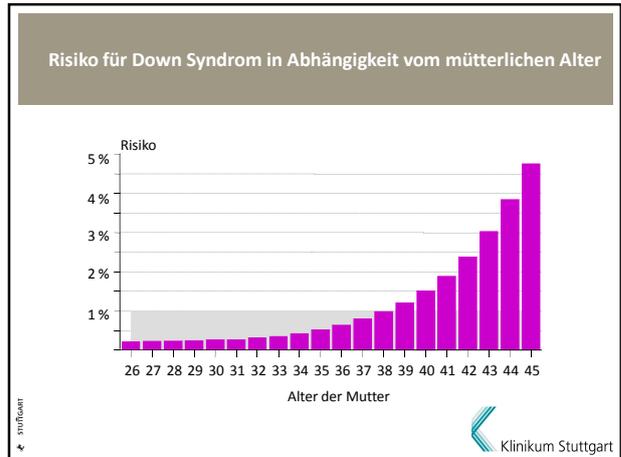


## Pränatale Diagnostik - gestern Forschung, heute Praxis, morgen Lifestyle?

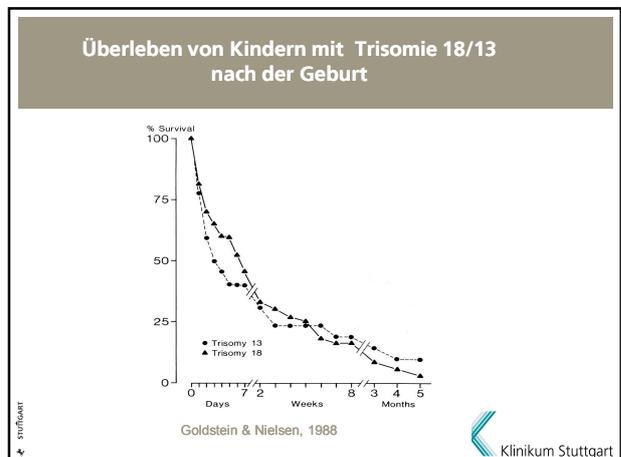
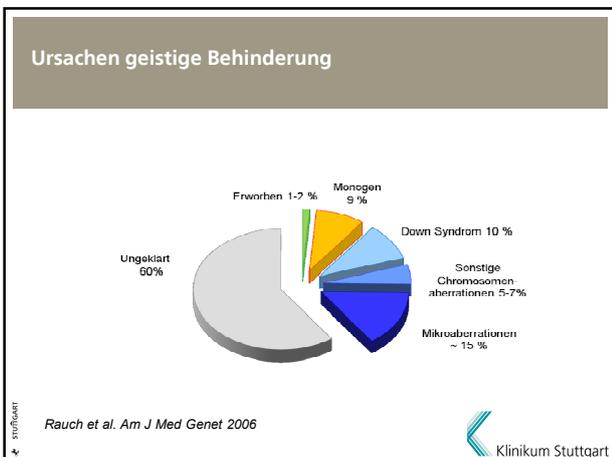
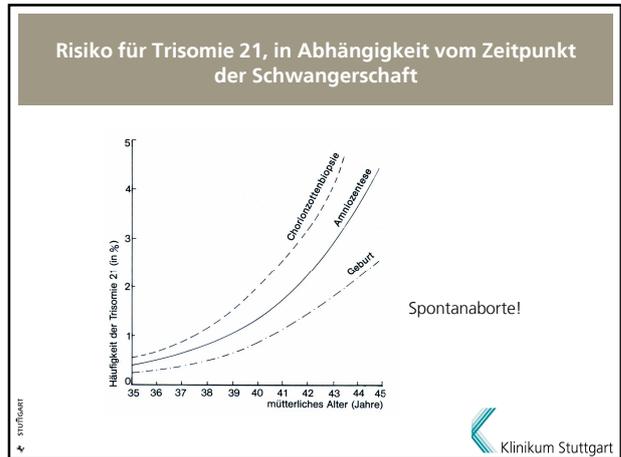
Deborah Bartholdi  
Klinische Genetik  
Olgahospital  
Klinikum Stuttgart  
[D.Bartholdi@Klinikum-Stuttgart.de](mailto:D.Bartholdi@Klinikum-Stuttgart.de)

