

Aus dem  
Department für Frauengesundheit Tübingen  
Universitäts-Frauenklinik

**Falsch-positiv Rate der zellfreien DNA-Analyse bzw.  
des kombinierten Ersttrimesterscreenings auf das  
Trisomie 21 Risiko**

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

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

**vorgelegt von**

**Sroka, Fabrina**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. O. Kagan  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. T. Schmidt

Tag der Disputation: 19.09.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Mutterschaftsrichtlinien .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Screening auf Chromosomenstörungen .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Mütterliches Altersscreening .....	12
1.2.2 Serumscreening (Triple und Quadruple Test) .....	14
1.2.3 Kombiniertes Ersttrimesterscreening .....	16
1.2.3.1 Fetale Nackentransparenz .....	17
1.2.3.2 Serum-Biochemie .....	20
1.2.3.3 Erweiterungen für das ETS.....	21
1.2.4 Zellfreie DNA (cfDNA)-Analyse .....	22
<b>1.3 Invasive Diagnostik .....</b>	<b>27</b>
<b>1.4 Fehlbildungen insgesamt .....</b>	<b>27</b>
1.4.1 Anteil der genetischen Erkrankungen .....	29
1.4.2 Anteil der Trisomie 21 an allen Chromosomenstörungen .....	29
<b>1.5 Prädiktion von Fehlbildungen US im 1. Trimenon.....</b>	<b>31</b>
<b>1.6 Problem- und Fragestellung .....</b>	<b>35</b>
1.6.1 Fragestellung .....	36
<b>2 Methoden.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Ethik .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 Ein- und Ausschlusskriterien .....</b>	<b>38</b>
<b>2.3 Ausführliche Ultraschallkriterien.....</b>	<b>39</b>
<b>2.4 Randomisierung.....</b>	<b>40</b>
<b>2.5 Studienarme .....</b>	<b>40</b>
<b>2.6 Erwartete falsch-positiv Rate und invasive Diagnostik .....</b>	<b>43</b>
<b>2.7 Befragungen der Patientinnen .....</b>	<b>44</b>
<b>2.8 Verlaufsdatenerhebung .....</b>	<b>44</b>
<b>2.9 Enddatenerhebung .....</b>	<b>45</b>
<b>2.10 Power-Berechnung und Statistische Auswertung .....</b>	<b>46</b>
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Charakteristika der Studienarme .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 NT-Messung und Risikoverteilung.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3 Nicht-auswertbare cfDNA-Analysen.....</b>	<b>59</b>
<b>3.4 Zusätzliches Screening, Screening-positive Fälle und invasive Diagnostik .....</b>	<b>60</b>
<b>3.5 Erkannte Fehlbildungen mittels Ultraschalls vor und nach Risikoberechnung.....</b>	<b>61</b>
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>64</b>

4.1	Studienausschluss aufgrund auffälligen US .....	70
4.2	Weitere Aspekte des kombinierten ETS .....	71
4.3	Weitere Aspekte der cfDNA-Analyse .....	72
4.4	Fazit für Beratung und Ausblick für weitere Untersuchungen.....	73
5	<i>Limitationen</i> .....	77
6	<i>Zusammenfassung</i> .....	79
	<i>Sponsoring</i> .....	80
	<i>Literaturverzeichnis</i> .....	81
	<i>Abbildungsverzeichnis</i> .....	95
	<i>Tabellenverzeichnis</i> .....	96
	<i>Frage-, Aufklärungs- und Einwilligungsbögen</i> .....	97
	<i>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift</i> .....	109
	<i>Veröffentlichung</i> .....	110
	<i>Danksagung</i> .....	118

## Abkürzungsverzeichnis

AC	Amniozentese; engl. Amniocentesis
AU	Abdomenumfang
AFP	Alphafetoprotein
$\beta$ -hCG	Freie $\beta$ -Kette des humanen Choriongonadotropin
BPD	Biparietaler Durchmesser
C21	Chromosom 21
cfDNA	Zellfreie DNA; engl. cell-free DNA
cffDNA	Zellfreie fetale DNA; engl. cell-free fetal DNA
CI	Konfidenzintervall, engl. confidence interval
CVS	Chorionzottenbiopsie; engl. chorionic villus sampling
$\Delta$	Delta
DANSR	Digitale Analyse ausgewählter Regionen, engl. digital analysis of selected regions
DEGUM	Deutsche Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin
DoE	Grad der Extreme; engl. degree of extremeness
DR	Detektionsrate
DV	Ductus venosus
ETS	Ersttrimester-Screening
FF	Fetale Fraktion
FL	Femurlänge
FMF	Fetal Medicine Foundation (UK)
FORTE	FF-optimiertes Trisomierisiko; engl. fetal-fraction optimized risk of trisomy evaluation
FPR	Falsch-positiv-Rate
hCG	humanen Choriongonadotropin
LKGS	Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte
MoM	Vielfaches des Medians; engl. multiples of the Median
n	Anzahl
NB	Nasenbein
NIPT	Nicht-invasiver Pränataltest

NT	(fetale) Nackentransparenz
PAPP-A	schwangerschaftsassoziertes Plasmaprotein A; engl. pregnancy-associated plasma protein A
PPW	Positiver Prädikationswert
SD	Standardabweichung
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
SSW	Schwangerschaftswoche
T13	Trisomie 13
T18	Trisomie 18
T21/18/13	Trisomie 21
TI	Trikuspidalklappeninsuffizienz
uE3	Unkonjugiertes Östriol, engl. unconjugated estriol

Wenn bei bestimmten Begriffen, die sich auf Personengruppen beziehen, nur die männliche Form gewählt wurde, so ist dies nicht geschlechtsspezifisch gemeint, sondern wurde ausschließlich aus Gründen der Lesbarkeit gewählt.

# 1 Einleitung

Es wird angenommen, dass bei bis zu 1:150 Schwangerschaften eine Trisomie 21 (T21) vorliegt, jedoch  $\frac{3}{4}$  in Fehlgeburten resultieren (Noble 1998). Dabei liegt die Fehlgeburtsrate zwischen der 10. Schwangerschaftswoche (SSW) und Geburt bei etwa 32 %, zwischen der 16. SSW und Geburt bei 25 % (Savva et al. 2006). In Deutschland wurden im Jahr 2016 792.131 Kinder geboren (Statistische Bundesamt (Destatis) 28.03.2018). In diesem Jahr wurden in den aktiven Geburtenregistern des Mainzer Modells und von Sachsen-Anhalt 47.699 und 296.527 Geburten beziehungsweise Schwangerschaften erfasst, davon 166 und 496 mit T21. Dies entspricht einer Prävalenz von 34,8 und 16,7 auf 10000 Geburten (European Union 2021).

Die T21 beschreibt das dreifache, anstelle des zweifachen, Vorliegen des Genmaterials des Chromosoms 21 (Hennig 2002). Das klinische Bild der T21 wird als Down-Syndrom bezeichnet. Das Down-Syndrom ist die häufigste Ursache für schwere geistige Behinderungen (Bull 2020). Eine geistige Behinderung ist definiert als mindestens zwei Standardabweichungen (SD) unter dem durchschnittlichen Intelligenzquotienten der Allgemeinbevölkerung. Der Durchschnitt liegt bei 100, der Grenzwert von zwei SD unterhalb bei 70. Es wird angenommen, dass etwa 20 % aller Kinder mit Down-Syndrom eine milde geistige Behinderung, sprich mindestens einen Intelligenzquotienten von 50 bis 70, aufweisen. Bei etwa 70 % liegt eine mittelschwere geistige Behinderung mit einem Intelligenzquotienten zwischen 20 und 50 vor. 10 % leiden an einer schweren geistigen Behinderung mit einem Intelligenzquotienten unter 20 (Alberman et al. 1992). Jedoch lernen in Deutschland heute fast alle Kinder mit Down-Syndrom lesen, schreiben und rechnen, ein recht selbstständiges und selbstbestimmtes Leben ist mit Unterstützung möglich (Hoppen 2021). Zusätzlich zu den kognitiven Einschränkungen leiden zwischen 50 und 60 % an schweren angeborenen Fehlbildungen. Am häufigsten sind mit etwa 44 % die angeborenen Herzfehler, gefolgt von gastrointestinalen Fehlbildungen mit etwa 6 %. Auch wurden Fehlbildungen des Urogenitaltrakts, der Extremitäten und

angeborene Katarakte beschrieben (Alberman et al. 1992). Bei den angeborenen Herzfehlern treten insbesondere der atrioventrikuläre Septumdefekt, Ventrikelseptumdefekte, Vorhofseptumdefekte, die Fallot-Tetralogie und ein persistierender Ductus arteriosus auf. Weitere ernste gesundheitliche Probleme, die mit Down-Syndrom assoziiert sind und deutlich häufiger als in der Allgemeinbevölkerung auftreten, sind Leukämien und Tumore mit einer Inzidenz von etwa 2 bis 3 %, Schilddrüsenerkrankungen bei etwa 52 %, neurologische Entwicklungsstörungen mit 9 bis 26 %, Autismus bei 7 bis 16 % und Demenz mit etwa 5 % bei den unter 40-Jährigen und 68 bis 80 % im Alter von 65 Jahren. Über 70 % haben orthopädische Probleme, 55 % leiden an Dysphagie und 65 % an Schlafstörungen. Immundefizite zusammen mit obstruktiven Atemwegen begünstigen besonders respiratorische Infekte, die bei  $\leq 40$  % der Patienten mit Down-Syndrom als Todesursache angegeben werden (Hoppen 2021). Durch diese gesundheitlichen Besonderheiten ergeben sich erhöhte Kosten im Vergleich zu Individuen ohne chromosomale Aberrationen. So berechneten Kageleiry et al. die durchschnittlichen medizinischen Mehrkosten für Kinder mit Down-Syndrom zwischen Geburt und Vollendung des 18. Lebensjahrs auf etwa \$250.000 US Dollar (Kageleiry et al. 2017). Die gesamten gesellschaftlichen Mehrkosten, direkte durch entstandene Kosten und indirekte durch ausbleibende Einnahmen, wurden auf \$677000 bis \$900.000 US Dollar berechnet (Ball et al. 2007; Cuckle et al. 2013; Song et al. 2013). In Deutschland liegt der Fokus eher auf guter Informationsverfügbarkeit für Betroffene, deren Eltern und den behandelnden Ärzten, um die adäquate Betreuung und Förderung, sowie Behandlung und/oder Prävention von assoziierten Erkrankungen zu gewährleisten (Hoppen 2021; AWMF 2016).

In den letzten 40 Jahren hat sich das Screening auf T21 deutlich ausgeweitet, neue Tests sind zunehmend spezifischer und sensitiver. Auch ist die Testung auf weitere Fehlbildungen oder genetische Erkrankungen möglich (Cuckle und Maymon 2016). Jedoch ist für eine definitive Diagnose einer Trisomie weiterhin die Durchführung einer invasiven Diagnostik von Nöten (Gemeinsamer Bundesausschuss 2021). Die Entwicklung dieser Test wird auch durch den



Wunsch werdender Mütter ein gesundes Kind zur Welt zu bringen getrieben. Von den insgesamt 496 mit T21 betroffenen Schwangerschaften und Lebendgeburten in Sachsen-Anhalt 2016 wurde bei 272 ein Schwangerschaftsabbruch nach einer pränatalen Diagnose durchgeführt, was 54,8 % aller T21-Schwangerschaften entspricht. Im Vergleich hierzu wurde ein Abbruch durchschnittlich nur bei 1071 von insgesamt 9411 Schwangerschaften, also bei 11,4 %, durchgeführt, wenn alle großen fetalen Anomalien im Jahr 2016 betrachtet wurden. Im Mainzer Modell waren die Proportionen ähnlich; 51,8 % aller T21 Schwangerschaften resultierten nach pränataler Diagnose in einem Schwangerschaftsabbruch, während es bei Betrachtung aller großen Anomalien nur 11,5 % waren (European Union 2021).

In Deutschland ist der aktuelle Goldstandard für das Screening auf T21 das kombinierte Ersttrimesterscreening (ETS). Es ermöglicht die Detektion von etwa 90 % aller Feten mit T21, jedoch werden ebenso etwa 3 % aller euploiden Feten fälschlich positiv getestet. Bei einem positiven Screeningtest wird zur invasiven Diagnostik geraten, die mit einem Fehlgeburtsrisiko einhergeht. Auch zur Reduktion von Fehlgeburten wird die Entwicklung von Screeningtests mit einer besseren Testgüte angestrebt. Die zellfreie fetale DNA (engl. cell-free fetal DNA; cfDNA)-Analyse verspricht die Detektion von 99 % aller Feten mit T21 bei einer falsch-positiv Rate (FPR) von 0,1 % und wäre somit sensitiver und spezifischer als das ETS beim Screening für die T21 (Gil et al. 2017). Ziel der Studie ist, die FPR des ETS und der cfDNA-Analyse beim Screening auf T21 in einem Zentrum für Pränataldiagnostik klinisch zu verifizieren und einen Screening-Algorithmus zur Reduktion der gesamten FPR zu entwickeln, unter Berücksichtigung der entstehenden Kosten und der Möglichkeit, auf weitere fetale Anomalien und Schwangerschaftskomplikationen zu testen.

## 1.1 Mutterschaftsrichtlinien

„Die vom Gemeinsamen Bundesausschuss (...) beschlossenen Richtlinien dienen der Sicherung einer nach den Regeln der ärztlichen Kunst und unter

Berücksichtigung des allgemein anerkannten Standes der medizinischen Erkenntnisse ausreichenden, zweckmäßigen und wirtschaftlichen ärztlichen Betreuung der Versicherten während der Schwangerschaft und nach der Entbindung“ (Gemeinsamer Bundesausschuss 2016, 2021). In den Mutterschafts-Richtlinien wird explizit für die ärztliche Versorgung die Vorrangigkeit der frühzeitigen Erkennung von Risikoschwangerschaften und Risikogeburten festgelegt. Die ärztliche Betreuung soll zweckmäßig und ausreichend sein, jedoch sollen entbehrliche Kosten vermieden werden. Des Weiteren sollen alle Maßnahmen durch Ärzte ausgeführt werden, die über die entsprechenden Kenntnisse und Einrichtungen verfügen. Laut den Richtlinien sollen lediglich drei Basisultraschalluntersuchungen, innerhalb der von den gesetzlichen Krankenkassen übernommenen Regelversorgung, durchgeführt werden. Sie dienen der Verlaufsbeobachtung einer normalen Schwangerschaft mit dem Ziel der genauen Gestationsaltersbestimmung, der Kontrolle der somatischen Entwicklung des Feten, der Suche nach auffälligen fetalen Merkmalen sowie dem Erkennen von Mehrlingsschwangerschaften (Gemeinsamer Bundesausschuss 2016, 2021). Alle weiteren Ultraschalluntersuchungen und Screeningmethoden zur Risikoberechnung bezüglich eines Down-Syndroms beim Feten gehören zu den sogenannten individuellen Gesundheitsleistungen (IGeL-Leistungen) und werden bei einer normalen Schwangerschaft mit unauffälligen Voruntersuchungen und Anamnese in der Regel nicht von den Krankenkassen übernommen (Gemeinsamer Bundesausschuss 2016, 2021). Mit Inkrafttreten der aktuellen Version der „Mutterschafts-Richtlinien“ am 01.01.2022 hat der nicht-invasive Pränataltest (NIPT) eine Sonderstellung erhalten. Um invasive Maßnahmen, wie der Fruchtwassergewinnung durch Amniozentese (engl. Amniocentesis; AC) oder Gewinnung von Chorionzotten (engl. chorionic villus sampling; CVS) beziehungsweise Plazentagewebe, zu vermeiden, kann eine NIPT mit Frage auf das Vorliegen einer T21, Trisomie 18 (T18) oder Trisomie 13 (T13) als Kassenleistung durchgeführt werden. Liegen Befunde vor, die eine invasive Abklärung von Nöten machen, kann die NIPT nicht in diesem Rahmen durchgeführt werden. Die Testung ist jedoch nicht an eine statistisch erhöhte

Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Trisomie gebunden (Gemeinsamer Bundesausschuss 2021).

Weitere Bedingungen sind, dass nur NIPT-Verfahren mit Qualitätssicherung für die Validität der Ergebnisse durchgeführt werden, die für die T21 eine Sensitivität von mindestens 97 % und eine Spezifität von mindestens 99 % aufweisen, gesichert durch eine prospektiv geplante, verblindete Studie. Zudem muss der beratende Arzt über eine Qualifikation gemäß des Gendiagnostikgesetzes verfügen und darauf basierend aufklären und beraten (Gemeinsamer Bundesausschuss 2021). Ein Befund der auf das Vorliegen einer Trisomie hinweist, muss darauf verweisen, dass eine gesicherte Diagnose einer invasiven Abklärung bedarf (Gemeinsamer Bundesausschuss 2021).

## 1.2 Screening auf Chromosomenstörungen

Aktuelle Screeningmethoden auf Chromosomenstörungen haben sich seit den frühen 1980er Jahren deutlich weiterentwickelt und umfassen von anfänglich nur dem mütterlichen Alter mittlerweile diverse Parameter, die meisten aus serologischen oder sonographischen Untersuchungen stammend (Cuckle und Maymon 2016). Was jedoch unverändert geblieben ist, ist das durch nicht-invasive Methoden bislang nur die Erstellung eines individuellen Risikoprofils möglich ist. Somit dienen aktuelle Screeningmethoden lediglich zur Bestimmung des Risikokollektivs innerhalb der Gruppe aller Schwangeren, für die eine invasive Diagnostik laut Leitlinien in Erwägung gezogen werden sollte. Die Diagnose einer Chromosomenstörung bleibt der invasiven Diagnostik vorbehalten (Gemeinsamer Bundesausschuss 2021; Salomon et al. 2017).

