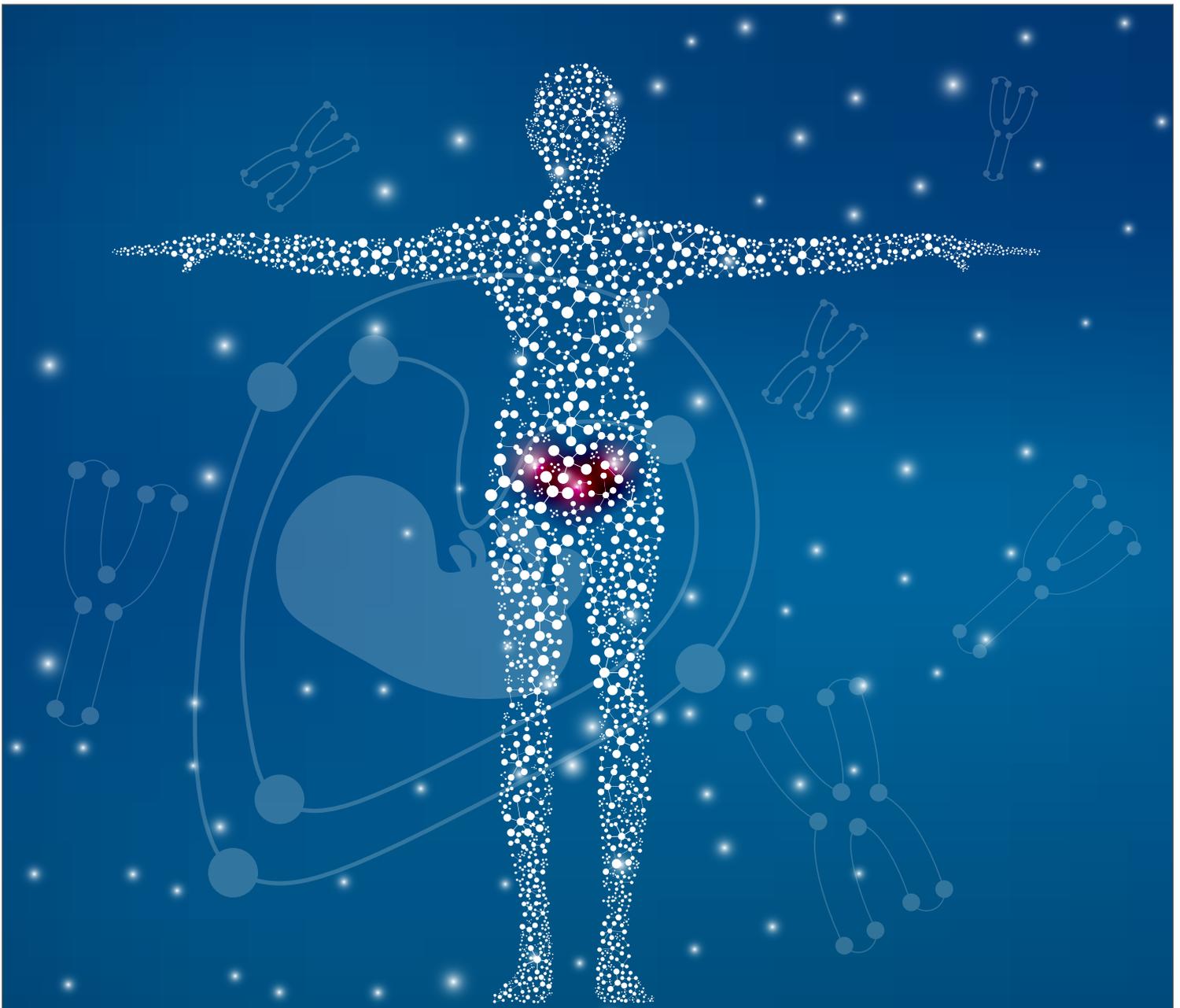




LaborDiagnostik
Karlsruhe

FETALE ANEUPLOIDIEN ZUVERLÄSSIG ERKENNEN

MIT DEM NICHT INVASIVEN PRÄNATALTEST VERISEQ



// FRÜHZEITIG UND ZUVERLÄSSIG RISIKEN EINSCHÄTZEN KÖNNEN

DARUM GEHT'S

- Den zuverlässigsten Ansatz zum Erkennen von Chromosomenanomalien in der Frühschwangerschaft bieten derzeit NIPTs mit der Analyse von cffDNA aus mütterlichem Blut.
- Kennzahlen für die Qualität eines NIPT sind dabei Sensitivität und Spezifität für die drei relevanten Trisomien sowie Ausfallrate und Befundlaufzeit (Turnaround-Time)
- In all diesen Kennzahlen schneidet der Veriseq-Test auf der Illumina-Plattform im Branchenvergleich am besten ab.

