



Neueste Methoden in der nicht-invasiven Pränataltestung (NIPT)

Dr. Stephan Busche

27. Feb. 2019

Fortbildungsreihe Pränatal- und Sterilitätsmedizin

Dr. rer. nat. Stephan Busche

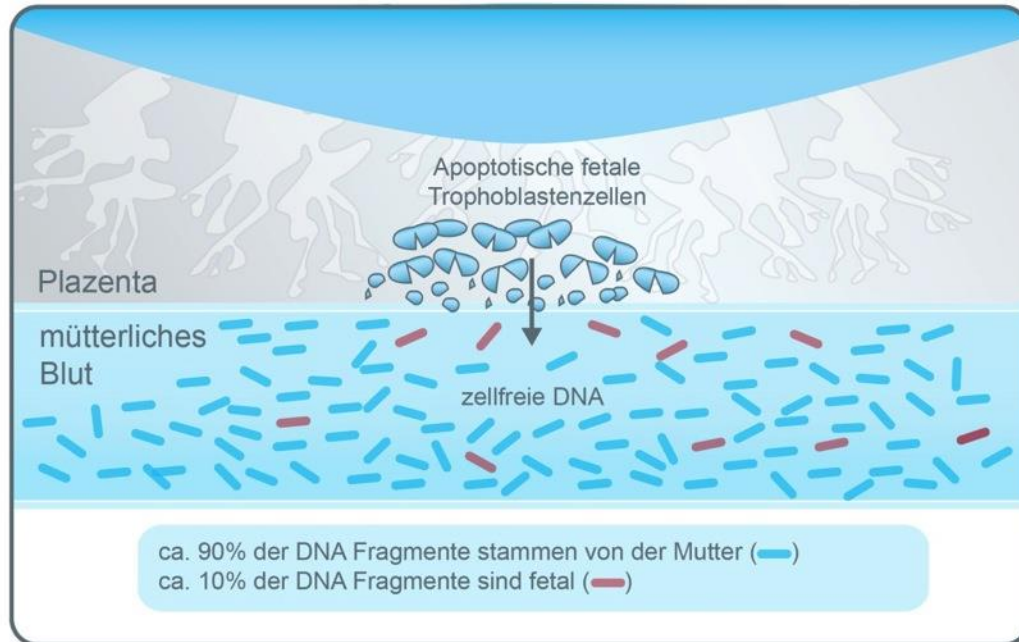
Seit Juli 2015 bei der LifeCodexx

- Direktor Labor und Technologie-Transfer -

- **Studium (Diplom) der Biochemie (Universität Hannover und University of Canterbury, Neuseeland)**
- **Promotion in Biochemie (Max-Planck-Institut für Biochemie)**
- **PostDoc in Humangenetik / Epigenetik / Genomics / Epigenomics (McGill University, Canada)**

1. NIPT Überblick
2. Eurofins LifeCodexx
3. T21 Basic
4. NIPD-RhD
5. All Chromosome Analyse
6. Ausblick

Grundlage: Entdeckung von fetalen DNA-Fragmenten in maternalem Plasma



Nachweis: ab ca. 4. SSW

Anteil: bis ca. 40%

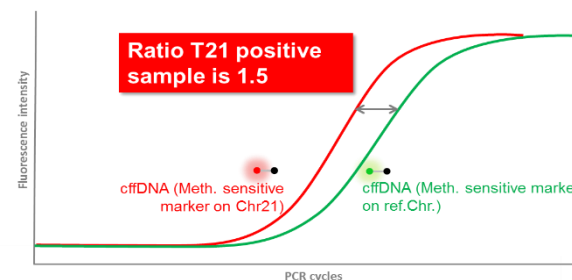
Stabilität: < 2 Stunden

* Lo et al., Lancet 1997; 350:485-7

Physikalische Eigenschaften:

- aus Trophoblasten (Plazenta) durch Apoptose / Nekrose-Prozesse freigesetzt
- kurze Fragmente, 80% < 200bp

- **Okt. 2008: Next Generation Sequencing für NIPT**
(Fan et al., PNAS 2008; 105:16266–16271)
- **Okt. 2011: Erster NIPT-Test in USA durch Sequenom eingeführt**
- **Ende 2011: Erster NIPT-Test in China durch Berrygenomics eingeführt**
- **Aug. 2012: Erster NIPT-Test in Europa durch LifeCodexx AG eingeführt (PraenaTest)**
- **Ende 2014: Einführung Microarray-basierter NIPT (Harmony-Test, Ariosa/Roche)**
- **Dez. 2016: Einführung quantitative real-time PCR für NIPT (LifeCodexx AG)**



- **2018: ca. 5-6 Mio. NIPT-Analysen weltweit**
 - China: 2.5 – 3 Mio. Tests (ca. 1.4 Mrd. Einwohner)
 - USA: 1 – 1.5 Mio. Tests (ca. 325 Mio. Einwohner)
 - **EU: 0.3 – 0.5 Mio. Tests** (ca. 510 Mio. Einwohner)

- **Erste Kassenleistungen von NIPT, z.B.**
 - CH (NIPT für T13/18/21) seit Juli 2015 Regelleistung der OKP in der Schweiz für Risikoschwangere → weltweit erste staatliche Kostenerstattung
 - NL (NIPT kann Analyse aller Chromosomen umfassen), Angebot an alle Schwangere
 - DK (NIPT für T13/18/21), Angebot an definierte Risikoschwangere
 - LUX (NIPT für T13/18/21), Angebot an definierte Risikoschwangere
 - BEL (NIPT für T21), Angebot an alle Schwangere
 - FR (NIPT für T21), Angebot an definierte Risikoschwangere

Entwicklung in Deutschland:

|transkript 1.2019

POLITIK. | 57

- Eurofins LifeCodexx: stetig wachsende Probenzahlen (sämtliche Optionen)
- Einführung NIPD-RhD
- Tagung des Gemeinsamen Bundesausschuss (GBA) bzgl. Kassenleistung NIPT, Entscheidung erwartet: pot. Kassenleistung Ende 2019 / Anfang 2020