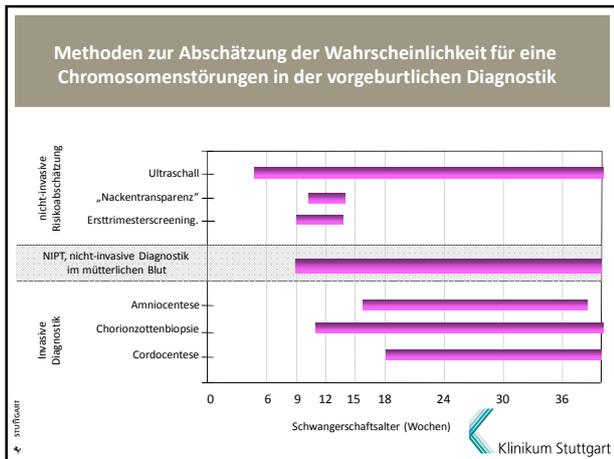
22.10.2013

## Themen

1. Einführung Pränataldiagnostik "state of the art"
2. Down Syndrom
3. Neue Technologien im Vormarsch
4. Forschungsansätze / Zukunft
5. Gesetzliche Grundlagen / Missbrauchspotential



### Punktionsrisiko....

Komplikationen

- kommen bei ca. 0,5-1% der Eingriffe vor
- größtenteils abhängig vom Erfahrungshintergrund des Punkteurs

Klinikum Stuttgart

### Vorgeburtliche invasive Diagnostikverfahren Chorionzottenbiopsie und Amniocentese

ab 11. SSW      ab 16. SSW

Klinikum Stuttgart

### Aufarbeitung der Proben nach invasiver Diagnostik

Zellen      Zellen      Zellkultur      Karyogramm

Klinikum Stuttgart

### Chordozentese (fetales Nabelschnurblut) ab 19. SSW

Diese Methode kommt nur bei spezifischen Fragestellungen zum Einsatz, z.B.

- kindliche Anämien
- Infektionen
- Mosaik in der vorgeburtlichen Chromosomenanalyse

Klinikum Stuttgart

### Chromosomenanalyse – Karyogramm - Karyotyp

47,XY,+21

Klinikum Stuttgart

### Pränatale Chromosomenanalyse, Goldstandard

**Vorteile**

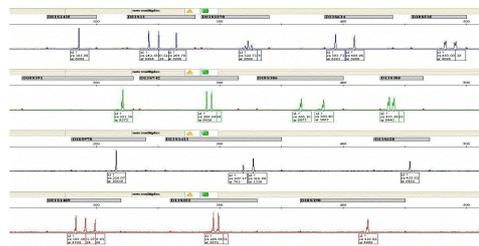
- ▶ Grosse Erfahrung mit Methode
- ▶ Hohe Erfolgsrate
- ▶ Screening-Verfahren

**Nachteile**

- ▶ Punktionsrisiko
- ▶ aufwändig, teuer
- ▶ lange Dauer
- ▶ limitierte Auflösung

Klinikum Stuttgart

### Schnelltest Mikrosatellitenanalyse (QF-PCR)



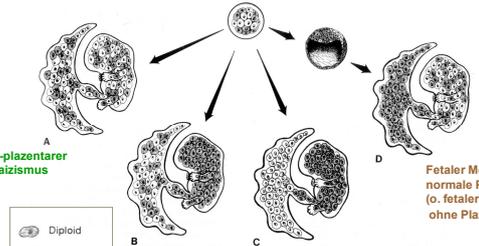
Klinikum Stuttgart

### Pränatale Chromosomenanalyse, Dauer

|                        | Ø          | Dauer  | min. |
|------------------------|------------|--------|------|
| ▶ Amniocentese         | 10-14 Tage | 7 Tage |      |
| ▶ Chorionzottenbiopsie | 10-14 Tage | 5 Tage |      |
| ▶ Fetales Blut         | 1 Woche    | 2 Tage |      |

