

Masterthesis

Paradigmenwechsel in der
Pränataldiagnostik

Invasive und nicht invasive Methoden
im Wandel der Zeit

eingereicht von

Monika Artl, MSc

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

(MSc)

Medizinische Universität Graz

Institut für Humangenetik

Unter der Anleitung von

Assoz. Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Mag.^a Dr.ⁱⁿ rer.nat. Ellen Heitzer

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, Februar 2018

Monika Artl, MSc

In Dankbarkeit meiner Familie

ZUSAMMENFASSUNG

Genetische Untersuchungen in der Schwangerschaft sind heutzutage ein fester Bestandteil der Pränataldiagnostik. Die Untersuchungsmöglichkeiten haben sich in den letzten ein bis zwei Jahrzehnten wesentlich verändert. Derzeit steht nicht nur eine Vielzahl an unterschiedlichen Methoden zur Verfügung, auch die steigende Sensitivität von Technologien eröffnet neue Untersuchungsmöglichkeiten. So sind beispielsweise Next Generation Sequencing Ansätze geeignet zirkulierende fetale DNA aus mütterlichem Plasma zu analysieren, und somit mittels minimal invasiven Methoden eine Aussage über den genetischen Status des ungeborenen Kindes treffen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Literaturrecherche zu den derzeit gängigen Methoden in der Pränataldiagnostik durchgeführt. Es wird ein Überblick der klassischen Methoden, wie der Zytogenetik und invasiven Eingriffen geliefert. Der Bogen wird weiter bis hin zu molekulargenetischen Methoden und dem nicht invasiven Pränataltest (NIPT) gespannt.

Der Umbruch von invasiven Pränataltests und/oder Eingriffen hin zu nicht invasiven Screeningtests als fixe Bestandteile der Schwangerschaftsbegleitung oder gar einem Ersatz der etablierten Untersuchungsmethoden ist nicht unumstritten. Im Rahmen der Arbeit werden die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen pränatalen Untersuchungsmethoden herausgearbeitet, um eine objektive Beurteilung des Feldes zu ermöglichen.

Invasive Untersuchungsmethoden sind in der Pränataldiagnostik nach wie vor der Goldstandard. Die heute verfügbaren Screeningtest scheinen, bei entsprechender Indikation, invasive Methoden nicht vollständig abzulösen. Dennoch herrscht eine deutliche Tendenz invasive Eingriffe möglichst zu reduzieren. Vor allem bei einer Verdachtsdiagnose auf eine der häufigsten Trisomien (13, 18 und 21) kann ein invasiver Eingriff durch vorangehende Durchführung einer nicht invasiven Untersuchungsstrategie vermieden werden. Das gut etablierte Ersttrimesterscreening, oftmals als Combined Test bezeichnet, lieferte dazu in den vergangenen Jahren einen signifikanten Beitrag. Der neuere NIPT bringt vor allem bei der Feststellung der häufigsten Trisomien 13, 18 und 21 eine weitere Reduktion von invasiven Eingriffen und stellt somit eine sinnvolle Ergänzung zu den bisherigen Methoden dar.

ABSTRACT

Genetic analysis during pregnancy has become an integral part of prenatal diagnosis. However, the analysis methods have changed in the past decades. Today a plenty of different methods are available and the sensitivities of each technology has significantly improved over the last years. This enables for example the determination of the genetic status of an unborn child by the analysis of circulating fetal DNA derived from maternal plasma.

In the present work, a literature search was conducted in order to present the current methods of prenatal diagnosis and to provide an overview of methods such as cytogenetic analysis after invasive diagnostic procedures as well as modern molecular genetic approaches like noninvasive prenatal testing.

The change from invasive prenatal tests and/or interventions to non-invasive screening tests as fixed components of maternity care or even a replacement of the established analysis methods is controversial discussed. In the course of this thesis, advantages and disadvantages of different prenatal examination methods were summarized and critically discussed in order to enable an objective assessment.

Performance of invasive analysis methods is still the gold standard in prenatal diagnostics. With appropriate indication, the currently available screening tests do not seem to completely replace invasive methods. Nevertheless, there is a clear tendency to reduce the utilization of invasive procedures. For example, the screening for trisomies 13, 18 and 21 using noninvasive analysis strategies could easily save women to undertake an invasive manipulation. The well-established first trimester screening, often referred to as a combined test, has made a significant contribution in recent years. The new NIPT brings a further reduction of invasive procedures, especially in determining the most frequent trisomies 13, 18 and 21, and thus represents a useful supplement to the previous methods.

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	1
2	<i>EINLEITUNG</i>	2
3	<i>METHODEN</i>	6
4	<i>ERGEBNISSE</i>	7
4.1	Untersuchungsmaterialien	7
4.1.1	Fruchtwasser	7
4.1.2	Chorionzotten.....	7
4.1.3	Fetales Nabelschnurblut	8
4.1.4	Mütterliches Blut.....	8
4.1.5	Polkörper, Blastomere und Trophektodermzellen.....	9
4.1.6	Fetales Gewebe	12
4.2	Methoden der Pränataldiagnostik	13
4.2.1	Invasive Methoden	13
4.2.2	Nicht (minimal) invasive Methoden.....	17
4.2.3	Zytogenetische Methoden	20
4.2.4	Molekulargenetische Methoden	23
5	<i>DISKUSSION</i>	35
6	<i>LITERATUR</i>	45

2 EINLEITUNG

Der Wunsch nach einem gesunden Baby ist wohl die große Hoffnung von werdenden Eltern. Um diesen sehnlichsten Wunsch für Familien schon relativ früh in der Schwangerschaft mit einer hohen Treffsicherheit für häufige Erkrankungen bestätigen oder ausschließen können, liefern die vorgeburtlichen Untersuchungsmöglichkeiten heutzutage bereits eine Vielzahl an unterschiedlichen Analysen.

Unter dem Begriff Pränataldiagnostik versteht man üblicherweise alle Untersuchungen am ungeborenen Kind mit dem Ziel, Informationen über den Fötus bzw. dessen Gesundheitszustand zu gewinnen. Dazu zählen vor allem die gut etablierte, aber dennoch recht junge Ultraschalldiagnostik, sowie alle humangenetischen Untersuchungsmethoden und im weiteren Sinne auch die sogenannte Präimplantationsdiagnostik - die Untersuchung von Zellen aus dem entstehenden Embryo nach künstlicher Befruchtung. All diese Methoden haben gemeinsam, dass die Auflösungsgrenzen aufgrund technischer Errungenschaften in den letzten Jahren signifikant gestiegen sind und sich auch in absehbarer Zeit noch wesentlich verbessern werden.

Diese rasante Entwicklung in der Pränataldiagnostik hat in den letzten Jahren eine Vielzahl an innovativen humangenetischen Methoden hervorgebracht. Die Analyse unterschiedlicher Parameter, deren Untersuchung vor einigen Jahren noch undenkbar war, gehört heute bereits zur Routine in der Begleitung einer Schwangerschaft. Viele dieser Entwicklungen durfte ich persönlich von labortechnischer Seite mitverfolgen und im Rahmen meiner beruflichen Tätigkeit selbständig am Institut für Humangenetik in Graz etablieren. Das so gewachsene Interesse an dieser Thematik wurde in den vergangenen Jahren durch die Geburt meiner eigenen Kinder und den damit verbundenen Entscheidungen für oder gegen ebensolche Untersuchungen noch zusätzlich verstärkt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den unterschiedlichen Untersuchungstechniken in der Pränatalmedizin und soll einen Überblick über die geläufigsten Methoden sowie deren Vor-, und Nachteile liefern. Die historische Entwicklung der Techniken soll ebenso umrissen werden, wie ein Ausblick auf zukünftig mögliche Untersuchungsmethoden.

Die Entwicklung der Labormethoden hat fast ausschließlich in den letzten vier bis fünf Jahrzehnten stattgefunden. Die pränatale Diagnostik ist damit eine relativ junge Disziplin, welche erst in den späten 1960-er Jahren ihre Anfänge genommen hat. Als die Pioniere des Ultraschalls im deutschen Sprachraum gelten Hansmann und Kratochwil (Klink et al. 1971, Kratochwil 1970), welche sich mit der Ultraschallbildgebung in der Schwangerschaft beschäftigt haben. Erste

klinische Verwendung von US-Geräten gab es ab Anfang der 1970-er Jahre. Zunächst beschränkte sich die Diagnostik auf die Feststellung von Zwillingsschwangerschaften. Bald jedoch zählte auch die Messung des Biparietaldurchmessers zur Bestimmung des Gestationsalters bzw. zur Einschätzung des Geburtstermins und zur Feststellung von Wachstumsstörungen zum erweiterten Spektrum der Ultraschalluntersuchungen in der Schwangerschaft. Doch auch die Erkennung von Fehlentwicklungen wie Blasenmole oder die sogenannte „missed abortion“ und der Ausschluss einer extrauterinen Schwangerschaft wurden schnell zum fixen Bestandteil in der Ultraschalldiagnostik (Persson et al. 1978).

Parallel dazu nahmen die Entwicklungen der genetischen Diagnostik in den späten 1950-er und frühen 1960-er Jahren ihren Anfang. Fuchs und Riis publizierten 1956 in Nature die Geschlechtsbestimmung mittels Barrschen Körperchens aus Amnionzellen (Fuchs et al. 1956). Dies zeigte erstmal einen genetischen Zugang zum ungeborenen Kind. Da es zu diesem Zeitpunkt noch keine klassische Chromosomenanalyse aus Blutzellen gab, stand lediglich die Geschlechtsbestimmung zur Vorhersage von X-chromosomal vererbten Krankheiten im Fokus der Untersuchung. Die weitere Entwicklung von genetischen Analysen aus Fruchtwasserzellen nahm eher einen langsamen Verlauf. Erst 10 Jahre später wurden von Breg und Steele Fruchtwasserzellen erfolgreich kultiviert (Steele, Breg 1966). Erste vorgeburtliche genetische Analysen konnten gegen Ende der 1960-er Jahre durchgeführt werden (Valenti et al. 1968, Nadler 1968).

Die Chorionzottenbiopsie (CVS, engl. Chorionic Villus Sampling), sowie die damit verbundenen Methoden wie Entnahmetechnik und Kultivierung der Zellen, wurden erst in den frühen 1980-er Jahren für den Einsatz in der Routinediagnostik brauchbar (Ward et al. 1983, Simoni et al. 1983). Die CVS erweiterte das Spektrum in der Pränataldiagnostik wesentlich, da sowohl eine Untersuchung in der Frühschwangerschaft wie auch eine Direktpräparation von Chromosomen aus den entnommenen Chorionzotten ermöglicht wurden. Speziell die Direktpräparation erlaubte erstmals eine Diagnosestellung innerhalb von ein bis zwei Tagen.

In Österreich und Deutschland nahm die angewandte Zytogenetik in etwa seit Anfang der 70-er Jahre ihren Ausgang. Die großen Herausforderungen in den Anfängen der Pränataldiagnostik bestanden in erster Linie in der Entnahmetechnik sowie der erfolgreichen Kultivierung der entnommenen Zellen. Das mit einer Entnahme verbundene Abortrisiko wurde zunächst recht hoch eingeschätzt. Mittlerweile finden Punktionen des Fruchtwassers oder der Chorionzotten fast ausschließlich in hochspezialisierten Instituten oder zentralen Krankenhäusern statt, sodass die Abortrate heutzutage mit unter einem Prozent beziffert wird.

Gegen Ende der 1980-er Jahre fand die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) schließlich auch in der Pränataldiagnostik ihre Anwendung (Pinkel et al. 1988, Kuo et al. 1991). Die Möglichkeit der Analyse von unkultivierten Zellen beschleunigte die Diagnostik und lieferte erste Ergebnisse, insbesondere hinsichtlich einer konkreten Indikation bei Verdacht auf die häufigsten Trisomien 13, 18, 21 innerhalb von 24 Stunden. Diese Methode sollte für viele Jahre der Goldstandard in der pränatalen Schnell Diagnostik bleiben und wurde erst Mitte der 90-er Jahre von der molekularen Technik der quantitativen Fluoreszenz-PCR (QF-PCR) abgelöst (Adinolfi et al. 1995, Pertl et al. 1996)

Die von Kallioniemi et al. (Kallioniemi et al. 1992) publizierte, vergleichende genomische Hybridisierung (engl. comparative genomic hybridization) und die sich daraus entwickelnde Array-Technik (aCGH) revolutionierte die pränatale Diagnostik ganz wesentlich. Je nach Auflösungsvermögen des verwendeten Arrays oder Chips wurde eine Untersuchung des Genoms bis auf wenige 100 Kilobasen möglich. Damit konnten auch bereits sehr kleine Zugewinne oder Verluste von genetischen Material detektiert werden. Fortan war es möglich, nicht nur die häufigsten Trisomien, sondern vielmehr das gesamte Genom innerhalb einer einzigen Analyse darzustellen, wodurch es auch zu einem vermehrten Auftreten von indikationsunabhängigen Zufallsbefunden kommen kann, was zu einer gewissen Problematik im Umgang mit solchen führt. Außerdem wurden auch seitens der beratenden Fachärzte für Medizinische Genetik große Bedenken hinsichtlich der Interpretation von bisher noch nicht oder nur vage beschriebenen Aberrationen laut (Held et al. 2014). Obwohl sich also die aCGH nur sehr langsam durchgesetzt hat, zählt sie heute dennoch zu einem fixen Bestandteil der Diagnostik bei festgestellten fetalen Auffälligkeiten im Ultraschall.

Die Anwesenheit von fetalen Zellen im mütterlichen Blutkreislauf während der Schwangerschaft wurde erstmals von Weiner et al. 1958 beschrieben (Weiner et al. 1958). In den ersten Arbeiten lag der Fokus aber nicht primär auf genetischen Analysen, sondern vielmehr auf der immunologischen Bedeutung hinsichtlich einer potentiellen Rhesusunverträglichkeit.

Zunächst wurde nach fetalen Zellen im mütterlichen Kreislauf gesucht. Die Konzentration von ca. 1:100.000 Zellen hat sich aber als sehr gering und in weiterer Folge als methodisch höchst aufwendig erwiesen. Die vergleichsweise niedrigen Detektionsraten (75%) bzw. Falsch-Positiv-Raten (0,6 – 4,1 %) zeigten keine überzeugenden Resultate. Zusätzlich bleiben fetale Zellen einer Schwangerschaft oft viele Jahre im mütterlichen Kreislauf und können so bei einer erneuten Schwangerschaft die Analyse wesentlich beeinflussen. Daher wird die Analyse von fetalen Zellen aus mütterlichen Blut kaum oder gar nicht zur Diagnosestellung eingesetzt (Bianchi et al. 2002).

In den frühen 1990-er Jahren publizierten mehrere Gruppen den Nachweis von fetaler DNA in mütterlichem Blut (Holzgreve et al. 1990, Lo et al. 1989). Zunächst beschränkten sich die Arbeiten auf die Bestimmung des (männlichen) Geschlechts der Feten. Mangels ausreichend sensitiver Techniken war die Untersuchung der fetalen DNA aus mütterlichen Blut zunächst eher als methodische Forschung zu sehen. Gegen Ende des Jahrtausends jedoch lieferten die fortschreitenden Next Generation Sequencing (NGS)-Strategien eine immer höhere Sensitivität und Genauigkeit, sodass die Methode der Nicht invasiven Pränataltests (NIPT, engl. „*Non-Invasive Prenatal Tests*“) zunehmende Bedeutung gewonnen hat (Lo et al. 1997). Ihre routinemäßige Anwendung findet der NIPT seit ca. 2012 (Fan et al. 2012). In der Pränatalmedizin hat dies zu einer signifikanten Reduktion von invasiven Untersuchungen geführt (Warsof et al. 2015). Der klassische NIPT ist mittlerweile als Screeningtest angelegt und fokussiert insbesondere auf die Detektion von Aneuploidien aber auch häufigen Mikrodeletionssyndromen. Diese Technik hat die Pränataldiagnostik wesentlich revolutioniert und findet trotz großer anfänglicher Vorbehalte mittlerweile weltweite Akzeptanz und Anwendung.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt insbesondere an der Darstellung der Vor- und Nachteile der vorgestellten Techniken sowie der Feststellung des Status quo in der genetischen Pränataldiagnostik.

3 METHODEN

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Literaturliteraturarbeit. Im ersten Abschnitt werden Untersuchungsmaterialien in der Pränataldiagnostik aufgelistet und erklärt, während im zweiten Teil auf die unterschiedlichen Methoden fokussiert wird. In der Diskussion werden die einzelnen Aspekte miteinander verglichen, in größerem Zusammenhang gesetzt, und kritisch diskutiert.

Zur Darstellung und Erklärung der klassischen Techniken in der Pränatalmedizin bzw. der Untersuchungsmaterialien wurden als Primärliteratur die Bücher „Humangenetik“ von Jan Murken, „Embryologie“ von Thomas Sadler sowie „Ultraschalldiagnostik in Geburtshilfe und Gynäkologie“ von Ulrich Gembruch herangezogen.

Die Themenhefte der Zeitschrift *Medizinische Genetik* zum Thema „Pränatal- und Präimplantationsdiagnostik“ (Medizinische Genetik 2011) und „Pränatale Diagnostik“ (Medizinische Genetik 2014) lieferten die Grundlage für die allgemeine Darstellung der Entwicklungen und Techniken. Fallzahlen und statistische Erhebungen sowie wichtige Studien wurden ausgehend von den dort zitierten Arbeiten recherchiert.

Die Spezialausgabe aus 2015 der Zeitschrift *Prenatal Diagnosis* zum Thema „Next Generation Sequencing in Preconceptual, Preimplantation, and Prenatal Screening/Diagnosis“ diente als hauptsächlichlicher Anhaltspunkt anhand dessen der Großteil der Literaturverweise der vorliegenden Arbeiten zum Thema Next Generation Sequencing stammt. Die dort publizierten Arbeiten, insbesondere die Reviews, wurden als Ausgangspunkt für eine erweiterte Pubmed Literaturrecherche verwendet.

Ergänzende Informationen zu einzelnen Methoden der NIPT stammen von den Websites der entsprechenden Anbieter.

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungsmaterialien

4.1.1 Fruchtwasser

Bereits am achten Entwicklungstag des Embryos bildet sich durch die Formation der zweiblättrigen Keimscheibe die Amnionhöhle. Diese vergrößert sich bis zum Ende des dritten Schwangerschaftsmonats zunehmend und umgibt schließlich den gesamten Embryo. Durch das Fruchtwasser werden Verwachsungen des Embryos mit dem Amnion verhindert, Stöße aufgefangen, aber auch fetale Bewegungen überhaupt erst ermöglicht. Die Amnionhöhle ist mit einer physiologisch klaren, wässrigen Flüssigkeit, der Amnionflüssigkeit bzw. dem Fruchtwasser gefüllt. Bei einer unauffälligen Schwangerschaft beträgt die Flüssigkeitsmenge in der 10. Schwangerschaftswoche (SSW) ca. 40 mL und steigert sich bis zu einem Liter gegen Ende der Schwangerschaft. Bereits die Fruchtwassermenge dient in der Ultraschalldiagnostik als Softmarker für pathologische Erscheinungsbilder da zu viel Flüssigkeit (Polyhydramnion) oder zu wenig Flüssigkeit (Oligohydramnion) häufig einen wichtigen Hinweis auf Fehlbildungen des Embryos geben können.

Der Fetus trinkt seine eigene Amnionflüssigkeit und scheidet diese auch wieder mit dem Urin aus, zusätzlich werden viele epidermale Zellen aufgrund der Kindsbewegungen in die Flüssigkeit abgegeben. Somit befinden sich in der Amnionflüssigkeit sehr viele kindliche Zellen die durch eine Punktion der Amnionhöhle gewonnen und isoliert bzw. gezüchtet werden können. Die embryonalen Zellen des Fruchtwassers entstammen dem Amnion, der fetalen Haut und dem Urogenitalsystem des Feten (Sadler et al. 1970).

