

# Combined First Trimester Screening and Cell-Free Fetal DNA – “Next Generation Screening”

## Kombiniertes Ersttrimesterscreening und zellfreie fetale DNA – „Next Generation Screening“

### Authors

K. O. Kagan<sup>1</sup>, B. Eiben<sup>2</sup>, P. Kozlowski<sup>3</sup>

### Affiliations

<sup>1</sup> Department of obstetrics and gynaecology, University of Tuebingen  
<sup>2</sup> Institute for clinical genetics and laboratory medicine, Amedes Group, Essen  
<sup>3</sup> Prenatal medicine and genetics Duesseldorf, praenatal.de, Duesseldorf

### Key words

- cellfree fetal DNA
- first trimester screening
- trisomy
- ultrasound

### Abstract

In the last decades, prenatal screening for aneuploidy has become increasingly effective. While first trimester combined screening is considered to be the current gold standard, the use of cell-free fetal DNA (cffDNA), which is also called non-invasive prenatal testing (NIPT), will result in a change of paradigm. Respective studies indicate that in screening for trisomy 21, the detection and false-positive rates are 99% and 0.1%, respectively. For trisomies 18 and 13, there is less evidence but recent studies report detection rates of 98% and 86%. Despite the excellent results in screening for trisomy 21, NIPT should not be considered as a diagnostic test. Due to the costs of NIPT, it is unlikely that NIPT will be applied in the near future in population-based screening for trisomy. In addition, the scope of the current approach in first trimester screening exceeds the screening for aneuploidy as it is possible to assess the risk for various pregnancy complications. Therefore, a combination of both NIPT and first trimester combined screening seems reasonable. Both examinations could be applied in a contingent model where the latter is offered to everyone and NIPT is restricted to women with an intermediate risk after first trimester combined screening. Such a policy would result in a detection rate of about 97% for a false-positive rate of about 1%. While NIPT currently focuses on screening for trisomy 21, 18, 13 and sex chromosomal abnormalities, the scope of NIPT will soon become broader. In this respect, some study groups have managed to examine the whole fetal genome within the course of the pregnancy. However, moral and ethical considerations need to be taken into account.

### Zusammenfassung

In den vergangenen Jahrzehnten wurden zunehmend komplexere und effektivere Methoden im pränatalen Screening auf Chromosomenstörungen entwickelt. Während heute noch das kombinierte Ersttrimesterscreening als Goldstandard betrachtet wird, ist in baldiger Zukunft durch den Einsatz der zellfreien fetalen DNA (cffDNA) im Sinne eines „non-invasive prenatal testing“ (NIPT) ein Paradigmenwechsel zu erwarten. Diesbezügliche Studien verweisen auf eine Detektionsrate von etwa 99% für Trisomie 21 bei einer Falsch-Positiv-Rate von 0,1%. Die Studienlage für Trisomie 18 und 13 ist erheblich dünner, wobei die Detektionsraten derzeit bei etwa 98 und 86% liegen. Trotz der guten Testgüte im Hinblick auf das Screening auf Trisomie 21 darf der Test auch weiterhin nicht als diagnostischer Test verstanden werden. Aufgrund der derzeit noch hohen Kosten der Untersuchung ist eine flächenhafte Anwendung noch nicht sinnvoll. Zudem beschränkt sich das heutige Ersttrimesterscreening nicht nur auf ein Aneuploidiescreening sondern erlaubt die Beurteilung zahlreicher schwangerschaftsspezifischer Risiken. Insofern ist eine kombinierte Anwendung beider Untersuchungen sinnvoll. Diese könnte beispielsweise gestaffelt erfolgen. Zunächst würde ein kombiniertes Ersttrimesterscreening erfolgen, welches bei einem intermediären Risiko durch die NIPT-Untersuchung erweitert wird. Dadurch läge die Detektionsrate für Trisomie 21 bei etwa 97% bei einer Falsch-Positiv-Rate von etwa 1%. Während sich die NIPT-Untersuchung derzeit noch auf das Screening auf Trisomie 21, 18, 13 und gonosomale Aberrationen konzentriert, ist in der Zukunft eine deutliche Erweiterung des Untersuchungsspektrums zu erwarten. So ist es einzelnen Arbeitsgruppen in der Schwangerschaft bereits gelungen, das gesamte Genom mittels cffDNA-Analysen zu entschlüsseln. Dabei dürfen moralische und ethische Aspekte aber nicht außer Acht gelassen werden.

received 16.7.2013  
accepted 17.2.2014

### Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1366353>  
Published online: April 24, 2014  
Ultraschall in Med 2014; 35: 229–236 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · ISSN 0172-4614

### Correspondence

**Prof. Karl Oliver Kagan**

Department of obstetrics and gynaecology, University of Tuebingen  
Calwer Straße 7  
72076 Tuebingen  
Tel.: ++49/70 71/2 98 48 07  
Fax: ++49/70 71/29 56 19  
kokagan@gmx.de

### License terms



## Einleitung

In den vergangenen Jahrzehnten wurden zunehmend komplexe und effektivere Methoden im pränatalen Screening auf Chromosomenstörungen entwickelt. War Ende der 70er-Jahre das mütterliche Alter die einzige Möglichkeit, das Risikokollektiv für eine weiterführende Diagnostik zu definieren, stellt heute das kombinierte Ersttrimesterscreening das Mittel der Wahl dar. In baldiger Zukunft ist diesbezüglich ein Paradigmenwechsel zu erwarten, da der Einsatz der zellfreien fetalen DNA (cffDNA) im Sinne eines „non-invasive prenatal testing“ (NIPT) zunehmend an Bedeutung gewinnt. Dabei gehen die Möglichkeiten der NIPT bei weitem über das Screening auf Chromosomenstörungen hinaus und werden die pränatale Medizin in erheblichem Maße prägen. In dieser Übersichtsarbeit sollen das heute mögliche Screening mittels NIPT und zukünftige Einsatzmöglichkeiten beleuchtet werden.

## Methodik der NIPT

Der Wunsch, die häufigsten Chromosomenstörungen über eine mütterliche Blutanalyse auszuschließen, wurde zunächst dahingehend verfolgt, fetale Zellen aus dem mütterlichen Blut zu analysieren [1]. Da die Konzentration aber etwa bei 1:100 000 mütterlicher Zellen liegt, erwies sich die Extraktion als schwierig. Dementsprechend waren auch die Ergebnisse im pränatalen Screening auf Trisomie 21 mittels fetaler Zellen im mütterlichen Blut mit einer Detektionsrate von 75 % und einer Falsch-Positiv-Rate von 0,6 und 4,1 % bei männlichen und weiblichen Feten nicht konkurrenzfähig [2]. Ende der 90er-Jahre wurde gezeigt, dass sich im Plasma einer Schwangeren stark fragmentierte DNA finden lässt, die der jeweils aktuellen Schwangerschaft zuzuordnen ist und Stunden nach der Entbindung nicht mehr nachgewiesen werden kann [3, 4]. Obwohl sich der Begriff zellfreie fetale DNA etabliert hat, ist die DNA nicht fetalen, sondern plazentaren Ursprungs und umfasst etwa 5–15 % der gesamten freien DNA im mütterlichen Plasma [5]. Durch die Entwicklung neuer Hochdurchsatzsequenziergeräte („Next Generation Sequencing“) ist es möglich geworden, die zellfreie DNA zeitnah zu amplifizieren und zu sequenzieren, wodurch eine Auswertung in der Schwangerschaft möglich wurde [6, 7]. Um spezifische genomische Merkmale wie eine Trisomie 21 erkennen zu können, kommen zwei Ansätze in Betracht: beim „massively“ oder „targeted parallel sequencing“ werden die DNA-Fragmente den einzelnen Chromosomen zugeordnet. Dies kann alle DNA-Fragmente („massively“) involvieren oder auf für spezifische chromosomentypische Fragmente („targeted“) beschränkt sein [8–11]. Auf diesen Ansatz greifen Firmen wie Sequenom bzw. Lifecodex, Verinata, BGI und Ariosa zurück.

