

# PraenaTest® | Erläuterungen zu den Ergebnismitteilungen

## Untersuchungsmethode und Analyseergebnis

Der PraenaTest® für die Bestimmung der untersuchten Chromosomenstörungen basiert auf molekulargenetischen Methoden wie qPCR und Next Generation Sequencing (NGS) unter Verwendung der CE-gekennzeichneten Software PraenaTest® DAP.plus.<sup>1-4</sup> Die Grenzwerte der Analysewerte, anhand derer ein positives von einem negativen Testergebnis unterschieden wird, sind für die Chromosomenstörungen aufgrund biologischer und analytischer Faktoren unterschiedlich. Für die Bestimmung gonosomaler Aneuploidien werden weitere Bewertungskriterien herangezogen, so dass die genannten Analysewerte allein nicht aussagekräftig sind. Derzeit wird die qPCR-Methode nur für die PraenaTest® Option 1 zur Bestimmung der Trisomie 21 angewendet.

## Aussagekraft

Das PraenaTest®-Ergebnis sollte im Kontext aller anderen relevanten klinischen Befunde betrachtet werden. Auffällige Testergebnisse haben eine hohe Signifikanz. Der PraenaTest® ist ein fortgeschrittenes nicht-invasives Testverfahren mit hoher Aussagekraft, welches derzeit als „nicht vollständig diagnostisch“ bezeichnet wird.<sup>5</sup> Es sind internationale und nationale Empfehlungen bzw. Stellungnahmen zu berücksichtigen.<sup>5,6</sup>

## Aussagekraft bei Einlingsschwangerschaften

### Daten zur Leistungsbewertung des NGS-basierten PraenaTest® aus Studien in 2012/2013

Die Aussagekraft des PraenaTest® wurde mittels Studien, an denen die LifeCodexx AG maßgeblich beteiligt war, validiert. Im Rahmen einer europäischen Validierungsstudie (EVS) wurden insgesamt 468 Blutproben analysiert und ausgewertet. Im Rahmen einer weiteren Studie mit Proben der Partner-Firma Sequenom Inc., USA, (Sequenom Collective Study, SCS) wurden 340 Proben analysiert und ausgewertet. Die zusammenfassende Leistungsbewertung umfasste somit die Analyse von insgesamt 808 Blutproben mit 75 Trisomie-21-Fällen (EVS 41, SCS 34), 14 Trisomie-18-Fällen (EVS 8, SCS 6), und 8 Trisomie-13-Fällen (EVS 5, SCS 3). Es wurden 806 der 808 Blutproben korrekt klassifiziert (99,8%) (Tabelle 1). Im Rahmen der EVS war ein Ergebnis falsch-negativ für Trisomie 21 und ein Ergebnis falsch-positiv für Trisomie 18 (mit auffälligem Karyotyp für Chromosom 10). Das ergibt eine Gesamt-Sensitivität bezüglich der Trisomie 21 von 98,7% bei einer Falsch-Positiv-Rate von 0% (Tabelle 2). Die Fallzahlen zur Bestimmung der Trisomien 13 und 18 reichen für die Angabe gesonderter Sensitivitäten und Spezifitäten nicht aus.

Tabelle 1: Fallzahlen und Gesamtdetektionsraten der fetalen Trisomien 21, 18 und 13 innerhalb der Studienkollektive

	EVS 2012	SCS 2013	Gesamt
Korrekt klassifizierte Proben	466/468 (99,6%)	340/340 (100%)	806/808 (99,8%)
Trisomie 13	5/5 (100%)	3/3 (100%)	8/8 (100%)
Trisomie 18	8/8 (100%)	6/6 (100%)	14/14 (100%)
Trisomie 21	40/41 (97,6%)	34/34 (100%)	74/75 (98,7%)
<b>Gesamtdetektionsrate</b>	<b>53/54 (98,1%)</b>	<b>43/43 (100%)</b>	<b>96/97 (99,0%)</b>
<b>Falsch-positiv-Rate</b>	<b>1/414 (0,2%)</b>	<b>0/297 (0%)</b>	<b>1/711 (0,1%)</b>

Tabelle 2: PraenaTest® Sensitivität & Spezifität für die Detektion der fetalen Trisomie 21 bei Einlingsschwangerschaften (Mosaik sowie strukturelle Aberrationen finden keine Berücksichtigung).

