

# SPECULUM

**Geburtshilfe / Frauen-Heilkunde / Strahlen-Heilkunde / Forschung / Konsequenzen**

Schmid M

**Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) - Screening  
auf fetale Aneuploidien durch Analyse der  
zellfreien DNA im mütterlichen Blut**

*Speculum - Zeitschrift für Gynäkologie und Geburtshilfe 2014; 32 (2)  
(Ausgabe für Österreich), 10-14*

*Speculum - Zeitschrift für Gynäkologie und Geburtshilfe 2014; 32 (2)  
(Ausgabe für Schweiz), 16-20*

**Homepage:**

**[www.kup.at/speculum](http://www.kup.at/speculum)**

**Online-Datenbank mit  
Autoren- und Stichwortsuche**



Science For A Better Life

# Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) – Screening auf fetale Aneuploidien durch Analyse der zellfreien DNA im mütterlichen Blut

M. Schmid

## Hintergrund

Voraussetzung für eine pränatale genetische Diagnostik war bis dato die Gewinnung von fetalen Zellen oder Plazentagewebe durch einen invasiven Eingriff. Das Eingriffsrisiko für den Fetus wird dabei gewöhnlich für Amniozentesen und Chorionzottenbiopsien mit 1:100–1:200 angegeben. Der Traum von einer nichtinvasiven pränatalen genetischen Diagnostik ohne Risiko für das ungeborene Kind existiert daher schon lange. Es ist auch schon länger bekannt, dass fetale Zellen im mütterlichen Blutkreislauf vorhanden sind. Diese sind jedoch dadurch, dass sie nur in sehr geringen Mengen vorkommen (ca. 1 Zelle/ml maternales Blut) und über die Schwangerschaft hinaus im mütterlichen Blut persistieren können, derzeit keine verlässliche Quelle von fetalem Material für eine nichtinvasive pränatale genetische Diagnostik. Erst die Entdeckung von zellfreier fetaler DNA im mütterlichen Blut durch Dennis Lo 1997 ermöglichte die Entwicklung in der klinischen Routine anwendbarer, nichtinvasiver pränataler genetischer Tests. Sie ist im Vergleich zu den fetalen Zellen in größeren Mengen im mütterlichen Kreislauf vorhanden und ausschließlich Produkt der aktuellen Schwangerschaft.

## Zellfreie DNA im mütterlichen Blut

Sowohl die Mutter als auch der Fetus produzieren zellfreie DNA. Derzeit wird angenommen, dass die primäre Quelle der zellfreien fetalen DNA im mütterlichen Blut die Plazenta ist. Sie wird durch Apoptose

von Plazentazellen, aber auch (in geringem Ausmaß) von fetalen Erythroblasten freigesetzt. Beginnend mit ca. 4 Wochen *post conceptionem* steigt die fetale Fraktion mit zunehmendem Gestationsalter. Der Anteil der zellfreien fetalen DNA (i. e. die fetale Fraktion) beträgt typischerweise 10–15 % der gesamten zellfreien DNA im mütterlichen Blut. Neben dem Gestationsalter ist vor allem das maternale Gewicht für die fetale Fraktion entscheidend. Dies ist klinisch relevant, da die fetale Fraktion die Sensitivität und Spezifität von auf der Analyse von zellfreier fetaler DNA basierenden Tests signifikant beeinflusst.

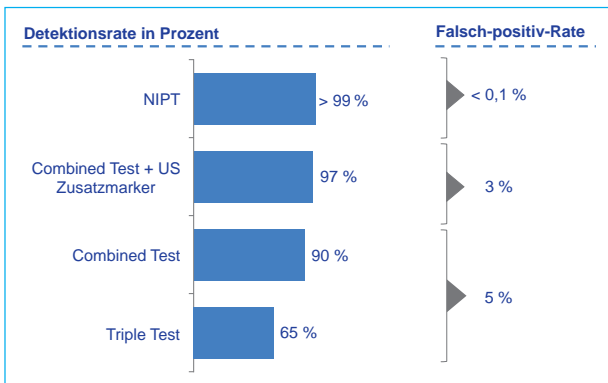
## Screening auf Aneuploidien durch Analyse der zellfreien DNA im mütterlichen Blut

