

Aus dem

Department für Frauengesundheit Tübingen  
Universitäts-Frauenklinik

**Prädiktion der Fetalen Fraktion im Rahmen eines  
cfDNA Tests**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Cornelius, Peter Jan**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. O. Kagan

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. F. Poets

Tag der Disputation: 23.06.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
1.1. ENTWICKLUNG DER PRÄNATALDIAGNOSTIK IM HINBLICK AUF CHROMOSOMENSTÖRUNGEN .....	8
1.2. WANDEL ZUR cfDNA-ANALYSE .....	10
1.3. METHODIK DER NIPT .....	12
1.4. TESTGÜTE DER cfDNA-ANALYSE IM SCREENING AUF T21, T18 UND T13 .....	14
1.5. SCREENING AUF ANDERE CHROMOSOMALE STÖRUNGEN UND VERÄNDERUNGEN .....	16
1.6. SCREENING AUF GONOSOMALE ABERRATIONEN UND FRÜHZEITIGE GESCHLECHTERERKENNUNG.....	17
1.7. SCREENING IN MEHRLINGSSCHWANGERSCHAFTEN.....	18
1.8. NIPT IM SCREENING AUF SELTENE CHROMOSOMENSTÖRUNGEN, MIKRODELETIONEN UND -DUPLIKATIONEN .....	19
1.9. NIPT IN DER KLINISCHEN ANWENDUNG .....	21
1.10. LIMITATION DER cfDNA-ANALYSE .....	23
1.11. ZIELSETZUNG .....	25
<b>2. MATERIAL &amp; METHODIK</b> .....	<b>27</b>
2.1. VOTUM DER ETHIKKOMMISSION.....	27
2.2. REKRUTIERUNG DES STUDIENKOLLEKTIVS.....	27
2.3. STUDIENABLAUF .....	27
2.4. ERFASSUNG UND DOKUMENTATION DER DATEN.....	30
2.5. DATENSCHUTZ UND DATENARCHIVIERUNG .....	31
2.6. STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	32
2.6.1. <i>Lineare Regression (metrische unabh. Variable):</i> .....	33
2.6.2. <i>Multiple of Median der Serummarker</i> .....	34
2.6.3. <i>Logistische Regression (nominale Variable)</i> .....	35
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>37</b>
3.1. DESKRIPTIVE STATISTIK .....	37
3.1.1. <i>Demographie</i> .....	37
3.1.2. <i>Fetal Fraction</i> .....	39
3.1.3. <i>Zeitpunkt der Untersuchung</i> .....	41
3.1.4. <i>Blutdruckanalyse - Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)</i> .....	41
3.1.5. <i>Sonographische Marker</i> .....	42
3.1.6. <i>Serummarker</i> .....	44
3.2. UNIVARIABLE LINEARE REGRESSION .....	54
3.2.1. <i>Serummarker</i> .....	55
3.2.2. <i>Patientenmerkmale und Blutdruck</i> .....	60
3.2.3. <i>Sonographische Marker</i> .....	62
3.3. MULTIVARIATE LINEARE REGRESSION .....	65
3.4. LOGISTISCHE REGRESSION .....	66
3.5. UNIVARIATE LOGISTISCHE REGRESSION .....	68
3.6. MULTIVARIATE LOGISTISCHE REGRESSION .....	69
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>73</b>
4.1. DISKUSSION DER SERUMMARKER .....	74
4.2. DISKUSSION DER PATIENTENMERKMALE UND BLUTDRUCK.....	79
4.3. SONOGRAPHISCHE MARKER.....	82
4.4. DEMOGRAPHISCHE MARKER .....	83
4.5. SCHLUSSFOLGERUNG .....	86
4.6. AUSBLICK .....	90
4.7. KRITISCHE BEURTEILUNG DIESER STUDIE.....	91
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>92</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb.1 - Streudiagramm: Fetal Fraction Abh. zum freien bhCG MoM	33
Abb. 2 - Streudiagramm: Konzentration des AFP in Abh. zur SSW	34
Abb. 3 - Streudiagramm: Konzentration des AFP in Abh. zum Gewicht	34
Abb. 4 - Streudiagramm: AFP MoM in Abh. zur SSW	35
Abb. 5 - Streudiagramm: AFP MoM in Abh. zum Gewicht	35
Abb. 6 - Streudiagramm: Prolaktin (und MoM) in Abh. zur SSW	36
Abb. 7 - Streudiagramm: Copeptin (und MoM) in Abh. zum Gewicht	37
Abb. 8 - Balkendiagramm: Verteilung Gestationsalter	40
Abb. 9 - Kreisdiagramm: Verteilung BMI	41
Abb. 10 - Kreisdiagramm: Verteilung Raucherstatus	41
Abb. 11 - Balkendiagramm: Verteilung Konzeptionsmodus	42
Abb. 12 - Balkendiagramm: Verteilung Fetale Fraktion	43
Abb. 13 - Balkendiagramm: Verteilung „Zeitpunkt der Untersuchung	44
Abb. 14 - Boxplot: Verteilung freies bhCG MoM	48
Abb. 15 - Boxplot: Verteilung PAPP-A MoM	49
Abb. 16 - Boxplot: Verteilung PCT MoM und Prolaktin MoM	51
Abb. 17 - Boxplot: Verteilung Copeptin MoM und PIGF-plus MoM	52
Abb. 18 - Streudiagramm: FF in Abh. zu bhCG MoM	54
Abb. 19 - Streudiagramm: FF in Abh. zu PAPP-A MoM	55
Abb. 20 - Streudiagramm: FF in Abh. zu AFP MoM	55
Abb. 21 - Streudiagramm: FF in Abh. zu MR-proANP MoM	56
Abb. 22 - Streudiagramm: FF in Abh. zu NSE MoM	56
Abb. 23 - Streudiagramm: FF in Abh. zu PCT MoM	56
Abb. 24 - Streudiagramm: FF in Abh. zu Prolaktin MoM	57
Abb. 25 - Streudiagramm: FF in Abh. zu Copeptin MoM	58
Abb. 26 - Streudiagramm: FF in Abh. zu PIGF-plus MoM	58
Abb. 27 - Streudiagramm: FF in Abh. zum Gewicht	60
Abb. 28 - Streudiagramm: FF in Abh. zum BMI	60
Abb. 29 - Streudiagramm: FF in Abh. zur Größe	60
Abb. 30 - Streudiagramm: FF in Abh. zum mütterlichen Alter	60
Abb. 31 - Streudiagramm: FF in Abh. zum Gestationsalter	60
Abb. 32 - Streudiagramm: FF in Abh. zu Mittleren art. Druck MoM	60
Abb. 33 - Streudiagramm: FF in Abh. zu Aa. Uterinae MoM	61
Abb. 34 - Streudiagramm: FF in Abh. zur SSL	62
Abb. 35 - Streudiagramm: FF in Abh. zum BPD	62
Abb. 36 - Streudiagramm: FF in Abh. zur NT	62
Abb. 37 - Streudiagramm: FF in Abh. zur delta-NT	62
Abb. 38 - Streudiagramm: FF in Abh. zur fetalen HF	62
Abb. 39 - Streudiagramm: FF in Abh. zu DV-PIV	62
Abb. 40 - Kreisdiagramm: Verteilung der fetal fraction <7 vs. >7	66

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 – Einschluss-, Ausschluss und Abbruchkriterien	29
Tab. 2 – Koeffiziententabelle lin. Reg. AFP und Gewicht/GA	35
Tab. 3 – Häufigkeiten AFP MoM	35
Tab. 4 – Koeffiziententabelle lin. Reg. Prolaktin und GA	36
Tab. 5 – Häufigkeiten Prolaktin MoM	36
Tab. 6 – Koeffiziententabelle lin. Reg. Copeptin und Gewicht/GA	36
Tab. 7 – Häufigkeiten Copeptin MoM	37
Tab. 8 – Übersicht aller unabhängiger Variablen	39
Tab. 9 – Ethnische Zugehörigkeit der Studienteilnehmerinnen	42
Tab. 10 – Häufigkeiten der Fetalen Fraktion	43
Tab. 11 – Häufigkeiten MAP MoM	45
Tab. 12 – Häufigkeiten Aa. Uterinae MoM	45
Tab. 13 – Übersicht: Häufigkeiten – Sonographische Marker	46
Tab. 14 – Übersicht: Häufigkeiten – fetale Marker	47
Tab. 15 – Übersicht: Häufigkeiten – Serummarker	53
Tab. 16 – Übersicht: Streudiagramme FF in Abh. Patientenmerkmale	60
Tab. 17 – Übersicht: Streudiagramme FF in Abh. Sonomarker	62
Tab. 18 – Ergebnisse – univariaten linearen Regression	63
Tab. 19 – Ergebnisse – univariate/multivariate linearen Regression	65
Tab. 20 – Ergebnisse – univariate/multivariate logistische Regression	69

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFP	Alpha-Fetoprotein
BMI	Body Mass Index
BPD	Biparietaler Durchmesser
Bspl.	Beispiel
cETS	kombiniertes Ersttrimesterscreening
cfDNA	zell-freie DNA ( <i>engl. cell-free DNA</i> )
cffDNA	zell-freie fetale DNA ( <i>engl. cell-free fetal DNA</i> )
DR	Detektionsrate
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl. Desoxyribonucleic acid</i> )
ETS	Ersttrimesterscreening
FF	Fetale Fraktion ( <i>engl. fetal fraction</i> )
FMF	Fetal Medicine Foundation
FPR	Falsch-Positiv-Rate
hCG	(freies) beta – humanes Choriongonadotropin
GA	Gestationsalter ( <i>engl. gestational age</i> )
IVF	In-vitro Fertilisation
MA	mütterliches Alter ( <i>engl. maternal age</i> )
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck ( <i>engl. mean arterial pressure</i> )
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MoM	Vielfaches des Medians ( <i>engl. multiple of median</i> )
MR-proANP	Mid-regional pro atrial natriuretic peptide
n	Anzahl
NIPT	Nicht-invasiver Pränataler Test ( <i>engl. non-invasive prenatal test</i> )
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NT	Nackentransparenz
p	Signifikanz

PAPP-A	Plazenta assoziiertes Schwangerschaftshormon ( <i>engl. placenta associated pregnancy hormone</i> )
PCT	Prolactin
PIGF-plus	placental growth fractor ( <i>engl.</i> )
PPV	Positive Prädiktive Vorhersagewert
SCA	gonosomale Aberrationen ( <i>engl. sex chromosome aneuploidies</i> )
SD	Standardabweichung ( <i>engl. standard deviation</i> )
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus ( <i>engl. single nucleotide polymorphism</i> )
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
T13, T18, T21	Trisomie 13, Trisomie 18, Trisomie 21

## 1. Einleitung

In der heutigen Zeit spielen die Screening- und Diagnostikmethoden im ersten Trimenon der Schwangerschaft eine immer größere Rolle, da dadurch bereits frühzeitig Erkrankungen des Feten und der Mutter im Rahmen der Schwangerschaft erkannt und weitere Schritte, auch therapeutischer Art, eingeleitet werden können. Die Grundlage dafür, insbesondere beim Screening auf Chromosomenstörungen, bietet das Ersttrimesterscreening (ETS) in der 11+0 - 13+6 Schwangerschaftswoche (Kozłowski, Burkhardt et al. 2018), welches sich seit Anfang der 1990er Jahre etabliert hat (Kagan, Eiben et al. 2014). Das ETS, welches den aktuellen Standard darstellt, setzt sich aus einer Beratung der Schwangeren durch den Arzt, einer Organdiagnostik mittels Ultraschalluntersuchung sowie biochemischen (PAPP-A, b-HCG) und maternalen Markern (mütterliches Alter, Gestationsalter) zusammen. In den letzten Jahren vollzieht sich ein Wandel zum Aneuploidie-Screening mittels Analyse von zellfreier fetaler DNA (cffDNA), auch bezeichnet als „non invasive prenatal testing“ (NIPT).

Dieser Ansatz, bei dem fragmentierte DNA aus dem mütterlichen Blut gewonnen und auf Chromosomenstörungen untersucht wird, zeichnet sich durch die höchste Detektions- und eine niedrige Falsch-Positiv-Rate im Hinblick auf die Trisomie 21, 18 und 13 aus (Gil, Accurti et al. 2017). Dadurch hat sich der NIPT für das T21-Screening als heutiger Goldstandard etabliert (Cuckle and Maymon 2016, Kagan, Sonek et al. 2017, Kagan, Sonek et al. 2017). Meistens, so auch in Deutschland, besteht die Empfehlung zur Inanspruchnahme der cffDNA Testung für bestimmte Risikogruppen als zweiten Screening-Schritt nach auffälligem ETS (Kagan, Hoopmann et al. 2015). In einigen Ländern, darunter in den Niederlanden, findet der NIPT sogar als „First-Tier Screening“ Anwendung (van der Meij, Sistermans et al. 2019). Der Einsatz von NIPT ist gegenwärtig noch auf das Screening auf Trisomie 21, 18, 13 sowie gonosomale Aberrationen beschränkt. Einige Studien setzen sich jedoch auch mit der Detektion von selteneren Chromosomenstörungen (Benn 2016, Pescia, Guex et al. 2017), Mikrodeletionen und Mikroduplikationen (Yaron, Jani et al. 2015, Lo, Karampetsou et al. 2016, Maya, Salzer Sheelo et al. 2022) und monogenen

Erkrankungen (Chiu, Hui et al. 2018) auseinander. Kitzman et al. und Fan et al. ist es überdies gelungen, das gesamte fetale Genom mittels cffDNA-Analyse in der Schwangerschaft zu decodieren (Fan, Gu et al. 2012, Kitzman, Snyder et al. 2012). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Verwendung von cffDNA auch in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen wird.

Dies bedeutet einen wesentlichen Fortschritt in der frühzeitigen und sicheren Detektion insbesondere von Chromosomenstörungen, allerdings dürfen ethisch-moralische Aspekte nicht außer Betracht gelassen werden.

### **1.1. Entwicklung der Pränataldiagnostik im Hinblick auf Chromosomenstörungen**

Das pränatale Screening auf fetale Entwicklungsstörungen hat sich in den vergangenen Jahrzehnten enorm weiterentwickelt. Den Anfang machte das Screening auf Neuralrohrdefekte mittels AFP im Serum zu Beginn der 70er Jahre (Wald, Cuckle et al. 1977). Seit den 1980er Jahren wurde der Fokus auf Chromosomenstörungen, insbesondere auf die Erkennung der Trisomie 21, des „Down-Syndroms“, gelegt (Cuckle and Maymon 2016). Zurückzuführen ist das darauf, dass die Trisomie 21 etwa die Hälfte aller Chromosomenaberrationen abbildet (Grati, Barlocco et al. 2010). Nach und nach wurden umfassendere und effektivere Methoden entwickelt, sodass neben weiteren Aneuploidien wie der Trisomie 18 und 13, und gonosomalen Aberrationen, auch eine Vielzahl anderer Schwangerschaftserkrankungen und -risiken erkannt werden können.

Ursprünglich stand die alleinige Berücksichtigung des mütterlichen Alters bei der Risikoeinschätzung für die Trisomie 21 im Vordergrund. So wurde allen Schwangeren ab 37 Jahren eine invasive Diagnostik, im Sinne einer Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese, angeboten (Snijders, Noble et al. 1998). Die Detektionsrate lag jedoch nur bei 30% für die T21. Unter zusätzlicher Berücksichtigung biochemischer Marker (AFP, bHCG, unkonj. Estriol), die im 2. Trimenon abgenommen wurden, konnte die Erkennungsrate auf 60% verbessert werden (Wald, Cuckle et al. 1988). Der sogenannte Triple-Test stellte für ein Jahrzehnt den Standard dar, wurde jedoch bedingt durch eine vergleichsweise

hohe Falsch-Positiv-Rate in Abhängigkeit des mütterlichen Alters durch neuere Methoden ergänzt (Wald 2014). Heute wird er nur noch als kostensparende Alternative oder bei versäumten ETS eingesetzt. Als optimierte Variante kann der Quadruple-Test angesehen werden. Zusätzlich zu den bereits genannten drei biochemischen Stoffen wird bei diesem Test das Inhibin-A im mütterlichen Blut untersucht. Malone et al. ermittelten für den Quadruple-Test eine DR von 81% bei einer FPR von 5% (Malone, Canick et al. 2005).

Zu Beginn der 1990er Jahre gelang es erstmals den Zusammenhang einer vergrößerten Nackentransparenz (NT) in der Ultraschalluntersuchung zwischen der 10-14. SSW. und dem Risiko für das Auftreten von Chromosomenstörungen, vor allem der Trisomie 21, zu ermitteln (Nicolaidis, Azar et al. 1992, Ville, Lalondrelle et al. 1992). Durch die Kombination der Nackentransparenzmessung und des maternalen Alters konnte eine Detektionsrate von 82,2% bei einer Falsch-Positiv-Rate von 8,3% erreicht werden (Snijders, Noble et al. 1998). Die Nackentransparenz repräsentiert dabei bis heute den effektivsten Einzelmarker im Hinblick auf das Screening für Chromosomenstörung (Wright, Kagan et al. 2008). Ferner kann die NT auch ein Hinweis auf andere Anomalien wie in erster Linie Herzfehler, aber auch Zwerchfellhernien, Akranie, Omphalozele, Megacystis, Skeletale Dysplasie und andere Fehlbildungen sein (Syngelaki, Chelemen et al. 2011).

Gegenwärtig stellt das kombinierte Ersttrimesterscreening (cETS) in der 11+0 – 13+6 SSW., welches sich aus einer Beratung durch den Arzt, einer Ultraschalluntersuchung der NT sowie biochemischen und maternalen Markern zusammensetzt, den Goldstandard in der Entscheidungsfindung für weitere Untersuchungen dar. Richtlinien und Empfehlungen zur korrekten Durchführung werden von der Fetal Medicine Foundation (FMF), German Society of Ultrasound in Medicine and Biology und International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG) zur Verfügung gestellt (Nicolaidis 2011, Salomon, Alfirevic et al. 2013, von Kaisenberg, Chaoui et al. 2016). Hierdurch können für die T21, 18 und 13 Detektionsraten von 92,1, 96,4 % und 92,2% bei einer Falsch-Positiv-Rate (FPR) von 4,6 % erreicht werden (Kagan, Wright et al. 2008, Kagan, Etchegaray et al. 2009, Wright, Syngelaki et al. 2014, Santorum, Wright et al.

2017). Santorum et al. konnten dieses Ergebnis in einer großen Studie mit knapp 110.000 Schwangeren, bei denen ein cETS erfolgte, bestätigen (Santorum, Wright et al. 2017). Gemittelt lässt sich mit dieser Methode für die drei häufigsten Trisomien entsprechend eine Gesamt-DR und FPR von ungefähr 95% und 3,1% erreichen (Kagan, Wright et al. 2008). Eine zusätzliche Reduzierung der FPR kann mittels Einkalkulierung zusätzlicher Ultraschall-Marker wie das Fehlen des fetalen Nasenbeins, einer fetalen Trikuspidalinsuffizienz oder der Beurteilung des Ductus Venosus erzielt werden, sofern die erforderliche Untersucherexpertise dies zulässt (Kagan, Cicero et al. 2009, Kagan, Valencia et al. 2009, Maiz, Valencia et al. 2009). Hervorzuheben ist auch das breite Untersuchungsspektrum des cETS, welches keinesfalls als isoliertes Screening auf Chromosomenstörungen, sondern vielmehr als generelle Vorsorgeuntersuchung verstanden werden sollte (Kagan, Sonek et al. 2022). So lassen sich mittels detaillierter Ultraschalluntersuchung und NT-Messung auch andere fetale Anomalien wie Triploidien, das Ullrich-Turner-Syndrom (Wagner, Sonek et al. 2016) oder Herzfehler (Becker and Wegner 2006) im 1. Trimenon erkennen. Die Beurteilung des Hirnstamms und des 4. Ventrikels kann frühzeitig auf die Entwicklung von Neuralrohrdefekten, wie einer Spina Bifida, hinweisen (Chaoui, Benoit et al. 2009, Lachmann, Chaoui et al. 2011). Die Erforschung neuer Messparameter im Hinblick auf die fetale Anatomie ist unter anderem auf die stetige Optimierung von Messgeräten, beispielshalber von Ultraschallequipment, zurückzuführen. Auch die zunehmende Erfahrung der Untersucher spielt dabei keine unwesentliche Rolle (von Kaisenberg, Chaoui et al. 2016). Eine fortdauernde Optimierung der Untersuchungseffektivität kann folglich gewährleistet werden.

## **1.2. Wandel zur cfDNA-Analyse**

Mit der cfDNA-Analyse kündigte sich ein Paradigmenwechsel im Pränatalscreening auf Aneuploidien an. Diese neue effektive Untersuchungsmethode etablierte sich insbesondere durch ihre hohe Testgüte für das Screening auf das Down-Syndrom (Kagan, Eiben et al. 2014).

Rechnete man bei Einführung noch damit, dass der NIPT die derzeitigen Untersuchungsverfahren gänzlich ablösen würde, wird der Test heute viel mehr als Ergänzung zum Ersttrimesterscreening gesehen. Das cETS verteidigt seine Position nicht zuletzt durch die größere Bandbreite der potenziell detektierbaren Komplikationen in der Schwangerschaft, während sich der NIPT weitestgehend auf die gängigen Chromosomenstörungen beschränkt. Ob es im Zuge zukünftiger Optimierung bezüglich des Untersuchungsspektrums und der Kosteneffizienz zu einem gänzlichen Wandel zur cfDNA-Analyse kommt, bleibt abzuwarten. Gegenwärtig sind die Kosten für eine flächendeckende Anwendung jedoch noch zu hoch (Kagan, Hoopmann et al. 2015). Sicher bleibt, dass es sich auch weiterhin nicht um einen diagnostischen Test handelt und eine invasive diagnostische Absicherung mittels Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese bei positivem Ergebnis obligat bleibt (Kagan, Eiben et al. 2014).

Der Gedanke, Chromosomenstörungen über eine Analyse fetaler DNA zu diagnostizieren, wurde zunächst über den Versuch fetale Zellen aus dem mütterlichen Blut zu gewinnen, verfolgt (Holzgreve, Garritsen et al. 1992). Zu geringe Konzentrationen limitierten jedoch die Möglichkeit der Extraktion. Dies spiegelte sich in der bescheidenen Testgüte dieses Verfahrens wieder. Folglich ermöglichte die Analyse fetaler Zellen im Hinblick auf das Trisomie 21 Screening nur eine DR von 75% bei einer FPR von 4,1% und 0,6% für weibliche und männliche Feten (Bianchi, Simpson et al. 2002). Die Entdeckung von zellfreier fetaler DNA (cffDNA) im mütterlichen Plasma Schwangerer im Jahr 1997 eröffnete neue Pforten für die Pränataldiagnostik (Lo, Corbetta et al. 1997). Bei der frei zirkulierenden zellfreien DNA (cfDNA) handelt es sich um ein Gemisch, welches sich aus maternalen- und fetalen DNA – Fragmenten zusammensetzt. Der maternale Anteil macht dabei mengenmäßig den Großteil aus und entsteht hauptsächlich aus mütterlichen hämatopoetischen Zellen und Fettgewebe (Haghiac, Vora et al. 2012, Peng and Jiang 2017). Der Anteil der geringer konzentrierten cffDNA an der gesamten cfDNA wird auch als Fetale Fraktion (*engl. fetal fraction*, FF) bezeichnet und ist bereits wenige Stunden nach der Entbindung nicht mehr nachweisbar (Lo, Chan et al. 2010). Mittels Gaußscher

Glocke lässt sich die Verteilung der FF während des gesamten Schwangerschaftszeitraums darstellen. Sie umfasst rund 5-15% der cfDNA (Lo, Tein et al. 1998) und erreicht mit 10-20% in der 10.-21. SSW ihr Maximum (Taglauer, Wilkins-Haug et al. 2014). Dabei ist sie in Bruchstücke von etwa 300 Basenpaaren verteilt. Es ist anzumerken, dass die cffDNA, entgegen der durch die irreführende Bezeichnung anzunehmenden Erwartung, nicht fetalen sondern primär plazentaren Ursprungs ist (Bianchi 2004). Tjoa et al. konstatierten einen Zusammenhang zwischen degenerativen Veränderungen der Synzytotrophoblasten und einer Liberation der cffDNA ins maternale Blut. Das Zusammenwirken von apoptotischen und nekrotischen Prozessen ist anzunehmen (Tjoa, Cindrova-Davies et al. 2006). Verschiedene maternale und fetale, biochemische und biophysikalische Faktoren nehmen dabei Einfluss auf die Menge der cffDNA.

### 1.3. Methodik der NIPT

Derzeit existieren zur Messung der cffDNA mit „*massively parallel sequencing*“ (MPS) und „*targeted sequencing*“ (TS) sowie der Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. single nucleotid polymorphism = SNP) mehrere etablierte und moderne Analyseverfahren. Beim MPS und TS handelt es sich um Hochdurchsatz-Sequenzierungen. Sie erlauben eine rasche Amplifizierung und Sequenzierung der zellfreien DNA während der Schwangerschaft mit der Folge, dass eine Anwendung im klinischen Alltag ermöglicht werden kann (Metzker 2010, Fan, Gu et al. 2012). Beide Verfahren zeichnen sich durch verschiedene Methoden aus um unterschiedliche Ausprägungen des Erbguts, wie Aneuploidien, zu erkennen. Gleichwohl beide Ansätze darauf abzielen, die DNA Fragmente den entsprechenden Chromosomen zuzuweisen, werden beim MPS alle DNA-Fragmente analysiert, während das *targeted sequencing* allein die Zuordnung von DNA-Fragmenten einzelner Chromosomen verfolgt (Palomaki, Kloza et al. 2011, Bianchi, Platt et al. 2012, Sparks, Wang et al. 2012, Stumm, Entezami et al. 2012). MPS liest dementsprechend enorm viel „unbrauchbares“ Genmaterial aus. Chiu et al.

fürten beispielsweise eine Studie durch, in der mit MPS nach Aneuploidien gescreened wurde (Chiu, Chan et al. 2008). Nur 0,3% der sequenzierten DNA war für die Analyse relevant. Folglich handelt es sich beim *targeting sequencing* um eine effizientere und kostensparendere Methode, die für den klinischen Gebrauch geeigneter scheint (Sparks, Wang et al. 2012).

Auf Grund der Tatsache, dass eine gesonderte Untersuchung der plazentaren DNA-Fragmente zu komplex ist, konzentriert sich die Auswertung auf die gesamte cfDNA. Dies hat zur Folge, dass sich nur marginale Unterschiede zwischen einer fetalen Trisomie und einem normalen Ergebnis ergeben. Lassen sich dementsprechend 0,75% des menschlichen Genoms dem Chromosom 21 (C) zuordnen, bedeutet das einen Anteil von 1,5% bei unauffälligem Chromosomensatz und folglich 2,25% bei Trisomie 21. Folgende Rechnung veranschaulicht die Herausforderung eines solchen Tests, würde man einen fetalen Anteil von 15% bei vorliegender Schwangerschaft mit Trisomie annehmen:  $0,15 (15\% \text{ cfDNA}) \times 2,25 (\text{fetaler Anteil des C21 bei T21}) + 0,85 (85\% \text{ maternale DNA}) \times 1,5 (\text{maternaler Anteil des C21 am mütterlichen Genom}) = 1,6125$ . Dementsprechend muss der Test hier in der Lage sein zwischen 1,6125% und 1,5% zu unterscheiden. Je geringer also die FF ausfällt, desto marginaler präsentiert sich der Abstand zum Normalbefund.

Das hat zur Folge, dass sich der Abstand zum Normalbefund mit geringer werdender FF marginaler präsentiert und der Test an Trennschärfe verliert (Kagan, Eiben et al. 2014). Mit der Microarray-basierten DNA-Quantifikationsmethode wurde eine noch effektivere Version des NIPT entwickelt, die im Vergleich zum Next-Generation-Sequencing sowohl ein schnelleres als auch präziseres Ergebnis generiert (Juneau, Bogard et al. 2014). Z-Scores dienen der statistischen Analyse. Sie stellen den Abstand des ermittelten Wertes vom erwarteten Mittelwert, hier also dem Normalbefund, in Standardabweichungen an. Üblicherweise wird ein Grenzwert von 3,0 zur Entscheidungshilfe herangezogen (Chiu, Akolekar et al. 2011). Das bedeutet, dass bei einem Z-Score bis 3,0 ein normaler Karyotyp angenommen wird, hingegen bei einem Wert  $> 3,0$  von einer Trisomie ausgegangen wird. Bei Gebrauch dieses Schwellenwertes, würden sich 99,9% der Feten mit euploidem

Chromosomensatz im Normalbereich, also  $z < 3$ , wiederfinden. Daraus resultiert eine FPR von 0,01% (Chiu, Chan et al. 2008).

Die Untersuchung von Einzelnukleotidpolymorphismen stellt eine Alternative dar. Bei dieser Methode wird zuerst das Muster von SNPs auf den Chromosomen 13, 18, 21, X und Y ausgewertet. Hierbei wird die gesamte freie DNA, also maternale und fetale Fragmente, untersucht. In einem zweiten Schritt werden dann allein die SNPs der maternalen DNA, mittels Analyse mütterlicher Leukozyten, beurteilt und mit der ersten Analyse verglichen. In der Folge kann die fetale SNP-Konstellation abgeleitet werden und auf Aneuploidien geschlossen werden (Dhallan, Guo et al. 2007).

#### **1.4. Testgüte der cfDNA-Analyse im Screening auf T21, T18 und T13**

In den ersten Jahren nach Einführung des NIPT limitierten sich die meisten Studien, die sich die Untersuchung der Testgüte zum Ziel setzten, auf Risikokollektive (Ashoor, Syngelaki et al. 2012, Bianchi, Platt et al. 2012, Norton, Brar et al. 2012, Palomaki, Deciu et al. 2012, Sparks, Struble et al. 2012, Stumm, Entezami et al. 2012, Zimmermann, Hill et al. 2012). Mittlerweile existieren auch Screeningstudien in Normalkollektiven (Pergament, Cuckle et al. 2014, Norton and Wapner 2015, Quezada, Gil et al. 2015, Stokowski, Wang et al. 2015, McLennan, Palma-Dias et al. 2016, Iwarsson, Jacobsson et al. 2017). Verschiedene Meta-Analysen werteten die Ergebnisse einzelner Studien aus (Taylor-Phillips, Freeman et al. 2016, Gil, Accurti et al. 2017).

Gil et al. ermittelten in ihrer Meta-Analyse eine DR von 99,7%, 97,9% und 99% bei einer FPR von jeweils 0,04% für T21, T18 und T13 sowie eine DR und FPR von 95,8% und 0,14% für Monosomie X. Dabei wurden 30 Studien mit insgesamt 225032 normalen Schwangerschaften und 1963 T21 Schwangerschaften berücksichtigt.

Seit dieser Meta-Analyse steht fest, dass es sich bei der cfDNA-Analyse angesichts höchster Testgütekriterien um die beste Screeningmethode hinsichtlich einer T21, T18 oder T13 handelt. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch weitere Meta-Analysen und Cochrane-Studien (Badeau, Lindsay et al.