Die Qualität der verschiedenen Screeningtests lässt sich anhand der Detektionsrate (DR) und FPR ermitteln (Tabelle 1). Hierbei beschreibt die DR den Anteil der getesteten Feten, welche eine T21 aufweisen und auch auf diese zutreffend getestet wurden. Die FPR hingegen beschreibt den Anteil von Feten ohne T21, die jedoch fälschlich als auffällig getestet wurden. Zudem gibt der

positive Prädikationswert (PPW) den Anteil aller richtig positiv getesteten zu allen Screening-positiven Feten gesamt an und beschreibt somit die Wahrscheinlichkeit, dass nach einem positiven Screeningtest tatsächlich eine T21 vorliegt.

*Tabelle 1: Wahrheitsmatrix für richtige und falsche Screening-Klassifikationen.*

	Fetus mit Trisomie 21	Fetus ohne Trisomie 21
Screening positiv	richtig positiv → Detektionsrate/Sensitivität	falsch positiv
Screening negativ	falsch negativ	richtig negativ → Spezifität

Als auffällig wird ein Screening-Ergebnis oberhalb eines zuvor bestimmten Schwellenwertes definiert. Um die DR anzuheben, müsste ein zuvor festgelegter Schwellenwert herabgesetzt werden, was jedoch auch zu einem Anstieg der FPR führen würde (Wright et al. 2014). Daher würden automatisch mehr Frauen in die Risikogruppe fallen, was neben einer erhöhten Rate von invasiver Diagnostik auch einen psychisch negativen Effekt auf die Frauen zur Folge hätte (Wagner et al. 2018). Somit ist die Festlegung des Schwellenwertes immer ein Kompromiss zwischen dem Wunsch alle Schwangerschaften mit einer T21 zu detektieren und einer tolerierbaren Quote von fälschlich Screening-positiv kategorisierten Frauen (Wright et al. 2014). In der Regel ist der Schwellenwert so gelegt, dass 5 % aller euploiden Feten als auffällig kategorisiert werden (Kagan et al. 2013).

### 1.2.1 Mütterliches Altersscreening

1933 wurde erstmals der Zusammenhang zwischen mütterlichem Alter und dem Risiko einer Schwangerschaft mit einer T21 hergestellt (Abbildung 1) und 1968 wurde erstmals ein Fetus pränatal mit T21 diagnostiziert (Penrose 1933; Valenti et al. 1968). Dies führte zu dem ersten Screening für die T21, die in den frühen 1980 lediglich über das mütterliche Alter möglich war. Ein Schwellenwert von 35

Jahren wurde festgelegt, um das Risikokollektiv zu bestimmen (Wald et al. 1997).

Zu Beginn der 1980 Jahre lag auf dem Schwellenwert „35 Jahre“ die 95. Perzentile des Altersspektrums der werdenden Mütter, somit gehörten nur 5% aller Schwangeren zum Risikokollektiv (Wald et al. 1997; Eiben et al. 2014). 2020 waren in Deutschland bei 224.064 von insgesamt 772.790 Lebendgeburten die Mütter 35 Jahre oder älter (Statistische Bundesamt (Destatis)). Somit liegt durch das zunehmend höhere Alter der Schwangeren der Schwellenwert „35 Jahre“ über der 75. Perzentile, womit mehr als 25 % aller Schwangeren zu dem Risikokollektiv gehören würden. Die Anzahl der Totgeburten, Aborten und induzierten Schwangerschaftsabbrüchen ist hierbei noch nicht berücksichtigt. Dies stellt die Sinnhaftigkeit des Tests als alleinige Screeningmethode in Frage. Zudem liegt bei einem reinen altersbasierten Screening die DR nur bei etwa 30 % (Wald et al. 1997). In Verbindung mit anderen Parametern fließt das mütterliche Alter jedoch weiterhin in komplexere Screening-Algorithmen standardmäßig ein.

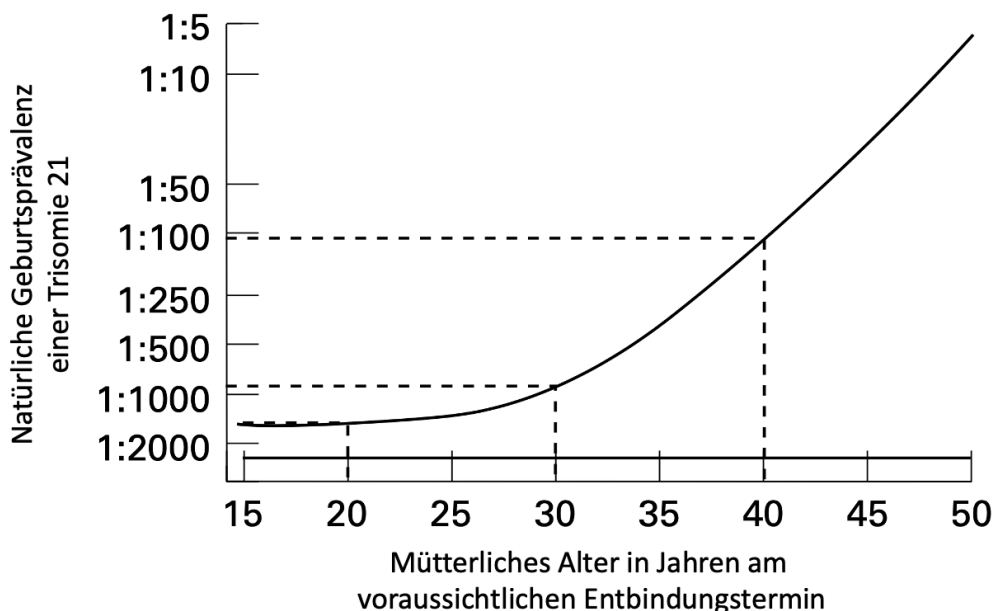


Abbildung 1: Natürliche Geburtsprävalenz einer Trisomie 21 nach mütterlichem Alter bei Geburt (Adaptiert von Noble 1998).

### 1.2.2 Serumscreening (Triple und Quadruple Test)

1987 wurde gezeigt, dass zwischen der 14. und 22. Schwangerschaftswoche (SSW) der mediane mütterliche Serumspiegel für Alphafetoprotein (AFP), ursprünglich verwendet für das Screening auf Neuralrohrdefekte, bei T21-Schwangerschaften 25% unter dem von euploiden Schwangerschaften lag. Diese Veränderung ist nicht durch das mütterliche Alter beeinflusst (Cuckle et al. 1987). Durch die zusätzliche Verwendung von AFP mit dem mütterlichen Alter konnte die DR für Trisomie 21 % auf 35 % angehoben werden, bei einer FPR von 5 % (Cuckle et al. 1987). Ebenfalls zeigte sich zu dieser Zeit, dass die mütterlichen Serumspiegel von humanem Choriongonadotropins (hCG), später die  $\beta$ -Kette von hCG ( $\beta$ -hCG), doppelt so hoch und von unkonjugiertem Östriol (uE3, engl. unconjugated estriol) 25 % unter der Norm bei T21-Schwangerschaften lagen. Die Analyse dieser drei Serummarker, AFP, hCG/ $\beta$ -hCG und uE3, in der 15. bis 22. SSW, zusammen mit dem mütterlichen Alter ergaben den sogenannten Triple-Test. Dieser wies eine DR von etwa 60 %, später 70 % durch genaue sonographische Bestimmung des Gestationsalters, bei gleichbleibender FPR von 5 % auf (Wald et al. 1997).

Mit der Identifizierung weiterer Serummarker wurde 1996 gezeigt, dass in T21-Schwangerschaften die Inhibin A-Serumspiegel durchschnittlich um das 1,76-fache erhöht sind (Wald et al. 1996). Der so entstandene Quadruple-Test, durchführbar in der 15. bis 22. SSW, wies einen Anstieg der DR auf 76 % auf, bei unveränderter FPR (Wald et al. 1997). Ebenfalls wurde das schwangerschaftsassozierte Plasmaprotein A (engl. pregnancy-associated plasma protein A; PAPP-A) als Serummarker identifiziert. Da der Unterschied der Plasmakonzentration von PAPP-A bei T21 in Vergleich zu euploiden Schwangerschaften zu Beginn der Schwangerschaft am größten ist und im Verlauf des 1. Trimenons rapide abnimmt, eignet sich PAPP-A nicht als ein Serummarker für einen Test, welcher im 2. Trimenon durchgeführt wird (Cuckle und Maymon 2016).

Da die Idealergebnisse der Serumparameter weit gestreut und von mehreren Faktoren abhängig sind, wie beispielsweise SSW, mütterliches Gewicht, Einlings- bzw. Mehrlingsgravidität, Ethnizität, Raucherstatus, spontaner Konzeption oder assistierter Reproduktion, usw., werden sie als das Vielfache des Medians (engl. Multiples of the median; MoM) angegeben (Spencer et al. 2002; Spencer et al. 2003b; Spencer et al. 2000b; Spencer et al. 2004; Liao et al. 2001). Zur Berechnung wird die gemessene Serumkonzentration durch die erwartete Serumkonzentration bei einer Schwangerschaft mit einem euploiden Fetus dividiert. Somit werden die Ergebnisse immer in Bezug zum Idealwert angegeben. Die prospektive Multizentrum-Studie SURUSS erhob bei 47.053 Einlingsschwangerschaften, davon 101 mit T21, Serumparameter und testete sie gegen 5-gepaarte Stichproben, sowie 600 weitere Proben. Aus den erhobenen Daten wurden die in Tabelle 2 gelisteten Abweichungen der MoMs von T21-Schwangerschaften zu unbetroffenen Schwangerschaften berechnet (Wald et al. 2003).

*Tabelle 2: Mediane MoM-Werte in Down-Syndrom-Schwangerschaften und Detektionsraten bei einer 5% Falsch-positiv-Rate für individuelle Marker (ohne Verwendung des mütterlichen Alters) nach Gestationsalter (Wald et al. 2003).*

*MoM, Multiples of the Median; DR, Detektionsrate; AFP, Alphafetoprotein; uE3, unkonjugiertes Östriol; hCG, humanes Choriongonadotropin;  $\beta$ -hCG,  $\beta$ -Kette des humanen Choriongonadotropins; PAPP-A, schwangerschaftsassoziertes Plasmaprotein-A.*

Serumparameter	Abgeschlossene Schwangerschaftswochen			
	10 <sup>a</sup>		14-20	
	Median (MoM)	DR (%)	Median (MoM)	DR (%)
AFP	0,86	8	0,74	24
uE3	0,99	13	0,70	40
hCG	0,96	5	2,05	40
$\beta$ -hCG	1,62	19	2,66	50
Inhibin-A	0,94	5	2,54	59
PAPP-A	0,34	58	1,11	5

<sup>a</sup> Der Median für Serum-AFP basiert auf 10-13 abgeschlossenen Schwangerschaftswochen zusammen, da dieser sich nicht wesentlich im Schwangerschaftsverlauf ändert.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, ist Inhibin-A der aussagekräftigste Serummarker. B-hCG ist ein stärkerer Marker als hCG und gewinnt im 2. Trimenon an Signifikanz. Die mit am längsten bekannten Serummarker AFP, uE3 und hCG sind im 2. Trimenon die Marker mit der geringsten Testgüte (Cuckle und Maymon 2016; Wald et al. 1997).

So wie andere Screeningtests dient der Triple- bzw. der Quadruple-Test lediglich zur statistischen Risikoberechnung auf ein erhöhtes Risiko einer Chromosomenstörung oder einer Fehlbildung. Bei einer FPR von 9,3 % bzw. von 6,2 % des Triple- bzw. des Quadruple-Tests bei einer 85 % DR wurde die Testung weitgehend durch andere nicht-invasive Verfahren mit einer besseren Spezifität bei gleicher Sensitivität ersetzt, zumal die Durchführung in einen späteren Zeitraum der Schwangerschaft fällt als neuere Testverfahren (Wald et al. 2003). Sie kann aber weiterhin als IGeL-Leistung durchgeführt werden.

### 1.2.3 Kombiniertes Ersttrimesterscreening

Das kombinierte ETS basiert auf der fetalen Nackentransparenz (NT)-Messung mittels Ultraschalls in der 12. – 14. SSW, sowie der Messung der Serummarker  $\beta$ -hCG und PAPP-A im mütterlichen Blut (Kagan et al. 2013). Für die Berechnung eines individuellen Risikos für eine fetale T21 werden diese Parameter mit dem mütterlichen Altersrisiko, dem Gestationsalter und der Anamnese kombiniert unter der Berücksichtigung der jeweiligen Wahrscheinlichkeitsquotienten (Kagan et al. 2013).

Somit entsteht die Berechnung eines persönlichen Risikos. In Deutschland liegt der verwendete Schwellenwert zur Definition des Risikokollektivs meist bei 1:150. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich liegen die dazugehörige DR und FPR etwa bei 90 % und 3 % (Wright et al. 2014).

Das kombinierte ETS gilt heute als Goldstandard der Risikoevaluation. In Deutschland wird die Untersuchung als IGeL-Leistung angeboten, je nach



Zentrum belaufen sich die Kosten auf 150 € bis 250 € (Gemeinsamer Bundesausschuss 2021). In vielen anderen Ländern Europas ist sie Bestandteil der gesetzlichen Regelversorgung (Ekelund et al. 2008; Morgan et al. 2013).

*Tabelle 3: Detektions- und Falsch-positiv-Raten bei unterschiedlichen Risikoschwellenwerten in Screening auf Trisomie 21 mittels ETS basierend auf dem mütterlichen Altersrisiko, der NT, PAPP-A und  $\beta$ -hCG (Ausschnitt aus (Wright et al. 2014). T21, Trisomie 21; FPR, Falsch-positiv-Rate; DR, Detektionsrate; T18/T13, Trisomien 18 und 13.*

Schwellenwert für T21-Risiko (1:x)	FPR, %	DR T21, %	DR T18/T13, %
100	2,0	86,4	65,8
200	3,5	89,9	69,8
300	4,7	91,7	71,9
400	5,8	92,9	73,3
500	6,8	93,7	74,4
1000	11,3	95,9	77,7
1500	15,0	96,9	79,8
2000	18,1	97,5	81,3
2500	20,8	97,9	82,5
3000	23,3	98,2	83,5
3500	25,5	98,4	84,4
4000	27,5	98,6	85,1
5000	31,2	98,8	86,4

### 1.2.3.1 Fetale Nackentransparenz

Erstmals wurde ein „erweiterter Raum im fetalen Nackenbereich, zwischen der Wirbelsäule und der Haut“ bei einer T21-Schwangerschaft im 2. Trimenon 1985 beschrieben (Benacerraf et al. 1985). Fünf Jahre später wurde die erhöhte NT auch bei einem Fetus mit T21 zwischen der 10. bis 11. SSW beschrieben (siehe Abbildung 2); die Autoren gingen von einer erhöhten Flüssigkeitsansammlung im Nacken aus (Szabó und Gellen 1990). Nicolaides et al. zeigten 1994, dass in einer Studienpopulation mit 1273

Einlingsschwangerschaften, 86 % der T21-Feten eine NT  $\geq 3$  mm aufwiesen und in der Gruppe mit einer NT  $< 3$  mm (Anzahl (n) = 1185 Schwangerschaften) die Inzidenz einer T21 fünfmal niedriger als die erwartete Inzidenz basierend auf dem mütterlichen Altersrisiko lag (Nicolaidis et al. 1994).

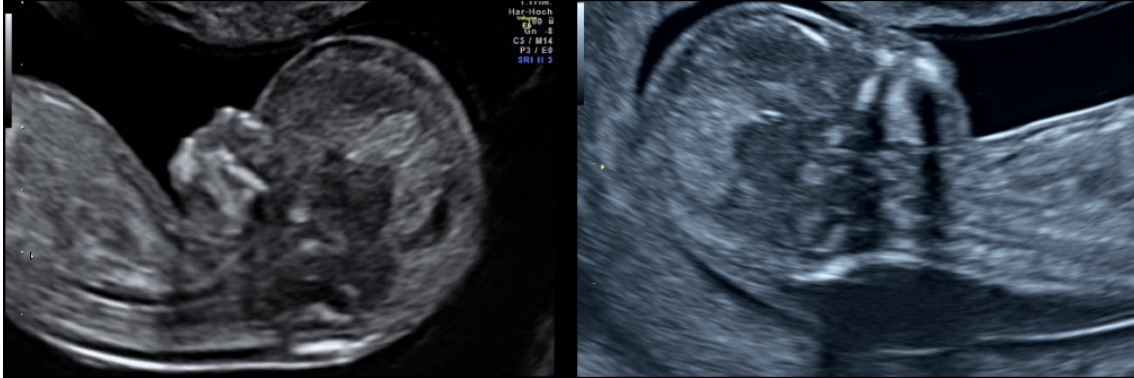


Abbildung 2: Normale Nackentransparenz (links) und erhöhte Nackentransparenz (rechts) bei einem Fötus mit Trisomie 21.

Um die NT richtig beurteilen und in die Risikoberechnung miteinbeziehen zu können, wurde die sonographische Messung der NT standardisiert und präzise Richtlinien zur Bilddarstellung des Fetus und Markierungsplatzierung für die Messung herausgegeben (Kozlowski et al. 2019; Fetal Medicine Foundation 2022). Folgende Kriterien sind zu erfüllen (Fetal Medicine Foundation 2022):

- Messung durch ausgebildete und qualifizierte Gynäkologen, die jährlich durch unabhängige Audits überprüft werden
- ein Gestationsalter zwischen 11+0 und 13+6 SSW
- einer Scheitel-Steiß-Länge (SSL) zwischen 45 mm und 84 mm
- neutraler Position des Fötus, mit dem Kopf in der Verlängerung der Wirbelsäule
- alleinige Darstellung des Kopfes und des Thorax (angemessene Vergrößerung)
- Darstellung des Kopfes und des Thorax in mediosagittaler Schnittebene mit Abbildung der Nasenspitze als echogener Punkt, des Nasenbeins (NB), der rechteckigen Maxilla, des Dienzephalons und der NT
- Genaue Unterscheidung von NT und Amnion

- Reduzierung des „Gain“ auf ein Minimum, um die NT-Linien klar und dünn abzubilden
- Messung des echoleeren Raums zwischen den NT-Linien; die horizontalen Linien der Messkreuze sollten gerade in den weißen Linien der NT verschwinden
- Messung der NT an der weitesten Stelle; hierzu soll die NT mehrfach gemessen werden und der größte Wert, der allen obigen Anforderungen entspricht, soll zur Risikoermittlung verwendet werden.