Das Ersttrimester-Screening mittels Messung der fetalen Nackentransparenz und Bestimmung der Konzentrationen von freiem beta-hCG und PAPP-A („Combined Test“ [CT]) ist derzeit die Standardmethode beim Screening auf fetale Trisomie-21, Trisomie-18 und Trisomie-13. Werden dabei auch noch sonographische Zusatzmarker für Aneuploidie (Darstellbarkeit des Nasenbeins, Blutfluss im Ductus venosus und über der Trikuspidalklappe) berücksichtigt, können mit diesem Verfahren maximal 97 % der Fälle von Trisomie-21 bei einer Falsch-positiv-Rate von mindestens 3 % erkannt werden. Basierend auf dem Einsatz von Next-Generation-Sequencing-Technologien ist es erstmals 2008 gelungen, durch Analyse der zellfreien DNA im mütterlichen Blut ein neues Aneuploidie-Screening-Verfahren mit höherer Sensitivität und niedrigeren Falsch-po-

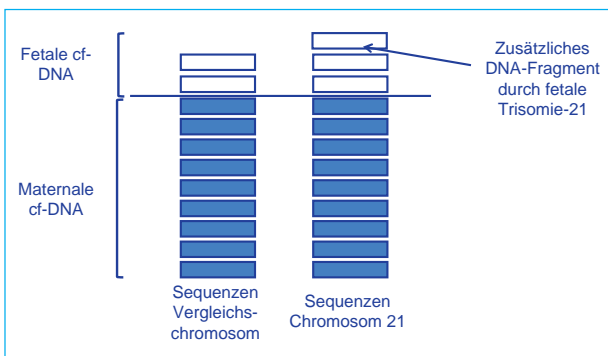
sitiv-Raten zu entwickeln (Abb. 1). Obwohl man diese Verfahren anfänglich als „non-invasive prenatal diagnosis“ (NIPD) bezeichnet hat, stellte sich rasch heraus, dass es sich weiterhin um ein Screening-Verfahren und nicht um einen diagnostischen Test handelt. Deshalb spricht man derzeit von „non-invasive prenatal testing“ (NIPT) oder „zellfreien DNA- (cfDNA) Tests“. Seit den ersten „Proof of concept“-Studien 2008 haben mehrere Firmen kommerzielle cfDNA-Tests entwickelt und zur Marktreife gebracht.

Die meisten kommerziellen cfDNA-Tests (z. B. Praenatest®) basieren auf dem Prinzip des „massively parallel shotgun sequencing“ (MPSS). Hierbei wird ungerichtet die gesamte zellfreie DNA im mütterlichen Blut vervielfältigt und anschließend der relative Anteil der Menge an DNA-Fragmenten einzelner Chromosomen (z. B. Chromosom 21) bestimmt. Da bei der Trisomie-21 ein zusätzliches Chromosom 21 im Fetus vorhanden ist, sind (verglichen mit einem oder mehreren Vergleichschromosomen bzw. einem historischen Kollektiv an Schwangerschaften mit sicher euploiden Feten) relativ gesehen mehr Fragmen-

te vom Chromosom 21 im Blut der Mutter nachweisbar (Abb. 2). Dieser Zugewinn kann für verschiedene Chromosomen berechnet und z. B. mithilfe eines Z-Scores eine Aussage über das Vorliegen einer Aneuploidie gemacht werden. Bei zielgerichteten („targeted sequencing“) Methoden (i. e. Harmony™-Test) wird durch selektive Sequenzierung nichtpolymorpher DNA-Abschnitte (der für die Analyse relevanten Chromosomen) der Sequenzierungsaufwand wesentlich verringert und gleichzeitig eine höhere Sequenzierungstiefe bei den untersuchten Chromosomen erreicht. Bei einem weiteren zielgerichteten Verfahren (i. e. Panorama™-Test), das im Unterschied zu den anderen Verfahren nicht auf dem Zählen von zellfreien DNA-Fragmenten beruht, werden ca. 11.000 „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) der untersuchungsrelevanten Chromosomen analysiert. Unter Berücksichtigung der Position der SNPs auf den Chromosomen und der Möglichkeit, dass eine Rekombination stattgefunden hat, wird eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass der Fetus entweder normal, aneuploid oder triploid ist.