4.1.2 Chorionzotten

Chorionzotten bilden sich in etwa ab der 2.SSW aus und differenzieren sich in den folgenden Wochen rasant zu voll funktionsfähigen Tertiärzotten. Die Chorionzotten stellen den Stoffaustausch zwischen der Plazenta und dem Embryo sicher. Deren Kreislauf kann den Embryo bereits ab der 4. Entwicklungswoche mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen. Die Zytotrophoblasten der Chorionzotten dringen in das mütterliche Endometrium ein und schaffen so eine enge Verbindung zwischen den beiden Kreisläufen. Da die Chorionzotten mesodermalen

Ursprungs sind, wird auch bei der Gewinnung dieses Untersuchungsmaterials nur ein bestimmtes Keimblatt untersucht (Sadler et al. 1970).

4.1.3 Fetales Nabelschnurblut

Die Nabelschnur verbindet den Embryo bzw. Feten mit der Plazenta. Ab etwa der 10. Entwicklungswoche wird die Nabelschnur als solche bezeichnet. Innerhalb der Nabelschnur verlaufen die paarigen Nabelschnurarterien (Aa umbilicales) und die Nabelschnurvene (V. umbilicales). Das aus diesen Gefäßen abgenommene Blut ist zumeist vollständig embryonales Gewebe mesenchymalen Ursprungs (Sadler et al. 1970).

4.1.4 Mütterliches Blut

Die Möglichkeit mütterliches Blut als Untersuchungsmaterial in der pränatalen Diagnostik einzusetzen, teilt sich heutzutage einerseits in die Untersuchung serologischer Parameter wie etwa Alpha-Fetoprotein-Spiegel (AFP), Beta-HCG, konjugierte Östriole sowie Pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) und andererseits auf die Detektion von fetalen Zellen bzw. zirkulierenden fetalen DNA-Fragmenten (cffDNA, engl. cell-free circulating fetal DNA) im mütterlichen Blut auf.

Während das maternale Serumscreening bereits seit vielen Jahren unter dem Begriff „*Triple-Test*“ als etablierter diagnostischer Standard zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit einer kindlichen Trisomie 13, 18 oder 21 bzw. der Diagnose von diversen Fehlbildungen wie z. B. Neuralrohr- oder Bauchdeckendefekten dient, ist die Untersuchung von kindlichen Zellen und/oder DNA erst seit wenigen Jahren zur einer vielversprechenden Analysemethode geworden (Murken et al. 1975). Die Anwesenheit von cffDNA ist seit den frühen 1990-er Jahren bekannt (Bennett et al. 1993). Geeignete Analysemethoden mit einer entsprechend hohen Sensitivität gibt es jedoch erst seit wenigen Jahren. Seit der Einführung des NGS haben sich verschiedene Tests zur direkten Detektion einer Trisomie 13, 18 oder 21 aus dem mütterlichen Blut etabliert.

4.1.5 Polkörper, Blastomere und Trophektodermzellen

Seit etwa 1990 findet die Entnahme von Polkörpern, einzelnen Zellen aus der Blastozyste bzw. Trophektodermbiopsien ihre Anwendung. Die Anwendung dieser Untersuchungsmethoden ist selbstverständlich ausschließlich bei der Inanspruchnahme der assistierten Reproduktionsmedizin möglich und hat somit einen Sonderstatus in der Pränataldiagnostik. Ziel der Präimplantationsdiagnostik (PID) ist es, in erster Linie die Schwangerschafts- bzw. Geburtenrate nach einem Transfer zu erhöhen. Die PID wird vor allem Hochrisikofamilien mit entsprechender Anamnese für genetische Erkrankungen wie unbalancierte Chromosomenaberrationen oder monogenen Erkrankungen, angeboten. Rund die Hälfte aller Untersuchungen werden international jedoch im Rahmen einer regulären *in vitro* Fertilisation (IVF) als Aneuploidiescreening durchgeführt (Hehr et al. 2014).

Bei der Polkörperdiagnostik wird unmittelbar nach der Befruchtung der erste und idealerweise auch der zweite Polkörper mittels Punktion der befruchteten Eizelle gewonnen (Abb. 1) (Montag et al. 2013). Der große Vorteil dieser Methode liegt im Zeitgewinn bis zum Transfer, da die frühe Entnahme der Polkörper für eine genetische Testung bis zu drei Tage mehr Zeit einräumt als andere Strategien. Dennoch spielt diese Technik international gesehen keine große Rolle, da mittels der Polkörperdiagnostik lediglich indirekte Rückschlüsse auf das mütterliche Erbgut gezogen werden können. Das väterliche Genom kann nicht untersucht werden, und zusätzlich kann bei einem sehr hohen technisch Aufwand keine Aussage über das Entwicklungspotenzial der Embryonen in dieser frühen Phase getroffen werden (Rosenbusch 2006, Hehr et al. 2011).

Damit bleibt die Untersuchung von Blastomeren noch immer der Goldstandard in der PID. Die Punktion des 8-Zellstadiums erfolgt meist am dritten Tag nach der Befruchtung, womit immer noch ein ausreichend langes Zeitfenster bis zum Transfer gegeben ist (Abb. 1). Im Gegensatz zur Polkörperdiagnostik, lässt die Untersuchung von Blastozysten auch Rückschlüsse auf das gesamte Genom, also sowohl auf die von der Mutter sowie die vom Vater vererbten Allele, zu. Zudem kann bereits eine Vorselektion aufgrund der Entwicklungsfähigkeit einzelner Blastozysten getroffen werden. Allerdings gibt es Hinweise, dass die Entnahme von Blastomeren einen negativen Einfluss auf die Schwangerschaftsrate haben könnte (De Vos et al. 2009). Zusätzlich weiß man, dass im frühen embryonalen Stadium eine hohe chromosomale Fehlverteilungsraten vorliegen kann und sich dennoch ein normaler Embryo entwickeln kann (Hehr et al. 2014). Diese Tatsachen erschweren eine akkurate genetische Diagnostik, da zumeist nur eine Zelle pro Embryo entnommen wird, was somit zu einem falsch positiven Ergebnis führen kann und den restlichen Embryo nicht unbedingt repräsentieren muss. (Hehr et al. 2014).

Auch bei einer Trophektodermbiopsie (Abb 1) können sowohl die mütterlich als auch der väterlich vererbten Allele untersucht werden. Die Methode ist technisch gut umsetzbar und man kann bereits eine gute Aussage über die Entwicklung der Embryonen treffen. Zusätzlich wird bei einer Untersuchung von Trophektodermzellen kein direkter Transfer, sondern meistens eine Kryokonservierung also das Einfrieren der Embryonen vor dem Transfer, durchgeführt (Hehr et al. 2014). Das bedeutet, dass der Embryo frühestens nach 1-2 Zyklen der Patientin rückgeführt wird, wodurch ein breites Zeitfenster für eine Analyse der Zellen zur Verfügung steht. Gleichzeitig stellt die Kryokonservierung jedoch auch einen Nachteil dar, da es aufgrund der zeitlichen Verzögerung zu einer möglichen höheren psychischen Belastung für Patientinnen kommt. Des Weiteren kann auch in Trophektodermzellen eine hohe Anzahl an somatischen Mosaiken vorliegen, wodurch wiederum die Falsch-Positiv-Rate erhöht wird (Hehr et al. 2014).

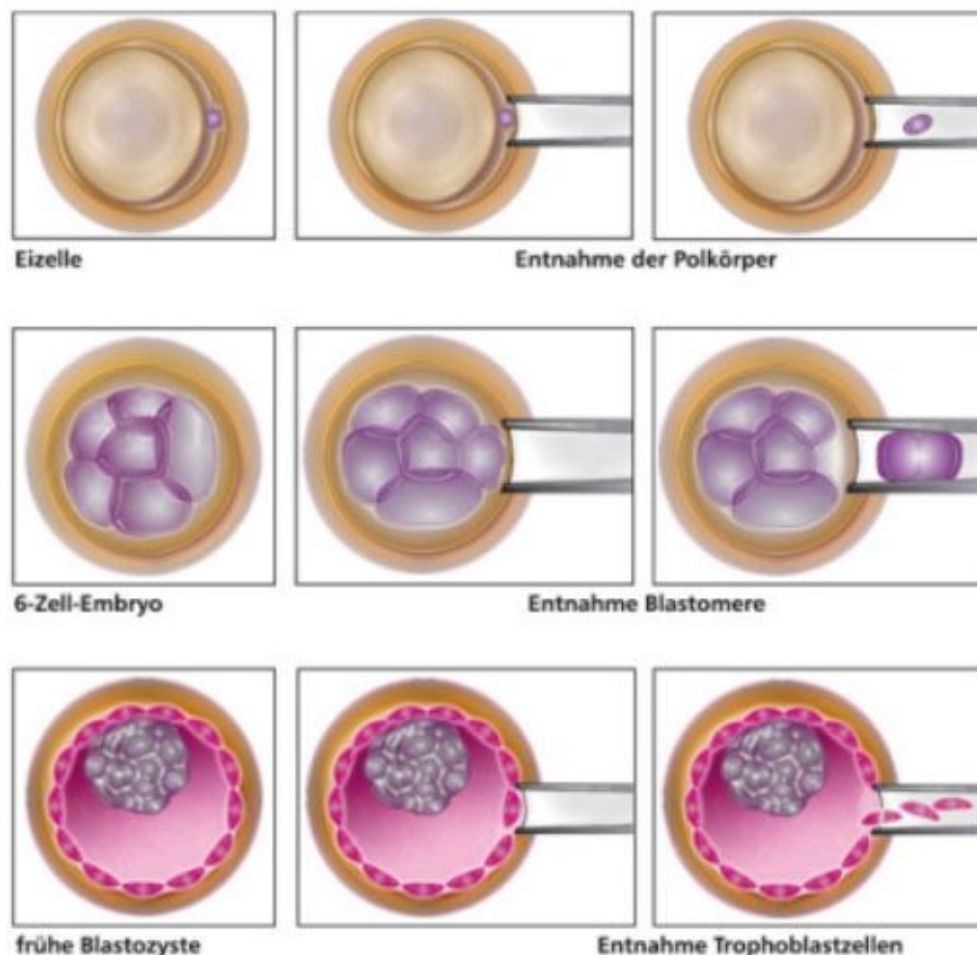


Abbildung 1: Übersicht über präimplantationsdiagnostischen Entnahmemethoden. Oberste Zeile: Gewinnung von Polkörpern durch Aspiration des Polkörpers nach der Befruchtung der Eizelle. Mittlere Zeile: Entnahme einer Blastomere aus einem 6-Zell Stadium. Untere Zeile: Biopsie der Trophektoblasten zur Gewinnung von Zellen zur genetischen Analyse (Ferstl 2017)

Wurden zunächst für den Nachweis von strukturellen familiären Chromosomenaberrationen spezifische FISH-Sonden für die individuelle Bestimmung der Aberration eingesetzt, so wird diese Methode heutzutage vermehrt durch die höher auflösende aCGH Untersuchung abgelöst. Das Ergebnis der aCGH liefert vergleichsweise genauere Ergebnisse und kann zusätzlich kleinere chromosomale Imbalancen detektieren.

Bei der Untersuchung von monogenen Erkrankungen lösen neuere Methoden wie das NGS die sehr aufwendige Markeranalyse bzw. Haplotypenbestimmung ab. Mittels NGS-basierten Methoden können sowohl chromosomale Aberrationen als auch monogene Erkrankungen nachgewiesen werden. Gerade dieses Potenzial kann aus ethischer Sicht hinsichtlich der Feststellung von Zufallsbefunden auch hinterfragt werden. Daher ist die restriktive Einhaltung von genau festgelegten Auswertekriterien bei der Anwendung des NGS von signifikanter Bedeutung (Sermon et al. 2016, Brezina et al. 2016).

Auf der Tagung der *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) wurde noch vor drei Jahren festgestellt, dass Untersuchungen wie z. B. aCGH in Studien keinen unmittelbaren Nutzen belegen können, deshalb wird ein generell ausgelegtes Screening von der ESHRE nicht empfohlen (Hehr et al. 2014).

Bis vor wenigen Jahren war in Österreich ausschließlich die Untersuchung von Polkörpern erlaubt und eine Entnahme von Blastomeren per Gesetz verboten. Seit der Novellierung des Fortpflanzungsmedizingesetzes aus dem Jahre 2015 (Bundeskanzleramt Österreich 2018) ist die Entnahme von Blastomeren in bestimmten Ausnahmesituationen erlaubt.

§2a(2) Eine Erbkrankheit im Sinn des Abs.1 Z3 liegt vor, wenn das Kind während der Schwangerschaft oder nach der Geburt derart erkrankt, dass es

- 1. Nur durch den ständigen Einsatz moderner Medizintechnik oder den ständigen Einsatz anderer, seine Lebensführung stark beeinträchtigender medizinischer oder pflegerischer Hilfsmittel am Leben erhalten werden kann oder*
- 2. Schwerste Hirnschädigungen aufweist oder*
- 3. Auf Dauer an nicht wirksam behandelbaren schwersten Schmerzen leiden wird und darüber hinaus die Ursache dieser Krankheit nicht behandelt werden kann (Bundeskanzleramt Österreich 2018).*

Die Formulierung des Gesetzestextes lässt allerdings einen doch nicht unwesentlichen Interpretationsspielraum zu. Da die prinzipielle Durchführung einer PID in Österreich ohnehin an das Vorliegen einer genetischen Disposition der Eltern gebunden ist, wäre ein konkreter Indikationskatalog wünschenswert. Die österreichische Gesellschaft für Humangenetik (ÖGH) hat

dazu eine Stellungnahme formuliert, in welcher eine genauere gesetzliche Regelung gefordert wird. Die Indikation zur PID sollte jenen für einen Schwangerschaftsabbruch nach einer Pränataldiagnostik entsprechen (Österreichische Gesellschaft für Humangenetik 2014).

Somit bewegt man sich bei der Anwendung von präimplantationsdiagnostischen Methoden derzeit - trotz neuer Gesetzgebung - häufig in einem juristischen Graubereich. Es wurde beispielsweise nicht genau geregelt, wie eine simple Formulierung wie „stark, nicht therapierbare Schmerzen“ interpretiert werden darf. Darüber hinaus wird die Diskussion über die präkonzeptionelle Analyse des Genoms bzw. Exoms schon längst geführt. Die Feststellung von monogenen Erkrankungen sowie prädiktive Untersuchungen vor der Implantation eines (gesunden) Embryos sind zu einer durchführbaren Option geworden.

Die europaweit höchst unterschiedliche Gesetzeslage bietet für Paare die Möglichkeit nationale Gesetze weitestgehend zu umgehen und eine Analyse nach IVF im Ausland anzustreben. Eine konkrete und vor allem auch gesamteuropäische Lösung wäre für das Gebiet der PID in jedem Fall wünschenswert.

4.1.6 Fetales Gewebe

Bei fetalem Gewebe handelt es sich nur mehr im weitesten Sinne um ein Untersuchungsmaterial, welches der Pränataldiagnostik zugeordnet werden kann. Fetales Gewebe kann üblicherweise nur untersucht werden, wenn es sich um Abortmaterial handelt und keine intakte Schwangerschaft mehr besteht. Nichts desto trotz ist die genetische Analyse des abgestorbenen Feten vor allem bei wiederholten Fehlgeburten (Abortus habitus) einer Schwangeren sinnvoll, um Ursachen z. B. kryptische Aberrationen detektieren zu können oder auch ein individuelles Wiederholungsrisiko einschätzen zu können. Von fetalem Gewebe wird in den meisten Fällen eine Zellkultur angelegt und anschließend zytogenetisch analysiert. Zusätzlich kann direkt aus dem frischen Gewebe, aber auch der Gewebekultur, DNA isoliert werden, um eine molekulargenetische Untersuchungsmethode, wie beispielsweise eine aCGH, anschließen zu können.

4.2 Methoden der Pränataldiagnostik

Derzeit werden Schwangere in Österreich im Rahmen des Mutter-Kind-Pass-Programms einem engmaschigen Untersuchungsprogramm zugeführt. Durch drei angebotene Ultraschalluntersuchungen können beispielsweise Auffälligkeiten in der Schwangerschaft frühzeitig erkannt und entsprechende weiterführende Analysen eingeleitet werden. Abgesehen von der Ultraschalluntersuchung werden pränatale Untersuchungsmethoden ausschließlich beim Vorliegen einer bestimmten Indikation durchgeführt. Diese können folgende Gründe haben (Murken et al. 1975, Bundeskanzleramt Österreich):

- Altersindikation: erhöhtes mütterliches Alter (derzeit ab dem 35. Lebensjahr)
- Pathologische Ultraschallbefunde der aktuellen oder einer vorangegangenen Schwangerschaft
- Auffällige Familienanamnese: beim Vorliegen von Neuralrohrdefekten, genetischen Erkrankungen wie z. B. Down-Syndrom bei engen Familienmitgliedern oder erhöhtem Risiko für monogen bedingte Erkrankungen
- Vorliegen von mütterlichen Erkrankungen wie beispielsweise Diabetes
- X-Chromosomaler Überträgerinnenstatus der Mutter
- Potentielle Exposition von teratogenen Noxen während der Schwangerschaft z. B. Medikamenteneinnahme oder Röntgenuntersuchungen der Mutter

4.2.1 Invasive Methoden

Invasive diagnostische Methoden dienen der direkten Gewinnung von fetalen Zellen, fetalem Serum oder Fruchtwasser zu unterschiedlichen Zeiten der Schwangerschaft. Das Untersuchungsmaterial wird mittels transabdominaler oder transzervikaler Punktion gewonnen. Üblicherweise erfolgt eine Kultivierung der Zellen mit angeschlossener Chromosomenanalyse. Zusätzlich kann auch eine direkte Isolierung von DNA aus den kernhaltigen fetalen Zellen bzw. eine Isolierung von zellfreier DNA und darauffolgender molekulargenetischer Analyse erfolgen. Als Komplikation könnte es bei allen invasiven Eingriffen zu einem Abort oder intrauterinem Furchttod kommen. Der kausale Zusammenhang einer Gefährdung der Schwangerschaft kann nur schwer ermittelt werden, wird in der Literatur jedoch mit < 1% angegeben (Murken et al. 1975).

4.2.1.1 Chorionzottenbiopsie (CVS)

Als sehr frühe, invasive Untersuchungsmethode können ab ca. der 10. SSW Chorionzotten durch Aspiration von Chorion- oder Trophoblastengewebe gewonnen werden. Durch die transabdominale oder transvaginale Punktion werden dabei ca. 5- 10 mg Zottengewebe entnommen (Abb. 2). Durch die Entnahmetechnik kann im Untersuchungsmaterial auch immer eine mütterliche Kontamination aus Deziduazellen vorliegen, daher ist eine zuverlässige Diagnostik nur bei männlichen Feten möglich. Zusätzlich können Trophoblasten häufig chromosomale Aberrationen aufweisen, die sich im Embryo nicht durchsetzen, was – wie auch die relativ häufig vorliegenden Plazentamosaiken – zu einem falsch positiven Ergebnis führen kann (Sadler et al. 1970).