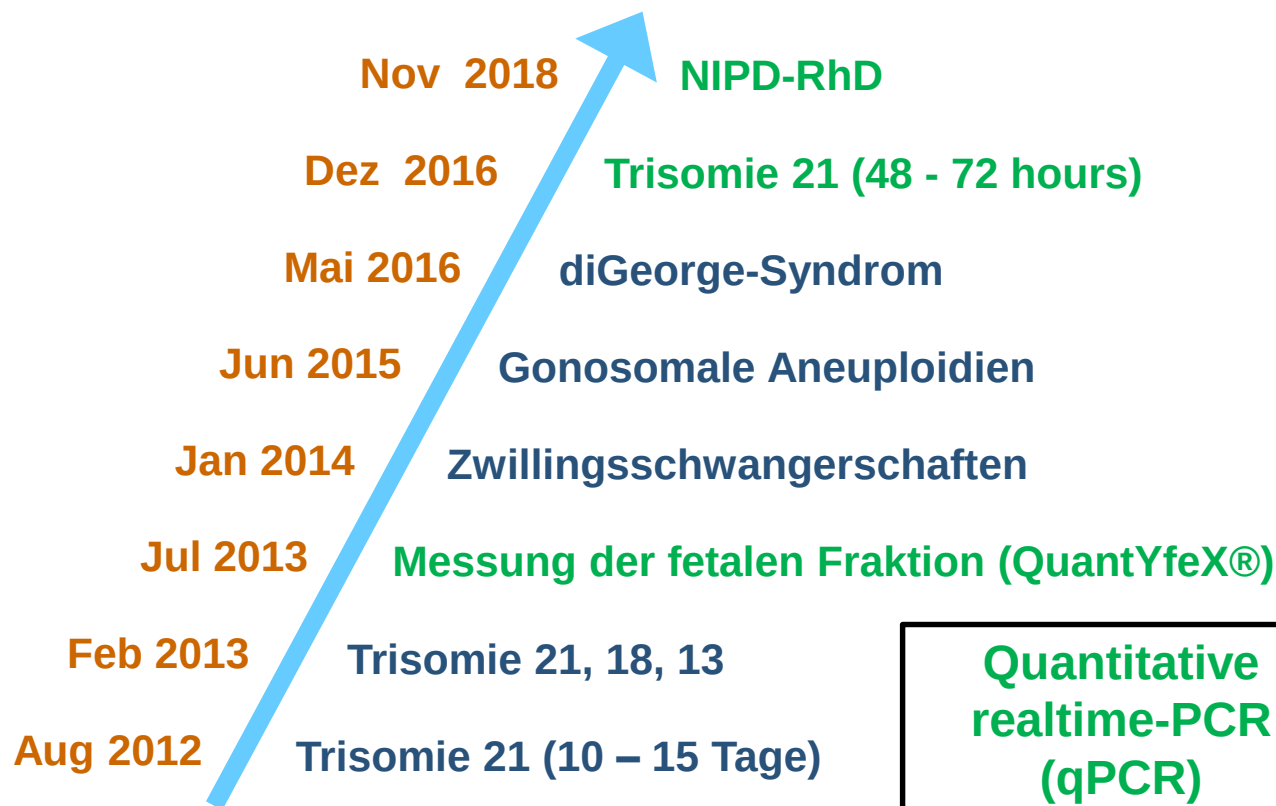
ERBGUT-CHECK FÜR EMBRYOS

Mit ein wenig Blut der Schwangeren und den Erbgutschnipseln des Embryos darin lässt sich das Risiko für Erkrankungen abschätzen. Ob solche schon lange eingesetzten Tests nun von der Krankenkasse bezahlt werden sollen, darüber wollte Deutschland 2019 streiten. Eigentlich.

von Sascha Karberg

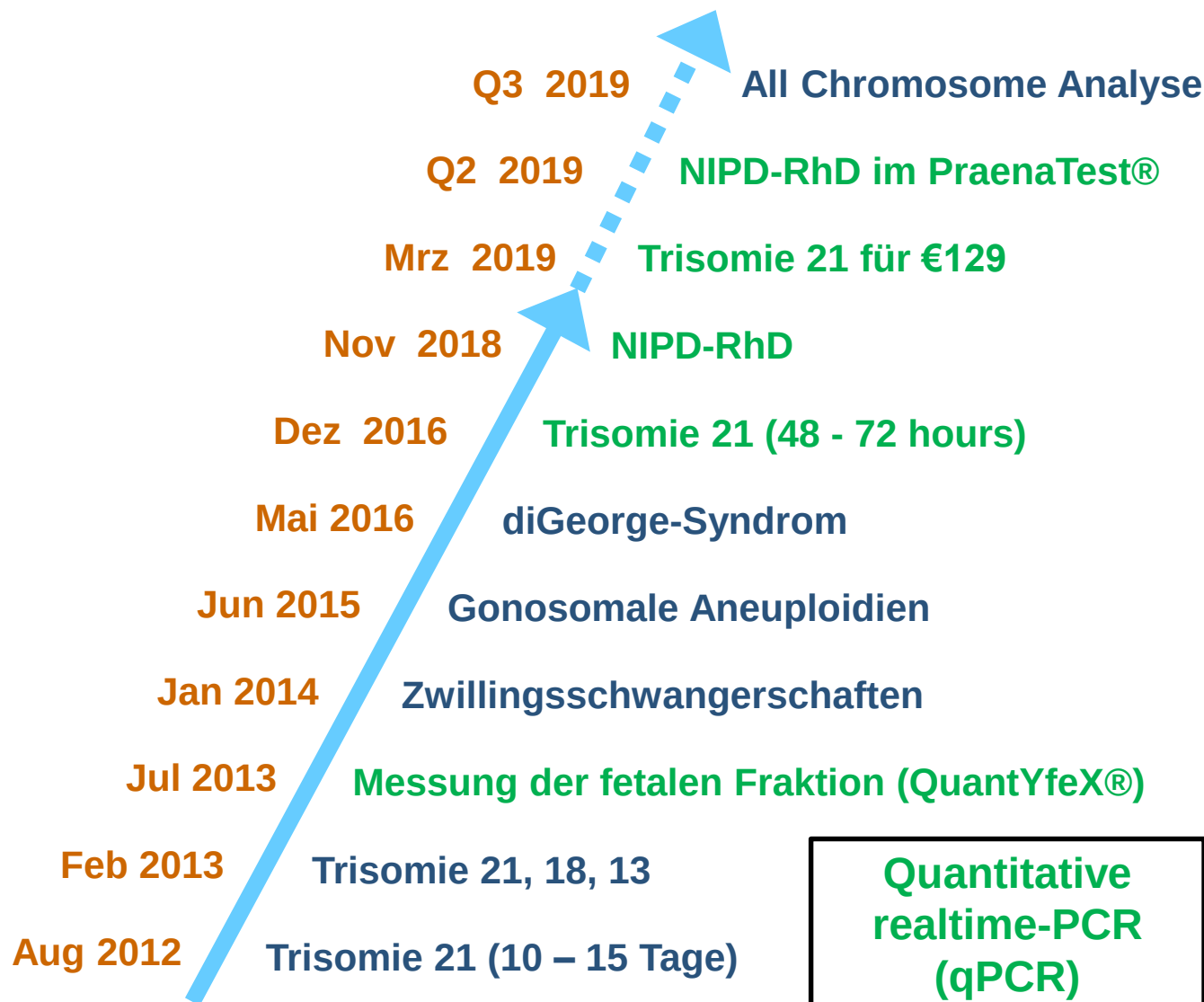
- Gegründet 2008 in Konstanz, seit 2018 Teil der  eurofins
- Pionier in Deutschland und Europa für Diagnostik basierend auf Next-Generation-Sequencing
- 1. NIPT Anbieter in Europa, seit Aug. 2012 mit dem PraenaTest®, derzeit aktiv in ~ 35 Ländern in Europa, dem mittleren Osten, und Asien
- Seit Einführung NIPT ca. 150.000 Proben erfolgreich analysiert, ca. 75.000 davon aus dem Ausland
- Seit 2016 erster und einziger Anbieter eines qPCR-basierten NIPT Ansatzes
- Seit 2018 Anbieter der nicht-invasiven RhD-Testung