Bei der Interpretation gilt es die Abhängigkeit der NT zu der SSL zu beachten. Bei einer SSL von 45 mm liegt der Median von euploiden Feten bei 1,2 mm, bei einer SSL von 84 mm bei 2,5 mm. Zur Beurteilung und Berechnung des Wahrscheinlichkeitsquotienten des NT-Werts wird dieser mit dem Median für die spezifische SSL verglichen. Normalerweise wird ein Schwellenwert auf der 95. Perzentile verwendet und ein Überschreiten definiert einen auffälligen Befund (Kagan et al. 2013; Wright et al. 2008). Bei 75 % der Feten mit T21 liegt die NT über der 95. Perzentile (Wright et al. 2008; Snijders et al. 1998). Für den Vergleich der gemessenen NT zum SSL-spezifischen Median gibt es drei Ansätze, den Delta ( $\Delta$ )-NT-Ansatz, der Differenz der gemessenen NT und des SSL-spezifischen Medians, dem MoM-Ansatz, der Division der gemessenen NT durch den SSL-spezifischen Median, und den Mixture-Model-Ansatz, bei dem der gemessene NT-Wert sowohl ins Verhältnis zum SSL-spezifischen Median als auch zur SSL-unabhängigen Median für erhöhter NT-Werte gesetzt wird (Spencer et al. 2003a; Wright et al. 2008; Kagan 2009).

Insgesamt hat die fetalen NT eine große Aussagekraft zu dem T21-Risiko wie auch dem Gesundheitszustand des Fetus. Wald et al. geben in der SURUSS-Studie eine MoM-Deviation der NT von Trisomie 21 zu nicht betroffenen Föten von 1,96 an, sowie einer DR alleinig basierend auf der NT von 51 % bei einer FPR von 5 % (Wald et al. 2003). Cuckle und Maymon benennen die fetale NT als „den mit Abstand besten individuellen Marker“ in der Risikoberechnung für Trisomie 21 (Cuckle und Maymon 2016). Da eine erhöhte NT-Messung auch

als Indikator für andere Chromosomenstörungen und Anomalien gilt, wird unabhängig vom T21-Risiko ab einer NT-Messung  $\geq 3,5\text{mm}$  zu einer invasiven Diagnostik mit Karyotypisierung und gegebenenfalls Microarray geraten (Kozlowski et al. 2019).

#### 1.2.3.2 Serum-Biochemie

Im ersten Trimenon sind die Serummarker  $\beta$ -hCG und PAPP-A die bedeutendsten Serummarker (Tabelle 2), wobei PAPP-A mit zunehmenden Gestationsalter an Aussagekraft abnimmt während  $\beta$ -hCG an Aussagekraft zunimmt (Cuckle und Maymon 2016). Die Blutentnahme und Messung der Parameter findet für gewöhnlich im selben Besuch wie die Ultraschalluntersuchung statt und sollte nach dem OSCAR (Ein-Stopp Klinik für Risikobewertung fetaler Anomalien; engl: **O**ne-stop **C**linic for **A**ssessment of **R**isk for fetal anomalies) -Ansatz für die bestmögliche Patientenberatung unmittelbar nach dieser zur Verfügung stehen. Somit kann die Risikoermittlung mit einem vollständigen Datensatz direkt im Anschluss an die Ultraschalluntersuchung erfolgen (Spencer et al. 2000a). Die Verwendung von gemessenen Konzentrationen von  $\beta$ -hCG und PAPP-A an einem abweichenden Tag von der Ultraschalluntersuchung, meist früher, ist möglich, jedoch müssen die Ergebnisse für die Ultraschalluntersuchung und die Serumbiochemie jeweils für das Gestationsalter am Tag der Untersuchung berechnet und anschließend kombiniert werden. Dieser Ansatz hat aufgrund unserer dezentralen Struktur ohne Messung der Serumkonzentrationen vor Ort den Vorteil, dass die Ergebnisse ebenfalls nach der Ultraschalluntersuchung vorliegen und die Übermittlung des spezifischen Risikos nicht nachträglich in einem zweiten Gespräch erörtert werden muss (Wright et al. 2010).

Analog zum Serumscreening im 2. Trimenon sind die Plasmakonzentrationen von  $\beta$ -hCG und PAPP-A im Serumscreening des ETS ebenfalls weit gestreut und werden von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Zum Vergleich mit den erwarteten Werten bei einer Schwangerschaft mit einem euploiden Fetus,

müssen die gemessenen Konzentrationen entweder wie oben beschrieben in MoMs oder in sogenannte Grade des Extremen (engl: degree of extremeness, DoEs) umgewandelt werden. Bei DoEs liegt der erwartete Wert bei einem euploiden Fetus auf 0, im Gegensatz zu 1 bei der Verwendung des MoM-Systems. Die Werte -1 und +1 geben jeweils die 5. und 95. Perzentile an (Merz et al. 2008). Die Einflussfaktoren sind maternal und schwangerschaftsspezifisch, zu ihnen gehören das maternale Körpergewicht, die Ethnizität, der Raucherstatus, der Modus der Konzeption, die Parität und die Anzahl der Feten (Spencer et al. 2003b; Spencer et al. 2004; Spencer et al. 2002; Spencer et al. 2000b; Liao et al. 2001; Kagan et al. 2008a; Merz et al. 2011). Diese Patientinnen-spezifischen Größen werden mit denen einer Referenzpatientin mit kaukasischer Herkunft, Nichtraucherin, Gewicht von 69 kg und Parität >0 mit spontaner Konzeption und Einlingsschwangerschaft verglichen (Wagner et al. 2018). Korrekturen für die oben genannten Einflussfaktoren müssen mit einbezogen werden, um Abweichungen, die auf diese Charakteristika zurückzuführen sind, abzugrenzen. Die ermittelten MoMs oder DoEs werden wie die NT mit Wahrscheinlichkeitsquotienten verrechnet und zu dem mütterlichen Alter in die Risikoberechnung eingeschlossen (Wagner et al. 2018).

### 1.2.3.3 *Erweiterungen für das ETS*

Eine Verbesserung des ETS ist durch die Hinzunahme weiterer Ultraschall- und Serummarker möglich. Als weitere Serummarker für das ETS werden der placental growth factor (PIGF) und AFP in Erwägung gezogen. PIGF wird zudem im Screening auf Präeklampsie, AFP im Screening für fetale Wachstumsretardierung verwendet (Cuckle und Maymon 2016).

Vor allem haben sich drei Ultraschallmarker, das fetale Nasenbein (NB), Regurgitation oder Insuffizienz der fetalen Trikuspidalklappe (Trikuspidalklappeninsuffizienz; TI) und der reverse flow im Ductus venosus (DV)-Fluss, als zusätzliche Marker im ETS bewährt, nicht jedoch der fronto-

maxillare Gesichtswinkel (Kagan et al. 2013). Wegen des Zeitaufwands der Untersuchung und des ausgiebigen Schulungsbedarfs der Untersucher ist die routinemäßige Untersuchung dieser Parameter außerhalb von Zentren schwer zu etablieren und die Sinnhaftigkeit fraglich (Cicero et al. 2003; Kagan et al. 2009c; Maiz et al. 2009). Mit einem 2-Stufen Verfahren, bei dem diese Parameter nur bei einer Gruppe von Schwangeren mit einem intermediären Risiko erhoben werden müsste, könnte der Anteil an Untersuchungen deutlich reduziert werden. Mit der Definierung des intermediären Risikos zwischen 1:51 bis 1:1000 müssten beispielsweise nur 15 % der Schwangeren auf diese Parameter hin untersucht (Kagan et al. 2009a; Kagan et al. 2009c; Maiz et al. 2009). Die DR der Marker NB, TI und DV-Fluss allein liegt zwischen 55 % bis 66 %, die FPR bei 1 % bis 3 %. Durch die zusätzliche Anwendung einer dieser Marker im Intermediärrisikokollektiv kann die DR des ETS von 90 % auf 93 % bis 96 % gesteigert werden bei einer Verringerung der FPR von 3 % auf 2,4 % bis 2,6 % (Kagan et al. 2013).

Zusätzlich zur Detektion von der T21 kann das ETS zur Detektion von Feten mit T18 und T13 verwendet werden. Mit dem Algorithmus zur Risikobestimmung für eine Schwangerschaft mit einer T21 werden bei einer FPR von 3 % neben etwa 90 % der Feten mit T21 auch 74 % beziehungsweise 77 % aller Feten mit T18 und T13 erfasst. Unter Hinzunahme der fetalen Herzfrequenz und spezifischen Algorithmen für T18 und T13 können die DR auf 91 %, 97 % und 94 % für T21, T18 und T13 verbessert werden bei festgelegten FPR von 3% für T21 und 0,2 % für T18/T13 oder einer gesamten FPR von 3,1 % (Kagan et al. 2008b).

#### 1.2.4 Zellfreie DNA (cfDNA)-Analyse

Zu Beginn der 90er Jahre fokussierten sich die ersten Versuche fetale DNA durch eine einfache venöse Blutabnahme bei der Mutter zu gewinnen darin, fetale kernhaltige Zellen aus dem Blut zu isolieren (Bianchi et al. 1990). In der prospektiven, multizentrischen klinischen Studie des National Institute of Child Health and Human Development Fetal Cell Isolation Study (NIFTY) sollte die

Durchführbarkeit einer Geschlechtsbestimmung und eines Aneuploidiescreenings an diesen Zellen getestet werden. Jedoch lag bei insgesamt 1292 männlichen Feten von insgesamt 2744 analysierten Einlingsschwangerschaften die FPR bei der Geschlechtsbestimmung bei 11,1 %. Bei dem Aneuploidiescreening lag die DR bei 74,4 % mit einer FPR von etwa 0,6 % bis 4,1 %, womit diese Methode dem klassischen ETS deutlich unterlegen ist (Bianchi et al. 2002).

Im Jahr 1997 wurden erstmals freie Y-Chromosom-Fragmente im Blut von schwangeren Frauen mit männlichen Feten nachgewiesen. Sowohl bei Schwangeren mit weiblichen Feten als auch bei nicht-Schwangeren konnten diese nicht nachgewiesen werden. Somit wurden diese DNA-Fragmente der aktuellen Schwangerschaft zugeordnet (Lo et al. 1997). Im Jahr 2010 konnte gezeigt werden, dass sich das ganze fetale Genom durch die im mütterlichen Blut befindlichen Fragmente abbilden lässt (Lo et al. 2010). Diese freie DNA entstammt der Plazenta, obwohl sich der Begriff zellfreie fetale DNA (cffDNA) etabliert hat, und macht etwa 10 % der gesamten zellfreien DNA (cfDNA) im mütterlichen Plasma zwischen der 11. und 13. SSW aus (Ashoor et al. 2013; Lo et al. 1997). Jedoch hängt die Konzentration des fetalen DNA von diversen Faktoren ab, so ist sie beispielsweise geringer bei Schwangeren mit afro-karibischer Ethnizität und nimmt zu zunehmenden mütterlichen Gewicht ab, steigt jedoch mit zunehmender SSL, PAPP-A und  $\beta$ -hCG Serumspiegeln positivem Raucherstatus (Ashoor et al. 2013; Scott et al. 2018). Der prozentuale Anteil der fetalen DNA an der gesamten cfDNA im mütterlichen Plasma wird als fetale Fraktion (FF) bezeichnet. Der hohe Anteil maternaler cfDNA im Serum erschwert die Analyse auf Aneuploidien, daher versuchten mehrere Gruppen eine Allelenvariation zwischen der Mutter und dem Feten zu nutzen (Lo et al. 1998). Obwohl durch diese Methoden eine T21 als auch eine T18 nachgewiesen werden konnte, können sie nicht universal angewandt werden, da die Analysen auf Polymorphismen in spezifischen Regionen basieren (Lo et al. 2007b; Dhallan et al. 2007; Tong et al. 2006).

Erste Versuche zur Entwicklung eines von Polymorphismen unabhängigen Tests mittels digitaler PCR zeigten, dass diese Methode prinzipiell möglich ist, jedoch scheiterten sie in der praktischen klinischen Umsetzung an den technischen Voraussetzungen (Lo et al. 2007a; Fan und Quake 2007). Die Entwicklung des Next Generation Sequencing ermöglicht einen deutlich gesteigerten Sequenzierungsdurchsatz im Vergleich zur konventionelle Sanger-Sequenzierung (Mardis 2008). Massively parallel shotgun sequencing amplifiziert alle vorhandenen DNA-Fragmente und kann in einem Durchlauf 10 Millionen kurze Sequenzen generieren, welche anschließend den spezifischen Chromosomen zugeordnet werden (Fan et al. 2008; Stumm et al. 2012). Alternativ kann ein targeted parallel shotgun sequencing durchgeführt werden, bei dem die Amplifizierung auf Fragmente typisch für vorher ausgewählte Chromosomen beschränkt ist (Stumm et al. 2012; Sparks et al. 2012b). Durch die Zuordnung der Fragmente zu den spezifischen Chromosomen kann festgestellt werden, ob eine ausgewogene Verteilung des genetischen Materials auf die verschiedenen Chromosomen vorliegt, oder ob Abweichungen detektierbar sind (Fan et al. 2008; Sparks et al. 2012b).

Da die Isolation der cffDNA aus der gesamten cfDNA im mütterlichen Serum oder auch die Isolation von klinisch relevanten Chromosomfragmenten technisch schwierig ist, wird die gesamte gewonnene cfDNA aus dem Serum analysiert. Die Gendosis-Analyse klinisch relevanter Chromosomen wird in Relation zur Dosis eines Referenzchromosoms bestimmt, meist Chromosom 3 (Liao et al. 2011; Chiu et al. 2008; Eiben et al. 2014). Durch die Amplifizierung der gesamten cfDNA aus dem mütterlichen Serum ergeben sich die marginalen Unterschiede zwischen einem normalen und einem Befund mit fetaler T21. Der Anteil der DNA eines einzelnen Chromosoms 21 (C21) am gesamten Genom beträgt in etwa 0,75 %, somit der beider Chromosomen bei einem normalen Karyotypen 1,5 %. Beim Vorliegen einer T21 erhöht sich der Anteil auf ca. 2,25 % (Sparks et al. 2012a). Im maternalen Serum fallen die Unterschiede noch geringer aus, da die FF wie oben erwähnt durchschnittlich nur 10 % beträgt.



Daher gilt für einen normalen Karyotypen:

$1,5 \% \text{ (C21 Anteil am maternalen Genom)} * 0,9 \text{ (90 \% maternale DNA)} + 1,5 \% \text{ (C21 Anteil am fetalen Genom)} * 0,1 \text{ (10 \% fetale DNA)} = 1,5 \% \text{ Anteil C21 bei normalem Karyotypen.}$

Gegenüber dem Anteil bei Vorliegen einer fetalen T21:

$1,5 \% \text{ (C21 Anteil am maternalen Genom)} * 0,9 \text{ (90 \% maternale DNA)} + 2,25 \% \text{ (C21 Anteil am fetalen Genom)} * 0,1 \text{ (10 \% fetale DNA)} = 1,575 \% \text{ Anteil C21 bei fetaler T21.}$

Das Analyseverfahren muss also in der Lage sein, solch geringe Unterschiede zu detektieren (Kagan et al. 2014; Eiben et al. 2014). Um eine Chromosomendosisabweichung in Relation zur FF wiederzugeben, werden die ermittelten Gendosen im Anschluss als Vielfaches einer Standardabweichung, den sogenannten z-Scores, berechnet. Ein z-Score von größer 3, also einer ermittelten Gendosis von mehr als 3 Standardabweichungen gegenüber dem erwarteten Wert, wird als Screening positiver Befund gewertet (Eiben et al. 2014). 99,9 % aller euploiden Feten liegen unter einem z-Score von 3, weswegen die FPR bei 0,1 % liegt (Chiu et al. 2008). Bei abnehmender FF im maternalen Serum fällt die Differenz der C21-Dosis zwischen euploiden und Feten mit T21 noch geringer aus, weswegen die Trennschärfe des Tests abnimmt, bis sie bei einer FF kleiner 4 % an der gesamten cfDNA zu gering ist, um den Test erfolgreich auswerten zu können (Differenz 0,03 %). Somit ist die Angabe der FF ein Qualitätsmerkmal der Analyse und muss im Befund mitgeteilt werden (Eiben et al. 2014). Eine Unterschreitung der FF unter 4 % tritt in etwa 1 % bis 5 % aller Untersuchungen ein, eine Reanalyse mit erneuter Blutentnahme nach frühestens 2 Wochen kann in dieser Gruppe bei weiteren 63 % zu einem Ergebnis führen (Revello et al. 2016). Somit bleiben etwa 2 % aller getesteten Schwangerschaften ergebnislos (Eiben et al. 2014). Insgesamt hat das mütterliche Gewicht den größten Einfluss auf die FF (Galeva et al. 2019; Revello et al. 2016). Eine zu geringe FF wird bei 7 %, 11 % beziehungsweise 50 % bei einem mütterlichen Gewicht von 100 kg, 110 kg

beziehungsweise 160 kg Körpergewicht beobachtet (Galeva et al. 2019). Neben einer zu geringen FF von unter 4 % kann eine zu hohe Assayvarianz oder ein Assayversagen Grund für ergebnislose cfDNA-Analysen sein. Norton et al. berichteten über eine Quote von 3 % ergebnisloser Test, welche sich aus 1,2 % mit  $FF < 4 \%$ , 0,5 % ohne ermittelbare FF und 1,3 % mit zu hoher Assayvarianz oder Assayversagen zusammensetzt (Norton et al. 2015).