NICHT INVASIVE BLUTTESTS

Nicht invasive vorgeburtliche Bluttests bieten seit vielen Jahren die Möglichkeit, ohne Eingriffsrisiko für Mutter und Kind die Wahrscheinlichkeit für eine Chromosomenanomalie in Einzel- oder Zwillingschwangerschaften ermitteln zu können.

Die verschiedenen Verfahren unterscheiden sich in Methode und Zuverlässigkeit. Biochemische Serum-Screeningverfahren fördern mit ihrer Falsch-positiv-Rate von etwa 5% eine bestätigende invasive Diagnostik.¹ Diagnostische Verfahren, wie die Amniozentese, gelten als zuverlässigste Nachweise für Aneuploidien. Doch bei etwa zwei bis zehn von 1.000 Schwangerschaften führen invasive Eingriffe zu Fehlgeburten. Daher werden sie nur angewandt, wenn ein hohes Risiko für eine Trisomie vorliegt.

Seit 2012 erweitern nicht invasive Pränataltests (NIPT) das Angebot der vorgeburtlichen Screeningoptionen. NIPTs weisen auch im Vergleich zu herkömmlichen Screening-Methoden sehr zuverlässig die häufigsten fetalen Aneuploidien der Chromosomen 21, 18, 13, X und Y nach. Die hohe klinische Genauigkeit wurde durch mehrere Studien belegt.^{2,3}

Eine Studie kommt zu dem Ergebnis, dass NIPT, wenn als primäres Screening-Verfahren eingesetzt, die Zahl der bestätigenden invasiven Verfahren um 89% reduzieren könnte.⁴

Insbesondere wegen der niedrigen Falsch-positiv-Rate im Vergleich zu den biochemischen Screening-Tests, empfehlen immer mehr medizinische Institutionen NIPT für alle schwangeren Frauen: Die International Society for Prenatal Diagnosis, das American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), die Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), das American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), die Europäische Gesellschaft für Humangenetik und die American Society of Human Genetics.⁵ Die Fachgesellschaften raten darüber hinaus stets zur Beratung schwangerer Frauen vor einem nicht-invasiven Pränataltest.⁶

Auch der Gemeinsame Bundesausschuss (G-BA) und das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) bewerten NIPT als zuverlässigen Screeningtest, insbesondere für die Bestimmung von Trisomie 21.⁷

Der Bundestag hat am 19.09.2019 positiv darüber beschlossen, dass der NIPT auf die Trisomie 21, 18 und 13 in begründeten Fällen auch von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen wird (vermutlich ab Ende 2020).

VERISEQ – NICHT INVASIVER PRÄNATALTEST

Mittels Gesamtgenom-Sequenzierung zellfreier fetaler DNA-Fragmente (cffDNA), weist VeriSeq aus einer Blutprobe (7-10 ml) von Schwangeren ab der 10. Schwangerschaftswoche fetale Aneuploidien der Chromosomen 21, 18, 13, X und Y nach.

Für NIPT gibt es verschiedene Testverfahren auf dem Markt. Eine etablierte und sichere Methode ist die Next-Generation Sequenzierung (NGS).⁸

VeriSeq nutzt dieses Verfahren in einem PCR-freien Whole Genome Sequencing (WGS)-Ansatz und wendet dabei die leistungsstarke Technologie von Illumina

an: Weltweit werden 99,7% aller NGS-basierten NIPTs mit den Systemen und Technologien von Illumina durchgeführt.⁹

Die klinische Genauigkeit und Zuverlässigkeit von VeriSeq ist intensiv getestet worden. In einer Studie analysierte VeriSeq 3107 mütterliche Blutproben.

Die Testergebnisse für Trisomie 21, 18 und 13 waren durch invasive Diagnostik oder körperliche Untersuchung des Neugeborenen durch einen Arzt bekannt und stellten die klinische Referenz dar, mit der die VeriSeq-Ergebnisse verglichen wurden.

