

# Fetale Chromosomenstörungen

## Möglichkeiten und Limitationen der NIPT

Dr. Kai Lüthgens, Labor Enders, Stuttgart



In den 1960er Jahren gelang durch Einführung der Amniozentese mit anschließender Chromosomenanalyse der im Fruchtwasser enthaltenen fetalen Zellen erstmals der Nachweis chromosomaler Störungen beim ungeborenen Kind. Allerdings handelt es sich sowohl bei der Amniozentese als auch bei der etwas später entwickelten Chorionzottenbiopsie um invasive Methoden mit dem Risiko, den Feten zu schädigen bzw. einen Abort zu induzieren. Daher sollte diese Diagnostik möglichst gezielt nur bei Schwangeren mit erhöhtem Risiko für eine kindliche Chromosomenstörung durchgeführt werden. In den 1990er Jahren begannen Versuche, fetales Erbgut nicht-invasiv aus dem mütterlichen Blut zu analysieren. Einen wichtigen Meilenstein stellte 1997 die Entdeckung von frei im mütterlichen Blut zirkulierender fetaler DNA dar. 2008 wurde erstmals der Nachweis einer Trisomie 21 aus zellfreier fetaler DNA in mütterlichem Blut publiziert. Das war die Geburtsstunde der nicht-invasiven pränatalen Testung (NIPT\*). Heute stehen hocheffiziente Testmethoden zur Verfügung, die – sinnvoll und kompetent eingesetzt – die moderne Schwangerenbetreuung wertvoll unterstützen.

Die meisten fetalen Chromosomenstörungen treten mit zunehmendem Alter der Mutter häufiger auf. Daher galt lange Zeit das mütterliche Alter als Hauptindikation für eine Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie. Durch verbesserte Ultraschall-Diagnostik und Algorithmen, welche die Ergebnisse von Ultraschall-Messungen (z. B. fetale Nackentransparenz) mit biochemischen Markern und dem Alter der Mutter kombinieren, ließ sich die Treffsicherheit der Screening-Methoden als Vorauswahl für eine invasive Diagnostik verbessern. Die Erkennungsrate der Trisomie 21, der häufigsten Chromosomenstörung, stieg beispielsweise von etwa 50 % bei alleiniger Altersindikation auf über 90 %.<sup>1,2</sup> Gleichzeitig sank die Falsch-Positiv-Rate auf etwa 3–5 %.

Über zwei Jahrzehnte war parallel dazu versucht worden, nicht-invasive Untersuchungen an fetalem Erbgut aus dem mütterlichen Blut zu etablieren. Der Ansatz einer molekulardiagnostischen Diagnostik aus dort zirkulierenden fetalen Zellen blieb lange erfolglos. Allerdings eröffnete im Jahre 1997 die Entdeckung frei im mütterlichen

Blut zirkulierender fetaler DNA (zellfreie fetale DNA, cfDNA) neue Möglichkeiten.<sup>3</sup> Schließlich wurde im Jahr 2008 erstmals der Nachweis einer Trisomie 21 über cfDNA im mütterlichen Blut publiziert.<sup>4</sup>

### Die „Fetal Fraction“

Während der Schwangerschaft setzt die Plazenta relativ große Mengen cfDNA in das mütterliche Blut frei.<sup>5</sup> Diese zirkulierende fetale DNA besteht aus Bruchstücken mit einer Größe von im Mittel 150 Kilobasen – groß genug, um sie einem bestimmten Chromosom bzw. einem bestimmten Gen zuzuordnen. Bei Schwangeren sind im Durchschnitt etwa 10 % der im mütterlichen Blut frei zirkulierenden DNA fetalen Ursprungs. Diese, sog. „Fetal Fraction“ kann auch weniger als 4 % und bis zu 40 % betragen.

Die Fetal Fraction wird hauptsächlich durch folgende Faktoren beeinflusst:

- Gestationsalter: Mit fortschreitender Schwangerschaft steigt der Gehalt an zirkulierender cfDNA. Ab etwa der 10. Woche ist ihre Konzentration für



*Fetale Chromosomenstörungen treten mit zunehmendem Alter der Mutter häufiger auf.*

ein valides Screening auf chromosomale Störungen ausreichend hoch.