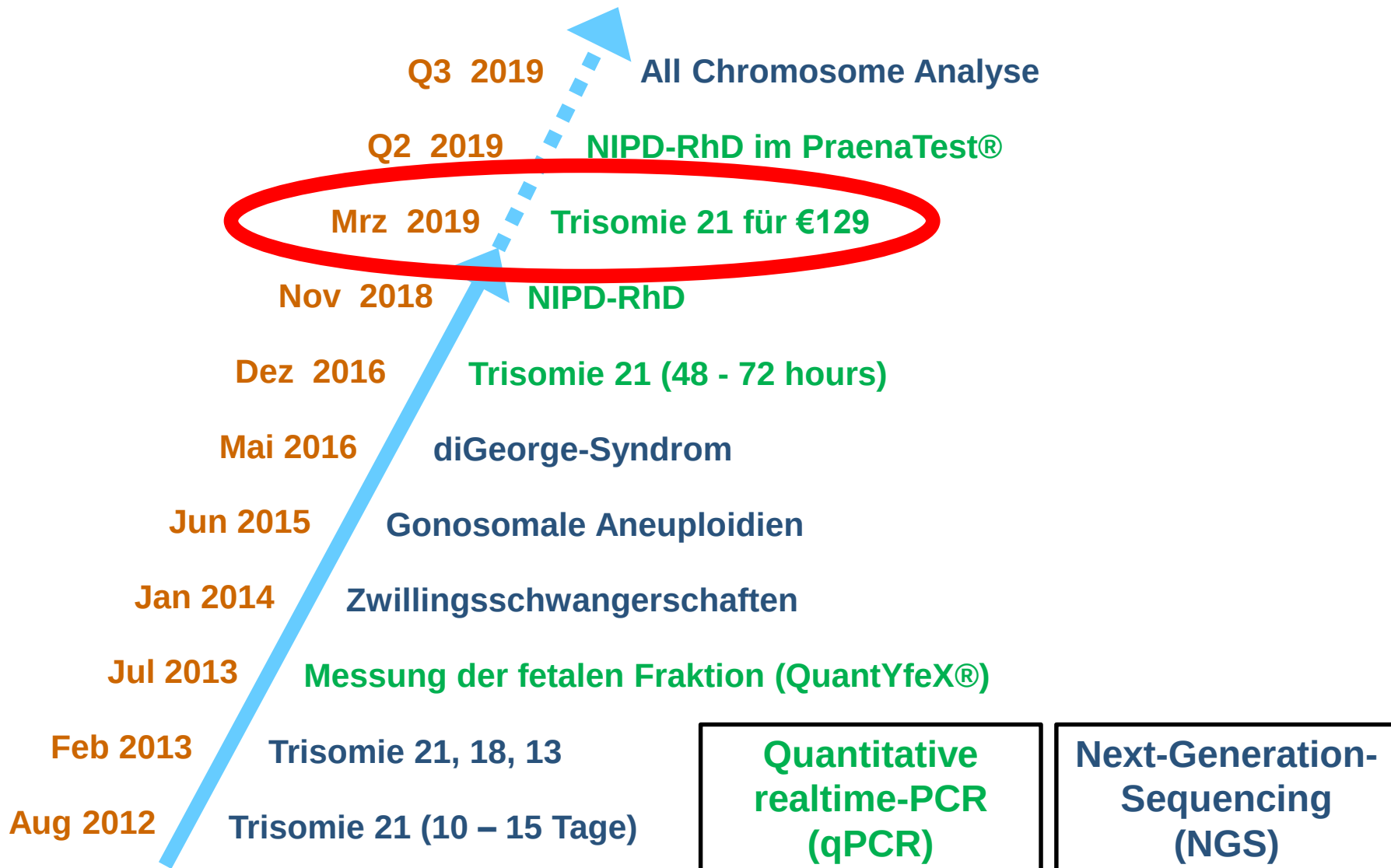
Quantitative
realtime-PCR
(qPCR)

Next-Generation-
Sequencing
(NGS)



Quantitative
realtime-PCR
(qPCR)

Next-Generation-
Sequencing
(NGS)