Die Resultate bestätigen eine ausgesprochen hohe Sensitivität sowie Spezifität (Tabelle 1).¹⁰

In einer weiteren realen klinischen Studie mit mehr als 86.000 Patientenproben wurden weitere Leistungsmerkmale untersucht (Tab. 2).¹¹ Im Rahmen dieser Erhebung zeigt VeriSeq die niedrigste Testausfall-Rate im Branchenvergleich (Abb. 1).¹¹ Diese Rate beschreibt den Anteil an Proben, die wegen technischer Gegebenheit, zum Beispiel Anteil der fetalen DNA in der mütterlichen Blutprobe, nicht auswertbar waren.

SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT VON VERISEQ FÜR DEN NACHWEIS DER TRISOMIEN 21, 18 UND 13.¹⁰ ABSOLUTE ZAHLEN IN KLAMMERN.

| | TRISOMIE 21 | TRISOMIE 18 | TRISOMIE 13 |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| SENSITIVITÄT | 98.9 % (90/91) | 90.0 % (18/20) | 100.0 % (8/8) |
| ZWEISEITIGES 95%-KI* | 94.0 %, 99.8% | 69.9 %, 97.2% | 67.6 %, 100.0 % |
| SPEZIFITÄT | >99.9 % (2965/2966) | 99.9 % (3034/3037) | 99.9 % (3045/3049) |
| ZWEISEITIGES 95%-KI* | 99.8 %, 100.0% | 99.7 %, 100.0% | 99.7 %, 99.9 % |

*Konfidenzintervall (KI) basiert auf der Score-Methode nach Wilson.

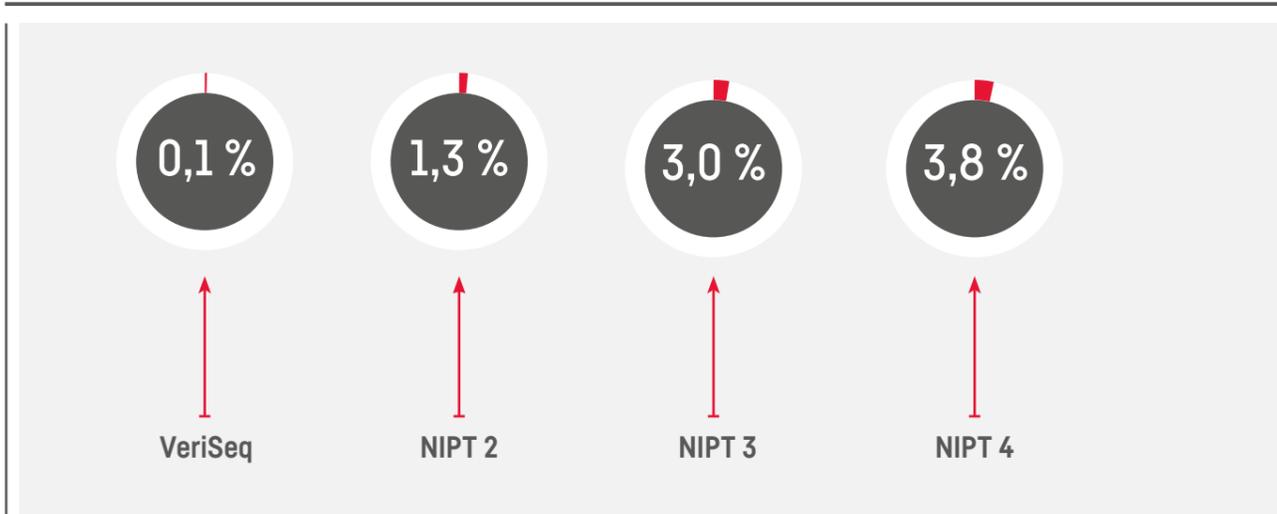


ABB. 1 Testausfall-Rate von nicht invasiven Pränataltests im Vergleich.

VERISEQ LEISTUNG IN EINER REALEN KLINISCHEN POPULATION VON MEHR ALS 86.000 PATIENTENPROBEN.

| | |
|--|--------|
| Gesamtzahl Patientenproben | 86.658 |
| Durchschnittliche Bearbeitungszeit (Werktage) | 3,3 |
| Technische Ausfälle | 0,1 % |
| Erkannte Aneuploidien | 2,2 % |
| Vermutete Aneuploidie | 0,3 % |
| Gesamtzahl der entdeckten oder vermuteten Aneuploidien | 2,5 % |
| Beobachtete Falsch-Positive* | 0,12 % |
| Beobachtete Falsch-Negative* | 0,02 % |

* FP Berechnung basiert auf klinischer Charakterisierung, die für jede Probe vorlag..