- Mütterliches Gewicht: Die Größe der Plazenta ist gewichtsabhängig, daher verteilt sich die gleiche Menge cffDNA bei Schwangeren mit hohem Körpergewicht auf ein größeres Volumen als bei Frauen mit niedrigerem Körpergewicht.<sup>6</sup>
- Circadianer Rhythmus

#### Methoden der NIPT

Derzeit sind im Wesentlichen drei Methoden für die cffDNA-Analyse im Einsatz:

- Beim *rMPS-* (bzw. *MPSS-*)Verfahren (Glossar) werden sämtliche vorhandenen DNA-Bruchstücke aus dem mütterlichen Plasma zunächst vervielfältigt und danach sequenziert – ohne Unterscheidung zwischen fetaler und maternaler DNA. In einem komplexen biomathematischen Verfahren werden die DNA-Fragmente anschließend einem Chromosom zugeordnet und quantifiziert. Da bei Trisomie drei statt zwei Exemplare eines bestimmten Chromosoms vorhanden sind, steigt der Gehalt der fetalen DNA des betreffenden Chromosoms um 50 %. Beträgt die Fetal Fraction z. B. 10 %, erhöht die fetale Trisomie den cffDNA-Gehalt für dieses Chromosom im mütterlichen Blut um 5 %.
- Bei der zielgerichteten (*targeted*) NIPT werden nur DNA-Abschnitte vervielfältigt, welche für ein bestimmtes Chromosom spezifisch sind. Anschließend

erfolgen auch hier Zählung, Vergleich mit Referenzchromosomen und eine Plausibilitätsprüfung, ob die gefundene zusätzliche Menge an Chromosomenspezifischer DNA mit der zuvor ermittelten Fetal Fraction übereinstimmt. Aufgrund der Vorselektion der untersuchten, Chromosomen-spezifischen Sequenzen reduziert sich der Aufwand, daher kann die Sequenzierungstiefe (Glossar) der *targeted* NIPT höher sein als bei den *rMPS-/MPSS-*Verfahren, was theoretisch die Genauigkeit der Methode erhöht.

Die *Microarray-Technologie* (Glossar) verwendet dieselben, vorab definierten DNA-Sequenzen wie früher die Sequenzierung, allerdings erfolgt anstelle der Sequenzierung eine *Microarray-Analyse*. Der Vorteil ist eine deutlich kürzere Analysezeit bei offenbar mindestens gleich hoher Aussagekraft.<sup>7</sup>

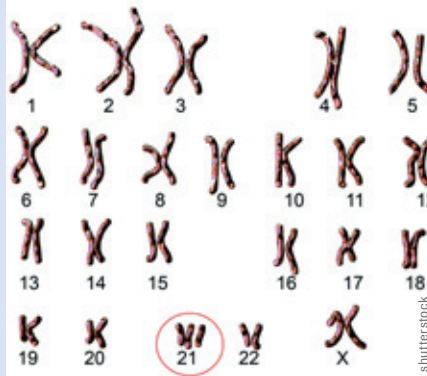
- Bei der „SNP-basierten“ NIPT werden Variationen einzelner Basenpaare in der DNA, sog. SNPs (single nucleotide polymorphism) untersucht. Es gibt Verfahren, die mehr als 10 000 SNPs analysieren. Das sind deutlich mehr als z. B. im *Harmony-Test* (Ariosa/Roche) welcher 576 SNPs verwendet. Die höhere Anzahl untersuchter SNPs führt jedoch nicht zu einer weiteren Verbesserung der ohnehin schon hohen Genauigkeit der Testverfahren.<sup>8</sup>

Aufgrund des interindividuell stark unterschiedlichen Gehaltes an cffDNA im mütterlichen Blut ist die Kenntnis der Fetal Fraction für die Testauswertung von großer Bedeutung. Bei einer Fetal Fraction von 10 % beträgt die Zunahme an Chromosomenspezifischer Information im Falle einer fetalen Trisomie im mütterlichen Blut noch 5 %. Bei abnehmender Fetal Fraction geht die Zunahme einer Chromosomen-spezifischen DNA irgendwann im Grundrauschen unter, dies ist typischerweise bei unter 4 % der Fall. Wurde die Fetal Fraction zuverlässig bestimmt, können moderne Algorithmen den niedrigen cffDNA-Gehalt berücksichtigen und die Trennschärfe des Tests wesentlich verbessern. Bei fehlender Kenntnis der Fetal Fraction hingegen nimmt die Trennschärfe bei niedrigem cffDNA-Gehalt deutlich ab.<sup>9</sup>