Da eine isolierte Betrachtung der schwangerschaftsspezifischen plazentaren DNA-Fragmente zu aufwendig ist, wird die gesamte zellfreie DNA zur Auswertung verwendet, wodurch die Unterschiede zwischen einer fetalen Trisomie und einem normalen Befund entsprechend gering ausfallen. So kann etwa 0,75 % des humanen Genoms dem Chromosom 21 zugeordnet werden. Bei einem unauffälligen Karyotyp beträgt der Anteil somit 1,5 %, bei einer Trisomie 21 entsprechend 2,25 %. Sind beispielsweise 10 % der freien DNA im mütterlichen Blut einer Schwangerschaft mit Trisomie 21 zuzuordnen, so ergibt sich:  $1,5\% (\text{Anteil des Chromosoms 21 am maternalen Genom}) \times 0,9 (90\% \text{ maternale DNA}) + 2,25 (\text{fetaler Anteil des Chromosom 21 bei Trisomie 21 am fetalen Genom}) \times 0,1 (10\% \text{ fetale DNA}) = 1,575\%$  versus 1,5 %. Ein entsprechender Algorithmus muss also zwischen 1,5 % und 1,575 % differenzieren können. Bei abnehmender fetaler DNA-Konzentration im mütterlichen Blut wird dieser Abstand geringer, wodurch die Trennschärfe des Tests abnimmt.

Die statistische Beurteilung, ob die Menge an chromosomenspezifischer DNA dem Erwartungsmaß entspricht oder dieses übersteigt, d. h. eine Trisomie vorliegt, erfolgt über z-scores. Dabei wird die Abweichung vom Erwartungswert als Mehrfaches der Standardabweichung angegeben. In der Regel wird ein Schwellenwert von 3,0 verwendet. Bei Verwendung dieses Grenzwertes liegen 99,9 % der Werte euploider Feten unterhalb des Schwellenwerts, das heißt im Normalbereich, wodurch sich eine Falsch-Positiv-Rate von 0,1 % ergibt [12]. Alternativ kann auch der Wahrscheinlichkeitsquotient, der aus der Detektions- und Falsch-Positiv-Rate bei einer NIPT-Untersuchung ermittelt wird, mit dem Alters- und gestationsalterspezifischen Risiko multipliziert werden, woraus sich das adjustierte Risiko ergibt [13].

Als Alternative kommt die Beurteilung von Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms bzw. „snips“ oder SNP) in Betracht. Hierbei wird nicht die gesamte zellfreie DNA amplifiziert und sequenziert, sondern das Muster von 19 500 SNPs ausgewertet, die auf den Chromosomen 21, 18, 13, X und Y liegen. Für die Beurteilung sind zwei Analyseschritte aus der gleichen Blutprobe notwendig: die Analyse der SNP-Muster der gesamten fetalen und maternalen zellfreien DNA und die Analyse der reinen maternalen SNP-Konstellation aus den Leukozyten. Durch den Vergleich beider Analysen kann auf die fetale SNP-Konstellation und somit auf Trisomien geschlossen werden [14]. Dieser Ansatz wird von Natera verfolgt [15].

Zusammenfassend fokussieren gegenwärtig die meisten NIPT-Verfahren auf Trisomie 21, 18, 13, auf gonosomale Chromosomenstörungen und auf Triploidien. Eine Ausweitung auf kleinste chromosomale Veränderungen bis hin zum „whole genome sequencing“ ist aber grundsätzlich möglich [16].

## Screening auf Chromosomenstörungen

### Screening auf Trisomie 21

Die bisherigen Studien im Screening auf Chromosomenstörungen fokussierten primär auf die Trisomie 21 und wurden vor allem im Risikokollektiv als Fall-Kontroll-Studien durchgeführt.

Bisher wurden nur wenige Screeningstudien im Normalkollektiv durchgeführt. **Tab. 1** gibt einen Überblick über die größten Studien im Risiko- und im Normalrisikokollektiv. Hervorzuheben gilt, dass die Fallzahlen, die von einer Screeningstudie erwartet werden, bisher für NIPT-Studien nicht vorliegen. Mit zunehmender Größe der Studien ist anzunehmen, dass die Testgüte unter anderem aufgrund der Problematik der Mosaikete etwas niedriger sein wird als heute angenommen.

Zur Beratung empfiehlt es sich auf eine Detektionsrate (DR) von 99 % und auf eine Falsch-Positiv-Rate (FPR) von 0,1 % zu verweisen. Das bedeutet, dass von 100 000 normalen Schwangerschaften 100 durch ein falsch positives Ergebnis auffallen werden. Unter Berücksichtigung einer altersunabhängigen Prävalenz der Trisomie 21 von etwa 1 in 500 Fällen wären bei 100 000 normalen Schwangerschaften 200 Feten mit Trisomie 21 zu finden, von denen 198 durch NIPT erkannt werden könnten. Das bedeutet aber auch, dass von den 298 testpositiven Schwangerschaften nur 198 bzw. 66 % wirklich betroffen sind.

**Tab. 1** Übersicht über die größten NIPT-Studien im Risiko- und im Normal-kollektiv.

Studie	Euploid		Trisomie 21	
	n	Falsch-Positiv-Rate	n	Detektionsrate
		% (n)		% (n)
<i>Studien im Risikokollektiv</i>				
Norton et al. [18]	2888	0,03 % (1)	81	100 % (81)
Palomaki et al. [20]	1471	0,2 % (3)	212	98,6 % (209)
Bianchi et al. [11]	410	0 % (0)	90	98,9 % (89)
Ehrich et al. [69]	410	0,24 % (1)	39	100 % (39)
Ashoor et al. [19]	297	0 % (0)	50	100 % (50)
<i>Screeningstudien im Normalrisikokollektiv</i>				
Nicolaides et al. [13]	1939	0 % (0)	8	100 % (8)
Song et al. [70]	1733	0 (0)	8	100 % (8)
Dan et al. [71]	10916	0,009 % (1)	139	100 % (8)

**Tab. 2** Testgüte pränataler Screeningverfahren auf Trisomie 21. Vorausgesetzt wird ein Screening in der gesamten Bevölkerung und eine altersunabhängige Prävalenz der Trisomie 21 von 1:500 [72, 73].<sup>1</sup>

Screeningverfahren	Detektionsrate	Falsch-Positiv-Rate	Anteil Trisomie-21-Fälle in der Screenpositiv-gruppe
mütterliches Alter $\geq 35$ Jahre	~50 %	25 %	1:251
Triple-Test	~58 %	3 %	1:27
Quadruple-Test	~64 %	3 %	1:24
kombiniertes ETS	~86 %	3 %	1:18
NIPT	~99 %	0,1 %	1,5:1

<sup>1</sup> Triple-Test: AFP, freies beta-hCG und freies Estriol, Quadruple-Test: AFP, freies beta-hCG, freies Estriol und Inhibin A, Kombiniertes ETS: mütterliches Altersrisiko, fetale Nackentransparenz, freies b-hCG und PAPP-A.