	EVS 2012	SCS 2013	Gesamt
Sensitivität (unteres einseitiges 95% KI)	97,6% (88,9%)	100% (91,6%)	<b>98,7%</b> <b>(93,8%)</b>
Spezifität (unteres einseitiges 95% KI)	100% (99,3%)	100% (99,0%)	<b>100%</b> <b>(99,6%)</b>

### Daten zur Leistungsbewertung des qPCR-basierten PraenaTest® Option1 zur Bestimmung der fetalen Trisomie 21 (Studie Dezember 2016)

Die Aussagekraft der neuen PraenaTest® Option 1 wurde im Rahmen einer Leistungsbewertung validiert. Die Studien-ergebnisse der maternalen Plasmaproben (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 war 100% (niedrigeres 1-seitiges 95% Konfidenzintervall von 99,68%). Der durchschnittliche Anteil fetaler DNA aller untersuchten Blutproben betrug 8,1%. Bei 54 Blutproben mit einem Anteil fetaler DNA von unter 4% bzw. bis zu 2,4% wurde ein korrektes Testergebnis erzielt.

Aufgrund einer 100%-igen positiven sowie negativen Übereinstimmung der Ergebnisse des validierten qNIPT Konzepts (neue PraenaTest® Option 1) mit dem PraenaTest® basierend auf Next Generation Sequencing (NGS), bleibt die finale Testgüte für den PraenaTest® unverändert.

**Bitte beachten Sie, dass die neue PraenaTest® Option 1 derzeit noch nicht bei Zwillingsschwangerschaften angewendet werden kann.**

**Tabelle 3: Testgüte des PraenaTest® Option 1 für die Untersuchung des Chromosoms 21 bei Einlingsschwangerschaften**

	qNIPT 2016
Korrekt klassifizierte Proben	966/966 (100%)
Trisomie 21 positiv	35/35 (100%)
Trisomie 21 negativ	931/931 (100%)
Sensitivität (unteres einseitiges 95% KI)	100% (91,8%)
Spezifität (unteres einseitiges 95% KI)	100% (-)
NPV (unteres einseitiges 95% KI)	100% (99,68%)

### Aussagekraft bei Zwillingsschwangerschaften

Im Rahmen einer Leistungsbewertung des NGS-basierten PraenaTest® für Mehrlingsschwangerschaften wurden 60 Zwillingss- sowie 2 Drillingsschwangerschaften untersucht (darunter 16 Proben unserer Partner-Firma Sequenom Inc., USA) (Tabelle 3). Die 6 in den Zwillingsschwangerschaften enthaltenen und durch Karyotypisierung bestätigten Trisomie-21-Fälle (1 x monochorial, konkordant; 5 x dichorial, diskordant) wurden mit dem PraenaTest® korrekt klassifiziert. Alle anderen untersuchten Mehrlingsproben wiesen unauffällige PraenaTest®-Ergebnisse auf. Eine fetale Trisomie 13 oder 18 trat in keiner der untersuchten Mehrlingsschwangerschaften auf, so dass keine Rückschlüsse auf eine PraenaTest®-Genauigkeit hinsichtlich dieser Trisomien bei Mehrlingsschwangerschaften gezogen werden können. Es wurden zu wenige Drillingsschwangerschaften untersucht, um eine Leistungsbewertung und Angaben zur Testgenauigkeit für Drillingsschwangerschaften zu treffen.

**Tabelle 4: Ergebnisse der Leistungsbewertung des PraenaTest® zur Bestimmung der fetalen Trisomien 21, 18 und 13 bei Mehrlingsschwangerschaften (alle positiven und ein Teil der negativen Ergebnisse (SQNM Studie 2013) wurde mittels Karyotypisierung überprüft)**

	EVS 2012	SQNM Studie 2013	Gesamt
Korrekt klassifizierte Proben	46/46*	16/16	62/62*
Trisomie 21	2/2	4/4	6/6
Trisomie 13/18	0	0	0
<b>Detektionsrate</b>	<b>2/2</b>	<b>4/4</b>	<b>6/6</b>

\* inklusive 2 Drillingsschwangerschaften

### Aussagekraft bei Gonosomalen Aneuploidien

Der NGS-basierte PraenaTest® für die Bestimmung fetaler gonosomale Aneuploidien (Turner-, Triple X-, Klinefelter- und XYY-Syndrom) wurde an insgesamt 434 Proben von Einlingsschwangerschaften untersucht. Dabei wurden 11 von der 12 betroffenen Proben korrekt bestimmt. Darüber hinaus wurden fünf diskordante, „falsch-positive“ Ergebnisse erzielt. Aufgrund der geringen

untersuchten Fallzahlen wird die LifeCodexx AG im Moment keine gesonderten Sensitivitäten und Spezifitäten für gonosmale Aneuploidien ausweisen.