#### Studien- und Datenlage zur NIPT

**Trisomie 21:** Mittlerweile wurde die sehr gute Performance der NIPT für die Erkennung der Trisomie 21 in zahlreichen Publikationen, davon etlichen klinischen, prospektiven Studien, dokumentiert. Im klinischen Alltag bzw. im Beratungsgespräch mit der Schwangeren kann von einer Erkennungsrate von 99 % ausgegangen werden. Gleichzeitig erreicht die NIPT mit ca. 0,1 % für die Trisomie 21 eine etwa 50-fach niedrigere Falsch-Positiv-Rate auf, verglichen mit dem klassischen Ersttrimester-Screening (Nackentransparenz, PAPP-A und freies  $\beta$ -hCG).

## Trisomie 21 – häufigste fetale Chromosomenstörung.



Bislang gibt es nur wenige Studien in Kollektiven mit *normalem* Risiko für eine Trisomie 21.<sup>10,11</sup> In der ersten ausreichend großen Normalrisiko-Kollektiv-Studie („NEXT“-Studie) mit 15 841 auswertbaren Schwangerschaften<sup>11</sup> zeigte der Harmony-Test

- eine Falsch-Positiv-Rate von nur 0,06 %,
- in der ROC-Analyse eine AUC von 0,999 (Glossar).

Trotz der nahezu 100%igen Trennschärfe für das Erkennen einer fetalen Trisomie 21 sollte die NIPT nicht als diagnostisches, sondern als Screening-Verfahren angesehen werden, da falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse (wenn auch selten) vorkommen können.

**Andere chromosomale Störungen:** Weitere fetale Aneuploidien betreffen die Chromosomen 18 und 13 sowie geschlechtschromosomale Störungen. Die durchschnittlichen Erkennungsraten der NIPT betragen:

- ca. 97 % für die Trisomie 18
- ca. 92 % für die Trisomie 13
- ca. 93 % für X/Y-chromosomale Störungen.

Die Falsch-Positiv-Raten für die Trisomien 13 und 18 lagen in der NEXT-Studie für den Harmony-Test mit 0,01 % und 0,02 % ebenfalls extrem niedrig.<sup>11</sup>

Während die Gesamtzahl der in publizierten Studien untersuchten Trisomie-18-Fälle für eine zuverlässige Aussage zur Detek-

tionsrate ausreicht, trifft das auf die Trisomie 13 bislang nicht zu, da aufgrund des relativ seltenen Auftretens dieser Chromosomenstörung Studien mit ausreichend großen Fallzahlen fehlen.

Ein Grund für die im Vergleich zur Trisomie 21 niedrigeren Erkennungsraten ist die Tatsache, dass die Trisomien 13 und 18 zu etwa 70 % als plazentare Mosaik (Glossar) vorliegen,<sup>12</sup> welche durch NIPT grundsätzlich schlechter als vollständige Trisomien erkannt werden. Da die Quelle der cfDNA die Plazenta ist, führt ein dort vorliegendes Mosaik zu einem eventuellen Übersehen einer beim Feten vollständig ausgeprägten Trisomie.

Auch für geschlechtschromosomale Störungen liegen aktuell noch zu wenige Studiendaten vor. Erste Publikationen zeigten eine durchschnittliche Erkennungsrate von ca. 93 % bei einer Falsch-Positiv-Rate von 0,14 %.<sup>13,14</sup>

Bei dichorialen (zweieiigen) Zwillingsschwangerschaften rechtfertigt die derzeitige Datenlage kein Aneuploidie-Screening mittels NIPT.<sup>15</sup> Für dichoriale Geminigraviditäten mit einem abgestorbenen Fetus („vanishing twin“) bietet das NIPT-basierte Screening ebenfalls nicht die gleiche Ergebnisqualität wie bei einer Einlingsschwangerschaft. Da die zellfreie DNA des abgestorbenen, nicht selten von einer Aneuploidie betroffenen Feten aufgrund der teilweise

persistierenden Plazenta weiterhin im mütterlichen Kreislauf zirkuliert, ist die Trennschärfe bei diesen Schwangerschaften deutlich reduziert. Hier ist das sonographische Ersttrimester-Screening zu bevorzugen.