Insofern sollte NIPT als sehr guter Screeningtest, nicht aber als diagnostischer Test verstanden werden. Im Falle eines auffälligen Ergebnisses ist eine weitere invasive Abklärung erforderlich.

• **Tab. 2** zeigt die Detektions- und Falsch-Positiv-Raten weiterer Screeningtests im Vergleich.

### Screening auf Trisomie 18 und 13

Im Screening auf Trisomie 18 und 13 mittels NIPT muss berücksichtigt werden, dass jeder zusätzliche Test die Gesamt-FPR erhöht. Insofern kommt der sonografischen Beurteilung eine besondere Bedeutung zu, da fast jeder Fet mit einer entsprechenden Chromosomenstörung bereits im ersten Trimenon wegweisende Fehlbildungen aufweist [17]. Aussagekräftige Studien zum Screening auf Trisomie 18 und 13 mittels NIPT in einem Normalkollektiv liegen noch nicht vor. Die Tests erreichen aber auch im Risikokollektiv trotz einer besonderen Nukleotidbindung (GC-Adjustierung) noch nicht die Testgüte des Trisomie-21-Screenings. Palomaki, Ashoor und Norton et al. untersuchten insgesamt 147 Feten mit Trisomie 18. Die Detektionsrate lag bei 98,6% bei einer zum Screening auf Trisomie 21 zusätzlichen Falsch-Positiv-Rate von 0,1% [18–20]. Im Screening auf Trisomie 13 berichteten Palomaki und Ashoor et al. von insgesamt 22 Fällen, von denen 19 (86,4%) korrekt identifiziert wurden. Die Falsch-Positiv-Rate lag jedoch bei etwa 0,5% [20, 21].

### NIPT in der klinischen Anwendung

In Deutschland sind derzeit LifeCodexx, Natera und Ariosa mit den Produkten PraenaTest, Panorama und Harmony vertreten. Der PraenaTest war 2012 als erster verfügbar und war daher Anstoß zahlreicher politischer, gesellschaftlicher und gesundheitspolitischer Diskussionen. Durch die zusätzlichen Anbieter, deren Produkte seit letztem Jahr kommerziell verfügbar sind, ist das Preisgefüge erheblich in Bewegung geraten. Wie weit die Preise weiter gesenkt werden können oder ob es eher zu einer Erweiterung des Untersuchungsspektrums kommen wird, bleibt abzuwarten. Neben den Laborkosten müssen auch die Kosten für die ärztliche Beratung, das eventuell vorgeschaltete Ersttrimester-screening (ETS) und die Blutabnahme berücksichtigt werden. Bei Veranlassung der NIPT-Untersuchung in Deutschland müssen die Bestimmungen des GenDG berücksichtigt werden. Entsprechend des GenDG stellt die NIPT-Untersuchung eine genetische Analyse im Rahmen einer vorgeburtlichen genetischen Untersuchung und keine vorgeburtliche Risikoabklärung dar. Entgegen der medizinischen Vorstellung einer Screeninguntersuchung orientiert sich der Gesetzgeber nicht an der Testgüte der angewandten Untersuchung, sondern stellt das untersuchte Material in den Mittelpunkt. Als genetische Probe wird das biologische Material beschrieben, das zur Verwendung für genetische Analysen vorgesehen ist. Gleichzeitig wird die genetische Analyse definiert als eine auf die Feststellung genetischer Eigenschaften gerichtete Analyse der molekularen Struktur der Desoxyribonukleinsäure [22].

Das Ergebnis muss an die verantwortliche ärztliche Person übermittelt werden. Der betreuende Arzt ist verpflichtet, über die Testgüte der NIPT-Untersuchung und das Ergebnis aufzuklären und zu beraten. Besonders betont werden sollte, dass im Durchschnitt aller mütterlichen Altersgruppen nur die Hälfte aller Feten mit einer Chromosomenstörung eine Trisomie 21 haben, und dass Chromosomenstörungen nur für etwa 10% aller Entwicklungsstörungen verantwortlich sind [23].

Es ist anzunehmen, dass NIPT vor allem im ersten Trimenon Anwendung finden wird [24]. Natürlich könnte der Test auch zu einem späteren Zeitpunkt in der Schwangerschaft durchgeführt werden, zum Beispiel nach einer auffälligen feindiagnostischen Untersuchung im zweiten Trimenon. Der Wunsch der Patientinnen nach frühzeitiger Risikobeurteilung hat aber durch das ETS einen so hohen Stellenwert erlangt, dass NIPT vor allem in dieser Zeit von Bedeutung sein wird [25].

Die FMF Deutschland spricht sich dabei für einen indikationsbezogenen Einsatz der NIPT-Untersuchung aus [26–29]. Die Deutsche Gesellschaft für Humangenetik weist in der Stellungnahme vom 12.11.2012 ausdrücklich darauf hin, „dass die Untersuchung keiner Schwangeren vorenthalten werden kann, bzw. allen Schwangeren verfügbar gemacht werden sollte“ [30].

Da die NIPT-Untersuchung gegenwärtig als IGeL-Leistung angeboten wird, ist der Einsatz aufgrund der Kosten eher überschaubar. Auch für staatliche Gesundheitssysteme, wie in Großbritannien sind die Kosten der NIPT-Untersuchung noch zu hoch [31]. Selbst unter Berücksichtigung der abnehmenden Geburtenrate von Kindern mit Trisomie 21 durch die höhere Testgüte des NIPT-Ansatzes und der konsekutiv abnehmenden Folgekosten der medizinischen Versorgung der Kinder, die sich in den USA auf etwa \$940 000 pro Kind belaufen, ist das alleinige Screening mittels NIPT nicht finanzierbar [31]. Dies wird sich sicher mit zunehmender Konkurrenz, billigeren Analysegeräten und selektiveren Auswertungsalgorithmen in den kommenden Jahren

ändern. Bis dahin bietet sich eine Kombination mit dem kombinierten ETS an, da dieses weitgehend flächendeckend verfügbar ist und deutlich günstiger angeboten wird.

Dem ETS kommt dabei eine Triagefunktion für die NIPT-Untersuchung in einer spezifischen Subgruppe zu: auf der Basis des ETS kann das Trisomie-21-Risiko in drei Gruppen (hoch – intermediär – niedrig) eingeteilt werden [32 – 34].

In der Hochrisikogruppe, die sich dadurch definiert, dass Fehlbildungen vorliegen, die fetale Nackentransparenz deutlich erhöht oder die PAPP-A-Konzentration deutlich verringert ist, scheint die NIPT-Untersuchung nicht ausreichend, da auch das Risiko für andere derzeit nicht durch NIPT erkennbare, aber klinisch relevante Chromosomenstörungen im Vergleich zum Intermediär- und Niedrigrisikokollektiv ansteigt.