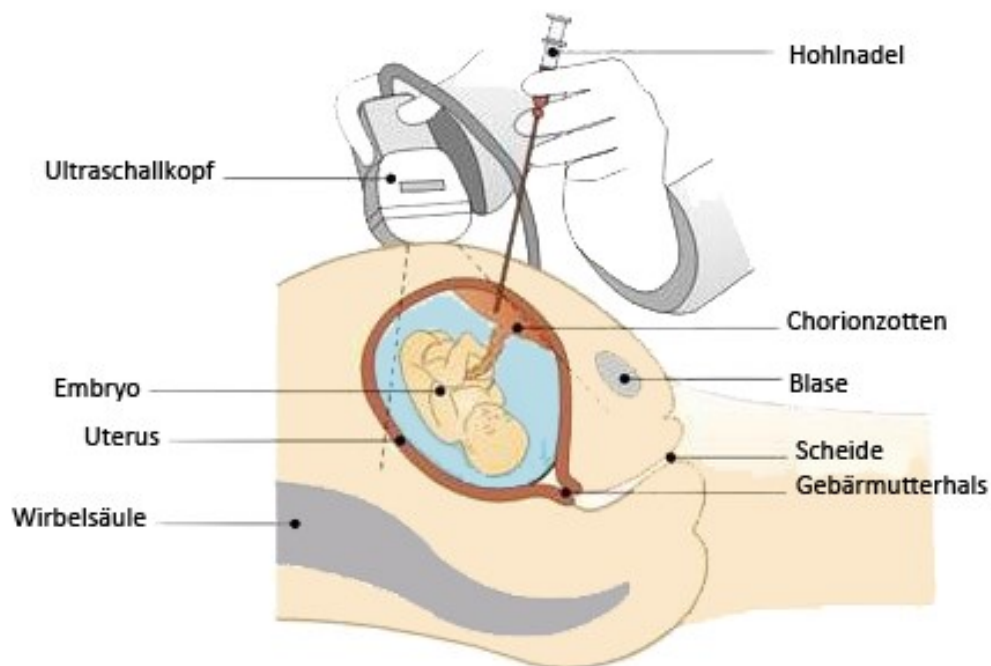


Abbildung 2: Durchführung einer transabdominellen CVS. Einführung einer Hohlnadel durch die Bauchdecke unter Ultraschallkontrolle zur Entnahme von Chorionzotten (Brehm 2017).

Aufgrund der hohen Zellzahl besteht bei Chorionzotten die Option einer Direktpräparation von Chromosomen. Das erlaubt die Erstellung eines Karyogramms bereits am Tag nach der Punktion und stellt zusätzlich zur Möglichkeit der genetischen Analyse in der Frühschwangerschaft eine wesentliche Beschleunigung der Analyse dar. Üblicherweise liefert aber auch die Kultivierung der Zellen nach nur wenigen Tagen ein Ergebnis. Die Isolierung von DNA und angeschlossene

molekulargenetische Untersuchungsmethoden sind aufgrund der höheren Zellzahl ein weiterer Vorteil dieser Methode.

4.2.1.2 Fruchtwasserpunktion

Bei der Fruchtwasserpunktion oder Amniozentese (AC, engl. amniocentesis) wird eine Hohlnadel unter Ultraschallkontrolle transabdominal in die Fruchthöhle eingeführt und 10-20 mL Fruchtwasser entnommen (Abb. 3). Diese Entnahmetechnik wird zumeist ab dem 2. Trimenon bzw. in etwa ab der 14. SSW durchgeführt, da ab diesem Zeitpunkt ausreichend Amnionflüssigkeit vorhanden ist, um keinen Abortus zu riskieren.

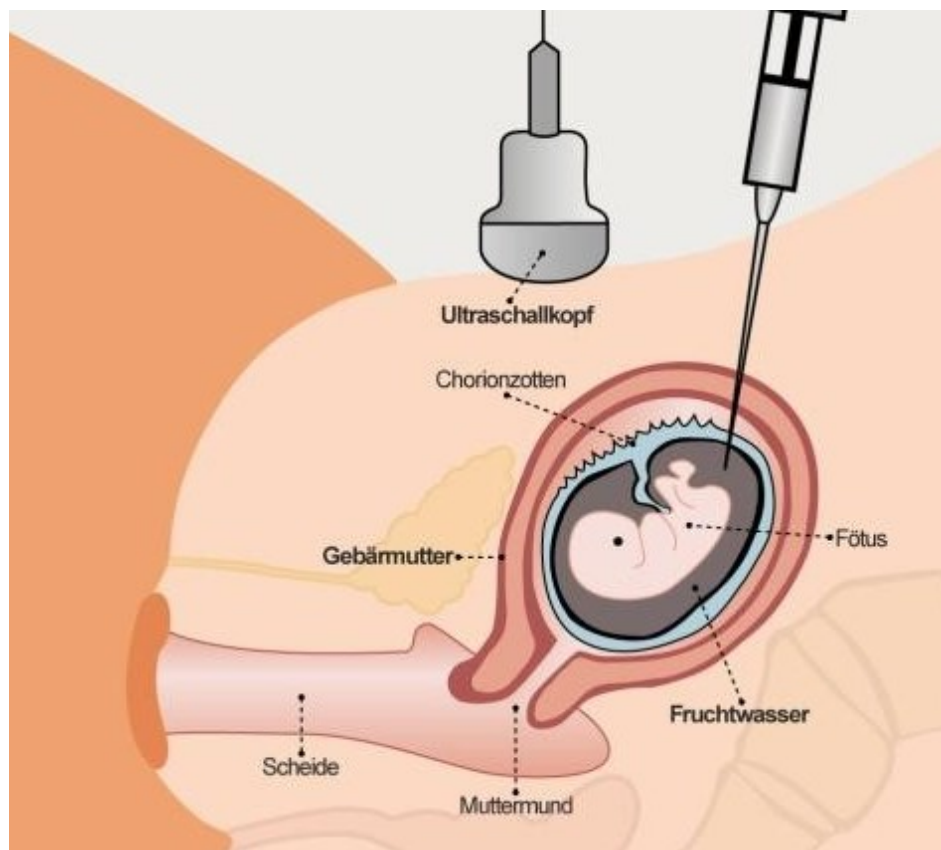


Abbildung 3: Durchführung einer Fruchtwasserpunktion: Einführung einer Hohlnadel durch die Bauchdecke unter Ultraschallkontrolle zur Entnahme von Fruchtwasser (Berufsverband der Frauenärzte 2017).

Die aus dem Fruchtwasser isolierten Zellen stammen aus dem Amnion, der fetalen Haut bzw. dem Urogenitaltrakt des Feten. Von den Zellen wird üblicherweise eine Zellkultur angelegt, welche nach einer Kulturdauer von ca. 14 Tagen geerntet wird. Diese Zellen können nun mit zytogenetischen Methoden analysiert werden und dienen somit dem Nachweis von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen bzw. zur Untersuchung von Mikrodeletionssyndromen, welche mittels FISH-Techniken diagnostiziert werden können. Eine direkte Präparation analog zur CVS von Zellen aus der Fruchtwasserpunktion ist nicht möglich, da sich zu wenige Zellen im Metaphasestadium befinden würden. Allerdings kann aus den Zellen im Fruchtwasser DNA isoliert werden bzw. kann auch die zellfreie DNA des Fruchtwassers mit molekulargenetischen PCR-basierenden Methoden analysiert werden (Murken et al. 1975).

4.2.1.3 Fetale Nabelschnurpunktion

Eine fetale Nabelschnurpunktion oder Chordozentese wird frühestens ab der 20. SSW durchgeführt und dient zur Gewinnung von fetalen Blutzellen oder Serum. Bei dieser Methode wird unter Ultraschallkontrolle das Blut aus der Nabelschnur abgenommen und kann wie eine konventionelle Blutprobe mit zytogenetischen und molekulargenetischen Methoden untersucht und analysiert werden (Abb. 4). In den meisten Fällen wird zum Ausschluss einer mütterlichen Kontamination das fetale Hämoglobin mittels einer Spezialfärbung eines Kontrollblutausstriches nachgewiesen. Das Abortrisiko wird in der Literatur abhängig von der SSW, Anzahl von Nadelinsertionen, Erfahrung des Untersuchers und der Indikation mit 1-2% beziffert (Tongsong et al. 2000). Häufige Gründe für eine Nabelschnurpunktion können auffällige oder unklare Chromosomenbefunde (z. B. Mosaikkonstellationen) nach einer AC sein, der Nachweis fetaler Infektionen sowie die Diagnostik von fetalen Anämien oder anderen Blutkrankheiten (Gembruch et al. 2013)

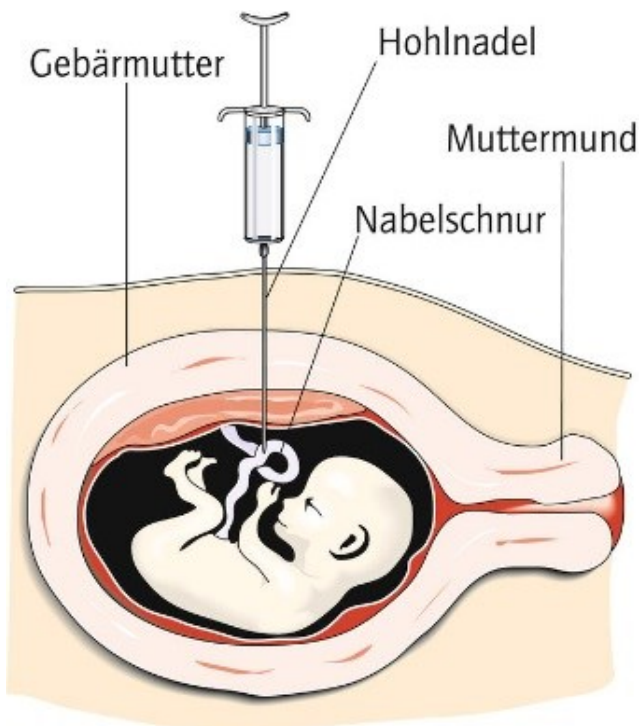


Abbildung 4: Durchführung einer Nabelschnurpunktion: Einführung einer Hohlnadel durch die Bauchdecke unter Ultraschallkontrolle. Genaue Punktion der Nabelschnur zur Entnahme von fetalem Blut (Effe 2017).

4.2.2 Nicht (minimal) invasive Methoden

Bei allen nicht invasiven Untersuchungsmethoden wird am Fetus bzw. der Fruchthöhle keinerlei Manipulation vorgenommen. Hierzu zählen sämtliche Ultraschalluntersuchungen inklusive sonografischer Marker sowie die, bezogen auf die Schwangerschaft, minimal invasive mütterliche Blutabnahme mit anschließender Gewinnung von DNA aus kindlichen Zellen bzw. frei cffDNA.

4.2.2.1 Ultraschalldiagnostik

Die medizinische Begleitung einer Schwangerschaft ist ohne Ultraschalldiagnostik undenkbar geworden und hat somit eine zentrale Bedeutung in der Pränataldiagnostik. Diese dient vor allem zur Überprüfung des Entwicklungsfortschrittes des Feten, um bei Auffälligkeiten entsprechende vorgeburtliche Maßnahmen treffen zu können.

Alle erhobenen Parameter wie etwa biometrische Daten, (Scheitel-Steiß-Länge, biparietaler Durchmesser), Sitz der Plazenta oder die Beurteilung der Fruchtwassermenge bilden die Grundlage für eine fachgerechte Betreuung der Schwangerschaft (Sadler et al. 1970).

Heutzutage wird die Ultraschalldiagnostik in der Schwangerschaft als sogenanntes Screening bezeichnet, wobei zwischen einem Basisscreening und erweitertem Screening unterschieden wird.

Während das Basisscreening nach wie vor der Klassifizierung von Mehrlingsschwangerschaften, der Feststellung des intrauterinen Sitzes der Schwangerschaft sowie der exakten Datierung der Schwangerschaft zum ersten Nachweis einer Wachstumsretardierung (IUGR, engl. Intrauterine growth restriction) dient, sollten erst beim erweiterten Screening genauere Parameter erhoben werden. Die Anwendungen in der Ultraschalldiagnostik haben sich in den letzten Jahrzehnten wesentlich verfeinert und differenziert. So werden im Rahmen der erweiterten Untersuchungen innerhalb der sogenannten Feindiagnostik, ein Fehlbildungsscreening und eine fetale Echokardiografie, oder möglicherweise ein genetisches Screening in Verbindung mit der Erhebung von serologischen Parametern durchgeführt und zur Befunderstellung herangezogen.

Im ersten Trimenon kommt vor allem die transvaginale Sonografie zum Einsatz. Die transvaginale Sonografie hat den Vorteil, den kindlichen Strukturen näher zu kommen und somit eine höhere Auflösung zu liefern. Der Hauptvorteil der transabdominalen Sonografie liegt in der Übersichtlichkeit und vor allem darin, dass er von Schwangeren als angenehmer empfunden wird, da die Technik weniger invasiv ist (Gembruch et al. 2013).

Seit den späten 1980iger Jahren hat sich durch den Fortschritt der Computertechnologie zusätzlich zu konventionellen Ultraschallverfahren der 3-D Ultraschall entwickelt. Dieser ermöglicht eine detaillierte Darstellung der embryonalen Anatomie und somit der Entwicklung des ungeborenen Kindes (Timor-Tritsch et al. 1988). Die durch den 3D-Ultraschall möglichen Volumenmessungen erlauben z. B. die Beurteilung von Fruchtwassermenge oder aber auch Hirnflüssigkeit bzw. Gehirnhohlräumen und bereichern so das Spektrum sonografischer Parameter. Des Weiteren können die genaue dreidimensionale Darstellung von fetalen Strukturen wie das Nervensystem, Kopf und Gesicht, Extremitäten und Skelettsystems und natürlich des Herzens zur Präzisierung der Diagnosestellung wesentlich beitragen.

Die sich immer weiter verbessernden Darstellungs- und Auflösungsmöglichkeiten erlauben heutzutage bereits eine sehr genaue Rekonstruktion von fetalen Strukturen und embryonalen Organen. So ermöglicht beispielsweise der Einsatz der Dopplersonografie als Spezialultraschall im sogenannten Duplexverfahren die Darstellung des uteroplazentaren und des fetoplazentaren Kreislaufs. Dies erleichtert die Einschätzung einer IUGR aber auch die Risikoabschätzung für eine Präeklampsie, sowie die Feststellung von Auffälligkeiten der fetalen Herzfrequenz bei Verdacht auf Herzfehlern.

Die Erhebung dieser sonografischen Zusatzmarker erfolgt üblicherweise nicht routinemäßig, sondern aufgrund von individuell erhobenen Risiken nach vorangegangenem Ersttrimesterscreening (ETS). Die individuelle Risikoberechnung wird heutzutage fast ausschließlich Software-basierend bestimmt und folgt strengen Qualitätskriterien (Eiben et al. 2011).

4.2.2.2 Combined Test

Beim sogenannten Combined Test handelt es sich um einen Screeningtest im ersten Trimenon, weshalb er international eher als ETS bezeichnet wird. Von einem Screeningtest spricht man, wenn die Testung zu keiner eindeutigen Diagnose wie etwa bei der zytogenetischen Analyse nach einer AC oder CVS führt, sondern vielmehr nur das Risiko für das Vorliegen einer entsprechenden Erkrankung ermittelt wird. Der große Vorteil im Vergleich zu den invasiven Methoden ist, dass der Test durch die mütterliche Blutabnahme lediglich minimal invasiv ist und damit nicht mit einem Fehlgeburtsrisiko verbunden ist (Kagan et al. 2008).

Auf der Basis eines für die Patientin spezifischen *A-priori-Risikos* werden Serumparameter sowie Auffälligkeiten im Ultraschall in die Risikoeinschätzung mit einbezogen und so ein individuelles Risiko für die Schwangere berechnet, ein Kind mit Trisomie 21 oder aber auch Trisomie 13 und Trisomie 18 zu erwarten.

Das mütterliche *A-priori-Risiko* setzt sich aus folgenden Parametern zusammen:

- Altersrisiko
- Gestationsalter
- Maternale Vorgeschichte

Das ermittelte *A-priori-Risiko* der Patientin wird mit einem Wahrscheinlichkeitsquotienten multipliziert, welcher aufgrund von weiteren Tests und Parametern wie der fetalen Nackentransparenz und biochemischen Serummarker (z.B. beta-hCG und PAPP-A) ermittelt wird (Gembruch et al. 2013). Das mütterliche Altersrisiko wurde auf Basis von Studien aus den 1970-er Jahren erstellt, als noch keinerlei Screeningmethoden eine Verfälschung der Ergebnisse beeinflussten (Cuckle et al. 1987, Snijders et al. 2001).

Speziell für die Messung der fetalen Nackentransparenz - das ist die Flüssigkeitsansammlung im Bereich des fetalen Nackens - ist eine bestimmte Mindest- bzw. Maximalgröße des Feten notwendig, da diese von der Scheitel-Steiß-Länge (SSL) des Feten abhängt. Als Normalwert kann

abhängig von der SSL im Zusammenhang mit dem Gestationsalter ein Wert zwischen 1,2 und 2,5 Millimeter angenommen werden (Gembruch et al. 2013).

Die vom Serum der Schwangeren ermittelten biochemischen Parameter Beta-hCG und PAPP-A werden beim Combined Test in Relation zu den zu erwartenden Serumwerten von Referenzpatientinnen mit euploider Schwangerschaft gesetzt. Daraus resultiert ein Risikowert, der einer Wahrscheinlichkeit entspricht. Ein Ergebnis von 1:300 sagt nicht mehr aus, als dass eine von 300 Frauen mit den gleichen erhobenen Werten ein Kind mit einer Chromosomenstörung in sich trägt. Für eine Absicherung wäre eine anschließende invasive Untersuchung notwendig.

Die in der Literatur beschriebenen Detektionsraten des Combined Tests für die Trisomie 21 liegen meist bei über 90% (Malone 2005, Nicolaides et al. 2005, Ekelund et al. 2008), die Falsch-Positiv-Rate bei unter 5%. Da für die Trisomien 13 und 18 noch weitere Parameter (z. B. erhöhte Herzfrequenz bei Trisomie 13) für die Risikoberechnung herangezogen werden, sind hier die Detektionsraten teilweise noch höher (Kagan et al. 2008, Kagan et al. 2008). Grundsätzlich ist aber erwähnenswert, dass der Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 11. und 13. SSW sehr wichtig für eine präzise Detektionsrate ist, da zu einem späteren Zeitpunkt viele Parameter nicht mehr differenzierungsabhängig sind (Gembruch et al. 2013).

4.2.3 Zytogenetische Methoden

Die Grundlage für zytogenetische Untersuchungen ist die Gewinnung von fetalen Zellen mit einer der oben genannten invasiven Methoden. Die fetalen Zellen können durch Direktpräparation oder nach Kultivierung als Interphase- oder Metaphasechromosomenpräparate analysiert werden.

4.2.3.1 Klassische Zytogenetik

Kernhaltige Zellen aus heparinisiertem Blut oder Gewebe lassen sich in einer Zellkultur zur weiteren Teilung anregen. Wird der Kultur zu einem bestimmten Zeitpunkt das Spindelgift Kolchizin zugesetzt, so werden alle Zellen ab dem Zeitpunkt der Zugabe in ihrem Zellzyklus in der Metaphase arretiert. Während der Metaphase sind die Chromosomen am stärksten kondensiert, welches für eine anschließende Bänderungstechnik am besten geeignet ist. Durch spezielle Techniken können die Chromosomen auf Objektträger aufgebracht werden und nach geeigneten Färbemethoden, wie der häufig angewandten G-Bänderung, in einer 1000-fachen Vergrößerung ausgewertet werden.

Die 46 Chromosomen werden meist Software unterstützt in einem sogenannten Karyogramm paarweise nach Größe, Lage des Zentromers und Bandenmuster angeordnet, um den Karyotyp zu bestimmen. Sogenannte Aberrationen können mit der entsprechenden Kenntnis von geschultem Personal hinsichtlich der Anzahl und Struktur der Chromosomen visuell beurteilt werden. Die Auflösung von detektierbaren Veränderungen hängt dabei stark von der Qualität der Chromosomen ab und liegt in etwa im Bereich in der Größe von 5-10 Megabasen (Mb).