Insgesamt liegen mittlerweile viele Metaanalysen zur Testgüte der cfDNA-Analyse vor. Badeau et al. analysierten 65 Studien mit insgesamt 86.139 Schwangerschaften, davon 3141 mit Aneuploidien, und berichteten eine T21-DR von 99,2 % bei einer FPR  $< 0,1 \%$  in der Allgemeinbevölkerung (Badeau et al. 2017). Von Gil et al. wurden 35 Studien eingeschlossen mit insgesamt 223.932 Schwangerschaften, davon 1963 mit T21 und eine DR von 99,7 % bei einer FPR von 0,04 % ermittelt (Gil et al. 2017). Eine aktuelle Metaanalyse von Demko et al. schloss 24 prospektive Studien ein und ermittelte eine DR von 98 % bei einer FPR von 0,09 % (Demko et al. 2022). In einem Review des American College of Medical Genetics and Genomics wurden 78 Studien miteinbezogen und eine DR von 98,8 % (95 % CI 97,8 – 99,3 %) bei einer FPR von 0,04 % (95 % CI 0,02 - 0,08 %) ermittelt. Der ebenfalls angegebene PPW von 91,8 % verdeutlicht jedoch, dass obwohl sich die DR für die T21 den 100 % annähert, es sich nicht um einen diagnostischen Test, sondern um ein Screeningverfahren handelt (Rose et al. 2022).

Die cfDNA-Analyse ist zum Zeitpunkt der Studiendurchführung bereits klinisch etabliert und als IGeL-Leistung von etwa 200 € je nach Anbieter verfügbar. Bei den 2 % der ergebnislosen cfDNA-Auswertungen muss auf eine alternative Risikoberechnungen zurückgegriffen werden. Eine spätere Reanalyse mittels cfDNA ist vor allem bei primärer Testung in frühen SSW möglich, da die durchschnittliche FF mit jeder SSW steigt (Scott et al. 2018; Wang et al. 2013). Meist wird das kombinierte ETS verwendet, hier ist jedoch das oben beschriebene Zeitfenster der Probenentnahme für die Serumparameter zu beachten.

### 1.3 Invasive Diagnostik

Eine pränatale Diagnose einer genetischen Erkrankung wie der T21 ist nur mittels invasiver Diagnostik möglich. Eine invasive Diagnostik, entweder durch eine CVS oder eine AC sollte laut Leitlinien immer auf ein auffälliges Screening folgen (Gemeinsamer Bundesausschuss 2021). Vor jeder invasiven Diagnostik besteht die Notwendigkeit, die Patientin nach §15 Vorgeburtliche genetische Untersuchungen des Gendiagnostikgesetzes und des Schwangerenkonfliktgesetzes ausführlich über den Eingriff aufzuklären (Bundesamt für Justiz). Dies beinhaltet auch die assoziierte erhöhte Fehlgeburtsrate von 0,2 % beziehungsweise 0,1 % für die CVS oder die AC, im Vergleich zum Hintergrundrisiko für einen Spontanabort (Salomon et al. 2019). Die CVS ist die bevorzugte invasive Diagnostik vor Erreichen der 16. SSW, die AC wird routinemäßig ab Erreichen der 16. SSW durchgeführt. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass eine CVS eine Gewebeprobe der Plazenta und nicht des Fötus ist, die bei einer AC entnommenen Zellen sind jedoch fetalen Ursprungs. Somit würde beispielsweise ein auf die Plazenta beschränktes T21-Mosaik (1 % aller Fälle) einen auffälligen Befund in einer CVS, nicht aber bei einer AC aufweisen. Die Kosten können auf ca. 1000 € angesetzt werden und werden bei einem auffälligen Screeningbefund von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen (Kagan et al. 2015b; Gemeinsamer Bundesausschuss 2021).

### 1.4 Fehlbildungen insgesamt

Fehlbildungen werden als Prävalenz und nicht nach Inzidenz angegeben, da es sich bei ihnen nicht um Neuerkrankungen, sondern um einen Zustand bei Geburt handelt. Die Erfassung von Fehlbildungen hängt stark vom verwendeten System, einer passiven Erfassung mit Übermittlung der Daten an ein Zentrum oder eine aktive Erfassung mit standardisiertem, systematischem Untersuchungsvorgang durch geschultes Personal, ab. Aktive Erfassungssysteme sind daher passiven Erfassungssystemen überlegen. (Queißer-Luft und Spranger 2006). In Deutschland werden nach aktiven

Erfassungssystemen etwa 2,5 % aller Kinder mit einer größeren Fehlbildung geboren (EUROCAT 2020). Bei jährlich etwa 780.000 Geburten in Deutschland sind somit 19.500 Kinder betroffen (Statistische Bundesamt (Destatis)).

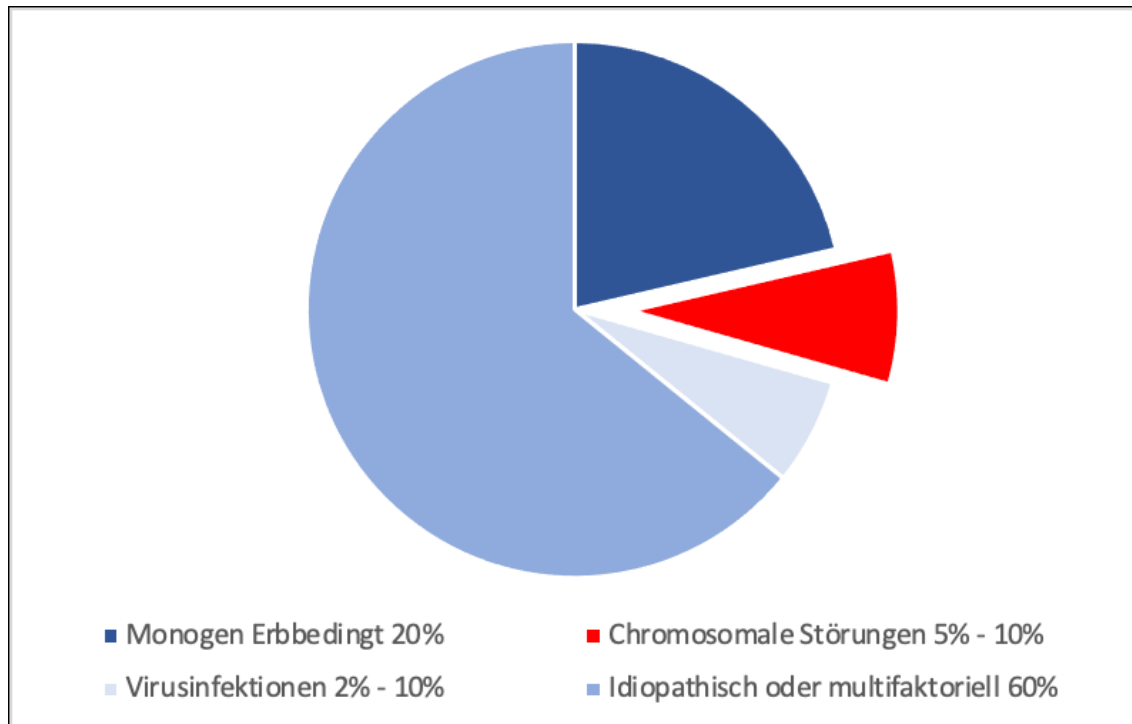


Abbildung 3: Anteilige Darstellung der Ursachen für große Fehlbildungen.

Unter größeren Fehlbildungen versteht man singuläre und kombinierte strukturelle Defekte, Syndrome, Sequenzen und Assoziationen, die die Lebensfähigkeit beeinträchtigen oder interventionsbedürftig sind (Queißer-Luft und Spranger 2006). In nur 5 % bis 10 % der Fälle ist eine chromosomale Störung Ursache der Fehlbildung, weitere 20 % sind monogenen Ursprungs. In 2 % bis 10 % wird die Ursache auf eine Virusinfektion in der Schwangerschaft zurückgeführt. Der Großteil dieser Fehlbildungen mit etwa 60 % Anteil entsteht idiopathisch oder ist multifaktoriell bedingt (Queißer-Luft und Spranger 2006).

#### 1.4.1 Anteil der genetischen Erkrankungen

Das menschliche Genom besteht aus 23 Chromosomenpaaren, den Autosomen und Geschlechtschromosomen, den Gonosomen. Bei numerischen Chromosomenaberrationen liegt eine Fehlverteilung mit Abänderung der normalen Chromosomenzahl vor, den Aneuploidien. Hierbei bezeichnet die Trisomie das dreifache und die Monosomie das einfache Vorliegen eines Chromosoms. Aneuploidien basieren meist auf Fehlverteilungen in der Eizelle, selten in der Samenzelle. In der Regel steigt die Inzidenz einer Schwangerschaft mit einer fetalen Aneuploidie mit dem mütterlichen Alter (Hennig 2002). Zu den bekanntesten Chromosomenstörungen zählen die T21, T18 und T13 und die gonosomalen Aberrationen. Andere Mono- oder Trisomien sind selten, da die Entwicklungsfähigkeit des Embryos deutlich eingeschränkt und meist nur bei Vorliegen eines Mosaikes gegeben ist. Andere strukturelle Chromosomenaberrationen basieren auf lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen des Chromosoms, wie Deletionen, Inversionen und Translokationen. Chromosomale Veränderungen wie beispielsweise die Mikrodeletionen sind nicht lichtmikroskopisch erfassbar und bedürfen weiterer labortechnischer Abklärung als der Karyotypisierung. Die Inzidenz von fetalen Chromosomenstörungen, die auf Veränderungen innerhalb der Chromosomen basieren ist in der Regel unabhängig vom mütterlichen Alter (Hennig 2002).

#### 1.4.2 Anteil der Trisomie 21 an allen Chromosomenstörungen

Die Trisomie 21, das Down-Syndrom, ist die wohl bekannteste als auch am häufigsten auftretende Chromosomenaberration. Die Gesamtprävalenz in Deutschland liegt zwischen 0,125 % bis 0,2 %, jedoch variiert sie zwischen den Altersgruppen stark und nimmt mit dem mütterlichen Alter exponentiell zu. So liegt die Inzidenz für eine Schwangerschaft mit fetaler T21 bei einer Frau im Alter von 20 Jahren bei 1:1250, im Alter von 30 Jahren bei 1:714 und im Alter von 40 Jahren bei 1:86 (Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin, Number 226 2020). Im Jahr 2016 wurden in Sachsen-

Anhalt und Mainz 1124 und 387 genetische Störungen auf 296.527 und 47.699 Schwangerschaften beziehungsweise Geburten registriert. Somit lagen die Prävalenzen bei 0,37 % und 0,81 % für genetische Störungen. Die T21 wurde 496-mal in Sachsen-Anhalt und 166-mal in Mainz registriert, somit lagen 2016 die Prävalenzen in diesen Regionen bei 0,17 % und 0,35 %. Vergleichsweise lagen die Prävalenzen für die Trisomie 18 bei 0,036 % und 0,08 %, für die Trisomie 13 bei 0,01 % und 0,034 % und für die Monosomie X bei 0,022 % und 0,021 % (European Union 2021).

Den Hauptanteil der T21 machen mit ca. 95 % die sogenannten freien T21, bei denen ein drittes freies Chromosom 21 vorliegt, aus. Dies geschieht durch non-disjunction, dem Aneinanderhaften von 2 Chromosomen anstelle von deren Trennung, bei der elterlichen Gametenformation. 88 % entfallen dabei auf die mütterliche Meiose, 9 % auf die väterliche und 3 % auf die Mitose. 1 % aller T21-Fälle sind Mosaik, bei denen Zellen mit dem dreifachen Erbgut des Chromosoms 21 neben normalen Zellen vorliegen. Die verbleibenden 4 % basieren auf Translokationen, meist Robertson'schen. Bei Translokationen werden zuvor gebrochene Chromosome falsch zusammengefügt, was bei der Zellteilung zu einer ungleichmäßigen Aufteilung des genetischen Materials führt. Die Robertson'schen Translokationen stellen eine Besonderheit dar; bei ihnen entsteht der Bruch zwischen dem langen und dem kurzen Arm des Chromosoms, die kurzen Arme gehen verloren und die langen Arme werden an ein anderes Chromosom geheftet (Noble 1998; Hennig 2002).

Dabei häuft sich mit zunehmendem mütterlichem Alter vor allem die Inzidenz der freien Trisomien und die der Mosaik-Trisomie. In vielen europäischen Ländern führt die pränatale Diagnose einer fetalen T21 oft zu einem Abbruch der Schwangerschaft, weswegen trotz der hohen Inzidenz kaum noch Kinder mit Down-Syndrom geboren werden. Zum Beispiel wurden zwischen 1992 und 1996 nach Diagnosestellung und Beratung nur 5,5 % aller Feten mit T21 in der Schweiz ausgetragen (Binkert und Schinzel 2002). Auch wurde von

Schwangerschaftsabbruchraten von über 90 % in England und Wales, China, den Niederlanden und Australien berichtet (Hill et al. 2017).

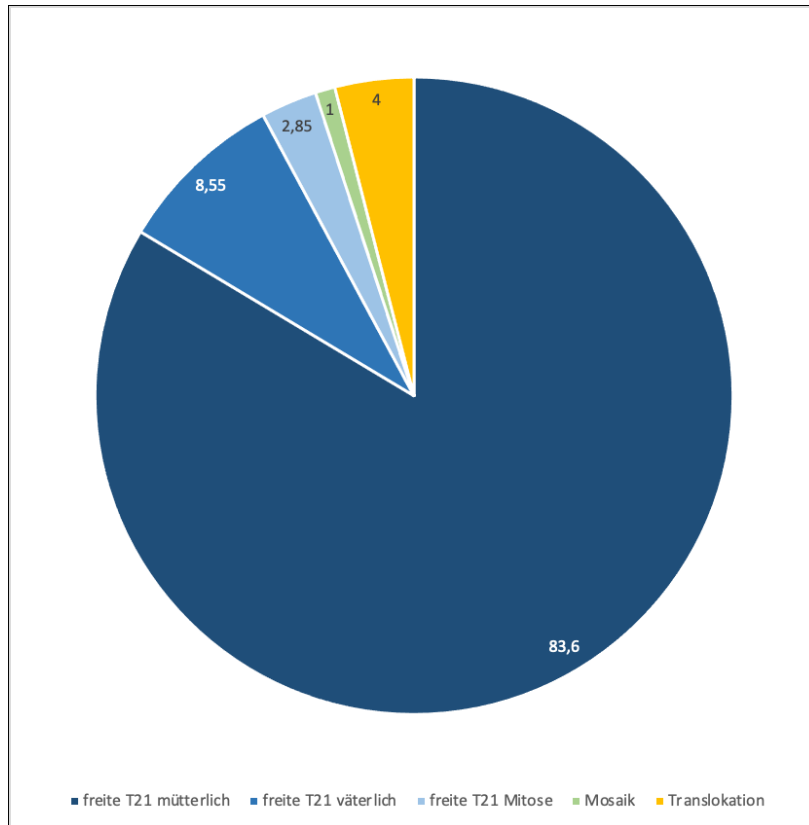


Abbildung 4: Ursprung des zusätzlichen Chromosom 21-Genmaterials in Prozent an der Gesamtanzahl aller Trisomien 21.

### 1.5 Prädiktion von Fehlbildungen US im 1. Trimenon

Im Rahmen des ETS wird standardmäßig eine detaillierte Ultraschalluntersuchung durchgeführt. Neben der Messung der SSL, daher der Bestimmung des tatsächlichen Gestationsalters, und der NT, wird hier die fetale Sonoanatomie zur Erkennung von Fehlbildungen inspiziert (Wagner et al. 2018). Syngelaki et. al. berichteten 2019 über die Ergebnisse einer standardisierten 30-minütigen Ultraschalluntersuchung von über 100.000 Einlingsschwangerschaften zwischen der 11+0 und 13+6 SSW. Nach Ausschluss aller Aneuploidien wurden bei insgesamt 0,47 % der Feten zwischen der 11+0 und 13+6 SSW Abnormalitäten diagnostiziert, zwischen der 19. und 25. SSW zusätzliche 0,9 % der bislang unauffällig getesteten Feten,

weitere 0,3 % im 3. Trimenon und nach Geburt 0,08 %. Die Autoren untergliederten die aufgeführten Fehlbildungen in drei Kategorien; in der Ultraschalluntersuchung auf Fehlbildungen zwischen der 11+0 und 13+6 SSW immer detektierbar, nicht detektierbar und möglicherweise detektierbar. In die Gruppe der immer detektierbaren Fehlbildungen fielen die Anenzephalie, die alobäre Holoprosenzephalie, Trikuspidal- oder Pulmonalatresie, die Cantrell-Pentalogie, Herzektopie, der Exomphalos, die Gastroschisis und die body-stalk Anomalie (Syngelaki et al. 2019). Erwähnenswert ist, dass die alobäre Holoprosenzephalie, der Exomphalos und der Megazystitis mit erhöhten Risiken für die T13 beziehungsweise T18 einhergehen (Kagan et al. 2010). Weiter wurden über 50 % der Fälle mit offener Spina bifida, hypoplastischem Linksherzsyndrom, atrioventrikuläre Septumdefekte, komplexen Herzfehlern, linksatrialer Isomerie, unteren Harnwegsobstruktionen, fehlenden Extremitäten, fetaler Akinesie-Deformations-Sequenz und letalen Skelettdysplasien erkannt. Nur eine geringe Anzahl von Fällen mit Ventrikulomegalie, Corpus callosum-Agenesie, isolierter Lippenpalte, kongenitaler pulmonaler Atemwegsmalformation, Ventrikelseptumdefekten, Abdominalzysten, unilateraler Nierenagenesie oder multizystischer Niere, Hydronephrose, Doppelnieren, Hypospadie und Klumpfüßen wurden bereits zwischen der 11+0 und 13+6 SSW detektiert. In die Kategorie der nicht detektierbaren Abnormalitäten zwischen der 11+0 und 13+6 SSW fallen jene Fehlbildungen, welche beziehungsweise deren sonographischen Merkmale sich erst im zweiten oder dritten Trimenon manifestieren (Syngelaki et al. 2011). Im Vergleich zum Vorläufer dieser Studie derselben Gruppe von 2011 wird auf die deutlich verbesserte DR von offener Spina bifida, schweren Herzfehlern und Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten (LKGS) verwiesen (Syngelaki et al. 2011; Syngelaki et al. 2019).

