305.
- PAPAGEORGIOU E, FIEGLER H, RAKYAN V, BECK S, HULTEN M, LAMNISSOU K, CARTER N, PATSALIS P.** Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Pathol* 2009; 174(5): 1609–18.
- PAPAGEORGIOU E, KARAGRIGORIOU A, TSALIKI E, VELISSARIOU V, CARTER N, PATSALIS P.** Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med* 2011; 17(4): 510–3.
- PETHERIK A.** Cell-free DNA screening for trisomy is rolled out in Israel. *Lancet* 2013; 382(9895): 846.
- POON L, LEUNG T, LAU T, CHOW K, LO Y.** Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2002; 48(1): 35–41.
- SCHARF A, STUMM M.** Konsensusempfehlung: Molekulargenetische nichtinvasive Pränataldiagnostik-Tests. *Frauenarzt* 2013; 54: 1082–6.
- SIMPSON J.** Cell-free fetal DNA and maternal serum analytes for monitoring embryonic and fetal status. *Fertil Steril* 2013; 99(4): 1124–34.
- SOUKA A, VON KAISENBERG C, HYETT J, SONEK J, NICOLAIDES K.** Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192(4): 1005–21.
- SPENCER K, SPENCER CE, POWER M, DAWSON C, NICOLAIDES KH.** Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years prospective experience. *BJOG* 2003; 110(3): 281–6.
- SYNGELAKI A, CHELEMEN T, DAGKLIS T, ALLAN L, NICOLAIDES KH.** Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11–13 weeks. *Prenat Diagn* 2011; 31(1): 90–102.
- TONG Y, DING C, CHIU R, GEROVASSILI A, CHIM S, LEUNG T, LEUNG T, LAU T, NICOLAIDES K, LO Y.** Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations. *Clin Chem* 2006; 52(12): 2194–202.
- TONG Y, JIN S, CHIU R, DING C, CHAN K, LEUNG T, YU L, LAU T, LO Y.** Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach. *Clin Chem* 2010; 56(1): 90–8.
- WANG E, BATEY A, STRUBLE C, MUSCI T, SONG K, OLIPHANT A.** Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2013; 33(7): 662–6.



Priv.-Doz. Dr. med. Arne M. Willruth

Abteilung für Geburtshilfe und Pränatale Medizin
Universitätsklinikum Bonn
Sigmund-Freud-Straße 25
53105 Bonn
E-Mail: arne.willruth@ukb.uni-bonn.de

Priv.-Doz. Dr. med. Arne M. Willruth studierte Medizin in Münster und Freiburg. Er begann 2000 seine Laufbahn an der Universitätsfrauenklinik Freiburg und absolvierte von 2002 bis 2008 seine Facharztausbildung an der Universitätsfrauenklinik in Essen. Priv.-Doz. Willruth absolvierte die spezielle Weiterbildung für Geburtshilfe und Perinatalmedizin und ist DEGUM-II-Seminarleiter. Die Habilitation für das Fach Gynäkologie und Geburtshilfe sowie die Ernennung zum Privatdozenten erfolgte 2013.

Seit 2009 arbeitet Herr Priv.-Doz. Dr. med. Arne M. Willruth als Oberarzt in der Abteilung für Geburtshilfe und Pränatale Medizin der Universitätsfrauenklinik Bonn (Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Gembruch).

Danksagung

Für kritische Hinweise zum Manuskript danke ich Herrn Professor Dr. Ulrich Gembruch, Abteilung für Geburtshilfe und Pränatale Medizin, Universitätsklinikum Bonn.

Interessenkonflikt

Der Autor erklärt, dass kein Interessenkonflikt im Sinne der Richtlinien des International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE; www.icmje.org) besteht.

Manuskriptdaten

Datum der Einreichung: 22.12.2013

Datum der Annahme: 25.01.2014

Frage 1

Welche Aussage ist richtig?

- Mit zunehmendem Gestationsalter findet sich im mütterlichen Serum neben zellfreier fetaler DNA eine ansteigende Fraktion von zellfreier maternaler DNA.
- Mit zunehmendem Gestationsalter findet sich im mütterlichen Serum neben zellfreier maternaler DNA eine ansteigende Fraktion von zellfreier fetaler DNA.
- Mit zunehmendem Gestationsalter findet sich im mütterlichen Serum neben zellfreier maternaler DNA eine unveränderte Fraktion von zellfreier fetaler DNA.
- Mit zunehmendem Gestationsalter findet sich im mütterlichen Serum neben zellfreier maternaler DNA eine abnehmende Fraktion von zellfreier fetaler DNA.
- keine der Antworten a.-d ist richtig

Frage 2

Welche Aussage ist *falsch*?

- Das Ersttrimester-Screening, bestehend aus fetaler Sonografie (NT-Messung) und maternaler Serumbiochemie (PAPP-A, freies β -HCG) zwischen 11+0 und 13+6 SSW, gilt derzeit als Goldstandard zur nichtinvasiven Risikoevaluation einer fetalen Aneuploidie.
- Die cffDNA-basierten Verfahren ersetzen schon heute das erweiterte Ersttrimester-Screening zur nichtinvasiven Risikoevaluation einer fetalen Aneuploidie im Low-risk-Kollektiv.
- Durch das erweiterte Ersttrimester-Screening ist es möglich, die Detektionsrate der fetalen Trisomien auf 96 % zu steigern und die Falsch-positiv-Rate zu halbieren.
- Bei auffälligem Ersttrimester-Screening erfolgt zur definitiven Abklärung des erhöhten Aneuploidierisikos eine invasive Diagnostik (CVS, AC).
- Die invasive Diagnostik ist mit einem punktionsbedingten Abortrisiko von ca. 0,5–1 % behaftet.