ANALYTISCHE HERAUSFORDERUNG: NIEDRIGE FETALE CFDNA

Die cfDNA des Fetus ist ein entscheidender Faktor für ein valides NIPT-Ergebnis. Deswegen verwenden einige NIPT-Anbieter einen strengen Schwellenwert für die fetale Fraktion von min. 4 % (untere Nachweisgrenze).¹⁹⁻²¹ Ab der 10. SSW ist ausreichend fetale DNA im mütterlichen Blut vorhanden. Doch neben dem Schwangerschaftsalter gibt es weitere Einflussfaktoren, die die cfDNA reduzieren: Das mütterliche Gewicht, die fetalen Trisomien 13 und 18 sowie plazentare Mosaiken. In diesen Fällen liefern einige Tests kein interpretierbares Ergebnis. VeriSeq weist auch bei cfDNA von < 4 % fetale Aneuploidien nach.²² Dadurch gibt es weniger Testausfälle und damit verbundene Testwiederholungen mit VeriSeq. Für eine eventuelle Testwiederholung reicht dann in der Regel das Volumen der eingesendeten Blutprobe aus, sodass in den allermeisten Fällen keine erneute Blutentnahme bei der Schwangeren nötig wird.

WGS-ANSATZ UND SOFTWARE-AUSWAHL BEEINFLUSSEN ZAHL DER TESTAUSFÄLLE

Die Ausfallrate bei den nicht invasiven Pränataltests variiert zwischen den verschiedenen Anbietern, abhängig von dem zugrunde liegenden Verfahren.

NIPTs, die sich nur auf ausgewählte Gen-Regionen beziehen, haben das Risiko, nicht alle vorhandenen Variationen abzudecken. Diese sogenannten „Targeted Approaches“ weisen dadurch höhere Testausfallraten auf als solche, die die komplette DNA sequenzieren.¹²

Ursächlich für Testausfallraten können inhärente Verzerrungen (Bias) im Testdesign sein, wie sie bei gezielter Sequenzierung und Array-basierten Verfahren durch komplexe Laborprotokolle und PCR-Anreicherung entstehen. Die unvollständige Abdeckung des Genoms kann bei Proben mit einem niedrigen Anteil fetaler Fraktion ein Problem darstellen: In diesen Fällen sind die Informationen nicht so eindeutig, dass der Test aussagekräftig wäre.

Damit gelten Ergebnisse als nicht interpretierbar und der Test als fehlgeschlagen. Invalide Ergebnisse erfordern Test-Wiederholungen und können zu invasiven Untersuchungen führen.

Um das zu vermeiden, nutzt VeriSeq NIPT einen PCR-freien NGS-Ansatz, der einen umfassenden Blick in das genomische Material ermöglicht.

Durch Abdeckung des gesamten diploiden Genoms entsteht eine analytische Referenz, mit der assay- und probenspezifische Verzerrungen reduziert werden. Diese Normalisierung anhand des diploiden Genoms ermöglicht auch die Bearbeitung von Proben mit geringem fetalem DNA-Anteil.¹³

Zudem enthält die VeriSeq NIPT Assay Software den individualisierten fetalen Aneuploidie-Vertrauenstest (iFACT) zur Beurteilung der Probenqualität. iFACT zeigt an, ob das Sequenziersystem eine ausreichende Sequenzierabdeckung und Datenqualität erzeugt.¹⁴⁻¹⁶ Diese dynamische Cutoff-Funktion ermöglicht es der VeriSeq NIPT Assay Software, über Proben mit niedrigem Fötusanteil zu berichten, was zu einer weiteren Reduktion von Testausfällen im Vergleich zu anderen NIPT-Technologien führt.¹⁶⁻¹⁸

VOR-ORT-ANALYSE

Die Datenanalyse erfolgt auf einem in Europa lokalisierten dedizierten VeriSeq Server mit der CE-IVD-gekennzeichneten VeriSeq NIPT Assay Software. Der Server verarbeitet automatisch Sequenzierungsdaten. Mehrere Probenchargen können zur Analyse auf einem einzigen Server in die Warteschlange gestellt werden. Es ist nicht erforderlich, Daten zur Analyse zu versenden, was Zeit spart und Sicherheit bietet.

MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN

VeriSeq weist fetale Aneuploidien der Chromosomen 21, 18, 13, X und Y in Einzel- und Zwillingsschwangerschaften nach. Das Geschlecht des heranwachsenden Kindes kann bei Einlingsschwangerschaften ermittelt werden. Bei Zwillingsschwangerschaften kann die Analyse ein Y-Chromosom erkennen, aber nicht die individuellen Geschlechter beider Föten zuordnen.