Um eine höhere DR dieser Fehlbildungen zu erzielen, wurde in der vorangegangenen Studie eine Ausweitung der Screeningprotokolls auf weitere Strukturen, die häufigere Anwendung der vaginalen Ultraschallsonde anstelle der abdominellen, mehr beziehungsweise ausreichend Zeit für die



Untersuchung und die Durchführung durch speziell ausgebildete Untersucher diskutiert. Zusätzliche wären leicht erkennbare Marker, die bereits in der Routineuntersuchung auffallen können, wichtig, um diese Hochrisikopatientinnen dann an einen Experten der Fetalsonographie überwiesen werden können (Syngelaki et al. 2011). Zudem können standardisierte Protokolle zur Erfassung der fetalen Sonoanatomie die Sensitivität des Ersttrimesterultraschalls verbessern (Karim et al. 2017).

Im ETS hat sich die NT als ein Marker für fetale Auffälligkeiten bewährt. Generell gesehen ist eine erhöhte NT häufiger bei nicht chromosomalen (12 %), als bei chromosomalen (4 %) Abnormalitäten (Syngelaki et al. 2019). Signifikant häufiger zeigt sich eine fetale NT über der 95. Perzentile, beziehungsweise  $\geq 3,5$  mm, bei LKGS, Diaphragmahernien, Exomphalos, Lymphabflussstörungen, Megazystis und Nierenfehlbildungen, (letalen) Skelettdysplasien, neuromuskulären Fehlbildungen, body-stalk-Anomalien und in Fällen von multiplen Defekten, sowie in 35 % der Fälle von schweren Herzfehlern (Syngelaki et al. 2011; Kagan et al. 2013). Es besteht ein Zusammenhang zwischen NT-Ausprägung und einer Diagnose im 1. Trimenon. So wurde beispielsweise eine erhöhte NT bei 48 % aller Feten beobachtet, die im 1. Trimenon mit einem Herzvitium diagnostiziert wurden, jedoch nur bei 22 % aller Herzvitien (Syngelaki et al. 2019). Hierbei ist unklar, ob eine erhöhte NT zu einer erhöhten Alarmbereitschaft des Untersuchers und somit zu einer genaueren Untersuchung beziehungsweise zu einer Überweisung zum Spezialisten für fetale Sonographie führt oder ob eine schwerere Ausprägung und folglich leichtere Diagnose eher zu den hämodynamischen Veränderungen führt, die eine erhöhte NT bedingen (Syngelaki et al. 2011).

Insgesamt liegt die Wahrscheinlichkeit einer fetalen Fehlbildung bei einer erhöhten NT  $\geq$  der 95. Perzentile bei 43 %, zwischen der 95. und 99. Perzentile bei 21 %, ab der 99. Perzentile bei 62 % (Bardi et al. 2020). Unabhängig vom T21-Risiko sollte daher ab einer NT-Messung  $\geq 3,5$ mm zu einer invasiven Diagnostik mit Karyotypisierung geraten werden (Kagan et al. 2006).

Neben der NT sind weitere Fehlbildungen mit einem erhöhten Risiko für eine Chromosomenstörung bekannt. Zu ihnen gehören die fetale Megazystis, die Omphalozele, die Holoprosenzephalie, der atrioventrikuläre Septumdefekt und die Diaphragmahernie (Kagan et al. 2013). Weitere Ultraschallmarker für den Verdacht auf und die Detektion von Fehlbildungen sind das Fehlen des „butterfly sign“ für die Holoprosenzephalie, die Darstellung des retronasalen Dreiecks für LKGS, eine fehlende Blasenfüllung für eine bilaterale Nierenagenesie und eine Veränderung des Hirnstamms zusammen mit dem „banana“ und „lemon sign“ für die Spina bifida (Hoopmann und Kagan 2013).

## 1.6 Problem- und Fragestellung

Die Nutzung von Screeningtests auf T21 spiegelt den Wunsch der Schwangeren wider ein gesundes Kind zu gebären (Wagner et al. 2018). Screeningtests für die T21 stehen in Deutschland in der Regel nur als IgeL-Leistung zur Verfügung, daher sollten sie möglichst kostengünstig sein, um einen allgemeinen Zugang zu gewährleisten (Kozlowski et al. 2019). Jedoch sind Screeningtest auf die Erstellung eines persönlichen Risikoprofils und der Bestimmung des Risikokollektivs beschränkt, die Diagnose einer Aneuploidie kann nur durch die invasive Diagnostik gestellt werden. Die kostenintensivere invasive Diagnostik ist bei einem auffälligen Befund Leistung der gesetzlichen Krankenkassen (Gemeinsamer Bundesausschuss 2021). Daher wirkt sich ein großes Risikokollektiv mit einer großen Anzahl von invasiven Diagnostiken negativ auf die Gesundheitsbudgets aus. Zudem besteht ein assoziiertes Fehlgeburtsrisiko von 0,2 % beziehungsweise 0,1 % bei einer CVS oder AC (Salomon et al. 2019). Somit ist das Ziel eines guten Screeningtests eine möglichst hohe DR bei einer möglichst geringen FPR (großer PPW), um so viele T21-Schwangerschaft als auch so wenig euploide Schwangerschaften wie möglich dem Risikokollektiv zuzuordnen und folglich, richtig zu diagnostizieren, um dabei die Anzahl der Fehlgeburten durch invasive Diagnostik sowie die Kosten gering zu halten. Jedoch sind die DR und die FPR beim kombinierten ETS, dem aktuellen Goldstandard im Screening auf die T21, voneinander anhängig; eine Senkung der Risikoschwelle erhöht zwar die DR, dadurch aber auch die FPR und umgekehrt (Wright et al. 2014).

### 1.6.1 Fragestellung

Lässt sich die FPR durch die standardmäßige Etablierung des cfDNA-Screenings anstelle des kombinierten ETS reduzieren?

H<sub>0</sub>:

Die FPR lässt sich durch die standardmäßige Etablierung des cfDNA-Screenings anstelle des kombinierten ETS nicht reduzieren.

H<sub>1</sub>:

Die FPR lässt sich durch die standardmäßige Etablierung des cfDNA-Screenings anstelle des kombinierten ETS reduzieren.

H<sub>2</sub>:

Die FPR lässt sich durch die standardmäßige Ergänzung des cfDNA-Screenings zum kombinierten ETS reduzieren.

## 2 Methoden

Dies war eine randomisierte kontrollierte Studie in der Abteilung für Pränataldiagnostik an der Universitätsfrauenklinik Tübingen. In der Abteilung werden im Jahr durchschnittlich 1200 ETS als IGeL-Leistung durchgeführt. Die Schwangeren gehören zum „Normalkollektiv“ und werden von den lokalen niedergelassenen Frauenärzten zur Untersuchung überwiesen, ohne dass in diese Richtung einschlägige Voruntersuchungen stattgefunden haben oder eine Vorauswahl getroffen wurde. Die Rekrutierung erfolgte aus diesem Kollektiv bei Übereinstimmung mit den Ein- und Ausschlusskriterien, nach einer unauffälligen detaillierten Ultraschalluntersuchung mit einer normalen fetalen Sonoanatomie und einer NT < 3,5 mm, ebenso wie einer eingehenden Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung. Bei fetalen Fehlbildungen oder einer NT  $\geq$  3,5mm wurde wie üblich eine invasive Diagnostik mittels CVS oder AC empfohlen und primär keine individuelle Risikoberechnung durchgeführt (Kagan et al. 2018). Alle beteiligten Ärzte, die die Ultraschalluntersuchung durchführten, sind mindestens mit der Stufe II der Deutschen Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin (DEGUM) und nach der UK Fetal Medicine Foundation (FMF) qualifiziert (DEGUM 2020a; Fetal Medicine Foundation 2022).

### 2.1 Ethik

Jede Patientin erklärte ihre Einwilligung zur Studienteilnahme durch Unterschrift. Den Patientinnen wurde dabei ausreichend Zeit und Gelegenheit gegeben, um über ihre Teilnahme zu entscheiden und offene Fragen zu klären (Kagan et al. 2018). Ferner wurden sie über ihr Recht, die Teilnahme an der Studie abzulehnen, beziehungsweise sie zu jedem Zeitpunkt abubrechen, vom untersuchenden Arzt informiert, ohne dass ihnen hierdurch Nachteile während der klinischen Behandlung entstehen. Die Bestimmungen des GenDG und SchwangerenkonfliktG wurden in beiden Studien-Armen berücksichtigt. Auch die Vorgaben der Fetal Medicine Foundation zur Berechnung der Aneuploidie-

Risiken wurden berücksichtigt. Das kombinierte ETS, bestehend aus dem mütterlichen Alter, der fetalen NT, den Serumparametern PAPP-A und freiem  $\beta$ -hCG (Studienarm 1), entspricht der bisher an der Universitäts-Frauenklinik angebotenen Untersuchung. Die Untersuchung entsprechend des Studienarms 2 wird ebenfalls in der dargelegten Form an der Universitäts-Frauenklinik angeboten. Beide Untersuchungen sind klinisch etabliert und durch zahlreiche Voruntersuchungen validiert.

Vor jeder invasiven Diagnostik ist eine notwendige eingehende Aufklärung im Sinne des GenDG und SchwangerenkonfliktG erfolgt. Diese beinhaltete die Aufklärung über das Fehlgeburtsrisiko der AC und der CVS in Höhe von 0,1 % und 0,2 %.

Diese nach § 15 der Berufsordnung für Ärzte Prüfer-initiierte Studie wurde vom örtlichen Ethikkomitee geprüft und genehmigt (Nr. 572/2015BO1) (Deutscher Ärztetag 2011). Die Studie wurde in der International Standard Randomized Controlled Trial Number registry (ISRCTN No. 11174071) registriert. Da es sich um eine reine Observationsstudie handelte, wurden keine Abbruchkriterien festgelegt.

## 2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Zu den Einschlusskriterien gehörten ein mütterliches Alter  $\geq 18$  Jahren, der Wunsch der Schwangeren ein ETS durchführen zu lassen, die Durchführung der Untersuchung zwischen der 12. bis 14. SSW, Einlingsgravidität, kein Anhalt für fetale Fehlbildungen in der detaillierten Ultraschalluntersuchung, eine NT  $< 3,5$  mm, sowie eine unterschriebene Einwilligungserklärung der Patientin. Die Ausschlusskriterien beinhalteten ein fehlendes Einverständnis zur Studienteilnahme, ein Verdacht auf eine fetale Fehlbildung oder eine NT  $\geq 3,5$  mm, eine SSL  $< 45$  mm oder  $> 84$  mm und Mehrlingsschwangerschaften inklusive Vanishing twin (Kagan et al. 2018). Auch eine nachträglich

zurückgezogene Einwilligung führte zum Ausschluss. Eine alleinige Ablehnung der Befragung führte nicht zum Studienausschluss.

### 2.3 Ausführliche Ultraschallkriterien

Die folgenden Parameter werden regelhaft bei der detaillierten Ultraschalluntersuchung überprüft und, wo anwendbar, gemessen. Die Untersuchung basiert somit auf den aktuellen ISUOG-Richtlinien (Salomon et al. 2013):

- Plazentasitz und Morphologie
- SSL: Die SSL muss definitionsgemäß 45 mm bis 84 mm für das ETS betragen. Gemessen wird sie in der mediosagittalen Schnittebene in Neutralstellung des Fötus und wird zur Bestimmung des Gestationsalters nach Ultraschall herangezogen.
- Biparietaler Durchmesser (BPD): Der BPD wird an der weitesten transversalen Distanz des Kopfes von außen nach außen vermessen und gehört ebenfalls zur Routineuntersuchung. Er eignet sich im hohen Maße zur Bestimmung des Gestationsalters da er mit diesem stark korreliert und eine geringe Inter- und Intraobservervariabilität aufweist.
- Abdomen-Umfang (AU): Auch der AU wird im transversalen Schnittbild vermessen. Hier gilt der Magen als Leitstruktur. Der AU wird ebenfalls zur Gewichtsabschätzung des Fetus genutzt.
- Femurlänge (FL): Die FL wird als weiteres biometrisches Maß erfasst.
- NT: Die NT wird in der mediosagittalen Schnittebene des Kopfes vermessen. Der Nasenrücken mit Spitze und das Nasenbein verlaufen parallel, die Maxilla mit dem harten Gaumen hierzu im rechten Winkel und zentral im Kopf gelegen das Dienzephalon gelten als Leitstrukturen. Hier ist darauf zu achten, dass von dieser Ebene nicht abgewichen wird, was anhand des Fehlens einer der Leitstrukturen oder der Darstellung des Os zygomaticus oder des Plexus choroideus zu erkennen ist. Die NT ist im Nacken aller Feten zu finden und stellt sich als echofreier, subkutaner Flüssigkeitsbereich dar.

- Herzfrequenz: Die Herzfrequenz wird standardmäßig erfasst.
- Beurteilung der fetalen Sonoanatomie: Diese ist sehr weitläufig und umfasst Herzvitien, Bauchwanddefekte, Urogenitalmalformationen, Extremitätendefekte, Kopf-/Hirnfehlbildungen, Gesichtsfehlbildungen und vieles mehr.

## 2.4 Randomisierung

Die Randomisierung erfolgte in einem Verhältnis von 1:1 durch die Studienzentrale der Universitätsfrauenklinik Tübingen in Form von computergenerierten zufälligen Nummern (Kagan et al. 2018). Diese Zuordnung wurden in verschlossenen Losen der Abteilung für Pränataldiagnostik der Universitätsfrauenklinik Tübingen ausgehändigt. Die Lose wurden der Reihe nach entnommen und der Patientenakte beigefügt. Erst direkt im Anschluss an die ausführliche Ultraschalluntersuchung und der Feststellung des möglichen Studieneinschlusses sowie der schriftlichen Studieneinwilligung wurde das verschlossene Los geöffnet und der Studienarm offenbart. Bei einem Studienausschluss wurde das verschlossene Los rückgestellt, um bei der nächsten möglichen Studienteilnehmerin verwendet werden zu können. Die Losnummer fungierte bei der folgenden Studiendatendokumentation als Pseudonym.

## 2.5 Studienarme

Für diese Studie wurden Frauen nach einer unauffälligen Ultraschalluntersuchung in einer der beiden Studienarme randomisiert. Für die erste Gruppe wurde das individuelle Risiko anhand des kombinierten ETS berechnet, für die zweite Gruppe anhand der cfDNA-Analyse:

- Studien-Arm 1: kombiniertes ETS

Die Spiegel des freien  $\beta$ -hCGs und PAPP-As wurden im mütterlichen Serum durch das Labor Enders, Stuttgart bestimmt und die MoMs mithilfe des



Software-Programms „Viewpoint“ von GE Healthcare, München berechnet. Zusammen mit dem mütterlichen Alter, dem Gestationsalter und der NT-Messung wurde das individuelle Risiko für eine T21 anhand des aktuellen FMF-Algorithmus berechnet (Kagan et al. 2018). Die Ergebnismitteilung erfolgte durch den primär beratenden und rekrutierenden Arzt.

- Studien-Arm-2: Ultraschall mit cfDNA-Analyse

Die cfDNA-Analyse wurde durch die Firma Cenata, Tübingen mittels des Harmony® Pränatal Tests (Roche/Ariosa Diagnostics, Inc., San Jose, CA, USA) durchgeführt und zusammen mit dem mütterlichen Alter das T21-Risiko berechnet. Die Ergebnismitteilung erfolgte an den primär beratenden und rekrutierenden Arzt, der dieses an die Schwangere weitergab. Zeitgleich zur Probenentnahme für die cfDNA-Analyse wurde ein weiteres Serumröhrchen abgenommen, bei 4000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, aliquotiert und pseudonymisiert bei -80°C in den Laborräumen der Universitätsfrauenklinik Tübingen asserviert (Kagan et al. 2018). Dies ermöglichte die Ermittlung des T21-Risikos mittels kombinierten ETS im Falle einer erfolglosen cfDNA-Analyse. Das Serum konnte nicht zu einem späteren Zeitpunkt abgenommen werden, da die Messung der Serummarker nur zwischen der 12. bis 14. SSW validiert ist und bis zu 4 Wochen für der Prozess der cfDNA-Analyse nach erfolgloser Primärauswertung vergehen können. Nach Untersuchungsabschluss wurde die Probe verworfen, es sei denn, die Patientin hatte im Vorfeld der weiteren Archivierung zugestimmt.