2017, Mackie, Hemming et al. 2017, Geppert, Stinton et al. 2020). Im unmittelbaren Vergleich zum cETS stellt sich der NIPT damit als überlegen heraus. Dennoch darf dabei nicht vergessen werden, dass die cfDNA-Analyse im Untersuchungsspektrum limitiert ist und sich auf die typischen Chromosomenstörungen und Sexchromosomenveränderungen beschränkt. Zudem fällt der Test in 1-3% der Fälle ergebnislos aus (Palomaki and Kloza 2018). Auch muss betont werden, dass es sich bei der Analyse zellfreier fetaler DNA um DNA-Fragmente primär plazentaren Ursprungs handelt. Insbesondere plazentare Mosaik oder das Phänomen eines „Vanishing Twins“ können entsprechend Falsch-positive Ergebnisse verursachen (Kagan, Eiben et al. 2014). Der NIPT darf deshalb trotz seiner hohen Testgüte nicht als diagnostischer Test, sondern viel mehr als sehr guter Screeningtest verstanden werden. Einem auffälligen Ergebnis muss entsprechend immer eine invasive Diagnostik folgen (Nicolaidis, Syngelaki et al. 2012). Kagan et al. verdeutlichen dies in einer Übersichtsarbeit an folgendem Beispiel: Wenn in der Normalbevölkerung von einer altersunabhängigen T21-Prävalenz von etwa 1 in 500 Fällen ausgegangen wird, fänden sich bei 100000 normalen Schwangerschaften 200 von T21 betroffene Feten. Bei einer DR von 99% würden 198 davon erkannt werden können. Entsprechend würden bei einer FPR von 0,1% 100 Schwangerschaften falsch-positiv deklariert werden. Von insgesamt 298 testpositiven Schwangerschaften wären also nur 198, also zwei Drittel, wirklich betroffen (Kagan, Eiben et al. 2014). Eine allein auf der cfDNA-Analyse basierte Konsequenz, wie schlimmstenfalls eine Abortinduktion, ließe sich nicht vertreten.

Betont werden sollte auch, dass die positiven (PPV) und negativen Vorhersagewerte (NPV) eines Screeningtests immer in Abhängigkeit zur Prävalenz einer Erkrankung stehen. Dies gilt auch für Tests mit hoher Sensitivität und niedriger FPR (Wax, Chard et al. 2015). Der positiv prädiktive Wert gibt an, wie viele Personen mit einem positiven Testergebnis, tatsächlich krank sind. Solange die Prävalenz niedriger als die FPR ist, ist mit mehrheitlich falsch-positiven Ergebnissen zu rechnen. Sogar bei vollständiger Detektionsrate von 100% und niedriger FPR trifft dies zu (Mackie, Hemming et al. 2017).

Insbesondere bei der Aufklärung junger Patientinnen mit entsprechend geringer Prävalenz der Trisomien 21, 18 und 13 sollte dies berücksichtigt werden (Kozłowski, Burkhardt et al. 2018).

### **1.5. Screening auf andere chromosomale Störungen und Veränderungen**

Mit zunehmender Etablierung des NIPT stieg in den letzten Jahren auch das Interesse andere Chromosomenabberationen, wie seltene Trisomien, Sexchromosomenstörungen, Mikrodeletionen und -duplikationen und monogenetische Erkrankungen mittels cfDNA-Analyse zu testen und das Restrisiko anderer genetischer Störungen zu reduzieren. Maya et al. konnten in ihrer Studie demonstrieren, dass eine Erweiterung des Spektrums detektierbarer Erkrankungen nicht zwangsläufig zu einer signifikanten Reduktion des Restrisikos führt (Maya, Salzer Sheelo et al. 2022). In ihrer Studie verglichen sie das Restrisiko für unterschiedliche Gruppen, die sich einem Screening für T21, T18 und T13, sowie zusätzlich jeweils für Sexchromosomenveränderungen, für Mikrodeletionen/-duplikationen einschließlich 1p36.3-1p36.2; 4p16.3-4p16.2; 5p15.3-5p15.1; 15q11.2-15q13.1 und 22q11.2 und einer Gruppe mit „genome-wide screening“ für Chromosomenstörungen von 7 Megabasenpaaren und mehr, unterzogen. Insgesamt fanden sich bei 1,2% aller Feten chromosomale Störungen und das Restrisiko betrug in den Gruppen 1,07%, 0,78%, 0,74% und 0,68%.

Dabei darf nicht vergessen werden, dass mit zunehmender Zahl detektierbarer Fehlbildungen auch die Falsch-Positiv Rate zunimmt. Zudem ist fraglich, ob die häufig extrem niedrige Prävalenz solcher Defekte eine Berücksichtigung in einem Routinescreening rechtfertigt (Kagan, Sonek et al. 2022). Dennoch kann der Einsatz eines NIPT zur Untersuchung auf selten Defekte durchaus nützlich sein. Beispielsweise lässt sich nach einer auffälligen Ultraschalluntersuchung der Verdacht auf eine Achondroplasie mittels cfDNA-Analyse auf eine FGFR-3 Mutation erhärten (Ren, Zhao et al. 2018).

## 1.6. Screening auf gonosomale Aberrationen und frühzeitige Geschlechtererkennung

Heutzutage wird im Rahmen des NIPT, zumeist auf Wunsch unter höherem Kostenaufwand, auch ein Screening auf X/Y-chromosomale Störungen angeboten. Die häufigsten gonosomalen Aberrationen (*engl. sex chromosome aneuploidies* = SCA) sind die Monosomie X, auch als Ullrich-Turner-Syndrom bezeichnet, das Triple-X-Syndrom (47, XXX), das Klinefelter-Syndrom (47, XXY) und das Diplo-Y-Syndrom (47, XYY). Die Gesamt-Prävalenz von SCAs ist mit etwa 0,03% im Vergleich zu den Trisomien gering. Gil et al. fassten die Testgüte in ihrer Meta-Analyse zusammen und berichteten über Detektionsraten zwischen 95,8% und 100% und Falsch Positiv Raten von 0,004% bis 0,41% (Gil, Accurti et al. 2017).

Diese zunächst sehr guten Ergebnisse sind jedoch kritisch zu hinterfragen, da etwaige Veränderungen postnatal häufig unentdeckt bleiben, wodurch die echte Detektionsrate niedriger liegen sollte. Bedingt durch die damit einhergehende niedrigere Letalität, übersteigt die Prävalenz an SCA-Trägern in der lebenden Bevölkerung allerdings jener der autosomalen Chromosomenstörungen, sodass auch hier der Wunsch nach einer frühen Identifikation besteht (Mazloom, Dzakula et al. 2013). Der oftmals gute Outcome stellt allerdings in Frage, ob eine pränatale Testung begründet werden kann. Betont werden sollte, dass der PPV (Positive Prädiktive Vorhersagewert) trotz der geringen FPR im Screening auf SCAs sehr gering ausfällt. Am Beispiel des Turner-Syndroms beträgt die PPV nur ca. 30% (Mennuti, Chandrasekaran et al. 2015). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch andere Studien (Meck, Kramer Dugan et al. 2015). Ursächlich kommen neben der geringen Prävalenz insbesondere plazentare Mosaik in Betracht (Neufeld-Kaiser, Cheng et al. 2015).

Weiter zeigt die cfDNA-Analyse bei der Identifikation des Geschlechts eine sehr hohe Testgenauigkeit von 99% (Kozlowski, Burkhardt et al. 2018). Dabei nimmt die Testzuverlässigkeit im Laufe der Schwangerschaft zu. Zurückzuführen ist dies am ehesten auf die steigende cfDNA Konzentration mit zunehmenden Gestationsalter. Allerdings ist eine verlässliche Aussage über das Geschlecht

schon ab der 7. SSW. möglich. Beachtet werden sollte, dass die Geschlechtermitteilung vor der 12. SSW post menstruationem durch das Gendiagnostikgesetz in Deutschland verboten ist (Gendiagnostikgesetz - GenDG). Dennoch kann eine frühzeitige Geschlechtsidentifikation in einzelnen Fällen, beispielsweise bei familiärer Vorbelastung durch X-chromosomal-vererbte Erkrankungen oder im Falle eines Adrenogenitalen Syndroms (AGS) um eine Steroid-Therapie rechtzeitig einzuleiten, sinnvoll sein (Kozlowski, Burkhardt et al. 2018).

### **1.7. Screening in Mehrlingsschwangerschaften**

Die cfDNA-Analyse wird auch im Rahmen vorliegender Zwillingsschwangerschaften angeboten. Dennoch gestaltet sich die Testung komplexer, da bei betroffenen zweieiigen Zwillingen in der Regel nur ein Fet eine chromosomale Störung aufweist. Außerdem könnten Aneuploidien übersehen werden, wenn der betroffene Fet nur eine geringe Menge an DNA unterhalb des Schwellenwerts zur *fetal fraction* beiträgt, während der gesunde Fet ein falsch-negatives Ergebnis hervorrufen würde. Darüber hinaus nimmt mit der insgesamt geringeren fetalen Fraktion auch die Zahl an Testfehlern zu (Bevilacqua, Gil et al. 2015). Konträr dazu findet sich bei monozygoten Zwillingen bedingt durch ihre identische Genetik in der Regel ausreichend fetale DNA (Revello, Sarno et al. 2016). Gil et al. ermittelten in ihrer Meta-Analyse, unter Berücksichtigung von fünf Studien (Lau, Jiang et al. 2013, Huang, Zheng et al. 2014, Benachi, Letourneau et al. 2015, Sarno, Revello et al. 2016, Tan, Gao et al. 2016), eine DR von 100% bei einer FPR von 0% für die Trisomie 21 (addierte Fallzahl = 24). Von 14 Trisomie 18 Fällen konnten 13 richtig erkannt werden. Im einzigen Fall einer Trisomie 13 lieferte die cfDNA Analyse ein falsch-negatives Ergebnis (Gil, Accurti et al. 2017). Damit zeigt der NIPT im Screening auf T21 bei Zwillingen gegenwärtig eine ähnliche Testgüte wie für Einlingsschwangerschaften, während die noch dünne Datenlage hinsichtlich einer T18 und T13 eine sinnvolle Interpretation noch nicht zulässt. Für höhere Mehrlingsschwangerschaften ist der Test derzeit nicht erhältlich (Kozlowski, Burkhardt et al. 2018).

## **1.8. NIPT im Screening auf seltene Chromosomenstörungen, Mikrodeletionen und -duplikationen**

Neben den klassischen Trisomien 21, 18 und 13, die etwa 75% aller Aneuploidien ausmachen, können auch seltenere Chromosomenstörungen (RATs), wie z.B. die Trisomie 9, mittels cfDNA-Analyse erfasst werden (Liang, Lv et al. 2013, Pescia, Guex et al. 2017). Die Arbeitsgruppe um Scott et al. berichteten nach Auswertung von 23.000 cfDNA-Tests von einer Prävalenz von 1:835 für RATs. Dazu zählten Fälle einer Trisomie 7, 16 und 22 (Scott, Bonifacio et al. 2018). Benn et al. demonstrierten in einer noch größeren Analyse unter Berücksichtigung von insgesamt 200.000 cfDNA Messungen eine Prävalenz von 0.32%, hauptsächlich bedingt durch Trisomie 7, 15, 16 und 22 Fälle (Benn, Malvestiti et al. 2019). In 41,1% endete die Schwangerschaft in einer unauffälligen Lebendgeburt und in 27,2% wurde eine Fehlgeburt beobachtet. Nur 7,3% der Feten zeigten Fehlbildungen, bei 2% fand sich eine relevante uniparentale Disomie und bei 14,6% konnte eine Wachstumsretardierung beobachtet werden. Eine routinemäßige Implementierung in die cfDNA-Analyse wurde hinsichtlich der fraglichen klinischen Relevanz und mangels Präventionsmöglichkeiten seitens der Autoren abgelehnt.

Abgesehen von autosomalen und gonosomalen Chromosomenaberrationen verfügt der NIPT auch über die Möglichkeit Kopienzahlvariationen (*engl. copy number variation* = CNV) zu detektieren. Dabei handelt es sich um kleinste strukturelle Abweichungen des Erbguts, die hauptsächlich durch Mikrodeletionen, seltener auch durch Mikroduplikationen verursacht werden. CNVs treten unabhängig vom mütterlichen Alter auf. Pathologische submikroskopische Veränderungen lassen sich in etwa 3,6% aller Schwangerschaften mit auffälligem und 1,9% ohne auffälligem Ultraschallbefund finden (Srebniak, Knapen et al. 2017). Da Mikrodeletionen durch klassische Karyotypisierung nicht erfasst werden können, gelingt der Nachweis über eine Array-CGH-Analyse (*Array-base Comparative Genomic Hybridization*)

(Kozlowski, Burkhardt et al. 2018). Sogar Mikrodeletionssyndrome, wie das wohl bekannteste Di-George-Syndrom, in der Größenordnung von 3-5 Megabasen lassen sich mit dieser Methode nachzuweisen (Jensen, Dzakula et al. 2012). In einer großen retrospektiven Studie unter Berücksichtigung von 80000 cfDNA-Analysen betrug die FPR für die SNP-basierte Testung des Di-George-Syndroms 0,33%. Nach Adjustierung der Sequenzierungstiefe konnte eine FPR von 0,07% erreicht werden (Martin, Iyengar et al. 2018). Kagan et al. berichten in einer prospektiven Studie von einer FPR von 0,27% bei einer Testfehler-Quote von 0,9% (Kagan, Hoopmann et al. 2020). Die Arbeitsgruppe um Schmid et al. berichten nach einer Gegenüberstellung von 122 betroffenen Schwangerschaften mit einer simulierten unbetroffenen Kontrollgruppe über eine Detektionsrate von 75,4% bei niedriger Falsch-positiv Rate (Schmid, Wang et al. 2018). Andere Studien konnten diese Ergebnisse bestätigen (Bevilacqua, Jani et al. 2021).

Zusammenfassend ist eine Implementierung des Screenings auf 22q11.2DS in die cfDNA-Analyse hinsichtlich der Testgüte bereits möglich. Gegenwärtig wird das Di-George-S. überwiegend im zweiten Trimenon oder sogar später nach auffälligem Fehlbildungsschall diagnostiziert. Mittels cfDNA-Analyse wäre eine frühzeitigere Erkennung möglich, wodurch präventive Maßnahmen hinsichtlich der Symptomatik (z.B. Dysphagie, erhöhtes Krampfpotenzial, etc.) vorausgehend geplant und eingeleitet würden. Die Variabilität der phänotypischen Ausprägung lässt dennoch Diskussionspielraum.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für die cfDNA-Analyse ist die frühe Erkennung von monogenen Erkrankungen. Insbesondere für Schwangerschaften mit positiver Familienanamnese kann die Abklärung nicht-invasiv erfolgen, um unnötige Bedenken zu beseitigen. Das Spektrum erkennbarer Leiden ist dabei sehr breit gefächert und schließt unter anderem Erkrankungen wie Achondroplasie und Myotone Dystrophie ein (Amicucci, Gennarelli et al. 2000, Chitty, Griffin et al. 2011).

## 1.9. NIPT in der klinischen Anwendung

Bis vor kurzem wurde der NIPT nur als IGeL-Leistung angeboten, wodurch der klinische Einsatz kostenbedingt limitiert war. Seit Juli 2022 können Schwangere die Untersuchung im Rahmen einer kassenärztlichen Leistung in Anspruch nehmen. Zurückzuführen ist dies auch auf immer effektivere Analysemethoden, günstigere Gerätschaften, wachsende Konkurrenz und eine zunehmende gesellschaftliche Etablierung.

Die FMF Deutschland empfiehlt die indikationsbezogene Anwendung des NIPT, obwohl sich die Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GfH) dafür ausgesprochen hat, dass der Test keiner Schwangeren vorenthalten werden darf (GfH 2012, Kozlowski, Burkhardt et al. 2018). Bei Inanspruchnahme der cfDNA-Analyse in Deutschland muss das Gendiagnostikgesetz eingehalten werden. Der durchführende Arzt ist verpflichtet über die Testgüte, Alternativen und das Ergebnis aufzuklären. Das Ergebnis darf nur der betroffenen Person und nur durch den verantwortlichen Arzt mitgeteilt werden (Gendiagnostikgesetz).

Auch die Deutsche Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin (DEGUM) empfiehlt den NIPT nur für ein ausgewähltes Risikokollektiv nach stattgehabter Ultraschalluntersuchung. Eine Kombination mit dem kombinierten Ersttrimesterscreening ist anzustreben. Der Vorteil liegt darin, dass sich das cETS als gute, kosteneffiziente Methode etabliert hat, die durch den Großteil der Gynäkologen durchgeführt werden kann. So kann ein Zwei-Stufen-Ansatz verfolgt werden, bei dem nach entsprechendem Ergebnis im cETS im zweiten Schritt der NIPT zur weiteren Abklärung erfolgen kann (Nicolaidis, Wright et al. 2013, Kagan, Hoopmann et al. 2015, Kagan, Schmid et al. 2015, Kagan, Sonek et al. 2022). Dabei dient das cETS als vorausgehende Untersuchung dazu, Schwangerschaften entsprechend ihres Fehlbildungs-Risikos in Hoch-, Intermediär- und Niedrigrisikogruppen einzuordnen.

In der Hochrisikogruppe, die sich durch Grenzwerte von 1:50 (FMF UK) bis 1:150 (FMF Deutschland) definiert, wird der Einsatz des NIPT als Folgeuntersuchung nicht empfohlen. Der Grund liegt darin, dass in diesem Kollektiv das Spektrum

an zu Grunde liegenden Ursachen dem der durch NIPT erkennbaren Erkrankungen bei weiten überragt (Kagan, Hoopmann et al. 2015). Entsprechend sollte eine invasiv-diagnostische Abklärung folgen, da die Trisomien 21, 18 und 13 nur ca. 70% der erkennbaren Chromosomenstörungen abbilden (Wellesley, Dolk et al. 2012). Petersen et al. konnten zeigen, dass mit steigendem mütterlichem Alter, zunehmender NT und abweichender biochemischer Untersuchung der Anteil an atypischen Chromosomenstörungen ansteigt. 23,4% aller pathologischen chromosomalen Anomalien wurden nicht durch eine T21, T18 oder T13 verursacht (Petersen, Vogel et al. 2014).

Auch im Niedrigrisikokollektiv wird von einem Einsatz des NIPT zur weiteren Abklärung abgeraten. Grund dafür ist einerseits die niedrige Prävalenz der durch NIPT erkennbaren Chromosomenstörungen, die den positiven prädiktiven Wert gering ausfallen lässt. Zum anderen ist die Prävalenz anderer nicht durch NIPT detektierbarer Chromosomenstörungen in dieser Gruppe vergleichsweise höher, sodass ein unauffälliges Ergebnis den Patientinnen fälschlicherweise ein Gefühl der Sicherheit vermitteln würde. Wegen des niedrigen Gesamtrisikos für eine vorliegende Erkrankung, wird im Niedrigrisikokollektiv keine weitere Abklärung empfohlen (Kagan, Eiben et al. 2014).

Nach heutiger Kenntnis eignet sich der NIPT insbesondere für Einsatz bei Patienten der Intermediärrisikogruppe. Dem Kollektiv gehören jene Fälle an, bei denen das Risiko zwischen den Schwellenwerten der Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Gruppe liegt. Je nach Definition handelt sich also um Patienten mit einem Risiko von etwa 1:10 – 1:2500, beispielsweise bedingt durch ein erhöhtes mütterliches Alter oder ein auffälliges biochemisches Ergebnis bei unauffälligem Ultraschall. Unter Berücksichtigung zusätzlicher Ultraschallmarker, wie beispielsweise einer fetalen Trikuspidalinsuffizienz, kann das Risiko weiter eingegrenzt werden (Kagan, Cicero et al. 2009, Kagan, Valencia et al. 2009, Maiz, Valencia et al. 2009). Diese Methode bedarf allerdings einer gewissen Expertise und ist deshalb nicht überall umsetzbar.

In einer retrospektiven Studie berichteten Kagan et al. nach direkter Gegenüberstellung eines Zwei-Stufen Ansatzes (Hochrisiko  $\geq 1:10$ ; Intermediärrisiko 1:11 – 1000; Niedrigrisiko  $\leq 1:1001$ ) und einer universellen

cfDNA-Analyse über vergleichbare Detektionsraten für die T21 bei gleichzeitiger Kosteneinsparung und Berücksichtigung anderer Fehlbildungen.

Einige Länder verfolgen einen alternativen Ansatz der universellen cfDNA Analyse in erster Instanz (van der Meij, Siermans et al. 2019). Für die breite Anwendung des NIPT sprechen dessen unkomplizierte Durchführung mittels einfacher Blutentnahme und die höchste Detektionsrate und niedrigste Falsch-Positiv Rate für die T21, 18 und 13.

NIPT als First-Line Screening würde zudem eine Reduktion invasiver Diagnosetests erzielen, dennoch wäre diese Strategie auch mit dem höchsten Kostenaufwand verbunden. Außerdem sollte der Test mindestens zwei Wochen vor dem ETS-Termin durchgeführt werden, um das cETS im Falle eines Testfehlers rechtzeitig durchführen zu können (Kagan, Hoopmann et al. 2015). Die Kombination aus ETS zur Abklärung einer großen Bandbreite potentieller Erkrankungen und dem NIPT für eine bestimmte Risikopopulation ist dementsprechend die geeignetste Methode (Kagan, Eiben et al. 2014, Kozlowski, Burkhardt et al. 2018, Prodan, Wiechers et al. 2022).

### **1.10. Limitation der cfDNA-Analyse**

Der NIPT ist ein Screeningtest und erlaubt nur eine Einschätzung des Risikos für das Vorliegen chromosomaler Aberrationen. Eine Diagnose kann mittels cfDNA-Analyse nicht gestellt werden. Dafür bedarf es einer invasiv-diagnostischen Abklärung mittels Chorionzottenbiopsie im ersten Trimenon oder vorzugsweise Fruchtwasseruntersuchung ab der 15. SSW (Zelig, Knutzen et al. 2016), da bei der Amniozentese nur fetale Zellen analysiert werden und das Mosaikrisiko minimiert ist. Auf diese Weise können falsch positive aber auch falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Diskordante Befunde entstehen primär deshalb, da die im NIPT analysierten DNA-Fragmente überwiegend maternalen und plazentaren Ursprungs sind. Falsch negative Ergebnisse können beispielsweise zustande kommen, wenn zytogenetische Anomalien auf den Feten beschränkt sind und nicht die Zytotrophoblasten betreffen. Andererseits ist die häufigste Ursache für einen falsch-positiven Befund ein plazentares Mosaik

(Srebniak, Diderich et al. 2014). Auch maternale Mosaik und Erkrankungen, insbesondere Tumoren, können falsch-positive Ergebnisse bewirken. Seltener kann auch ein „vanishing twin“ solch einen Befund verursachen, wenn die Blutabnahme für den NIPT und der Abort zeitlich nah beieinander liegen (Osborne, Hardisty et al. 2013, Kozlowski, Burkhardt et al. 2018, Wilkins-Haug, Zhang et al. 2018).

Bei der Veranlassung des NIPT ist mit drei Gründen zu rechnen, die einen Testfehler oder einen ergebnislosen Befund verursachen können. Dazu zählen Transport und Bearbeitungsfehler, technische Fehler bei der Extraktion, Amplifikation oder Sequenzierung der DNA und eine geringe fetale Fraktion von unter 4%. Die häufigste Ursache, die in etwa 1-3% der Fälle auftritt, ist die Unterschreitung der Mindestkonzentration an fetaler DNA (Grati and Kagan 2017). Hier wird unter Einverständnis des Patienten eine Reanalyse durchgeführt, die in der Hälfte bis zwei Drittel der Fälle zum Ergebnis führt. In der Hälfte bis ein Drittel der Fälle bleibt die cfDNA-Analyse auch dann ergebnislos (Palomaki and Kloza 2018). In Schwangerschaften mit Trisomie fällt die DNA des betroffenen Chromosoms geringfügig höher aus als bei einem diploiden Chromosomensatz. Ob der Test diesen Unterschied erkennt, ist abhängig von der fetalen Fraktion, die als Qualitätsparameter deshalb immer angegeben werden sollte (Ashoor, Syngelaki et al. 2013, Kagan, Sonek et al. 2022).

Ein ergebnisloser Test ist jedoch nicht nur mit unnötigen Kosten verbunden. Auch würden Betroffene mit einer notwendigen erneuten oder alternativen Testung, dem damit verbundenen Zeitaufwand, der psychische Belastung und den konsekutiv höheren Risiken im Falle eine Intervention dann fortgeschrittenem Gestationsalter, konfrontiert werden.

Es stellt sich die Frage, inwiefern sich der fehlende Outcome vorhersagen lässt. Bestenfalls könnten betroffene Patienten vorab herausselektiert werden und alternative Screeningmethoden, wie beispielsweise eine detaillierte Ultraschalluntersuchung, angeboten werden.

Beantworten lässt sich die Frage, indem man die Einflussfaktoren auf die FF identifiziert. Dazu gehören biophysikalische und biochemische Determinanten.

Bereits bekannt ist ein Zusammenhang zwischen steigendem beta-hCG, PAPP-A und PIGF-plus Konzentrationen, zunehmender fetaler Scheitel-Steiß-Länge (SSL) sowie zunehmendem Gestationsalter und der FF. Ebenso publiziert wurden Daten, die eine inverse Korrelation mit zunehmendem mütterlichem Alter, Gewicht und BMI aufzeigen. Bei Südostasiatinnen sowie Patienten afrikanischer Herkunft fällt die FF im Vergleich zu Kaukasierinnen niedriger aus. Geringere Konzentrationen sind außerdem zu erwarten, wenn reproduktionsmedizinische Maßnahmen in Anspruch genommen wurden oder eine Heparinabgabe während der Schwangerschaft erfolgt. Ebenso ist bei vorliegender T18 und 13 eine niedrigere FF messbar. (Ashoor, Poon et al. 2012, Ashoor, Syngelaki et al. 2013, Dar, Curnow et al. 2014, Bevilacqua, Gil et al. 2015, Revello, Sarno et al. 2016, Ma, Wu et al. 2018, Galeva, Gil et al. 2019). Entsprechend ist in diesen Fällen öfter mit einem ergebnislosen Test zu rechnen, sodass eine sonographische Beurteilung hier von besonderer Bedeutung bleibt. Im Gegensatz dazu ist bei Schwangerschaften mit T21 keine Abnahme der FF zu erwarten (Ashoor, Syngelaki et al. 2013, Kinnings, Geis et al. 2015). Einige Studien berichten in diesem Fall sogar von einer erhöhten FF (Dar, Curnow et al. 2014, Rava, Srinivasan et al. 2014, Palomaki, Kloza et al. 2015).

### **1.11. Zielsetzung**

In dieser Studie wurde Schwangeren im Rahmen des Ersttrimesterscreenings in der 12 - 14. SSW. im Anschluss an die Ultraschalluntersuchung eine cfDNA-Analyse angeboten. Zusätzlich wurde venöses Blut in Form eines zweiten Serumröhrchens für die Messung potentieller Serummarker abgenommen. Nach Zentrifugation wurde das Plasma zur Lagerung zunächst tiefgefrorenen und anschließend laborchemisch auf verschiedene Parameter untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung potentieller fetaler und maternaler Einflussfaktoren der Fetalen Fraktion, sowohl biochemischer als auch biophysikalischer Art, um eine Prädiktion der fetalen Fraktion im Rahmen der cfDNA-Analyse zu ermöglichen.

Durch die Identifikation von Ursachen für die Unterschreitung der Mindestkonzentration und dem in der Konsequenz ergebnislosen Test könnten diese bereits vor Testdurchführung geprüft werden. Folgen, wie unter anderem der höhere Kostenaufwand und die psychische Belastung für die Patientin im Falle eines Testfehlers würden damit im Vorfeld reduziert oder sogar verhindert werden.

Im Idealfall kann folglich bereits vor Durchführung einer cfDNA-Analyse ein ergebnisloser Test vorhergesagt werden und auf eine günstigere Alternative zurückgegriffen werden.

Um eine genauere Vorhersage zu treffen, bedarf es also einer tiefergründigen Erforschung von Einflussfaktoren auf die FF.

## **2. Material & Methodik**

In dieser Arbeit wurden cfDNA-Analysen an Schwangeren innerhalb einer großen Studie („ReFaPo“), welche sich das Ziel setzte die Falsch-Positiv Rate des Ersttrimester-Screenings zu reduzieren, durchgeführt.

Die ReFaPo-Studie (*engl. Reducing-False-Positives in screening*) befasst sich mit der Erforschung der Falsch-Positiv-Rate beim Ersttrimester-Screening und bei der zellfreien fetalen DNA-Analyse. Im Rahmen dieser Studie untersuchten mehrere Arbeitsgruppen jeweils unterschiedliche Themen.

Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation von Einflussfaktoren auf die fetale Fraktion.

### **2.1. Votum der Ethikkommission**

Mit der Studie wurde nach Einholung des Votums der Ethikkommission der Eberhard Karls Universität Tübingen begonnen. Das Eingangsdatum des Bescheids der ReFaPo-Studie mit der Projektnummer 572/2015BO1 war der 06.10.2015.

### **2.2. Rekrutierung des Studienkollektivs**

Das Patientenkollektiv umfasste 648 Teilnehmerinnen. Rekrutiert wurden Schwangere, die in der Zeit vom Oktober 2015 bis Dezember 2016 zur ETS-Untersuchung in der 12 – 14. SSW an die Universitäts-Frauenklinik in Tübingen überwiesen wurden.

Die Überweisung erfolgte von den lokalen Frauenärzten zur Untersuchung, ohne dass vorab eine entsprechende Voruntersuchung erfolgte und ohne, dass vorab eine Vorauswahl aufgrund einer auffälligen Ultraschall-Untersuchung stattfand. Die Patientinnen wurden, sofern eine Einwilligung zur Studienteilnahme bestand, für die Studie rekrutiert.

### **2.3. Studienablauf**

Zu Beginn wurde bei allen Schwangeren eine eingehende Ultraschall-Untersuchung zur Messung der fetalen NT und zum Ausschluss von fetalen

Fehlbildungen durchgeführt. Zeigten sich Fehlbildungen bzw. eine NT >3,5 mm wurde wie üblich eine invasive Abklärung zur weiteren Diagnostik empfohlen. Diese Patientinnen konnten nicht für die Studie rekrutiert werden.

Im Falle einer unauffälligen Voruntersuchung konnten die Patientinnen für die Studie rekrutiert werden, sofern diese, nach ausführlicher Aufklärung, schriftlich einwilligten. Dann wurden die Teilnehmerinnen in zwei Studienarme randomisiert.

1. Studien-Arm 1 (*keine weitere Berücksichtigung in dieser Arbeit*)

Durchführung des kombinierten ETS durch Berechnung des Trisomie 21 Risikos mittels Bestimmung des freien beta-hCG und PAPP-A. Die beiden Schwangerschaftshormone wurden durch das Labor Enders in Stuttgart bestimmt. Mithilfe des Software-Programms „Viewpoint“ von GE Healthcare, München wurde das Risiko für Trisomie 21 durch den primär beratenden und rekrutierenden Arzt berechnet und das Ergebnis an die Schwangere mitgeteilt. Die Datendokumentation erfolgte im Software-Programm Viewpoint. Dieser Studien-Arm fand in dieser Arbeit keine weitere Berücksichtigung.