Petersen et al. präsentierten beim FMF-Weltkongress 2013 bisher nicht publizierte Daten von 193 638 ETS-Untersuchungen zwischen 2008 und 2011 in Dänemark. Bei 10 205 Fällen wurde prä- und postnatal oder am Abortgewebe eine Karyotypisierung durchgeführt. Von den 1122 aneuploiden Fällen lagen bei 72,6% eine Trisomie 21, 18, 13 oder eine geschlechtschromosomale Aberration vor. Atypische aber klinisch relevante Chromosomenstörungen wurden bei 262 Untersuchungen gefunden. Bei einem Risiko nach ETS für Trisomie 21 von 1:50 oder höher wurde bei 1,7% der Fälle – bzw. 7,4% der aneuploiden Fälle – eine atypische Chromosomenstörung gefunden. Es könnte argumentiert werden, dass die meisten bisherigen Studien zum NIPT im Risikokollektiv durchgeführt wurden, welches konkordant zur Hochrisikogruppe nach ETS ist. Die Studien wurden aber größtenteils als Fall-Kontroll-Studien durchgeführt, die nicht darauf abzielten, den Anteil andersartiger Chromosomenstörungen zu bestimmen. Daher sollte in diesen Fällen eher eine invasive Diagnostik erwogen werden.

Das Niedrigrisikokollektiv scheint ebenfalls für die weitere Abklärung mittels NIPT ungeeignet, da die Prävalenz der Trisomie 21, 18 und 13 in diesem Kollektiv niedriger ist als viele nicht mittels NIPT erkennbare Chromosomenstörungen. Insofern würde sich die Patientin diesbezüglich in falscher Sicherheit wiegen.

Zudem fällt der positive Vorhersagewert der NIPT-Untersuchung mit sinkender Prävalenz der Erkrankung. So liegt er bei einem ETS-Risiko von 1:2000 bei nur noch 33%.

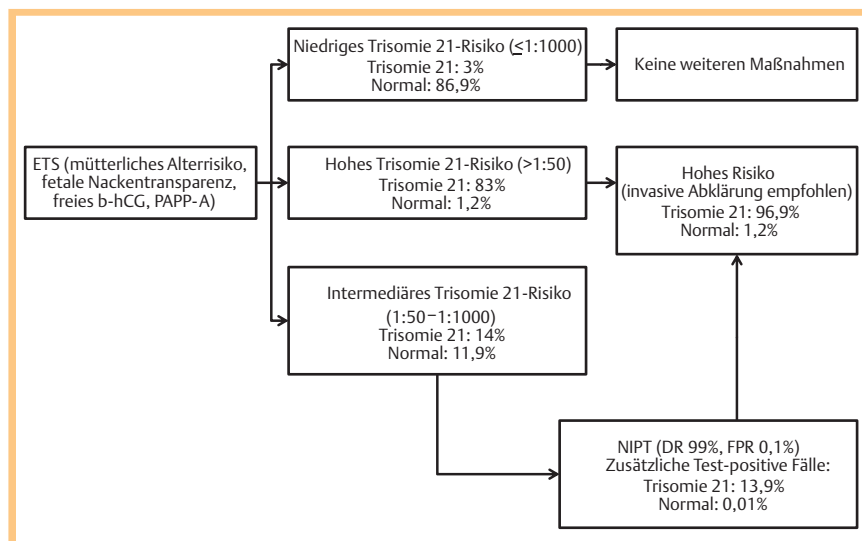
In der Intermediärrisikogruppe könnte eine weiterführende NIPT-Untersuchung sinnvoll sein. Die FMF Deutschland verwen-

det die Schwellenwerte 1 in 150 und 1 in 500, die der FMF UK liegen bei 1 in 50 und 1 in 1000 [33, 35 – 37]. Diese Gruppe umfasst beispielsweise die Patientinnen, die aufgrund des erhöhten mütterlichen Alters trotz unauffälliger ETS-Ergebnisse ein Risiko im Intermediärbereich erhielten oder bei denen grenzwertige Risikomarker auffielen. Das bisherige Zweistufen-Modell oder Contingentscreening beinhaltet die Überprüfung des Nasenbeins, des Ductus venosus und des Trikuspidalklappenflusses [35 – 37]. Anstelle dieser Ultraschallmarker, die eine hohe Expertise erfordern, könnte die NIPT-Untersuchung folgen.

• **Abb. 1** zeigt die Verteilung der ETS-Risiken bei euploiden und Trisomie-21-Schwangerschaften und die theoretische Testgüte bei zusätzlicher Verwendung der NIPT im Intermediärrisikokollektiv [38]. Zur Abgrenzung der Risikogruppen wurden die Schwellenwerte der FMF UK verwendet. Die Restriktion der NIPT für dieses Subkollektiv, welches etwa 12% der Bevölkerung umfasst, könnte NIPT kosteneffektiv und somit auch für Krankenkassen interessant werden lassen [39]. Die theoretische Detektions- und Falsch-Positiv-Rate läge bei 97 und 1,2%. Kritisch anzumerken ist, dass in dieser Modellrechnung nicht berücksichtigt wurde, dass 5% der Untersuchungen zunächst ergebnislos bleiben.

Sollte sich der Preis der NIPT tatsächlich so deutlich reduzieren, dass der Test allen Patientinnen angeboten werden kann und die Triagefunktion des ETS diesbezüglich nicht mehr notwendig ist, könnte die Untersuchung auch vor dem Zeitfenster des ETS angesiedelt werden. Der Ansatz hätte den Vorteil, dass zum Zeitpunkt des ETS die Risikobeurteilung in Hinblick auf Trisomie 21, 18 und 13 bereits durchgeführt ist, und der Fokus auf die Feindiagnostik, ggf. andere Chromosomenstörungen und vor allem auf die Prädiktion und Prävention von typischen Schwangerschaftskomplikationen gerichtet werden könnte, deren Prävalenz deutlich höher ist als die der Trisomie 21 [40]. Von Nachteil wäre aber, dass ein Teil der Patientinnen die weitere Abklärung eines auffälligen Befundes ablehnen und stattdessen direkt den Schwangerschaftsabbruch über die Fristenregelung wählen würden. Zudem ist durch die (zu) frühe Testung mit einer höheren Detektion von aneuploiden Schwangerschaften zu rechnen, die in den kommenden Wochen mit einer Fehlgeburt geendet hätten.

Dem ETS wird auch zukünftig eine zentrale Bedeutung in der Schwangerschaft zukommen, wobei vor allem die Optimierung der Schwangerschaftsbetreuung und der frühzeitige Ausschluss fetaler Fehlbildungen an Bedeutung gewinnen wird.



**Abb. 1** Screening auf Trisomie 21 mittels kombiniertem ETS bestehend aus dem mütterlichen Altersrisiko, der fetalen Nackentransparenz, den Serumparametern freies beta-hCG und PAPP-A und NIPT. Das Screeningkonzept basiert darauf, dass zunächst bei allen Patientinnen ein ETS durchgeführt wird. Bei einem hohen Trisomie 21-Risiko wird eine invasive Abklärung empfohlen, bei einem niedrigen Risiko erfolgen keine weiteren Maßnahmen. Nur bei einem intermediären Risiko wird eine NIPT-Untersuchung durchgeführt.