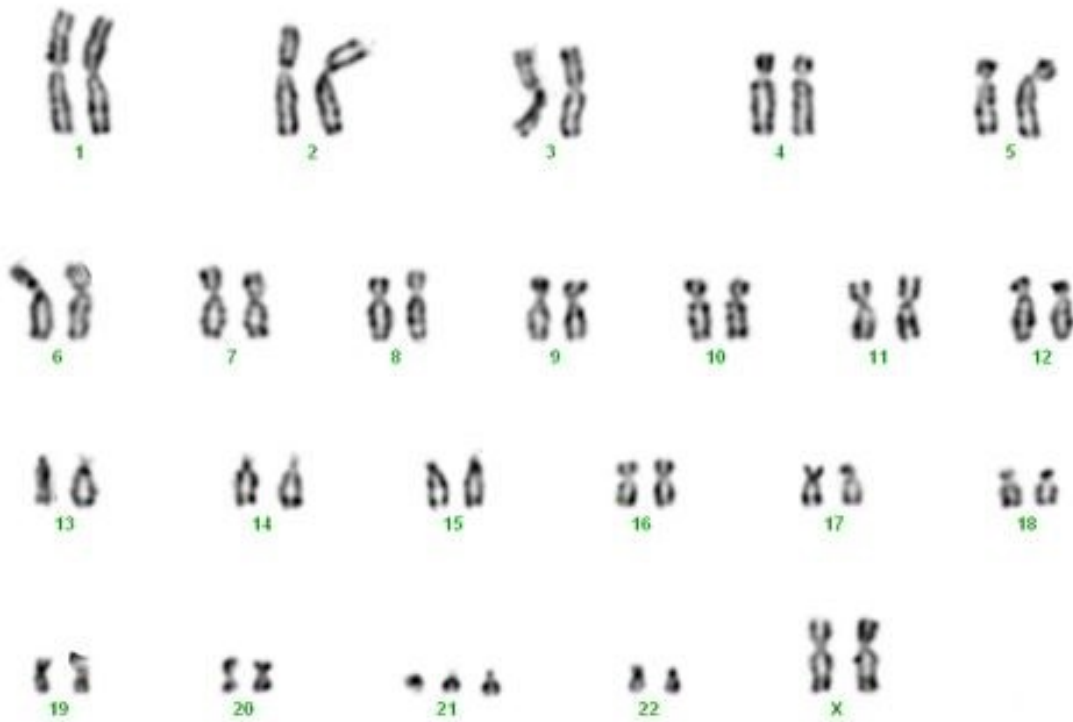


Abbildung 5: GTG-gebändertes Karyogramm eines weiblichen Individuums mit Trisomie 21 (47,XX,+21). Paarweise Anordnung der homologen Chromosomen. Das Chromosom 21 liegt 3-fach vor (Quelle: Zur Verfügung gestellt vom Institut für Humangenetik Graz).

Numerische Aberrationen bedeuten eine Veränderung der Anzahl und somit eine Abweichung der normalen Anzahl von 46 Chromosomen. Dies kann einzelne Chromosomen (Aneuploidie) - wie zum Beispiel bei einer Trisomie 21, bei der das 21. Chromosom dreifach vorhanden ist - (Abb. 5), oder aber auch den gesamten Chromosomensatz (Polyploidie) betreffen. So liegen bei einer Triploidie 69 Chromosomen vor. Auch wenn viele numerische Veränderungen während intakter Frühschwangerschaften festgestellt werden können, sind nur Embryonen mit Trisomie 13, 18 und 21 auch lebensfähig. Schwangerschaften mit anderen numerischen Chromosomenaberrationen führen meist in der Frühschwangerschaft zu einem Spontanabort. Daher liegt der Fokus der Pränataldiagnostik insbesondere an der Diagnose dieser drei Chromosomen und deren numerischen Veränderungen.

Strukturelle Aberrationen können ein oder mehrere Chromosomen gleichzeitig betreffen. Führen diese chromosomalen Umbauten zu einem Zugewinn oder Verlust von Chromosomenmaterial, so hat dies meist schwerwiegende Folgen für das betroffene Individuum. Die Lebensfähigkeit der Feten bzw. die Auswirkungen solcher Aberrationen können dabei stark variieren und oft nur sehr schwer interpretiert oder vorhergesagt werden (Murken et al. 1975).

4.2.3.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH-Technik beruht auf der hochspezifischen, komplementären Bindung von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden an bestimmte Chromosomenabschnitte (Abb. 6). Die FISH ist nicht ausschließlich an die vorhergehende Präparation von Metaphase-Chromosomen gebunden, sondern kann auch sehr einfach an Interphase-Kernen angewandt werden. Dies ermöglicht eine direkte Durchführung auf Zellen aus einer CVS oder AC ohne vorherige Kultivierung und damit einen wesentlichen Zeitgewinn in der Diagnosestellung. Zusätzlich ist die Auflösung mit 0,1 Mb bei dieser Untersuchungsmethode sehr viel höher als bei einer konventionellen Karyotypisierung. Je nach Indikation und Verfügbarkeit von Sonden können ganze Chromosomen, Zentromere, Telomere aber auch spezifische Chromosomenabschnitte, z. B. zur Detektion von Mikrodeletionssyndromen, untersucht werden.

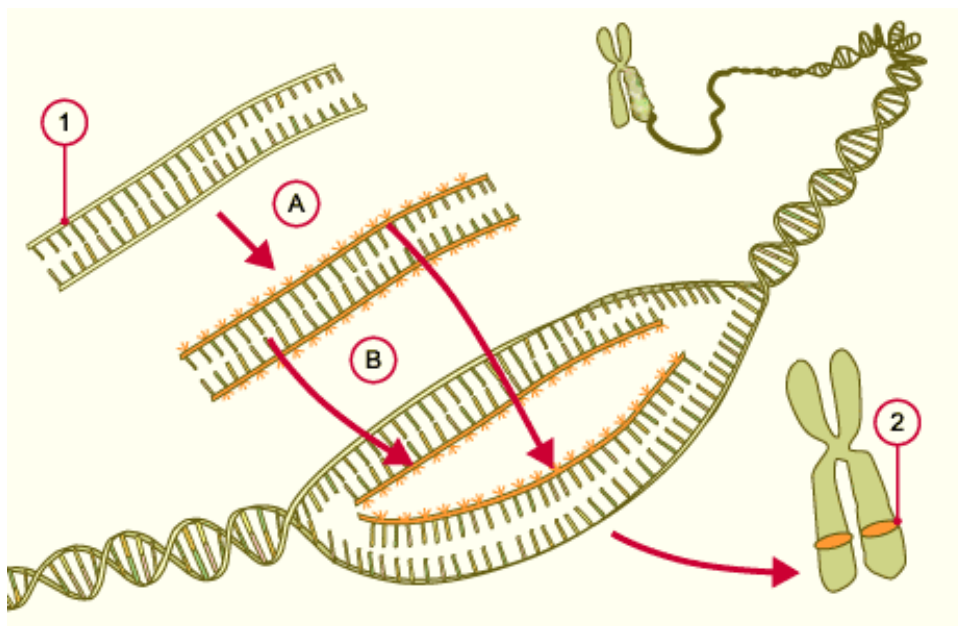


Abbildung 6: Prinzip der FISH: Spezifische fluoreszenzmarkierte DNA Abschnitte (A) binden auf die komplementäre Zielsequenz der Test DNA. Das Ergebnis ist ein detektierbares Fluoreszenzsignal auf Chromosomen (2) (Universitäten Fribourg, Lausanne und Bern 2017).

Eine ganz besondere Bedeutung kam in der Pränataldiagnostik lange Jahre der FISH-Schnelltest (FISH-ST) zur Detektion der häufigen Trisomien 13, 18, 21 sowie numerischer Aberrationen der Geschlechtschromosomen zu. Dieser Test erlaubt mit einer einzigen Hybridisierung die Analyse dieser Chromosomen hinsichtlich numerischer Veränderungen. Da die Hybridisierung auf Interphasekernen aus unkultivierten Fruchtwasserzellen durchgeführt werden kann, ist eine rasche Diagnosestellung innerhalb von 48 Stunden möglich (Abb. 7).

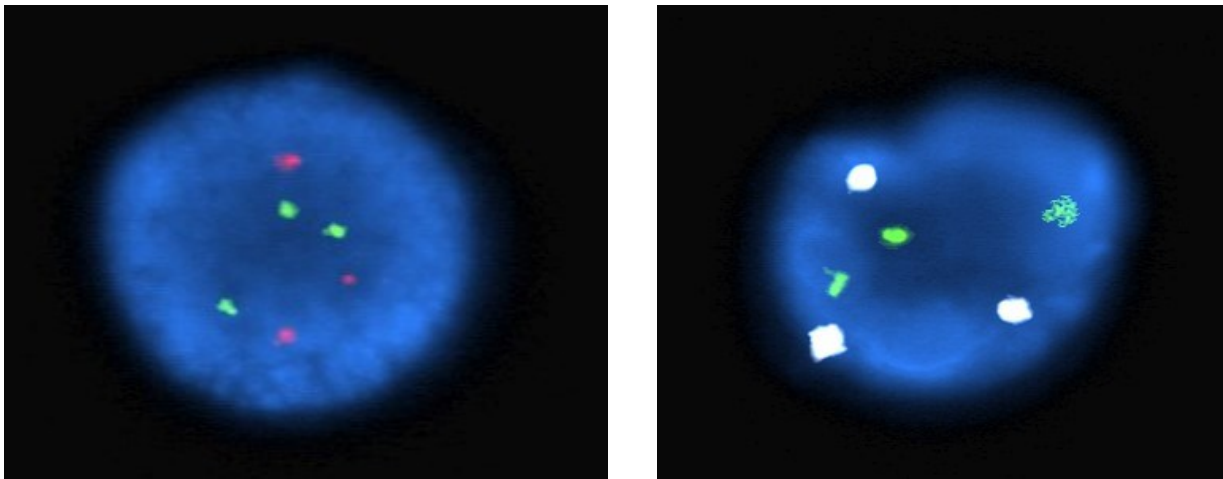


Abbildung 7: FISH-ST: Hybridisierung der Sonden für Chromosom 13 (grünes Signal) und 21 (rotes Signal) im linken Bild bzw. Chromosom 18 (weißes Signal), X (grünes Signal) und Y (rotes Signal (nicht vorhanden)) im rechten Bild. Alle dargestellten Chromosomen liegen 3-fach vor, dies lässt den Rückschluss auf das Vorliegen einer Triploidie zu (Quelle: Monika Artl, Institut für Humangenetik).

Der FISH-ST liefert so eine schnelle und direkte Möglichkeit zur Diagnose der häufigsten Trisomien sowie eine Beurteilung der Geschlechtschromosomen. Partielle Deletionen, welche außerhalb der Sondenabdeckung liegen, werden bei diesem Test nicht allerdings detektiert. Außerdem sind eine gewisse Anzahl und Qualität der Zellen notwendig, um eine präzise Analyse zu gewährleisten.

Bei distinkten Ultraschallauffälligkeiten (z.B. Herzfehler oder Velokardiofaciales Syndrom) oder konkreten Verdachtsindikationen wird die FISH mit spezifischen Sonden nach wie vor eingesetzt, um weitere aufwendige Analysen vermeiden zu können.

4.2.4 Molekulargenetische Methoden

Ziel der molekulargenetischen Diagnostik ist der Nachweis oder der Ausschluss einer konkreten krankheitsverursachenden Sequenzveränderung in der DNA (Murken 1975). Zum Schutz des

entstehenden Lebens wird in der Pränataldiagnostik insbesondere zwischen letalen Erkrankungen, welche die Indikation für einen Abbruch der Schwangerschaft zur Folge haben, genetischen Erkrankungen, die während oder unmittelbar nach der Geburt einer speziellen medizinischen Intervention bedürfen, und Erkrankungen oder Mutationen, welche keine unmittelbaren Auswirkungen auf das neugeborene Kind haben, unterschieden. Letztere, sogenannte prädiktive Untersuchungen dürfen aufgrund der Gesetzgebung in Österreich nicht pränatal durchgeführt werden.

Für die molekulargenetische Untersuchung des Feten können alle kernhaltigen fetalen Zellen aus AC oder CVS oder Nabelschnurpunktion zur DNA-Isolierung herangezogen werden. Zusätzlich gibt es mit neueren Methoden auch die Möglichkeit, frei zirkulierende DNA aus dem Fruchtwasser oder mütterlichem Blut zu untersuchen. Als zentrale Grundlage dient bei allen Methoden die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), welche die millionenfache Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten oder der gesamten DNA eines Individuums ermöglicht.

4.2.4.1 Quantitative Fluoreszenz-PCR/Markeranalyse

Als Grundlage zur Analyse der häufigsten Trisomien 13, 18 und 21 werden bei der quantitativen Fluoreszenz-PCR (QF-PCR) hochpolymorphe short tandem repeat (STR) Marker herangezogen. Genomische Regionen, welche hochpolymorphe STR Marker mit stark unterschiedlicher Allelfrequenz aufweisen, werden mit spezifischen Primern amplifiziert und quantitativ ausgewertet. Bei Heterozygotie liefern die Ergebnisse von normalen Individuen üblicherweise zwei PCR-Produkte mit einer sehr ähnlichen Quantitäten (Peakflächen 1:1) (Abb. 8), während bei trisom vorliegenden Chromosomen drei Peaks im Verhältnis 1:1:1 oder zwei Peaks im Verhältnis 2:1 beobachtet werden können (Abb. 9) (Adinolfi et al. 1995).

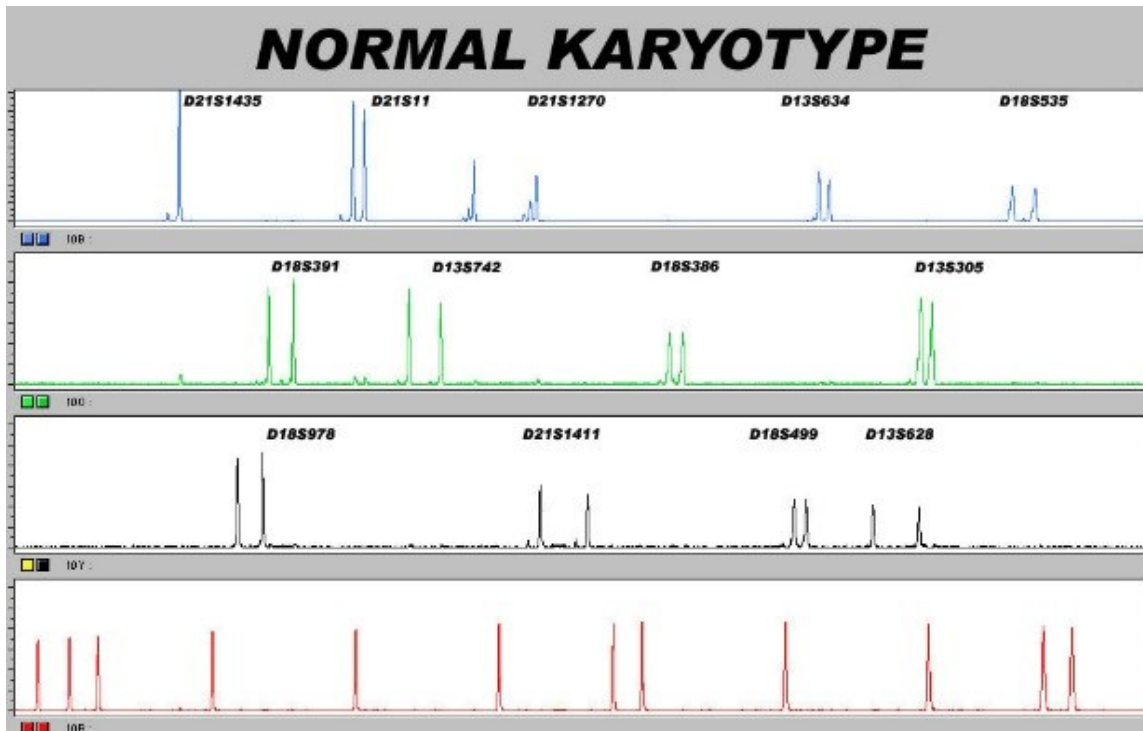


Abbildung 8: QF-PCR Ergebnis von unauffälliger Probe. Fünf Marker amplifizieren für das Chromosom 18 und jeweils vier Marker für die Chromosomen 13 und 21. Die Fenster 1-3 zeigen die Marker welche in den entsprechenden Farben markiert waren um eine Unterscheidung im Sequenziergerät zu ermöglichen. Im letzten, roten Fenster ist der Sizemarker, welcher vor der Analyse jeder Probe beigemischt wird, dargestellt, um eine Zuordnung der einzelnen Marker aufgrund der Länge der PCR-Produkte zu ermöglichen. Die Peakflächen der Marker präsentieren sich in einem Verhältnis von 1:1. Der Marker D21S1435 ist homozygot (ein Peak) und daher nicht informativ (Quelle: Monika Artl, Institut für Humangenetik).

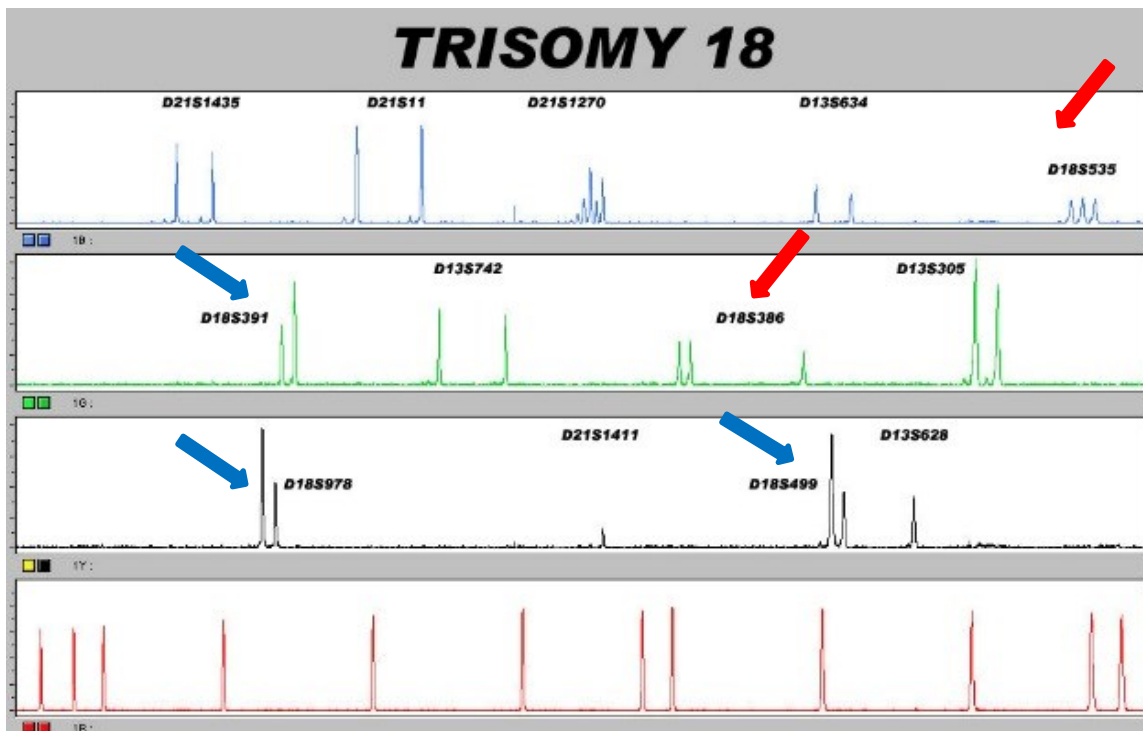


Abbildung 9: QF-PCR Ergebnis einer Probe mit vorliegender Trisomie 18. Die Marker D18S535 und D18S386 liegen triallelisch trisom vor (Verhältnis 1:1:1) (rote Pfeile). Die weiteren Marker am Chromosom 18 diallelic trisom (Verhältnis 2:1) (blaue Pfeile) (Quelle: Monika Artl, Institut für Humangenetik).