2. Studien-Arm 2

cfDNA-Analyse und Berechnung des Trisomie 21-Risikos mittels mütterlichem Altersrisiko und cfDNA. Die cfDNA-Analyse erfolgte durch die Firma Cenata, Tübingen. Das Analyseergebnis und das daraus resultierende Trisomie 21 Risiko wurden an den primär beratenden und rekrutierenden Arzt übermittelt. Die Ergebnismitteilung an die Schwangere erfolgte ebenfalls durch den primär beratenden und rekrutierenden Arzt. Zusätzlich wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine weitere Serum-Monovette abgenommen, zentrifugiert und in den Laborräumen der Universitätsfrauenklinik bei -86°C eingefroren. Die Archivierung der Serumprobe erfolgte pseudonymisiert. Im Falle einer ergebnislosen cfDNA-Analyse konnte hieraus eine Messung des beta-HCGs und PAPP-As erfolgen. Da die Messung der Serummarker nur in der 12. – 14. SSW

validiert ist und der gesamte cfDNA-Analyseprozess bei zunächst erfolgloser primärer Auswertung bis zu 4 Wochen benötigte, musste die Serumprobe bereits vor Durchführung der (potentiell fehlgeschlagenen) cfDNA-Analyse gewonnen werden. Die Probe wurde nach Abschluss der Untersuchung verworfen, es sei denn die Patientin willigte der Archivierung im Rahmen der Biobank des Gesamtklinikums ein.

Anschließend erfolgte eine weitere Untersuchung an den Serumproben. Ermittelt wurden die Konzentrationen folgender Hormone und Proteine im Serum der Schwangeren: beta-hCG, PAPP-A, AFP, NSE, PCT, Prolaktin, Copeptin pro-AVP, MR-proANP und PLGF-plus.

Hierfür wurden die eingefrorenen Serumproben, aus den Laborräumen der Universitätsfrauenklinik Tübingen in das Labor Enders in Stuttgart transportiert.

Ein Teil der Proben befand sich dabei bereits im abpipettierten Zustand und lag als reine Serumprobe vor. Hier erfolgte die Zentrifugation im Anschluss der Blutentnahme. Die übrigen Proben wurden nach dem Auftauen sorgfältig zentrifugiert und abpipettiert.

Im Anschluss wurden alle Proben mittels Vortex gründlich durchmischt und zur weiteren Messung in ein für das Messgerät entsprechendes Reagenzglas umpipettiert. Die Messung erfolgte im Anschluss mittels zwei Geräten des Modells Kryptor Compact PLUS (Brahms Thermo Fisher). Die Analyseergebnisse wurden ausgedruckt und händisch in einer Excel Tabelle eingetragen.

Die Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien

Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schwangerschaft in der 12. – 14. SSW</li> <li>- Wunsch der Patientin nach einer Risikobeurteilung einer Trisomie 21</li> <li>- Sonographisch kein Hinweis für eine fetale Fehlbildung</li> <li>- NT &lt; 3,5 mm</li> <li>- Unterschriebene Einwilligungserklärung</li> </ul>
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fehlendes Einverständnis zur Studienteilnahme</li> <li>- Sonographischer Hinweis für eine fetale Fehlbildung</li> <li>- NT &gt; 3,5 mm</li> </ul>
Abbruchkriterien	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zurückziehen des Einverständnisses durch die Probandin (Freiwilligkeit der Studie)</li> </ul>

#### 2.4. Erfassung und Dokumentation der Daten

Die in der Pränatalmedizin etablierte klinische Datenbank „Viewpoint“ (GE Healthcare) diene zur Dokumentation der im Rahmen der Behandlung erhobenen Daten. Dazu zählen für diese Arbeit:

- Patientenbezogene Daten:
  - o Name, Vorname, Adresse, Geburtsdatum, Frauenarzt, Versicherungsstatus
- Medizinische Anamnese / Demographische Daten:
  - o präexistenter Diabetes Mellitus, Raucherstatus, Ethnische Zugehörigkeit
- Geburtshilfliche Anamnese:
  - o Konzeptionsmodus, Assistierte Reproduktion

- Erster Tag der Letzten Periodenblutung
- Sonographisch erhobene Daten:
  - SSL, BPD
  - Nackentransparenz
  - Herzfrequenz
  - Nasenbein
  - Trikuspidalklappenfluss
  - DV-Fluss
  - Durchblutung der Aa. Uterinae
  - Beurteilung der fetalen Sonoanatomie
- Biophysikalische erhobene Daten
  - Mittlerer arterieller Blutdruck (jeweils zwei Messungen an beiden Armen)
- Labor-Analysen:
  - PAPP-A, beta-HCG, AFP, NSE, PCT, Prolaktin, MR-proANP, Copeptin pro AVP, PIGF-plus im Labor Prof. Enders und Partner, Stuttgart
  - cfDNA-Analyse durch die Firma Cenata, Tübingen

## **2.5. Datenschutz und Datenarchivierung**

Nach Abschluss der Studie wurden die Daten mithilfe von Viewpoint durch die Prüfarzte abgefragt, in eine Microsoft Excel Datei übertragen und für die weitere Auswertung pseudonymisiert. Dadurch blieb die Rückverfolgbarkeit den Prüfarzten vorbehalten. Die ausgelesenen Daten wurden ausschließlich zum Zwecke der beschriebenen wissenschaftlichen Fragestellungen in Excel-Tabellen aufbereitet und ausgewertet und nicht an Dritte weitergegeben. Eine Verschlüsselung verhinderte den Zugang zu den Daten für an der Studie unbeteiligte Personen und sicherte die Wahrung der ärztlichen Schweigepflicht.

Die Datenarchivierung erfolgte in der Viewpoint-Datenbank des Universitätsklinikums Tübingen, das im klinischen Alltag Anwendung findet und nur im Intranet der Frauenklinik geöffnet werden kann. Studienteilnehmerinnen

erhielten einen kleinen Vermerk, ansonsten ändert sich am Datenmanagement nichts. Da es sich (bei den erhobenen Daten) um klinische Daten handelt, gelten die Datenschutzbestimmungen des Universitätsklinikums, also eine Langzeitarchivierung über 30 Jahre mit anschließender Vernichtung. Explizit für die wissenschaftliche Untersuchung gewonnen Daten werden verschlossen aufbewahrt und spätestens 10 Jahre nach Studienabschluss vernichtet.

## **2.6. Statistische Auswertung**

Die erhobenen Daten wurden pseudonymisiert und mit Hilfe des Programmes *Microsoft Office Excel 2017* (Microsoft Corp. Redmond, WA, USA) zusammengefasst. Die statistische Verarbeitung erfolgte durch Anwendung des Programmes *SPSS Statistics 2021* (IBM corp. Armonk, NY, USA).

Der Anteil der Fetalen Fraktion wurde als kontinuierliche Größe in die Analyse eingeschlossen und als abhängige Variable festgelegt.

Alle Werte wurden zunächst statistisch analysiert und auf Stimmigkeit kontrolliert. Nicht plausible Werte und extreme Ausreißer, die z.B. auf Messerfehler zurückzuführen waren, konnten dadurch ausgeschlossen werden.

Mittels Regressionsanalyse wurden Zusammenhänge zwischen der abhängigen Variable und anderen, unabhängigen Parametern aufgezeigt. Die lineare Regression erlaubt einen Zusammenhang mit metrischen, kontinuierlichen Parametern abzuwägen. Um den Einfluss dichotomer, nominaler Variablen auf die unabhängige Variable zu untersuchen, bedient sich diese Studie zusätzlich der logistischen Regressionsanalyse. Hierfür wurde das Kollektiv in 2 Gruppen (Binärsystem) mit einer Gruppe  $FF < 7$  und einer Gruppe  $FF \geq 7$  aufgeteilt.

In der logistischen Regression berücksichtigt werden konnten auch jene Patientinnen, bei denen die cfDNA Analyse wegen einer Fetalen Fraktion  $< 4$  ergebnislos ausfiel, sodass kein absoluter Prozentwert, der für eine lineare Regression notwendig wäre, vorlag.

Ein p-Wert  $\leq 0.05$  wurde als statistisch signifikant eingestuft.

### 2.6.1. Lineare Regression (metrische unabh. Variable):

Zusammenhänge metrischer, kontinuierlicher Variablen werden anhand der linearen Regression analysiert. Die Prädiktion einer abhängigen Variablen, in diesem Fall die „FF“, von einer unabhängigen Variablen wird dadurch analysiert. Zu den metrischen Parametern zählen beispielsweise die in dieser Studie untersuchten Hormonkonzentrationen im mütterlichen Blut. Auch Patientenmerkmale wie u.a. Alter und Gewicht werden hierbei berücksichtigt.

Zunächst wird eine einfache lineare Regression angewandt. Dies erlaubt jeden unabh. Parameter einzeln auf einen Zusammenhang mit der FF zu überprüfen. Anschließend erfolgte die multiple lineare Regression unter Berücksichtigung aller unabhängiger Variablen, für die zuvor in der einfachen linearen Regression ein signifikanter Zusammenhang gefunden werden konnte.

Mittels multipler Regression wird abgewogen, ob die beobachtete Variable durch mehrere unabh. Variable zu erklären ist und welcher der untersuchten unabh. Parameter mehr Einfluss auf diese ausübt hat. Hierdurch wird ermöglicht, die Regressionskoeffizienten der interessierenden Determinanten bezüglich potentieller Störgrößen zu adjustieren.

Für die Betrachtung der linearen Regressionsanalyse werden die unabhängigen Variablen auf die x-Achse und die abhängige Variable auf die y-Achse aufgetragen. Anhand dieses Streudiagramms kann eine Gerade berechnet werden, die die Lage der Punkte „bestmöglichst“ beschreibt. Der Regressionskoeffizient stellt die Steigung der Geraden da und erklärt, ob die Korrelation positiv oder negativ ist. Je geringer die Streuung der Wertepaare von der Geraden, d.h. je näher die Punkte an der Geraden liegen, desto stärker ist der Zusammenhang und die Vorhersagekraft der unabhängigen Variablen zur abhängigen Fetalen Fraktion. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  beschreibt dies, wobei der Wert „0“ keinen linearen Zusammenhang und der Wert „1“ den perfekten linearen Zusammenhang aufzeigt. Dies ermöglicht einen Rückschluss auf die Relevanz der Regression.

Die grafische Darstellung einer Regression kann mittels Streudiagramm erreicht werden (s. Abb. 1).

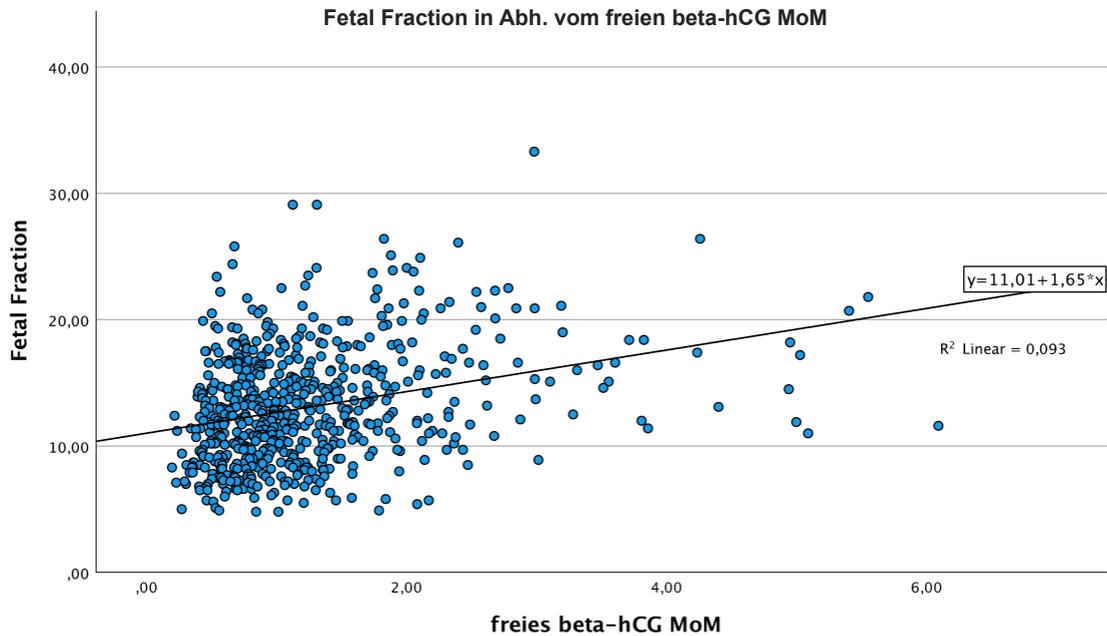


Abb. 1.: Exemplarisch: Fetal Fraction in Abh. vom freien beta-hCG MoM. Die Regressionsgerade hat hier einen Regressionskoeffizienten (= Steigung) von 1.65. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0.093$ .

### 2.6.2. Multiple of Median der Serummarker

Zunächst lagen die Konzentrationen der Serummarker nach Messung im Labor Enders in der jeweiligen „rohen“ Einheit vor. Um Einheitlichkeit zu schaffen und eine Interpretation zu ermöglichen, erfolgte die Konvertierung in den „MoM-Wert“ (*engl. Multiple of median*). Der MoM-Wert ist die Einheit, die einen gemessenen Wert zu einem Durchschnittswert in Beziehung setzt. Hierdurch wurde ermöglicht, den individuellen Hormonspiegel einer Patientin in Abhängigkeit zu potentiellen Einflussfaktoren wie der Schwangerschaftswoche oder dem Körpergewicht zu interpretieren.

Unberücksichtigt davon blieben MoM-Werte des freien beta-hCG und PAPP-a, welche automatisch durch die Software Viewpoint generiert wurden. Die Berechnung wird in den Ergebnissen unter Punkt 3.1.6.1 visualisiert und erläutert.

### 2.6.3. Logistische Regression (nominale Variable)

Um Zusammenhänge eines kategorialen Prädiktors (nominalskalierte abh. Variable) auf den Anteil der fetalen Fraktion aufzuzeigen, bedurfte es einer logistischen Regression. Hierfür wurde das Studienkollektiv zunächst in zwei Gruppen, eine mit  $FF \leq 7$  und eine mit  $FF > 7$  definiert, und das Kollektiv dadurch kategorisiert. Im Anschluss ließen sich nun neben den metrischen Variablen auch dichotome Variablen (0 oder 1) prognostizieren. Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten der Ausprägung 1 (= Merkmal vorhanden) konnte dadurch geschätzt werden.

Als Beispiel ließ sich der Einfluss des Raucherstatus mit nein = 0 und ja = 1 auf die „*fetal fraction*“ abbilden.

Danach wurde äquivalent zur linearen Regression eine multiple logistische Regression aller in der einfach logistischen Regression signifikanten Parameter durchgeführt.

Einen Überblick über alle untersuchten Merkmale gibt Tabelle 8.

Tabelle 8: Übersicht metrischer (= gelb hinterlegt) und kategorialer (= blau hinterlegt) abh. Variablen.

		Unabhängige Variable	Einheit
Metrisch skaliert	Serummarker	freies beta-hCG MoM	MoM
		PAPP-A MoM	
		AFP MoM	
		MRproANP MoM	
		NSE MoM	
		PCT MoM	
		Prolaktin MoM	
		Copeptin proAVP MoM	
		PIGF-plus MoM	
	Patientenmerkmale	Gewicht	kg
		Größe	cm
		BMI	
		Maternales Alter (J.)	Jahre
		Gestationsalter	SSW.
	Biophysikalische Marker	Mittlerer art. Blutdruck (MAP) MoM	MoM
	Sonographische Marker	Ae. Uterinae MoM	MoM
		Scheitel-Steiß-Länge (SSL)	mm
		Nackentransparenz (NT)	mm
		delta-NT	
		Herzfrequenz (HF)	S/min
Biparietaler Diameter		mm	
Ductus Venosus Pulsatility Index für Venen (DV-PIV)			
Kategorial skaliert		Nasenbein	darstellbar (Ja / Nein)
		Triskupidalinsuffizienz	
		DV a-Welle	
	Demographische Merkmale	Raucherstatus	Ja / Nein
		Konzeptionsmodus	Spontan vs. IVF
		Diabetes (als Vorekrankung)	Ja / Nein
		Ethnische Zugehörigkeit	Kaukasisch vs. Nicht-kaukasisch
		Zeitpunkt der Blutabnahme / Untersuchung	Vormittags vs. Nachmittags (cut-off 12:00 Uhr)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Deskriptive Statistik

##### 3.1.1. Demographie

Anhand der unter Punkt 2.1. definierten Einschlusskriterien konnten insgesamt 648 ( $n = 648$ ) Schwangere, die sich einer cfDNA-Analyse unterzogen, in die Studie aufgenommen werden. Das Alter der Patientinnen lag gemittelt bei 33,9 Jahren ( $SD = 4,2$  Jahre). Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Untersuchung 20 Jahre, die älteste Patientin 48 Jahre alt. Die Probandin im jüngsten Gestationsalter befand sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in der 11,29 SSW (= 11+2 SSW), die Probandin mit dem größten Schwangerschaftsfortschritt wurde in der 14,0 SSW (= 14+0 SSW) vorstellig. Gemittelt wurden die Teilnehmerinnen in der 12,77 SSW (= 12+5 SSW) vorstellig ( $SD = 0,51$  SSW).

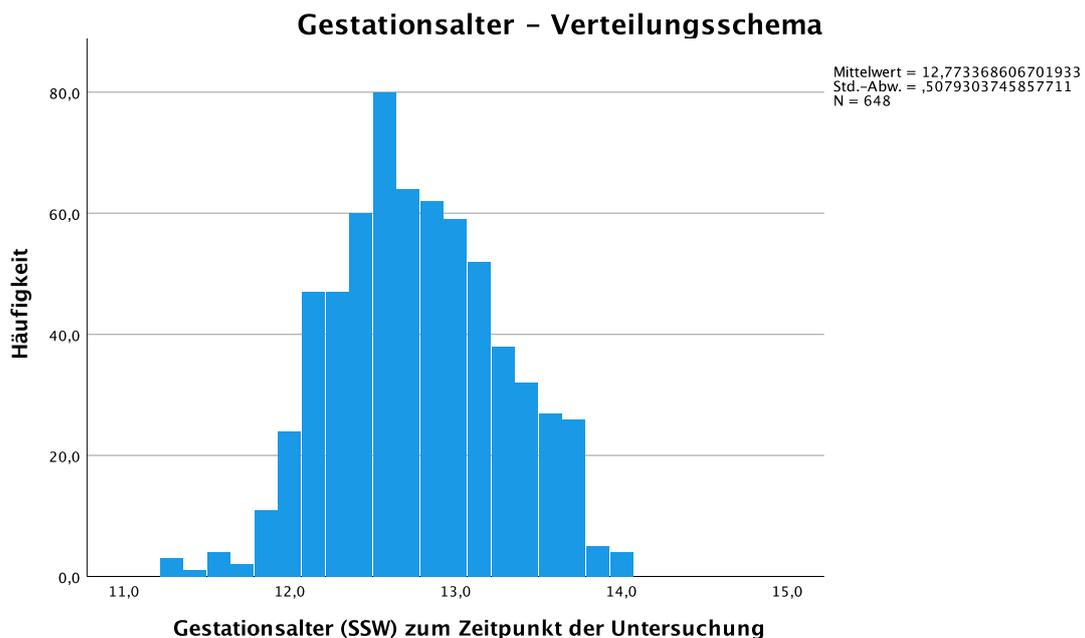


Abbildung 8: Verteilung des Gestationsalters zum Zeitpunkt der Untersuchung

Durchschnittlich wogen die Patientinnen 67,84 kg (SD = 13,28 kg). Das Gewicht der schwersten Patientin betrug 132 kg, das niedrigste Patientengewicht belief sich auf 42,5 kg. Die Durchschnittsgröße lag bei 166,9 cm (SD = 6.2 cm), dabei war die größte Patientin 189 cm und die kleine Patientin 135 cm groß.

Der gemittelte BMI lag bei 24.3 (SD = 4.4) (s. Abb. 9).

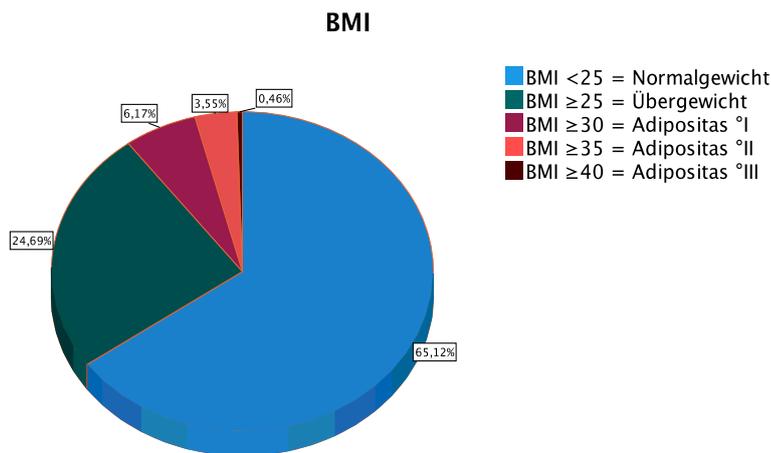


Abbildung 9: BMI Verteilungsschema

2,9 % der Probandinnen (n= 19) gaben an zu rauchen. Zu den Nichtrauchern zählten 97,1 % (n= 629) der Teilnehmerinnen (s. Abb. 9).

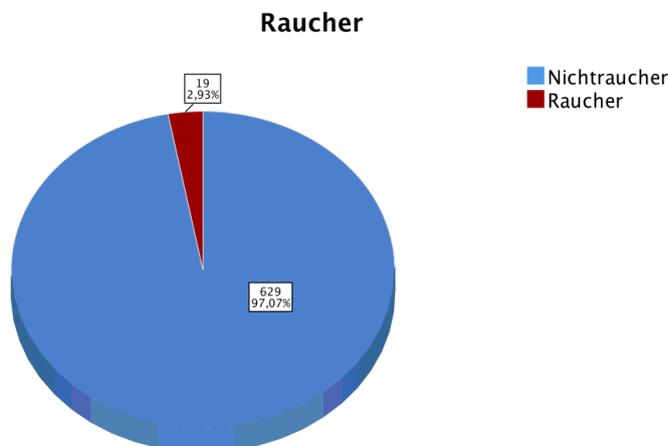


Abbildung 10: Raucher Verteilungsschema

Bei 93,8 % erfolgte die Konzeption spontan (n= 608). 6,2 % der Teilnehmerinnen gaben eine Befruchtung durch In-vitro Fertilisation (IVF) an (n= 40).

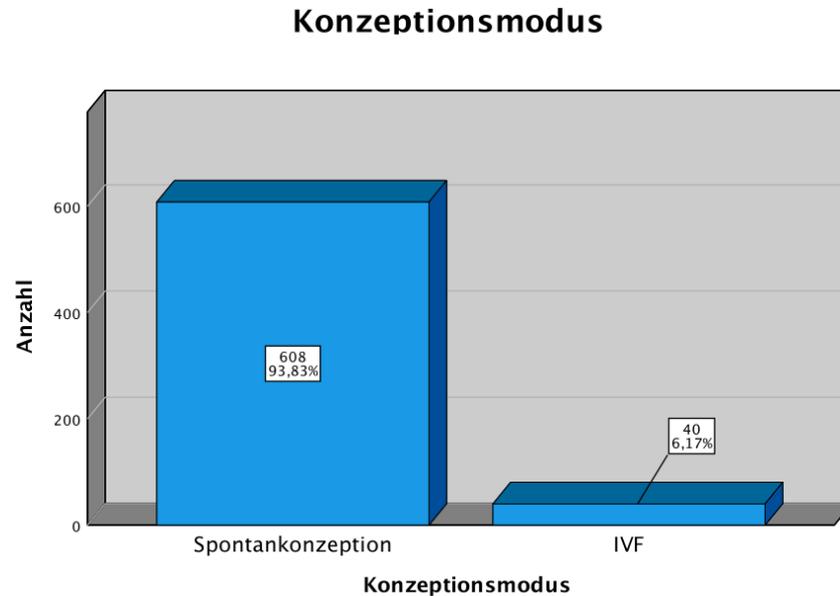


Abbildung 11: Konzeptionsmodus

Den Großteil der Gruppe bildeten mit 97,8 % Teilnehmerinnen mit weißer Hautfarbe (n= 634). Andere Ethnizitäten waren nur in geringer Zahl vertreten (s. Tab. 9).

Tabelle 9: Ethnische Zugehörigkeit der Studienteilnehmerinnen

Ethnizität	Anzahl	(%)
Ostasiatisch	8	1,2 %
Schwarz	5	0,8 %
Südasiatisch	1	0,2 %
Weiß/ Kaukasisch	634	97,8 %

### 3.1.2. Fetal Fraction

Insgesamt 648 Probandinnen unterzogen sich einer cfDNA Analyse mit Berechnung der „fetal fraction“. Bei 10 Patientinnen wurde die zur Analyse notwendige Mindestkonzentration von mindestens 4 % unterschritten, sodass ein

ergebnisloser Test vorlag. Da hier kein absoluter Wert, sondern ein ganzer Bereich „< 4%“ vorlag, wurden diese Patientinnen in der statistischen Analyse gesondert einbezogen und allein in der logistischen Regression berücksichtigt (s. Tab. 10).

Tabelle 10: Häufigkeit der Fetalen Fraktion. Bei 10 Patientinnen lag ein ergebnisloser Test vor ( $ff < 4$ ).

fetal fraction	%	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
gültig	$\geq 4$	638	4,800	33,300	13,053	4,490
ergebnislos	$< 4$	10				
Gesamt		648				

Die vermeintliche, angedeutete „Rechtsschiefe“ der in Wahrheit normalverteilten Population visualisiert diesen Aspekt (s. Abbildung 12).

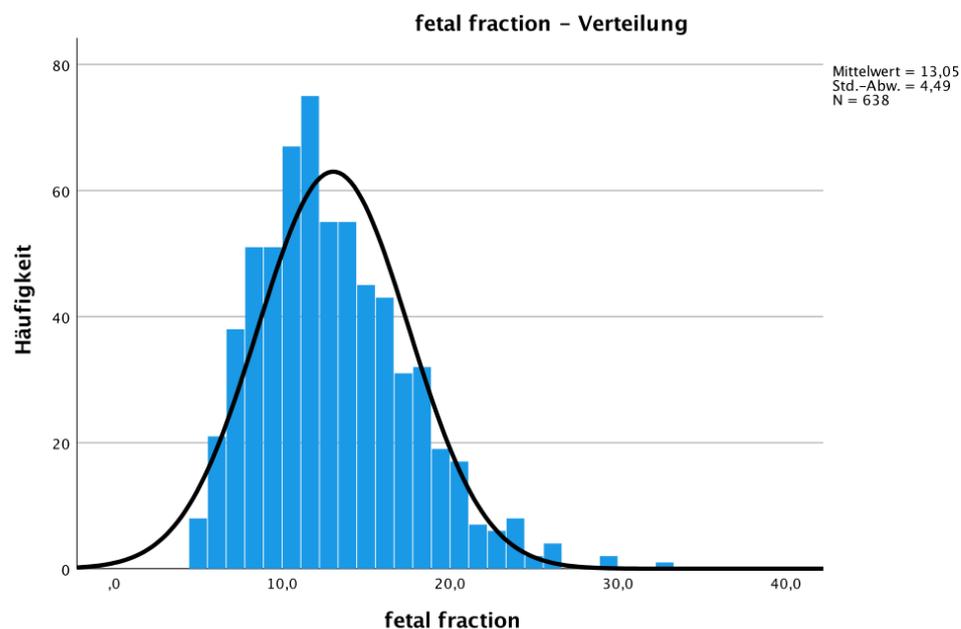


Abbildung 12: Vermeintlich „rechtsschiefe“ Verteilung FF. Der ergebnislose Test bei 10 Probandinnen ( $< 4$ ) und der dadurch fehlende absolute Wert unter 4% führt zu dieser Annahme, da diese Werte in der statistischen Darstellung nicht zur Geltung kommen. Es muss folglich von einer Normalverteilung ausgegangen werden.

Gemittelt lag die FF bei den Schwangeren mit gültiger cfDNA-Analyse bei 13,1 %. Das Minimum belief sich auf 4,8 %, der Maximalwert lag bei 33,3 % (SD 4,49).

### 3.1.3. Zeitpunkt der Untersuchung

Um zu ermitteln, ob der Zeitpunkt der Blutentnahme Einfluss auf die fetale Fraktion nimmt, wurde das Studienkollektiv in zwei Gruppen aufgeteilt. Bei 71,9 % der Probandinnen erfolgte die Blutentnahme vor 12:00 Uhr (= vormittags, n= 466), während bei 28,1 % der Patientinnen die Blutentnahme nach 12:00 Uhr erfolgte (=nachmittags, n= 182). Abbildung 13 visualisiert die Verteilung im Studienkollektiv.

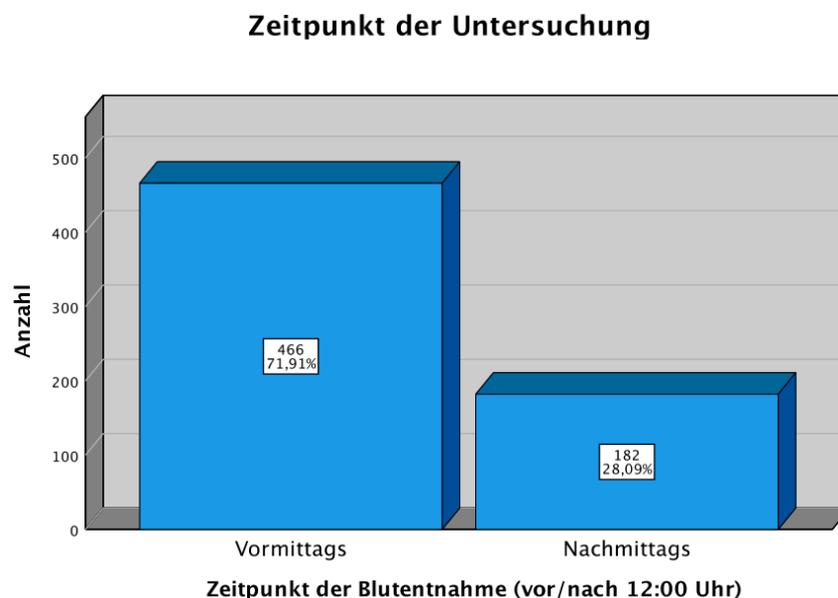


Abbildung 13: Zeitpunkt der Untersuchung. Bei ca. zwei Drittel der Probandinnen erfolgte die Untersuchung vormittags, bei einem Drittel nachmittags.