Das Screening auf Chromosomenstörungen wird hingegen langfristig durch die NIPT-Untersuchung abgelöst. Das ETS auf Chromosomenstörungen wird nur noch für eine Subgruppe eine Rolle spielen, zum Beispiel für Patientinnen, deren Konzentration an cfDNA im maternalen Blut zu gering ist [41].

Dem betreuenden Arzt wird die Aufgabe zukommen, zu prüfen, ob Fehlbildungen oder Hinweiszeichen erkennbar sind, die das Risiko sonstiger Chromosomenstörungen erhöhen. Bei Vorliegen von Fehlbildungen, wie zum Beispiel eines Herzfehlers oder einer Omphalocele, kann die mögliche Bandbreite chromosomaler Aberrationen durch einen alleinigen Test auf Trisomie 21, 18 und 13 nicht abgedeckt werden. Für diese Fälle ist auch weiterhin die Karyotypisierung ggf. mit einer CGH-Array-Untersuchung das Mittel der Wahl. Hier obliegt es dem Arzt, der die NIPT-Untersuchung in Auftrag gibt, sicherzustellen, dass eine qualifizierte Ultraschallbeurteilung durchgeführt wurde [42].

Auch sind zahlreiche weitere Screeningalgorithmen zum Zeitpunkt des ETS verfügbar, unter anderem auf Präeklampsie, Frühgeburt und Gestationsdiabetes – Erkrankungen, deren Prävalenz deutlich höher ist als diejenige der Trisomie 21 [43, 44]. Für diese Screeninguntersuchungen gewinnen andere Serumparameter wie PlGF, AFP und Adiponectin anstelle oder in Ergänzung des freien beta-hCGs und PAPP-A an Bedeutung [45]. Ob die Konzentration der cfDNA auch ein Hinweis auf ein adverses Schwangerschafts-Outcome sein könnte, wird kontrovers diskutiert [46, 47].

### Limitationen der NIPT-Methodik



#### Mindestkonzentration an cfDNA

Bei etwa 5 % der Schwangerschaften bleibt die NIPT-Untersuchung zunächst ergebnislos, da die notwendige Mindestkonzentration an cfDNA im mütterlichen Blut von 4 % unterschritten wird. Entscheidendes Kriterium für die Konzentration der cfDNA stellt das mütterliche Gewicht dar: bei einem mütterlichen Gewicht von 100 kg ist bei etwa 7 % der Untersuchungen keine ausreichende cfDNA-Konzentration zu erwarten. Im Gegensatz dazu liegt dieser Anteil bei 0,3 % bei einem Körpergewicht von 50 kg [41]. Des Weiteren wird die cfDNA-Konzentration durch die Ethnizität, den Raucherstatus, den Karyotyp und durch die PAPP-A und beta-hCG-Konzentration beeinflusst [41]. Das Gestationsalter scheint nur einen kleinen Einfluss zu haben, da die Menge an cfDNA zwischen der 10. und 21. SSW nur etwa 0,1 % pro Woche ansteigt [20, 48]. Bei Unterschreiten der Mindestkonzentration kann eine aufwändige Re-Analyse derselben Probe erfolgen. In etwa 3 % der Fälle ist eine neue Blutprobe notwendig.

Die Konzentration an cfDNA im mütterlichen Blut kann auch als Qualitätsparameter für die Aussagekraft der NIPT gewertet werden. Bei abnehmender Konzentration an cfDNA nimmt die Messgenauigkeit der „massively“ oder „targeted parallel sequencing“-Verfahren ab. Ursächlich ist eine zunehmende Streuung der Messwerte mit konsekutiver Erhöhung der Standardabweichung. Da die z-Werte ein Mehrfaches der Standardabweichung darstellen, werden diese bei niedriger cfDNA-Konzentration geringer ausfallen wodurch die Diskriminierungsfähigkeit des Tests abfällt. Neben dem Einfluss auf die z-Werte kann die cfDNA-Konzentration auch als Qualitätsparameter an sich gesehen werden. Carnick et al. berichteten von 4 von 212 Fällen mit Trisomie 21, die z-Werte unter 3,0 aufwiesen. In diesen Fällen lag die cfDNA-Konzentration zwischen 4 und 7 % [49].

### Diskordante Befunde zwischen cfDNA und invasiver Diagnostik

Die ersten „proof of principle“-Studien in Fall-Kontroll-Serien ergaben eine annähernd 100% Trennschärfe in Hinblick auf Trisomie 21. In den Folgestudien ist zu erwarten, dass die Trennschärfe etwas abnehmen wird [50]. Ursächlich sind plazentare, maternale und fetale Mosaik, ehemalige Zwillingsschwangerschaften mit einem vanishing twin und diskordantem Karyotyp, Laborfehler aufgrund der technisch anspruchsvollen Aufarbeitung und auch mütterliche Vorerkrankungen. So beschrieben Osborne et al. einen Fall mit einer gleichzeitigen Trisomie 18 und 13 bei einem sonomorphologisch normalen und konsekutiv gesund geborenen Feten. Die nachgeburtliche Aufarbeitung ergab ein metastasiertes kleinzelliges Plattenepithelkarzinom vaginalen Ursprungs bei der Mutter [51].

### Mehrlinge

Analog zu der Befürchtung, dass das Serumscreening bei Zwillingen nicht über die Trennschärfe von Einlingsschwangerschaften verfügt, ist auch der Einsatz der cfDNA bei Mehrlingsschwangerschaften umstritten. Dennoch ist NIPT bei Gemini bereits heute kommerziell verfügbar. Aussagekräftige Studien liegen jedoch noch nicht vor. In einer Serie von 189 Zwillingsschwangerschaften, darunter neun Schwangerschaften mit Trisomie 21, berichteten Huang et al., dass sie alle euploiden und aneuploiden Schwangerschaften korrekt klassifizieren konnten [52].

### Zukünftige Anwendungs- und Entwicklungsbereiche



#### Andere Chromosomenstörungen

Grundsätzlich ist es möglich, den gesamten Karyotyp mittels NIPT zu erheben. Liang et al. untersuchten bei 435 Schwangerschaften, darunter Schwangerschaften mit Trisomie 21, 18 und 13 sowie geschlechtschromosomale Aberrationen und einem Fall mit einer Trisomie 9, und konnten bei einer Falsch-Positiv-Rate von 0,3 % alle auffälligen Schwangerschaften korrekt identifizieren [53]. Natürlich sind auch hier die Fallzahlen noch nicht ausreichend genug, um eine generalisierende Aussage zu treffen. Ein Problem der Austestung aller Chromosomen könnte die höhere Falsch-Positiv-Rate darstellen.

Die pränatale Bestimmung von gonosomalen Chromosomenstörungen ist umstritten, da außer bei einem Turner-Syndrom mit Hygroma colli, welches sonografisch erkannt wird, das Outcome so gut sein kann, dass eine pränatale Testung nicht gerechtfertigt ist.