Der in dieser Studie verwendete Harmony®-Pränatal Test (Roche/Ariosa Diagnostics, Inc., San Jose, CA, USA) verwendet eine targeted parallel shotgun sequencing-Technik, der sogenannten digitalen Analyse ausgewählter Regionen (engl. digital analysis of selected regions; DANSR) -Technik, zusammen mit dem sogenannten FF-optimiertes Trisomierisiko (engl. fetal-fraction optimized risk of trisomy evaluation; FORTE) -Algorithmus zur Berechnung eines individuellen Risikos. Dabei basiert DANSR zum einen auf der Amplifikation von einer Vielzahl nicht-polymorphischen Regionen auf den zu

testenden Chromosomen (C21, C18 und C13), zum anderen auf der Amplifikation einer Vielzahl von Regionen mit Einzelnukleotidpolymorphismen auf Chromosomen 1 bis 12. Die Analyse der nicht polymorphen Regionen zeigt das relative Vorkommen von Genmaterial eines bestimmten Chromosoms gegenüber eines Referenzchromosoms. Die Analyse der Regionen mit Einzelnukleotidpolymorphismen zeigt, bei unterschiedlichen Varianten im fetalen gegenüber maternalem Genmaterial, das relative Auftreten verschiedener Varianten, von denen sich die FF ableiten lässt. Mittels FORTE wird das individuelle Risiko einer Trisomie anhand des relativen Vorkommens von Genmaterial eines bestimmten Chromosoms, der ermittelten FF und dem Altersrisiko berechnet. Durch die Miteinbeziehung der FF und des Altersrisikos in die Analyse wird die Trennschärfe auch bei geringeren FF vergrößert, was vor allem die FPR senkt. Die Autoren berichten über ein ermitteltes individuelles Risiko für eine Trisomie von > 99 % in allen betroffenen Schwangerschaften (Sparks et al. 2012a; Sparks et al. 2012b). In einer umfassenden Analyse der klinischen Performance, die 10 Kohorten umfasste, wurden insgesamt über 23.000 Schwangerschaften untersucht, davon 421 Schwangerschaften mit einer T21. 418 der 421 T21-Schwangerschaften wurden positiv getestet, 3 wurden als falsch-negativ kategorisiert. Von den euploiden Schwangerschaften wurden 227.724 von 231.55 als negativ, 10 als falsch-positiv getestet. Somit wurde eine Sensitivität von 99,3 % und eine Spezifität von 99,9 % errechnet. Die Rate der Testversager aufgrund einer zu geringen FF wurde nicht angegeben (Stokowski et al. 2015). Mittels einer Microarray basierten Untersuchung wurde die Testung nochmals verbessert. Juneau et. al. zeigten, dass die Varianz der cfDNA-Fragmentzählungen bei Verwendung eines Microarrays verringert ist, wenn verglichen mit der Verwendung von Next Generation Sequencing Techniken. Zusätzlich wurde die FF-Bestimmung durch eine größere Anzahl der analysierten polymorphen Regionen präzisiert und die Analysezeit drastisch von durchschnittlich 56 Stunden auf 7,5 Stunden reduziert. Insgesamt wurden in der Studie 878 Proben mit bekannten Trisomiestatus richtig getestet, davon waren 691 von euploiden, 18 von T13, 37 von T18 und 132 von T21-Feten (Juneau et al. 2014).

Zur Vergleichbarkeit beider Studienarme erfolgte die Klassifizierung als „Screening positiv“ bei einem ermittelten T21-Risiko  $> 1:100$ . Dieser Wert wird bereits standardmäßig bei der cfDNA-Analyse angewandt (Kagan et al. 2018). Für das ETS wird die Risikoschwelle heraufgesetzt; wie aus Tabelle 3 ersichtlich sinkt somit die DR und die FPR.

## 2.6 Erwartete falsch-positiv Rate und invasive Diagnostik

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich liegt die erwartete FPR bei 2 % für das kombinierte ETS bei einem Schwellenwert von 1:100. Aus Erfahrungen durch vorausgegangene prospektive ETS-Studien der Abteilung, wurde von einer erhöhten Altersstruktur ( $\geq 35$  Jahre) im Studienkollektiv in Relation zum Vergleichskollektiv aus England und Wales und somit mit einer höheren FPR von 2,5 % ausgegangen (Abele et al. 2015; Wagner et al. 2017; Wright et al. 2014). Wiederum hat der Studienausschluss aller Feten mit einer erhöhten NT  $\geq 3,5$  mm eine Abnahme der FPR zur Folge, weswegen diese abschließend mit 1,5 % für das kombinierte ETS geschätzt wurde (Kagan et al. 2018). Für die cfDNA-Analyse wurde eine FPR von 0,1 % und eine Rate von ergebnislosen Tests von 3 % angenommen. Durch eine weitere Analyse kann die Rate ergebnisloser Tests voraussichtlich auf 2 % gesenkt werden. Da für die 2 % ergebnisloser Tests anschließend mittels kombiniertem ETS das T21-Risiko ermittelt werden soll und daher die FPR des kombinierten ETS für diesen Anteil gilt, ergibt sich eine geschätzte FPR von 0,13 % für den Studienarm Ultraschall mit cfDNA-Analyse (Kagan et al. 2018).

Im Falle einer Screening-positiven Schwangerschaft wurde eine invasive Diagnostik angeboten und gegebenenfalls durchgeführt. Durch die verringerte FPR beider Studienarme (Studienarm 1 FPR von 2,0 %, Studienarm 2 FPR von 0,13 %) gegenüber des normalerweise angewandten Schwellenwerts beim

kombinierten ETS von 1:150 (FPR etwa 3 %), wird eine Reduktion der invasiven Diagnostik während der Studiendurchführung erwartet.

## 2.7 Befragungen der Patientinnen

Parallel wurden drei Befragungen der Patientinnen, die erste vor der Randomisierung und Aufklärung durch den betreuenden Arzt, eine weitere ab 2 Wochen nach der Ergebnismitteilung und die letzte nach der Geburt, durchgeführt. Die Fragebögen enthielten Fragen zu der Zufriedenheit der Studienteilnahme und Testabläufe und zum Wissen über die Screening-Tests. Die Patientinnen wurden telefonisch oder, falls in stationärer Behandlung, persönlich befragt. Die Fragebögen sind im Anhang zu finden und eine ausführliche Auswertung dieser ist Gegenstand der Promotionsarbeit von Markus Mader, Medizinische Fakultät der Universitätsklinik Tübingen.

## 2.8 Verlaufsdatenerhebung

Die Untersuchungsergebnisse wurden im Software-Programm „Viewpoint“ von GE Healthcare, München dokumentiert. Sowohl Bildmaterial als auch Messungen in numerischer Form und detaillierten Beschreibungen von Auffälligkeiten der ausführlichen Ultraschalluntersuchung wurden festgehalten und die anamnestisch erhobenen mütterlichen Faktoren, wie Alter, Gewicht, Raucherstatus, Ethnizität, Konzeptionsmodus und Parität eingetragen. Sonographisch wurde das Gestationsalter und Anzahl der Feten bestimmt und ebenfalls dokumentiert (Kagan et al. 2018). Im Falle der Durchführung einer serumbiochemischen Analyse wurden die ermittelten Serumspiegel von  $\beta$ -hCG und PAPP-A ebenfalls in das System übertragen und mittels der bereits erhobenen Daten die MoM-Werte durch die Software ausgegeben. Nach Eintragung aller benötigten Untersuchungsdaten wurde von „Viewpoint“ von GE Healthcare, München ein individuelles Risiko für eine Schwangerschaft mit einem T21-positivem Föten mittels ETS errechnet. Im Falle der Durchführung einer cfDNA-Analyse wurde nach Übermittlung des Ergebnisses an die

Abteilung für Pränataldiagnostik der Universitätsfrauenklinik, Tübingen, das individuelle Risiko einer Schwangerschaft mit einem T21 positiven Föten in „Viewpoint“ von GE Healthcare, München zusammen mit der ermittelten FF dokumentiert. Auch im Falle einer durchgeführten invasiven Diagnostik wurde das Ergebnis der CVS oder AC hier festgehalten.

Für die erste Befragung vor der Randomisierung und Aufklärung durch den betreuenden Arzt wurden mit den Aufnahmeunterlagen der „1. Fragebogen im Rahmen der ReFaPo-Studie an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen“ (siehe Anhang) den Patientinnen, die zum ETS erschienen, ausgehändigt. Die Antworten aller Patientinnen, die zum ETS im Zeitraum der Studiendurchführung erschienen, wurden unter dem Pseudonym erfasst. Für die 2 weiteren Befragungen wurden die Patientinnen telefonisch kontaktiert oder, bei Aufenthalt in der Universitätsfrauenklinik Tübingen, direkt befragt. Die Antworten des Fragebogens „2 Wochen nach Abschluss des Screening-Tests und nach Abschluss der Schwangerschaft“ wurden ebenfalls unter dem Pseudonym erfasst.

## 2.9 Enddatenerhebung

Zur weiteren Auswertung wurden die Ergebnisse der Untersuchung pseudonymisiert in eine gesicherte Exceltabelle übertragen. Hierzu gehörten das mütterliche Alter, das Gestationsalter, die SSL, die NT, die Herzfrequenz, der BPD, die Darstellbarkeit des NB, Vorhandensein einer TI, DV-Fluss, Vorhandensein von Fehlbildungen, den MoMs von  $\beta$ -hCG und PAPP-A im Fall von Studienarm 1 beziehungsweise der FF im Fall von Studienarm 2, sowie dem mütterlichen Altersrisiko, dem ermittelten individuellen Risiko und dem Datum des Befunds. Im Falle einer invasiven Diagnostik wurde dieses Ergebnis ebenfalls erfasst.

Der primäre Endpunkt sind die FPR in den beiden Studienarmen. Für die Überprüfung der korrekten Klassifizierung durch die Screeningtests wurde, bei

Verfügbarkeit, das Ergebnis der invasiven Diagnostik herangezogen. Für die Fälle ohne anschließende invasive Diagnostik wurden die Patientinnen ab sechs Wochen nach dem voraussichtlichen Entbindungstermin telefonisch kontaktiert. Dieses Intervall wurde gewählt um erstens eine mögliche spätere Entbindung verglichen zum voraussichtlichen Entbindungstermin zu berücksichtigen, sowie das Ergebnis der dritten Früherkennungsuntersuchung des Säuglings beim Kinderarzt, der sogenannten U3-Untersuchung, abzuwarten. Falls nach der U3-Untersuchung keine auf eine T21 oder andere Aberrationen deutenden Auffälligkeiten zu finden waren, wurden die Säuglinge abschließend als euploid klassifiziert. Somit konnten die Screening-Ergebnisse anschließend wie nach Tabelle 1 in richtig- oder falsch-positiv, beziehungsweise richtig- oder falsch-negativ kategorisiert werden. Die Dokumentation erfolgte pseudonymisiert zusammen mit den Daten der Untersuchung.

## 2.10 Power-Berechnung und Statistische Auswertung

Erwartet wird in Studien-Arm 1 und 2 jeweils eine FPR von 1,5 % und 0,13 %. Das Signifikanzniveau soll bei  $p = 0,05$  liegen und die Power bei 0,8. Daher ergibt sich, dass in beiden Studienarmen jeweils eine Anzahl von 674 Patientinnen untersucht werden müssen (Kagan et al. 2018). Unter Berücksichtigung eines geringen Anteils an Patientinnen, bei denen das Ergebnis des Aneuploidiestatus nach der Schwangerschaft nicht erhoben werden kann, sollen in jedem Studienarm jeweils 700 Patientinnen untersucht werden. In Studienarm 1 werden daher rechnerisch 10,5, beziehungsweise 11 Patientinnen mit einem falsch-positivem Ergebnis erwartet. In Studienarm 2 werden rechnerisch 0,91, beziehungsweise eine Patientin mit einem falsch-positivem Ergebnis erwartet.

Die FPR für das ETS wurde mittels Vergleichs des 95 % Konfidenzintervalls (engl. confidence interval, CI) unter Verwendung der Clopper-Pearson Methode und des Chi-Quadrattests analysiert. Die FPR des kombinierten ETS wurde

sowohl unverändert als auch angepasst an die mütterliche Altersstruktur in Deutschland im Jahr 2015 berechnet. Nach der Geburtsjahrmethode lag das mediane mütterliche Alter in Deutschland 2015 bei 31 Jahren, der Interquartilabstand (IQA) bei 27 bis 35 Jahren und 25,9 % aller Frauen waren 35 Jahre oder älter (Statistisches Bundesamt 2016). Eine Anpassung des mütterlichen Alters war in der Gruppe der cfDNA-Analyse nicht von Nöten, da das berechnete Risiko bei 99,0 % aller Frauen 1 zu 10.000 oder geringer lag (Kagan et al. 2018).

Maternale und schwangerschaftsspezifische Charakteristika wurden mithilfe des Mann-Whitney U-Test für kontinuierliche Variablen und mithilfe des Chi-Quadratstest für kategorielle Variablen verglichen. Der p-Wert wurde mit einem zweiseitigen Signifikanzniveaus von 5 % bewertet (Kagan et al. 2018).

### 3 Ergebnisse

Zwischen Oktober 2015 und Dezember 2016 erschienen 1601 Frauen in der Abteilung für Pränataldiagnostik an der Universitätsfrauenklinik Tübingen für ein ETS. 76 Frauen wurden wegen einer Mehrlingsgravidität und 7 wegen einem zu hohen Gestationsalters primär ausgeschlossen. Somit verblieben 1518 Frauen mit Einlingsgraviditäten im richtigen Untersuchungszeitraum zwischen der 12. bis 14. SSW. Weitere 31 Patientinnen (2 %) wurden nach einer auffälligen feindiagnostischen Ultraschalluntersuchung, entweder wegen einer erhöhten NT und/oder Fehlbildungen, ausgeschlossen. In dieser Gruppe befanden sich alle diagnostizierten Fälle von Trisomien der gesamten Population, darunter sieben Fälle mit T21, einen Fall von T18 und zwei Fälle mit T13. Die Anzahl der T21-Fälle stimmt mit der erwarteten Anzahl basierend auf der mütterlichen Altersstruktur der Kohorte überein; die Summe der Altersrisiken der 1518 Patientinnen für eine T21 betrug 7,15 (Mittelwert  $4,71 \cdot 10^{-3}$ ; 95 % CI  $4,58 \cdot 10^{-3} - 4,84 \cdot 10^{-3}$ ). Durch die Zuordnung aller Trisomieschwangerschaften in das Risikokollektiv enthielt unser Studienkollektiv nur euploide Feten (Kagan et al. 2018).

87 (5,9 %) Patientinnen lehnten die Studienteilnahme ab. Die verbleibenden 1400 Patientinnen wurden in die beiden Studienarme randomisiert, 699 Patientinnen in Studienarm 1, dem kombinierten ETS und 701 Patientinnen in Studienarm 2, dem Ultraschall mit cfDNA-Analyse. Im Verlauf der Studie wurden wegen Fehlgeburt oder intrauterinem Fruchttod drei Patientinnen aus dem Studienarm des kombinierten ETS und fünf Patientinnen aus dem Studienarm US und cfDNA-Analyse ausgeschlossen. Acht weitere Patientinnen je Studienarm wurden aufgrund eines nicht bekannten Schwangerschaftsausgangs aus der Analyse ausgeschlossen. Somit wurden wie aus Abbildung 5 ersichtlich je 688 Patientinnen pro Studienarm in die Analyse eingeschlossen (Kagan et al. 2018).



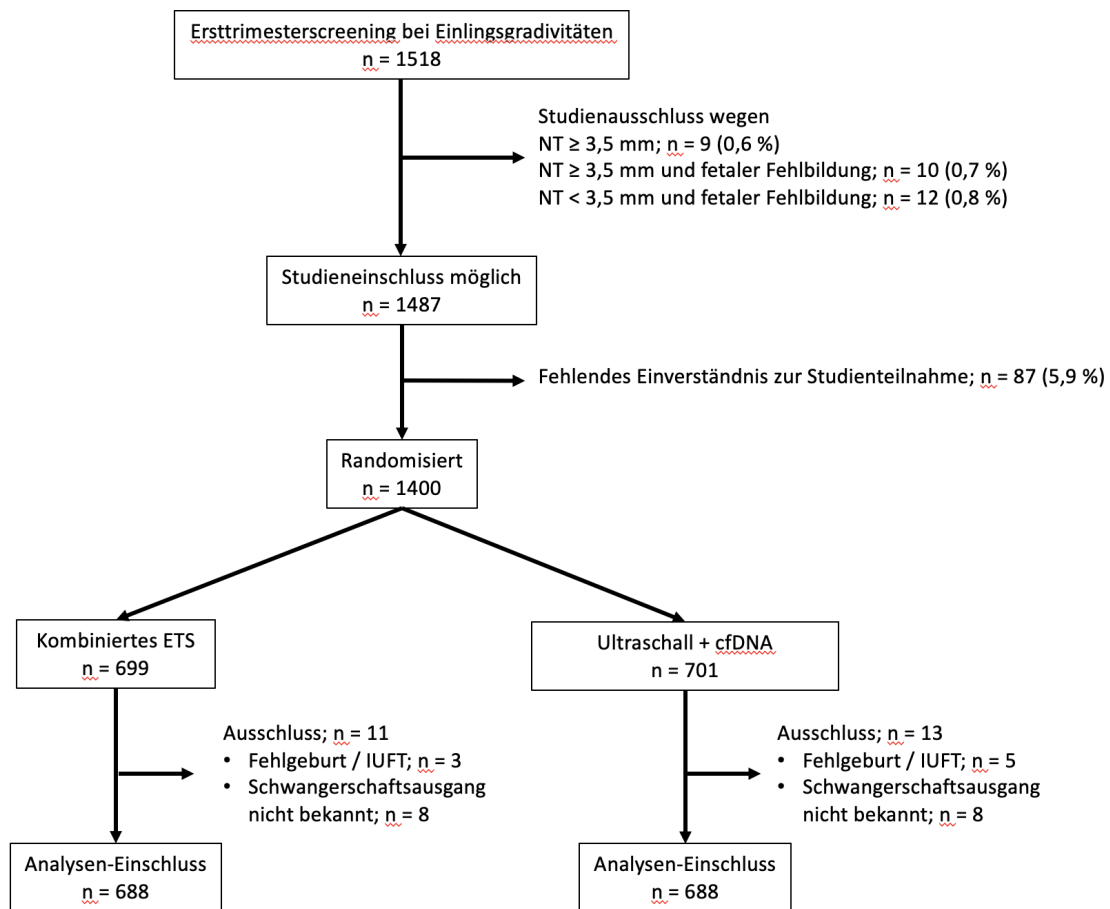


Abbildung 5: Flussdiagramm zur Formationsdarstellung des Studienkollektivs und der Studienarme für das kombinierte ETS und für Ultraschall mit cfDNA-Analyse (Kagan et al. 2018).

n, Anzahl; NT, Nackenfaltentransparenz; ETS, Ersttrimesterscreening; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse; IUFT, intrauteriner Fruchttod.