### 3.1.4. Blutdruckanalyse - Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurde der Blutdruck der Probandinnen erfasst und der Mittlere arterielle Blutdruck mittels folgender Formel ermittelt:

$$MAP = \frac{\text{Diastolischer Druck}}{0,5 \times (\text{Systolischer Druck} - \text{Diastolischer Druck})}$$

Anschließend erfolgte die automatische Konvertierung in MoM-Werte mittels Viewpoint. Nach Durchführen der Plausibilitätsanalyse wurden sechs

Blutdruckwerte ausgeschlossen, wodurch 642 Werte in der Analyse berücksichtigt wurden.

Die deskriptiven Häufigkeiten der MAP-MoM Werte können Tab. 11 entnommen werden.

*Tabelle 11: MAP MoM - Häufigkeiten*

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
MAP MoM	642	0,800	1,521	1,070	0,100

### 3.1.5. Sonographische Marker

#### 3.1.5.1. Aa. Uterinae MoM

Die dopplersonographische Betrachtung des Pulsatility Index (PI) beider Aa. Uterinae und automatisierte Umwandlung in MoM-Werte durch das Programm Viewpoint ergab einen gemittelten Uterina MoM Wert von 0,962. Der niedrigste Wert lag bei 0,097, der höchste Wert belief sich auf 1.521.

*Tabelle 12: Aa. Uterinae MoM - Häufigkeiten*

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
Aa. Uterinae MoM	648	0,097	2,586	0,962	0,300

#### 3.1.5.2. fetale Marker

Die durchschnittlich gemessene Scheitel-Steiß-Länge (SSL) betrug 67,71 mm (SD = 7,22 mm). Die kleinste Messung lag bei 46,70 mm, die längste Messung lag bei 84,00 mm.

Der gemittelte Biparietale Durchmesser (BPD) im Kollektiv betrug 22,73 mm (SD= 2,39 mm), wobei die kleinste Messung einen Wert bei 13,90 mm und die größte Messung bei 30,00 mm aufzeigte.

Mit durchschnittlich 158,04 Schlägen/min (SD = 6,27 S/min) wurde die fetale Herzfrequenz (HF) gemessen. Die geringste HF war bei 138 S/min, die höchste HF bei 175 S/min messbar.

Die Nackentransparenz (NT) zeigte einen gemittelten Wert von 1,86 mm (SD = 0,36 mm), wobei die kleinste Messung 0,94 mm und die größte Messung 3,50 mm betrug.

Der delta-Wert der NT (mm), welcher auf den Unterschied der fetalen NT Messung vom erwarteten normalen Medianwert der SSL beruht, lag gemittelt bei 0,07 mm (SD = 0,37 mm). Die kleinste Messung betrug - 0,89 mm, die größte Messung lag bei 1,99 mm.

Der Ductus Venosus Pulsatility Index für Venen (DV PIV) belief sich durchschnittlich auf 1,04 (SD = 0,24). Der kleinste Wert betrug 0,38, der größte Wert betrug 2,29.

Eine Übersicht über die metrisch skalierten fetalen Marker liefert Tabelle 13.

*Tabelle 13: fetale Marker der Sonographie – Häufigkeiten (metrisch skaliert)*

	Einheit	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
Scheitel-Steiß-Länge (SSL)	mm	648	46,70	84,00	67,71	7,22
Biparietaler Durchmesser (BPD)	mm		13,90	30,00	22,73	2,39
Fetale Herzfrequenz (HF)	S/min		138	175	158,04	6,27
Nackentransparenz (NT)	mm		0,94	3,50	1,86	0,36
delta-NT	mm		-0,89	1,99	0,07	0,37
Ductus Venosus Pulsatility Index für Venen (DV-PIV)			0,38	2,29	1,04	0,24

Das Nasenbein (NB) ließ sich sonographisch bei 99,4% (n = 644) Probandinnen darstellen. Bei 0,6% (n = 4) Untersuchungen konnte kein Nasenbein dargestellt werden.

Bei 99,5% (n = 645) Teilnehmerinnen bestand kein Anhalt für eine Trikuspidalinsuffizienz (TI), während bei 0,5% (n = 3) der Teilnehmerinnen eine TI im Ultraschall festgestellt werden konnte.

Die Ductus Venosus a-Welle zeigte in 97,8% (n = 634) Patientinnen einen positiven Fluss. Bei 2,2% (n = 14) der Probandinnen ließ sich ein *reverse flow* darstellen.

Eine Übersicht der kategorial skalierten fetalen Marker liefert Tabelle 14.

*Tabelle 14: Übersicht (kategorial-skaliertes) fetaler Marker - Häufigkeiten*

	Ergebnis	n	%
Nasenbein	darstellbar	644	99,4%
	nicht darstellbar	4	0,6%
Trikuspidalinsuffizienz	nein	645	99,5%
	ja	3	0,5%
DV a-Welle	positiv	634	97,8%
	reverse flow	14	2,2%

### 3.1.6. Serummarker

Zunächst erfolgte die statistische Analyse zur Identifikation von Ausreißern und Plausibilitätskontrolle für alle erhobenen Werte. Anschließend erfolgte eine Konvertierung der Daten in MoM Werte.

#### 3.1.6.1. Berechnung des Multiple of Median der Serummarker

Nach Messung der Konzentration der Serummarker im Labor Enders lagen die Ergebnisse zunächst in der jeweiligen „rohen“ Einheit vor. Um Einheitlichkeit zu schaffen und eine Interpretation zu ermöglichen erfolgte die Konvertierung in den

„MoM-Wert“ (*engl. Multiple of median*). Ausgenommen hiervon waren die MoM-Werte des freien beta-hCG und PAPP-a, welche automatisch durch die Software Viewpoint generiert wurden.

Der MoM-Wert ist die Einheit, die einen gemessenen Wert zu einem Durchschnittswert in Beziehung setzt.

Beispielsweise ist es sinnfrei den individuellen Wert des AFP einer Frau in der 12. SSW mit einer Frau in der 14. SSW zu vergleichen, da die Durchschnittskonzentration des Hormons mit steigendem Gestationsalter zunimmt. Auch nimmt die Konzentration des AFP mit zunehmendem Gewicht ab (s. Abb. 2, Abb. 3 und Tab. 2 – *exemplarisch anhand eigener Daten aus dem Studienkollektiv*).

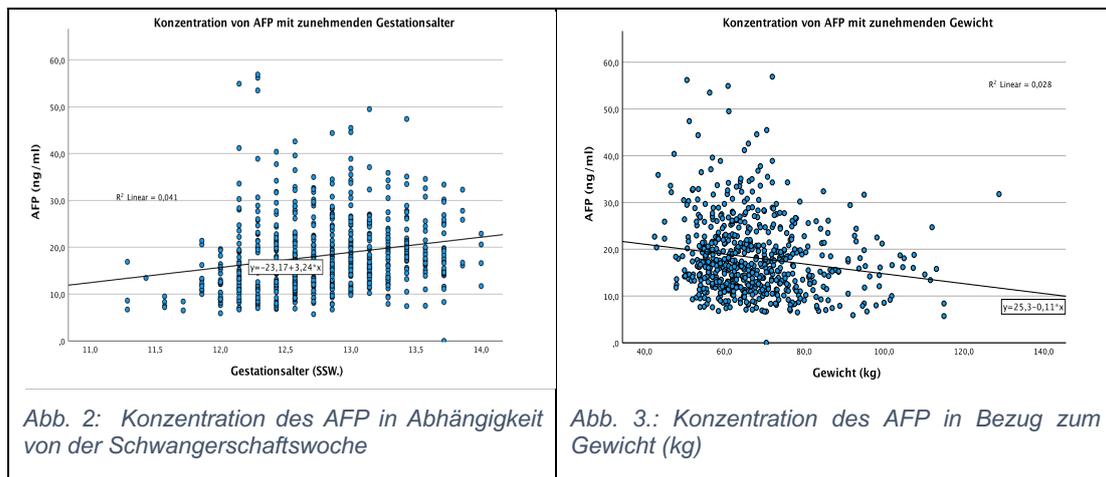


Tabelle 2: Signifikanter Zusammenhang zwischen steigendem Gestationsalter und ansteigender AFP-Konzentration ( $p < 0.05$ ) und zwischen steigendem Gewicht der Frau und abnehmender AFP Konzentration ( $p < 0.05$ )

	Regressions- koeffizient	Std.- Fehler	T	p	95% KI Untergrenze	95% KI Obergrenze
(Konstante)	-18,225	7,910	-2,304	0,022	-33,758	-2,692
Gestationsalter	3,465	0,615	5,630	<0,001	2,256	4,673
Gewicht	-0,116	0,024	-4,763	<0,001	-0,164	-0,068
<i>Abh. Variable: AFP (ng/ml)</i>						

Folglich sollte der individuelle AFP-Wert einer Patientin in der 12. SSW nur in Bezug zum AFP-Referenzwert in der 12. SSW betrachtet werden. Ebenso sollte der Einfluss des Patientengewichts berücksichtigt werden.

Mittels linearer Regressionsanalyse wird der „vorhergesagte Wert“ berechnet. Der MoM-Wert entsteht aus dem Quotienten der Konzentrationen in der jeweiligen Einheit und dem Prädiktionswert.  $MoM - Wert = \frac{Rohwert}{vorhergesagter Wert}$

Exemplarisch also:  $AFP - MoM = \frac{AFP \left(\frac{ng}{ml}\right)}{\text{vorhergesagter Wert von AFP in Bezug auf Gestationsalter und Gewicht}}$

Die MoM-Werte haben nun den Mittelwert 1. Je stärker die Abweichung hiervon, desto ausgeprägter die Abweichung vom Idealwert (s. Abb. 4, Abb. 5 und Tab. 3)

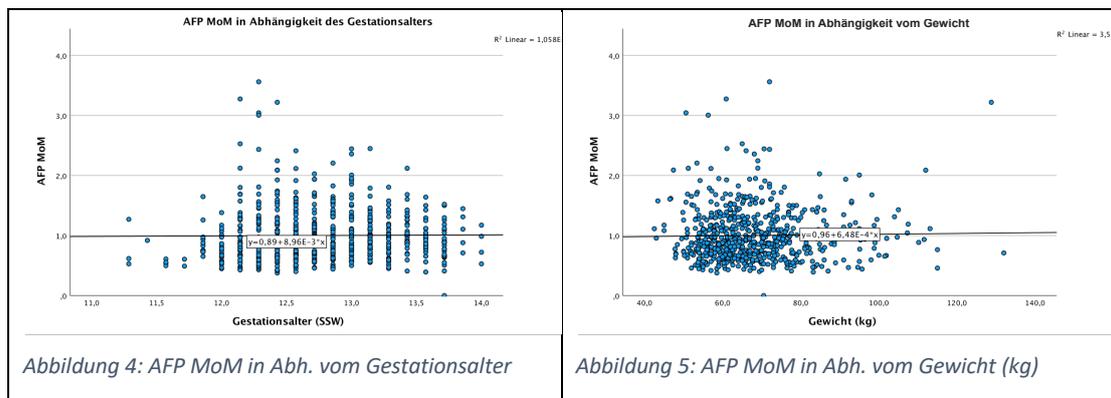


Tabelle 3: Häufigkeiten, Mittelwert und Median für AFP MoM

	Anzahl	Mittelwert	Median
AFP MoM	648	1,00	0,90

Da sowohl das Gestationsalter und das Gewicht der Patientin bekanntermaßen Einflussfaktoren für die Hormonkonzentration darstellen, erfolgte zunächst für die Ermittlung der MoM-Werte eine lineare Regressionsanalyse aller weiteren Serummarker in Abhängigkeit dieser Parameter. Signifikante Korrelationen

fanden sich neben AFP auch bei der Konzentration von Prolaktin und Copeptin proAVP.

Die Prolaktin-Konz. korrelierte positiv signifikant mit steigendem Gestationsalter. Ein signifikanter Zusammenhang mit dem Gewicht bestand nicht (s. Tab. 4, Tab 5 & Abb. 6).

Tabelle 4: Mit steigendem Gestationsalter (= GA) steigt auch die Konzentration von Prolaktin ( $p < 0.05$ )

	Regressions- koeffizient	Std.- Fehler	T	p	95% KI Untergrenze	95% KI Obergrenze
(Konstante)	-18,225	7,910	-2,304	0,022	-33,758	-2,692
Gestationsalter	3,465	0,615	5,630	<0,001	2,256	4,673

Abh. Variable: Prolaktin ( $\mu\text{g/l}$ )

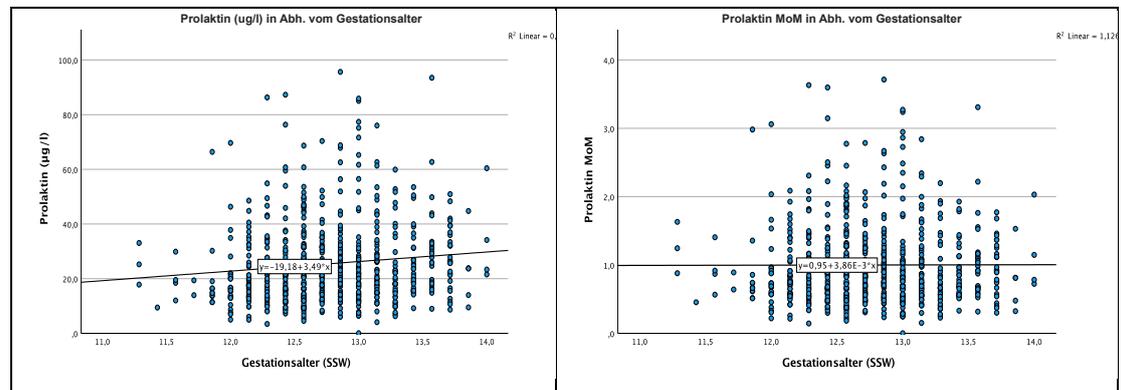


Abb. 6: Links: Prolaktin ( $\mu\text{g/l}$ ) in Abh. vom Gestationsalter mit einem Regressionskoeffizient von 3.495 ( $p = 0.003$ ) Rechts: Prolaktin MoM in Abh. vom Gestationsalter. Der Regressionskoeffizient ist hier nahe „0“.

Tabelle 5: Prolaktin MoM. Darstellung von Anzahl, Mittelwert und Median

	Anzahl	Mittelwert	Median
Prolaktin MoM	648	1,00	0,87

Die Copeptin proAVP-Konz. korrelierte positiv signifikant mit zunehmendem Gewicht. Ein signifikanter Zusammenhang mit dem Gestationsalter bestand nicht (s. Tab. 6, Tab. 7 und Abb. 7).

Tabelle 6: Mit steigendem Gewicht steigt auch das Copeptin ( $p = 0.002$ ). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter und Copeptin zeigt sich nicht.

	Regressions- koeffizient	Std.- Fehler	T	p	95% KI Untergrenze	95% KI Obergrenze
(Konstante)	0,702	1,113	0,630	0,529	-1,485	2,888
Gestationsalter	0,104	0,087	1,205	0,229	-0,066	0,275
Gewicht	0,010	0,003	3,038	0,002	0,004	0,017

Abh. Variable: Copeptin pro-AVP (pmol/L)

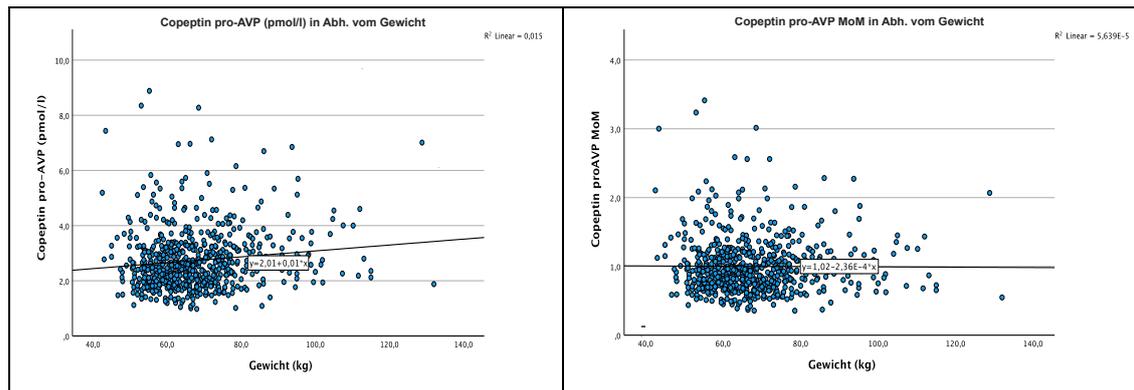


Abbildung 7: Links: Copeptin pro-AVP (pmol/l) in Abh. vom Gewicht mit einem Regressionskoeffizienten von 0,01 ( $p = 0.002$ ). Rechts: Copeptin pro-AVP MoM in Abh. vom Gewicht. Der Regressionskoeffizient entspricht hier „0“.

Tabelle 7: Copeptin pro-AVP MoM: Darstellung von Anzahl, Mittelwert und Median

	Anzahl	Mittelwert	Median
Copeptin MoM	648	1,00	0,92

Für die weiteren Serummarker (NSE, MRproANP, PIGF-plus und PCT) ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge zeigen. Dennoch erfolgte die Transformation in MoM Werte entsprechend der oben gezeigten Vorgehensweise, um die Übersicht der statistischen Auswertung zu optimieren.

### 3.1.6.2. freies beta-hCG MoM

Nach Ausschluss eines extremen Ausreißers ( $\beta$ -hCG MoM = 25,200), wurden 647 von 648 Patientinnen in der Analyse berücksichtigt.

Der Mittelwert betrug 1,231 (SD = 0,830), der Median 0,994 MoM, das Minimum 0,196 MoM und das Maximum 6,090 MoM.

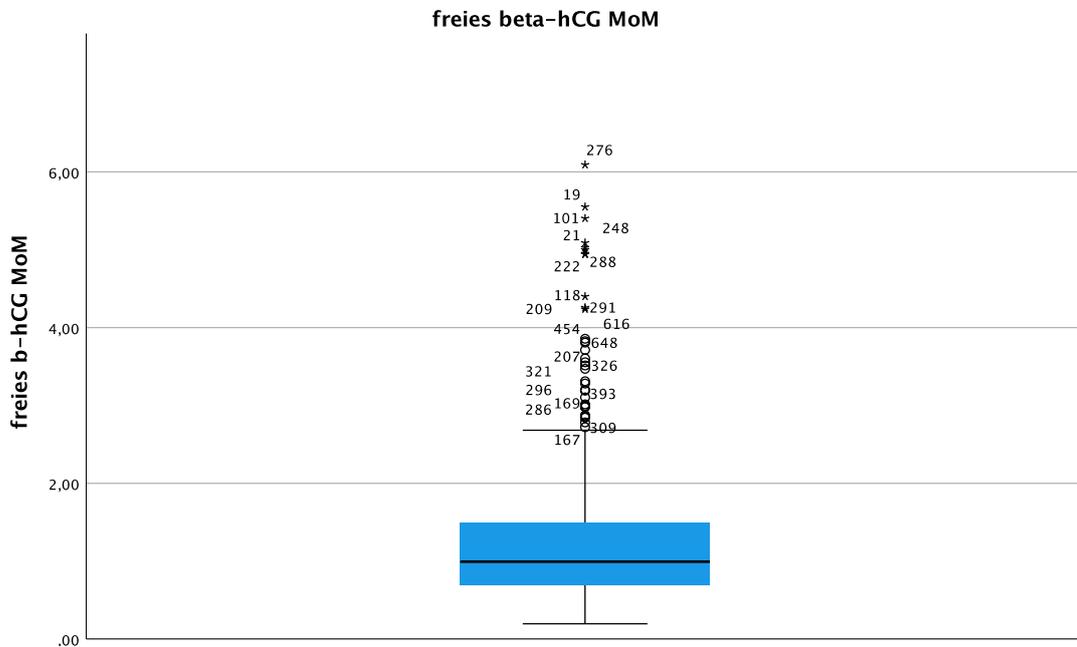


Abbildung 14: Boxplot – Verteilung des freien beta-hCG MoM

### 3.1.6.3. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) – MoM

Für 645 Teilnehmerinnen lagen plausible Daten des PAPP-A MoM vor. Ein extremer Ausreißer (PAPP-A MoM: 8,049) und zwei Messfehler gingen nicht in die Analyse ein.

Gemittelt lagen die Werte bei 1,303 MoM (SD = 0,642 MoM). Der Median befand sich bei 1,196 MoM, der geringste Wert betrug 0,006 MoM und der höchste Wert betrug 5,603 MoM.

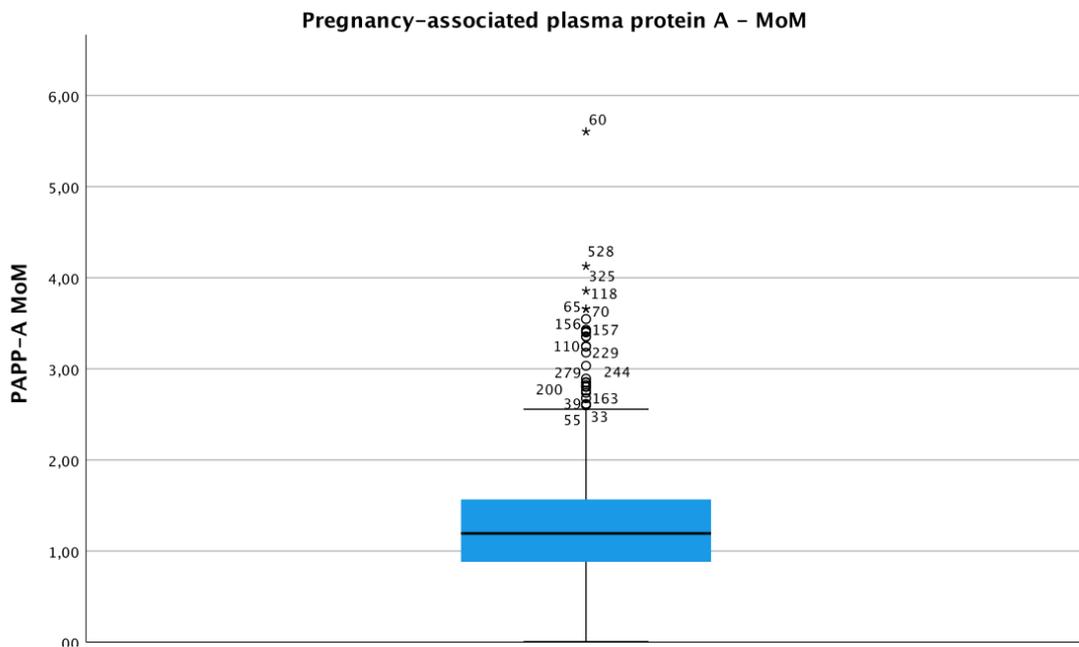


Abbildung 15: Boxplot – Verteilung des Pregnancy-associated plasma protein A - MoM

#### 3.1.6.4. Alpha-fetoprotein (AFP) – MoM

Bei 14 Teilnehmerinnen schlug die laborchemische Messung des AFP fehl, sodass 633 Probandinnen in die Analyse eingeschlossen werden konnten. Der Mittelwert belief sich auf 1,002 MoM (SD = 0,441 MoM), der Median betrug 0,898 MoM. Der geringste Wert lag bei 0,380 MoM und die höchste Messung zeigte 3,56 MoM (s. Abb. 15).

#### 3.1.6.5. Midregional pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) – MoM

638 Messungen des MR-proANP konnten für die Analyse berücksichtigt werden. 10 Messungen schlugen fehl. Gemittelt lag das MR-proANP bei 1,000 MoM (SD = 0,336 MoM). Der Median betrug 0,995 MoM, der Minimalwert 0,240 MoM und der Maximalwert 2,310 MoM. (s. Abb. 15).

### 3.1.6.6. Neuronenspezifische Enolase (NSE) – MoM

Messfehler traten bei 14 Proben auf, sodass 634 Werte in die Analyse gingen. Der Mittelwert betrug 1,000 MoM (SD = 0,349 MoM) und der Median lag bei 0,937 MoM. Die geringste Messung belief sich auf 0,46 MoM und die höchste Messung auf 3,62 MoM. (s. Abb. 15).

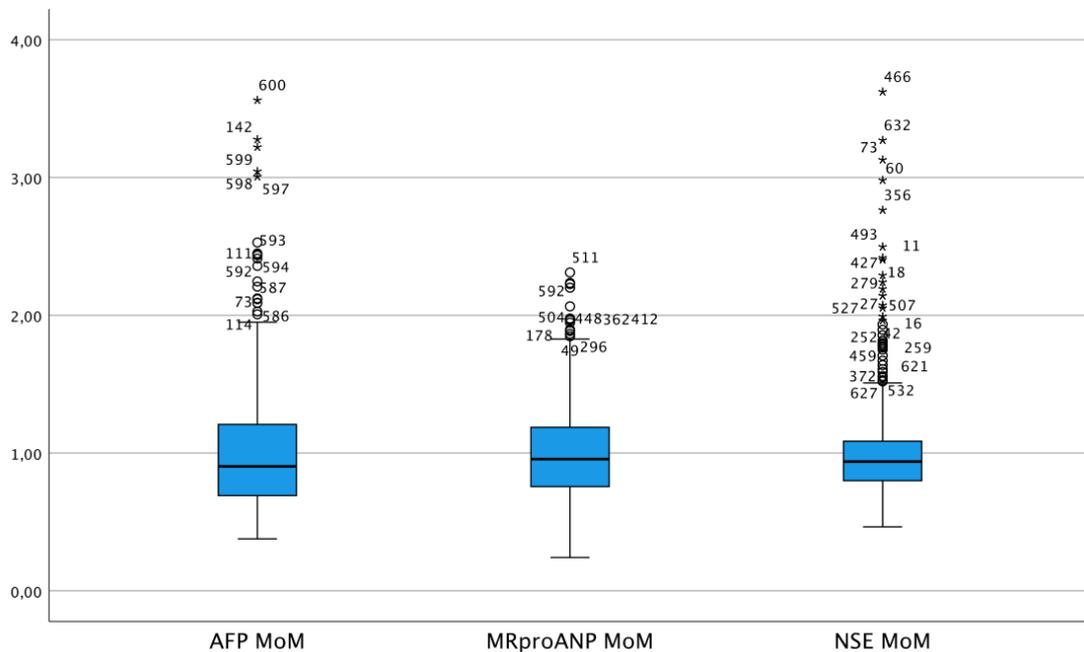


Abbildung 15: Boxplot – Verteilung von AFP MoM, MR-proANP MoM und NSE MoM.

### 3.1.6.7. Procalcitonin (PCT) – MoM

11 Proben konnten aufgrund eines Messfehlers nicht ausgewertet werden, sodass 637 Ergebnisse berücksichtigt wurden. Der Mittelwert lag bei 1,000 MoM (SD = 0,189 MoM), der Median betrug 1,049 MoM. Das Minimum lag bei 0,400 MoM und das Maximum bei 1,920 MoM (s. Abb. 16).

### 3.1.6.8. Prolaktin – MoM

634 Messungen konnten in der Analyse berücksichtigt werden, nachdem es bei 14 Proben zu Messfehlern kam.

Gemittelt lagen die Werte bei 1,001 MoM (SD= 0,584 MoM). Die geringste Messung belief sich auf 0,14 MoM und die höchste Messung betrug 3,71 MoM. Der Median lag bei 0,870 MoM (s. Abb. 16).

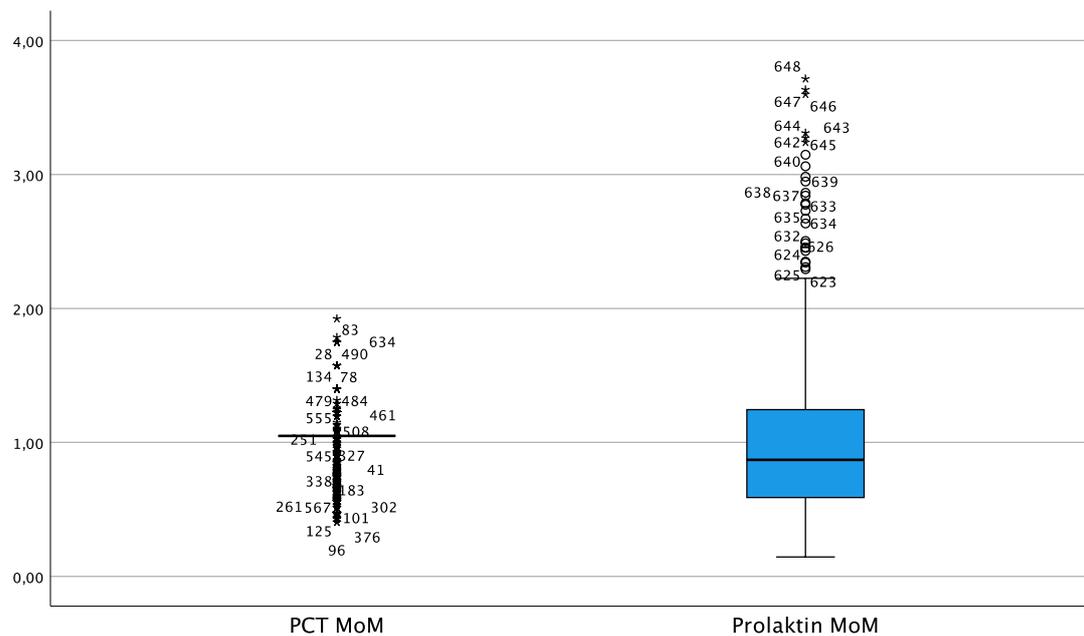


Abbildung 16: Boxplot – Verteilung von Procalcitonin (PCT) MoM und Prolaktin MoM

### 3.1.6.9. Copeptin (CT-proAVP) – MoM

15 Messfehler traten auf. 633 Ergebnisse konnten in die Analyse einbezogen werden. Der Mittelwert betrug 1,000 MoM (SD = 0,404 MoM), der Median lag bei 0,935 MoM. Die geringste Messung belief sich auf 0,360 MoM, die höchste Messung auf 3,410 MoM (s. Abb. 17).

### 3.1.6.10. Placental Growth Factor (PIGF-plus) - MoM

In 11 Fällen traten Messfehler auf, sodass 637 Ergebnisse in die Analyse eingingen. Gemittelt lagen die Werte bei 1,028 MoM (SD = 0,405 MoM), der Median betrug 0,973 MoM. Die geringste Messung zeigte einen Wert von 0,295 MoM, die höchste Messung lag bei 3,404 MoM (s. Abb. 17).