In standardisierten Tests werden pro Chromosom mindestens drei unterschiedliche STR-Marker zur Analyse verwendet, um eine zuverlässige Diagnostik durchführen zu können. Diese Methode liefert im Wesentlichen dieselben Informationen wie eine Interphase-FISH, wobei die QF-PCR speziell für den Einsatz von höheren Fallzahlen viel effizienter eingesetzt werden kann. Die QF-PCR liefert bereits innerhalb von 24 Stunden ein Analyseergebnis, was für die Schwangeren eine rasche psychische Erleichterung mit sich bringt (Pertl et al. 1996).

4.2.4.2 Array-CGH

Bei der vergleichenden genomischen Hybridisierung (engl. comparative genomic hybridization) oder CGH werden kurze Oligonukleotidsonden auf Glasobjektträgern - den sogenannten Arrays - immobilisiert, daher der Name Array-CGH (aCGH). Die Oligonukleotidsonden repräsentieren bestimmte Abschnitte im Genom, welche je nach Design des Arrays gezielt für Genregionen oder gleichmäßig über das ganze Genom verteilt sein können. Für die Hybridisierung werden die Patienten-DNA mit einem bestimmten Farbstoff und eine Referenz-DNA mit einem anderen Farbstoff markiert. Die DNA bindet an die komplementären Sonden des Arrays und die

Auswertung erfolgt über die Signalstärke der Fluoreszenzfarbstoffe. Bei einer Über- oder Unterrepräsentation von genomischen Abschnitten der Patienten-DNA ändert sich die Farbintensität und kann so mittels Software-unterstützter Datenauswertung sichtbar gemacht werden (Abb. 10).

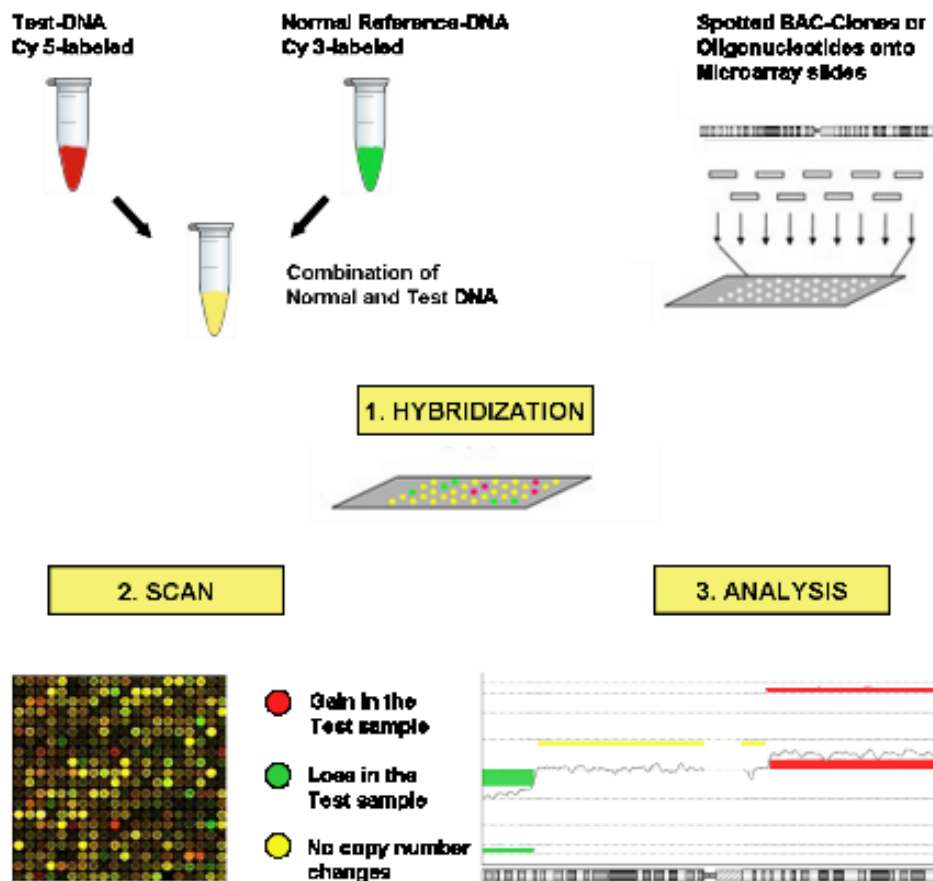


Abbildung 10: Ablauf einer Arrayanalyse: Fluoreszenzmarkierung von Test und Referenz DNA mit zwei unterschiedlichen Fluorochromen. Hybridisierung auf einem Array (1). Auswertung der Farbsignale mittels Laserscan (2). Computergestützte Analyse und Darstellung der Ergebnisse (3). Verlust von chromosomalen Materials der Test-DNA: Zunahme des grünen Farbstoffes. Zugewinn von chromosomalen Materials der Test-DNA: Zunahme des roten Farbstoffes. Ausgeglichenes Verhältnis zwischen Test und Referenz DNA: ausgeglichene Intensität beider Farbstoffe (Quelle: Monika Artl).

Damit können auch sehr kleine Deletionen oder Duplikationen im gesamten menschlichen Genom gleichzeitig und ohne vorherige Kenntnis oder bestimmte Verdachtsdiagnosen über eine Aberration detektiert werden. Daher wird diese Technik auch häufig als molekulare Karyotypisierung bezeichnet, da Zugewinne oder Verluste im gesamten Genom mit einer sehr hohen Auflösung analysiert werden können (Abb. 11). Balancierte Translokationen, Inversionen und Insertionen können allerdings nicht detektiert werden, da es bei diesen Aberrationen keinen Verlust oder Zugewinn von genetischen Material gibt.

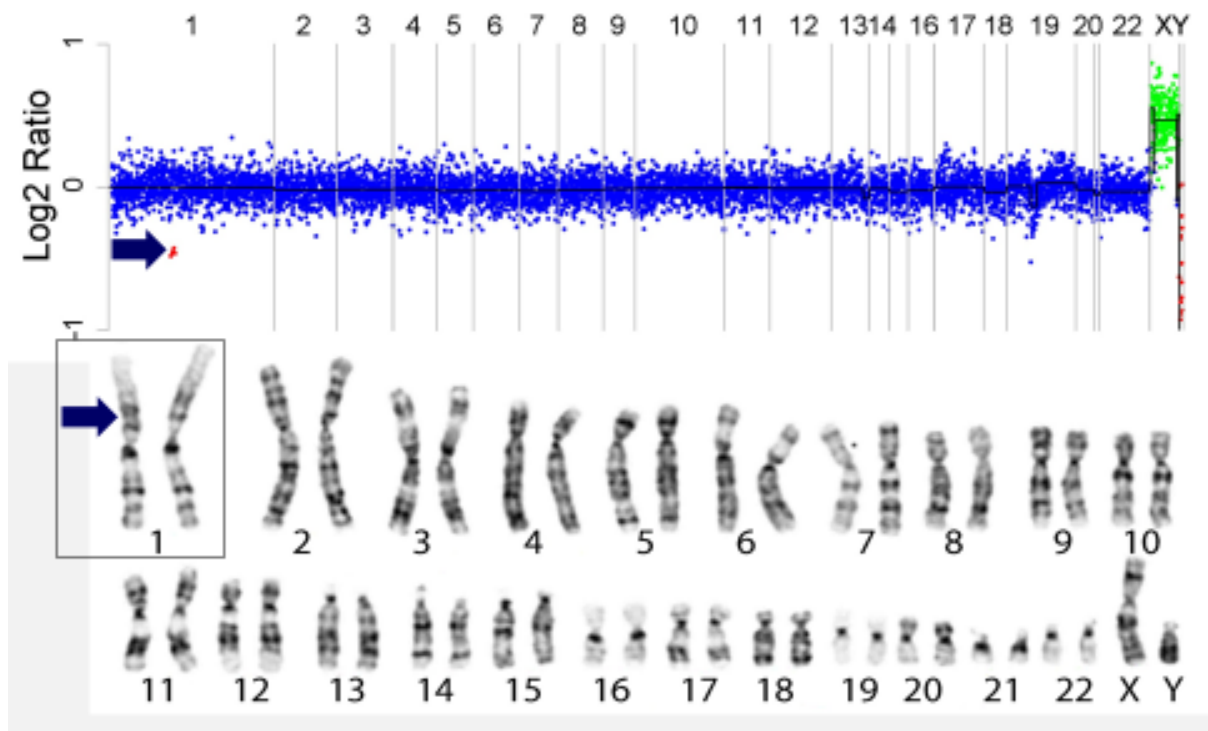


Abbildung 11: Optische Darstellung des gesamten Genoms nach Arrayanalyse. Oben: Log2-Ratios der Intensitäten der einzelnen über das Genom verteilten Sonden. Der Pfeil markiert eine kleine deletierte Region auf Chromosom 1. Unten: Darstellung des zugehörigen Zytogenetischen Ergebnisses. Das korrespondierende Karyogramm zeigt für Chromosom 1 keine nachweisbare Veränderung an der markierten Stelle (Quelle: Zur Verfügung gestellt von Anna Obenauf).

Die aCGH hat in den vergangenen Jahren die Charakterisierung von genetischen Syndromen wesentlich revolutioniert und verbessert. Viele neue Syndrome konnten so klinisch zugeordnet und charakterisiert werden (Speicher et al. 2005). In der Pränataldiagnostik stellt diese Untersuchung die Kliniker jedoch vor eine große Herausforderung, da bei einem genomweiten Screening häufig Aberrationen beobachtet werden, die nur schwer zu interpretieren sind.

4.2.4.3 Nicht invasive pränatale Tests (NIPT)

Die Entdeckung von cffDNA im Plasma und Serum schwangerer Frauen Ende der 1990-er Jahre ermöglichte die Entwicklung nicht invasiver pränataler Tests (Lo et al. 1997). CffDNA ist extrazelluläre meist aus Trophoblasten stammende DNA, deren Anteil in der Schwangerschaft in etwa 5-15% der gesamten zellfreien DNA im Plasma oder Serum der Schwangeren beträgt (Eiben et al. 2014). Trotz dieses relativ geringen Anteils ist es gelungen, erfolgreiche Verfahren zur molekularen Diagnostik chromosomaler Aberrationen zu entwickeln (Gembruch et al. 2013).

CffDNA stammt vermutlich aus apoptotischen Zellen der Plazenta und ist grundsätzlich stark fragmentiert; die Bruchstücke weisen häufig kaum mehr als ca. 150-170 Basenpaare auf (Lo et al. 2010). Aufgrund dieser starken Fragmentierung, nicht zuletzt aber auch wegen der Nachweisgrenze, ist ein gewisser Mindestanteil von ca. 4% an fetaler DNA an der gesamten zirkulierenden DNA im Serum oder Plasma notwendig, um ein qualitativ hochwertiges Ergebnis liefern zu können (Geigl et al. 2011). Verschiedene Faktoren, wie vor allem das mütterliche Gewicht, aber auch das mütterliche Alter, ein zu frühes Gestationsalter sowie die ethnische Herkunft, Raucherstatus und biochemische Parameter können zu einer niedrigeren fetalen Fraktionen von unter 4 % führen (Metzker 2010, Jiang et al. 2012). Je geringer die fetale Fraktion, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für falsch negative Resultate bzw. für die Notwendigkeit einer Reanalyse oder gar einer erneuten Blutabnahme. Die fetale Fraktion hat somit einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis.

Auch die Diskriminierung zwischen maternaler DNA und dem entsprechend relativ geringen Anteil an fetaler DNA stellt eine große Herausforderung für eine solide qualitative und quantitative Analyse dar. Die einfachste Unterscheidung zwischen fetaler und maternaler DNA ist zunächst bei der DNA des Y-Chromosoms (Lo et al. 1997) sowie RhesusD-positiver Sequenzen eines Fetus bei RhesusD-negativen Müttern gelungen (Lo et al. 1998). Bei weiblichen Feten bzw. zur Etablierung eines erweiterten Untersuchungsspektrums wie z. B. Mikrodeletionen müssen jedoch universelle DNA-Marker ihre Anwendung finden, um eine Unterscheidung zwischen mütterlicher und fetaler DNA zu liefern und damit eine zuverlässige Diagnose zu gewährleisten (Geigl et al. 2011). In den letzten Jahren haben sich dazu in der NIPT unterschiedliche Strategien etablieren können.

4.2.4.3.1 SNP-Marker

Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP, engl. Single Nucleotide Polymorphisms) werden in vielen Bereichen der molekularen Diagnostik eingesetzt. Hochpolymorphe Marker erlauben eine genaue Unterscheidung zwischen zwei Individuen und ermöglichen die Erstellung eines genetischen Fingerprints. Bezogen auf die Pränataldiagnostik gilt ein SNP als informativ, wenn die Mutter homozygot und der Fötus heterozygot ist. Deshalb muss bei diesem Versuchsansatz in einem zusätzlichen Analyseschritt auch der gesamte mütterliche SNP-Status ermittelt werden (Dhallan et al. 2007).

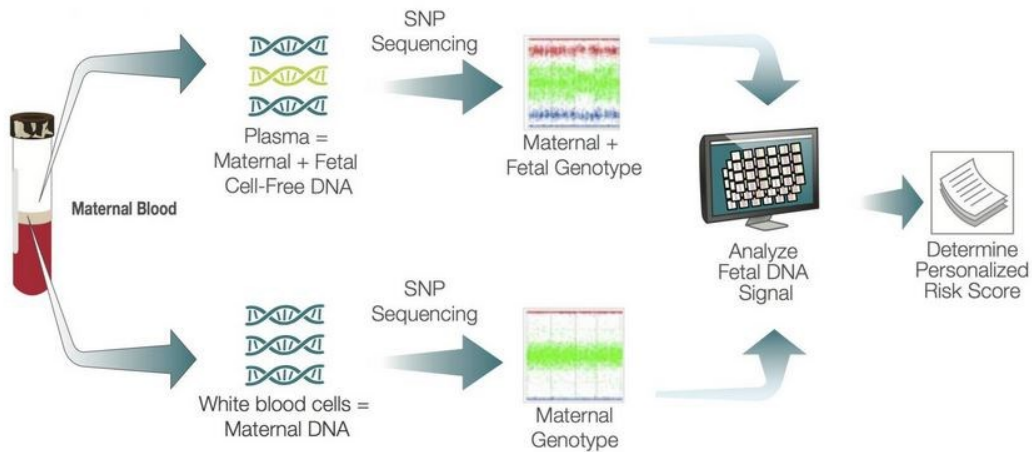


Abbildung 12: Durchführung eines NIPT mittels SNP Analyse. Gleichzeitige Isolierung von DNA aus mütterlichen Zellen bzw. cf-DNA aus dem Plasma. Analyse beider Proben mittels SNP Marker. Softwaregestützte Analyse der fetalen DNA (Natera 2018).

Für einen SNP-basierten NIPT werden üblicherweise rund 20.000 repräsentative, hochpolymorphe SNP-Marker der Chromosomen 13, 18, 21, X und Y ausgewertet. Die Bestimmung eines aneuploiden Feten erfolgt über eine errechnete Ratio der mütterlichen und der fetalen Genotypen (Abb. 12). Im Falle eines euploiden Chromosoms 21 beim Feten (Status: AB) stellt sich die Ratio zwischen dem Chromosom 21 und dem Referenzchromosom als balanciert und damit beim Wert 1 dar. Liegt eine Trisomie 21 vor, so verschiebt sich das Verhältnis nach 2 wenn das väterliche Allel doppelt vorliegt (Status: ABB) bzw. unter 1 wenn das mütterliche Allel doppelt vorhanden ist (Status: AAB) (Abb. 13).

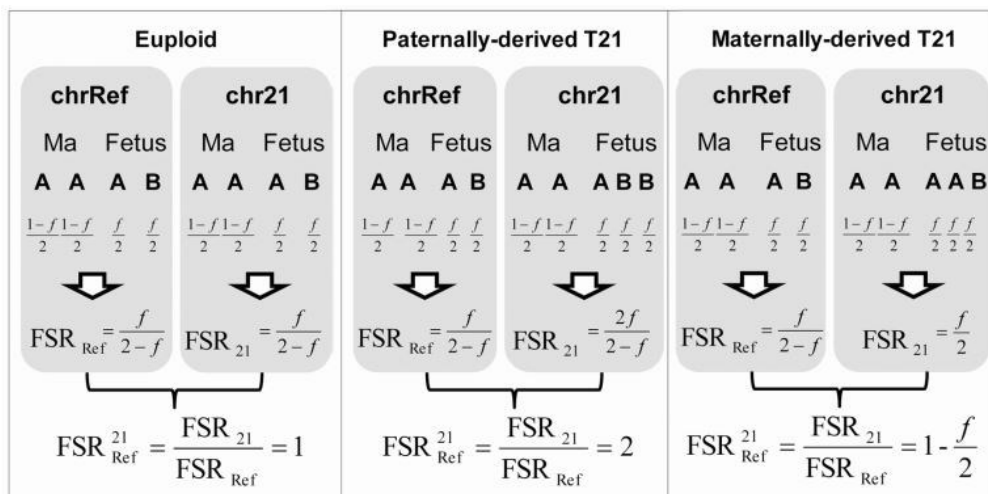


Abbildung 13: Analyseschema zur Feststellung des SNP-Status (Fetus-specific Ration (FSR)) beim Feten. Euploides Chromosom 21: Balanciertes Verhältnis = FSR 1 (linkes Fenster). Trisomie 21 väterlicher (mittleres Fenster) bzw. mütterlicher (rechtes Fenster) Herkunft: FSR von 2 bzw. unter 1 (Liao et al. 2012).

4.2.4.3.2 Epigenetische Marker

Fetale DNA stammt hauptsächlich aus Plazentazellen, daher werden bei diesem Ansatz vornehmlich Gene gewählt, welche sich hinsichtlich ihres Methylierungsstatus von mütterlichen Blutzellen unterscheiden. Die Problematik der notwendigen Bisulfitkonversion bei methylierungsspezifischen PCRs und die damit einhergehende Degradierung der ohnehin schon stark fragmentierten DNA konnte mittlerweile methodisch durch den Einsatz von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen umgangen werden (Poon et al. 2002, Chiu et al. 2011, Chim et al. 2005). Eine weitere Strategie zur methylierungsspezifischen Diskriminierung stellt auch die Immunpräzipitation dar (Papageorgiou et al. 2011).

4.2.4.3.3 Fetusspezifische mRNA

Die Untersuchung fetusspezifischer mRNA stellt einen ähnlichen Ansatz wie die Unterscheidung durch epigenetische Marker dar, um den störenden Einfluss der mütterlichen DNA zu reduzieren. Hier werden in erster Linie Transkripte analysiert, welche ausschließlich von der Plazenta und nicht von mütterlichem Gewebe exprimiert werden (Lo et al. 2007).

4.2.4.3.4 Whole Genome Sequencing (WGS)-basierte Tests

Durch den Einsatz der massiven parallelen Sequenzierung besteht die Möglichkeit, mehrere Millionen unterschiedlicher Nukleotidsequenzen bzw. das gesamte Genom in einem einzigen Ansatz zu analysieren. Beim Vorliegen einer Aneuploidie, meistens einer Trisomie, kann der Anstieg der DNA-Moleküle des entsprechenden Chromosoms abgeleitet werden.