Klinikum Stuttgart

### Wie sicher ist die Chromosomenanalyse? Spezielle Situation Mosaik



Klinikum Stuttgart

### Schnellmethoden zum Nachweis zahlenmäßiger Chromosomenstörungen

**Amniocentese**

- ▶ FISH
- ▶ QF-PCR

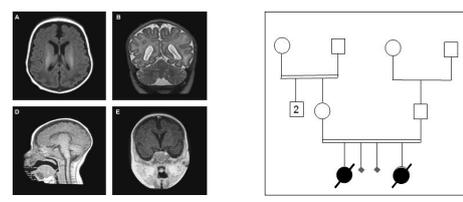
**Chorionzottenbiopsie**

- ▶ Direktpräparation

Dauer ca. 1-2 Tage

Klinikum Stuttgart

### Blutsverwandte Familie, Kinder mit unklassifiziertem Mikrocephaliesyndrom



Vorgeburtliche Diagnostik möglich?

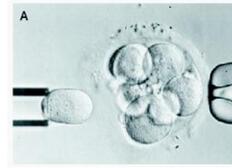
Klinikum Stuttgart

### Monogene Erkrankungen; mehr als 20,000 Erbanlagen im menschlichen Genom

| Number of Entries in OMIM                                 |           |          |          |               |        |
|---|-----------|----------|----------|---------------|--------|
| Prefix  | Autosomal | X Linked | Y Linked | Mitochondrial | Totals |
| - Gene description  | 13,109    | 641      | 48       | 35            | 13,833 |
| + Gene and phenotype, combined                            | 148       | 5        | 0        | 2             | 155    |
| + Phenotype description, molecular basis known            | 3,147     | 260      | 4        | 28            | 3,439  |
| + Phenotype description or locus, molecular basis unknown | 1,640     | 137      | 5        | 0             | 1,782  |
| Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis   | 1,787     | 127      | 2        | 0             | 1,916  |
| Totals  | 19,831    | 1,170    | 59       | 65            | 21,125 |

Solange ursächliche Genveränderung beim Indexpatienten nicht identifiziert wurde ist keine vorgeburtliche Diagnostik möglich

### Präimplantationsdiagnostik



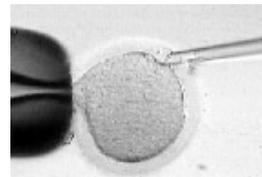
- Untersuchung für monogene Erkrankungen und Chromosomenstörungen (familiäre Translokation)
- Methode für alle Erbgänge geeignet
- z.Z. **nicht legal** in Deutschland

### Alternative zur Pränataldiagnostik: Präimplantationsdiagnostik (PID)

Definition:

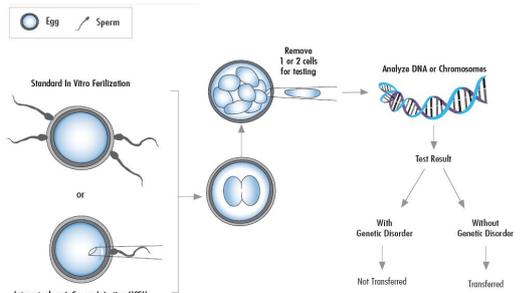
Selektion eines Embryos nach künstlicher Befruchtung, welcher das/die Krankheitsmerkmale nicht aufweist

### Polkörperdiagnostik



- Untersuchung des Polkörperchens bei der Reifeteilung der Eizelle („Abfallprodukt“)
- Methode kommt bei allen Erbgängen in Frage, bei denen die Mutter Anlageträgerin ist
- Methode ist in Deutschland **legal**