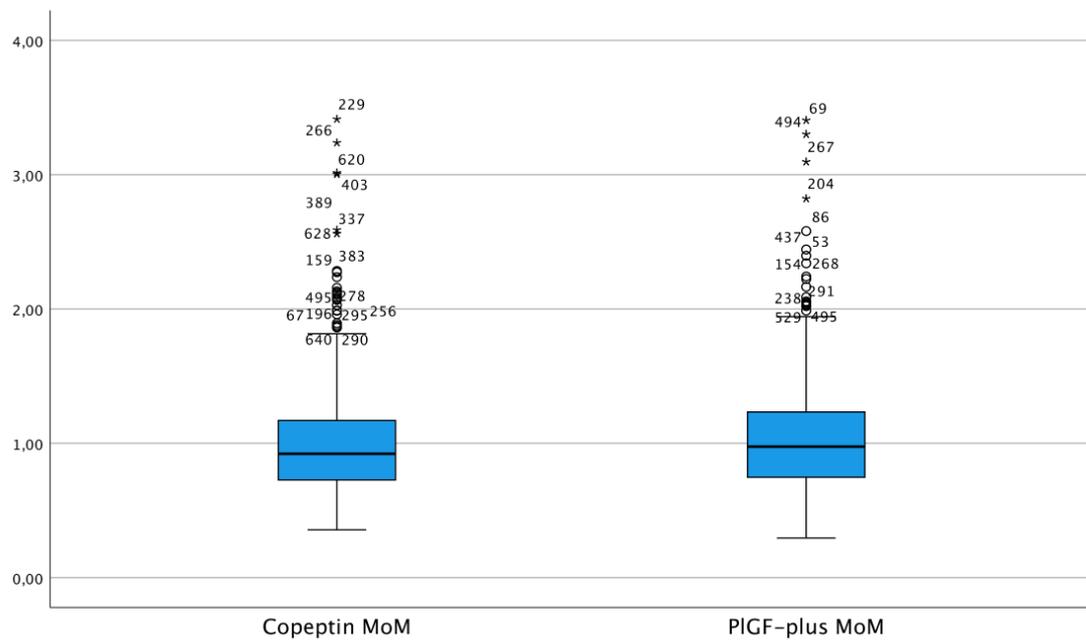


Abbildung 17: Boxplot – Verteilung von Copeptin MoM und PIGF-plus MoM

Einer Übersicht über die Häufigkeiten und Verteilung der Serummarker bietet Tabelle 15.

Tabelle 15: Häufigkeiten der Serummarker

Serummarker (MoM)	n	Messfehler / extremer Ausreißer	Min.	Max.	Median	Mittelwert	SD
Freies beta-hCG	647	1	0,196	6,090	0,994	1,231	0,830
PAPP-A	645	3	0,006	5,603	1,193	1,304	0,642
AFP	633	15	0,380	3,560	0,898	1,002	0,441
MR-proANP	638	10	0,240	2,310	0,955	1,000	0,336
NSE	634	14	0,460	3,620	0,937	1,000	0,350
PCT	637	11	0,400	1,920	1,049	1,000	0,189
Prolaktin	634	14	0,140	3,710	0,868	1,001	0,584
Copeptin	633	15	0,360	3,410	0,923	1,000	0,404
PIGF-plus	637	11	0,295	3,404	0,973	1,028	0,405

### 3.2. Univariable lineare Regression

Nachfolgend werden die Ergebnisse der einfachen linearen Regressionsanalyse dargestellt. Die *fetal fraction* (%) entspricht der Y-Achse und stellt die kontinuierliche abh. Variable dar, während der X-Achse jeweils die einzelnen zu untersuchenden Parameter und potentiellen Einflussfaktoren zugeordnet werden. In der linearen Regressionsanalyse wurde Bezug auf die *fetal fraction* von insgesamt  $n = 638$  Patientinnen genommen. Dies betraf alle Patientinnen bei denen die  $FF \geq 4$  war, also ein metrisch-skaliertes Wert vorlag. Bei  $n = 10$  Patientinnen lag eine ergebnislose cfDNA-Analyse vor ( $FF < 4$ ), sodass eine Inklusion in die lineare Regression nicht möglich war. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die Gesamtpopulation ( $n = 648$ ) in die logistische Regression (s. Kapitel 3.4) einbezogen wurde.

Die Ergebnisse der statistischen Analyse werden mit dem Signifikanzwert (= p-Wert) und dem Regressionskoeffizienten dargestellt. Je näher die Lage der Wertepaare zur Regressionsgeraden, desto geringer die Streuung und stärker der Zusammenhang der potenziellen Determinanten zur Fetalen Fraktion.

Beschrieben wird dies durch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  (Relevanz), bei welchem ein Wert von „0“ für keinen linearen Zusammenhang, und ein Wert von „1“ für einen perfekten linearen Zusammenhang stehen.

Die Ergebnisse sind in tabellarischer Zusammenfassung am Ende des Kapitels zu finden.

### 3.2.1. Serummarker

#### 3.2.1.1. freies beta-hCG MoM

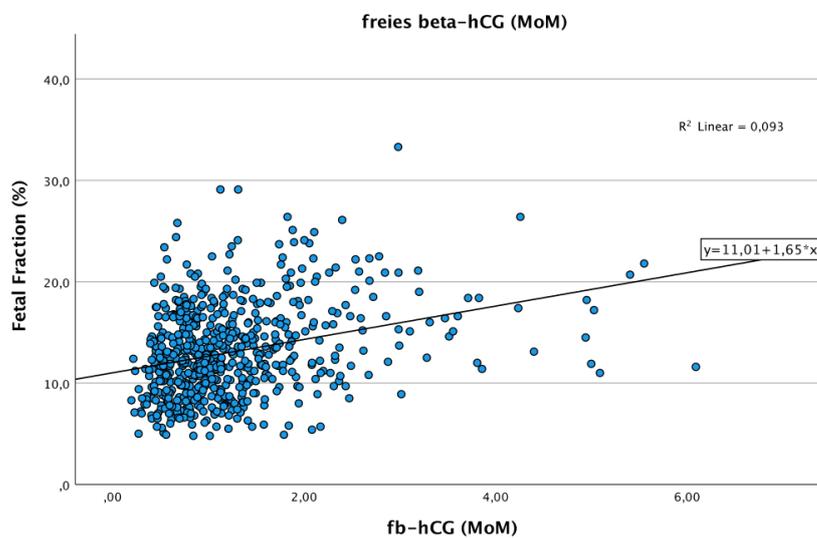


Abbildung 18: Fetal Fraction (%) in Abhängigkeit vom freien beta-hCG (MoM)

Die Regressionsanalyse des freien beta-hCG MoM ergab eine positive Korrelation mit zunehmender *fetal fraction*. Das Ergebnis war signifikant mit einem p-Wert von  $< 0,001$ . Der Regressionskoeffizient lag bei 1.646.

### 3.2.1.2. PAPP-A MoM

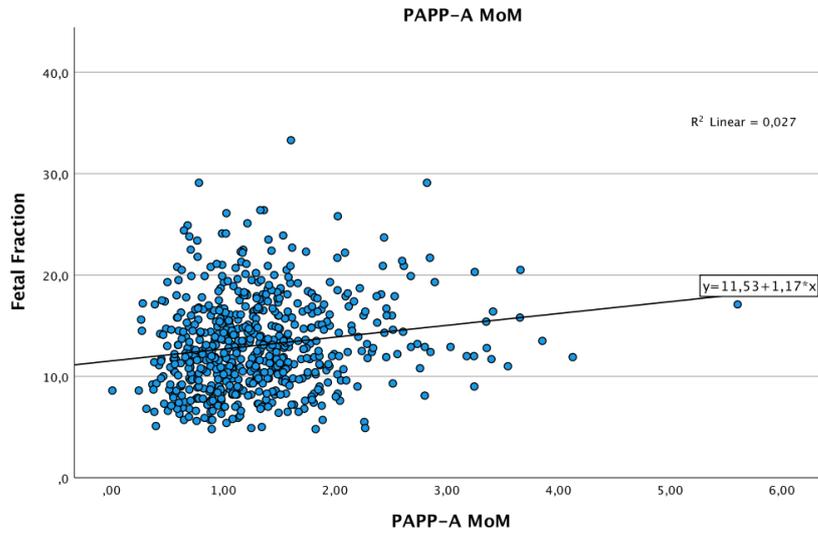


Abbildung 19: Fetal Fraction (%) in Abh. vom PAPP-A (MoM)

PAPP-A korrelierte positiv mit zunehmender *fetal fraction*. Das Ergebnis war signifikant ( $p < 0.001$ ). Der Regressionskoeffizient lag bei 1,168.

### 3.2.1.3. AFP MoM

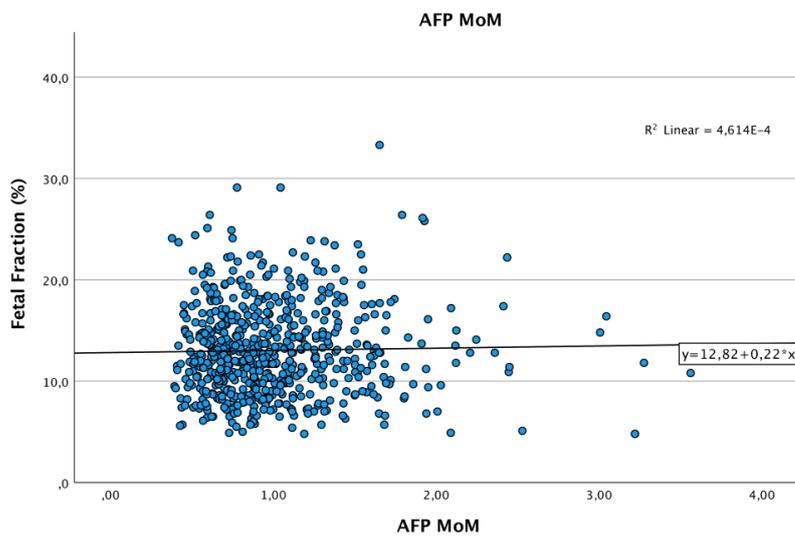


Abbildung 20: Fetal Fraction (%) in Abh. vom AFP (MoM)

Für AFP MoM resultierte aus der linearen Regression ein p-Wert von 0,590. Das Ergebnis war damit nicht signifikant. Der Regressionskoeffizient war 0,218.

### 3.2.1.4. MR-proANP MoM

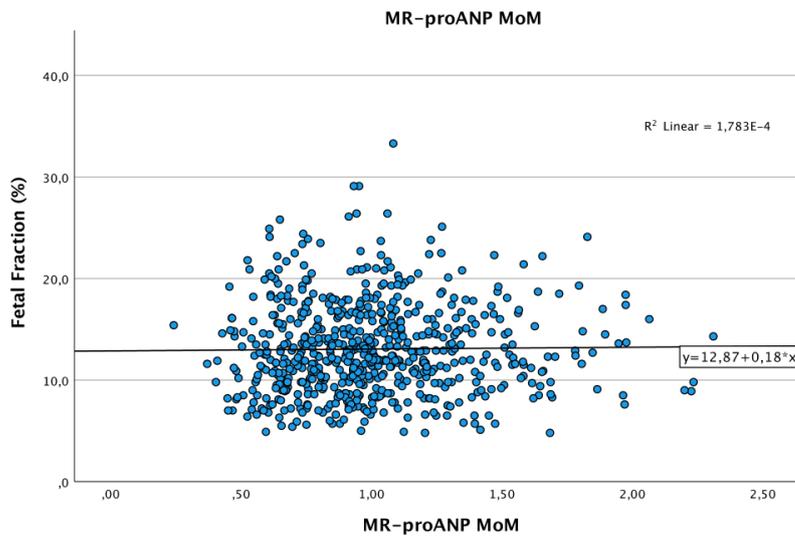


Abbildung 21.: Fetal Fraction (%) in Abh. vom MR-proANP (MoM)

Auch für MR-proANP ließ sich kein signifikanter Zusammenhang darstellen ( $p = 0,736$ ). Der Regressionskoeffizient lag bei 0,179.

### 3.2.1.5. NSE MoM

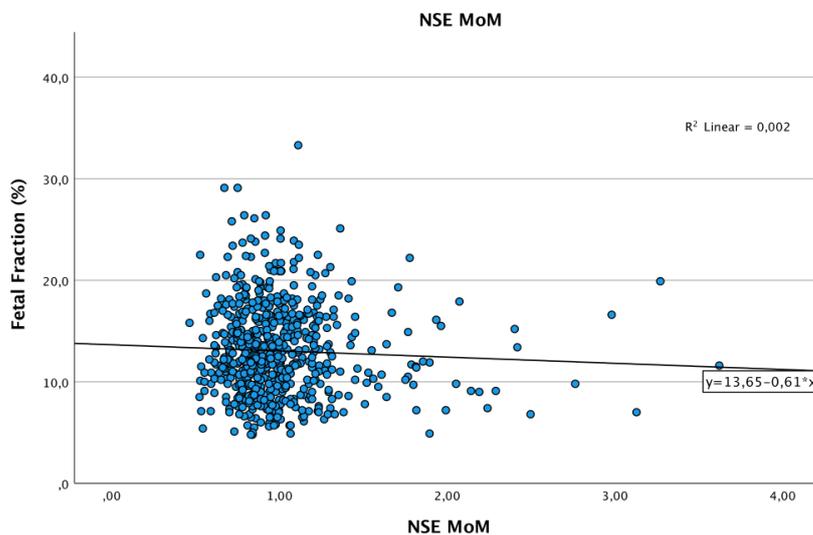


Abbildung 22: Fetal Fraction (%) in Abh. vom NSE (MoM)

Weiter resultierte für NSE MoM in der Berechnung ein p-Wert von 0,233. Das Ergebnis war nicht signifikant ( $p = 0,233$ ). Der Regressionskoeffizient war -0,609.

### 3.2.1.6. Procalcitonin MoM

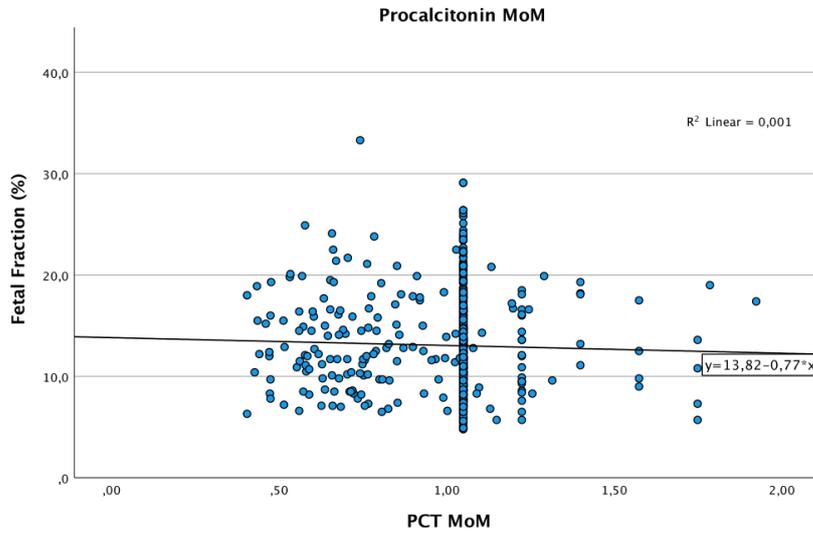


Abbildung 23: Fetal Fraction (%) in Abh. vom PCT (MoM)

PCT MoM zeigte in der linearen Regression auch keinen signifikanten Zusammenhang mit der *fetal fraction* ( $p = 0,415$ ). Der Regressionskoeffizient war  $-0,769$ .

### 3.2.1.7. Prolaktin MoM

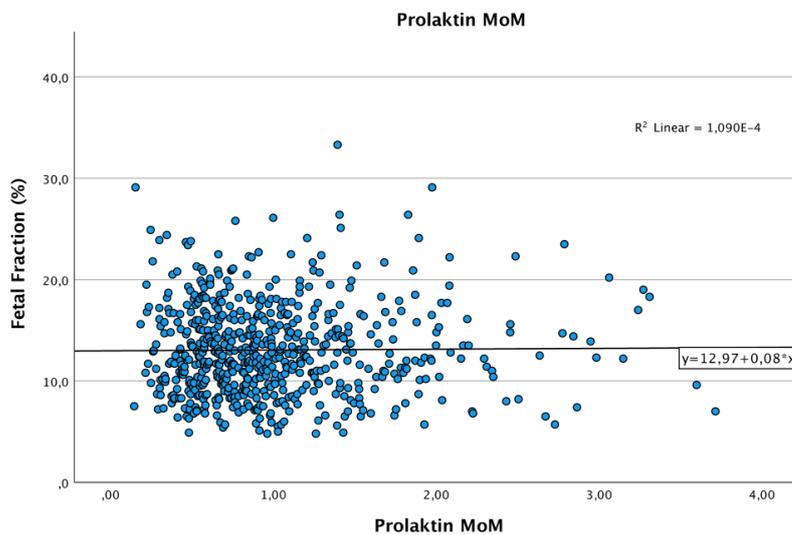


Abbildung 24: Fetal Fraction (%) in Abh. vom Prolaktin (MoM)

Auch Prolaktin MoM zeigte keine signifikante Korrelation mit der *fetal fraction*, da  $p = 0,793$ . Der Regressionskoeffizient war  $0,080$ .

### 3.2.1.8. Copeptin (CT-proAVP) MoM

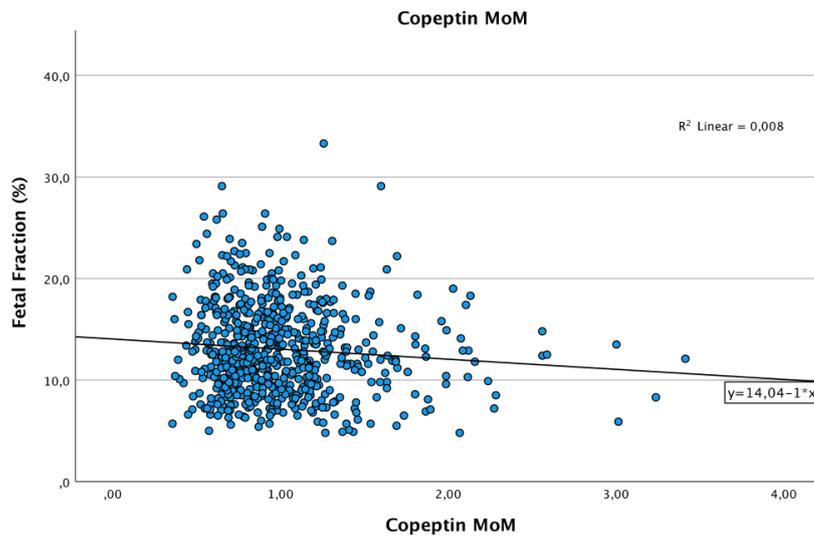


Abbildung 25: Fetal Fraction (%) in Abh. vom Copeptin (MoM)

Copeptin MoM korrelierte invers mit zunehmender *fetal fraction*. Der p-Wert war 0,024. Damit bestand ein signifikanter Zusammenhang. Der Regressionskoeffizient lag bei -0,995.

### 3.2.1.9. Placental Growth Factor (PIGF-plus) MoM

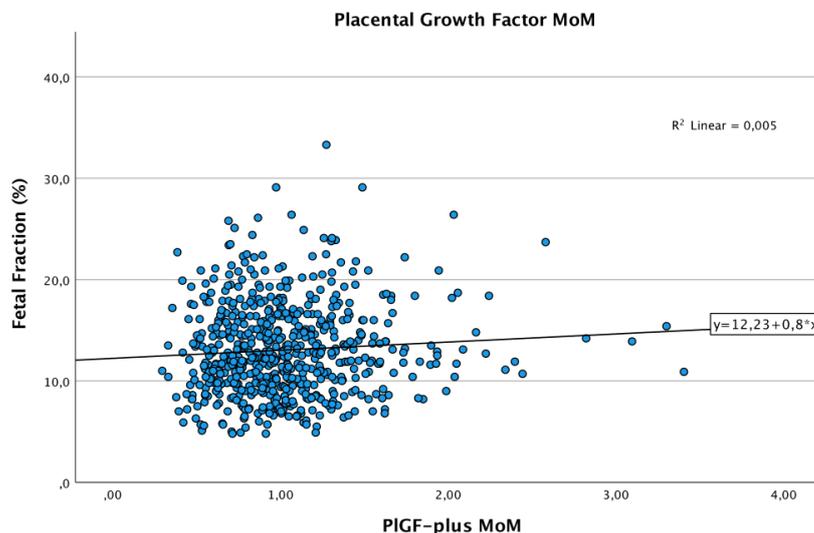


Abbildung 26: Fetal Fraction (%) in Abh. vom PIGF-plus (MoM)

Die grafische Darstellung ließ eine positive Korrelation zwischen der *fetal fraction* und dem PIGF-plus MoM vermuten. Mit einem p-Wert von 0,068 war das Ergebnis jedoch nicht signifikant. Der Regressionskoeffizient lag bei 0,802.

### 3.2.2. Patientenmerkmale und Blutdruck

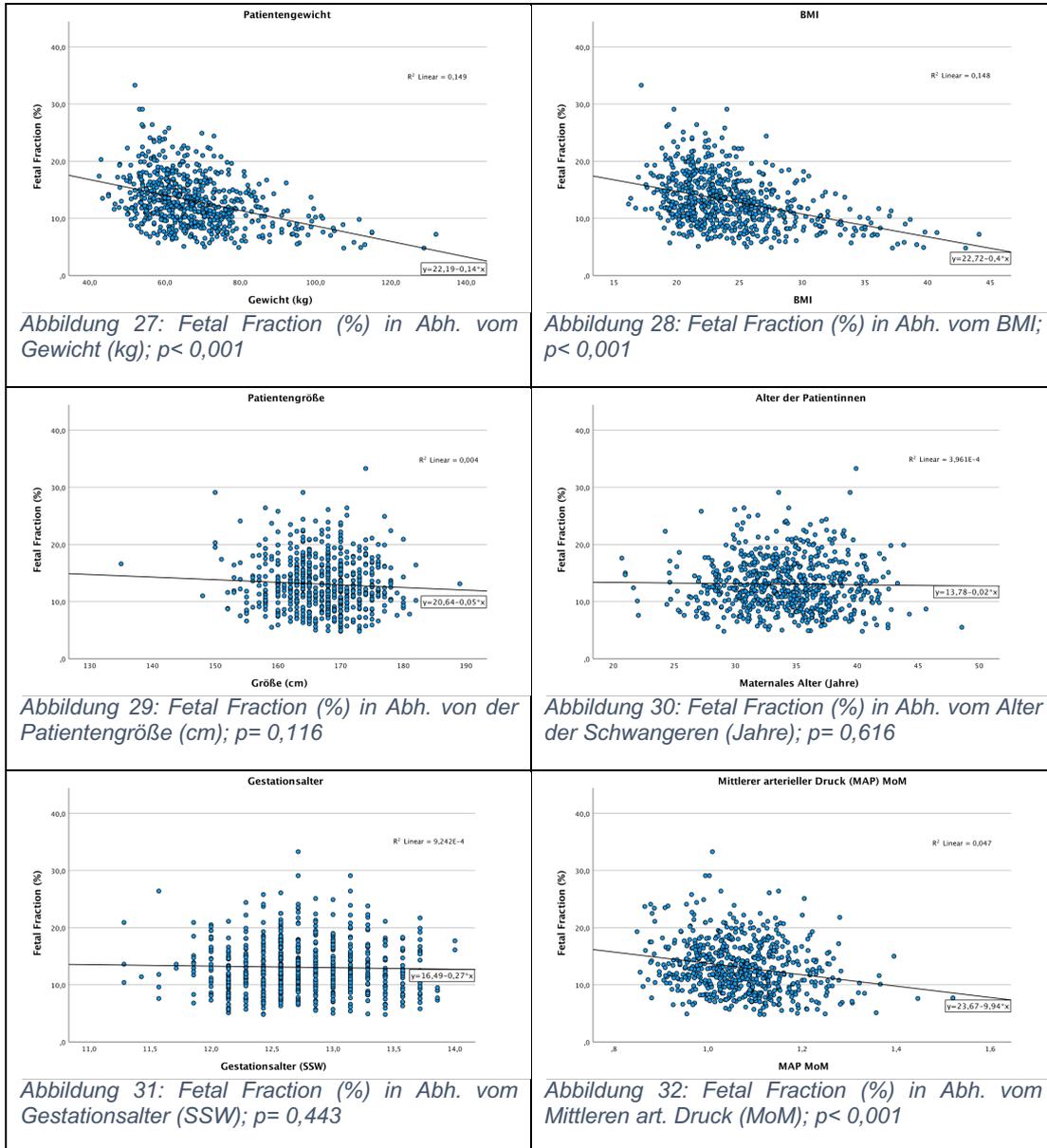
Eine signifikante, inverse Korrelation zeigte sich beim Patientengewicht (kg). Mit zunehmendem Gewicht nahm die *fetal fraction* ab. Der p-Wert ist  $< 0,001$  und der Regressionskoeffizient ist  $-0,135$ . Erwartungsgemäß traf dies auch für den BMI zu ( $p < 0,001$ ; Regressionskoeffizient:  $-0,399$ ). Für die Größe (cm) resultierte in der Berechnung kein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,116$ ; Regressionskoeffizient:  $-0,045$ ).

Auch für das maternale Alter ( $p = 0,616$ ; Regressionskoeffizient:  $-0,021$ ) und Gestationsalter ( $p = 0,443$ ; Regressionskoeffizient:  $-0,269$ ) ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge mit der *fetal fraction* darstellen.

Weiter zeigte sich ein signifikanter, inverser Zusammenhang zwischen der *fetal fraction* und dem mütterlichen Blutdruck, hier angegeben als MoM des mittleren arteriellen Blutdrucks. Ein zunehmender Mittlerer arterieller Druck (engl. mean arterial pressure = MAP) korrelierte mit einer Abnahme der *fetal fraction* ( $p < 0,001$ ; Regressionskoeffizient:  $-5,388$ ).

Die Ergebnisse wurden in Tabelle 16 grafisch zusammengefasst.

Tabelle 16: Grafische Darstellung des Verhältnisses zwischen den Patientenmerkmalen und der „Fetal Fraction“



### 3.2.3. Sonographische Marker

Für die im Ultraschall erhobenen Determinanten resultierte in der Berechnung ein signifikanter Zusammenhang zwischen der *fetal fraction* und den MoM-Werten des gemittelten PI (= Pulsatility Index) beider Aa. Uterinae. Mit zunehmendem intravasalem Druck, ergo steigendem PI, ließ sich eine Abnahme der *fetal fraction* beobachten. Der p-Wert war 0,024. Der Regressionskoeffizient war -1,331 (s. Abb. 33).

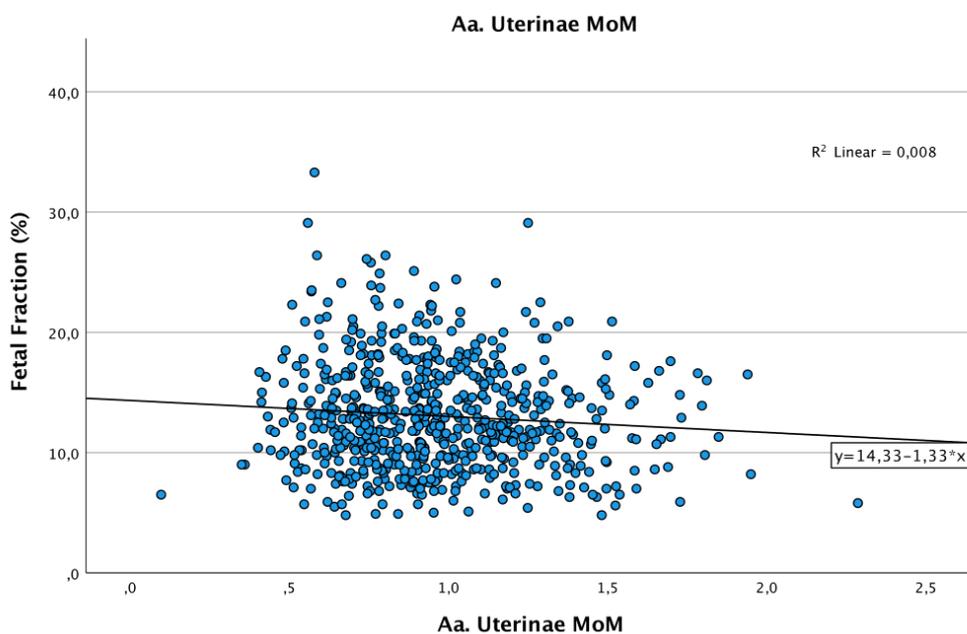
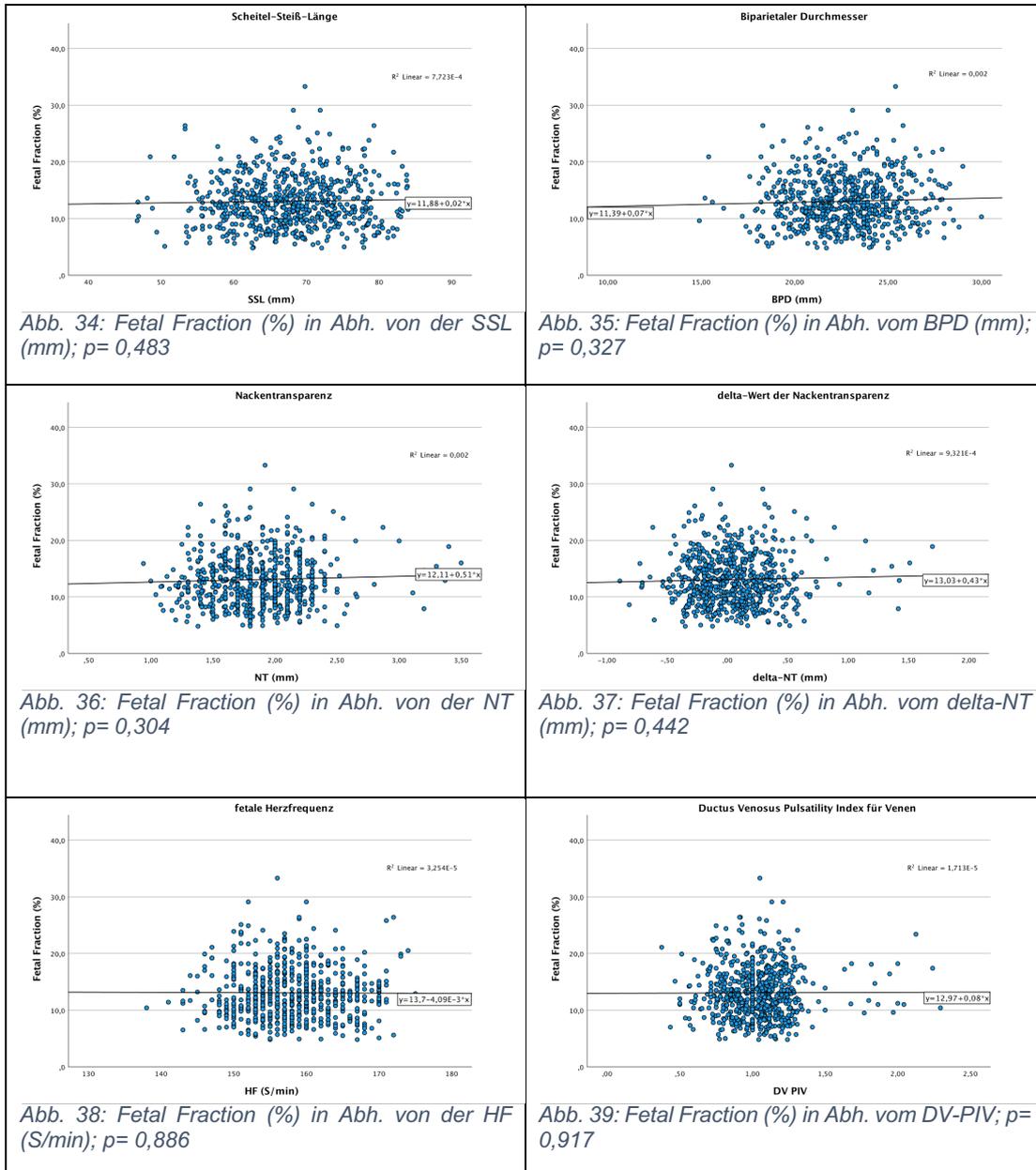


Abbildung 33: Fetal Fraction (%) in Abh. von Aa. Uterinae (MoM);  $p = 0,024$

In der Regression der anderen sonographisch ermittelten unabhängigen Variablen ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge aufzeigen (NT:  $p = 0,304$ ; delta-NT:  $p = 0,442$ ; SSL:  $p = 0,483$ ; BPD:  $p = 0,327$ ; HF:  $p = 0,886$ ; DV-PIV:  $p = 0,917$ ) (s. Tab. 17).