Grundsätzlich ist der Unterschied zwischen einem aneuploiden bzw. euploiden Status ausgesprochen gering. So macht beispielsweise ein relativ kleines Chromosom wie das Chromosom 21 nur 0,75% des gesamten menschlichen Chromosoms aus. Das entspricht 1,5% bei einem gesunden Menschen bzw. 2,25% bei einer Trisomie 21. Umgelegt auf den geringen Anteil von cfDNA von in etwa 10% im mütterlichen Plasma oder Serum ist der Unterschied zwischen einer Trisomie 21 und einer Normalschwangerschaft bei 0,075%. Diesbezüglich werden statistische Verfahren wie die Z-Score Statistik angewandt, um diesen geringen Unterschied detektieren und valide auswerten zu können (Geigl et al. 2011).

4.2.4.3.5 Kommerzielle NIPT Anbieter

Seit der Einführung der ersten NIPT in den USA und China im Jahr 2012, haben sich zahlreiche Anbieter mit unterschiedlichen Methoden am Markt etabliert. Mittlerweile werden unterschiedliche NIPT in mehr als 60 Ländern der Welt angeboten und mehrere Millionen Schwangere haben diese Tests bereits in Anspruch genommen. Im Laufe der Jahre sind die Kosten der Tests kontinuierlich gesunken (Dohr et al. 2014), sodass bei einer Entscheidung für einen NIPT heutzutage, je nach Anbieter und Umfang des Tests, mit 200€ bis 400€ gerechnet werden muss (Ariosa Diagnostics 2018, LifeCodexx 2017, Natera 2018). Die am weitesten verbreiteten Tests sind der „Panoramatest“ der Firma *Natera*, der „Praenatest“ der Firma *LifeCodexx* und der „Harmonytest“ der Firma *Ariosa*, diese wurde 2015 von *Roche* übernommen.

Hinsichtlich des methodischen Ablaufs und/oder der Anreicherung von bestimmten Sequenzen haben die einzelnen Anbieter von NIPTs unterschiedliche Strategien entwickelt. So findet bei dem aus Deutschland stammenden Praenatest der Firma *LifeCodexx* eine WGS-basierende Strategie ihre Anwendung. Bei dem in den USA vorherrschenden Panoramatest die Analyse mittels SNP-Technologie. Auch der Anbieter des in Österreich hauptsächlich angebotenen Harmony-Tests der Firma *Ariosa* verwendet SNP-basierte Tests. Im Gegensatz zum Panoramatest hingegen jedoch ein sogenanntes DANSR-Verfahren (digital analysis of selected regions) bei dem gezielt nur bestimmte Zielsequenzen amplifiziert und analysiert werden. Bei diesem Verfahren werden SNP-Sequenzen bestimmter Chromosomen wie 13, 18 und 21 mittels einer zielgerichteten Amplifikation analysiert (Abb. 14) (Ariosa Diagnostics 2018). Diese selektive Anreicherung führt zu einer wesentlichen Effizienzsteigerung durch die höhere Coverage in der Analyse der ausgewählten Chromosomen (Stumm et al. 2012, Sparks et al. 2012).

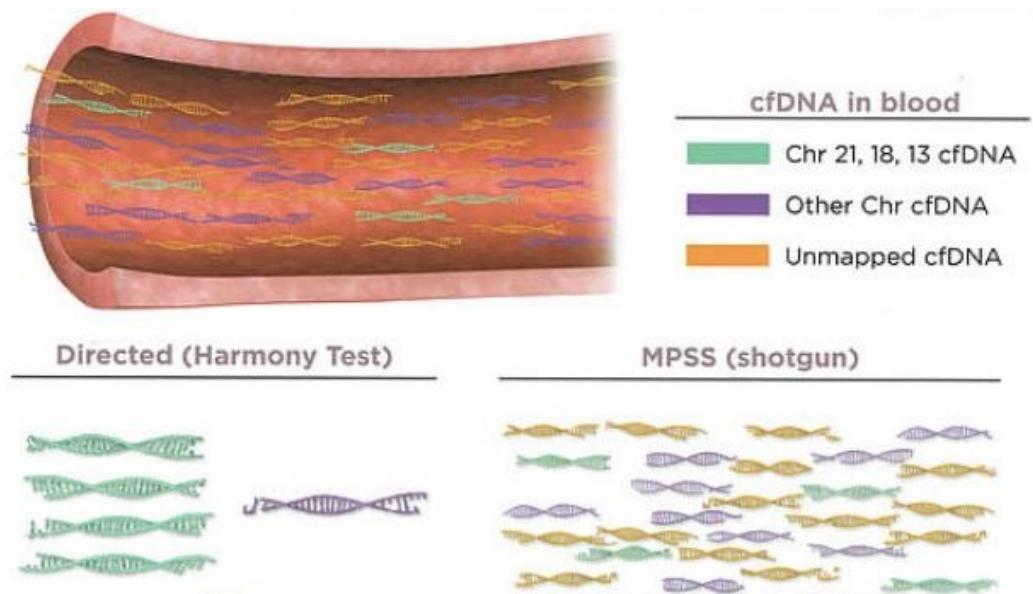


Abbildung 14: Schematische Darstellung der gesamten zirkulierenden DNA im mütterlichen Kreislauf. Darstellung von nicht untersuchter DNA (unmapped cf-DNA) bzw. fetaler und mütterlicher cf-DNA der Chromosomen 13, 18 und 21 (Ariosa Diagnostics 2018).

Da die genannten Verfahren auf der statistischen Verschiebung innerhalb von einzelnen Sequenzen bzw. einem Referenzgenom beruhen, können Triploidien grundsätzlich nicht erkannt werden. Lediglich beim Panoramatest wird optional auch die Abklärung einer Triploidie angeboten. Derzeit werden von einigen Anbietern von NIPTs wie *LifeCodexx* oder *Natera* neben Aneuploidien der Geschlechtschromosomen, auch häufige Mikrodeletionssyndrome wie DiGeorge, Prader-Willi oder Wolf-Hirschhorn analysiert. Natürlich steht auch die Entwicklung von Tests für monogene Erkrankungen im steigenden Interesse der Wissenschaftler. Der Nachweis von väterlichen Mutationen z.B. *FGFR3* Mutationen, die autosomal dominant vererbt werden, ist dabei einfacher zu führen, als die Diagnose von autosomal rezessiv übertragenen Krankheiten vor allem wenn beide Eltern die Träger der gleichen Mutation sind (z.B. adrenogenitales Syndrom). Die Etablierung solcher Tests steht jedoch sowohl in der pränatalen Routinediagnostik aus Zellen fetalen Ursprungs als auch in der Diagnostik von cffDNA bis dato trotz vielversprechender Ergebnisse noch aus (Helgeson et al. 2015, Geigl et al. 2011).

4.2.4.3.6 Sensitivität und Spezifität

Abhängig von den unterschiedlichen Versuchsansätzen können unterschiedliche Qualitätsparameter abgeleitet werden. Allen voran müssen natürlich die Qualität der cf-DNA, der Anteil der fetalen Fraktion sowie die Coverage als erste Parameter zur Sicherung einer profunden und reproduzierbaren Analyse herangezogen werden.

Häufig werden für die Sicherheit der Ergebnisse bei den unterschiedlichen Firmen statistische Parameter wie Sensitivität, Spezifität und Falsch-Positiv/Negativ-Rate zur Qualitätssicherung und Analysensicherheit angegeben. Die Sensitivität gibt dabei die Fähigkeit eines Testsystems an, Kranke als tatsächlich krank einzustufen und ist somit die Trefferquote einer Analyse. Die Sensitivität einer Methode addiert mit der Falsch-Negativ-Rate immer den Wert 1 (oder 100%). Die Spezifität gibt hingegen die Fähigkeit eines Tests an, Gesunde als gesund oder negativ zu identifizieren und wird deshalb auch als die richtig-negativ Rate bezeichnet. Addiert man zur Spezifität die Falsch-Positiv-Rate, so ergibt sich auch hier der Wert 1 (oder 100%). Alle diese Werte können eher als epidemiologisch relevante Kerngrößen gesehen werden. Klinisch relevanter für die Patientinnen ist jedoch der positiv prädiktive Wert (PPV) bzw. der negativ prädiktive Wert (PNV). Diese geben an, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Patientin, wenn sie als positiv/negativ eingestuft wurde, auch tatsächlich positiv/negativ ist.

Für die häufigsten Aneuploidien findet man in der Literatur unterschiedliche Werte hinsichtlich der einzelnen Chromosomen. Nicht zuletzt aufgrund der hohen Fallzahlen weisen die Untersuchung der Trisomie 21 bei allen Studien die höchste Sensitivität (>99%) und Spezifität (99%) auf. Dies ist vor allem auch auf die hohen Fallzahlen mit einer entsprechenden Trefferquote zurückzuführen. Für die Trisomie 18 werden jeweils 97-99% Sensitivität bzw. 79-92% für die Trisomie 13 angegeben (Sachs et al. 2015). Die Spezifität wird bei den meisten Aneuploidien mit 99%, respektive Falsch-Positiv-Rate mit 1 % beziffert.

5 DISKUSSION

Als Kary Mullis 1983 die Methode der PCR erfand, lieferte dies einen substantiellen Quantensprung in der molekularen Diagnostik und ermöglichte eine immense Verbesserung und Beschleunigung in unzähligen Bereichen der Medizin und Biowissenschaften.

Derzeit befindet sich die genetische Diagnostik durch die Entwicklung des NGS und den damit einhergehenden verminderten Kosten bei erhöhtem Durchsatz erneut in einem bannbrechenden Wandel. Diese Entwicklungen machen auch vor sensiblen Bereichen wie der Pränataldiagnostik nicht halt. Die Möglichkeit mittels einer nicht invasiven Diagnostik eine Analyse für die relevanten, häufigsten Trisomien bereitzustellen, bringt einen Paradigmenwechsel mit sich. Die Untersuchung weiterer genetischer Erkrankungen wie etwa Mikrodeletionssyndrome werden bereits kommerziell angeboten. Doch selbst das derzeit angebotene Spektrum an Untersuchungsmethoden stellt mit Sicherheit nicht das Ende der Möglichkeiten dar, da mittlerweile das gesamte fetale Genom aus dem mütterlichen Blut rekonstruiert werden kann (Kitzman et al. 2012).

Diese Entwicklung beschleunigt nicht nur die Diagnosestellung ganz wesentlich, sondern wird auch ein grundlegendes Umdenken in Analytik, Beratung und dem individuellen Umgang mit genetischen Daten mit sich bringen. Während beispielsweise vor wenigen Jahren das mütterliche Alter ab 35 Jahre noch als sichere Indikation für eine invasive Pränataldiagnostik galt, hat der zunehmende Anteil an älteren Schwangeren auch zu einer erhöhten Prävalenz von Trisomie 21 geführt. Dadurch müsste sich, nach alten Richtlinien, heutzutage ein sehr hoher Anteil an älteren Schwangeren mit der Frage nach einer invasiven Pränataldiagnostik auseinandersetzen (Held et al. 2014). Die Entwicklung des ETS hat dieser Notwendigkeit die Brisanz genommen, sodass eine invasive Diagnostik trotz steigender Anzahl an älteren Schwangeren zahlenmäßig kontinuierlich gesunken ist.

Trotz des technischen Fortschritts auf dem Gebiet der NIPTs, werden die invasiven Methoden mit angeschlossener Zytogenetik in der Pränataldiagnostik derzeit immer noch als der Goldstandard zur Analyse von chromosomalen Aberrationen herangezogen. Der große Vorteil dieser Untersuchung ist die Möglichkeit viele einzelne Zellen hinsichtlich chromosomaler Veränderungen beurteilen zu können. Im Rahmen der klassischen Zytogenetik können sowohl numerische als auch strukturelle Chromosomenaberrationen festgestellt werden, allerdings mit der Limitation einer eingeschränkten Auflösung. Im Gegensatz zu molekularen Methoden wie Array-basierenden Verfahren oder den derzeit angewandten NGS-Strategien, können ausgeglichene Chromosomenmutationen wie balancierte Translokationen, Inversionen oder

Insertionen bei entsprechender Größe und mikroskopischer Auffälligkeit ausschließlich mit der klassischen Zytogenetik detektiert werden. Die Feststellung von Mosaikkonstellationen im Untersuchungsmaterial kann durch den parallelen Ansatz mehrerer Kulturen relativ leicht geführt werden. So können auch Kulturartefakte gut beurteilt werden, wenn Aberrationen beispielsweise lediglich in nur einer Kultur bzw. überhaupt nur einem Zellklon vorkommen. Wird nach der Kultivierung der Zellen aus Fruchtwasser oder CVS DNA isoliert und anschließend mit molekulargenetischen Methoden analysiert, ist der Nachweis bzw. Ausschluss von Kulturartefakten allerdings nicht mehr gegeben.

Die Hoffnungen und Bestrebungen invasive Methoden durch minimal oder nicht invasive Methoden vollständig ablösen zu können, bestehen vor allem wegen der möglichen Gefährdung der Schwangerschaft. Üblicherweise werden Punktionen in Spezialkliniken bzw. Pränatalzentren von hochspezialisierten Fachpersonal durchgeführt, dennoch besteht durch den invasiven Eingriff ein Abortrisiko von ca. 0,5 – 1%. Für die standardmäßig angeschlossene Zytogenetik besteht zusätzlich ein hoher Personalaufwand mit den dafür hochqualifizierten Personen, um speziell bei der Chromosomenauswertung eine Auflösungsgrenze von 5-10 Megabasen gewährleisten zu können. Ein weiterer Nachteil von invasiven Methoden mit der relativ kostengünstigen Zytogenetik ist die relativ lange Kultivierungsdauer von durchschnittlich 14 Tagen. Nach einer CVS besteht aufgrund der hohen Zellzahl zwar zusätzlich zur Kultivierung der Zellen auch die Möglichkeit einer Direktpräparation von Chromosomen aus den Zotten, allerdings erlaubt diese Methode häufig nur eine numerische und grob strukturelle Beurteilung der Chromosomen, sodass eine Kultivierung der Zellen zur Absicherung jedenfalls noch abgewartet werden sollte. Die CVS wird in den meisten Fällen bereits im ersten Trimenon zwischen 10.-12. SSW durchgeführt, eine Fruchtwasserpunktion frühestens ab der 14. SSW. Die CVS könnte daher noch ein Ergebnis innerhalb der Fristenlösung bis zur 12. SSW liefern. Das bedeutet, dass eine Termination der Schwangerschaft innerhalb des gesetzlichen Rahmens auch ohne Indikation auf bloßen Wunsch der Mutter durchgeführt werden könnte. In Österreich erfolgt daher die Analyse der Geschlechtschromosomen bzw. die Mitteilung des Geschlechts bei einer CVS erst nach der 12. SSW, um eine Abtreibung aufgrund eines unerwünschten Geschlechts des Kindes zu vermeiden.

Zusätzlich zur Zytogenetik können aus dem gewonnenen Fruchtwasser oder den Chorionzotten direkt aus dem Untersuchungsmaterial oder aber auch nach erfolgter Kultivierung unterschiedliche FISH-Analysen angeschlossen werden. Der FISH-ST für die häufigsten Trisomien 13, 18, 21 sowie X und Y wird auch noch heute von vielen Sondenherstellern kommerziell als Test-Kit angeboten und war viele Jahre eine solide und schnelle Methode, um Klarheit über numerische Auffälligkeiten dieser Chromosomen zu liefern. Die Analyse von Interphasekernen liefert innerhalb weniger Stunden nach der Punktion ein Ergebnis. Abhängig von der morphologischen

Qualität und Anzahl der Interphasekerne kann die mikroskopische Auswertung der Tests auch bei einer hohen fachlichen Kompetenz der beurteilenden Person eine große Herausforderung und vor allem einen hohen zeitlichen Aufwand darstellen. Der FISH-ST wurde heutzutage fast zur Gänze von der quantitativen Fluoreszenz-PCR abgelöst. In einem Multiplex-PCR Ansatz können die Proben hinsichtlich der Chromosomen 13, 18 und 21 mittels Markeranalyse untersucht werden, die Aussagekraft ist bei diesem Test vergleichbar mit dem FISH-ST. Die Methode ist von der Qualität der Zellen nahezu unabhängig, da in den meisten Fällen ausreichend hochmolekulare DNA extrahiert werden kann, um eine profunde Analyse zu gewährleisten. Ähnlich wie beim FISH-ST liefert die QF-PCR ein Ergebnis innerhalb von wenigen Stunden. Die Auswertung erfolgt Software-unterstützt und kann daher leichter objektiviert werden als die mikroskopische Analyse des FISH-ST. Mosaikkonstellationen können sowohl mit der QF-PCR als auch dem FISH-ST detektiert werden, wobei eine Differentialdiagnose zwischen Mosaikkonstellationen und mütterlicher Kontamination mit der QF-PCR durch die parallele Marker-Statusbestimmung der mütterlichen DNA leichter geführt werden kann als der FISH-ST. Hier ist eine klare Unterscheidung zwischen mütterlichen und fetalen Zellen nur bei einem männlichen Fetus über die Fluoreszenzsignale für die Geschlechtschromosomen möglich.

Weitere FISH Untersuchungen mittels Sonden für Mikrodeletionssyndrome (DiGeorge, Cri-du-Chat, Williams-Beuren) oder Whole Chromosome Paint Sonden werden meist ausschließlich indikationsspezifisch bei Vorliegen eines dringenden Verdachts auf ein bestimmtes Syndrom oder eine strukturelle Aberration durchgeführt. Seit der Einführung von Array-Analysen wurden jedoch auch diese Untersuchungen weitestgehend abgelöst. Die Analyse von Mikrodeletionssyndromen kann mit der Array-Analyse ebenso geführt werden wie mit spezifischen Fluoreszenz-Sonden. Die erweiterte Aussagekraft eines Arrays bietet jedoch viele Vorteile. Einerseits kann mittels einer FISH-Sonde ausschließlich die spezifisch hybridisierte Zielregion überprüft werden, während mit dem Array die Bruchpunkte einer Aberration bis auf wenige Kilobasen hin bestimmt werden können. Dies spielt zum Beispiel bei der Differentialdiagnose von Syndromen in gleichen Regionen mit unterschiedlicher Größe und Beteiligung von mehreren Genen eine Rolle. Zusätzlich ermöglicht die Arrayanalyse auch die Feststellung von Duplikationen, welche mit einer FISH-Sonde nur in Sonderfällen detektiert werden können. Außerdem wird bei einer Array-Untersuchung das gesamte Genom analysiert, welches die diagnostische Aussagekraft wesentlich erhöht. Der kostentechnische und apparative Aufwand bei einer Arrayanalyse macht eine Entscheidung zur Durchführung dieser Technik jedoch von den finanziellen Möglichkeiten eines Labors abhängig. Methodisch ist die Analyse von vier bis acht Proben auf einem einzigen Array vorgesehen, sodass diese Untersuchung nur für Labors mit einem entsprechenden Probendurchsatz sinnvoll ist.

Die Etablierung der Mikroarray Untersuchungen erweiterte die Möglichkeiten in der humangenetischen Diagnostik und ermöglichte die Aufklärung einer Reihe von bisher ungelösten Fällen. Die bis zur Einführung des Arrays als Standard angewandte klassische G-Bänderungstechnik konnte aufgrund der eingeschränkten Auflösung im Bereich von etwa 5-10 Mb kleinere und submikroskopische Deletionen oder Duplikationen nicht detektieren. Die Einführung der Arraytechnologie erlaubte die Analyse von kleinsten Aberrationen im gesamten Genom und führte zur Charakterisierung vieler neuer Mikrodeletions- und Mikroduplikationssyndrome, die bisher nur unzureichend beschrieben waren. Mittels des Arrays können gleichzeitig hunderte genetische Syndrome analysiert und festgestellt werden (Patel et al. 2016).