1. Performance verschiedener Screening-Methoden für Trisomie-21.

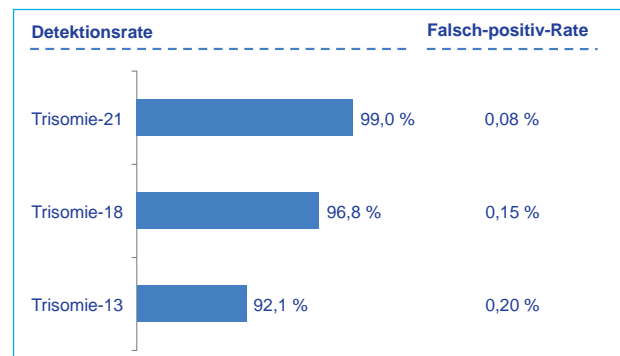


2. Aneuploidie-Screening mittels zellfreier DNA.

### Vorteile von zellfreien DNA-Tests

Eine Reihe von Validierungsstudien hat eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität für Trisomie-21, Trisomie-18 und Trisomie-13 gezeigt. Fasst man, unabhängig von der Methode, alle bisher publizierten Studie zusammen, ergeben sich folgende Leistungsdaten ([Gil MM et al. 2014]; Abb. 3):

- Trisomie-21: Detektionsrate 99,0 %; Falsch-positiv-Rate 0,08 %
- Trisomie-18: Detektionsrate 96,8 %; Falsch-positiv-Rate 0,15 %
- Trisomie-13: Detektionsrate 92,1 %; Falsch-positiv-Rate 0,20 %



3. Performance von NIPT.

**Tabelle 1:** Performance verschiedener Screening-Methoden für Trisomie-21.

Screening-Methode	100.000 Schwangerschaften*				
	Trisomie 21 (n = 200)		Normal (n = 99.800)		
	Detektionsrate	Erkannt	Falsch-positiv	Anzahl der Schwangerschaften	Spontanabort (Fehlgeburt)**
Maternales Alter	30 %	60	5 %	4990	25
Triple-Test SSW 16	65 %	130	5 %	4990	25
Combined Test SSW 12	90 %	180	5 %	4990	25
Combined Test Plus SSW 12	97 %	194	3 %	2994	15
NIPT	> 99 %	> 199	< 0,1 %	< 100	< 1

\* Annahme: Prävalenz Trisomie = 1:500  
 \*\* Fehlgeburtrisiko nach invasiver Pränataldiagnostik 0,5 % = 1:200

Die niedrige Falsch-positiv-Rate der cfDNA-Tests ist jedenfalls die entscheidende Verbesserung gegenüber dem CT. Die Rate an unnötigen invasiven Eingriffen und mit ihnen assoziierten Aborten kann dramatisch verringert werden (Tab. 1).

Ein weiterer Vorteil ist die frühe Durchführbarkeit des Tests. Die meisten kommerziell erhältlichen Tests sind ab Schwangerschaftswoche (SSW) 10+0 (Scheitel-Steißlänge [SSL] 32 mm) anwendbar. Führt man den Test früher durch, besteht die Gefahr, dass die fetale Fraktion für eine verlässliche Analyse zu gering ist. Eine fetale Fraktion von > 4 % ist Voraussetzung für ein verlässliches Ergebnis. Die Angabe der fetalen Fraktion auf dem Befund ist daher wesentliche Voraussetzung für einen verlässlichen cfDNA-Test. Nicht nur in der frühen Schwangerschaft, sondern auch bei adipösen Patientinnen ist die fetale Fraktion zu beachten. Bei übergewichtigen Patientinnen liegt die fetale Fraktion selbst bei einem Gestationsalter > 10+0 häufiger < 4 %.

CfDNA-Tests können auch nach dem ersten Trimenon noch zum Screening auf fetale Aneuploidien eingesetzt werden. Dies ist vor allem bei Patientinnen ein Vorteil, die das Zeitfenster für den CT (i. e. SSW 13+6 oder SSL > 84 mm) verpasst haben. Bis dato wurde in Österreich, wenn eine invasive Abklärung nicht gewünscht wurde, in so einem Fall vor allem ein Triple-Test angeboten. Dieser hat jedoch bei einer Falsch-positiv-Rate von 5 % eine maximale Detektionsrate für Trisomie-21 von nur 65 %. In der klinischen Praxis ist zu beachten, dass es bei fortgeschrittenem Gestationsalter im-

mer schwieriger wird, aus einem auffälligen Befund eine Konsequenz zu ziehen. Da das Ergebnis der NIPT üblicherweise erst nach ca. 2 Wochen verfügbar ist, sollte eine Anwendung nach SSW 19+0 kritisch hinterfragt werden.