Tabelle 17: Fetal Fraction (%) Abh. von den sonographisch erhobenen Determinanten SSL, BPD, NT, delta-NT, HF und DV PIV



Eine Ergebnisübersicht der univariaten linearen Regression bietet Tab. 18.

Tabelle 18: Univariate lineare Regression zur Darstellung der Korrelation der fetal fraction (%) mit den untersuchten, potentiellen Prädiktoren.

Variable	Univariate lineare Regression				
	p	Regressionskoeffizient	R <sup>2</sup>	F	Std.-Fehler
<b>Serummarker</b>					
freies beta-hCG MoM	<b>&lt;0,001</b>	1,646	0,093	65,046	0,204
PAPP-A MoM	<b>&lt;0,001</b>	1,168	0,027	17,888	0,276
AFP MoM	0,590	0,218	0,000	0,291	0,405
MR-proANP MoM	0,736	0,179	0,000	0,113	0,530
NSE MoM	0,233	-0,609	0,002	1,423	0,510
PCT MoM	0,415	-0,769	0,001	0,666	0,943
Prolaktin MoM	0,793	0,080	0,000	0,069	0,306
Copeptin MoM	<b>0,024</b>	-0,995	0,008	5,083	0,441
PIGF-plus MoM	0,230	0,802	0,005	3,337	0,439
<b>Patientenmerkmale und Blutdruck</b>					
Gewicht	<b>&lt;0,001</b>	-0,135	0,149	111,756	0,013
Größe	0,116	-0,045	0,004	2,474	0,029
BMI	<b>&lt;0,001</b>	-0,339	0,148	110,531	0,038
MA (Jahre)	0,616	-0,021	0,000	0,252	0,042
GA (SSW)	0,443	-0,269	0,001	0,588	0,351
MAP MoM	<b>&lt;0,001</b>	-9,936	0,047	31,085	1,782
<b>Ultraschallmarker</b>					
Uterina MoM	<b>0,024</b>	-1,331	0,008	5,093	0,590
SSL (mm)	0,483	0,017	0,001	0,492	0,025
NT	0,304	0,508	0,002	1,060	0,494
deltaNT	0,442	0,432	0,001	0,592	0,561
HF	0,886	-0,004	0,000	0,021	0,028
BPD	0,327	0,073	0,002	0,963	0,074
DV PIV	0,917	0,078	0,000	0,011	0,747

### 3.3. Multivariate lineare Regression

Im Folgenden werden die Ergebnisse der multivariaten linearen Regressionsanalyse tabellarisch aufgeführt. Einbezogen wurden jene Determinanten, die in der univariaten Regression einen signifikanten Zusammenhang aufwiesen, um eine Filterung möglicher Störgrößen zu erzielen. Mit Ausnahme des BMI ( $p = 0,125$ ) zeigten alle anderen Variablen auch in der multivariaten linearen Regression einen signifikanten Zusammenhang zur Fetal Fraction. Dieser Effekt ist am ehesten dadurch zu erklären, dass sich der BMI durch die Variablen Gewicht und Größe zusammensetzt und das Gewicht den treibenden Einflussfaktor darstellt.

Das freie beta-hCG korrelierte positiv signifikant mit der *fetal fraction*. Der p-Wert blieb  $< 0,001$ , der Regressionskoeffizient (= RK) lag bei 1,561. Daraus ergab sich, dass bei Zunahme der Variable beta-hCG, auch eine Zunahme der *fetal fraction* beobachtet werden konnte.

Auch PAPP-A korrelierte positiv signifikant mit zunehmender *fetal fraction* ( $p = 0,013$ , RK = 0,608). Eine inverse Korrelation konnte weiterhin zwischen Copeptin und der *fetal fraction* beobachtet werden. Der Zusammenhang war signifikant ( $p = 0,005$ ; RK = -1,077).

Auch die Variablen Gewicht ( $p = 0,011$ ; RK = -0,078), MAP MoM ( $p < 0,001$ ; RK = -8,034) und Uterina MoM ( $p = 0,005$ ; RK = -1,449) korrelierten invers zur zunehmenden *fetal fraction*. Folglich sanken das Gewicht, der Mittlere art. Blutdruck und der Pulsatilty Index der Aa. Uterinae mit zunehmender fetal fraction.

Tabelle 19: Ergebnisse der multivariaten linearen Regression (rechts) aller in der univariaten linearen Regression (links) signifikant mit der fetal fraction korrelierenden Variablen.

Variable	Einfache lineare Regression		Multivariate lineare Regression	
	p	Regressionskoeffizient	p	Regressionskoeffizient
freies beta-hCG MoM	<b>&lt;0,001</b>	1,646	<b>&lt;0,001</b>	1,561
PAPP-A MoM	<b>&lt;0,001</b>	1,168	<b>0,013</b>	0,608
Copeptin MoM	<b>0,024</b>	-0,995	<b>0,005</b>	-1,077
Gewicht	<b>&lt;0,001</b>	-0,135	<b>0,011</b>	-0,078
BMI	<b>&lt;0,001</b>	-0,339	0,125	-0,140
MAP MoM	<b>&lt;0,001</b>	-9,936	<b>&lt;0,001</b>	-8,034
Uterina MoM	<b>0,024</b>	-1,331	<b>0,005</b>	-1,449

### 3.4. Logistische Regression

Nachfolgend wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt, um den Einfluss auf die *fetal fraction* tiefgründiger zu untersuchen. Es wurden dieselben unabh. Variablen wie in der linearen Regression untersucht. Die Fallzahl (n = 648) bildet die Gesamtpopulation ab, da nun auch jene Probandinnen mit ergebnisloser cfDNA-Testung ( $FF < 4$ ) in die Analyse aufgenommen wurden, die in der linearen Regression nicht berücksichtigt werden konnten.

Zunächst wurden zwei Gruppen gebildet, die sich durch eine  $FF \geq 7$  (n= 603) und  $FF < 7$  (n= 45) definierten.

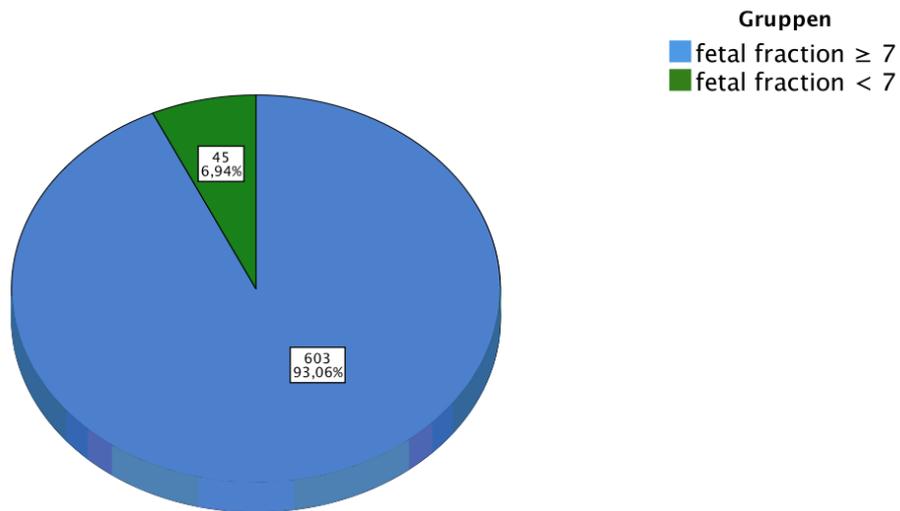


Abbildung 40: Aufteilung aller Studienteilnehmer ( $n = 648$ ) nach Anteil der fetal fraction. 93,06% der Probandinnen ( $n = 603$ ) wurden Gruppe  $FF \geq 7$  zugeteilt. 6,94% der Probandinnen ( $n = 45$ ) zeigten in der cfDNA Analyse eine  $FF < 7$ .

Zusätzlich zu den bereits in der linearen Regression eingeschlossenen Variablen konnten nun kategorial-skalierte bzw. dichotome Variablen in die Analyse eingeschlossen werden.

Analog zur linearen Regression wurden nach Berechnung der univariaten logistischen Regression alle dort signifikant getesteten Variablen in einer multivariaten logistischen Regression zusammen betrachtet. Nach Prüfung auf Multikollinearität und, wie erwartet, Feststellung einer hohen Korrelation zwischen der Variable Gewicht und BMI (Pearson: 0,924) wurde der Parameter BMI aus der multivariaten logistischen Regression ausgeschlossen. Weitere Korrelationen konnten nicht festgestellt werden, sodass die Variablenreduktion auf den Parameter BMI beschränkt blieb.

Angesichts zu geringer Fallzahlen für Patientinnen mit bekannter Diabeteserkrankung ( $n = 3$ ), sowie Fehlen des Nasenbeins ( $n = 4$ ), Darstellung einer Trikuspidalinsuffizienz ( $n = 3$ ) und reverse-Flow im Ductus Venosus ( $n = 14$ ) im Ultraschall wurden auch diese Variablen von der logistischen Regression ausgeschlossen.

### 3.5. Univariate logistische Regression

Zunächst wurde der Einfluss der in Tab. 3.9. zusammengefassten Parameter auf die Zielvariable „FF < 7“ mittels univariater logistischer Regression evaluiert.

Die Variablen beta-hCG, PAPP-A, Copeptin, Gewicht, BMI, MAP, das Vorhandensein von reproduktionsmedizinischen Maßnahmen beim Konzeptionsstatus, bzw. die Zugehörigkeit zu einer Ethnizität abweichend von „kaukasisch“, erwiesen sich in der univariaten log. Regression auf den Einfluss einer „FF < 7“ als signifikant.

Mit Zunahme des freien beta-hCG um eine Einheit, reduzierte sich die relative Wahrscheinlichkeit, dass eine FF < 7 vorlag um ca. 59,9% (OR= 0,401). Der Regressionskoeffizient war -0,914, die Berechnung mit einem p-Wert = 0,005 signifikant.

Auch der für PAPP-A errechnete Regressionskoeffizient (= RK) von -0,790 war mit einem p-Wert von 0,013 signifikant. OR war 0,454. Mit Zunahme von PAPP-A um den Wert 1, sank die relative Wahrscheinlichkeit der Gruppe FF < 7 anzugehören um 54,6%.

Stieg Copeptin um den Wert MoM= 1, stieg auch die relative Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der Zielvariable „FF < 7“ um den Faktor 2,180 (= OR). Der RK war 2,180 und mit  $p = 0,020$  signifikant.

Beobachtet wurde zudem, dass bei einer Gewichtszunahme um 1 kg, die relative Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer FF < 7 um 5,7% wuchs (OR = 1,057). Das Ergebnis war mit  $p < 0,001$  stark signifikant. Der Regressionskoeffizient lag bei 0,056.

Erwartungsgemäß konnte auch für den BMI ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (OR = 1,176;  $p < 0,001$ ; RK = 0,162).

Auch für den Mittleren art. Blutdruck konnte ein starker signifikanter Zusammenhang aufgezeigt werden ( $p < 0,001$ ; RK = 5,733). Ein zunehmender arterieller Blutdruck erhöhte die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer FF < 7 (OR= 309,040).

Ein signifikanter Zusammenhang konnte auch zwischen dem Konzeptionsstatus und der Zielvariable dargestellt werden. Erfolgte die Konzeption via in-vitro Fertilisation, erhöhte dies die relative Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer  $FF < 7$  um den Faktor 2,182 (OR = 3.182;  $p = 0,0,10$ ; RK = 1,157), verglichen zu jenen Probandinnen bei denen die Schwangerschaft spontan eintrat.

Weiter konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der ethnischen Zugehörigkeit und der *fetal fraction* dargestellt werden. Die relative Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer  $FF < 7$  war für Probandinnen nicht-kaukasischer Herkunft im Vergleich zu jenen kaukasischer Abstammung um 2,844 erhöht (OR = 3,844;  $p = 0,045$ ; RK = 1,347).

Für delta-NT ließ sich zunächst ein signifikanter Zusammenhang mit der Zielvariablen vermuten ( $p < 0,001$ ), welcher durch einen signifikanten Hosmer-Lemeshow-Test jedoch widerlegt wurde.

Weitere (signifikante) Zusammenhänge konnten nicht beobachtet werden (s. Tab. 20).

### 3.6. Multivariate logistische Regression

Vorgegangen wurde analog zur linearen Regressionsanalyse. Für Variablen mit einem  $p$ -Wert  $\geq 0,05$  im univariaten Modell bestand keine statistische Evidenz für den Einfluss auf die abhängige Variable, sodass diese im nun folgenden Gesamtmodell nicht berücksichtigt wurden. In der multivariaten logistischen Regression wurden nur jene unabhängige Variable einbezogen, die im univariaten Modell einen signifikanten Zusammenhang zur Zielvariable zeigten. Mit Ausnahme des freien beta-HCG MoM ( $p = 0,097$ ) und des Merkmals Ethnizität ( $p = 0,105$ ) zeigten die zuvor in der univariaten Analyse signifikant getesteten Variablen auch in der multivariaten logistischen Regression signifikante Zusammenhänge zur Zielvariablen.

Für PAPP-A konnte weiterhin ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,033$ ; OR = 0,421; RK = -0,866) beobachtet werden. Folglich sank die relative

Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer FF < 7 um 57,9% bei steigendem PAPP-A um den Faktor 1.

Weiter konnte für Copeptin ein signifikanter Einfluss aufgezeigt werden. Mit Zunahme des Copeptins stieg auch die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer FF < 7 ( $p = 0,012$ ; OR = 2,649; RK = 0,974).

Zudem blieb auch der signifikante Zusammenhang zwischen der Variable Gewicht und der abh. Variable in der multivariaten Analyse erhalten. Pro Kilogramm Körpergewicht stieg die relative Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen FF < 7 um 4,4% ( $p < 0,001$ ; OR = 1,044; RK = 0,043).

Auch für die Variable „MAP“ persistierte der signifikante Zusammenhang ( $p \leq 0,001$ ; OR = 1194,952; RK = 7,086). Stieg der Mittlere art. Druck um den Faktor MoM 1, so erhöhte sich die relative Wahrscheinlich für das Vorliegen der Zielvariable um den Faktor 1193,952.

Ferner blieb der Zusammenhang zwischen der Variablen „Konzeptionsmodus“ und der Zielvariablen signifikant. Traf die Ausprägung „künstliche Befruchtung“ zu, so stieg die relative Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer FF < 7 um den Faktor 6,6 ( $p < 0,001$ ; OR = 7,600; RK = 2,028).

Einen Überblick über die Ergebnisse der logistischen Regression (univariate & multivariate) zur Prädiktion einer FF < 7 zeigt Tabelle 20.

Tabelle 20: Ergebnisse der univariaten und multivariaten logistischen Regression zur Prädiktion der fetal fraction <7.

Variable	Univariate logistische Regression		Multivariate logistische Regression	
	OR 95% CI RK = Regressions- koeffizient	p	OR 95% CI	p
<b>Serummarker</b>				
freies beta-hCG MoM	<b>0.401</b> (0.212 – 0.759) <b>RK: -0,914</b>	<b>0.005</b>	0,550 (0,271 – 1,115) RK: -0,598	0,097
PAPP-A MoM	<b>0.454</b> (0.242 – 0.849)	<b>0.013</b>	<b>0,421</b> (0,190 – 0,934)	<b>0,033</b>

	<b>RK: - 0,790</b>		<b>RK: -0,866</b>	
AFP MoM	1.731 (0.911 – 3.292) <i>RK: 0,549</i>	0.094		
MR-proANP MoM	1.049 (0.382 – 2.880) <i>RG: 0,048</i>	0.926		
NSE MoM	1.216 (0.498 – 2.966) <i>RK: 0,195</i>	0.668		
PCT MoM	3.042 (0.496 – 18.672) <i>RK: 1,113</i>	0.229		
Prolaktin MoM	1.433 (0.865 – 2.377) <i>RK: 0,360</i>	0.162		
Copeptin MoM	<b>2.180</b> <b>(1.132 – 4.198)</b> <b>RK: 0,779</b>	<b>0.020</b>	<b>2,649</b> <b>(1,237 – 5,674)</b> <b>RK= 0,974</b>	<b>0,012</b>
PIGF plus MoM	0.490 (0.180 – 1.331) <i>RK: -0,714</i>	0.162		
<b>Patientenmerkmale und Blutdruck</b>				
Gewicht	<b>1.057</b> <b>(1.038 – 1.077)</b> <b>RK: 0,056</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1,044</b> <b>(1,020 – 1,068)</b> <b>RK: 0,043</b>	<b>&lt;0,001</b>
Größe	1.036 (0.985 – 1.090) <i>RK: 0,036</i>	0.167		
BMI	<b>1.176</b> <b>(1.113 – 1.242)</b> <b>RK: 0,162</b>	<b>&lt;0.001</b>		
MA (Jahre)	1.070 (0.994 – 1.152) <i>RK: 0,068</i>	0.072		
GA (SSW)	1.117 (0.616 – 2.028) <i>RK: 0,111</i>	0.715		
MAP MoM	<b>309,040</b> <b>(19,032 – 5018,43)</b> <b>RK: 5,733</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>1194,952</b> <b>(33,927 – 42087,439)</b> <b>RK: 7,086</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Ultraschallmarker</b>				
Uterina MoM	2.007 (0.770 – 5.228) <i>RK: 0,696</i>	0.154		
SSL (mm)	0.996 (0.955 – 1.039)	0.847		

	<i>RK: -0,004</i>			
NT	0.879 (0.377 – 2.047) <i>RK: -0,129</i>	0.764		
deltaNT	<b>*5.570</b> <b>(3.128 – 9.920)</b> <b><i>RK: 1,717</i></b>	<b>&lt;0.001</b>	Hosmer-Lemeshow-Test: signifikant p < 0,024	
HF	0.944 (0.947 – 1.043) <i>RK: -0,006</i>	0.812		
BPD	0.946 (0.834 – 1.074) <i>RK: -0,055</i>	0.394		
DV PIV	0.618 (0.160 – 2.384) <i>RK: -0,482</i>	0.484		
NB = Nasenbein	n= 4 → Ausschluss			
TI = Trikuspidalinsuff.	n= 3 → Ausschluss			
DV a-Welle (Reverse Flow)	n= 14 → Ausschluss			
Demographische Merkmale				
Diabetes	n= 3 → Ausschluss			
Raucher	1.603 (0.359 – 7.168) <i>RK: 0,472</i>	0.537		
Konzeption (IVF)	<b>3.182</b> <b>(1.321 – 7.665)</b> <b><i>RK: 1,157</i></b>	<b>0.010</b>	<b>7,600</b> <b>(2,524 – 22,883)</b> <b><i>RK: 2,028</i></b>	<b>&lt;0,001</b>
Ethnizität	<b>3.844</b> <b>(1.033 – 14.310)</b> <b><i>RK: 1,347</i></b>	<b>0.045</b>	4,355 (0,741 – 24,039) <i>RK: 1,440</i>	0,105
Tageszeit	1.223 (0.606 – 2.470) <i>RK: 0,202</i>	0.574		

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation potentieller Einflussfaktoren für die Fetale Fraktion um eine Prädiktion dieses Qualitätsmerkmals der cfDNA-Analyse zu ermöglichen.

Zur Untersuchung des Sachverhalts wurden die FF und die jeweiligen biochemischen, biophysikalischen und demographischen Determinanten einer linearen und logistischen, univariaten und multivariaten Regressionsanalyse unterzogen.

Die cfDNA-Analyse ist in der heutigen Zeit die beste nicht-invasive Methode zur Einschätzung des Risikos für eine Trisomie 21, 18 und 13. Das Forschungsteam um Gil et al. konnte in Metaanalyse für die Trisomie 21, 18 und 13 Detektionsraten von 99,7, 97,9 und 99,0% bei einer Falsch-Positive Rate von 0,04% aufzeigen (Gil, Accurti et al. 2017). Weitere Studien konnten dieses Ergebnis bestätigen (Mackie, Hemming et al. 2017, Geppert, Stinton et al. 2020). In Kombination mit einem ultraschallbasierten Ersttrimester-Screening mit Messung des fetalen Nackentransparenz, zur Identifikation weiterer schwangerschaftsspezifischer Risiken und Fehlbildungen, die auf andere Chromosomenstörungen, Mikrodeletionen etc. zurückzuführen sind, ist NIPT bedeutender Bestandteil zur frühzeitigen Erkennung von Chromosomenstörungen (Kagan, Eiben et al. 2014, Miltoft, Rode et al. 2018, Prodan, Wiechers et al. 2022).

Dennoch birgt die cfDNA-Analyse auch einige Hürden. Neben der restriktiven Screeningmöglichkeiten, die sich weitestgehend auf die typischen Chromosomenstörungen beschränken, kommt es in etwa 2-3% der Fälle zu einem ergebnislosen Test (Grati and Kagan 2017). Einer Wiederholung der cfDNA Analyse führt auch dann nur in etwa 50% der Fälle zu einem Ergebnis. Häufigste Ursache für einen ergebnislosen Test ist eine Fetale Fraktion  $< 4\%$ . Neben dem Aspekt, dass im Falle eines ergebnislosen Tests auch das Risiko für das Vorliegen von Pathologien (v.a. Trisomie 13, 18) erhöht ist, ist bei einer Re-Analyse erneut von einer geringeren FF und damit einem Qualitätsverlust der

Aussagekraft auszugehen (Canick, Palomaki et al. 2013, Wright, Wright et al. 2015, Kozlowski, Burkhardt et al. 2018). Des Weiteren darf nicht vergessen werden, dass zum Zeitpunkt des Erhalts eines ergebnislosen Tests häufig bereits mehrere Wochen Zeit vergangen sind. In der Folge ist oft der ideale Zeitraum für alternative Tests, wie dem kombinierten ETS (11+0 – 13+6 SSW), die Durchführung eines Diagnosetests oder für eine Abortinduktion nach Beratungsregel verstrichen. Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass in diesem Fall und mit voranschreitendem Gestationsalter von einer Zunahme der psychischen Belastung für die Patientin und des Risikos für Komplikationen im Falle einer konsekutiven Intervention auszugehen ist.

Auch liegen die Kosten für eine cfDNA-Analyse mit ca. 200 € (Stand 10/2022 für den Harmony-Test) deutlich höher als die Kosten für ein klassisches Ersttrimesterscreening.

Sowohl der höhere Kostenaufwand als auch das Risiko für ein einen ergebnislosen Test, rechtfertigen es, die Ursachen für einen ergebnislosen Test weiter zu untersuchen. Im Idealfall kann folglich bereits vor Durchführung einer cfDNA-Analyse ein ergebnisloser Test vorhergesagt werden und auf eine günstigere Alternative zurückgegriffen werden.

Um eine genauere Vorhersage zu treffen, bedarf es also einer tiefergründigen Erforschung von Einflussfaktoren auf die Fetal Fraktion.

#### **4.1. Diskussion der Serummarker**

In der vorliegenden Arbeit konnte für das freie beta humane Choriongonadotropin (hCG) MoM ein signifikanter Zusammenhang mit der FF in allen Regressionsanalysen mit Ausnahme der multivariaten logistischen Regression nachgewiesen werden. Die Korrelation war positiv. Bei zunehmender FF stieg auch das hCG.

Dieses Ergebnis wurde bereits in anderen Studien beschrieben und entspricht dem vorherrschenden Konsens. Ashoor et al. beschrieben in einer Studie mit 1949 Schwangeren, die sich einer cfDNA-Analyse unterzogen, einen Anstieg der FF mit zunehmendem hCG (Ashoor, Syngelaki et al. 2013). Durch weitere

Studien konnte dieser Aspekt bestätigt werden (Revello, Sarno et al. 2016, Scott, Menezes et al. 2018, Galeva, Gil et al. 2019).

Die Erklärung liegt im Ursprung des hCG und der FF. Mit Eintritt der Schwangerschaft und Entwicklung der Plazenta kommt es zur vermehrten Produktion des hCG durch die Syncytiotrophoblasten. Als Metabolit der Plazenta wird das hCG mit Zunahme der Plazentamasse auch vermehrt in die mütterliche Blutbahn freigegeben. Es kommt zum messbaren Anstieg. Gleichzeitig ist anzunehmen, dass auch die cfDNA nicht fetalen sondern plazentaren Ursprungs ist und mit zunehmender Plazentamasse der Anteil der Fetalen Fraktion im mütterlichen Blut durch das Zusammenwirken apoptotischer und nekrotischer Prozesse zunimmt (Bianchi 2004).

Neben dem hCG wird auch das „pregnancy-associated plasma protein A“ (PAPP-A) durch Produktion der plazentaren Syncytiotrophoblasten im Rahmen der Schwangerschaft freigesetzt. Dies erklärt das Vorliegen einer positiven Korrelation zwischen dem PAPP-A und der FF. Unter anderem in einer Studie der Arbeitsgruppe um Rolnik et al., in der 4317 Schwangere untersucht wurden, konnte eine signifikante positive Korrelation dargestellt werden.

In dieser Arbeit konnte der signifikante Zusammenhang sowohl in der linearen als auch der logistischen Regressionsanalyse erneut bestätigt werden.

Frühere Studien konnten ferner einen Zusammenhang zwischen dem „placental growth factor plus“ (PIGF), einem angiogenen Faktor der plazentaren Entwicklung, mit der FF darstellen. Scott et al. konnten in ihrer Regressionsanalyse, in der 5267 Schwangere untersucht wurden, eine positive Korrelation aufzeigen. In der Studie um die Arbeitsgruppe um Rolnik et al. konnte dies bestätigt werden (Rolnik, da Silva Costa et al. 2018, Scott, Menezes et al. 2018). In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang des PIGF mit der FF dargestellt werden. Allerdings wurde das Signifikanzniveau mit  $p = 0,068$  nur knapp verfehlt. Auch die visuelle Inspektion des Streudiagramms zwischen der FF in Abh. zu PIGF plus MoM (s. Abb. 26) könnte eine Tendenz zur positiven Korrelation vermuten lassen.

Auch hier ließe sich ein Zusammenhang durch die Abhängigkeit beider Variablen zur plazentaren Masse erklären, da PIGF in den Trophoblasten gebildet wird.

Bisher beschäftigten sich noch keine Arbeiten mit einem potentiellen Zusammenhang zwischen Copeptin und der FF. Diese Arbeit ist die erste, die eine signifikante, inverse Korrelation zwischen steigender FF und sinkenden Copeptin MoM - Werten darstellen konnte.

Die Erklärung ist am ehesten in der Funktion des Copeptins zu finden. Copeptin stellt den C-Terminalen Teil von Vasopressin (= Antidiuretisches Hormon / ADH) dar, welches nach Liberation durch die Neurohypophyse eine renale Wasserrückresorbtion bewirkt. Daraus resultiert eine Erhöhung der Plasmakonzentration und konsekutiv eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Nach aktueller Datenlage sind erhöhte Konzentrationen von Copeptin deshalb vor allem bei Patientinnen mit schwangerschaftsinduzierter Hypertonie (SIH) oder Präeklampsie (PE) vorzufinden (Neuman, van der Meer et al. 2020, Marek, Stojko et al. 2021).

Vorangegangene Studien konnten wiederum eine Assoziation zwischen steigendem arteriellen Blutdruck und abnehmender FF feststellen (Norton, Musci et al. 2015, Zhou, Zhu et al. 2015, Rolnik, da Silva Costa et al. 2018). Nach heutigem Kenntnisstand führt eine insuffiziente Entwicklung des plazentaren Gefäßsystems zu einer Minderperfusion mit konsekutiver Ischämie und Rebound-Hypertonie. Die ischämisch bedingten nekrotischen und apoptotischen Prozesse haben einen Anstieg von zellfreier maternaler und fetaler DNA zur Folge. Es ist anzunehmen, dass der maternale Anteil dabei überwiegt, sodass es zwar zur einer absoluten Zunahme jedoch relativen Abnahme der fetalen cfDNA kommt. Folglich nimmt die FF ab. Die Ergebnisse einer großen Studie um Rolnik et al., in der 4317 Schwangere untersucht wurden, stützen diese Theorie (Rolnik, da Silva Costa et al. 2018).

Auch diese Arbeit konnte eine signifikante inverse Korrelation des mittleren art. Blutdrucks mit der FF bestätigen und den allgemeinen Konsens dadurch unterstreichen.

Nun kann unterstellt werden, dass die Abnahme der FF nicht direkt durch das Copeptin sondern vielmehr indirekt durch den in Theorie assoziierten Blutdruckanstieg erklärt wird. Allerdings persistierten in dieser Arbeit die signifikanten Korrelationen mit der FF sowohl für das Copeptin als auch für den Mittleren art. Blutdruck (MoM) in der multivariaten linearen und multivariaten logistischen Regressionsanalyse. Auch eine signifikante Korrelation zwischen Copeptin und MAP MoM konnte nicht aufgezeigt werden, sodass ein unabhängiger Einfluss beider Variablen auf die FF angenommen werden kann.

MR-proANP stellt einen weiteren kardiovaskulären Biomarker dar, dessen potenzieller Einfluss auf die FF in dieser Arbeit untersucht wurde. MR-proANP wird zur Bestimmung des Atrialen natriuretischen Peptids (ANP) genutzt, da sich seine Konzentration äquivalent zum ANP, welches zu einer Vasodilatation und renalen Diurese führt, verhält. In der Literatur konnte dem MR-proANP ein nicht unbedeutender Stellenwert in der Präeklampsiediagnostik beigemessen werden. So konnten erhöhte MR-proANP Konzentrationen bei Präeklampsiepatientinnen gemessen werden (Neuman, van der Meer et al. 2020). Bisherige Studien haben den potenziellen Einfluss dieses Hormons auf die FF bisher nicht untersucht. Ein signifikanter Zusammenhang des MR-proANP mit der FF konnte in dieser Arbeit nicht aufgezeigt werden.