Neben den fetalen Aneuploidien der Autosomen können Schwangerschaften mit anderen Chromosomenstörungen, Geburtsfehlern oder Komplikationen einhergehen, welche VeriSeq nicht erfasst. Für strukturelle Aneuploidien liegen bisher unzureichend klinische Daten vor, sodass sich die Auswahl der Testoptionen von VeriSeq bei Bioscientia auf die numerischen Chromosomenanomalien beschränken.

Das Angebot und die Technologie werden entsprechend den wissenschaftlichen und technischen Fortschritten stetig weiterentwickelt und bei ausreichender klinischer Evidenz an medizinische Indikationen und Patientenbedürfnisse angepasst.

Die ausführliche Information der schwangeren Frau über einen nicht invasiven Pränataltest sollte idealerweise in einer genetischen Beratung erfolgen.

ZUSAMMENFASSUNG

Der nicht invasive VeriSeq ist ein sequenzbasierter Pränataltest zum Nachweis von fetalen Aneuploidien aus mütterlichen peripheren Vollblutproben der bei Schwangeren ab der 10. Schwangerschaftswoche angewendet werden kann. VeriSeq ist ein Screening-Test; er ist nicht diagnostisch. Die Testergebnisse dürfen nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose verwendet werden. Weitere Bestätigungstest sind notwendig, bevor eine irreversible Entscheidung über eine Schwangerschaft getroffen wird.

QUELLENANGABEN / LITERATUR

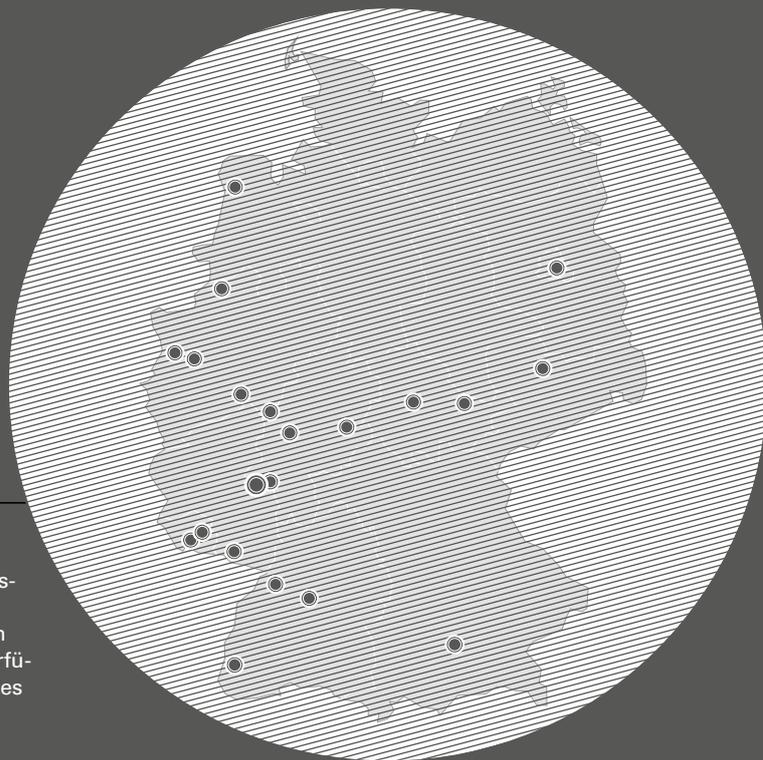
- ACOG Practice Bulletin #163.
- Malone FD, Canick JA, Ball RH, et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med.* 2005;353(19):2001-2011.
- Gil M M, Quezada M S, Revello R, Akolekar R, and Nicolaides K H (2015), Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45: 249–266. doi:10.1002/uog.14791.
- Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. CARE Study Group: DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med.* 2014;370:799-808.
- Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. (2015) „Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis.“ *Prenat Diagn* 35: 725-34.
2. ACOG Committee on Genetics. „Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy.“ *Obstet Gynecol* 126 (2015): e31-7.
- <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/96103/Bluttests-koennen-Trisomie-21-zuverlaessig-bestimmen>.
- Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012;119(5): 890-901.
- Based on a PubMed search for "cell-free, DNA, prenatal", "noninvasive prenatal testing", and "noninvasive prenatal screening" performed on July 25, 2016. All validation and clinical studies using unique samples were included, where a current clinical NIPT provider performed sample analysis. Case studies and studies published in a language other than English were excluded. Data from a 2015 ESHG conference abstract was also included. A total of 45 published studies were surveyed. Data calculations on file. Illumina, Inc. 2015
- Illumina. Veriseq NIPT Solution Packungsbeilage. 2018; S. 28-29. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/dx/veriseq-nipt-solution/translations/veriseq-nipt-solution-package-insert-ceivd-1000000031194-04-deu.pdf, letzter Zugriff am 15.05.2019.
- Taneja PA, Snyder HL, de Feo E, et al. Noninvasive prenatal testing in the general obstetric population: clinical performance and counseling considerations in over 85,000 cases. *Prenat Diagn.* 2016;36(3):237-243.
- Illumina. Don't settle for failure. [mkt.illumina.com/rs/600-XEX927/images/dont-settle-for-failure.pdf](https://www.illumina.com/rs/600-XEX927/images/dont-settle-for-failure.pdf). Accessed March 15, 2017.
- Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem.* 2014;60(1):243-250.
- Duenwald S, Chen G, Barbacioru C, et al. Development of a Novel Paired-End Sequencing-Based Noninvasive Prenatal Test. Poster presented at the Society for Maternal-Fetal Medicine 36th Annual Pregnancy Meeting; February 1-6, 2016; Atlanta, Georgia.
- Cirigliano V, Ordoñez E, Rueda L, Syngelaki A, Nicolaides KH. Performance evaluation of the NeoBona test, a new paired-end massive parallel shotgun sequencing approach for cfDNA based aneuploidy screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017, 49 (4) 460-464.
- Cirigliano V, Ordonez E, Rueda L, et al. Performance evaluation and clinical application of a new paired end MPSS approach for cfDNA based prenatal aneuploidy screening. Poster presented at the International Society for Prenatal Diagnosis. July 10-13 2016; Berlin, Germany.
- Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *PrenatDiagn.* 2013; 33:662-666.
- Pergament E, Cuckle H, Zimmermann B, et al. Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. *Obstet Gynecol.* 2014; 124(2 Pt 1):210-218.
- Mccullough RM, Almasri EA, Guan X, et al. (2014) Non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy testing – clinical experience: 100,000 clinical samples. *PLoS One.* 9(10): e109173.
- Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. (2012) Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *J Obstet Gynecol.* 207:137.e1-8.
- Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. (2015) Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *New Engl J Med.* 372(17):1589-97.
- Illumina. Veriseq NIPT Solution Packungsbeilage. 2018; S. 29.