### 3.1 Charakteristika der Studienarme

Die maternalen Charakteristika der Studienarme sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Wie in Abbildung 6 dargestellt lag das mediane mütterliche Alter zu Untersuchungszeitpunkt bei 33,9 Jahren in beiden Gruppen, der IQA bei 30,7 – 36,7 Jahren für die Gruppe des kombinierten ETS und bei 31,0 – 36,8 Jahren für die Gruppe Ultraschall mit cfDNA-Analyse. In beiden Gruppen war das mediane Gestationsalter 12,7 Wochen, mit einem IQA von 12,3 – 31,1 Wochen für die Gruppe des kombinierten ETS und von 12,4 – 13,1 für die Gruppe Ultraschall und cfDNA-Analyse (Abbildung 7; Kagan et al. 2018). Das mediane mütterliche Gewicht lag in den Gruppen bei 66,0 kg und 65,4 kg mit

IQA von 59,1 – 74,3 kg und 59,0 – 73,7 kg für das kombinierte ETS und den Ultraschall mit cfDNA-Analyse (Abbildung 8). In dem Studienarm des kombinierten ETS waren 676 (98,3 %) Frauen von kaukasischer Herkunft, 23 (3,3 %) Raucherinnen und 29 (4,2 %) erhielten eine assistierte Reproduktion. In dem Studienarm Ultraschall und cfDNA-Analyse waren 672 (97,7 %) Frauen von kaukasischer Herkunft, 19 (2,8 %) Raucherinnen und 44 (6,4 %) erhielten eine assistierte Reproduktion. Die Studiengruppen wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  bezüglich des mütterlichen Alters, des Gestationsalters, des mütterlichen Gewichts, Anteil der kaukasischen Mütter, Raucherstatus und assistierter Reproduktion auf (Kagan et al. 2018).

*Tabelle 4: Merkmale der 1376 Frauen im Randomisierungskollektiv für das ETS auf T21 bei kombiniertem ETS oder bei US mit cfDNA-Analyse. Ergebnisse sind als absolute Anzahl, n (prozentualer Anteil, %) oder Median (Interquartilabstand) angegeben (Kagan et al. 2018). ETS, Ersttrimesterscreening; US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse.*

Merkmal	kombiniertes ETS (n = 688)	US + cfDNA (n = 688)	p
Mütterliches Alter (Jahren)	33,9 (30,7 - 36,7)	33,9 (31,0 - 36,8)	0,498
Schwangerschaftswoche (Wochen)	12,7 (12,3 - 13,1)	12,7 (12,4 - 13,1)	0,296
Mütterliches Gewicht (kg)	66,0 (59,1 - 74,3)	65,4 (59,0 - 73,7)	0,26
Kaukasischer Herkunft	676 (98,3)	672 (97,7)	0,445
Raucher	23 (3,3)	19 (2,8)	0,531
Assistierte Reproduktion	29 (4,2)	44 (6,4)	0,09

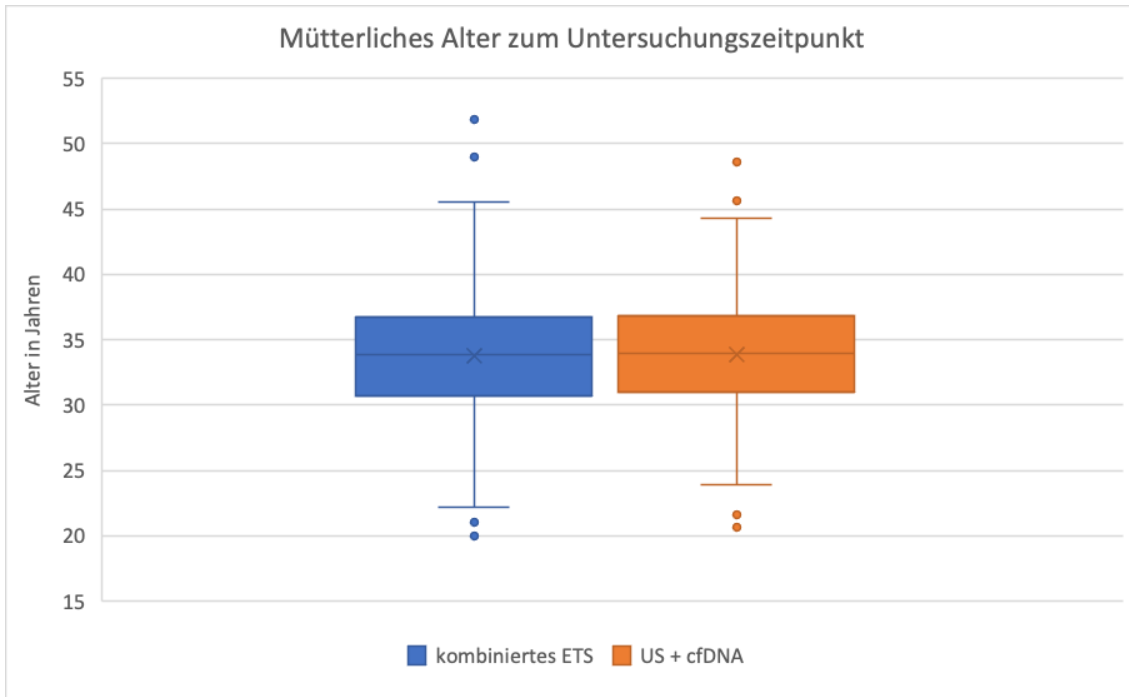


Abbildung 6: Mütterlichen Alters in Jahren in der Gruppe des kombinierten ETS und der Gruppe des Ultraschalls und cfDNA-Analyse (US + cfDNA) zum Zeitpunkt der ETS-Untersuchung. ETS, Ersttrimesterscreening; US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse.

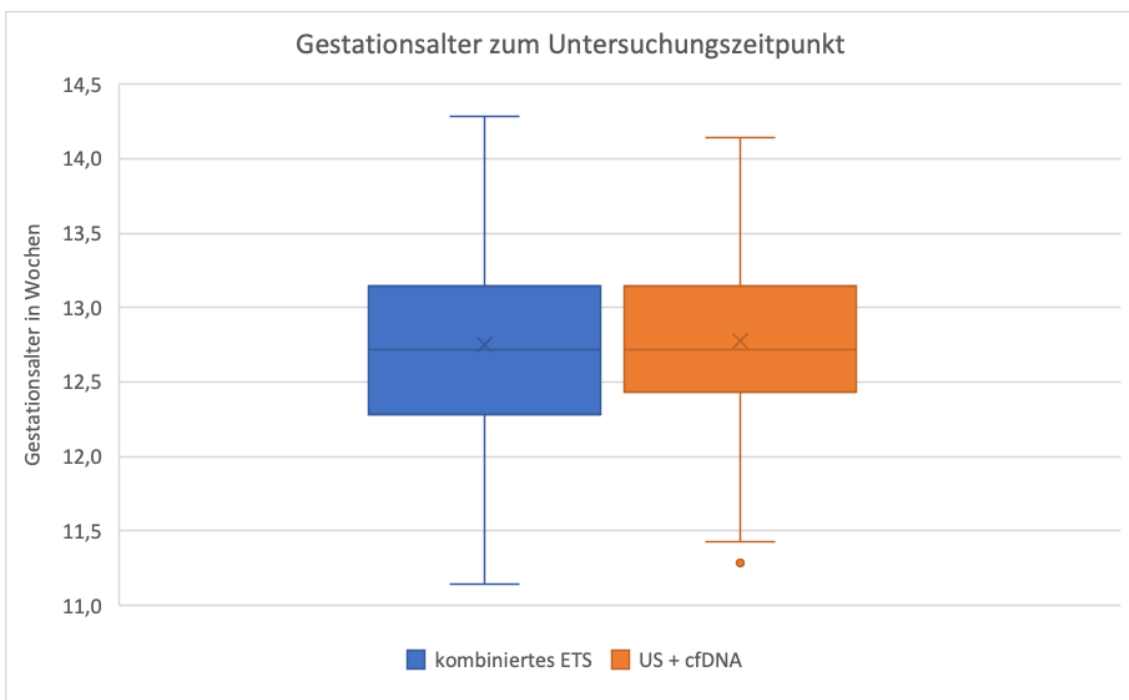


Abbildung 7: Gestationsalter in Wochen zum Zeitpunkt der ETS-Untersuchung in der Gruppe des kombinierten ETS und der Gruppe des Ultraschalls und cfDNA-Analyse (US + cfDNA). ETS, Ersttrimesterscreening; US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse.

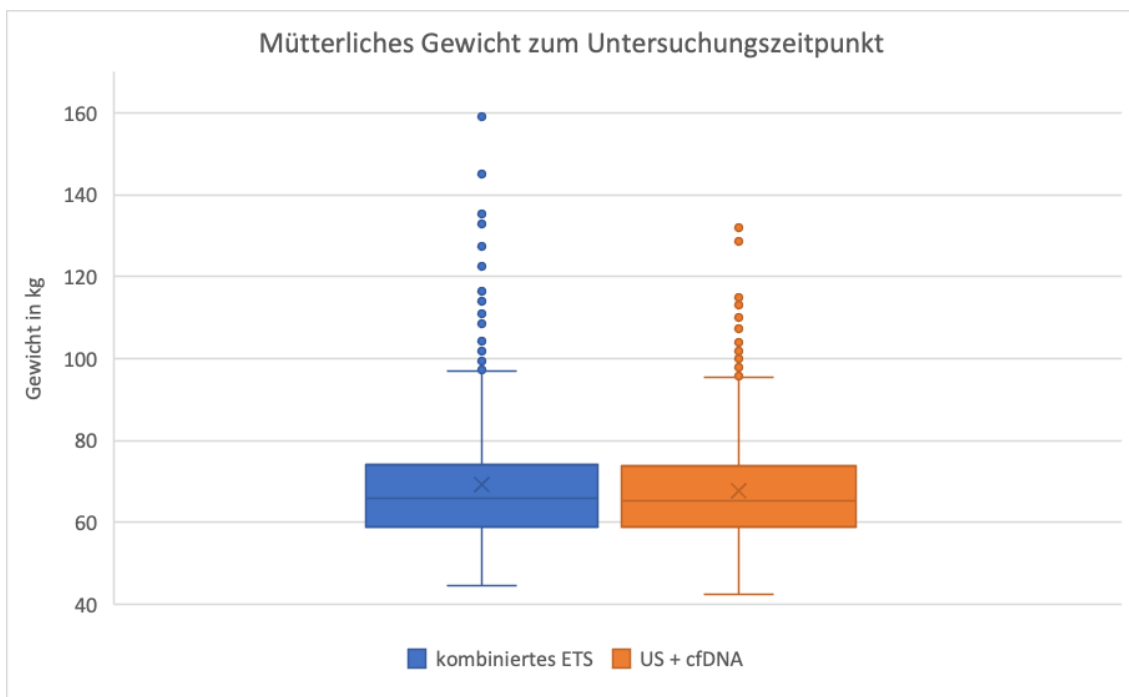


Abbildung 8: Mütterliches Gewicht in kg zum Zeitpunkt der ETS-Untersuchung in der Gruppe des kombinierten ETS und der Gruppe des Ultraschalls und cfDNA-Analyse (US + cfDNA). ETS, Ersttrimesterscreening; US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse.

### 3.2 NT-Messung und Risikoverteilung

Die Risikoparameter der Studienarme sind in Tabelle 5 aufgeführt. Der Median der NT-Messung lag in der kombinierten ETS-Gruppe bei 1,9 mm, in der Ultraschall mit cfDNA-Analyse bei 1,8 mm. Für die  $\Delta$ NT, die durch Abzug der erwarteten NT von der gemessenen NT errechnet wurde, wurde in beiden Gruppen ein Median von 0,0 mm ermittelt (Kagan et al. 2018). Sowohl die NT-Messung als auch  $\Delta$ NT unterschieden sich nicht signifikant in den Studienarmen ( $p = 0,843$  und  $p = 0,486$ ). Die SSL-abhängige NT der kombinierten ETS-Gruppe ist in Abbildung 9, der Ultraschall und cfDNA-Analyse-Gruppe in Abbildung 10 dargestellt.

In der Gruppe des kombinierten ETS lagen die Mediane für die Serumparameter  $\beta$ -hCG und PAPP-A bei 0,96 MoM und 11,1 MoM. In der Gruppe Ultraschall mit cfDNA-Analyse lag der Median für die FF bei 12,5 %. Insgesamt konnten bei 10 (1,5 %) Patientinnen keine Ergebnisse durch die cfDNA-Analyse ermittelt werden. Das individuelle Risiko wurde anstelle mit dem

kombinierten ETS ermittelt (Kagan et al. 2018). Die Mediane der Serumparametern lag bei diesen 10 Patientinnen bei 0,66 MoM für  $\beta$ -hCG und bei 0,73 MoM für PAPP-A. Statistisch lag ein signifikanter Unterschied zwischen den MoMs von  $\beta$ -hCG der Gruppe des kombinierten ETS und der Gruppe von 10 Patientinnen nach fehlgeschlagener cfDNA-Analyse ( $p = 0,36$ ) vor, nicht jedoch zwischen dem MoMs von PAPP-A ( $p = 0,156$ ).

*Tabelle 5: Risikoparameter im ETS auf T21 basierend auf dem kombinierten ETS oder Ultraschall mit cfDNA-Analyse (US + cfDNA). Daten sind als Mediane (IQA) oder n (%) angegeben. \*Das individuelle Risiko wurde in diesen Fällen mittels kombiniertem ETS ermittelt (Kagan et al. 2018).*

*ETS, Ersttrimesterscreening; T21, Trisomie 21; US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse, IQA, Interquartilabstand; n, Anzahl, SSL, Scheitel-Steiß-Länge; NT, Nackenfaltentransparenz;  $\Delta$ , Delta;  $\beta$ -hCG, freie  $\beta$ -Kette des humanen Choriongonadotropin; MoM, Vielfache des Medians, PAPP-A, schwangerschaftsassoziertes Plasmaprotein-A.*

Risikoparameter	kombiniertes ETS (n = 688)	US + cfDNA (n = 688)
Mütterliches Alter (Jahren)	33,9 (30,7 - 36,7)	33,9 (31,0 - 36,8)
SSL (mm)	67,6 (62,6 - 72,9)	67,7 (62,7 - 72,8)
NT (mm)	1,9 (1,6 - 2,1)	1,8 (1,6 - 2,1)
$\Delta$ NT (mm)	0,0 (-0,2 - 0,2)	0,0 (-0,2 - 0,2)
Serum $\beta$ -hCG (MoM)	0,96 (0,64 - 1,44)	-
Serum PAPP-A (MoM)	1,11 (0,76 - 1,51)	-
FF (%)	-	12,5 (9,8 - 16,0)
fehlgeschlagene cfDNA-Analysen*	-	10 (1,5)
Serum $\beta$ -hCG in ergebnislosen cfDNA-Analysen (MoM)	-	0,66 (0,37 - 0,9)
Serum PAPP-A in ergebnislosen cfDNA-Analysen (MoM)	-	0,73 (0,67 - 1,23)

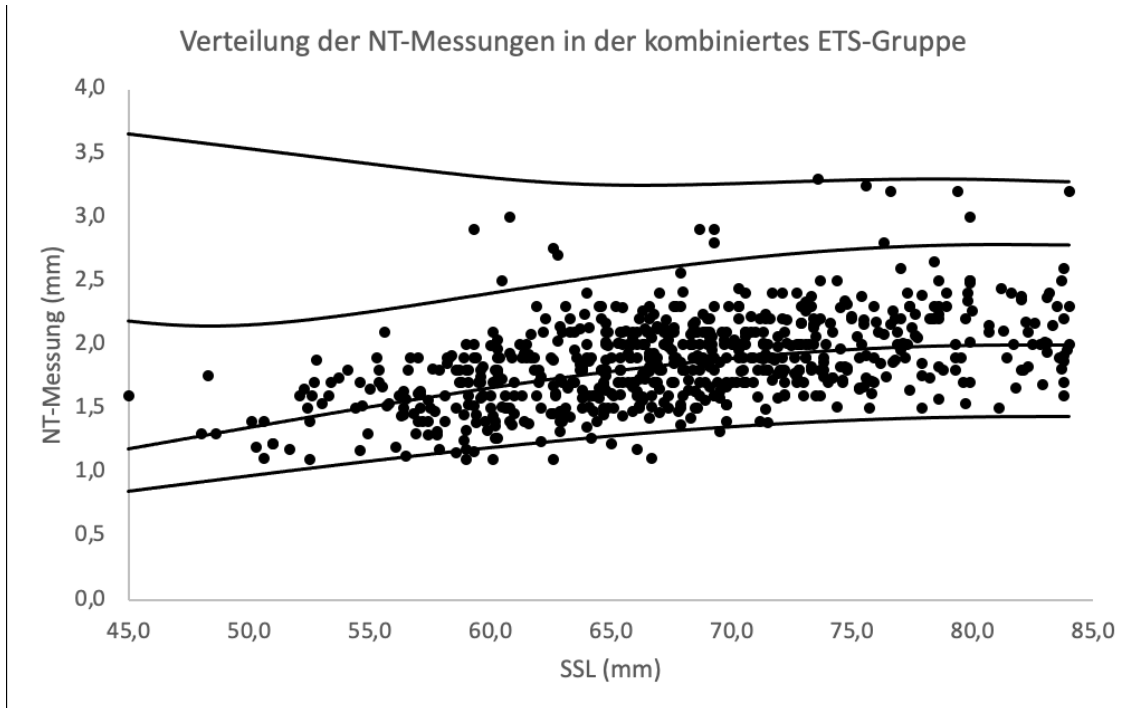


Abbildung 9: Verteilung der NT-Messungen in der Gruppe des kombinierten ETS nach SSL der Feten. Die Linien repräsentieren die 5., 50., 95. und 99. Perzentile .  
 NT, Nackenfaltentransparenz; ETS, Ersttrimesterscreening; SSL, Scheitel-Steiß-Länge.