### Limitationen von zellfreien DNA-Tests

Primär ist die Patientin darüber aufzuklären, dass es dazu kommen kann, dass ein cfDNA-Test nicht immer erfolgreich durchgeführt werden kann. In einer großen prospektiven Studie gab es bei 4,6 % der Patientinnen nach der ersten Blutabnahme kein Resultat. Bei 2,6 % kam es überhaupt zum Versagen des Tests [Norton ME et al. 2012]. Häufigste Ursache für eine Wiederholung der Blutabnahme ist eine zu geringe fetale Fraktion, aber auch andere Gründe wie zum Beispiel das Verschweigen einer Eizellspende können dazu führen, dass keine erfolgreiche Analyse möglich ist.

Trotz erheblicher Verbesserungen gegenüber den bisherigen nichtinvasiven Tests beträgt auch die Sensitivität und Spezifität der cfDNA-Tests nicht 100 %. Ein positives Ergebnis muss daher immer mit einer zweiten, diagnostischen, invasiven Methode (Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese) bestätigt werden. **Ein auffälliger cfDNA-Test alleine stellt in keinem Fall einen Grund für einen Schwangerschaftsabbruch aus medizinischer Indikation dar.** Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Sensitivität und Spezifität von cfDNA-Tests für die Trisomie-21 zwar exzellent, je-

doch für andere Aneuploidien wesentlich schlechter ist. Insbesondere die deutliche Einschränkung der Performance bei Trisomie-13 ist hier hervorzuheben. Grund dafür scheint neben technischen Umständen („GC bias“ bei MPSS) auch das bei Trisomie-13 häufige Vorliegen von Mosaiken in der Plazenta zu sein.

Es gibt viele mögliche Ursachen für falsch-positive cfDNA-Tests. Häufigste Ursache sind wahrscheinlich auf die Plazenta beschränkte Mosaik. Wie man von Chorionzottenbiopsien weiß, können diese bei bis zu 1 % der Schwangerschaften vorkommen. Insgesamt ist anzumerken, dass man wohl eher von diskordanten als falsch-positiven Befunden spricht, da der cfDNA-Test in diesen Fällen ja tatsächlich einen Zugewinn von cfDNA eines Chromosoms nachweist, dieser jedoch nicht auf den Fetus zurückzuführen ist. Ein „vanishing twin“ kann ebenso Ursache für ein falsch-positives Ergebnis sein. Daher ist bei bekanntem Abgang eines Zwillinges der Einsatz von cfDNA-Tests grundsätzlich zu hinterfragen. Es gibt auch seltene, bisher nur in einzelnen Publikationen beschriebene Ursachen für diskordante Befunde (z. B. maternale Aneuploidie im Mosaik [Grati FR et al. 2014]).

Klar ist, dass auch cfDNA-Tests keine Tests auf ein „gesundes Kind“ sind. In diesem Zusammenhang ist zu betonen, dass nur ein kleiner Teil der angeborenen Erkrankungen und Fehlbildungen überhaupt auf Aneuploidien zurückzuführen ist. Darüber hinaus wird bei cfDNA-Tests primär nur auf einige wenige mögliche Chromosomenaberrationen untersucht. Selbst bestimmte seltene Formen der Trisomien-13, -18 und -21 können nicht sicher nachgewiesen werden. Das betrifft vor allem partielle Trisomien, also jene (wenige) Fälle, bei denen nur Teile des betreffenden Chromosoms in 3-facher Kopienzahl (partielle Trisomien) vorliegen, oder aber auch Mosaik-Trisomien, wenn also nur Teile des kindlichen Körpers das betreffende Chromosom in 3-facher Ausfertigung aufweisen.

Auch wenn kommerzielle Anbieter von cfDNA-Tests versuchen, auf immer mehr Erkrankungen zu testen, wird man auch in der nahen Zukunft nicht auf alle möglichen genetischen Erkrankungen untersuchen können. Zu beachten ist dabei auch, dass neue Indikationen/Krankheitsbilder die kumulierte Falsch-positiv-Rate der Tests si-

gnifikant ansteigen lassen. Dadurch wird ein wesentlicher Vorteil gegenüber dem CT zu nichte gemacht. Eine umfassende pränatale genetische Diagnostik aus mütterlichem Blut ist also letztlich (noch) nicht möglich. Daher ist bei Feten mit Fehlbildungen oder einer Nackentransparenz  $> 3,5$  mm, falls eine genetische Untersuchung gewünscht ist, eine invasive pränatale genetische Diagnostik weiterhin Methode der Wahl. Hier sollte, neben der Durchführung einer Karyotypisierung, auch die Möglichkeit der Durchführung einer Microarray-Analyse angesprochen werden. Auch bei einem adjustierten Risiko nach CT von  $> 1:10$  ist die Durchführung eines cfDNA-Tests kritisch zu hinterfragen und die Möglichkeit einer sofortigen invasiven Diagnostik anzusprechen.