**Tabelle 5: Ergebnisse der Leistungsbewertung des PraenaTest® zur Bestimmung gonosomaler Aneuploidien bei Einlingschwangerschaften**

	<b>EVS 2012</b>	<b>SQNM Studie 2013</b>	<b>Gesamt</b>
Korrekt klassifizierte Proben	377/383* (98,4%)	51/51 (100%)	428/434* (98,6%)
Turner-Syndrom	7/8 (87,5%)	3/3 (100%)	10/11 (90,9%)
Triple-X-Syndrom**	0	0	0
Klinefelter-Syndrom**	0	0	0
YYY-Syndrom	1/1 (100%)	0	1/1 (100%)
<b>Gesamtdetektionsrate</b>	<b>8/9 (88,9%)</b>	<b>3/3 (100%)</b>	<b>11/12 (91,7%)</b>
<b>Falsch-Positiv-Rate</b>	<b>5/374 (1,3%)</b>	<b>0/48 (0%)</b>	<b>5/422 (1,2%)</b>

\* Drei Proben mit unauffälligem männlichen Karyotyp wurden als falsch-positiv für das Klinefelter-Syndrom klassifiziert. Bei zwei dieser Proben lag der cffDNA-Gehalt unter 5%. Die dritte Probe zeigte einen auffälligen Chromosom-X-Wert, so dass hier von einem maternalen Triple-X ausgegangen werden kann, welches mittel konventioneller Karyotypisierung im Rahmen der Studie nicht bestimmt wurde. Bei zwei weiteren falsch-positiv klassifizierten Proben für das Turner-Syndrom könnte die Ursache neben eines niedrigen cffDNA-Gehalts auch ein maternales Mosaik sein.

\*\* Das Triple-X- und das Klinefelter-Syndrom wurden unabhängig von dieser Leistungsbewertung im Rahmen von Forschungsprojekten untersucht und erfolgreich bestimmt.

## Aussagekraft bei der 22q11.2 Mikrodeletion, assoziiert mit dem DiGeorge-Syndrom und dem Velo-Cardio-Fazialen Syndrom (VCFS oder Shprintzen-Syndrom)

### Validierung der Untersuchungsmethode

Es wurden sowohl Daten von künstlich hergestellten DNA-Mischproben sowie mehreren Proben von schwangeren Frauen, deren ungeborenes Kind eine 22q11.2 Mikrodeletion aufwies, mittels Next Generation Sequencing untersucht. In allen Fällen wurde eine 22q11.2 Mikrodeletion korrekt nachgewiesen. Dabei verlief der Validierungsprozess in drei Phasen:

#### Phase 1

Es wurden vier künstlich hergestellte Proben mit jeweils unterschiedlichem cffDNA-Gehalt (16%, 8%, 4% sowie 2%), die eine 22q11.2 Mikrodeletion aufwiesen, mehrfach analysiert. Die 22q11.2 Mikrodeletion der beiden Proben mit einem cffDNA-Gehalt von 8% und 16% wurde korrekt bestimmt, während die Ergebnisse der Proben mit geringerem cffDNA-Gehalt nicht aussagekräftig waren.

#### Phase 2

Es wurden vier Proben von schwangeren Frauen, deren ungeborene Kinder eine 22q11.2 Mikrodeletion aufwiesen, retrospektiv untersucht und die 22q11.2 Mikrodeletion jeweils korrekt nachgewiesen. Dabei wurde zuvor die 22q11.2 Mikrodeletion bei drei der Proben mittels invasiver Diagnostik bestätigt. Bei der vierten Probe wurde per Ultraschall ein Herzfehler (DORV; Double outlet right ventricle), der mit dem DiGeorge- bzw. Velo-Cardio-Fazialen-Syndrom assoziiert ist, bestätigt. Eine invasive Diagnostik erfolgte in diesem Fall nicht.