Frage 3

Welche Aussage ist richtig?

Die fetale DNA ist im maternalen Serum sicher detektierbar ab der:

6. Schwangerschaftswoche
7. Schwangerschaftswoche
8. Schwangerschaftswoche
9. Schwangerschaftswoche
10. Schwangerschaftswoche

Frage 4

Welche Aussage ist richtig?

Für den NIPT (»non-invasive prenatal test«) muss der cffDNA-Anteil mindestens wie viel Prozent der gesamten cfDNA ausmachen?

- 1–2 %
- 4–5 %
- 10 %
- 20 %
- 25 %

Frage 5

Welche Aussage ist *falsch*?

- Das sMPS basiert auf der Hochdurchsatz-Sequenzierung, bei dem simultan unselektiert eine sehr große Anzahl zellfreier DNA-Fragmente analysiert wird.
- Das targeted MPS beschränkt das DNA-Hochdurchsatzverfahren zielgerichtet auf DNA-Regionen einzelner Chromosomen.
- Das sMPS kann zielgerichtet simultan mehrere für eine spezifische Erkrankung verantwortliche Gene untersuchen.
- Das targeted MPS kann zielgerichtet simultan mehrere für eine spezifische Erkrankung verantwortliche Gene untersuchen.
- Das targeted MPS eignet sich besonders dann, wenn Mutationen in unterschiedlichen Genen (genetische Heterogenität) der Erkrankung zugrunde liegen.

Frage 6

Welche Methode kann Informationen über den elterlichen Ursprung einer Aneuploidie liefern?

- die sMPS-Methode
- die targeted-MPS-Methode
- die PCR-Methode
- die SNP-Methode
- die Exom-Sequenzierung

Frage 7

Welche Aussage ist *falsch*?

- Das Exom macht ca. 5 % des menschlichen Genoms aus.
- Das Exom macht ca. 20 % des menschlichen Genoms aus.
- Die Exom-Sequenzierung kann zukünftig zur Identifizierung der genetischen Grundlage, Erkrankungsmechanismus, biologischer Signalwege und eines möglichen Therapiekonzeptes bei seltenen monogenetischen Erkrankungen beitragen.
- Bei Entwicklungsstörungen, bei denen eine große genetische Heterogenität mit multiplen krankheitsverursachenden Genen diskutiert wird, kann die Exom-Sequenzierung zukünftig einen sinnvollen diagnostischen Beitrag leisten.
- In der medizinischen Diagnostik ist es sinnvoll, nur das Exom (und nicht das gesamte Genom) zu sequenzieren.

Frage 8

Welche Aussage ist richtig?

- Zum Einsatz der cffDNA-basierten NIPT bei Zwillingen gibt es derzeit keine groß angelegten validierten prospektiven Studien.
- Der cffDNA-basierte NIPT liefert bei höhergradigen Mehrlingen immer eine sichere Aussage über das Vorliegen einer fetalen Aneuploidie.
- Der cffDNA-basierte NIPT ist mit einem punktionsbedingten Fehlgeburtsrisiko behaftet.
- Der cffDNA-basierte NIPT wird sinnvollerweise zur Entscheidungsfindung der werdenden Eltern im dritten Trimenon eingesetzt.
- Der cffDNA-basierte NIPT wird an mittels Cordozentese gewonnenem fetalem Blut durchgeführt.

Frage 9

Welche Aussage ist *falsch*?

- Der cffDNA-basierte NIPT zeichnet sich durch eine hohe Präzision aus.
- Da die Detektionsrate nicht 100 % und die Falschpositiv-Rate nicht 0 % beträgt, wird die cffDNA-basierte NIPT als Screening- und nicht diagnostische Methode verstanden.
- Ein auffälliger cffDNA-basierte NIPT sollte derzeit durch eine invasive Diagnostik (AC/ CVS) bestätigt werden.
- Der cffDNA-basierte NIPT ist eine Methode, die das menschliche Erbgut relativ ungezielt beleuchtet.
- Der cffDNA-basierte NIPT kann in Deutschland, da er unter das Gendiagnostikgesetz (GenDG) fällt, ohne besondere Beratung und Aufklärung erfolgen.

Frage 10

Welche Aussage ist richtig?

- Im Niedrigrisiko-Kollektiv findet der cffDNA-basierte NIPT zur Risikoevaluation einer fetalen Aneuploidie auch zukünftig keine Anwendung.
- Überwiegend basieren die hohen Sensitivitäten und Spezifitäten der cffDNA-basierten NIPT-Verfahren auf retrospektiven Analysen asservierter Blutproben in Low-risk-Kollektiven.
- Durch die innovativen cffDNA-basierten NIPT-Verfahren können grundlegende Fragen zum Chromosomensatz und genetischer Syndrome erst im 2.–3. Trimenon beantwortet werden.
- Der Einsatz der cffDNA-Verfahren sollte nur auf Situationen mit hohem Risiko für Aneuploidien oder auf Familien mit Indexfällen beschränkt werden.
- Bei den cffDNA-basierten Methoden kommen Zufallsbefunde und Varianten unklarer Signifikanz (VUS) vor, die ihren Einsatz im Einzelfall zu einer echten Herausforderung machen.

Bitte geben Sie die Lösungen online ein unter www.akademos.de/gyn. Sofern Sie die erforderliche Anzahl an richtigen Antworten haben, erhalten Sie Ihre Fortbildungspunkte. Bei einer unzureichenden Punktzahl können Sie die Eingabe nach 24 Stunden wiederholen.