Eine kritische Anwendung von cfDNA-Tests sollte auch bei Mehrlingsschwangerschaften erfolgen. Wenngleich viele kommerzielle Anbieter ihre Tests auch bei Zwillingsschwangerschaften durchführen, gibt es wenige klinische Studien zu cfDNA-Tests in Mehrlingen. Bei Zwillingen, die diskordant für eine Trisomie sind, kann der Zugewinn von cfDNA des betroffenen Chromosoms des erkrankten Fetus durch den normalen Anteil vom euploiden Co-Zwilling maskiert werden. Rein methodisch gesehen ist es also wahrscheinlich, dass die Performance der cfDNA-Tests bei Mehrlingen diejenige bei Einlingsschwangerschaften nicht erreichen wird. Umstritten ist auch die Anwendung von cfDNA-Tests zum Screening auf Störungen der Geschlechtschromosomen. Nicht zuletzt weil der klinische Phänotyp bei Störungen der Geschlechtschromosomen sehr variabel ist und viele Betroffene, wenn überhaupt, nur unter leichten Störungen der physischen oder psychischen Entwicklung leiden.

### **Einsatz von zellfreien DNA-Tests in der klinischen Praxis**

Der Einsatz von cfDNA-Tests wird derzeit von anerkannten Fachgesellschaften nur im Risikokollektiv empfohlen. Darunter versteht man in erster Linie den Einsatz als sekundäre Screening-Methode nach vorangegangenen auffälligem CT. Keine Klarheit besteht aber derzeit darüber, welcher Wert für das adjustierte Risiko nach CT eine Indikation für cfDNA-Tests darstellt. Hier wurde primär ein „cut-off“ von  $> 1:1000$  diskutiert.

**Tabelle 2:** Klinische Anwendung von NIPT.

<b>Bedingtes Screening</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Combined Test als primäres Screening-Verfahren</li> <li>– NT &gt; 3,5 mm, Risiko &gt; 1:10, Fehlbildung → invasive PND ± Microarray anbieten</li> <li>– Combined Test Risiko &gt; 1:1000 → NIPT anbieten</li> </ul>
<b>Primäres Screening</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Ultraschall SSW 10+ (Bestimmung GA, Vitalität, Anzahl Feten)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ NIPT, wenn GA SSW 10+</li> </ul> </li> <li>– Folgebesuch 2 Wochen später = SSW 12+               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Besprechung NIPT-Befund</li> <li>○ Durchführung NT und frühes Organscreening</li> <li>○ NT &gt; 3,5 mm oder Fehlbildung → CVS ± Microarray anbieten</li> </ul> </li> </ul>
<b>Spätes Screening</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– NIPT für Patientinnen, die das Zeitfenster 11+0 bis 13+6 für den Combined Test verpasst haben</li> <li>– NIPT für Patientinnen mit Fehlbildung/hohem Risiko für Aneuploidie, für die ein Schwangerschaftsabbruch nicht infrage kommt</li> </ul>
PND: Pränataldiagnostik; GA: Gestationsalter; NT: Nackentransparenz; CVS: Chorionzottenbiopsie.	