#### Phase 3

In einer abschließenden internen verblindeten Studie wurden Proben aus Phase 2 mit einer 22q11.2 Mikrodeletion sowie euploide Proben untersucht. Alle Proben wurden korrekt klassifiziert. Aufgrund der niedrigen Fallzahl kann eine konkrete Testsensitivität und -spezifität derzeit nicht abgeleitet werden.

Korrekt klassifizierte Proben 16/16

Gesamtdetektionsrate 2/2

Falsch-Positiv-Rate 0/14

### Grenzen der Untersuchungsmethode

1. Mit dem PraenaTest® können generell keine Aussagen zu strukturellen Chromosomenveränderungen, zu Mosaiken oder einer Polyploidie getroffen werden. Auch sind andere Chromosomenstörungen, bei denen nicht die Chromosomen 13, 18, 21, X und Y betroffen sind, sowie andere genetische Erkrankungen, nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

2. Die im PraenaTest® untersuchte fetale DNA stammt maßgeblich aus dem Zytotrophoblasten und wird durch Apoptose und Nekrose von Trophoblastzellen der Plazenta freigesetzt. Somit kann nur annähernd die diagnostische Sicherheit einer Direktpräparation bei einer Chorionzotten-Diagnostik erreicht werden. Fetale Mosaik oder fetoplazentare Diskrepanzen der Trisomien 21, 18, 13 bzw. gonosomaler Aneuploidien sind daher nicht zu erkennen. Im Falle einer fetoplazentaren Diskrepanz kann das bedeuten, dass das PraenaTest®-Ergebnis für das ungeborene Kind nicht repräsentativ ist.
3. Ein vorliegender oder nicht erkannter *vanishing twin* kann ausreichend cffDNA zum Gesamt-cffDNA-Anteil beitragen, um im Fall eines von einer Aneuploidie betroffenen *vanishing twins* zu einem auffälligen PraenaTest®-Ergebnis zu führen, welches für die intakte Schwangerschaftsanlage nicht repräsentativ ist.
4. Ein bestehendes maternales Mosaik kann zu einem auffälligen PraenaTest®-Ergebnis führen, so dass das Ergebnis für das ungeborene Kind nicht repräsentativ ist. Diese Mosaik betreffen vorrangig die gonosomalen Aneuploidien. So gehen beispielsweise Fälle von Schwangerschaften bei Frauen mit einem Turner-Syndrom auf einen Mosaikbefund (45,X/46,XX) zurück.
5. Eine bestehende maternale gonosomale Aneuploidie wie das Triple X-Syndrom kann zu einem auffälligen PraenaTest®-Ergebnis führen, ohne dass das Ergebnis für das ungeborene Kind repräsentativ ist. Das bedeutet beispielsweise, dass für ein auffälliges PraenaTest®-Ergebnis mit dem Hinweis auf eine Chromosomenstörung 47,XXY nicht zwingend eine fetale Chromosomenstörung vorliegt. Es sollte vielmehr geprüft werden inwiefern die schwangere Frau ein Triple X-Syndrom aufweist.
6. Maternale Tumorerkrankungen, Copy Number Variants (CNV, Kopienzahlvariation) sowie seltene Genveränderungen in untersuchten Genregionen können in sehr seltenen Fällen zu einem diskordanten PraenaTest®-Ergebnis führen, welches für das ungeborene Kind nicht repräsentativ ist.
7. Es ist möglich, dass die Mutter Trägerin der 22q11.2 Mikrodeletion (assoziiert mit dem DiGeorge-Syndrom) ist, nicht aber das ungeborene Kind<sup>7</sup>. Dies kann zu diskordanten (falsch-positiven) Testergebnissen führen.
8. Bei mehr als 85% der Betroffenen umfasst die 22q11.2 Mikrodeletion (assoziiert mit dem DiGeorge-Syndrom) eine Region in der Größe von zirka 2,5 Megabasen im Bereich 22q11.2 des Chromosoms 22. Diese Region wird mit dem PraenaTest® untersucht. Ein geringer Anteil der Betroffenen weist eine noch kleinere Deletion oder Punktmutation in der betroffenen Region auf, welche mit dem PraenaTest® nicht nachweisbar ist. Dies kann zu diskordanten (falsch-negativen) Testergebnissen führen.