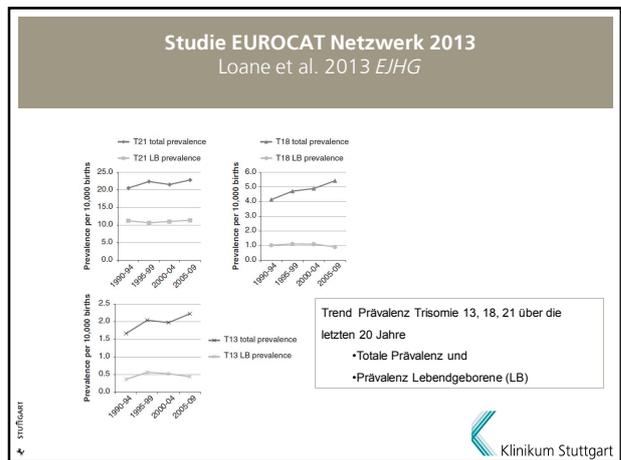
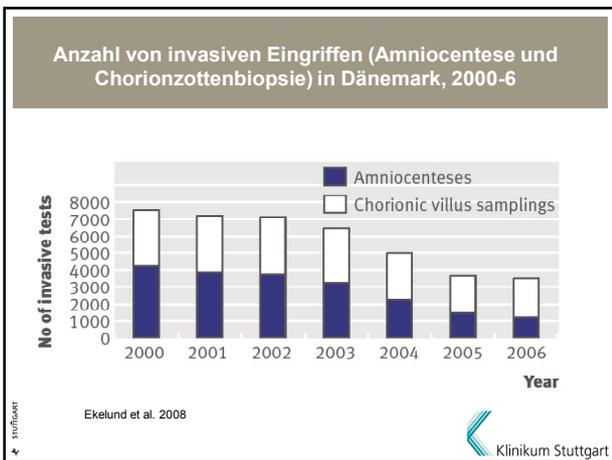
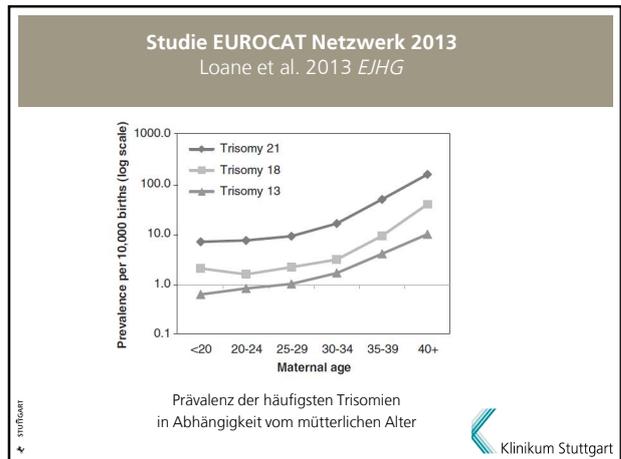
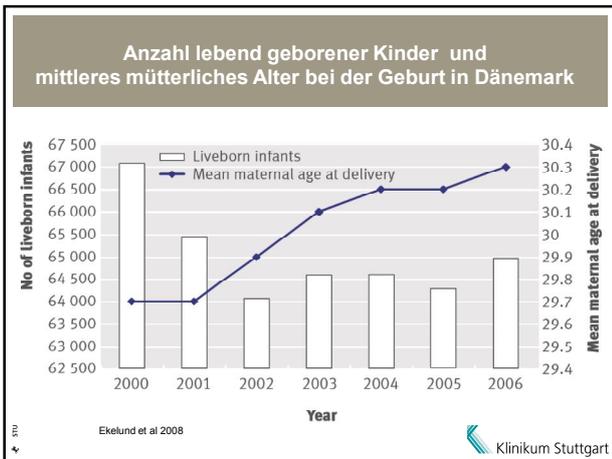
### Präimplantationsdiagnostik (PID)



Greenwood Center

### Präimplantationsdiagnostik Ethische Diskussion

- Unterschied zwischen PD und PID/Polkörperchendiagnostik ?
- Gefahr der Selektion (Geschlecht, HLA-Typen)?
- In mehreren europäischen Ländern erlaubt
- „Fortpflanzungstourismus“