Weiter wurde in dieser Studie eine potentielle Einflussnahme des Alphafetoproteins auf die FF untersucht. Ein erhöhtes AFP spielte bereits in den Anfängen der Pränataldiagnostik eine bedeutende Rolle in der Detektion von Neuralrohrdefekten (Wald, Cuckle et al. 1977). Zunächst konnte durch Berücksichtigung weiterer Biomarker im Rahmen des Triple- und Quadruple-Test die Spannweite detektierbarer Pathologien wie T21 ausgeweitet werden, bis das AFP durch Einführung besserer Screeningmethoden, wie dem ETS, endgültig abgelöst wurde. Nichtsdestotrotz sind geringere AFP Konzentrationen mit einer erhöhten Prävalenz des Down-Syndroms assoziiert (Wald, Cuckle et al. 1988). Auch wenn bisherige Studien eine direkte Korrelation von AFP und FF nicht untersucht haben, konnte aufgezeigt werden, dass im Falle einer T21 die FF

signifikant höher ausfällt (Ashoor, Syngelaki et al. 2013, Palomaki, Kloza et al. 2015). In der Konsequenz ließe sich vermuten, dass eine geringere AFP-Konzentration mit einer höheren FF assoziiert ist.

In dieser Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang in der Regressionsanalyse dargestellt werden. Es ist jedoch anzumerken, dass in dieser Studie keine Patientinnen mit dringendem Verdacht für T21 (s. Kapitel 2.1) berücksichtigt wurden, da dies ein Ausschlusskriterium darstellte. Dies stellt sicherlich einen Schwachpunkt bezüglich dieser Fragestellung dar und sollte im direkten Vergleich betroffener und nicht betroffener Schwangerschaften zukünftig tiefgründiger untersucht werden.

Prolaktin nimmt mit fortschreitendem Gestationsalter in der Konzentration zu. Es stimuliert das Wachstum der Brustdrüsen und fördert die Milchproduktion. Die Produktion von Prolaktin findet hauptsächlich in der Hypophyse statt. Ein geringerer Anteil wird darüber hinaus auch in der plazentaren Dezidua während der Schwangerschaft produziert (Fukamatsu, Tomita et al. 1984). Vor dem Hintergrund, dass die zellfreie fetale DNA ebenfalls plazentaren Ursprung ist (Bianchi 2004), lässt sich eine Korrelation von Prolaktin mit der FF vermuten. Eine signifikante Einflussnahme von Prolaktin auf die FF konnte in dieser Studie jedoch ausgeschlossen werden. Eine Erklärung liegt darin, dass das deziduale Prolaktin nur einen geringen Bruchteil der Gesamtkonzentration ausmacht. Andere Studien zu diesem Thema liegen gegenwärtig nicht vor.

Ein weiterer Serummarker, dessen potentieller Einfluss auf die FF in dieser Arbeit erstmals untersucht wurde, ist die Neuronenspezifische Enolase (NSE). Die NSE wird im Kontext der Schwangerschaft mit neuronalen Fehlbildungen in Verbindung gebracht. Eine kleine Studie um Spencer et al. mit 62 Schwangeren konnte ein Zusammenhang der NSE mit dem Vorliegen einer fetalen Anencephalie aufzeigen. Studien, die eine Korrelation zwischen der NSE und der FF untersuchen liegen nicht vor. Diese Arbeit konnte keine signifikante Korrelation zur FF darstellen.

Weiter konnte dargelegt werden, dass keine signifikante Korrelation zwischen Procalcitonin und FF besteht.

PCT ist in der heutigen Medizin ein bedeutender Entzündungs- und Sepsismarker. Jüngst konnte dargelegt werden, dass im Rahmen von inflammatorischen Prozessen neben einem Anstieg des PCT auch ein Anstieg zell-freier DNA beobachtet werden kann (Hamaguchi, Akeda et al. 2015, Troia, Giunti et al. 2018). Es ist anzunehmen, dass neben apoptotischen und nekrotischen Prozessen auch sogenannte „Neutrophil extracellular Traps“ (NETs) ursächlich sind. Dabei handelt es sich um Netzwerke extrazellulärer Fasern, die Pathogene binden und aus neutrophiler DNA bestehen (Hamaguchi, Akeda et al. 2015). Während einer Schwangerschaft hieße dies, dass es in der Konsequenz zu einem Anstieg maternaler zellfreier DNA kommt. Eine relative Abnahme der fetalen zellfreien DNA und damit der FF wäre das Resultat. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine erhöhte PCT Konzentration mit einer Abnahme der FF assoziiert ist. Diese Arbeit konnte diese Vermutung jedoch widerlegen. Andere Studien bezüglich dieser Fragestellung existieren gegenwärtig nicht.

#### **4.2. Diskussion der Patientenmerkmale und Blutdruck**

In dieser Arbeit konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen abnehmender FF und zunehmendem Gewicht sowohl in der linearen als auch in der logistischen Regressionsanalyse aufzeigen. Erwartungsgemäß zeigte auch ein steigender BMI eine hochsignifikante Korrelation zur abnehmenden FF. In der multivariaten Analyse persistierte die Signifikanz nur noch für den Parameter Gewicht, nicht jedoch für die Variable BMI. Da sich der BMI aus Gewicht und Körpergröße zusammensetzt und die Körpergröße als eigenständige Variable in keiner Regressionsanalyse eine signifikante Assoziation mit der FF aufzeigte, scheint allein das Gewicht Einfluss auszuüben.

Dieses Ergebnis deckt sich mit jenen bisheriger Studien (Wang, Batey et al. 2013, Rava, Srinivasan et al. 2014, Revello, Sarno et al. 2016, Galeva, Gil et al. 2019). Ashoor et al. konnten bereits früh in einer Studie mit 1949 Schwangeren eine Abnahme der FF mit zunehmendem Gewicht feststellen. So betrug die gemittelte

FF bei Schwangeren mit einem Körpergewicht von 60 kg 11,7%, während sie bei einem Gewicht von 160 kg nur noch 3,9% betrug (Ashoor, Syngelaki et al. 2013). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Dar et al. konnten dieses Ergebnis in einer großen Studie, in der Daten von knapp 29000 Schwangeren analysiert wurden, bestätigen (Dar, Curnow et al. 2014). Galeva et al. berechneten in ihrer Studie sogar eine Risikozunahme von 5% für eine ergebnislose cfDNA Analyse pro Kilogramm Gewichtszunahme (Galeva, Gil et al. 2019).

Es wird angenommen, dass bedingt durch die größere maternale Masse ein Verdünnungseffekt eintritt, da die zellfreie DNA fetalen Ursprungs in Relation an Gewichtung verliert (Ashoor, Syngelaki et al. 2013). Weiter führt eine vermehrte Menge von Adipozyten auch zu einem vermehrten Umsatz dieser Zellen, was neben der Bildung auch die Apoptose und Nekrose und damit die Freisetzung maternaler zellfreier DNA zur Folge hat (Haghiac, Vora et al. 2012).

Die Variable Maternales Alter korrelierte in der linearen Regressionsanalyse nicht mit der FF. Konträr dazu konnten Galeva et al. in einer großen prospektiven Studie unter Berücksichtigung von 23495 Schwangeren eine inverse Korrelation darstellen (Galeva, Gil et al. 2019). Eine Erklärung ließen die Autoren offen. In anderen Studien wurde solch ein Ergebnis nicht berichtet.

In der logistischen Regressionsanalyse dieser Arbeit konnte auch kein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Allerdings wurde das Signifikanzniveau mit  $p = 0,072$  nur knapp verfehlt, was auf einen tendenziellen Zusammenhang hindeuten könnte.

Auch die Variable Gestationsalter ließ in unserer Arbeit keine Prädiktion auf die FF zu. Im Gegensatz dazu haben bisherige Studien sehr wohl eine Korrelation des Gestationsalters und der FF demonstrieren können. Wang et al. berichteten bereits im Jahr 2013 nach Analyse von 22384 Schwangeren von einer signifikanten positiven Korrelation beider Parameter (Wang, Batey et al. 2013). Diverse andere Studiengruppen konnten dieses Ergebnis bestätigen (Dar, Curnow et al. 2014, Rava, Srinivasan et al. 2014, Lee, Rolnik et al. 2018, Galeva, Gil et al. 2019).

Dass in unserer Studie kein Zusammenhang dargelegt werden konnte, ist am ehesten durch die vergleichsweise geringe Fallzahl ( $n = 648$ ) zu erklären. Beispielsweise konnte die Arbeitsgruppe um Ashoor et al. im Jahr 2013 nach Datenauswertung von knapp 2000 Schwangeren zunächst auch keinen signifikanten Zusammenhang darstellen (Ashoor, Syngelaki et al. 2013). Im Jahr 2019, nach Erweiterung des Datensatzes und Ausweitung der Fallzahl auf fast 23495 Teilnehmerinnen, konnte ein Zusammenhang hingegen sehr wohl beobachtet werden (Galeva, Gil et al. 2019). Fairerweise muss darauf hingewiesen werden, dass mit einer zunächst linearen und später logistischen Regressionsanalyse unterschiedliche statistische Methoden benutzt wurden. Der beschriebene Effekt sollte dadurch jedoch nur geringfügig beeinflusst werden.

Eine stark signifikante Korrelation mit der FF konnte ferner für den Mittleren arteriellen Blutdruck beobachtet werden. Auch die logistische Regressionsanalyse bestätigte, dass der Mittlere arterielle Blutdruck zur Prädiktion einer niedrigen FF geeignet ist. Frühere Studien demonstrierten übereinstimmende Ergebnisse (Suzumori, Sekizawa et al. 2018). Die Arbeitsgruppe um Rolnik et al. konnte diesen Einfluss auf die FF ebenfalls feststellen (Rolnik, da Silva Costa et al. 2018). Einige Studien berichten auch von steigender fetaler zell-freier DNA bei Patientinnen mit Präeklampsie in der das Symptom der arterieller Hypertonie vorherrscht (Caramelli, Rizzo et al. 2003, Farina, Sekizawa et al. 2004). Die Autoren begründen ihre Beobachtung darin, dass in diesen Fällen eine vermehrte Apoptose von Trophoblasten einsetzt, die auf einer plazentaren Ischämie und inflammatorischen Schädigung von Gefäßen und Gewebe beruht. Zudem konnte eine gestörte „Clearance“ fetaler cfDNA in Schwangeren mit Präeklampsie beobachtet werden (Lau, Leung et al. 2002). Diese zunächst divergent erscheinenden Ergebnisse erklären sich am ehesten in der Unterscheidung der untersuchten Variablen, da die FF das relative Verhältnis zur zellfreien fetalen DNA maternalen Ursprungs berücksichtigt, während die fetale zellfreie DNA dies nicht tut. Ein minder ausgeprägter Anstieg fetaler zellfreier DNA im Verhältnis zur zellfreien DNA maternalen DNA könnte die Diskrepanz verursachen.

### 4.3. Sonographische Marker

In der linearen Regressionsanalyse konnte eine inverse Korrelation der FF mit zunehmenden Gefäßwiderstand in den Aa. Uterinae dargelegt werden. Zwar konnte dieser Effekt in der logistischen Regressionsanalyse nicht mehr dargestellt werden, dennoch wurde jener Zusammenhang bereits in der Studie um Rolnik et al. beobachtet (Rolnik, da Silva Costa et al. 2018). Dieser Effekt lässt sich durch dieselben pathophysiologischen Verhältnisse erklären, die bereits zuvor unter dem Punkt MAP MoM erläutert wurden.

Dass die logistische Regressionsanalyse keine signifikante Assoziation aufzeigt, ist am ehesten auf die geringere Fallzahl in der Gruppe  $ff < 7$  ( $n = 45$ ) zurückzuführen. Teilt man dieser Gruppe in der statistischen Analyse jene Patienten mit einer ff von genau 7 zu, vergrößert sich die Fallzahl auf  $n = 50$ . Das Signifikanzniveau ändert sich von  $p = 0,154$  auf  $p = 0,070$ . Eine Prädiktion ist dadurch noch immer nicht möglich, eine Tendenz jedoch bereits angedeutet.

In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der FF und der Scheitel-Steiß-Länge beobachtet werden. Konträr dazu, hat die Arbeitsgruppe um Revello et al. eine positive Korrelation darstellen können (Revello, Sarno et al. 2016). Eine Begründung lieferten die Autoren nicht. Andere Studien hierzu existieren gegenwärtig nicht. Da die zell-freie fetale DNA placentaren- und nicht fetalen Ursprungs ist, überrascht das Ergebnis von Revello et al. zunächst. Allerdings haben postpartale Studien demonstrieren können, dass die Plazentagröße positiv mit dem Geburtsgewicht und der Geburtslänge korreliert (Lo, Jeng et al. 2002, Little, Zadorozhnaja et al. 2003), wodurch dieser Effekt erklärt würde. Nichtsdestotrotz konnte diese Arbeit den Zusammenhang nicht bestätigen.

Auch für die fetale Herzfrequenz, den Ductus Venosus Pulsatilitätsindex für Venen und den Biparietalen Durchmesser ließ sich kein Zusammenhang zur FF demonstrieren, der eine Prädiktion ermöglichen würde. Eine Einflussnahme des kardiovaskulären fetalen Systems auf die Konzentration der FF im mütterlichen Blut kann damit in dieser Analyse ausgeschlossen werden. Da der Biparietale

Diameter vor allem im ersten Trimenon abhängig vom fetalen Wachstum ist und mit der SSL korreliert (Salomon, Bernard et al. 2003, Kumar, Vajala et al. 2017), war die fehlende Korrelation des BPD zur FF zu erwarten. Berichte bezüglich einer potenziellen Einflussnahme dieser Parameter auf die FF liegen in anderen Studien bisher nicht vor.

Ein Zusammenhang zwischen der Nackentransparenz bzw. dem Delta-Wert der Nackentransparenz und der FF konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. In der logistischen Regressionsanalyse war das Ergebnis signifikant, allerdings fiel auch der Hosmer-Lemeshow-Test signifikant aus, sodass eine statistische Interpretation bezüglich der Vorhersage ausgeschlossen werden kann. Hudecova et al. berichteten in ihrer Studie in der 726 Einlingsschwangerschaften berücksichtigt wurden ebenfalls über einen fehlenden signifikanten Zusammenhang zur FF (Hudecova, Sahota et al. 2014). Eine Zunahme der NT ist bei diversen Krankheitsbildern insbesondere aber der Trisomie 21, 18 und 13 zu erwarten. Da bei T13 und T18 eine niedrigere, bei T21 jedoch eine höhere FF beobachtet wurde, entspricht unsere Beobachtung der allgemeinen Annahme (Rava, Srinivasan et al. 2014, Revello, Sarno et al. 2016).

Angesichts zu geringer Fallzahlen wurden die Parameter „Fehlen des Nasenbeins“ (NB), „Vorliegen einer Trikuspidalinsuffizienz“ (TI) und „Reverse Flow der Ductus Venosus a-Welle“ (DV a-Welle) in die statistische Analyse nicht mit einbezogen. Auch Berichte anderer Studien über eine Assoziation dieser Ultraschallmarker liegen gegenwärtig nicht vor. Da es sich bei jenen Parametern um fetale Marker für Fehlbildungen insbesondere der Trisomie 13, 18 und 21 handelt und hier jeweils unterschiedliche FF-Konzentrationen beobachtet wurden, wäre ein Zusammenhang überraschend (Kagan, Cicero et al. 2009, Kagan, Valencia et al. 2009, Maiz, Valencia et al. 2009).

#### **4.4. Demographische Marker**

Die Variable präexistenter Diabetes Mellitus wurde aufgrund einer Fallzahl von  $n = 3$  ebenfalls ausgeschlossen. In der Literatur finden sich gegenwärtig nur

einzelne divergente Ergebnisse. Rolnik et al. berichten in ihrer prospektiven Kohortenstudie, an der 4317 Schwangere teilnahmen, von einer geringeren FF bei Patientin mit präexistentem Diabetes Mellitus Typ 1 und 2. Allerdings wurden hierbei jeweils nur 13 Fälle von Typ 1 und 2 Diabetikern berücksichtigt (Rolnik, da Silva Costa et al. 2018). Konträr dazu konnte die Arbeitsgruppe um Zhou et al. in ihrer retrospektiven Analyse unter Berücksichtigung von insgesamt 22650 Schwangeren keinen Zusammenhang aufzeigen (Zhou, Zhu et al. 2015).

Der Raucherstatus zeigte in dieser Arbeit keinen signifikanten Zusammenhang mit der FF. Auch hier besteht in der Literatur gegenwärtig noch kein Konsens. Ashoor et al. beobachteten in ihrer Studie über eine signifikant höhere FF bei Rauchern und erklären dies durch die erhöhte Nekroserate von Syncytiotrophoblasten in dieser Population (Ashoor, Syngelaki et al. 2013). Eine größere andere Studie konnte hingegen keinen signifikanten Zusammenhang beider Parameter aufzeigen (Revello, Sarno et al. 2016). Gegen eine Zunahme der FF spricht, dass es bei Rauchern zu einer gestörten placentaren Entwicklung und konsekutiv einer geringeren placentaren Masse kommt. In der Konsequenz müsste dann auch eine geringere zellfreie fetale DNA placentaren Ursprungs zu erwarten sein (Zdravkovic, Genbacev et al. 2005).

Übereinstimmend mit der gegenwärtigen Studienlage konnte in dieser Arbeit eine signifikant geringe FF in Patientinnen, die sich einer In-vitro Fertilisation unterzogen, aufzeigt werden (Revello, Sarno et al. 2016, Lee, Rolnik et al. 2018, Rolnik, da Silva Costa et al. 2018, Galeva, Gil et al. 2019). Die relative Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer niedrigeren FF von  $< 7$  ist bei Patientinnen mit IVF um das 3,2-fache erhöht.

Vermutlich liegt auch dieser Effekt im placentaren Ursprung fetaler zellfreier DNA. Wie unter Punkt 4.1. erläutert, korrelieren die von der Plazentamasse abhängigen Hormone bHCG und PAPP-A mit der FF (Metzenbauer, Hafner et al. 2001). Entsprechend könnte eine niedrigere FF die Folge einer gestörten Plazentaimplantation sein, wie sie nach einer IVF vermehrt zu beobachten ist (Jauniaux, Moffett et al. 2020).

Nach aktueller Datenlage übt auch die ethnische Herkunft Einfluss auf die FF aus. Ashoor et al. berichten über eine signifikant geringe FF in Schwangeren afrokaribischer Abstammung (Ashoor, Syngelaki et al. 2013). In der Kohortenstudie von Revello et al. konnte eine signifikant geringe FF in Probandinnen Südostasiatischer Herkunft aufgezeigt werden (Revello, Sarno et al. 2016). Weitere Studien konnten übereinstimmende Ergebnisse liefern (Lee, Rolnik et al. 2018, Rolnik, da Silva Costa et al. 2018, Galeva, Gil et al. 2019). Die Population dieser Arbeit setzte sich zu 97,8% (n= 634) aus Patientinnen kaukasischer Abstammung zusammen. Nur acht ostasiatische, fünf schwarzafrikanische und eine südasiatische Patientin nahmen an dieser Studie teil. Angesichts der geringen Fallzahl von Studienteilnehmerinnen nicht-kaukasischer Herkunft wurden diese in der statischen Analyse zusammen betrachtet um eine Interpretation zu ermöglichen. Die univariate logistische Regressionsanalyse konnte zunächst einen signifikanten Zusammenhang zwischen Patienten nicht-kaukasischer Abstammung und einer FF < 7 bestätigen. In der multivariaten logistischen Regression konnte das Signifikanzniveau jedoch nicht mehr erreicht werden. Zu begründen ist dieses Ergebnis sicherlich in der noch immer sehr geringen Fallzahl nicht-kaukasischer Patientinnen.

Abschließend wurde in dieser Studie untersucht, ob der Zeitpunkt der cfDNA Analyse Einfluss auf die FF ausübt. Vermutet wurde, dass im Laufe des Tages auftretende Blutdruckspitzen und körperliche Anstrengung die Konzentration der zellfreien fetalen DNA beeinflussen könnte. Im Gruppenvergleich von Patientinnen bei denen die Blutentnahme vormittags (vor 12:00 Uhr) beziehungsweise nachmittags (nach 12:00 Uhr) erfolgte, ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede finden. Andere Studien die einen potenziellen Effekt der Tageszeit auf die FF untersuchen liegen gegenwärtig nicht vor.

#### 4.5. Schlussfolgerung

In Anbetracht zunehmender Etablierung und Inanspruchnahme der cfDNA-Analyse, des hohen Kostenaufwands und der in 2-3% eintretenden ergebnislosen Tests bei einer FF < 4%, die einerseits mit einer höheren Prävalenz von Pathologien verbunden sind und andererseits mit einem nicht unbedeutenden Zeitverzug in der Konsequenz ein alternatives Screening oder sogar einen Diagnostest erfordern, ist die Prädiktion der FF zur individuellen Abschätzung für das Eintreten eines Testfehlers von hoher gesellschaftlicher und ökonomischer Relevanz (Palomaki and Kloza 2018, Kagan, Sonek et al. 2022).

Die aktuelle Datenlage beschreibt ein erhöhtes Risiko für einen ergebnislosen Test bei zunehmendem Gewicht und mütterlichem Alter, nach In-vitro-Fertilisation, bei zunehmendem arteriellen Blutdruck und Widerstand in den Aa. Uterinae sowie in Mehrlingsschwangerschaften. Auch Schwangere asiatischer und afrikanischer Abstammung scheinen häufiger mit einem ergebnislosen Test durch eine ungenügende FF konfrontiert zu werden als Frauen kaukasischer Herkunft. Eine Risikoverringerung kann bei erhöhten Konzentrationen des humanen Choriongonadotropin (bHCG), Schwangerschaftsassozierten Plasmaprotein A (PAPP-A), des „Placental Growth Factor“ (PIGF-plus) und mit zunehmendem Gestationsalter beobachtet werden (Ashoor, Syngelaki et al. 2013, Kinnings, Geis et al. 2015, Rolnik, da Silva Costa et al. 2018, Galeva, Gil et al. 2019).

Mit Ausnahme der Einflussnahme von Mehrlingsschwangerschaften auf die FF, die in dieser Studie nicht untersucht wurde, konnten die aktuellen Erkenntnisse größtenteils bestätigen. In der linearen Regressionsanalyse korrelierten die Parameter bHCG und PAPP-A positiv mit zunehmender FF, während das Gewicht, der arterielle Blutdruck und der Widerstand in der Aa. Uterinae eine inverse Korrelation aufzeigten.

Erstmals nachgewiesen werden konnte in dieser Studie zusätzlich eine inverse Korrelation von Copeptin zur FF, was auf eine akkuratere Prädiktion der FF in Zukunft hoffen lässt. Der einheitliche Bewertungsmaßstab beziffert die aktuellen

Kosten zur Bestimmung von Copeptin auf etwa 25 € (Kollegen 2022). Der Kostenaufwand beträgt damit nur einen Bruchteil der „verlorenen“ Kosten im Falle einer ergebnislosen cfDNA-Analyse.

Eine positive Korrelation des PIGF-plus mit der FF, wie sie durch Rolnik et al. und Scott et al. berichtet wurden, konnten nicht bestätigt werden. Allerdings verfehlte das Ergebnis nur knapp das Signifikanzniveau, sodass eine Assoziation zumindest vermutet werden kann (Rolnik, da Silva Costa et al. 2018, Scott, Menezes et al. 2018).

Konträr zu den Ergebnissen anderer Studien konnte kein Zusammenhang der FF zum Gestationsalter und zum mütterlichen Alter dargelegt werden. Revello et al. berichten auch von einer Korrelation der Scheitel-Steiß-Länge mit der FF (Revello, Sarno et al. 2016). In unserer Arbeit konnte ein derartiger Zusammenhang nicht dargelegt werden. Auch ließen weder der Biparietale Durchmesser, noch die Herzfrequenz, die Nackentransparenz, der Delta-Wert der Nackentransparenz und der Ductus Venosus Pulsatilitätsindex für Venen eine Vorhersage der FF zu.

Weiter konnte aufgezeigt werden, dass die Serumkonzentrationen von NSE, MR-proANP, PCT und Prolaktin keinen Aufschluss über die FF zulassen.

In der logistischen Regressionsanalyse konnte darüber hinaus bestätigt werden, dass eine geringere FF bei Schwangeren nach In-vitro-Fertilisation zu erwarten ist. Auch ließ sich eine geringere FF bei Frauen nicht-kaukasischer Abstammung in der univariaten logistischen Regression beobachten. In der multivariaten Regressionsanalyse konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang mehr dargelegt werden, was sicherlich auch durch die geringe Fallzahl nicht-kaukasischer Probandinnen in dieser Studie zu erklären ist. Der Raucherstatus erlaubte keine Vorhersage der FF, da kein signifikanter Zusammenhang besteht und bekräftigt damit die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Revello et al. (Revello, Sarno et al. 2016).

Auch konnte diese Arbeit demonstrieren, dass der Zeitpunkt der Blutentnahme keinen Einfluss auf die FF auszuüben scheint.

Unter Berücksichtigung dieser Einflussfaktoren in der medizinischen Beratung vor einem Screening könnte ein individuelles Risiko für einen Testfehler durch eine niedrige FF < 4 abgeschätzt und eine Eignung des NIPT individuell abwogen werden.

Heutzutage basiert das Screening auf Chromosomenstörungen im ersten Trimenon hauptsächlich auf dem kombinierten ETS und der cfDNA-Analyse (Sonek, Kagan et al. 2016, Kagan, Sonek et al. 2017, Kozlowski, Burkhardt et al. 2018, Kagan, Sonek et al. 2022). Die cfDNA Analyse ist dem klassischen Verfahren in Bezug auf die wichtigsten Chromosomenstörungen T21, T18 und T13 dabei überlegen. Höhere Kosten, das Risiko eines ergebnislosen Tests und die Limitation detektierbarer Pathologien führen dazu, dass ein allumfassender Ansatz gefordert und in jüngsten Publikationen auch empfohlen wird (Prodan, Wiechers et al. 2022).

Prodan et al. stellten in ihrer Studie eine Methode vor, in der das T21 Risiko zunächst mittels kombinierten ETS ermittelt wurde und eine Einteilung in drei Gruppen (Hochrisiko >1:10; Intermediäres Risiko >1:11 – 1000; Niedrigrisiko >1/1000) erfolgte. Berücksichtigt wurden insgesamt 2418 Schwangerschaften, wovon in 161 Fällen eine T21 vorlag. Frauen der Hochrisikogruppe wurde ein Diagnostest (Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie) angeboten. Bei einem intermediären Risiko wurde eine cfDNA Analyse durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnte eine der cfDNA-Analyse ebenbürtige Detektionsrate von 98,4% bei einer Falsch-positiv Rate von 0,7% erreicht werden. Gleichzeitig konnte die Notwendigkeit einer cfDNA-Analyse auf 27% aller Schwangerschaften begrenzt werden, ohne die Detektion anderer Fehlbildungen zu vernachlässigen (Prodan, Wiechers et al. 2022). Nicolaides et al. konnten in ihrer Studie, in der eine cfDNA-Analyse bei einem Risiko höher 1:3000 angeboten wurde, über vergleichbare Ergebnisse berichten (Nicolaides, Wright et al. 2013).

Andere Studien verfolgten einen ähnlichen Ansatz (Gil, Revello et al. 2016, Miltoft, Rode et al. 2018). Allerdings war die Zahl berücksichtigter T21 Fälle hier bedeutend geringer, was die Aussagekraft einschränkt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten eine weitere Reduktion der notwendigen cfDNA-Analysen bewirken, indem idealerweise ein ergebnisloser Test vorhergesagt werden kann. Dadurch könnten nicht nur unnötige Kosten vermieden werden. Auch würde die im Falle eines Testfehlers notwendige erneute oder alternative Testung, der damit verbundene Zeitaufwand, die psychische Belastung der Schwangeren und die konsekutiv höheren Risiken im Falle einer Intervention bei dann fortgeschrittenem Gestationsalter, reduziert werden können.

Nähme man sich die Methode der Arbeitsgruppe von Prodan et al. zum Beispiel, könnte man für Schwangere der Intermediärrisikogruppe ein individuelles Risikoprofil für das potenzielle Testversagen der cfDNA Analyse erstellen. In der Folge würde man einer Patientin mit hohem BMI, präexistentem Hypertonus, niedrigen bHCG und PAPP-A Konzentrationen sowie vorangegangener In-vitro-Fertilisation entsprechend über das Risiko eines ergebnislosen Tests aufklären und gegebenenfalls sogar davon abraten. Hier könnte ein Diagnosetest nach ausführlicher Aufklärung direkt erfolgen. Entsprechend würde man einer Patientin mit geringem Risikoprofil eine cfDNA empfehlen. Weitere „neue“ Prädiktoren wie das Copeptin oder die uterine Dopplersonographie könnten unschlüssigen Patientinnen die Entscheidung dabei zukünftig erleichtern.

Gegenwärtig basiert das Screening im ersten Trimenon noch auf dem klassischen ETS oder sogar allein auf einer cfDNA-Analyse. Insbesondere für Patientinnen, die eine isolierte cfDNA-Analyse in Erwägung ziehen, könnte mittels Prädiktion der FF unter Berücksichtigung der Einflussfaktoren das Risiko für eine  $FF < 4$  ermittelt werden und ein ergebnisloser Test erspart bleiben. Das kombinierte Ersttrimesterscreening wäre dann eine geeignetere Empfehlung.

#### 4.6. Ausblick

Zukünftige Studien zur Untersuchung weiterer Prädiktoren der FF wären wünschenswert. Im Idealfall könnte damit das Eintreten eines ergebnislosen Tests vorhergesagt werden. Durch Fortführung existierender Studien könnte die Fallzahl erweitert werden und die Aussagekraft existierender Effekte bekräftigt werden. Weitere Studien zur Untersuchung der in unserer Arbeit neu entdeckten, inversen Korrelation von Copeptin und der FF sollten zur Bestätigung erfolgen. Für die medizinische Anwendung vorteilhaft wären zudem Studien, die sich eine Erstellung von Risikoprofilen für bestimmte Parameterkonstellationen als Ziel setzen würden. Dadurch könnten Algorithmen entwickelt werden, die eine Beratung von Schwangeren im medizinischen Alltag anhand vorliegender Einflussfaktoren verbessern. So könnte das statistische Risiko für das Eintreten eines Testfehlers für jede Patientin individuell errechnet werden und in die Beratung für das Ersttrimesterscreening mit einbezogen werden.

Ungeachtet dessen sollte die Forschung und Weiterentwicklung an der cfDNA-Analyse selbst weiter intensiviert werden, um die Bandbreite detektierbarer Fehlbildungen und Syndrome sinnvoll zu erweitern. Es ist zu betonen, dass Chromosomenstörungen für nur 10% aller Entwicklungsstörungen verantwortlich sind und nur die Hälfte aller fetalen Chromosomenstörungen durch eine T21 ausgelöst werden (Grati, Barlocco et al. 2010). Andererseits konnte die Arbeitsgruppe um Maya et al. in ihrer Studie demonstrieren, dass eine Erweiterung des Untersuchungsspektrum auf unter anderem Mikrodeletionen/ -duplikationen und Sex-Chromosomaberrationen das Restrisiko für genetische Erkrankungen nur geringfügig reduziert (Maya, Salzer Sheelo et al. 2022). Zudem führt die Berücksichtigung weiterer vor allem seltener Krankheitsbilder auch zu einer höheren Falsch-Positiv Rate. Zudem ist fraglich, ob eine Testung extrem seltener Gendefekte in einem Routine-Screening als verhältnismäßig eingestuft werden sollten (Kagan, Sonek et al. 2022). Hinzukommend sollte kontrovers diskutiert werden, ob die Detektion oftmals phänotypisch unauffälliger Veränderung der Sexchromosomen ethisch vertretbar ist.