## Bestimmung des fetalen Geschlechts

Die Bestimmung des fetalen Geschlechts basiert für alle PraenaTest® Optionen 1, 2 und 3 auf dem proprietären qPCR-Assay QuantYfeX<sup>®3</sup> sowie ergänzend für PraenaTest® Option 2 und 3 auf Next Generation Sequencing. Die Geschlechtsbestimmung mittels beider Methoden wurde nicht im Rahmen einer klinischen Studie validiert. Ein Ergebnis –männlich– wird berichtet, wenn mittels QuantYfeX<sup>®</sup> ein Y-chromosomaler Marker bzw. mittels Next Generation Sequencing eine ausreichende Anzahl von Y-chromosomalen Sequenzen detektiert werden. Im Fall einer Zwillingsschwangerschaft bedeutet das, dass mindestens einer der Feten männlich ist. Ein Ergebnis –weiblich– wird berichtet, wenn mittels QuantYfeX<sup>®</sup> kein Y-chromosomaler Marker bzw. mittels Next Generation Sequencing eine geringe Anzahl chromosomaler Sequenzen, die dem Y-Chromosom zugeordnet werden, detektiert werden. In sehr seltenen Fällen kann mittels des QuantYfeX<sup>®</sup>-Assays keine Aussage zum fetalen Geschlecht getroffen werden oder die Aussagen des QuantYfeX<sup>®</sup> und des Next Generation Sequencing weichen voneinander ab. Dann wird bei den PraenaTest® Optionen 2 und 3 als Basis für die Geschlechtsbestimmung auf den im Rahmen der Sequenzierung der Patientenprobe ermittelten Anteil Y-spezifischer Sequenzen zurückgegriffen. Bei der PraenaTest® Option 1 erfolgt in diesem Fall die Angabe –nicht eindeutig bestimmbar– und die Analyse wird nicht wiederholt.

## Bitte bedenken Sie

Die LifeCodexx AG arbeitet nach neuestem Stand der Technik und Wissenschaft. Dennoch ist bei Anwendung des PraenaTest® in der Praxis eine Aussagekraft von 100% nicht zu erwarten. Es verbleiben Risiken, die auch bei sorgfältigster Durchführung der genetischen Analyse nie völlig auszuschließen sind. Es werden jedoch alle Maßnahmen und Sicherheitsvorkehrungen getroffen, um diese Risiken und andere Fehler zu vermeiden.

## Literaturnachweise

- <sup>1</sup> Stumm M, Entezami M, Trunk N, Beck M, Löcherbach J, Wegner R-D, Hagen A, Becker R, Hofmann W. Noninvasive prenatal detection of chromosomal aneuploidies using different next generation sequencing strategies and algorithms. *Prenat Diagn.* 2012;32:569-577
- <sup>2</sup> Stumm M, Entezami M, Haug K, Blank C, Wüstemann M, Schulze B, Raabe-Meyer G, Hempel M, Schelling M, Ostermayer E, Langer-Freitag S, Burkhardt T, Zimmermann R, Schleicher T, Weil B, Schöck U, Smerdka P, Grömminger S, Kumar Y, Hofmann W. Diagnostic accuracy of random massively parallel sequencing for non-invasive prenatal detection of common autosomal aneuploidies: a collaborative study in Europe. *Prenat Diagn.* 2014 Feb;34(2):185-91.
- <sup>3</sup> Grömminger S, Yagmur E, Erkan S, Nagy S, Schöck U, Bonnet J, Smerdka P, Ehrich M, Wegner RD, Hofmann W, Stumm M. Fetal Aneuploidy Detection by Cell-Free DNA Sequencing for Multiple Pregnancies and Quality Issues with Vanishing Twins. *J. Clin. Med.* 2014, 3, 679-692.
- <sup>4</sup> EG-Zertifikat / Richtlinie 98/79/EG Anhang IV, unter [www.lifecodexx.com](http://www.lifecodexx.com)
- <sup>5</sup> ACOG 2012, Committee Opinion Number 545, [www.acog.org](http://www.acog.org)
- <sup>6</sup> Nationale und internationale Stellungnahmen und Richtlinien unter [www.lifecodexx.com](http://www.lifecodexx.com)
- <sup>7</sup> Goodship J, Cross I, LiLing J, Wren C. A population study of chromosome 22q11 deletions in infancy. *Arch Dis Child.* 1998;79(4):348-51. doi: 10.1136/adc.79.4.348