LABOR KARLSRUHE

Am Rüppurrer Schloß 1
76199 Karlsruhe
T +49 721 6277500
F +49 721 6277900
info@labor-karlsruhe.de

LABOR | NETZWERK

Akkreditierte Diagnostik aus den Bereichen Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Humangenetik steht Ihnen an 21 Standorten ebenso zur Verfügung wie unser umfangreiches Servicepaket.



PARTNERLABORE

BERLIN

Lützowstraße 89/ 90
10785 Berlin
T +49 30 48526100
F +49 30 48526275
labor-berlin@bioscientia.de

FREIBURG

Mülhauser Straße 9
79110 Freiburg
T +49 761 4000650
F +49 761 40006510
labor-freiburg@bioscientia.de

GIESSEN

Ursulum 1
35396 Gießen
T +49 642 300210
F +49 642 30021100
info@ldm-labor.de

INGELHEIM

Konrad-Adenauer-Straße 17
55218 Ingelheim
T +49 6132 7810
F +49 6132 781214
hygiene@bioscientia.de

JENA

Orlaweg 2
07743 Jena
T +49 3641 40130
F +49 3641 401338
labor-jena@bioscientia.de

KARLSFELD

Liëbigstraße 14
85757 Karlsfeld
T +49 8131 5940
F +49 8131 594109
labor-karlsfeld@bioscientia.de

MAINZ

Wallstraße 3–5
55122 Mainz
T +49 6131 576080
F +49 6131 5760844
labor-mainz@bioscientia.de

MOERS

Zum Schürmannsgraben 30
47441 Moers
T +49 2841 1060
F +49 2841 10618
labor-moers@bioscientia.de

SAARBRÜCKEN

Winterberg 1
66119 Saarbrücken
T +49 681 88379133
F +49 681 88379142
labor-saarbruecken@bioscientia.de

ST. INGBERT

Otto-Kaiser-Straße 8a
66386 St. Ingbert
T +49 6894 9550100
F +49 6894 9550419
service@mvz-labor-saar.de