Bei X-chromosomal vererbten Syndromen kann die Bestimmung der Geschlechtschromosomen aber von großer Bedeutung sein. Mazloom et al. führten eine NIPT-Untersuchung bei 1450 euploiden Schwangerschaften durch und berichteten, dass bei acht (0,6 %) Feten das Geschlecht nicht korrekt erkannt und bei vier (0,3 %) eine Chromosomenstörung vermutet wurde. Die 19 gonosomalen Chromosomenstörungen wurden alle identifiziert [54]. Grundsätzlich sind für die Beurteilung der Geschlechtschromosomen in größeren Studien schlechtere Ergebnisse zu erwarten. Dies ist auf den hohen Anteil von Mosaiken zurückzuführen. So ist zum Beispiel bei 45,X/47,XXX eine ausreichende Menge an cfDNA, die dem X-Chromosom zuzuordnen ist, zu erwarten. Zum anderen ist der maternale Anteil der zellfreien DNA, die dem X-Chromosom zugeordnet wird, nicht konstant und kann mit zunehmendem Alter abnehmen [55]. Konsekutiv wird der fetale Anteil überschätzt und gegebenenfalls für pathologisch er-

achtet. Aufgrund des methodischen Ansatzes des massively parallel sequencing stellt die Triploidie ein Problem dar. Triploidien mit einem 69,XXX-Karyotyp werden bei einem Vergleich der DNA-Mengen, die jedem Chromosomen zugeordnet werden können, nicht auffallen. Triploidien mit einem 69,XXY-Karyotyp könnten durch ein auffälliges Verhältnis zwischen X- und Y-DNA-Menge erkennbar werden. Über Polymorphismen ist die Diagnosestellung aber möglich [56]. In der täglichen Praxis ist diese Fragestellung aber aufgrund der geringen Prävalenz, der hohen intrauterinen Mortalität und dem charakteristischen Ultraschallbild von untergeordneter Bedeutung.

### Whole genome sequencing

Neben der Beurteilung numerischer Chromosomenstörungen lässt sich durch die Beurteilung der cffDNA das gesamte Genom entschlüsseln.

Dies ist den Arbeitsgruppen von Kitzman und Fan et al. unter enormem finanziellen und zeitlichen Aufwand in der Schwangerschaft gelungen [6, 16]. Chen et al. konnten mit einer weiterentwickelten Methodik eine Sequenzierung in der 13+ SSW innerhalb einer Woche ermöglichen [57]. Grundsätzlich könnte mittels whole genome sequencing somit die gesamte invasive Diagnostik durch die cffDNA-Diagnostik ersetzt werden. Es muss aber einschränkend erwähnt werden, dass die NIPT-Untersuchung als Screeningtest verstanden wird und nicht dieselbe Sicherheit wie die Analyse von invasiv gewonnener DNA besitzt. Insofern ist unter klinischen Fragestellungen nicht abzusehen, dass die NIPT-Untersuchungen die invasiven Ansätze ersetzen. Zudem bleibt der postnatale Phänotyp selbst nach Aufschlüsselung des gesamten Genoms variabel. Verantwortlich dafür ist unter anderem eine Reihe von Genvarianten, deren klinische Relevanz noch nicht geklärt ist. Die Einschätzung epigenetischer Steuermechanismen steht ebenfalls erst am Anfang.

### Screening auf Mikrodeletionen und -duplikationen

Auch wenn in Zukunft die frühzeitige Entschlüsselung der gesamten fetalen DNA preislich und zeitlich als auch zeitlich realisierbar sein könnte, ist doch die Beurteilung größerer DNA-Abschnitte zeitnah umsetzbar. Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung von cffDNA-Tests auf Mikrodeletionen, die in der Größenordnung von 2–5 Megabasen wie z. B. DiGeorge- und Prader-Willi-Syndrom und damit unterhalb der durch klassische Karyotypisierung erfassbaren Dimension liegen. Auch Tests auf Wolf-Hirschhorn- und Cri-du-chat-Syndrom mit 4–20 Megabasen sind in naher Zukunft verfügbar, die nur in etwa zwei Drittel der Fälle zytogenetisch erfassbar sind. Der Nachweis der Durchführbarkeit von Tests auf Strukturanomalien oberhalb von 10 Mb Größe konnte geführt werden [58]. Erkrankungen wie Noonan-Syndrom, denen eine Vielzahl unterschiedlicher Mutationen zugrunde liegen können, werden der cffDNA-Diagnostik nur partiell zugänglich sein. Kritisch anzumerken ist, dass die Prävalenz einiger dieser Erkrankungen (z. B. Cri-Du-Chat 1:50.000) so niedrig ist, dass mit einer hohen Anzahl an falsch-positiven Testergebnissen gerechnet werden muss. Dies steht im Gegensatz zur Intension eines Screeningtests eine möglichst hohe Trennschärfe aufzuweisen.

### Vereinfachung der Methodik

Eine Vereinfachung des „massively parallel sequencing“-Verfahrens ist Gegenstand aktueller Forschung: Bei der digitalen PCR werden auf dem Wege intensiver Verdünnungsreihen die für die jeweilige Diagnostik relevanten DNA-Fragmente separiert und amplifiziert. Diese vom Ansatz her geeignete Methode zur Quan-

tifizierung von DNA-Stücken ist grundsätzlich zur nicht-invasiven Diagnostik monogener Erkrankungen gut geeignet [59]. Eine alternative Methodik stellt die Untersuchung der epigenetischen Unterschiede zwischen fetaler DNA und mütterlicher DNA dar. Über die Epigenetik wird die Expression von Genen reguliert, was unter anderem über eine unterschiedliche Methylierung von genomischer DNA erfolgt. Hypermethylierung in bestimmten Genabschnitten führt zur Inaktivierung und Hypomethylierung zur Aktivierung der Genexpression. 2002 wurde erstmalig über Methylierungsunterschiede zwischen fetaler und mütterlicher DNA berichtet [60]. Papageorgiou et al. zeigten, dass spezifische hypermethylierte Regionen beim Feten angereichert werden können (MeDIP). In Kombination mit der quantitativen PCR für Gene, die auf Chromosom 21 liegen, konnte so ein neuer Ansatz zur nicht-invasiven Diagnostik der Trisomie 21 aufgezeigt werden [61, 62]. Auch die auf der Bestimmung von RNA basierenden Methoden zielen auf den Nachweis hypomethylierter, nur im Feten exprimierter Gene ab, haben jedoch bislang noch nicht den Weg in die klinische Anwendung gefunden [18].

Durch die Extraktion fetaler Zellen aus dem mütterlichen Kreislauf könnte das kindliche Erbgut direkt beurteilt werden. Dies hätte den Vorteil, dass nicht die zellfreie DNA placentaren Ursprungs, sondern direkt Zellen fetalen Ursprungs beurteilt werden könnte. Zudem wäre die Analyse der Erbinformation intakter fetaler Zellen erheblich einfacher, als die Beurteilung der stark fragmentierten cffDNA, wodurch sich auch das Spektrum der Untersuchungen nochmals erweitern würde. Dieser Ansatz wurde in den 90er-Jahren verfolgt, dann aber aufgrund methodischer Probleme wieder verlassen. Derzeit versucht CellScape diesen Ansatz erneut zu etablieren, wobei diesbezügliche Studien und eine Validierung bisher fehlen [63].