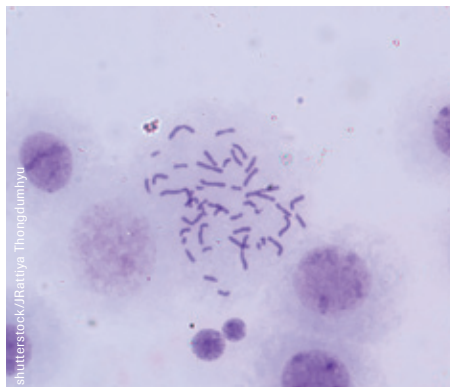
### Grenzen der NIPT

Chromosomale Störungen des Feten machen bei Geburt nur etwa 8 % der schweren Fehlbildungen aus.<sup>16</sup> Selbst eine sehr ausgereifte Screening-Technologie wie die NIPT erfasst daher insgesamt nur einen kleinen Teil der schweren kongenitalen Fehlbildungen. Aus diesem Grunde kann die NIPT eine ausführliche pränatale bildgebende Diagnostik, wie sie zurzeit im Rahmen des Ersttrimester-Screenings oder im Rahmen des feindiagnostischen Ultraschalls erfolgt, nicht ersetzen.

### Erkennung von Mikrodeletionen

Bei chromosomalen Mikrodeletionen handelt es sich um den Verlust von einigen hunderttausend bis wenigen Millionen Basenpaaren des Chromosoms. Die resultierenden Syndrome stellen in der Regel seltene, komplexe Erkrankungen dar. Der Nachweis von Mikrodeletionen erfolgt bei begründetem klinischem Verdacht mittels FISH (Glossar) oder Array-CGH (Glossar) aus dem Fruchtwasser.

Prinzipiell ist ein diesbezügliches Screening mittels NIPT aus dem mütterlichen Blut möglich, wenn Genlocus und Aberration klar umschrieben sind und die Krankheitsprävalenz ausreichend hoch ist. Die meisten Mikrodeletions-Syndrome sind jedoch sehr selten, daher muss die Sinnhaftigkeit eines entsprechenden Screenings hinterfragt werden. Liegt beispielsweise die Prävalenz eines Syndroms bei 1:50 000 (d.h. bei 50 000 Schwangerschaften ist ein Kind betroffen), treten bei 50 000 untersuchten Schwangeren und einer Falsch-Positiv-Rate von 0,2 % 100 falsch auffällige Testergebnisse auf. Somit läge bei 101 auffälligen Tests nur bei einem Feten tatsächlich eine Erkrankung vor (positiver Vorhersagewert 0,99 %). Als



*Amniozentese mit Chromosomenanalyse aus dem Fruchtwasser. NIPT reduziert die Notwendigkeit invasiver Eingriffe drastisch.*

Konsequenz sollte derzeit allenfalls auf die Syndrome gescreent werden, deren Prävalenz  $\geq 1:5\,000$  beträgt. Dies ist z. B. für das DiGeorge-Syndrom (22q11.2) der Fall.

**NIPT in der Praxis**

Aufgrund des zeitlichen Zusammenhangs mit dem Ersttrimester-Screening wird die NIPT derzeit überwiegend gegen Ende des ersten Trimenons durchgeführt. Grundsätzlich wäre auch eine spätere Anwendung denkbar – z. B. bei Auffälligkeiten im Feinultraschall um die 20. Schwangerschaftswoche. Die meisten Schwangeren wollen jedoch das Screening auf Chromosomenstörungen nach Abschluss des ersten Trimenons beendet sehen.<sup>17</sup>

NIPT ist in Deutschland derzeit keine regelhafte Leistung der gesetzlichen Krankenkassen,

die Kosten müssen von gesetzlich versicherten Schwangeren in aller Regel selbst getragen werden.