In der Pränataldiagnostik hat sich die aCGH dennoch nur sehr langsam durchgesetzt, da die Interpretation von möglichen pathogenen Befunden, die nicht in ursächlichem Zusammenhang mit der ursprünglichen Indikation stehen, zu großen Bedenken seitens der beratenden Ärzte geführt hat. Der Umgang mit Aberrationen deren Einschätzung aufgrund unzureichender Beschreibung in Datenbanken schwierig ist, wird nach wie vor heftig diskutiert. Mittlerweile haben die vielen Vorteile einer Arrayuntersuchung beim gleichzeitigen Vorliegen einer entsprechenden Indikation viele Bedenken weitestgehend ausgeräumt und die Analyse zählt mittlerweile zum festen Bestandteil in der Pränataldiagnostik.

Für die molekulare Karyotypisierung mittels Array benötigt man aus dem Fruchtwasser- oder Chorionzellen isolierte DNA. Die Isolierung von DNA aus Zellen ist sowohl direkt nach der Probenentnahme als auch nach erfolgreicher Kultivierung möglich. Um etwaige falsch positive Befunde durch Kulturartefakte zu vermeiden, ist der direkten Isolierung von DNA in jedem Fall der Vorzug zu geben. Mit der erhaltenen DNA können sämtliche molekulargenetische Untersuchungstechniken wie Array-Diagnostik, die Durchführung der QF-PCR oder auch spezifische Sequenzierungen aufgrund spezieller Indikationen wie in etwa monogene Erbkrankheiten in der Familie angeschlossen werden. Aus den Zellen kann - im Gegensatz zu der sehr stark fragmentierten fetalen DNA aus mütterlichem Plasma - hochmolekulare und daher qualitativ sehr hochwertige DNA gewonnen werden. Zudem macht die fetale DNA im mütterlicheren Plasma nur einen kleinen Teil aus, was hochsensitive Methoden zum Nachweis der cfDNA erfordert. Mütterliche Kontaminationen können aber auch bei allen invasiven Techniken vorkommen. Dies liegt zum einen an der Entnahmetechnik und Erfahrung des Operateurs oder einem vorangegangenen Einbluten in die Entnahmestelle bzw. in die Fruchthöhle. Im Normalfall sollte deshalb bei allen invasiven Methoden gleichzeitig auch eine Abnahme von mütterlichen Blut vorgenommen werden, um gegebenenfalls einen Kontaminationsausschluss mittels Markeranalyse durchführen zu können.

Nicht invasive Methoden wie z. B. der Combined Test im Rahmen des ETS basieren auf Risikokurven und Berechnungsalgorithmen zur Ermittlung eines individuellen Risikos aufgrund von mütterlichem Alter, Ultraschallauffälligkeiten und serologischen Parametern. Diese zielen in erster Linie darauf ab, Risikoschwangerschaften zu erkennen, um für die Schwangere ein entsprechendes Management oder gar eine Intervention folgen zu lassen. Grundsätzlich sollten Screeningverfahren eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die Detektionsrate des ETS hat sich, speziell bei der Trisomie 21, in den vergangenen Jahren als sehr genau herausgestellt und wird deshalb in einigen europäischen Ländern bereits als Regelleistung angeboten (Ekelund et al. 2008). In Österreich ist diese Untersuchung nach wie vor die freiwillige Entscheidung der Mutter und wird ausschließlich kostenpflichtig angeboten. Trotz der hohen Trefferquote muss dieser Test lediglich als Entscheidungshilfe für Schwangere zur Durchführung einer invasiven Diagnostik angesehen werden. Der Test ist im Rahmen einer Ultraschalluntersuchung mit mütterlicher Blutabnahme einfach und auch kostengünstig durchführbar. Ein unauffälliges ETS kann für schwangere Frauen eine auch ein zusätzliches Argument sein, eine invasive Diagnostik erst gar nicht durchführen zu lassen. Ein negatives Testergebnis bedeutet aber nicht zwingend tatsächlich ein gesundes Kind erwarten zu können. Umgekehrt kann bei einem auffälligen ETS ausschließlich eine invasive Diagnostik genaue Aufklärung bringen. Für viele Schwangere kann dieser Screeningtest daher als Entlastung angesehen werden, für viele erweist sich dieser jedoch auch als nachteilig. Wenn eine Schwangere keinerlei Konsequenzen aus einem positiven Befund ziehen würde, ist die Durchführung dieser Analyse von vorne herein in Frage zu stellen, da dieser in diesem Fall nur zu einer Verunsicherung führen würde. Daher sollte der Aspekt einer Entscheidung nach einem positiven Ergebnis in einem ausführlichen Gespräch mit den zuständigen Ärzten vorab geklärt werden.

Das ETS hat sich in den letzten Jahren zu einer wichtigen Screeningmethode für eine große Anzahl von Schwangerschaften mit Komplikationen entwickelt. Es bleibt abzuwarten, ob der NIPT diese gut etablierte Methode ablösen wird, zumal beim klassischen ETS die Ultraschalldiagnostik als zentraler Bestandteil eine wesentlich erweiterte Aussagekraft gegenüber der NIPT bietet. Derzeit ist der NIPT im Gegensatz zum ETS vorwiegend auf ein Aneuploidiescreening ausgerichtet. Die Bestrebungen von kommerziellen NIPT Anbietern gehen jedoch hin zur Detektion einer zunehmenden Anzahl weiterer Indikationen wie Mikrodeletionssyndrome und in Zukunft wahrscheinlich auch monogene Erkrankungen.

Derzeit gibt es für die Durchführung von NIPT im deutschsprachigen Raum klare Richtlinien und Entscheidungskriterien (Schmid et al. 2015): Demnach soll ein NIPT ausschließlich als ergänzende Methode zur klassischen Vorsorgeuntersuchung im Rahmen der Mutter-Kind-Pass Untersuchungen bzw. nach einem auffälligem Combined Test gesehen werden. Die Untersuchung

soll eine weitere Entscheidungshilfe für oder gegen einen invasiven Eingriff wie etwa einer Fruchtwasserpunktion liefern und somit die Anzahl an invasiven Eingriffen reduzieren.

Eine Screeningmethode soll nicht als Analyse zur Feststellung oder dem Ausschluss einer genetischen Erkrankung gesehen werden und darf daher nicht als primäres Screening für Trisomie 21 ihre Anwendung finden. Im Moment wird der NIPT fast ausschließlich als Erweiterung nach einem auffälligen ETS durchgeführt.

Trotz der guten Aussagekraft hinsichtlich der gängigsten Trisomien muss vor allem bei der Erstellung von klinischen Befunden auf die Limitationen dieser Methode hingewiesen werden. Die Ursache solcher Einschränkungen liegt zum einen an der Natur der chromosomalen Veränderung die zu keinem Zugewinn oder Verlust von genetischen Material führt oder unter der Nachweisgrenze bleibt, aber auch andere Faktoren wie eine vorliegende Grunderkrankung der Mutter oder andere biologische Faktoren können ein Testergebnis beeinflussen. Zusammengefasst kann das Vorliegen der folgenden Gründe zu falsch negativen Ergebnissen führen:

- Strukturelle Chromosomenaberrationen wie in etwa balancierte Translokationen und Insertionen, die zu keinerlei quantitativen Veränderungen von genetischen Material führen
- Polyploidien, da die Tests auf statistischen Verschiebungen innerhalb von DNA-Fraktionen beruhen
- Somatische und fetale Mosaik oder fetoplazentare Diskrepanzen: Diese liegen zum einen unter der Nachweisgrenze, da der Anteil der cffDNA an der Gesamt-ccf-DNA ohnehin schon sehr gering ist. Zum anderen sind die Mutationsraten im Trophoblast relativ hoch und können so, abhängig vom Zeitpunkt der Mutation, zu fetalen Mosaiken oder Plazentamosaik führen und somit falsch positive Ergebnisse liefern
- Vanishing Twins. Vor allem in der Reproduktionsmedizin kann ein abgestorbener Zwilling genügend cffDNA beitragen, um ein Ergebnis zu verfälschen
- Maternale gonosomale Mosaik
- Vorliegende maternale genetische Erkrankungen wie beispielsweise Tumorerkrankungen oder andere Kopienzahlveränderungen können das Ergebnis beeinflussen

Die Strategien des NIPTs können unter den einzelnen Anbietern wesentlich differieren. Davon abhängig ist entsprechend auch die Liste der Limitationen zu sehen. Während einige Firmen ausschließlich auf das Aneuploidiescreening der Chromosomen 13,18, und 21 fokussiert sind, wird von anderen Anbietern auch die Untersuchung von Geschlechtschromosomen sowie

bestimmten Mikrodeletionssyndromen angeboten. Schwangere müssen besonders auf die Problematik im Umgang und der Interpretation hinsichtlich von Detektionsraten und prädiktiver Wertigkeit hingewiesen werden. Aufgrund der hohen Fallzahlen aber auch der hohen Prävalenz ist die Detektionsrate für die Trisomie 21 mit über 99% wohl die Überzeugendste. Bei den Trisomien 13 und 18 variieren die Angaben der NIPT Anbieter zwischen 75-99%. Für die Patientinnen müssten die Detektionsraten jedoch nur als statistische Parameter interpretiert werden. Viel relevanter ist die Angabe des positiv prädiktiven Wertes (PPV, positive predictive value). Dieser gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein positives Testergebnis tatsächlich positiv ist und ein negatives Ergebnis eine Aberration ausschließen kann. Zudem hängt der PPV auch von der Prävalenz der Krankheit ab, und ist somit umso zuverlässiger je mehr Betroffene in einer Kohorte vorhanden sind. Daher gibt es gute Vorhersagewerte für Trisomie 21 und Frauen über 35 Jahre, da es hier wesentlich öfter zum Vorliegen einer Trisomie 21 kommt als bei unter 25-jährigen, bei denen eine Trisomie 21 ein seltenes Event darstellt. Außerdem gibt es bzgl. der PPV auch große Unterschiede, da viele NIPT Ergebnisse zum einen nicht immer mit einer weiteren zweiten Untersuchungsmethoden bestätigt werden. Zum anderen hängt die Diagnose einer Trisomie auch noch an vielen anderen Faktoren wie mütterliches Alter oder Ultraschallauffälligkeiten, welche bei einem reinen NIPT nicht miteinbezogen werden.

Fest steht jedoch, dass die Testung von Aberrationen der Geschlechtschromosomen sowie von Mikrodeletionssyndromen aufgrund nicht ausreichender Fallzahlen noch nicht dieselbe Testgüte liefern kann wie jene der Trisomie 21. Die Falsch-Positiv-Raten werden zwar höher eingeschätzt als bei den gut etablierten Aneuploidien 13, 18 und 21, allerdings gibt es noch keine konkreten Daten (Vora et al. 2014). Vor allem bei den Mikrodeletionssyndromen sind die Fallzahlen viel geringer als vergleichsweise bei der Trisomie 21. Auch innerhalb der Mikrodeletionssyndrome können die Detektions- und Falsch-Positiv-Raten nicht verglichen werden, da es sich um genetische Erkrankung mit völlig unterschiedlichen Prävalenzen handelt. Beispielsweise liegt beim DiGeorge-Syndrom mit einer Prävalenz von ca. 1:2.500 und einer Detektionsrate von 99% der positive prädiktive Wert in etwa bei 5%. Hingegen beim Cri-du-Chat Syndrom mit einer niedrigeren Prävalenz von 1:50.000 ändert sich bei gleichbleibender Detektionsrate der positive prädiktive Wert auf 0,27%. Das ändert die Wertigkeit eines NIPT für die unterschiedlichen Indikationen signifikant und sollte daher auch ein wichtiger Bestandteil in der Aufklärung der Schwangeren sein. Dazu kommt, dass Mikrodeletionssyndrome wie z. B. das DiGeorge Syndrom *per se* nicht letal sind und deren Untersuchung mit der ursprünglichen Indikationen nicht zwingend im Zusammenhang stehen muss, oder vielleicht sogar als Erhebung eines Zufallsbefunds eine größere Verunsicherung für eine Schwangerer darstellt. Dies stellt auch in der Beratungssituation eine große Herausforderung dar. Dementsprechend müssen die Auswahl der

entsprechenden NIPT-Plattformen, die Bedeutung der Ergebnisse und vor allem die weiteren Schritte nach einem NIPT genauestens mit der Patientin erläutert werden.

Als weitere Problematik kann sich nach einem NIPT auch die Feststellung weiterer Zufallsbefunde ergeben. Da ca. 90% der zirkulierenden DNA mütterlichen Ursprungs sind, wird bei einem NIPT auch der genetische Status der Mutter miterhoben. Nicht selten werden dabei mütterliche gonosomale Aneuploidien detektiert und können somit das Ergebnis verfälschen (Wang et al. 2014). In diesem Zusammenhang dürfen auch die Detektionsraten hinsichtlich der Geschlechtschromosomen hinterfragt werden, da Mütter mit Aberrationen der Geschlechtschromosomen durchaus einen wichtigen genetischen Beitrag zum Untersuchungsergebnis liefern. Des Weiteren können auch maligne Geschehen durch die Ausschwemmung von zirkulierender Tumor DNA einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis nehmen (Bianchi et al. 2015). Als letzte Schwierigkeit in der Analyse sollen an dieser Stelle auch noch Plazentamosaiken genannt werden, denn auch eine Mosaikkonstellation innerhalb des Plazentagewebes kann eine starke Über-/oder Unterrepräsentation der tatsächlich gesunden DNA des Feten und damit falsch positive Ergebnisse bewirken.

Insbesondere die zuletzt angeführten Faktoren sollen die Wichtigkeit von angeschlossenen invasiven Analysemethoden zur Abklärung der Ergebnisse hervorheben. Je nach Auffälligkeiten im Ultraschall bzw. Ergebnissen des ETS sollte sorgfältig abgewogen werden, ob ein NIPT in bestimmten Fällen der Mutter überhaupt angeboten werden sollte, oder von vorne herein eine invasive Methode angeraten werden sollte. Kann beispielsweise der Verdacht auf eine Trisomie 13, 18 oder 21 aufgrund des Ultraschalls weitestgehend ausgeschlossen werden oder liegt bereits der Verdacht auf ein konkretes genetisches Syndrom vor, kann der Schwangeren ein unnötiger psychischer Stress aufgrund der verlängerten Abklärungszeit durch den NIPT erspart werden.

Die ständige Verbesserung der Analyse und der technische Fortschritt werden auf dem Gebiet der NIPTs kurz- bis mittelfristig die zuverlässige Diagnosestellung vom bisherigen, aber auch einem sich ständig erweiternden Spektrum an kleinen unbalancierten Chromosomenstörungen, vielleicht sogar von monogenen Erkrankungen zulassen. Die Feststellung von genomweiten Aberrationen bzw. das Screening auf bekannte autosomal dominant vererbte Erkrankungen oder Kopienzahlveränderungen (CNV) wird zukünftig bereits vor der 12. SSW möglich sein.

Durch die ständige Verbesserung von Datenbanken, die immer strenger validiert und somit präziser werden, können die generierten Daten einfacher und genauer interpretiert und klassifiziert werden. Technische Limitationen von heute werden sich in absehbarer Zeit durch Verbesserungen der derzeitigen Methoden oder durch neue Untersuchungsstrategien aufheben. Damit werden viele der heutigen Probleme zunehmend in den Hintergrund rücken.

Hinzu kommt, dass die globalisierte Medizin auch für Patienten selbst die Möglichkeit eröffnet, nationale Gesetzgebungen zu umgehen und eine Blutprobe eigenständig im Ausland analysieren zu lassen. Eine umfassende genetische Beratung wird, im Falle dass die Proben von ausländischen Anbietern überhaupt angenommen werden, meist nicht im Untersuchungsangebot inkludiert. Bei allen Limitationen und Einschränkungen des NIPT wäre es dementsprechend kurzsichtig, sich vor der Weiterentwicklung als diagnostisches Tool zu verschließen. Vielmehr ist es besonders wichtig, eine gute allgemeine Aufklärungsarbeit, individuelle genetische Beratung im Rahmen der nationalen Gesetze sowie Empfehlungen einschlägiger Berufsgruppen zu gewährleisten und vor Ort anbieten zu können.

Die Anwendung von Hochdurchsatzanalysen wie zum Beispiel aCGH aber auch NGS hat die vorgeburtliche Diagnostik stark verändert. Bisher wurde die pränatale Diagnostik von hochspezialisierten humangenetischen Laboreinrichtungen mit dem entsprechenden medizinischen und wissenschaftlichen Personal angeboten. Auch wenn die Analysen relativ kostengünstig durchgeführt werden konnten, waren das Know-How sowie der apparative Aufwand bisher meist nur akademischen Institutionen vorbehalten. Bei NIPT wird die Analyse zunehmend von kommerziellen Anbietern durchgeführt, die ihre Ergebnisse gewissermaßen als Dienstleister, anbieten und entsprechend großes Interesse daran haben, den Test indikationsunabhängig als frühe Screeningmethode zu etablieren. Gerade für häufige Aberrationen wie die Trisomie 21 wird ein routinemäßiges Screening aller Schwangeren mittels NIPT bereits heiß diskutiert. Klinische Studien belegen, dass bei Hochrisikopatientinnen mit einem berechneten Risiko von über 1:10 nach ETS in fast der Hälfte der Fälle eine Trisomie 21 vorlag (Kagan et al. 2015, Kagan et al. 2008). Insbesondere in dieser Gruppe sollte aufgrund der zeitlichen Komponente genau überlegt werden, ob nicht von vorne herein eine invasive Untersuchungsmethode in Betracht gezogen werden sollte. Bei Patientinnen mit einem niedrigen Risiko zeigen NIPTs im Vergleich zum ETS hinsichtlich der Trisomie 21 nur einen marginal besseren PPV, sodass eine zusätzliche zweite Screeningmethode als sehr kostenintensives Modell hinterfragt werden muss. Lediglich für Patientinnen mit einem als intermediär eingestuften Risiko von 1:150 bis 1:500 kann ein NIPT als sinnvoll erachtet werden. In dieser Gruppe wird die hohe Risikoeinstufung oft aufgrund des mütterlichen Alters bei unauffälligen biochemischen und Ultraschall Markern erreicht. Damit könnte der NIPT bei Frauen über 35 Jahre einen wesentlichen Beitrag zur Reduktion invasiver Eingriffe liefern (Eiben et al. 2014).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass NIPT *de facto* als ergänzende Methode zum ETS und damit zur Reduktion eines invasiven Eingriffes beitragen kann. Eine Einführung der NIPT als allgemeines Screening, ist aufgrund der ohnehin sehr guten Detektionsraten beim ETS derzeit nicht zu erwarten, zumal das ETS viele wichtige zusätzliche Parameter wie Ultraschallmarker mit

einbezieht und damit ein breiteres Spektrum an Auffälligkeiten bedienen kann. Es bleibt offen in wie fern sich die Weiterentwicklung der NIPTs und damit die Diagnose weiterer genetischer Syndrome bzw. chromosomaler Imbalancen zukünftig positionieren wird. NIPTs sind in jedem Fall als eine sinnvolle Alternative und/oder Ergänzung etablierter pränataldiagnostischer Analysen zu sehen. Die NIPTs haben in den vergangenen fünf Jahren eine wesentliche Erweiterung der pränatalen Diagnosestellung gebracht. Die Entwicklung invasive Methoden zunehmend durch nicht invasive Tests und Analysen abzulösen, schreitet unaufhaltsam voran.

6 LITERATUR

ADINOLFI, M., SHERLOCK, J. and PERTL, B., 1995. Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **17**(7), pp. 661-664.

ARIOSIA DIAGNOSTICS, 11.1.2018, 2018-last update, Harmony Test [Homepage of F. Hoffmann-La Roche Ltd], [Online]. Available: www.ariosadx.com/healthcar-professionals/technology [28.8.2018, 2017].

BENNETT, P.R., LE VAN KIM, C., COLIN, Y., WARWICK, R.M., CHERIF-ZAHAR, B., FISK, N.M. and CARTRON, J.P., 1993. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *The New England journal of medicine*, **329**(9), pp. 607-610.