### Ethisch-moralische Aspekte der NIPT



Neben den enormen Möglichkeiten, die sich aus dem technischen Fortschritt ergeben, und dem Vorteil, invasive Eingriffe mit entsprechendem Fehlgeburtsrisiko auf ein Minimum zu reduzieren, birgt die Methode auch die Gefahr, dass die Einstellung der werdenden Eltern zu Kindern mit einer Entwicklungsstörung – welcher Art auch immer – negativ beeinflusst wird [64, 65]. Die Befürchtungen, die in Hinblick auf die Anwendung der NIPT-Untersuchung geäußert werden, sind nicht spezifisch und auch nicht neu. So ändert sich schlussendlich nur der Zugang zur fetalen DNA, die vormals mittels invasiver Diagnostik gewonnen wurde. Die entsprechenden Tests stehen auch heute bereits zur Verfügung und werden gezielt durchgeführt.

Durch die in der Schwangerschaft sehr frühe Zugänglichkeit zu den Testverfahren, der aus Patientinnensicht sehr einfachen Durchführbarkeit, den unzähligen möglichen Tests und der Globalisierung der Medizin werden wir zukünftig mit neuen ethisch-moralischen Fragen konfrontiert sein [66]. Die Problematik wird insbesondere dadurch verstärkt, dass die Testergebnisse noch vor Ablauf der Frist für einen Schwangerschaftsabbruch nach Beratungsregel vorliegen werden.

Es gilt natürlich auch die enormen Vorteile der cffDNA-Analyse hervorzuheben. So kann bei vorangegangener Erkrankung des ersten Kindes zum Beispiel mit zystischer Fibrose bereits vor der 10. SSW in der Folgeschwangerschaft eine Wiederholung ausgeschlossen werden. Die frühzeitige Beruhigung des Paares, ohne das Risiko einer invasiven Diagnostik auf sich zu nehmen, ist offensichtlich. Einzelne experimentelle Ansätze zielen auf eine Er-

höhung des IQs bei Trisomie 21 durch pränatal angewandte Antioxidantien wie zum Beispiel Apigenin, womit in ferner Zukunft gegebenenfalls auch die frühzeitige Austestung begründet werden könnte [67].

Das Gendiagnostikgesetz kann in Deutschland durch die Beratungsverpflichtung eine gewisse Hürde für die unkontrollierte Verwendung von NIPT-Untersuchungen darstellen. Für die Patientin stellt die Untersuchung aber nur eine Blutabnahme bzw. Blutprobe dar, die über Nacht in ein Land mit anderen gesetzlichen und ethischen Voraussetzungen versandt werden kann [68]. Es ist mehr als fraglich, ob Analyseanforderungen aus nicht ärztlicher Hand von den entsprechenden Anbietern im Ausland abgelehnt werden.

Dieser „Business to Consumer-Zugang“ einer genetischen Analyse ist neu und wirft viele Fragen auf. Ein Verbot wie vormals bei der Präimplantationsdiagnostik ist dabei aufgrund der Simplizität der Probengewinnung nicht zielführend, da nicht einmal ein Patiententourismus ins Ausland notwendig ist. Schlussendlich wird die aufgeklärte Patientin selbst entscheiden, ob sie die Analysemöglichkeiten, die ihr vor Ort angeboten werden, annehmen möchte, oder ob sie die Probe zu einem Anbieter im Ausland sendet, der sich durch eine spezielle Analyse oder durch einen besonders niedrigen Preis auszeichnet. Der verantwortungsvolle Umgang wurde auch bei Einführung vorangegangener technischer Verbesserungen wie zum Beispiel dem ETS angemahnt. Der betreuende Arzt steht in der Verpflichtung, seiner Patientin die Möglichkeiten und Grenzen der NIPT-Untersuchungen aufzuzeigen. Die Gesellschaft muss sich dieses Themas annehmen, so dass das technisch Mögliche zumindest in Deutschland durch das gesellschaftlich Gewollte ummantelt wird.

## Danksagung

Wir danken Prof. Professor Bauer aus dem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik und Herrn Prof. Michael Ludwig aus der Amedes-Gruppe für ihre konstruktiven Anregungen.

## Literatur

- Holzgreve W, Garritsen HS, Ganshirt-Ahlert D. Fetal cells in the maternal circulation. *J Reprod Med* 1992; 37: 410–418
- Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn* 2002; 22: 609–615
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–487
- Lo YMD, Chan KCA, Sun H et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2010; 2 61ra91
- Lo YM, Tein MS, Lau TK et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768–775
- Fan HC, Gu W, Wang J et al. Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature* 2012; 487: 320–324
- Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 31–46
- Stumm M, Entezami M, Trunk N et al. Noninvasive prenatal detection of chromosomal aneuploidies using different next generation sequencing strategies and algorithms. *Prenat Diagn* 2012; 32: 569–577
- Sparks AB, Wang ET, Struble CA et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 2012; 32: 3–9
- Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011; 13: 913–920
- Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012; 119: 890–901
- Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *National Acad Sciences* 2008; 105: 20458–20463
- Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207: 374.e1–374.e6
- Dhallan R, Guo X, Emche S et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 2007; 369: 474–481
- 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* 2012; 32: 1233–1241
- Kitzman JO, Snyder MW, Ventura M et al. Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus. *Sci Transl Med* 2012; 4 137ra76
- Kagan KO, Staboulidou I, Syngelaki A et al. The 11–13-week scan: diagnosis and outcome of holoprosencephaly, exomphalos and megacystis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 36: 10–14
- Norton ME, Brar H, Weiss J 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 Gynecol* 2012; 207: 137.e1–8
- Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M et al. 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: 322.e1–5
- Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM et al. 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: 296–305
- Ashoor G, Syngelaki A, Wang E et al. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41: 21–25
- Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen (Gendiagnostikgesetz – GenDG). <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/gendg/gesamt.pdf> Aufgerufen am 7.12.2013
- Grati FR, Barlocco A, Grimi B et al. Chromosome abnormalities investigated by non-invasive prenatal testing account for approximately 50% of fetal unbalances associated with relevant clinical phenotypes. *Am J Med Genet* 2010; 152A: 1434–1442
- Fairbrother G, Johnson S, Musci TJ et al. Clinical experience of noninvasive prenatal testing with cell-free DNA for fetal trisomies 21, 18, and 13, in a general screening population. *Prenat Diagn* 2013; 33: 580–583
- Mulvey S, Wallace EM. Women's knowledge of and attitudes to first and second trimester screening for Down's syndrome. *BJOG: An International Journal of Obs Gyn* 2000; 107: 1302–1305
- Eiben B, Hall M, Ludwig M et al. Ein neuer nichtinvasiver Pränataltest. *Frauenarzt* 2013; 54: 768–770
- Eiben B, Thode C, Merz E. Nichtinvasive Pränataldiagnostik Serumtestsysteme zur Erfassung von Chromosomenanomalien. *Gynäkologie+Geburtshilfe* 2013; 18: 34–37
- Eiben B, Glaubitz R, Merz E. Trisomie-21-Analyse aus mütterlichem Blut. *Frauenarzt* 2012; 53: 834–835
- Tercanli S, Vial Y, Merz E. Nicht invasiver Chromosomentest wirft neue Fragen in der Pränataldiagnostik nach der Bedeutung des Ultraschalls und Fragen nach neuen Screeningstrategien auf. *Ultraschall in Med* 2013; 34: 417–420
- Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) zur Analyse fetaler DNA aus dem mütterlichen Blut. [http://www.gfhev.de/de/leitlinien/LL\\_und\\_Stellungnahmen/2012\\_11\\_12\\_GfH\\_Stellungnahme\\_Analyse\\_fetale\\_DNA.pdf](http://www.gfhev.de/de/leitlinien/LL_und_Stellungnahmen/2012_11_12_GfH_Stellungnahme_Analyse_fetale_DNA.pdf) Aufgerufen am 7.12.2013
- Cuckle H, Benn P, Pergament E. Maternal cfDNA screening for Down syndrome – a cost sensitivity analysis. *Prenat Diagn* 2013; 33: 636–642
- Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K et al. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; 25: 221–226



