

## Der smarte qNIPT Ansatz:

### Bestimmung einer fetalen Trisomie 21 basierend auf einer quantitativen real-time PCR

#### Zielsetzung

Heutige nicht-invasive pränatale Tests (NIPT) zum Nachweis bzw. Ausschluß einer fetalen Trisomie 21 (T21) basieren hauptsächlich auf der Methode des *next generation sequencing (NGS)*. Diese ist in der klinischen Anwendung jedoch teuer und damit derzeit auf Patienten beschränkt, die sich die Analyse leisten können. Wir beschreiben hier die Ergebnisse einer verblindeten Studie hinsichtlich der Testgenauigkeit eines neu entwickelten NIPT-Assays auf der Basis einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR). Er wird zur pränatalen Untersuchung mütterlichen Plasmas zur Bestimmung einer fetalen Trisomie 2 eingesetzt.

#### Methode

Der neue qNIPT nutzt bekannte Unterschiede in den Methylierungsmustern spezifischer Genregionen in mütterlicher und fetaler DNA. Bestimmte Genregionen in der mütterlichen DNA sind hypomethyliert (d.h. nicht methyliert), während die gleichen Genregionen in der fetalen DNA hypermethyliert sind. Diese methylierungsspezifischen Genregionen werden als DNA-Biomarker zur Bestimmung der fetalen Trisomie 21 herangezogen (Abb. 1 und 2). Auf Basis mehrerer Pilot- und Machbarkeitsstudien mit insgesamt zirka 1.500 Proben wurde nun in einer verblindeten Validierungsstudie die klinische Leistungsfähigkeit des qNIPT-Assays an Blutproben von Patientinnen mit Einlingsschwangerschaft beurteilt. Alle Proben wurden zuvor von einem unabhängigen Auftragsforschungsinstitut verblindet. Nach der Extraktion zellfreier DNA mit einem QIASymphony-System sowie nach methylierungsspezifischem Verdau der DNA-Proben wurde eine Multiplex-qPCR durchgeführt. Anschließend wurden die so erhaltenen primären qPCR-Daten mit der CE-markierten PraenaTest® Analysesoftware ausgewertet. Zusammen mit Ergebnissen aus bestätigenden NGS-Analysen wurden dann die qNIPT-Ergebnisse mit Ergebnissen aus der klinischen PraenaTest®-Routine verglichen und bewertet.

#### Studienergebnisse

Die Studienergebnisse der Leistungsbewertung (n= 966) zeigen eine positive prozentuale Übereinstimmung (*PPA, positive percentage agreement*, entspricht der Sensitivität) von 100% (niedrigeres 1-seitiges 95% -Konfidenzintervall von 91,8%; n=35/35) sowie eine negative prozentuale Übereinstimmung (*NPA, negative percentage agreement*, entspricht der Spezifität; n=931/931) von 100% im Vergleich zum NGS-basierten PraenaTest®. Der negative prädiktive Wert (*NPV, negative predictive value*) für qNIPT sowie für die bestätigenden NGS-Analysen war 100% (niedrigeres 1-seitiges 95% Konfidenzintervall von

99,68%). Der durchschnittliche Anteil zellfreier fetaler DNA aller untersuchten Blutproben betrug 8,1%. Der qNIPT-Assay lieferte auch zuverlässige Testergebnisse bei 54 Blutproben mit einem Anteil fetaler DNA von unter 4% bzw. sogar bis zu 2,4%.

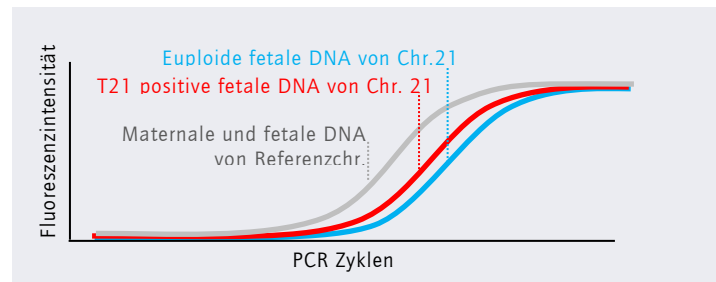


Abb. 1: Methylierungsspezifische qPCR an Referenz und Zielchromosom

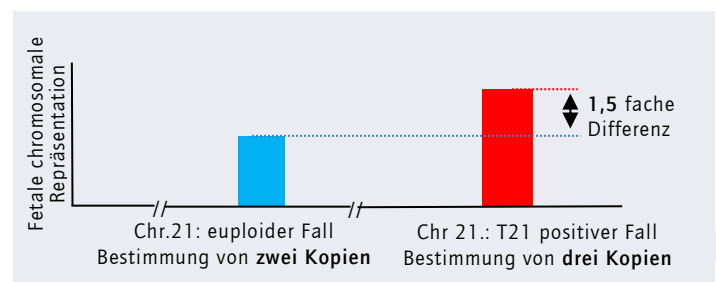


Abb. 2: Relative Quantifizierung

#### Fazit

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der neue qNIPT-Assay eine äußerst zuverlässige Untersuchungsmethode ist, welche in der klinischen NIPT-Routine gemäß den Empfehlungen der internationalen Fachgesellschaften<sup>2</sup> eingesetzt werden kann. Während andere NIPT-Methoden einen fetalen DNA-Gehalt von mindestens 4% in Blutproben von Patientinnen mit Einlingsschwangerschaft voraussetzen, konnten wir in unserer Studie zeigen, dass der qNIPT auch bei Blutproben mit einem fetalen DNA-Gehalt von 2,4% erfolgreich angewendet werden kann.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass der innovative qNIPT-Ansatz das Potenzial hat, als globale NIPT-Lösung bei Schwangeren aller Alters- und Risikogruppen eingesetzt zu werden. Derzeit wird er zur nicht-invasiven Bestimmung der fetalen Trisomien 13 und 18 weiterentwickelt.