#### **4.7. Kritische Beurteilung dieser Studie**

Ein Schwachpunkt dieser Studie stellt die Handhabung der Datenanalyse bei Probandinnen mit ergebnislosem Test dar. Für diesen Fall wurde zuvor sicherheitshalber eine zweite Serummonovette eingelagert, um eine bHCG und PAPP-A Bestimmung einzuleiten. Dadurch konnte Betroffenen ein kombiniertes ETS als alternatives Screening angeboten werden.

Infolgedessen konnte diese Serummonovette jedoch nicht mehr zur Messung der Serummarker herangezogen werden, sodass mit Ausnahme von bHCG und PAPP-A keine anderen Serummarker bei Patientinnen mit einer FF < 4 berücksichtigt wurden. Eine bessere Planung hätte diesen Aspekt verhindern können. Zukünftig sollte die Abnahme eines weiteren Serumröhrchens unbedingt erfolgen.

Darüber hinaus ist auf die geringe Fallzahl von Probandinnen mit präexistentem Diabetes und Schwangerschaften bei denen ein fehlendes Nasenbein, eine Trikuspidalinsuffizienz oder eine Reverse-Flow im Ductus venosus gemessen wurde hinzuweisen. Diese Merkmale wurden aus der statistischen Analyse ausgeschlossen. Um einen Zusammenhang zu untersuchen, sollte zuerst eine höhere Fallzahl erreicht werden.

Positiv hervorzuheben ist das breite Spektrum laborchemischer Marker, dessen potenzieller Einfluss auf die FF untersucht wurde. Bisherige Studien haben hauptsächlich Zusammenhänge zwischen der FF und den klassischen Schwangerschaftshormonen bHCG und PAPP-A erforscht. Diese Arbeit berücksichtigt eine Vielzahl anderer Hormone und Enzyme und konnte mit Copeptin einen neuen Prädiktor entdecken. Zudem sind eine Vielzahl sonographischer Variablen und der fehlende Zusammenhang des Zeitpunkts der Blutentnahme hinsichtlich der FF in dieser Arbeit erstmals untersucht wurden, auch wenn weitere Studien zur Bestätigung dieser Ergebnisse erfolgen sollten.

## 5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren konnte in der Pränataldiagnostik ein Paradigmenwechsel hin zur cfDNA-Analyse beobachtet werden. Gegenwärtige Screeningmodelle basieren hauptsächlich auf dem klassischen kombinierten Ersttrimesterscreening und der cfDNA-Analyse. Beim klassischen Ansatz werden das mütterliche Alter, das Gestationsalter, die Nackenfalte und die Hormone bHCG und PAPP-A zur Risikoermittlung herangezogen. Diese Methode besticht neben einer guten Detektionsrate und niedrigen Falsch-positiv-Rate auch durch einen geringen Kostenaufwand und ein extrem breites Spektrum anderer detektierbarer Fehlbildungen.

Die cfDNA-Analyse beeindruckt durch noch bessere Detektions- und noch geringere Falsch-Positiv Raten, ist im Untersuchungsspektrum jedoch auf die typischen Trisomien und Sexchromosomenstörungen begrenzt. Zudem ist dieser Ansatz mit einem höheren Kostenaufwand verbunden und liefert in 2-3% der Fälle kein Ergebnis, was primär auf eine für die Analyse zu geringe Fetale Fraktion zurückzuführen ist.

Infolgedessen empfiehlt sich nicht nur eine allgemeinere Herangehensweise, die die Vorteile beider Methoden kombiniert, an die individuelle Patientin und Situation anpasst und kosteneffektiv einsetzt. Auch werden Einflussfaktoren auf die FF, die den Anteil zellfreier DNA fetalen Ursprungs darstellt, erforscht. Anzustreben ist die Prädiktion der FF, um das Risiko für einen ergebnislosen Test vorherzusagen, eine individuelle Beratung der Schwangeren zu ermöglichen und die Rate ergebnisloser Tests zu minimieren oder idealerweise gänzlich zu verhindern. Neben unnötigen Kosten könnte Betroffenen auch die konsekutive psychische Belastung, die Notwendigkeit eines alternativen Screenings oder sogar die durch den Zeitverzug höheren Risiken im Fall einer daraus resultierenden Intervention, erspart bleiben.

Ziel dieser Arbeit ist die Prädiktion der Fetalen Fraktion im Rahmen eines cfDNA-Tests anhand der Identifikation potentieller Einflussfaktoren.

Für die Studie rekrutiert wurden 648 Schwangere in der 12. – 14. Schwangerschaftswoche bei denen eine cfDNA-Analyse durchgeführt wurde und

eine Einwilligung vorlag. Ausgeschlossen wurden Patientinnen im Falle eines fehlenden Einverständnisses oder bei sonographischem Hinweis für Fehlbildungen, wie einer Nackentransparenz von  $> 3,5$  mm.

Mittels linearer Regressionsanalyse wurde eine Korrelation zwischen der FF und den untersuchten Variablen geprüft. Für die untersuchten Serummarker erfolgte zuvor eine Konvertierung in MoM-Werte, um die Daten von anderen Einflüssen wie das Gestationsalter und das Gewicht zu bereinigen. Es zeigten sich eine positive Korrelation der FF mit bHCG und PAPP-A, sowie eine inverse Korrelation mit Copeptin, dem Gewicht, dem mittleren arteriellen Blutdruck und dem Pulsatilitätsindex der uterinen Dopplersonographie.

Anschließend wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt, um auch nominalskalierte-dichotome Variablen zu untersuchen. Hierfür wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen mit einer FF  $< 7$  und  $\geq 7$  aufgeteilt. In der logistischen Regression konnte demonstriert werden, dass eine niedrige FF signifikant häufiger mit einer vorangegangenen In-vitro-Fertilisation assoziiert ist. Auch die ethnische Zugehörigkeit schien zunächst Einfluss auf die FF auszuüben. Die multivariate logistische Regressionsanalyse konnte einen unabhängigen Einfluss jedoch nicht bestätigen.

Diverse Prädiktoren eignen sich zur Prädiktion der FF bei geplanter cfDNA-Analyse. Um der Schwangeren und dem behandelnden Therapeuten unnötige Kosten und Umstände zu ersparen, sollte eine individuelle Beratung anhand des Risikoprofils erfolgen und im Einzelfall eine Beratung zugunsten geeigneter Alternativen, wie dem kombinierten Ersttrimesterscreening, erfolgen.

## 6. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Abteilung für Pränatale Diagnostik und Medizin der Universitätsfrauenklinik unter Betreuung von Professor Dr. Karl Oliver Kagan durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Abteilung für Pränataldiagnostik der Universitätsfrauenklinik Tübingen. Hierzu gehören insbesondere Prof. Dr. Karl Oliver Kagan, Prof. Dr. Markus Hoopmann und Prof. Dr. Harald Abele.

Die Studie erfolgte außerdem in Zusammenarbeit mit Dr. Kai Lüthgens und dem Labor Enders, die die Laborgeräte zur Analyse der Serummarker zur Verfügung stellten und beratend zur Verfügung standen.

Sämtliche laborchemische Messungen wurden nach Einarbeitung durch Dr. Kai Lüthgens von mir eigenständig in den Laborräumen des Labor Enders Stuttgart durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Beratung von Prof. Dr. Karl Oliver Kagan und dem Institut für Biometrie Tübingen durch mich.

Tübingen, den

---

Peter Jan Cornelius



## Literaturverzeichnis

Amicucci, P., et al. (2000). "Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma." Clin Chem **46**(2): 301-302.

Ashoor, G., et al. (2012). "Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors." Fetal Diagn Ther **31**(4): 237-243.

Ashoor, G., et al. (2013). "Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics." Ultrasound Obstet Gynecol **41**(1): 26-32.

Ashoor, G., et al. (2012). "Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18." Am J Obstet Gynecol **206**(4): 322 e321-325.

Badeau, M., et al. (2017). "Genomics-based non-invasive prenatal testing for detection of fetal chromosomal aneuploidy in pregnant women." Cochrane Database Syst Rev **11**: CD011767.

Becker, R. and R. D. Wegner (2006). "Detailed screening for fetal anomalies and cardiac defects at the 11-13-week scan." Ultrasound Obstet Gynecol **27**(6): 613-618.

Benachi, A., et al. (2015). "Cell-free DNA analysis in maternal plasma in cases of fetal abnormalities detected on ultrasound examination." Obstet Gynecol **125**(6): 1330-1337.

Benn, P. (2016). "Expanding non-invasive prenatal testing beyond chromosomes 21, 18, 13, X and Y." Clin Genet **90**(6): 477-485.

Benn, P., et al. (2019). "Rare autosomal trisomies: comparison of detection through cell-free DNA analysis and direct chromosome preparation of chorionic villus samples." Ultrasound Obstet Gynecol **54**(4): 458-467.

Bevilacqua, E., et al. (2015). "Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies." Ultrasound Obstet Gynecol **45**(1): 61-66.

Bevilacqua, E., et al. (2021). "Performance of a targeted cell-free DNA prenatal test for 22q11.2 deletion in a large clinical cohort." Ultrasound Obstet Gynecol **58**(4): 597-602.

Bianchi, D. W. (2004). "Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review." Placenta **25 Suppl A**: S93-S101.

Bianchi, D. W., et al. (2012). "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing." Obstet Gynecol **119**(5): 890-901.

Bianchi, D. W., et al. (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." Prenat Diagn **22**(7): 609-615.

Canick, J. A., et al. (2013). "The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies." Prenat Diagn **33**(7): 667-674.

Caramelli, E., et al. (2003). "Cell-free fetal DNA concentration in plasma of patients with abnormal uterine artery Doppler waveform and intrauterine growth restriction--a pilot study." Prenat Diagn **23**(5): 367-371.

Chaoui, R., et al. (2009). "Assessment of intracranial translucency (IT) in the detection of spina bifida at the 11-13-week scan." Ultrasound Obstet Gynecol **34**(3): 249-252.

Chitty, L. S., et al. (2011). "New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma." Ultrasound Obstet Gynecol **37**(3): 283-289.

Chiu, E. K. L., et al. (2018). "cfDNA screening and diagnosis of monogenic disorders - where are we heading?" Prenat Diagn **38**(1): 52-58.

Chiu, R. W., et al. (2011). "Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study." BMJ **342**: c7401.

Chiu, R. W., et al. (2008). "Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20458-20463.

Cuckle, H. and R. Maymon (2016). "Development of prenatal screening--A historical overview." Semin Perinatol **40**(1): 12-22.

Dar, P., et al. (2014). "Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing." Am J Obstet Gynecol **211**(5): 527 e521-527 e517.

Dhallan, R., et al. (2007). "A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study." Lancet **369**(9560): 474-481.

Fan, H. C., et al. (2012). "Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome." Nature **487**(7407): 320-324.

Farina, A., et al. (2004). "Total cell-free DNA (beta-globin gene) distribution in maternal plasma at the second trimester: a new prospective for preeclampsia screening." Prenat Diagn **24**(9): 722-726.

Fukamatsu, Y., et al. (1984). "Further evidence of prolactin production from human decidua and its transport across fetal membrane." Gynecol Obstet Invest **17**(6): 309-316.

Galeva, S., et al. (2019). "First-trimester screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in singleton and twin pregnancies: factors affecting test failure." Ultrasound Obstet Gynecol **53**(6): 804-809.

Gendiagnostikgesetz "GenDG."

Gendiagnostikgesetz - GenDG. "Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen (Gendiagnostikgesetz - GenDG)." from [http://www.gesetze-im-internet.de/gendg/\\_15.html](http://www.gesetze-im-internet.de/gendg/_15.html).

Geppert, J., et al. (2020). "Antenatal screening for fetal trisomies using microarray-based cell-free DNA testing: A systematic review and meta-analysis." Prenat Diagn **40**(4): 454-462.

GfH, G. f. H. (2012). "Stellungnahme cfDNA." from [https://www.gfhev.de/de/leitlinien/LL\\_und\\_Stellungnahmen/2012\\_11\\_12\\_GfH\\_Stellungnahme\\_Analyse\\_fetale\\_DNA.pdf](https://www.gfhev.de/de/leitlinien/LL_und_Stellungnahmen/2012_11_12_GfH_Stellungnahme_Analyse_fetale_DNA.pdf).

Gil, M. M., et al. (2017). "Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis." Ultrasound Obstet Gynecol **50**(3): 302-314.

Gil, M. M., et al. (2016). "Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test." Ultrasound Obstet Gynecol **47**(1): 45-52.

Grati, F. R., et al. (2010). "Chromosome abnormalities investigated by non-invasive prenatal testing account for approximately 50% of fetal unbalances associated with relevant clinical phenotypes." Am J Med Genet A **152a**(6): 1434-1442.

Grati, F. R. and K. O. Kagan (2017). "Rate of no result in cell-free DNA testing and its influence on test performance metrics." Ultrasound Obstet Gynecol **50**(1): 134-137.

Haghiac, M., et al. (2012). "Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women." Obesity (Silver Spring) **20**(11): 2213-2219.

Hamaguchi, S., et al. (2015). "Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model." Mediators Inflamm **2015**: 614518.

Holzgreve, W., et al. (1992). "Fetal cells in the maternal circulation." J Reprod Med **37**(5): 410-418.

Huang, X., et al. (2014). "Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies." Prenat Diagn **34**(4): 335-340.

Hudecova, I., et al. (2014). "Maternal plasma fetal DNA fractions in pregnancies with low and high risks for fetal chromosomal aneuploidies." PLoS One **9**(2): e88484.

Iwarsson, E., et al. (2017). "Analysis of cell-free fetal DNA in maternal blood for detection of trisomy 21, 18 and 13 in a general pregnant population and in a high risk population - a systematic review and meta-analysis." Acta Obstet Gynecol Scand **96**(1): 7-18.

Jauniaux, E., et al. (2020). "Placental Implantation Disorders." Obstet Gynecol Clin North Am **47**(1): 117-132.

Jensen, T. J., et al. (2012). "Detection of microdeletion 22q11.2 in a fetus by next-generation sequencing of maternal plasma." Clin Chem **58**(7): 1148-1151.

Juneau, K., et al. (2014). "Microarray-based cell-free DNA analysis improves noninvasive prenatal testing." Fetal Diagn Ther **36**(4): 282-286.

Kagan, K. O., et al. (2009). "Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation." Ultrasound Obstet Gynecol **33**(3): 259-264.

Kagan, K. O., et al. (2014). "[Combined first trimester screening and cell-free fetal DNA - "next generation screening"]." Ultraschall Med **35**(3): 229-236.

Kagan, K. O., et al. (2009). "Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21." Ultrasound Obstet Gynecol **34**(1): 14-18.

Kagan, K. O., et al. (2015). "Screening for chromosomal abnormalities by first trimester combined screening and noninvasive prenatal testing." Ultraschall Med **36**(1): 40-46.

Kagan, K. O., et al. (2020). "First Trimester Screening for Common Trisomies and Microdeletion 22q11.2 Syndrome Using Cell-Free DNA: A Prospective Clinical Study." Fetal Diagn Ther **47**(11): 841-852.

Kagan, K. O., et al. (2015). "Screening Performance and Costs of Different Strategies in Prenatal Screening for Trisomy 21." Geburtshilfe Frauenheilkd **75**(3): 244-250.

Kagan, K. O., et al. (2022). "Antenatal screening for chromosomal abnormalities." Arch Gynecol Obstet **305**(4): 825-835.

Kagan, K. O., et al. (2017). "Principles of first trimester screening in the age of non-invasive prenatal diagnosis: screening for chromosomal abnormalities." Arch Gynecol Obstet **296**(4): 645-651.

Kagan, K. O., et al. (2017). "Principles of first trimester screening in the age of non-invasive prenatal diagnosis: screening for other major defects and pregnancy complications." Arch Gynecol Obstet **296**(4): 635-643.

Kagan, K. O., et al. (2009). "Tricuspid regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11+0 to 13+6 weeks of gestation." Ultrasound Obstet Gynecol **33**(1): 18-22.

Kagan, K. O., et al. (2008). "Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A." Ultrasound Obstet Gynecol **31**(6): 618-624.

Kagan, K. O., et al. (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." Hum Reprod **23**(9): 1968-1975.

Kinnings, S. L., et al. (2015). "Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing." Prenat Diagn **35**(8): 816-822.

Kitzman, J. O., et al. (2012). "Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus." Sci Transl Med **4**(137): 137ra176.

Kollegen, D. L.-D. K. u. (2022). "Copeptin (CT-proAVP) bei Verdacht auf Diabetes insipidus - Kosten EBM." 2022, from <https://ladr.de/copeptin-ct-proavp>.

Kozlowski, P., et al. (2018). "DEGUM, OGUM, SGUM and FMF Germany Recommendations for the Implementation of First-Trimester Screening, Detailed Ultrasound, Cell-Free DNA Screening and Diagnostic Procedures." Ultraschall Med.

Kumar, M., et al. (2017). "First-trimester reference centiles of fetal biometry in Indian population." J Matern Fetal Neonatal Med **30**(23): 2804-2811.

Lachmann, R., et al. (2011). "Posterior brain in fetuses with open spina bifida at 11 to 13 weeks." Prenat Diagn **31**(1): 103-106.

Lau, T. K., et al. (2013). "Non-invasive prenatal screening of fetal Down syndrome by maternal plasma DNA sequencing in twin pregnancies." J Matern Fetal Neonatal Med **26**(4): 434-437.

Lau, T. W., et al. (2002). "Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia." Clin Chem **48**(12): 2141-2146.

Lee, T. J., et al. (2018). "Cell-free fetal DNA testing in singleton IVF conceptions." Hum Reprod **33**(4): 572-578.

Liang, D., et al. (2013). "Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing." Prenat Diagn **33**(5): 409-415.

Little, R. E., et al. (2003). "Placental weight and its ratio to birthweight in a Ukrainian city." Early Hum Dev **71**(2): 117-127.

Lo, K. K., et al. (2016). "Limited Clinical Utility of Non-invasive Prenatal Testing for Subchromosomal Abnormalities." Am J Hum Genet **98**(1): 34-44.

Lo, Y. F., et al. (2002). "Placental weight and birth characteristics of healthy singleton newborns." Acta Paediatr Taiwan **43**(1): 21-25.

Lo, Y. M., et al. (2010). "Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus." Sci Transl Med **2**(61): 61ra91.

Lo, Y. M., et al. (1997). "Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum." Lancet **350**(9076): 485-487.

Lo, Y. M., et al. (1998). "Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis." Am J Hum Genet **62**(4): 768-775.

Ma, G. C., et al. (2018). "Low-molecular-weight heparin associated with reduced fetal fraction and subsequent false-negative cell-free DNA test result for trisomy 21." Ultrasound Obstet Gynecol **51**(2): 276-277.

Mackie, F. L., et al. (2017). "The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis." BJOG **124**(1): 32-46.

Maiz, N., et al. (2009). "Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation." Ultrasound Obstet Gynecol **33**(5): 512-517.

Malone, F. D., et al. (2005). "First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome." N Engl J Med **353**(19): 2001-2011.

Marek, A., et al. (2021). "Copeptin in Patients with Pregnancy-Induced Hypertension." Int J Environ Res Public Health **18**(12).

Martin, K., et al. (2018). "Clinical experience with a single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal test for five clinically significant microdeletions." Clin Genet **93**(2): 293-300.

Maya, I., et al. (2022). "Residual risk for clinically significant copy number variants in low-risk pregnancies, following exclusion of noninvasive prenatal screening-detectable findings." Am J Obstet Gynecol **226**(4): 562.e561-562.e568.

Mazloom, A. R., et al. (2013). "Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma." Prenat Diagn **33**(6): 591-597.

McLennan, A., et al. (2016). "Noninvasive prenatal testing in routine clinical practice--an audit of NIPT and combined first-trimester screening in an unselected Australian population." Aust N Z J Obstet Gynaecol **56**(1): 22-28.

Meck, J. M., et al. (2015). "Noninvasive prenatal screening for aneuploidy: positive predictive values based on cytogenetic findings." Am J Obstet Gynecol **213**(2): 214 e211-215.

Mennuti, M. T., et al. (2015). "Cell-free DNA screening and sex chromosome aneuploidies." Prenat Diagn **35**(10): 980-985.

Metzenbauer, M., et al. (2001). "Three-dimensional ultrasound measurement of the placental volume in early pregnancy: method and correlation with biochemical placenta parameters." Placenta **22**(6): 602-605.

Metzker, M. L. (2010). "Sequencing technologies - the next generation." Nat Rev Genet **11**(1): 31-46.

Miltoft, C. B., et al. (2018). "Contingent first-trimester screening for aneuploidies with cell-free DNA in a Danish clinical setting." Ultrasound Obstet Gynecol **51**(4): 470-479.

Neufeld-Kaiser, W. A., et al. (2015). "Positive predictive value of non-invasive prenatal screening for fetal chromosome disorders using cell-free DNA in maternal serum: independent clinical experience of a tertiary referral center." BMC Med **13**: 129.

Neuman, R. I., et al. (2020). "Copeptin and mid-regional pro-atrial natriuretic peptide in women with suspected or confirmed pre-eclampsia: comparison with sFlt-1/PIGF ratio." Ultrasound Obstet Gynecol **56**(6): 872-878.

Nicolaides, K. H. (2011). "Turning the pyramid of prenatal care." Fetal Diagn Ther **29**(3): 183-196.

Nicolaides, K. H., et al. (1992). "Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy." BMJ **304**(6831): 867-869.

Nicolaides, K. H., et al. (2012). "Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population." Am J Obstet Gynecol **207**(5): 374 e371-376.

Nicolaides, K. H., et al. (2013). "First-trimester contingent screening for trisomy 21 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing." Ultrasound Obstet Gynecol **42**(1): 41-50.

Norton, M., et al. (2015). "358: Relationship between 1st trimester fetal fraction of cell-free DNA from maternal plasma and preeclampsia in a large general pregnancy population." American Journal of Obstetrics and Gynecology **212**(1).

Norton, M. E., et al. (2012). "Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18." Am J Obstet Gynecol **207**(2): 137 e131-138.

Norton, M. E. and R. J. Wapner (2015). "Cell-free DNA Analysis for Noninvasive Examination of Trisomy." N Engl J Med **373**(26): 2582.

Osborne, C. M., et al. (2013). "Discordant noninvasive prenatal testing results in a patient subsequently diagnosed with metastatic disease." Prenat Diagn **33**(6): 609-611.

Palomaki, G. E., et al. (2012). "DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study." Genet Med **14**(3): 296-305.

Palomaki, G. E. and E. M. Kloza (2018). "Prenatal cell-free DNA screening test failures: a systematic review of failure rates, risks of Down syndrome, and impact of repeat testing." Genet Med **20**(11): 1312-1323.

Palomaki, G. E., et al. (2011). "DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study." Genet Med **13**(11): 913-920.

Palomaki, G. E., et al. (2015). "Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative?" Prenat Diagn **35**(3): 289-293.

Peng, X. L. and P. Jiang (2017). "Bioinformatics Approaches for Fetal DNA Fraction Estimation in Noninvasive Prenatal Testing." Int J Mol Sci **18**(2).

Pergament, E., et al. (2014). "Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort." Obstet Gynecol **124**(2 Pt 1): 210-218.

Pescia, G., et al. (2017). "Cell-free DNA testing of an extended range of chromosomal anomalies: clinical experience with 6,388 consecutive cases." Genet Med **19**(2): 169-175.

Petersen, O. B., et al. (2014). "Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: population-based study from a country with existing first-trimester screening." Ultrasound Obstet Gynecol **43**(3): 265-271.

Prodan, N. C., et al. (2022). "Universal cell free DNA or contingent screening for trisomy 21 - does it make a difference? A comparative study with real data." Fetal Diagn Ther.

Quezada, M. S., et al. (2015). "Screening for trisomies 21, 18 and 13 by cell-free DNA analysis of maternal blood at 10-11 weeks' gestation and the combined test at 11-13 weeks." Ultrasound Obstet Gynecol **45**(1): 36-41.

Rava, R. P., et al. (2014). "Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X." Clin Chem **60**(1): 243-250.

Ren, Y., et al. (2018). "Noninvasive prenatal test for FGFR3-related skeletal dysplasia based on next-generation sequencing and plasma cell-free DNA: Test performance analysis and feasibility exploration." Prenat Diagn **38**(11): 821-828.

Revello, R., et al. (2016). "Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result." Ultrasound Obstet Gynecol **47**(6): 698-704.

Rolnik, D. L., et al. (2018). "Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia." Ultrasound Obstet Gynecol **52**(6): 722-727.

Salomon, L. J., et al. (2013). "ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan." Ultrasound Obstet Gynecol **41**(1): 102-113.

Salomon, L. J., et al. (2003). "Revisiting first-trimester fetal biometry." Ultrasound Obstet Gynecol **22**(1): 63-66.

Santorum, M., et al. (2017). "Accuracy of first-trimester combined test in screening for trisomies 21, 18 and 13." Ultrasound Obstet Gynecol **49**(6): 714-720.

Sarno, L., et al. (2016). "Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy." Ultrasound Obstet Gynecol **47**(6): 705-711.

Schmid, M., et al. (2018). "Prenatal Screening for 22q11.2 Deletion Using a Targeted Microarray-Based Cell-Free DNA Test." Fetal Diagn Ther **44**(4): 299-304.

Scott, F., et al. (2018). "Rare autosomal trisomies: Important and not so rare." Prenat Diagn **38**(10): 765-771.

Scott, F. P., et al. (2018). "Factors affecting cell-free DNA fetal fraction and the consequences for test accuracy." J Matern Fetal Neonatal Med **31**(14): 1865-1872.

Snijders, R. J., et al. (1998). "UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group." Lancet **352**(9125): 343-346.

Sonek, J. D., et al. (2016). "Inverted Pyramid of Care." Clin Lab Med **36**(2): 305-317.

Sparks, A. B., et al. (2012). "Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18." Am J Obstet Gynecol **206**(4): 319 e311-319.

Sparks, A. B., et al. (2012). "Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy." Prenat Diagn **32**(1): 3-9.

Srebniak, M. I., et al. (2014). "Abnormal non-invasive prenatal test results concordant with karyotype of cytotrophoblast but not reflecting abnormal fetal karyotype." Ultrasound Obstet Gynecol **44**(1): 109-111.

Srebniak, M. I., et al. (2017). "The influence of SNP-based chromosomal microarray and NIPT on the diagnostic yield in 10,000 fetuses with and without fetal ultrasound anomalies." Hum Mutat **38**(7): 880-888.

Stokowski, R., et al. (2015). "Clinical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies." Prenat Diagn **35**(12): 1243-1246.

Stumm, M., et al. (2012). "Noninvasive prenatal detection of chromosomal aneuploidies using different next generation sequencing strategies and algorithms." Prenat Diagn **32**(6): 569-577.

Suzumori, N., et al. (2018). "Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma for the prediction of hypertensive disorders of pregnancy." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **224**: 165-169.

Syngelaki, A., et al. (2011). "Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11-13 weeks." Prenat Diagn **31**(1): 90-102.

Taglauer, E. S., et al. (2014). "Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease." Placenta **35 Suppl**: S64-68.

Tan, Y., et al. (2016). "Noninvasive prenatal testing (NIPT) in twin pregnancies with treatment of assisted reproductive techniques (ART) in a single center." Prenat Diagn **36**(7): 672-679.

Taylor-Phillips, S., et al. (2016). "Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis." BMJ Open **6**(1): e010002.

Tjoa, M. L., et al. (2006). "Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetoplacental DNA." Am J Pathol **169**(2): 400-404.

Troia, R., et al. (2018). "Cell-Free DNA, High-Mobility Group Box-1, and Procalcitonin Concentrations in Dogs With Gastric Dilatation-Volvulus Syndrome." Front Vet Sci **5**: 67.

van der Meij, K. R. M., et al. (2019). "TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands." Am J Hum Genet **105**(6): 1091-1101.

Ville, Y., et al. (1992). "First-trimester diagnosis of nuchal anomalies: significance and fetal outcome." Ultrasound Obstet Gynecol **2**(5): 314-316.

von Kaisenberg, C., et al. (2016). "Quality Requirements for the early Fetal Ultrasound Assessment at 11-13+6 Weeks of Gestation (DEGUM Levels II and III)." Ultraschall Med **37**(3): 297-302.

Wagner, P., et al. (2016). "First-trimester screening for trisomies 18 and 13, triploidy and Turner syndrome by detailed early anomaly scan." Ultrasound Obstet Gynecol **48**(4): 446-451.

Wald, N. J. (2014). "The triple test." Clin Chem **60**(1): 269-270.

Wald, N. J., et al. (1977). "Maternal serum-alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy. Report of U.K. collaborative study on alpha-fetoprotein in relation to neural-tube defects." Lancet **1**(8026): 1323-1332.

Wald, N. J., et al. (1988). "Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy." BMJ **297**(6653): 883-887.

Wang, E., et al. (2013). "Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma." Prenat Diagn **33**(7): 662-666.

Wax, J. R., et al. (2015). "Prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA." Am J Obstet Gynecol **213**(6): 879-880.

Wellesley, D., et al. (2012). "Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe." Eur J Hum Genet **20**(5): 521-526.

Wilkins-Haug, L., et al. (2018). "Biological explanations for discordant noninvasive prenatal test results: Preliminary data and lessons learned." *Prenat Diagn* **38**(6): 445-458.

Wright, D., et al. (2008). "A mixture model of nuchal translucency thickness in screening for chromosomal defects." *Ultrasound Obstet Gynecol* **31**(4): 376-383.

Wright, D., et al. (2014). "First-trimester screening for trisomies 21, 18 and 13 by ultrasound and biochemical testing." *Fetal Diagn Ther* **35**(2): 118-126.

Wright, D., et al. (2015). "A unified approach to risk assessment for fetal aneuploidies." *Ultrasound Obstet Gynecol* **45**(1): 48-54.

Yaron, Y., et al. (2015). "Current Status of Testing for Microdeletion Syndromes and Rare Autosomal Trisomies Using Cell-Free DNA Technology." *Obstet Gynecol* **126**(5): 1095-1099.

Zdravkovic, T., et al. (2005). "The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review." *Placenta* **26 Suppl A**: S81-86.

Zelig, C. M., et al. (2016). "Chorionic Villus Sampling, Early Amniocentesis, and Termination of Pregnancy Without Diagnostic Testing: Comparison of Fetal Risk Following Positive Non-invasive Prenatal Testing." *J Obstet Gynaecol Can* **38**(5): 441-445 e442.

Zhou, Y., et al. (2015). "Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma." *Reprod Sci* **22**(11): 1429-1435.

Zimmermann, B., et al. (2012). "Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci." *Prenat Diagn* **32**(13): 1233-1241.