### Hat der weitverbreitete Einsatz der vorgeburtlichen Diagnostik die Prävalenz von Chromosomenstörungen verändert ?

Beispiel Trisomie 21,13,18

### Studie EUROCAT Netzwerk 2013

Loane et al. 2013 *EJHG*

| Country           | Trisomy 21      |        |        |           |
|-------------------|-----------------|--------|--------|-----------|
|                   | Total cases (n) | LB (%) | FD (%) | TOPFA (%) |
| Austria: Styria   | 381             | 51.4   | 2.1    | 46.5      |
| Denmark: Odense   | 209             | 47.4   | 5.3    | 47.4      |
| France            | 2690            | 25.2   | 1.7    | 73.1      |
| Germany           | 559             | 50.5   | 2.9    | 46.7      |
| Ireland           | 1369            | 94.7   | 5.1    | 0.2       |
| Malta             | 166             | 99.4   | 0.6    | 0         |
| Norway            | 1043            | 70.2   | 1.7    | 28.1      |
| Poland:           | 515             | 99.6   | 0.4    | 0         |
| Wielkopolska      |                 |        |        |           |
| Spain             | 1357            | 32.6   | 0.8    | 66.6      |
| Switzerland: Vaud | 437             | 23.3   | 1.6    | 75.1      |
| Ukraine           | 195             | 86.7   | 1.5    | 11.8      |
| UK                | 4550            | 48.8   | 3.4    | 49.8      |
| Total             | 13471           | 50.5   | 2.6    | 46.9      |

Anzahl Schwangerschaften mit Trisomie 21  
 LB: Lebendgeborene  
 FD: Spontanborte  
 TOPFA: SS-Abbruch



**Microarray Analyse; Bsp. Mikrodeletion 22q11.2 bekanntes Fehlbildungssyndrom mit Herzfehler, Verhaltensauffälligkeiten, Immunschwäche**

Klinikum Stuttgart

**The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE**

ESTABLISHED IN 1812      DECEMBER 6, 2012      VOL. 367 NO. 23

**Chromosomal Microarray versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis**

Ronald J. Wapner, M.D., Christa Lese Martin, Ph.D., Brynn Levy, M.Sc.(Med.), Ph.D., Blake C. Ballif, Ph.D., Christine M. Eng, M.D., Julia M. Zachary, Melissa Savage, M.S., Lawrence D. Platt, M.D., Daniel Saltzman, M.D., William A. Grobman, M.D., M.B.A., Susan Klugman, M.D., Thomas Scholl, Ph.D., Joe Leigh Simpson, M.D., Kimberly McCall, B.S., Vimla S. Aggarwal, M.B., B.S., Brian Bunke, B.S., Odelia Nahum, M.Sc., Ankit Patel, Ph.D., Allen N. Lamb, Ph.D., Elizabeth A. Thorn, Ph.D., Arthur L. Beaudet, M.D., David H. Ledbetter, Ph.D., Lisa G. Shaffer, Ph.D., and Laird Jackson, M.D.

Klinikum Stuttgart

**Microarray Analyse, Bsp. große terminale Deletion 10q bessere Aussage über die zu erwartende Klinik, da genaue Aussage über Ausmaß des Stückverlustes**

Klinikum Stuttgart

**Studie Einsatz der Microarray Analyse in der vorgeburtlichen Diagnostik**  
Wapner et al. *NEJM* 2012

|                 | By Predeterm Listings | VOUS Adjudicated by CAC or Clinical Geneticist |               | Total             |                     |
|-----------------|-----------------------|--|---------------|-------------------|---------------------|
|                 | Pathogenic            | Total  | Likely Benign | Report to Patient | Clinically Relevant |
| <b>Alter</b>    | 9 (0.5%)              | 62 (3.2%)                                      | 37 (1.9%)     | 25 (1.3%)         | 34 (1.7%)           |
| <b>ETT</b>      | 3 (0.4%)              | 22 (3.0%)                                      | 13 (1.8%)     | 9 (1.2%)          | 12 (1.6%)           |
| <b>US-Auff.</b> | 21 (2.8%)             | 40 (5.3%)                                      | 16 (2.1%)     | 24 (3.2%)         | 45 (5.9%)           |
| <b>N=</b>       | 1965                  | 727  | 757           |                   |                     |

Klinikum Stuttgart

**Beispiel klinische Variabilität bei unterschiedlichen Mikrodeletions- und Mikroduplikations-Syndromen**

Devlin and Scherer, *Current Opinion in Genetics and Development*, 2012

Klinikum Stuttgart

**Zusammenfassung**  
**Microarray Analyse in der vorgeburtlichen Diagnostik**

- Die Microarray Analyse hat bei Auffälligkeiten im Ultraschall eine zusätzliche Detektionsrate von ca. 6% (4-10%)
- Bei ca. 1-2% der Mikroarray-Analysen in der Pränataldiagnostik werden Varianten unklarer Signifikanz erhoben
- > vorab zwingend genetische Beratung !