Ziel: NIPT für jede schwangere Frau ermöglichen

Ziel: NIPT für jede schwangere Frau ermöglichen

T21 BASIC

Screeningtest zur nicht invasiven pränatalen
Bestimmung der Trisomie 21

bei Einlingsschwangerschaft

Blutentnahme-Set für eine Patientin

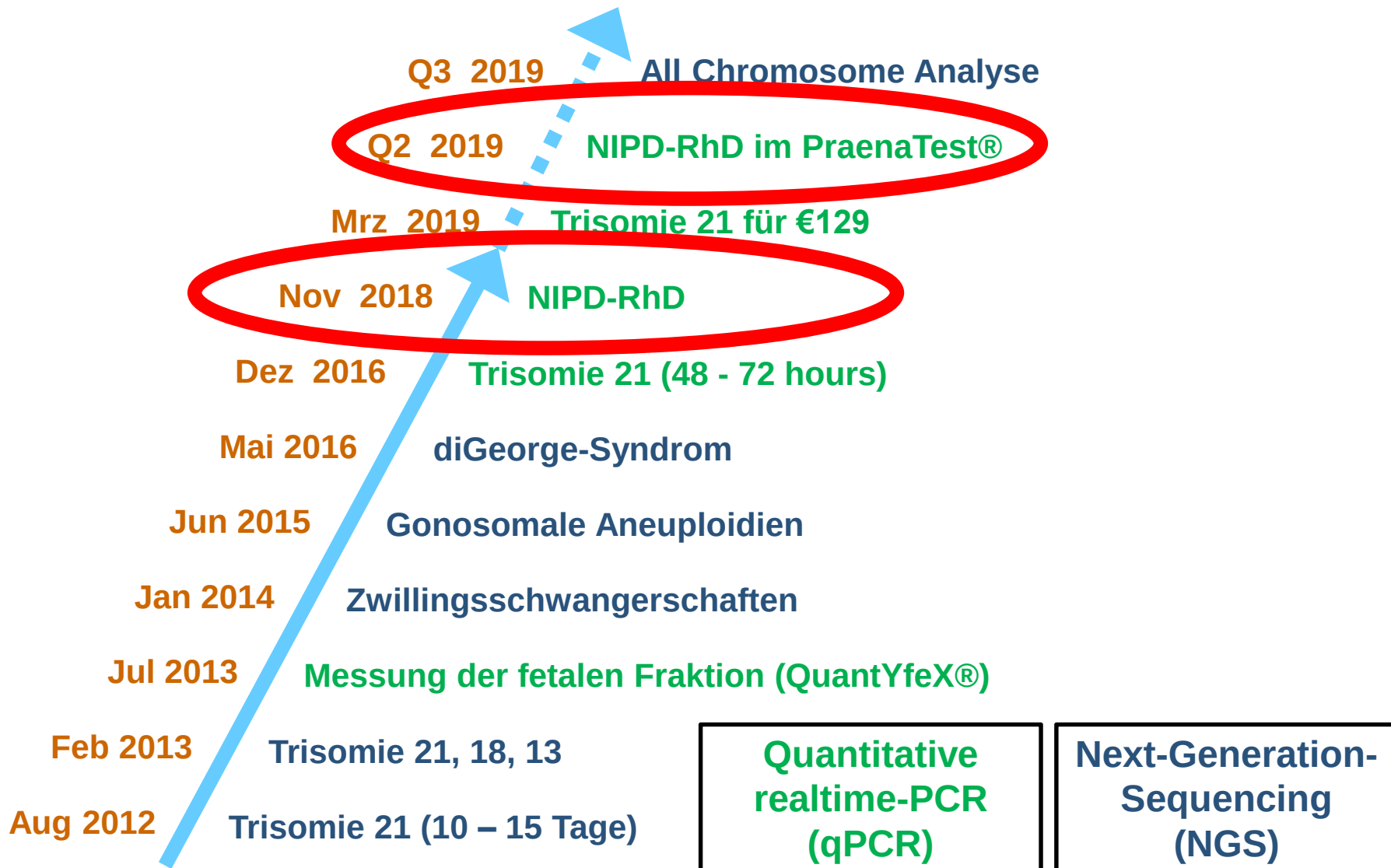
 eurofins | LifeCodexx

129 €

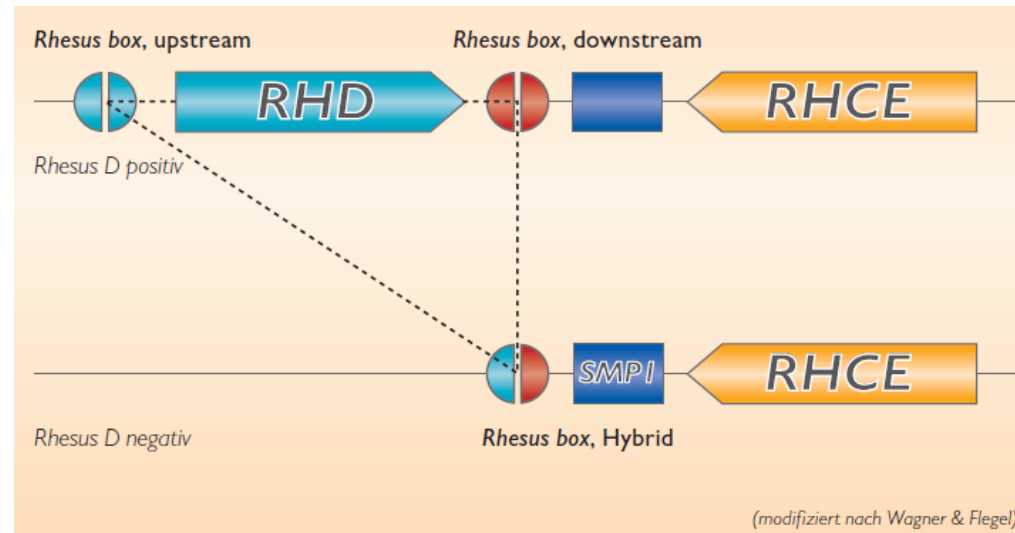
inkl. MwSt. und Versand
gültig für Deutschland
ab 01. März 2019

T21 BASIC

Prävalenz T21 positive-Fälle	1,34 %
Sensitivität	98,92 %
Spezifität	99,99 %
PPV	99,46 %
NPV	99,99 %



- Das Rhesus-System stellt neben dem AB0-System das wichtigste Blutgruppensystem dar
- Im Wesentlichen unterscheidet man mit D-positiven und D-negativen Individuen zwei Rhesus-D-Serotypen
- Beide Rhesus-Gene RhD und RhCE auf Chromosom 1 an Position 1p36.13-p34.3 in Tandemanordnung lokalisiert, umfassen zusammen 69 kB
- RhD und RhCE zu 97% identisch (Differenz besteht aus 41 Codons)
- Das RhD-Gen wird von zwei DNA-Segmenten, den sogenannten Rhesus-Boxen, flankiert
- Die Rhesus-Boxen beinhalten 1463 bp umspannende identische Regionen (*identity regions*), in denen Bruchpunkte für eine Deletion des kompletten RhD-Gens lokalisiert sind

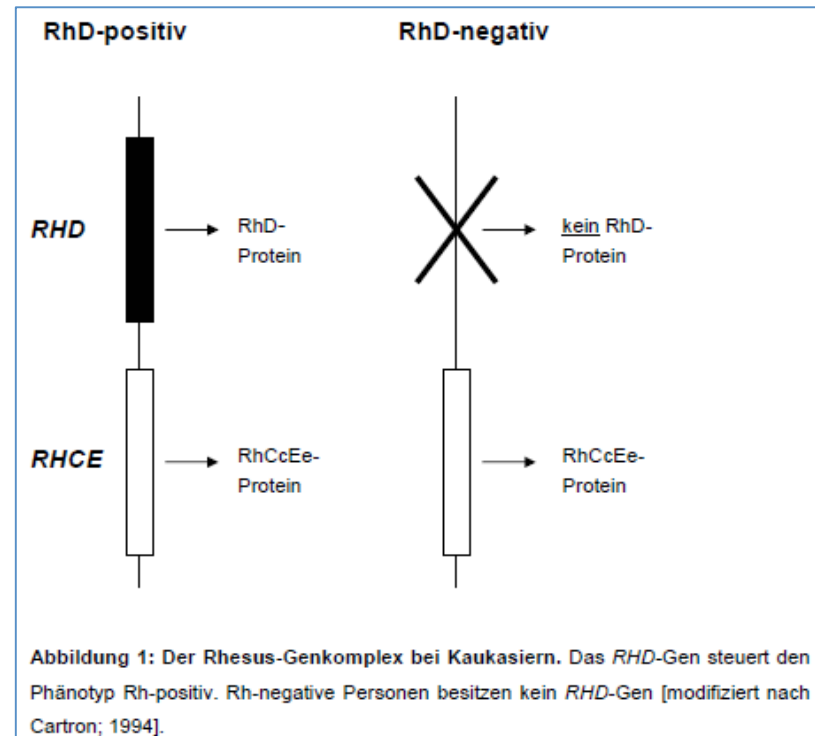


https://www.drk-haemotherapie.de/data/ausgabe_7/beitraege/Rhesus_D-Diagnostik_07_06.pdf

- Ca. 18 Prozent der Europäer sind serologisch D-negativ
- Bei fast allen sind die für das RHD-Gen spezifischen Sequenzen im Genom aufgrund einer Deletion nicht nachweisbar
- Unter Afrikanern (< 7 Prozent) und Asiaten (< 1 Prozent) sind D-negative Individuen seltener
- Das RhD-Gen ist bei den meisten D-negativen Afrikanern als Pseudogen zu finden
- Gene werden in Proteine translatiert:

RhD-negativ: RhCcEe-Protein

RhD-positiv: RhD- und RhCcEe-Protein



<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2002/879/pdf/d020179.pdf>

Relevanz des Rhesus-Systems in der Schwangerschaft

- ➔ Gelangen Rhesus-positive Erythrozyten des Fetus in das Blut einer Rhesus-negativen Mutter, werden Anti-D-Antikörper gebildet
 - Die Gefahr einer Sensibilisierung ist im dritten Trimenon am höchsten
- ➔ In einer darauffolgenden Schwangerschaft mit einem Rhesus-positiven Kind greift das Immunsystem der Mutter die Erythrozyten des Fetus an

Eine Rhesus-Unverträglichkeit zwischen Mutter und Fetus führt zu einem Morbus haemolyticus neonatorum/fetalis

Folgen sind u.a. Blutarmut, Unterversorgung mit Sauerstoff, Herzinsuffizienz

Klassifikation eines Rhesus D-bedingten Morbus haemolyticus neonatorum (Nach 3)

Schweregrad	Bezeichnung	Klinische Merkmale
Leicht	Anaemia neonatorum	Mäßige Anämie
Mittel	Icterus gravis	Hyperbilirubinämie
Schwer	Anaemia gravis	Schwere Anämie, Hyperbilirubinämie, keine Ödeme
Schwer	Hydrops fetalis	Ödeme, Ascites, Pleura-, Perikarderguss

http://www.drk-haemotherapie.de/data/ausgabe_7/beitraege/Rhesus_D-Diagnostik_07_06.pdf

Vorsorge in Deutschland: Status Quo

→ Die zweistufige Prophylaxe wird zu 100% von der Krankenkasse getragen

- Stufe 1: Alle Rhesus-negativen Schwangeren in SSW28-30
- Stufe 2: Postpartal für Rhesus-negative Mütter innerhalb von 24-72 h nach Geburt eines Rhesus-positiven Kindes

→ Immunisierung basiert auf der Gabe von Anti-D-Hyperimmunglobulin (z.B. Rhophylac® 300)