Zuletzt wird, im Sinne einer großzügigeren Indikationsstellung, auch ein adjustiertes Risiko von > 1:2500 diskutiert (Tab. 2). Diese Werte beruhen jedoch nur auf theoretischen Überlegungen. Klinische Studien oder klare Empfehlungen dazu gibt es derzeit nicht. Die Empfehlung zum Einsatz im Hochrisikokollektiv beruht primär darauf, dass es zu den meisten cfDNA-Tests bis dato kaum Daten in Kollektiven mit mittlerem bzw. niedrigerem Risiko gab. In 2 rezenten, großen prospektiven Studien mit dem Harmony™-Test und dem Verify™-Test konnte jedoch gezeigt werden, dass cfDNA-Tests im direkten Vergleich mit herkömmlichen Screening-Tests auch in nichtselektionierten Kollektiven deutlich überlegen sind [Norton ME et al. 2014, Bianchi DW et al. 2014]. Auf Basis dieser Daten scheint es insgesamt wahrscheinlich, dass sich die Empfehlungen der Fachgesellschaften in naher Zukunft ändern werden. Ein von der Fetal Medicine Foundation entwickelter Algorithmus für den Einsatz von cfDNA-Tests im primären Screening (Tab. 2) wurde bereits in einer prospektiven Studie erfolgreich evaluiert. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass laut einer rezenten Metaanalyse > 50 % der fetalen Fehlbildungen mittels Ultraschall schon im ersten Trimenon erkannt werden können. cfDNA-Tests sollten daher immer mit entsprechend hochwertigem Ultraschall kombiniert werden.

### Zusammenfassung

- NIPT ist ein neuartiges Verfahren zur Messung zellfreier DNA (cfDNA) im mütterlichen Blut. Über die Konzentration und Verteilung der zellfreien fetalen

len DNA (cffDNA) wird eine Einschätzung abgeleitet, ob das ungeborene Kind von einer so genannten freien Trisomie -21, -18 oder -13 betroffen sein könnte oder nicht.

- Es handelt sich hierbei um einen medizinischen Test, nicht aber um ein medizinisches Diagnoseverfahren.
- Es kann bei NIPT (selten) zu falsch-un auffälligen und falsch-auffälligen Befunden kommen.
- NIPT macht nur eine Aussage zur freien Trisomie-21, Trisomie-18 und Trisomie-13. Mit einigen Tests können auch X- und Y-chromosonale Störungen erkannt werden. Andere Chromosomenstörungen, auch seltene Formen dieser Trisomien (partielle Trisomien, Mosaik), sowie Erkrankungen, die nur einzelne Gene betreffen, werden durch den Test nicht erfasst.
- Bei < 5 % der Untersuchungen ist aus technischen Gründen eine weitere Blutabnahme erforderlich. Bei < 2 % der Patienten kommt es zum Testversagen.
- Eine zytogenetische Diagnose aller 46 Chromosomen des Fetus ist weiterhin nur durch einen invasiven Eingriff (Amniozentese, Chorionzottenbiopsie) möglich.

Literatur beim Verfasser

#### Korrespondenzadresse:

Ass.-Prof. Priv.-Doz. Dr. Maximilian Schmid  
Abteilung für Geburtshilfe und feto-maternale  
Medizin

Universitätsklinik für Frauenheilkunde  
Medizinische Universität Wien

A-1090 Wien, Währinger Gürtel 18–20

E-Mail: maximilian.schmid@meduniwien.ac.at

# NEUES AUS DEM VERLAG

## Abo-Aktion zum Kennenlernen

Wenn Sie Arzt sind, in Ausbildung zu einem ärztlichen Beruf, oder im Gesundheitsbereich tätig, haben Sie die Möglichkeit, die elektronische Ausgabe dieser Zeitschrift kostenlos zu beziehen.

Die Lieferung umfasst 4–6 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte. Das e-Journal steht als PDF-Datei (ca. 5–10 MB) zur Verfügung und ist auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

➔  **Bestellung kostenloses e-Journal-Abo**

Besuchen Sie unsere **zeitschriftenübergreifende Datenbank** mit zahlreichen Artikeln, Fallberichten und Abbildungen – teilweise durch Videoclips unterstützt!

➔  **Bilddatenbank**

➔  **Artikeldatenbank**

➔  **Fallberichte**

Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

Wir stellen vor:



## Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

**Offizielles Organ:** – Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsbiologie des Menschen (AGRBM); – Berufsverband der Reproduktionsmedizinischen Zentren Deutschlands (BRZ); – Dachverband Reproduktionsbiologie und -medizin (DVR); – Dt. Gesellschaft für Andrologie (DGA); – Dt. Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF); – Dt. Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (DGRM); – Deutsches IVF-Register (DIR); – Embryologenforum Austria (EFA); – Österr. Gesellschaft für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie (OEGRM); – Sektion Reproduktionsbiologie und -medizin der Dt. Gesellschaft für Endokrinologie (SRBM/DGE)

**Homepage:** <http://www.kup.at/reproduktionsmedizin>