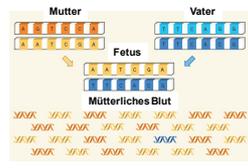
Klinikum Stuttgart

## NIPT (Non-Invasive Prenatal Testing / Diagnosis) Diagnostik aus mütterlichem Blut



### Analyse zellfreie DNA im mütterlichen Blut NIPT (Nicht-Invasive Pränatale Testung)

- Nachweis von Zell-freier DNA im mütterlichen Plasma (cfDNA)
- “fetale” Fraktion stammt vom Zytotrophoblasten
- nachweisbar ab der 4. SSW
- Ab 10. SSW >4%
- Anteil danach: 10-20%
- kurze Halbwertszeit!
- Analysmethoden:
  - next generation sequencing (NGS)
  - massive parallel sequencing (MPS)




THE LANCET  
Early report  
Lancet 1997; 350: 485-87

### Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum

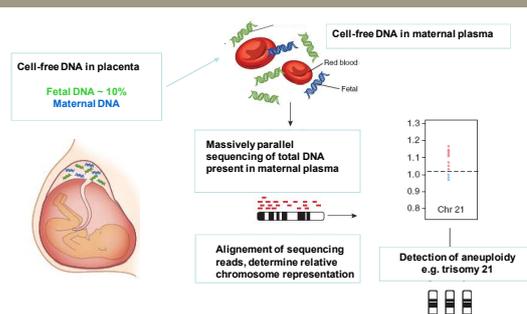
Y M Dennis Lo, Nbeni Corbetta, Paul F Chamberlain, Vik Rai, Ian L Sargent, Christopher W G Redman, James S Wainscoat

**Summary**  
**Background** The potential use of plasma and serum for molecular diagnosis has generated interest. Tumour DNA has been found in the plasma and serum of cancer patients, and molecular analysis has been done on this material. We investigated the equivalent condition in pregnancy—that is, whether fetal DNA is present in maternal plasma and serum.  
**Methods** We used a rapid-boiling method to extract DNA from plasma and serum. DNA from plasma, serum, and nucleated blood cells from 43 pregnant women underwent a sensitive Y-PCR assay to detect circulating male fetal DNA from women bearing male fetuses.  
**Findings** Fetus-derived Y sequences were detected in 24 (80%) of the 30 maternal plasma samples, and in 21 (70%) of the 30 maternal serum samples, from women bearing male fetuses. These results were obtained with only 10 µL.

**Introduction**  
 The passage of nucleated cells between mother and fetus is well recognised.<sup>1,2</sup> One important clinical application is the use of fetal cells in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis.<sup>3</sup> This approach avoids the risks associated with conventional invasive techniques, such as amniocentesis and chorionic-villus sampling. Substantial advances have been made in the enrichment and isolation of fetal cells for analysis.<sup>4-6</sup> However, most techniques are time-consuming or require expensive equipment.  
 There has been much interest in the use of DNA derived from plasma or serum for molecular diagnosis.<sup>7</sup> In particular, there have been reports that tumour DNA can be detected by molecular techniques in the plasma or serum of cancer patients.<sup>8-11</sup> Such reports prompted us to investigate whether fetal DNA can be detected in maternal plasma and serum.



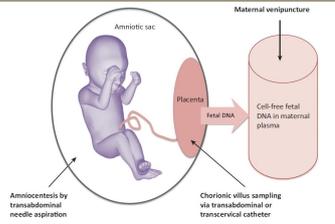
### Analyse fetale DNA im mütterlichen Blut (NIPT Nicht-Invasive Pränatale Testung)



modified from Bianchi 2012 Nature Medicine



### Untersuchungsmöglichkeiten des fetalen Genoms

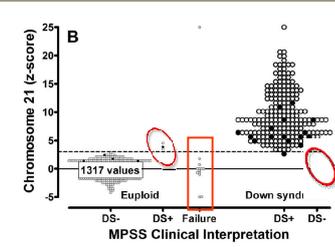


*Hui & Bianchi 2012*

**im Blut der Schwangeren zirkulieren  
zellfreie DNA-Fragmente (cfDNA; cell free DNA)**



### Erste grosse Studie NIPT (Palomaki et al. 2011) (NIPT Nicht-Invasive Pränatale Testung)



**MPSS Clinical Interpretation**

|                             |                  |
|-----------------------------|------------------|
| Trisomie 21 Detektionsrate: | 98.6% (209/212)  |
| falsch-positive Rate:       | 0.20% (3/1471)   |
| Testversagen:               | 13 Proben (0.8%) |