- Gewonnen aus menschlichem Blut (limitiert verfügbare Ressource)
- Trotz Testung kann die Übertragung von Erregern nicht vollständig ausgeschlossen werden
- Pot. Nebenwirkungen

Systemorganklasse (SOC, MedDRA)	Nebenwirkung (MedDRA PT)	Häufigkeit der Nebenwirkung
Erkrankungen des Immunsystems	Überempfindlichkeitsreaktion, anaphylaktischer Schock	Selten
Erkrankungen des Nervensystems	Kopfschmerz	Gelegentlich
Herzerkrankungen	Tachykardie	Selten
Gefäßerkrankungen	Blutdruckabfall	Selten
Erkrankungen der Atemwege, des Brustraums und des Mediastinums	Dyspnoe	Selten
Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes	Übelkeit, Erbrechen	Selten
Erkrankungen der Haut und des Unterhautzellgewebes	Hautreaktion, Erythem, Pruritus	Gelegentlich
Skelettmuskulatur-, Bindegewebe- und Knochenerkrankungen	Arthralgie	Selten
Allgemeine Erkrankungen und Beschwerden am Verabreichungsort	Fieber, Unwohlsein, Schüttelfrost	Gelegentlich
	An der Injektionsstelle: Schwellung, Schmerz, Erythem, Verhärtung, Wärme, Pruritus, Hautausschlag	Selten

Tabellarische Aufstellung der Nebenwirkungen von Rhophylac® 300

IQWiG: Pränataler Test ist gleichwertig zum postnatalen Test

In ihrem Abschlussbericht (März 2018)¹⁰ bescheinigt das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) der nicht invasiven pränatalen Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität. Aufgrund der hohen Sensitivität des Tests sei nur mit einer geringen Anzahl an präpartal fälschlicherweise nicht gegebenen Anti-D-Prophylaxen zu rechnen. Zudem erzeugten auch die postnatalen Tests falsch-negative Ergebnisse in ähnlicher Größenordnung wie die pränatalen Tests. Daher sei der pränatale Test gleichwertig zum postnatalen Test.

NIPD-RhD

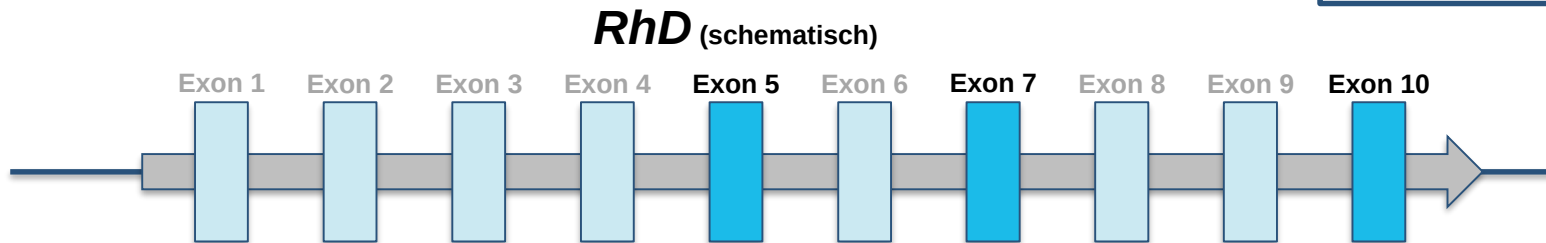
Nicht invasive pränatale
RhD-Bestimmung

„Eine Anti-D-Prophylaxe bei der Schwangeren ist nicht notwendig, wenn der Fetus mit einem validierten Verfahren RhD-negativ bestimmt wurde. Nach der Geburt ist das Merkmal RhD, vorzugsweise aus Nabelschnurblut, zu bestimmen.“

– Hämotherapie-Richtlinie der Bundesärztekammer, 2017

NIPD-RhD Test der Eurofins LifeCodexx (CE-IVD)