- 33 Merz E, Thode C, Eiben B et al. Individualized correction for maternal weight in calculating the risk of chromosomal abnormalities with first-trimester screening data. *Ultraschall in Med* 2011; 32: 33–39
- 34 Eiben B, Thode C, Merz E. Das Ersttrimesterscreening und die neue Risikoberechnungssoftware der Fetal Medicine Foundation Deutschland. *medgen Springer-Verlag* 2011; 23: 453–456
- 35 Kagan KO, Cicero S, Staboulidou I et al. Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11–13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 33: 259–264
- 36 Kagan KO, Valencia C, Livanos P et al. 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* 2009; 33: 18–22
- 37 Maiz N, Valencia C, Kagan KO et al. 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: 512–517
- 38 Kagan K, Hoopmann M, Kozlowski P. Assessment of Foetal DNA in Maternal Blood – A Useful Tool in the Hands of Prenatal Specialists. *Geburtsh Frauenheilk* 2012; 72: 998–1003
- 39 Kagan KO, Etcchegaray A, Zhou Y et al. Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 34: 14–18
- 40 Nicolaides KH, Chitty LS, Lau TK. editors A model for a new pyramid of prenatal care based on the 11 to 13 weeks' assessment. *Prenat Diagn* 2011; 31: 3–6
- 41 Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41: 26–32
- 42 Salomon LJ, Alfirevic Z, Bilardo CM et al. ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41: 102–113
- 43 Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Chitty LS, Lau TK. et al. editors Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11–13 weeks. *Prenat Diagn* 2011; 31: 66–74
- 44 Nanda S, Akolekar R, Sarquis R et al. Maternal serum adiponectin at 11 to 13 weeks of gestation in the prediction of macrosomia. *Prenat Diagn* 2011; 31: 479–483
- 45 Kagan KO, Hoopmann M, Abele H et al. First-trimester combined screening for trisomy 21 with different combinations of placental growth factor, free  $\beta$ -human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012; 40: 530–535
- 46 Poon LCY, Musci T, Song K et al. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagn Ther* 2013; 33: 215–223
- 47 Papantoniou N, Bagiokos V, Agiannitopoulos K et al. RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia. *Prenat Diagn* 2013; 33: 682–687
- 48 Wang E, Batey A, Struble C et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2013; 33: 662–666
- 49 Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Chitty LS, Bianchi DW. et al. editors The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 2013; 33: 667–674
- 50 Chitty LS. Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study. *BMJ* 2006; 332: 452–455
- 51 Osborne CM, Hardisty E, Devers P et al. Discordant noninvasive prenatal testing results in a patient subsequently diagnosed with metastatic disease. *Prenat Diagn* 2013; 33: 609–611
- 52 Huang X, Zheng J, Chen M et al. Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2013, Dec, in press
- 53 Liang D, Lv W, Wang H et al. Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing. *Prenat Diagn* 2013; 33: 409–415
- 54 Mazloom AR, Dzakula Z, Oeth P et al. Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2013; 33: 591–597
- 55 Abruzzo MA, Mayer M, Jacobs PA. Aging and aneuploidy: evidence for the preferential involvement of the inactive X chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 1985; 39: 275–278
- 56 Nicolaides KH, Syngelaki A, Del Mar GilM et al. Prenatal Detection of Fetal Triploidy from Cell-Free DNA Testing in Maternal Blood. *Fetal Diagn Ther* 2013, Oct, in press
- 57 Chen S, Ge H, Wang X et al. Haplotype-assisted accurate non-invasive fetal whole genome recovery through maternal plasma sequencing. *Genome Med* 2013; 5: 18
- 58 Chen S, Lau TK, Zhang C et al. A method for noninvasive detection of fetal large deletions/duplications by low coverage massively parallel sequencing. *Prenat Diagn* 2013; 33: 584–590
- 59 Evans MI, Wright DA, Pergament E et al. Digital PCR for noninvasive detection of aneuploidy: power analysis equations for feasibility. *Fetal Diagn Ther* 2012; 31: 244–247
- 60 Poon LLM, Leung TN, Lau TK et al. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 2002; 48: 35–41
- 61 Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsiliki E et al. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med* 2011; 17: 510–513
- 62 Kyriakou S, Kypri E, Spyrou C et al. Variability of fDNA in maternal plasma does not prevent correct classification of trisomy 21 using MeDIP-qPCR methodology. *Prenat Diagn* 2013; 33: 650–655
- 63 CellScape. [http://www.cellscapcorp.com/?page\\_id=1959](http://www.cellscapcorp.com/?page_id=1959) Aufgerufen am 12.7.2013
- 64 Skirton H, Patch C, Chitty LS, Bianchi DW. editors Factors affecting the clinical use of non-invasive prenatal testing: a mixed methods systematic review. *Prenat Diagn* 2013; 33: 532–541
- 65 Kelly SE, Farrimond HR. Non-invasive prenatal genetic testing: a study of public attitudes. *Public Health Genomics* 2012; 15: 73–81
- 66 Allyse MA, Sayres LC, Havard M et al. Best ethical practices for clinicians and laboratories in the provision of noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn* 2013; 33: 656–661
- 67 Guedj F, Bianchi DW. Noninvasive prenatal testing creates an opportunity for antenatal treatment of Down syndrome. *Prenat Diagn* 2013; 33: 614–618
- 68 Deans Z, Hill M, Chitty LS et al. Non-invasive prenatal testing for single gene disorders: exploring the ethics. *Eur J Hum Genet Nature Publishing Group* 2012; 21: 713–718
- 69 Ehrlich M, Deciu C, Zwiefelhofer T et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204: e1–e11
- 70 Song Y, Liu C, Qi H et al. Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat Diagn* 2013; 33: 700–706
- 71 Dan S, Wang W, Ren J et al. 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: 1225–1232
- 72 Cuckle H, Benn P, Wright D. Down Syndrome Screening in the First and/or Second Trimester: Model Predicted Performance Using Meta-Analysis Parameters. *Seminars in Perinatology* 2005; 29: 252–257
- 73 Wright D, Spencer K, Kagan KK et al. First-trimester combined screening for trisomy 21 at 7–14 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 36: 404–411