### Vergleich Studien NIPT (NIPT Nicht-Invasive Pränatale Testung) Detektionsrate Trisomie 21 / falsch positive Befunde

| Trial                                   | Down syndrome         |                      |
|---|-----------------------|----------------------|
|   | DR (n (%))            | FPR (n (%))          |
| Chiu <i>et al.</i> <sup>65,6</sup>      | 86/86 (100)           | 3/146 (2.1)          |
| Ehrich <i>et al.</i> <sup>66</sup>      | 39/39 (100)           | 1/410 (0.24)         |
| Palomaki <i>et al.</i> <sup>67,72</sup> | 209/212 (98.6)        | 3/1471 (0.20)        |
| Bianchi <i>et al.</i> <sup>68</sup>     | 89/90 (98.9)          | 0/410 (0.00)         |
| Sparks <i>et al.</i> <sup>70</sup>      | 36/36 (100)           | 1/123 (0.81)         |
| Ashoor <i>et al.</i> <sup>69</sup>      | 50/50 (100)           | 0/297 (0.00)         |
| Norton <i>et al.</i> <sup>71</sup>      | 81/81 (100)           | 1/2888 (0.03)        |
| <b>Total</b>                            | <b>590/594 (99.3)</b> | <b>9/5745 (0.16)</b> |

*Benn et al. 2013*

DR: Detektionsrate  
FPR: falsch positive Testresultate

### NIPT; Ethisches Dilemma Geschlechtschromosomen NIPT (Nicht-Invasive Pränatale Testung)

Alle Anbieter bieten (mittlerweile) Analyse der Geschlechts-Chromosomen an

- 47,XXY Klinefelter Syndrom
- 47,XXX Triple X Syndrom
- 47,XYY Doppel Y Syndrom
- 45,X Turner Syndrom

### Ursache falsch positive Befunde NIPT? (NIPT Nicht-Invasive Pränatale Testung) plazentare Mosaik

aus: Gardiner and Sutherland, Chromosome Abnormalities

### Stellungnahme Berufsverband Deutsche Humangenetiker zur NIPT (Juli 2012) NIPT (Nicht-Invasive Pränatale Testung)

- Der BVDH hält es für erforderlich, dass die Schwangeren ausdrücklich darüber aufgeklärt werden, dass der Test keinen eindeutigen Befund ermöglicht, sondern eine Wahrscheinlichkeitsberechnung darstellt,
- dass die Schwangeren informiert werden, dass der Test auch bei auffälligen Ultraschallbefunden zwei Wochen dauert und alternativ eine kurzfristige und eindeutige Abklärung einer möglichen Chromosomenstörung durch eine CVS oder AC erfolgen kann, die eine Leistung der gesetzlichen Krankenkassen ist,
- dass eine gesellschaftliche Debatte erfolgt, ob und wie der immanente Zwang auf Schwangere zur Durchführung von Untersuchungen auf genetische Veränderungen begrenzt werden kann und welche Folgen die abzusehende technische Weiterentwicklung derartiger Testsysteme auf die Gesellschaft haben kann

### NIPT Angebot in Deutschland NIPT (Nicht-Invasive Pränatale Testung)

- 2012; **PraenaTest** (LifeCodexx, Teilpatent Sequenom)
  - Nachweis von Trisomie 21, 13, 18, Geschlechtschromosomen
  - Analyse erfolgt in Konstanz, 10 Arbeitstage
  - Preis: 845 Euro / Express (1 Woche): 1100 Euro
- 2013; **Panorama Test** (Natera / Amedes)
  - Chromosomen 21, 13, 18, Geschlechtschromosomen
  - Analyse erfolgt in den USA, keine genaue Zeitangabe
  - Preis: 595 Euro
- 2013; **Harmony Test** (Ariosa)
  - Chromosomen 21, 13, 18, Geschlechtschromosomen
  - Analyse in den USA, 10 Tage
  - Preis: 500 Euro