Sensitivität*: 100%
Spezifität*: 95,1%

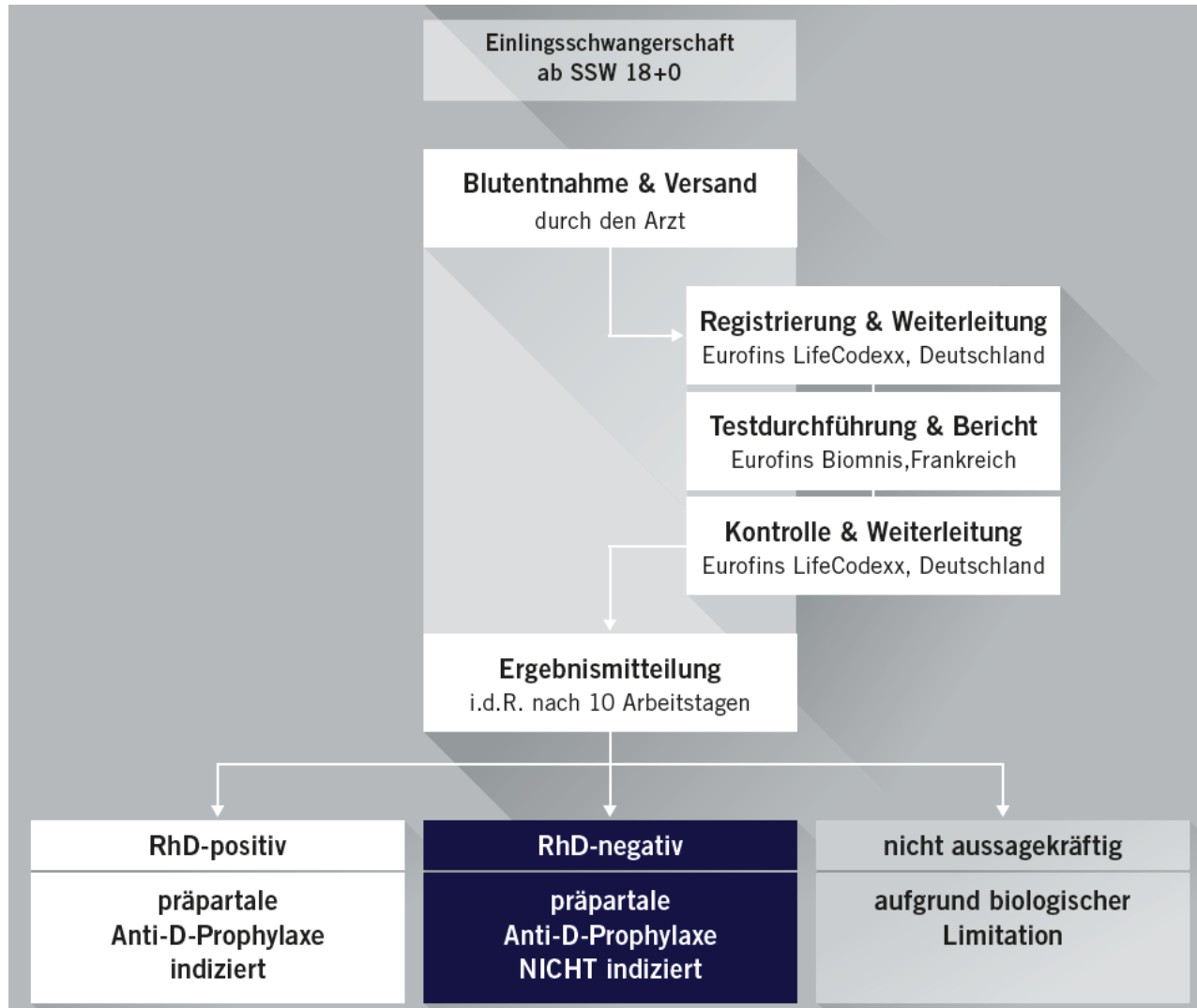


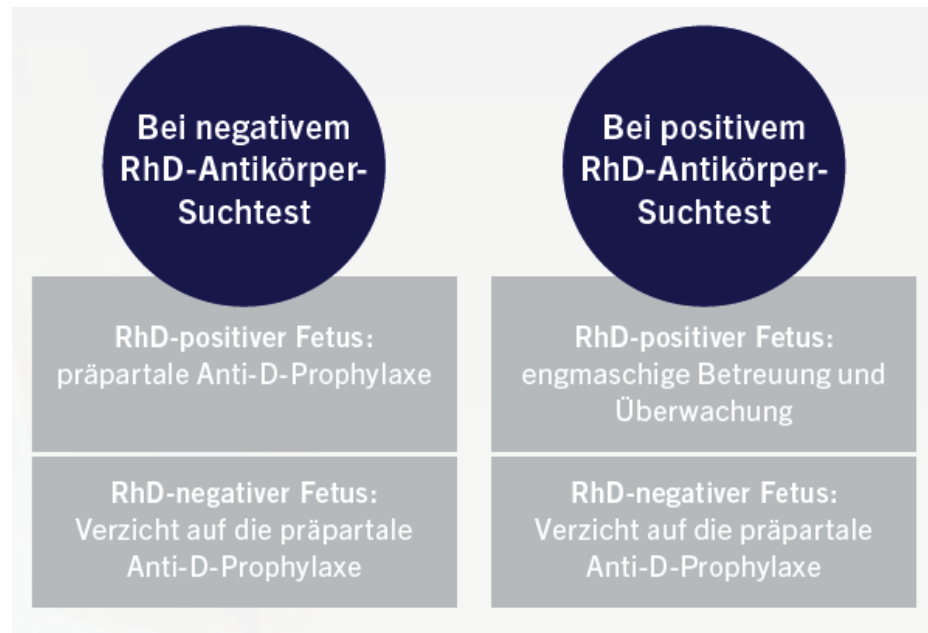
Es werden drei separate Reaktionen durchgeführt, um verschiedene Regionen des RhD-Gens nachzuweisen (Exon 5, Exon 7, Exon 10)

- Ermöglicht die Detektion möglichst vieler Varianten des RhD-Gens
- Kann keins der Exons detektiert werden, ist der Fet RhD(-)
- Sobald ein Exon detektiert werden kann, wird der Fet als RhD(+) angenommen

* Instruction manual: Institut de Biotechnologies Jaques Boy. Free DNA Fetal KitR RhD. Noninvasive fetal RHD genotyping from free fetal DNA in maternal RhD-Negative pregnant women blood (Real-Time PCR). Product identification: 502080233. Manual version 16/03/2018.

Testablauf:

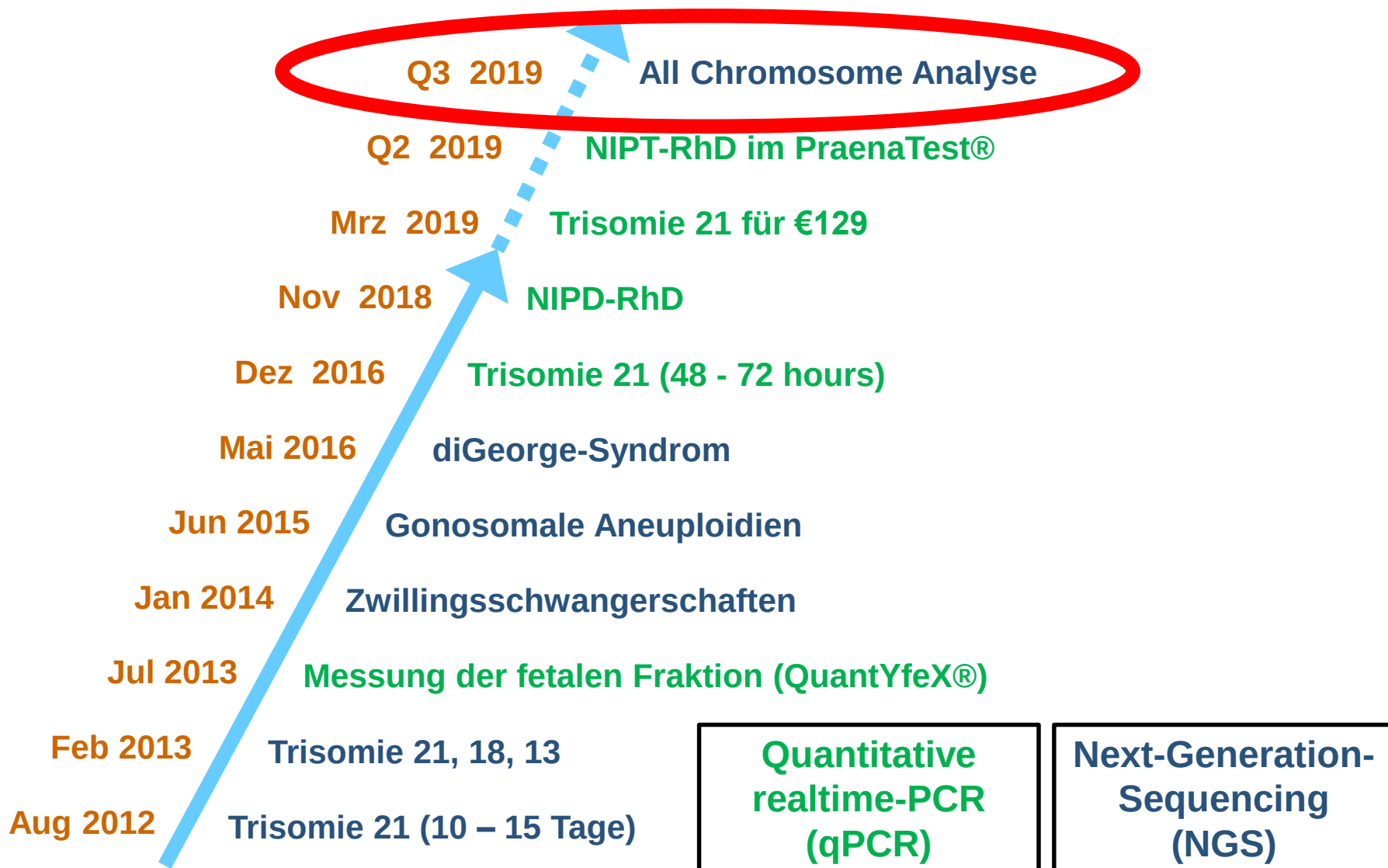




Für RhD negative Schwangere

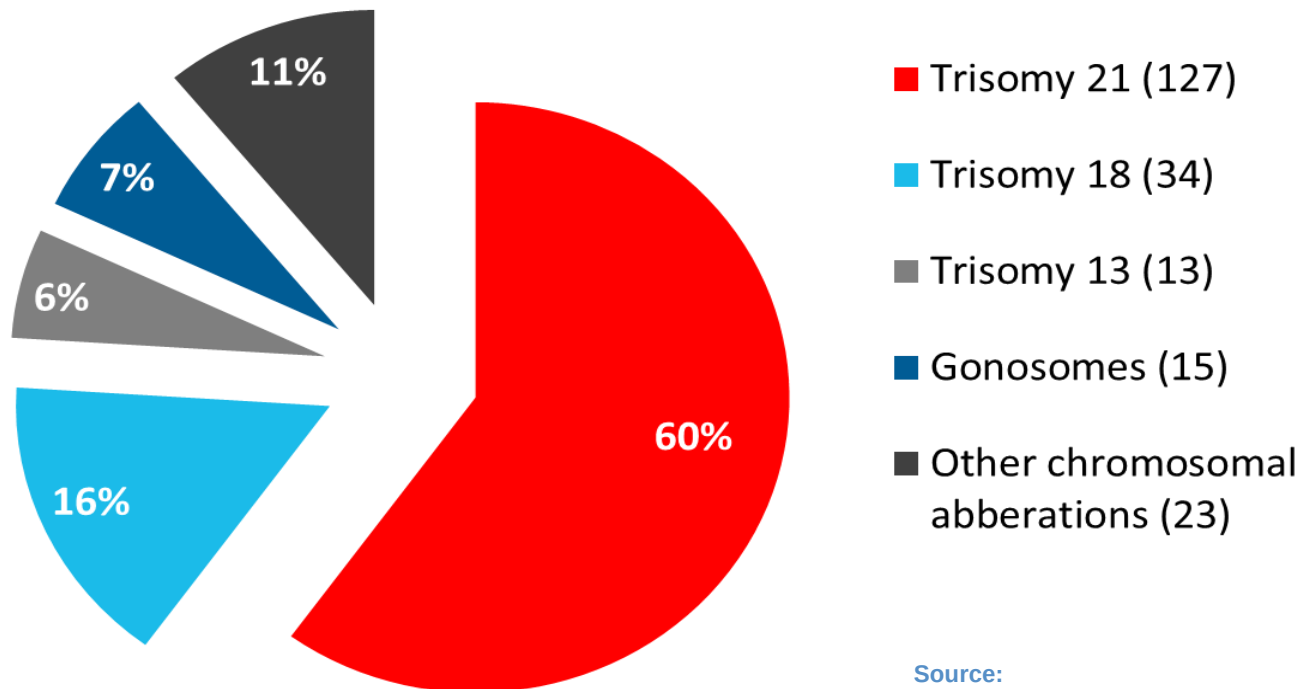
- Hohe Sicherheit gegenüber falsch negativen Ergebnissen
- Vermeidung unnötiger Anwendung von humanem Anti-D
- Unabhängigkeit von der Verfügbarkeit von Anti-D

Testkosten: €149 (inkl. MwSt & Versand)



Häufigkeit von Aneuploidien im ersten Trimester

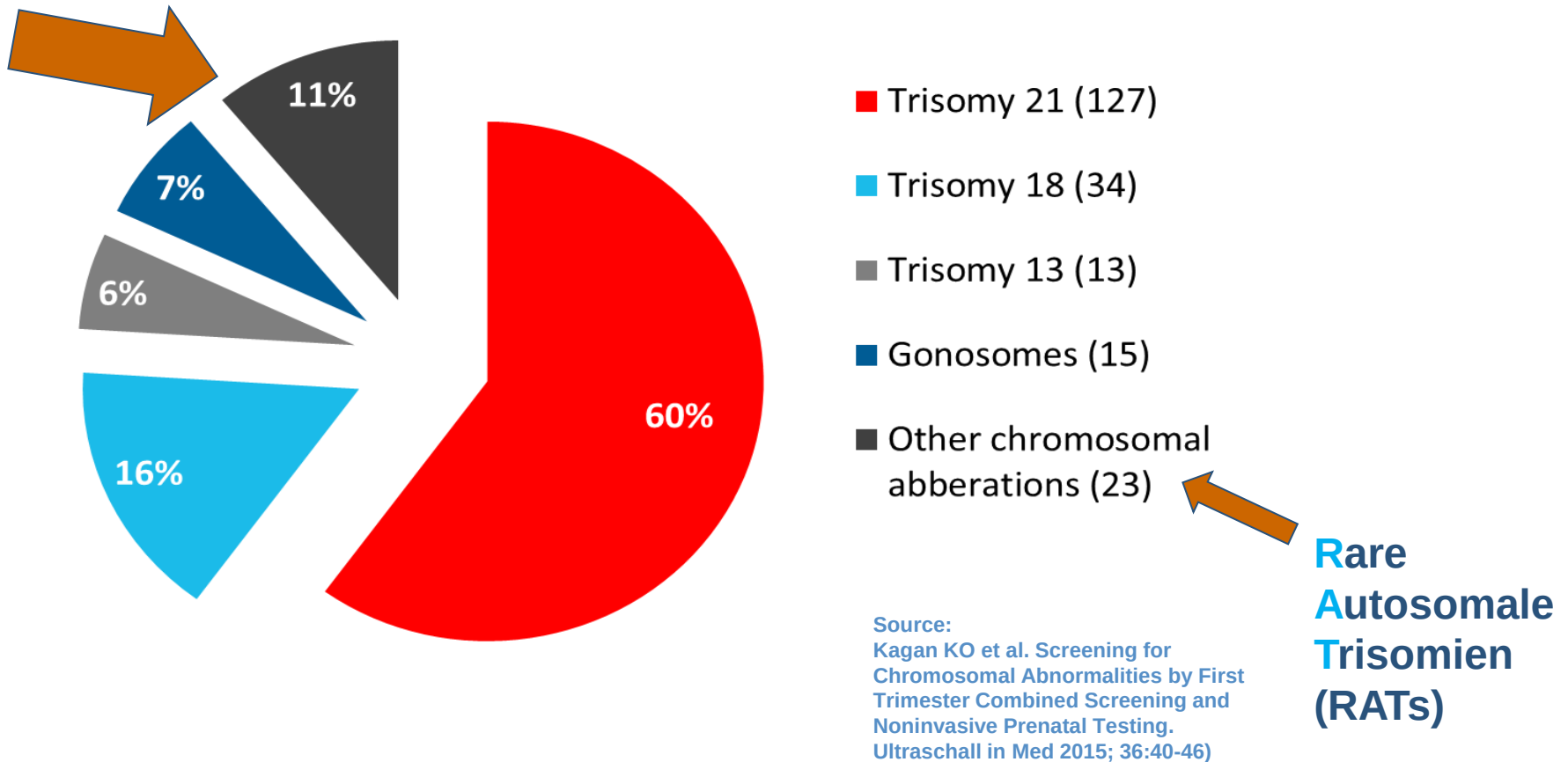
- Retrospektive Studie mit 21.052 Schwangeren
- Aneuploidien: 212 Fälle (100%)



Source:
Kagan KO et al. Screening for
Chromosomal Abnormalities by First
Trimester Combined Screening and
Noninvasive Prenatal Testing.
Ultraschall in Med 2015; 36:40-46)

Häufigkeit von Aneuploidien im ersten Trimester

- Retrospektive Studie mit 21.052 Schwangeren
- Aneuploidien: 212 Fälle (100%)



Studie mit 16.885 Schwangeren:

Table 4. Clinical outcome data for cohort 2 cases with RATs. Misc., miscarriage; MCA, multiple congenital abnormalities; NLB, normal live birth; NA, follow-up not available; Mat, maternal; Av., average; TF, trisomic fraction; FF, fetal fraction.