BERUFSVERBAND DER FRAUENÄRZTE, 09/2017, 2017-last update, Fruchtwasseruntersuchung [Homepage of Berufsverband der Frauenärzte; München], [Online]. Available: https://www.frauenaerzte-im-netz.de/de_praenatale-diagnostik-amniozentese-fruchtwasseruntersuchung_530.html [22.08.2017, 2017].

BIANCHI, D.W., CHUDOVA, D., SEHNERT, A.J., BHATT, S., MURRAY, K., PROSEN, T.L., GARBER, J.E., WILKINS-HAUG, L., VORA, N.L., WARSOFF, S., GOLDBERG, J., ZIAINIA, T. and HALKS-MILLER, M., 2015. Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies. *Jama*, **314**(2), pp. 162-169.

BIANCHI, D.W., SIMPSON, J.L., JACKSON, L.G., ELIAS, S., HOLZGREVE, W., EVANS, M.I., DUKES, K.A., SULLIVAN, L.M., KLINGER, K.W., BISCHOFF, F.Z., HAHN, S., JOHNSON, K.L., LEWIS, D., WAPNER, R.J. and DE LA CRUZ, F., 2002. 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. *Prenatal diagnosis*, **22**(7), pp. 609-615.

BREHM, M., 11.2017, 2017-last update, Chorionzottenbiopsie [Homepage of Vision Net AG], [Online]. Available: <http://www.familie.de/gesundheit/chorionzottenbiopsie-540529.html> [28.8.2017, 2017].

BREZINA, P.R., ANCHAN, R. and KEARNS, W.G., 2016. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *Journal of assisted reproduction and genetics*, **33**(7), pp. 823-832.

BUNDESKANZLERAMT ÖSTERREICH, 11.01.2018, 2018-last update, Fortpflanzungsmedizingesetz [Homepage of Bundeskanzleramt Österreich], [Online]. Available: <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10003046> [16.12.2017, 2017].

BUNDESKANZLERAMT ÖSTERREICH, , Gesamte Rechtsvorschrift für Erhaltung der Volksgesundheit, Fassung vom 16.12.2017 [Homepage of Bundeskanzleramt Österreich], [Online]. Available: <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10008492> [Dezember/2017, 2017].

CHIM, S.S., TONG, Y.K., CHIU, R.W., LAU, T.K., LEUNG, T.N., CHAN, L.Y., OUDEJANS, C.B., DING, C. and LO, Y.M., 2005. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in

maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(41), pp. 14753-14758.

CHIU, R.W. and LO, Y.M., 2011. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, **16**(2), pp. 88-93.

CUCKLE, H.S., WALD, N.J. and THOMPSON, S.G., 1987. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *British journal of obstetrics and gynaecology*, **94**(5), pp. 387-402.

DE VOS, A., STAESSEN, C., DE RYCKE, M., VERPOEST, W., HAENTJENS, P., DEVROEY, P., LIEBAERS, I. and VAN DE VELDE, H., 2009. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Human reproduction (Oxford, England)*, **24**(12), pp. 2988-2996.

DHALLAN, R., GUO, X., EMCHE, S., DAMEWOOD, M., BAYLISS, P., CRONIN, M., BARRY, J., BETZ, J., FRANZ, K., GOLD, K., VALLECILLO, B. and VARNEY, J., 2007. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet (London, England)*, **369**(9560), pp. 474-481.

DOHR, A. and BRAMKAMP, V., 2014. Nicht invasive Pränataltests. *Familienplanungsrundbrief*, (2), pp. 1-8.

EFFE, F., 6.3.2017, 2017-last update, Nabelschnurpunktion [Homepage of Prezi Inc], [Online]. Available: <https://prezi.com/70pvdku8qhqg/pranataldiagnostik> [28.8.2017, 2017].

EIBEN, B., GLAUBITZ, R. and KAGAN, K.O., 2014. Nichtinvasive Pränataldiagnostik. ETS und NGS-basierte Tests. *Medizinische Genetik*, **26**(4), pp. 382-390.

EIBEN, B., THODE, C. and MERZ, E., 2011. Das Ersttrimesterscreening und die neue Risikoberechnung-software der Fetal Medicine Foundation Deutschland. *Medizinische Genetik*, **23**(4), pp. 453-456.

EKELUND, C.K., JORGENSEN, F.S., PETERSEN, O.B., SUNDBERG, K., TABOR, A. and DANISH FETAL MEDICINE RESEARCH GROUP, 2008. Impact of a new national screening policy for Down's syndrome in Denmark: population based cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, **337**, pp. a2547.

FAN, H.C., GU, W., WANG, J., BLUMENFELD, Y.J., EL-SAYED, Y.Y. and QUAKE, S.R., 2012. Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature*, **487**(7407), pp. 320-324.

FERSTL, N., 2017, 2017-last update, Polkörper, Blastomere und Trophektodermzellen [Homepage of dasauge], [Online]. Available: <https://dasauge.de/-nina-ferstl/gassi-1> [28.8.2017, 2017].

FUCHS, F., FREIESLEBEN, E., KNUDSEN, E.E. and RIIS, P., 1956. Antenatal detection of hereditary diseases. *Acta Genetica et Statistica Medica*, **6**(2), pp. 261-263.

FUCHS, F. and RIIS, P., 1956. Antenatal sex determination. *Nature*, **177**(4503), pp. 330.

GEIGL, J.B. and SPEICHER, M.R., 2011. Nichtinvasive molekulargenetische Methoden in der pränatalen Diagnostik. *Medizinische Genetik*, **23**(4), pp. 485-490.

- GEMBRUCH, U., HECHER, K. and STEINER, H., 2013. *Ultraschalldiagnostik in Geburtshilfe und Gynäkologie*. 2. Auflage edn. Berlin: Springer.
- HEHR, A., FRISTER, H., FONDEL, S., KRAUSS, S., ZUEHLKE, C., HELLENBROICH, Y., HEHR, U. and GILLESSEN-KAESBACH, G., 2014. Präimplantationsdiagnostik. *Medizinische Genetik*, **26**(4), pp. 417-426.
- HEHR, A., PAULMAN, B., SEIFERT, B. and HEHR, U., 2011. Präimplantationsdiagnostik für monoogen vererbte Erkrankungen. *Medizinische Genetik*, **23**(4), pp. 469-478.
- HELD, K. and ZAHN, S., 2014. Pränataler Array. Indikation, Bewertung. *Medizinische Genetik*, **26**(4), pp. 398-404.
- HELGESON, J., WARDROP, J., BOOMER, T., ALMASRI, E., PAXTON, W.B., SALDIVAR, J.S., DHARAJIYA, N., MONROE, T.J., FARKAS, D.H., GROSU, D.S. and MCCULLOUGH, R.M., 2015. Clinical outcome of subchromosomal events detected by whole-genome noninvasive prenatal testing. *Prenatal diagnosis*, **35**(10), pp. 999-1004.
- HOLZGREVE, W., GANSHIRT-AHLERT, D., BURSCHYK, M., HORST, J., MINY, P., GAL, A. and POHLSCHMIDT, M., 1990. Detection of fetal DNA in maternal blood by PCR. *Lancet (London, England)*, **335**(8699), pp. 1220-1221.
- JIANG, P., CHAN, K.C., LIAO, G.J., ZHENG, Y.W., LEUNG, T.Y., CHIU, R.W., LO, Y.M. and SUN, H., 2012. FetalQuant: deducing fractional fetal DNA concentration from massively parallel sequencing of DNA in maternal plasma. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **28**(22), pp. 2883-2890.
- KAGAN, K.O., HOOPMANN, M., HAMMER, R., STRESSIG, R. and KOZLOWSKI, P., 2015. Screening for chromosomal abnormalities by first trimester combined screening and noninvasive prenatal testing. *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)*, **36**(1), pp. 40-46.
- KAGAN, K.O., WRIGHT, D., MAIZ, N., PANDEVA, I. and NICOLAIDES, K.H., 2008. Screening for trisomy 18 by maternal age, fetal nuchal translucency, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, **32**(4), pp. 488-492.
- KAGAN, K.O., WRIGHT, D., VALENCIA, C., MAIZ, N. and NICOLAIDES, K.H., 2008. Screening for trisomies 21, 18 and 13 by maternal age, fetal nuchal translucency, fetal heart rate, free beta-hCG and pregnancy-associated plasma protein-A. *Human reproduction (Oxford, England)*, **23**(9), pp. 1968-1975.
- KALLIONIEMI, A., KALLIONIEMI, O.P., SUDAR, D., RUTOVITZ, D., GRAY, J.W., WALDMAN, F. and PINKEL, D., 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, **258**(5083), pp. 818-821.
- KITZMAN, J.O., SNYDER, M.W., VENTURA, M., LEWIS, A.P., QIU, R., SIMMONS, L.E., GAMMILL, H.S., RUBENS, C.E., SANTILLAN, D.A., MURRAY, J.C., TABOR, H.K., BAMSHAD, M.J., EICHLER, E.E. and SHENDURE, J., 2012. Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus. *Science translational medicine*, **4**(137), pp. 137ra76.
- KLINK, R., HANSMANN, M. and HUNERMANN, B., 1971. Localization of the placenta. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, **96**(37), pp. 1473-1475.

- KRATOCHWIL, A., 1970. Ultrasound diagnostics in obstetrics and gynaecology. *Duodecim*, **86**(18), pp. 1040-1049.
- KUO, W.L., TENJIN, H., SEGRAVES, R., PINKEL, D., GOLBUS, M.S. and GRAY, J., 1991. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *American Journal of Human Genetics*, **49**(1), pp. 112-119.
- LIAO, G.J., CHAN, K.C., JIANG, P., SUN, H., LEUNG, T.Y., CHIU, R.W. and LO, Y.M., 2012. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *PloS one*, **7**(5), pp. e38154.
- LIFECODEXX, 2017, 2017-last update, Praenatest [Homepage of LifeCodexx], [Online]. Available: <https://lifecodexx.com/> [29. Jan 2018, 2018].
- LO, Y.M., CHAN, K.C., SUN, H., CHEN, E.Z., JIANG, P., LUN, F.M., ZHENG, Y.W., LEUNG, T.Y., LAU, T.K., CANTOR, C.R. and CHIU, R.W., 2010. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Science translational medicine*, **2**(61), pp. 61ra91.
- LO, Y.M., CORBETTA, N., CHAMBERLAIN, P.F., RAI, V., SARGENT, I.L., REDMAN, C.W. and WAINSCOAT, J.S., 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet (London, England)*, **350**(9076), pp. 485-487.
- LO, Y.M., HJELM, N.M., FIDLER, C., SARGENT, I.L., MURPHY, M.F., CHAMBERLAIN, P.F., POON, P.M., REDMAN, C.W. and WAINSCOAT, J.S., 1998. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *The New England journal of medicine*, **339**(24), pp. 1734-1738.
- LO, Y.M., PATEL, P., WAINSCOAT, J.S., SAMPIETRO, M., GILLMER, M.D. and FLEMING, K.A., 1989. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet (London, England)*, **2**(8676), pp. 1363-1365.
- LO, Y.M., TSUI, N.B., CHIU, R.W., LAU, T.K., LEUNG, T.N., HEUNG, M.M., GEROVASSILI, A., JIN, Y., NICOLAIDES, K.H., CANTOR, C.R. and DING, C., 2007. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nature medicine*, **13**(2), pp. 218-223.
- MALONE, F.D., 2005. Nuchal translucency-based Down syndrome screening: barriers to implementation. *Seminars in perinatology*, **29**(4), pp. 272-276.
- METZKER, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews.Genetics*, **11**(1), pp. 31-46.
- MONTAG, M., KOSTER, M., STROWITZKI, T. and TOTH, B., 2013. Polar body biopsy. *Fertility and sterility*, **100**(3), pp. 603-607.
- MURKEN, J., ed, 1975. *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 7 edn. Stuttgart: Thieme.
- NADLER, H.L., 1968. Antenatal detection of hereditary disorders. *Pediatrics*, **42**(6), pp. 912-918.
- NATERA, 2018, 2018-last update, Panoramatest [Homepage of Natera], [Online]. Available: <https://www.natera.com/panorama-test> [29.Jan 2018, 2018].
- NICOLAIDES, K.H., SPENCER, K., AVGIDOU, K., FAIOLA, S. and FALCON, O., 2005. 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 in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, **25**(3), pp. 221-226.

ÖSTERREICHISCHE GESELLSCHAFT FÜR HUMANGENETIK, 30.11.2014, 2014-last update, Stellungnahme zum Fortpflanzungsmedizingesetz [Homepage of ÖGH], [Online]. Available: http://www.oegh.at/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=9&Itemid=16 [7.9.2017, 2017].

PAPAGEORGIU, E.A., KARAGRIGORIOU, A., TSALIKI, E., VELISSARIOU, V., CARTER, N.P. and PATSALIS, P.C., 2011. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nature medicine*, **17**(4), pp. 510-513.

PATEL, A. and CHEUNG, S.W., 2016. Application of DNA Microarray to Clinical Diagnostics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **1368**, pp. 111-132.

PERSSON, P.H., GRENNERT, L., GENNSER, G. and GULLBERG, B., 1978. Normal range curves for the intrauterine growth of the biparietal diameter. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica. Supplement*, **78**, pp. 15-20.

PERTL, B., WEITGASSER, U., KOPP, S., KROISEL, P.M., SHERLOCK, J. and ADINOLFI, M., 1996. Rapid detection of trisomies 21 and 18 and sexing by quantitative fluorescent multiplex PCR. *Human genetics*, **98**(1), pp. 55-59.

PINKEL, D., LANDEGENT, J., COLLINS, C., FUSCOE, J., SEGRAVES, R., LUCAS, J. and GRAY, J., 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(23), pp. 9138-9142.

POON, L.L., LEUNG, T.N., LAU, T.K., CHOW, K.C. and LO, Y.M., 2002. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clinical chemistry*, **48**(1), pp. 35-41.

ROSENBUSCH, B., 2006. The contradictory information on the distribution of non-disjunction and pre-division in female gametes. *Human reproduction (Oxford, England)*, **21**(11), pp. 2739-2742.

SACHS, A., BLANCHARD, L., BUCHANAN, A., NORWITZ, E. and BIANCHI, D.W., 2015. Recommended pre-test counseling points for noninvasive prenatal testing using cell-free DNA: a 2015 perspective. *Prenatal diagnosis*, **35**(10), pp. 968-971.

SADLER, T., ed, 1970. *Taschenlehrbuch Embryologie*. 12 edn. Stuttgart: Thieme.

SCHMID, M., KLARITSCH, P., ARZT, W., BURKHARDT, T., DUBA, H.C., HAUSLER, M., HAFNER, E., LANG, U., PERTL, B., SPEICHER, M., STEINER, H., TERCANLI, S., MERZ, E., HELING, K.S. and EIBEN, B., 2015. Cell-Free DNA Testing for Fetal Chromosomal Anomalies in clinical practice: Austrian-German-Swiss Recommendations for non-invasive prenatal tests (NIPT). *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)*, **36**(5), pp. 507-510.

SERMON, K., CAPALBO, A., COHEN, J., COONEN, E., DE RYCKE, M., DE VOS, A., DELHANTY, J., FIORENTINO, F., GLEICHER, N., GRIESINGER, G., GRIFO, J., HANDYSIDE, A., HARPER, J., KOKKALI, G., MASTENBROEK, S., MELDRUM, D., MESEGUER, M., MONTAG, M., MUNNE, S., RIENZI, L., RUBIO, C., SCOTT, K., SCOTT, R., SIMON, C., SWAIN, J., TREFF, N., UBALDI, F., VASSENA, R.,

VERMEESCH, J.R., VERPOEST, W., WELLS, D. and GERAEDTS, J., 2016. The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists. *Molecular human reproduction*, **22**(8), pp. 845-857.

SIMONI, G., BRAMBATI, B., DANESINO, C., ROSSELLA, F., TERZOLI, G.L., FERRARI, M. and FRACCARO, M., 1983. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Human genetics*, **63**(4), pp. 349-357.

SNIJEDERS, A.M., NOWAK, N., SEGRAVES, R., BLACKWOOD, S., BROWN, N., CONROY, J., HAMILTON, G., HINDLE, A.K., HUEY, B., KIMURA, K., LAW, S., MYAMBO, K., PALMER, J., YLSTRA, B., YUE, J.P., GRAY, J.W., JAIN, A.N., PINKEL, D. and ALBERTSON, D.G., 2001. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet*, **29**(3), pp. 263-264.

SPARKS, A.B., WANG, E.T., STRUBLE, C.A., BARRETT, W., STOKOWSKI, R., MCBRIDE, C., ZAHN, J., LEE, K., SHEN, N., DOSHI, J., SUN, M., GARRISON, J., SANDLER, J., HOLLEMON, D., PATTEE, P., TOMITA-MITCHELL, A., MITCHELL, M., STUELPNAGEL, J., SONG, K. and OLIPHANT, A., 2012. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenatal diagnosis*, **32**(1), pp. 3-9.

SPEICHER, M.R. and CARTER, N.P., 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*, **6**(10), pp. 782-792.

STEELE, M. and BREG, W.R., Jr, 1966. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet (London, England)*, **1**(7434), pp. 383-385.

STUMM, M., ENTEZAMI, M., TRUNK, N., BECK, M., LOCHERBACH, J., WEGNER, R.D., HAGEN, A., BECKER, R. and HOFMANN, W., 2012. Noninvasive prenatal detection of chromosomal aneuploidies using different next generation sequencing strategies and algorithms. *Prenatal diagnosis*, **32**(6), pp. 569-577.

TIMOR-TRITSCH, I.E., FARINE, D. and ROSEN, M.G., 1988. A close look at early embryonic development with the high-frequency transvaginal transducer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **159**(3), pp. 676-681.

TONGSONG, T., WANAPIRAK, C., KUNAVIKATIKUL, C., SIRIRCHOTIYAKUL, S., PIYAMONGKOL, W. and CHANPRAPAPH, P., 2000. Cordocentesis at 16-24 weeks of gestation: experience of 1,320 cases. *Prenatal diagnosis*, **20**(3), pp. 224-228.

UNIVERSITÄTEN FRIBOURG, LAUSANNE UND BERN, 2017, 2017-last update, Prinzip der Fluoreszenz in situ Hybridisierung [Homepage of Schweizerischen Virtuellen Campus], [Online]. Available:
<http://www.embryology.ch/allemand/kchromaber/popupchromaber/02abweichende/mffish/01.html> [28.08.2017, 2017].

VALENTI, C., SCHUTTA, E.J. and KEHATY, T., 1968. Prenatal diagnosis of Down's syndrome. *Lancet (London, England)*, **2**(7561), pp. 220.

VORA, N.L. and O'BRIEN, B.M., 2014. Noninvasive prenatal testing for microdeletion syndromes and expanded trisomies: proceed with caution. *Obstetrics and gynecology*, **123**(5), pp. 1097-1099.

WANG, Y., CHEN, Y., TIAN, F., ZHANG, J., SONG, Z., WU, Y., HAN, X., HU, W., MA, D., CRAM, D. and CHENG, W., 2014. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex

chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clinical chemistry*, **60**(1), pp. 251-259.

WARD, R.H., MODELL, B., PETROU, M., KARAGOZLU, F. and DOURATSOS, E., 1983. Method of sampling chorionic villi in first trimester of pregnancy under guidance of real time ultrasound. *British medical journal (Clinical research ed.)*, **286**(6377), pp. 1542-1544.

WARSOFF, S.L., LARION, S. and ABUHAMAD, A.Z., 2015. Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. *Prenatal diagnosis*, **35**(10), pp. 972-979.

WEINER, W., CHILD, R.M., GARVIE, J.M. and PEEK, W.H., 1958. Foetal cells in the maternal circulation during pregnancy. *British medical journal*, **2**(5099), pp. 770-771.