### Diskussionspunkte NIPT (Nicht-Invasive Pränatale Testung)

- erhebliche psychische Belastung durch lange Wartezeit (10 Tage)
- schafft „risikolose Verfügbarkeit“ einen erhöhten Druck auf Schwangere, eine Testung bezüglich Down Syndrom durchzuführen?
- Private Anbieter -> Qualitätskontrolle der Analyse ?
- Soziale Gerechtigkeit: „nur Reiche können sich die risikoarme nicht-invasive Abklärung leisten“
- Folgekosten einer privaten Dienstleistung werden auf die gesetzlichen Krankenkassen abgewälzt
- ...

RESEARCH ARTICLE | www.ScienceTranslationalMedicine.org | 6 June 2012 | Vol 4 Issue 137 | 137ra76

GENOMICS

### Noninvasive Whole-Genome Sequencing of a Human Fetus

Jacob O. Kitzman,<sup>1\*</sup> Matthew W. Snyder,<sup>1</sup> Mario Ventura,<sup>1,2</sup> Alexandra P. Lewis,<sup>1</sup> Ruolan Qiu,<sup>1</sup> LaVone E. Simmons,<sup>3</sup> Hillary S. Gammill,<sup>3,4</sup> Craig E. Rubens,<sup>5,6</sup> Donna A. Santillan,<sup>7</sup> Jeffrey C. Murray,<sup>8</sup> Holly K. Tabor,<sup>5,9</sup> Michael J. Bamshad,<sup>1,5</sup> Evan E. Eichler,<sup>1,10</sup> Jay Shendure<sup>1\*</sup>

ARTICLE 320 | NATURE | VOL 487 | 19 JULY 2012 | doi:10.1038/nature11251

### Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome

H. Christina Fan<sup>1\*</sup>, Wei Gu<sup>1\*</sup>, Jianbin Wang<sup>1</sup>, Yair J. Blumenfeld<sup>2</sup>, Yasser Y. El-Sayed<sup>2</sup> & Stephen R. Quake<sup>1,3,4</sup>

Klinikum Stuttgart

### Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen § 15 Vorgeburtliche genetische Untersuchungen

Eine vorgeburtliche genetische Untersuchung, die darauf abzielt, genetische Eigenschaften des Embryos oder des Fötus für eine **Erkrankung festzustellen, die nach dem allgemein anerkannten Stand der medizinischen Wissenschaft und Technik erst nach Vollendung des 18. Lebensjahres ausbricht**, darf **nicht** vorgenommen werden.

-> Implikationen für die Präimplantationsdiagnostik spät-manifestierender Erkrankungen?

Klinikum Stuttgart

### Genetische Testung über Internet (23andMe)

Klinikum Stuttgart

### Zukunftsperspektiven / offene Fragen in der pränatalen Diagnostik

- Neue Methoden bieten zuverlässigere Diagnostik für Chromosomenstörungen und monogenen Erkrankungen
- Nicht-invasive Diagnostik wird weiter an Bedeutung zunehmen
- Weniger invasive Abklärungen -> Senkung der Aborte durch Punktion
- Werden die neuen Methoden die Prävalenz von genetischen Erkrankungen verändern?
- Werden kommerzielle Interesse einen künstlichen Bedarf schaffen?
- Kosten für unser Gesundheitssystem?

Klinikum Stuttgart

### Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen § 15 Vorgeburtliche genetische Untersuchungen

Eine genetische Untersuchung darf vorgeburtlich nur zu medizinischen Zwecken und nur vorgenommen werden, soweit die Untersuchung auf bestimmte genetische Eigenschaften des Embryos oder Fötus abzielt, die nach dem allgemein anerkannten Stand der Wissenschaft und Technik **seine Gesundheit während der Schwangerschaft oder nach der Geburt beeinträchtigen**, oder wenn eine Behandlung des Embryos oder Fötus mit einem Arzneimittel vorgesehen ist, dessen Wirkung durch bestimmte genetische Eigenschaften beeinflusst wird und die Schwangere nach § 9 aufgeklärt worden ist und diese nach § 8 Abs. 1 eingewilligt hat.

Klinikum Stuttgart