	Missed or early misc.	TFM	UPD	IUFD	IUGR	MCA	NLB	NA	Mat	Total
Trisomy 2		3	(2*)	1	(1*, 1 [†])		1			5
Trisomy 3							1	1		2
Trisomy 4			2	1						3
Trisomy 5								1		1
Trisomy 7		1			(1*)		5	3		9
Trisomy 8							1	1	1	3
Trisomy 9	1				1	1	1			4
Trisomy 10	1						2			3
Trisomy 14	1									1
Trisomy 15	13		1							14
Trisomy 16	2	1	2	(2 [‡])	(1 [‡])		2			7
Trisomy 20	1				1			1		3
Trisomy 22	3	1 [§]					1	1		5
Total	22	5 (+1 [§])	5 (+2*)	2 (+2 [‡])	2 (+4* ^{†‡})	1	14	8	1	60

*Pertile et al., Sci. Transl. Med. 9, eaan1240 (2017)

RATs:

- Häufigkeit: ca. 3-4 von 1000 Schwangerschaften betroffen
- Schwangerschaften mit identifizierten RATs sind assoziiert mit*:
 - Abort
 - intrauteriner Fruchttod
 - intrauterine Wachstumsretardierung
 - Fetale Mosaik
 - Uniparentaler Disomie

Eurofins LifeCodexx: Einführung eines *all chromosome* Tests geplant in Q3 2019.

*Pertile et al., Sci. Transl. Med. 9, eaan1240 (2017)

Was ist technologisch / methodisch möglich?

Was ist technologisch möglich?

**NIPT (Trisomien) derzeit:
ca. 0,1x Genomabdeckung**



Genomische DNA

NIPT (Trisomien) derzeit: ca. 0,1x Genomabdeckung

Genomische DNA

Article | Published: 04 July 2012

Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome

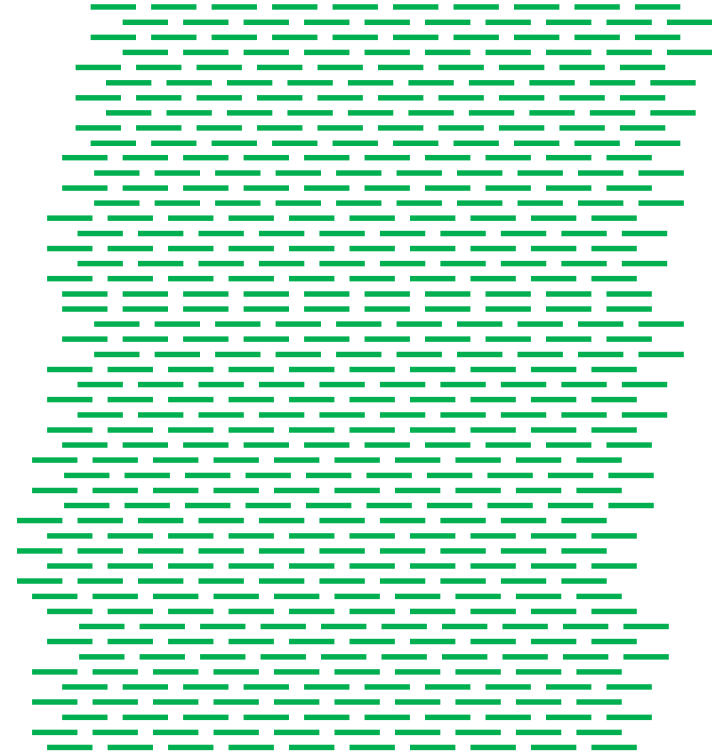
H. Christina Fan, Wei Gu, Jianbin Wang, Yair J. Blumenfeld, Yasser Y. El-Sayed & Stephen R. Quake 

Nature **487**, 320–324 (19 July 2012) | [Download Citation](#) 

ca. 50x Genomabdeckung

→ Es ist möglich, nicht-invasiv das gesamte
fetale Genom zu sequenzieren

Genomische DNA



**NIPT (Trisomien) derzeit:
ca. 0,1x Genomabdeckung**

Genomische DNA

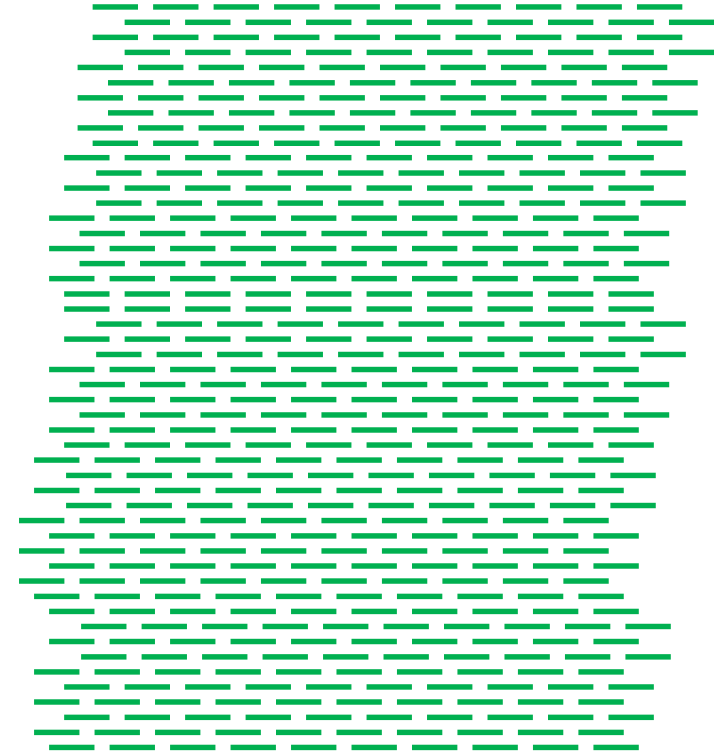
**Second generation noninvasive fetal
genome analysis reveals de novo
mutations, single-base parental inheritance,
and preferred DNA ends**

K. C. Allen Chan, Peiyong Jiang, Kun Sun, Yvonne K. Y. Cheng, Yu K. Tong, Suk Hang Cheng, Ada I. C. Wong, Irena Hudecova, Tak Y. Leung, Rossa W. K. Chiu, and Yuk Ming Dennis Lo

PNAS December 13, 2016 113 (50) E8159-E8168; published ahead of print October 31, 2016 <https://doi.org/10.1073/pnas.1615800113>

ca. 270x Genomabdeckung

Genomische DNA



Bayesian-based noninvasive prenatal diagnosis of single-gene disorders

Tom Rabinowitz,¹ Avital Polsky,¹ David Golan,² Artem Danilevsky,¹ Guy Shapira,¹ Chen Raff,¹ Lina Basel-Salmon,^{1,3} Reut Tomashov Matar,³ and Noam Shomron¹

¹Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, 6997801, Israel; ²Faculty of Industrial Engineering and Management, Technion, Haifa, 3200003, Israel; ³Raphael Recanati Genetic Institute, Rabin Medical Center, Beilinson Hospital, Petah Tikva, 4941494, Israel

Genome Res. 2019 Feb 20. doi: 10.1101/gr.235796.118.

→ Entwicklung bioinformatischer Methoden zur verbesserten Interpretation von Daten auch bei geringen Readzahlen.

Zitat Noam Shomron:

“This is like looking at a map of the world and noticing not only that a continent is missing, but also that a single house is missing. We see even the smallest changes. We offer a huge-fold better resolution,” he said.

Kurz- und mittelfristig:

- Integration NIPD-RhD in PraenaTest® ab SSW11+0
- Analyse sämtlicher Chromosomen in D
- Evtl. Kassenzulassung NIPT

Längerfristig:

- technologisch / methodisch ist bereits sehr vieles möglich
- sinnvolle Grenzen der nicht-invasiven Untersuchungen müssen definiert werden
- Regulation durch Gesetzgeber (GenDG)

Vielen Dank.

Fragen?

s.busche@lifecodexx.com