Eine NIPT sollte in eine ausführliche Ultraschalluntersuchung eingebettet werden. Durch das heutige Ersttrimester-Screening lässt sich etwa die Hälfte der schweren Fehlbildungen erkennen. Eine Beschränkung auf das NIPT-basierte Screening würde der modernen Schwangerschaftsbetreuung nicht gerecht.<sup>18</sup> Dennoch stellt die NIPT durch ihre hohe Sensitivität und Spezifität, gerade für die Trisomie 21, ein aus der Pränataldiagnostik nicht mehr wegzudenkendes Verfahren dar. Mit ihrer Hilfe lässt sich insbesondere die Zahl der notwendigen invasiven Eingriffe drastisch reduzieren.

\* **NIPT:** Synonym verwendete Abkürzung für nicht-invasiven pränatalen Test, nicht-invasive pränatale Testung und non-invasive prenatal testing

**Literatur**

- 1 Nicolaidis KH: Am J Obstet Gynecol (2004); 191:45–67
- 2 Kagan KO et al: Ultrasound Obstet Gynecol (2009); 34:14–18
- 3 Lo YM et al: Lancet (1997); 350:485–487
- 4 Fan HC et al: Proc Natl Acad Sci USA (2008); 105: 16266–16271
- 5 Alberry M et al: Prenat Diagn (2007); 27:415–418
- 6 Wang E et al: Prenatal Diagnosis (2013); 33:662–666
- 7 Juneau K et al: Fetal Diagn Ther (2014); 36:282–286
- 8 Kozłowski P: Ultraschall in Med (2018); doi:10.1055/a-0631-8898 [Epub ahead of print]
- 9 Kagan KO et al: Ultraschall Med (2014); 35:229–236
- 10 Bianchi DW et al: N Engl J Med (2014); 370:799–808
- 11 Norton ME et al: N Engl J Med (2015); 372:1589–1597
- 12 Kaloupek DK et al: Am J Hum Genet (1989); 44:338–343
- 13 Gil MM et al: Ultrasound Obstet Gynecol 2017; 50: 302–3143
- 14 Nicolaidis KH et al: Fetal Diagn Ther (2014); 35:1–6
- 15 Gil MM et al: Fetal Diagn Ther (2014); 35:204–211
- 16 Eurocat-Register: [www.eurocat-network.eu/access-prevalencedata/prevalencetables](http://www.eurocat-network.eu/access-prevalencedata/prevalencetables)
- 17 Bartlett LA et al: Obstet Gynecol (2004); 103:729–737
- 18 Nicolaidis KH: Prenat Diagn (2011); 31:3–6

**Glossar**

- **Array-CGH (array-based comparative genomic hybridisation):** Simultane Hybridisierung von fluoreszenzmarkierter Patienten- und Kontroll-DNA auf einem Trägerchip mit DNA-Fragmenten
- **AUC (area under the curve) in der ROC (receiver-operating characteristics)-Analyse:** Maß für die Güte eines Trennverfahrens. AUC=1 bedeutet vollständige Differenzierung zwischen Betroffenen/Kranken und Nicht-Betroffenen/Gesunden. AUC=0 bedeutet, dass das Verfahren keinerlei Aussage besitzt.
- **FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung,** um Nukleinsäuren z.B. auf Metaphase-Chromosomen nachzuweisen.
- **Micro-Arrays:** „Genchips“ mit angebrachten Sonden. Ermöglicht die parallele Analyse von

mehreren tausend Einzelnachweisen in biologischem Probenmaterial.

- **MPSS (massively parallel shotgun sequencing) / rMPS (random massively parallel sequencing):** Hochdurchsatzmethoden (next-generation sequencing / NGS) der DNA-Sequenzierung.
- **Plazentare Mosaik:** Unterschiedliche Chromosomenausstattung von Zellen innerhalb der Plazenta bzw. zwischen Plazenta und Fetus als Resultat von Mutationen nach Bildung der Zygote.
- **Sequenzierungstiefe:** Häufigkeit, mit der derselbe DNA-Abschnitt während einer Sequenzierung abgelesen wird („reads“). Sie beträgt mehrere Millionen Mal und kann bei der NIPT typischerweise bis zu 30 Mio. Reads betragen.

**Korrespondenzadresse**



Dr. med. Kai Lüthgens  
Leiter Endokrinologie und Pränatales Screening im Labor Prof. G. Enders und Kollegen, MVZ Rosenbergstraße 85 70193 Stuttgart  
luethgens@labor-enders.de  
www.labor-enders.de