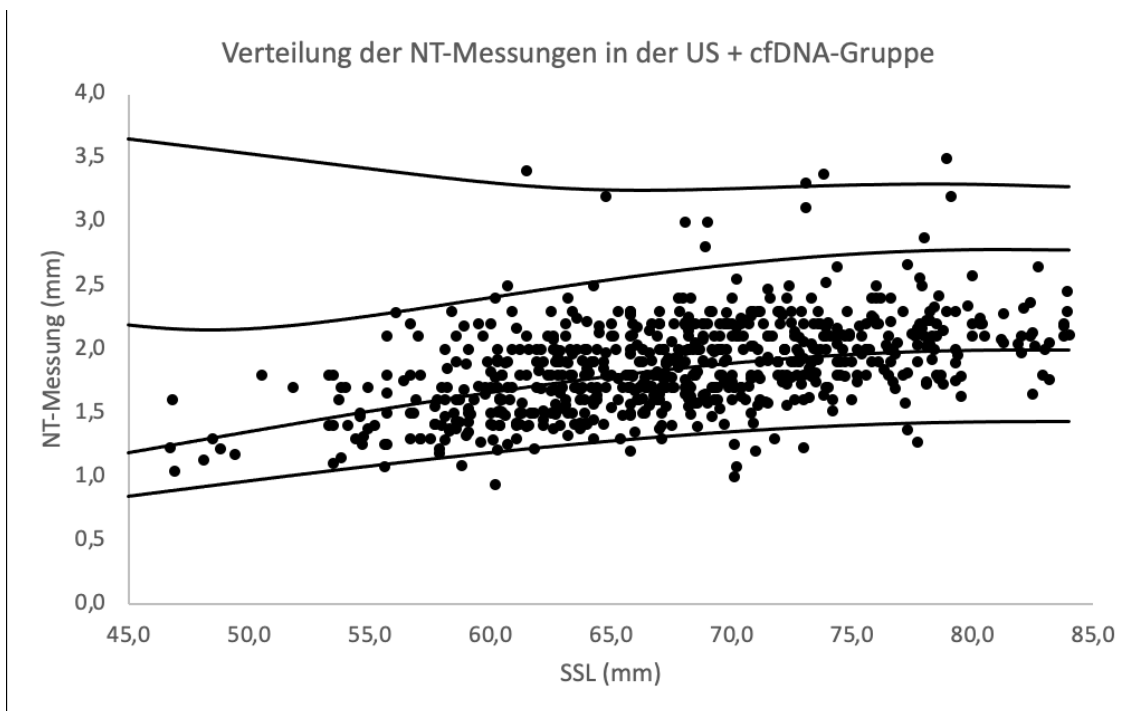


Abbildung 10: Verteilung der NT-Messungen in der Gruppe Ultraschall mit cfDNA-Analyse nach SSL der Feten. Die Linien repräsentieren die 5., 50., 95. und 99. Perzentile (Kagan et al. 2018).  
 NT, Nackenfaltentransparenz; US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse; SSL, Scheitel-Steiß-Länge.

Das mediane Risiko für eine T21 lag bei 1:3787 in der Gruppe des kombinierten ETS. Bei 17 Fällen wurde ein Risiko  $> 1:100$  ermittelt und gehörten somit dem Hochrisikokollektiv an, was 2,5 % (95 % CI, 1,5 – 3,9 %) des ersten Studienarms entspricht. Nach Standardisierung an die mütterliche Altersstruktur in Deutschland 2015 wären 15 Fälle in das Hochrisikokollektiv gefallen, was 2,2 % (95 % CI, 1,2 – 3,6 %) aller Schwangeren entspricht (Kagan et al. 2018). Das Ergebnis der biochemischen Parametern lag meist noch am selben Tag vor (Median 0 Tage, 3. Quartile 0 Tage, Maximum 1 Tag), sodass das individuelle Risiko zur Mitteilung am Tag nach der Untersuchung bereit war.

In der Gruppe Ultraschall mit cfDNA-Analyse lag das mediane Risiko für eine T21 bei 1:10.000. In keinem der Fälle lag das Risiko bei  $> 1:100$  (CI 95 %, 0,0 – 0,5 %). Das ermittelte Risiko vor und nach der Alterstandardisierung in dem Studienarm des kombinierten ETS lag signifikant höher als in dem Studienarm des Ultraschalls mit cfDNA-Analyse (Chi-Quadratstest,  $p < 0,0001$ ; Kagan et al. 2018). Die mediane Anzahl von Tagen zum Erhalten des cfDNA-Ergebnisses betrug 7 Tage (IQA 6 – 8 Tage) nach Untersuchung. Die Risikoverteilung für eine T21 in beiden Studienarmen ist in Tabelle 6 und Abbildung 11 zusammengefasst. Die Verteilung des individuellen T21-Risikos nach mütterlichem Alter und nach SSL sind für beide Studienarme in den Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt.

Tabelle 6: Verteilung der individuellen Risiken ermittelt durch das kombinierte ETS und durch Ultraschall mit cfDNA-Analyse (US + cfDNA) in Risikokategorien. Daten sind als Mediane (IQA) oder n (%) angegeben (Kagan et al. 2018).

ETS, Ersttrimesterscreening; US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse, T21, Trisomie 21; IQA, Interquartilabstand; n, Anzahl.

	kombiniertes ETS (n = 688)	US + cfDNA (n = 688)
Medianes Risiko einer T21	1:3787 (1605 - 8280)	1:10 000 (10.000 - 10.000)
T21 Risiko > 1:100	17 (2,5)	0 (0)
T21 Risiko 1:100 bis 1:999	79 (11,5)	2 (0,3)
T21 Risiko 1:1000 bis 1:4999	302 (43,9)	1 (0,1)
T21 Risiko 1:5000 bis 1:9999	163 (23,7)	4 (0,6)
T21 Risiko ≤ 1:10.000	127 (18,5)	681 (99,0)

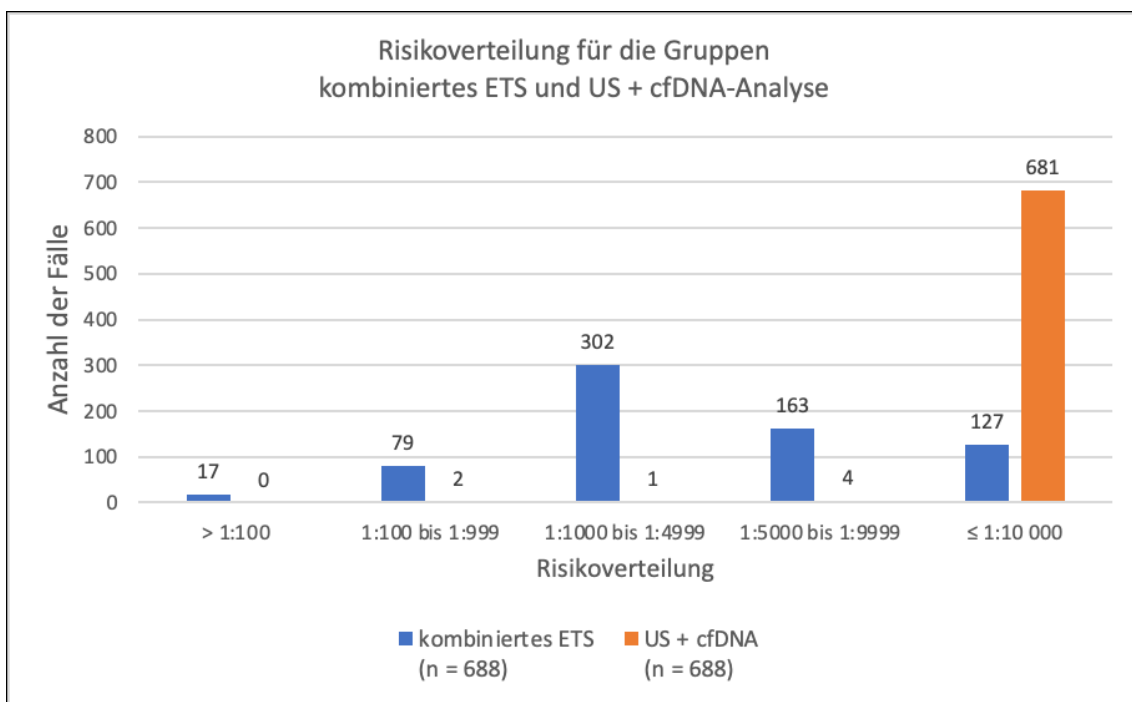


Abbildung 11: Verteilung der individuellen Risiken ermittelt durch das kombinierte ETS und durch Ultraschall mit cfDNA-Analyse (US + cfDNA) als absolute Fallanzahl in Risikokategorien. ETS, Ersttrimesterscreening; US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse; n, Anzahl.



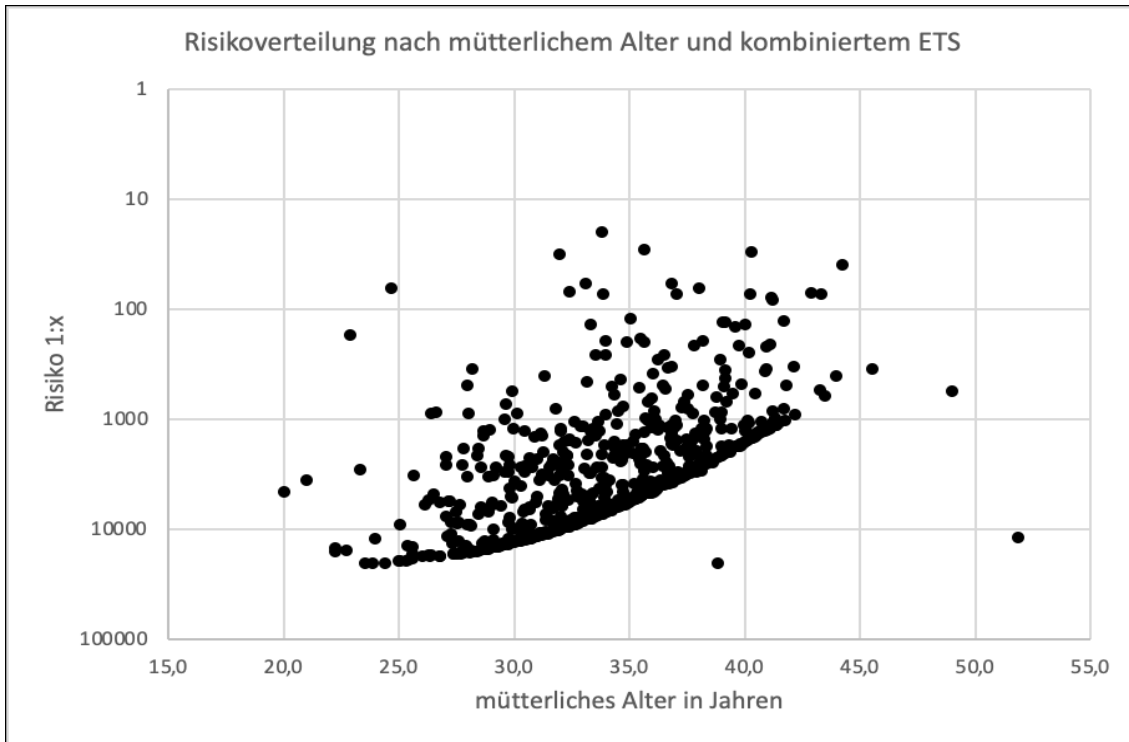


Abbildung 12: Risikoverteilung für eine T21 in dem Studienarm kombiniertes ETS nach mütterlichem Alter in Jahren zum Untersuchungszeitpunkt. T21, Trisomie 21; ETS, Ersttrimesterscreening.

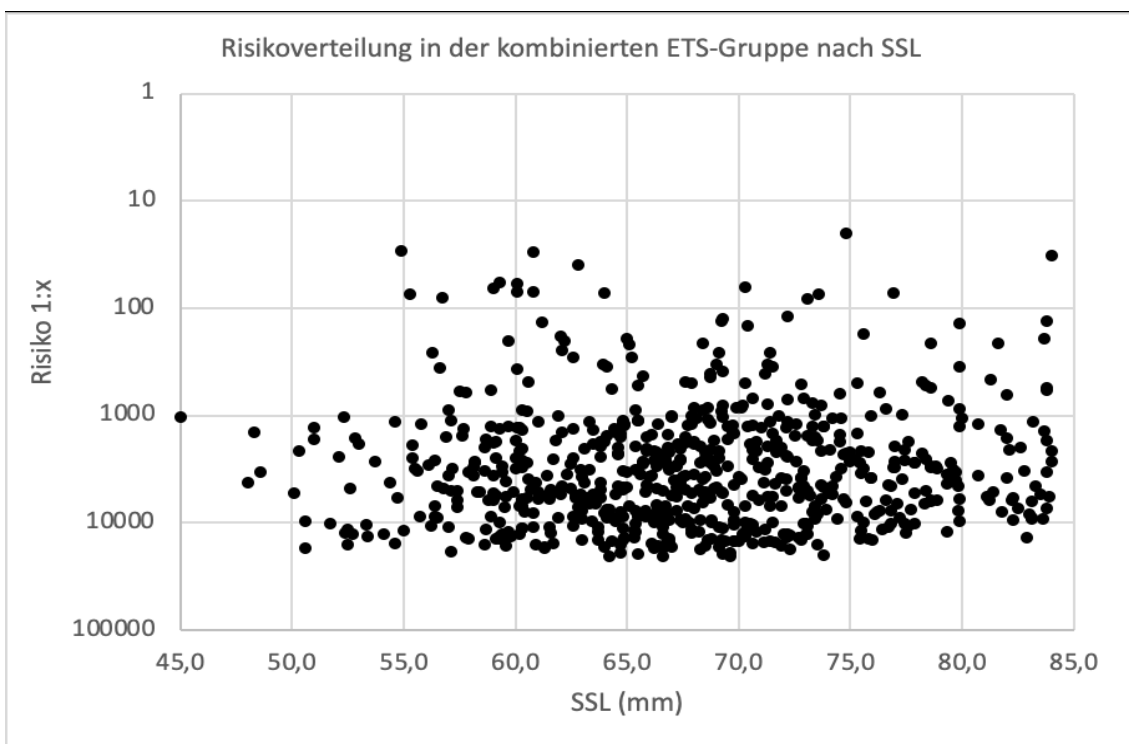


Abbildung 13: Risikoverteilung für eine T21 in dem Studienarm kombiniertes ETS nach SSL (Kagan et al. 2018). ETS, Ersttrimesterscreening; SSL, Scheitel-Steiß-Länge; T21, Trisomie 21.

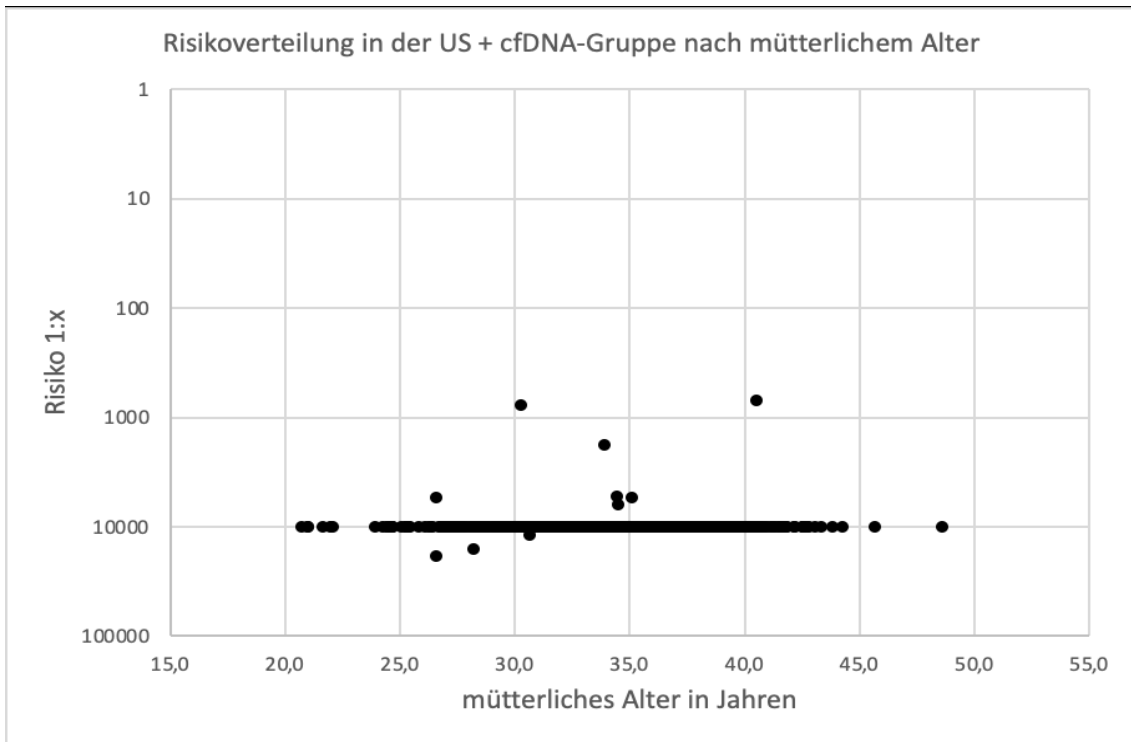


Abbildung 14: Risikoverteilung für eine T21 in dem Studienarm Ultraschall und cfDNA-Analyse nach mütterlichem Alter in Jahren zum Untersuchungszeitpunkt. US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse.

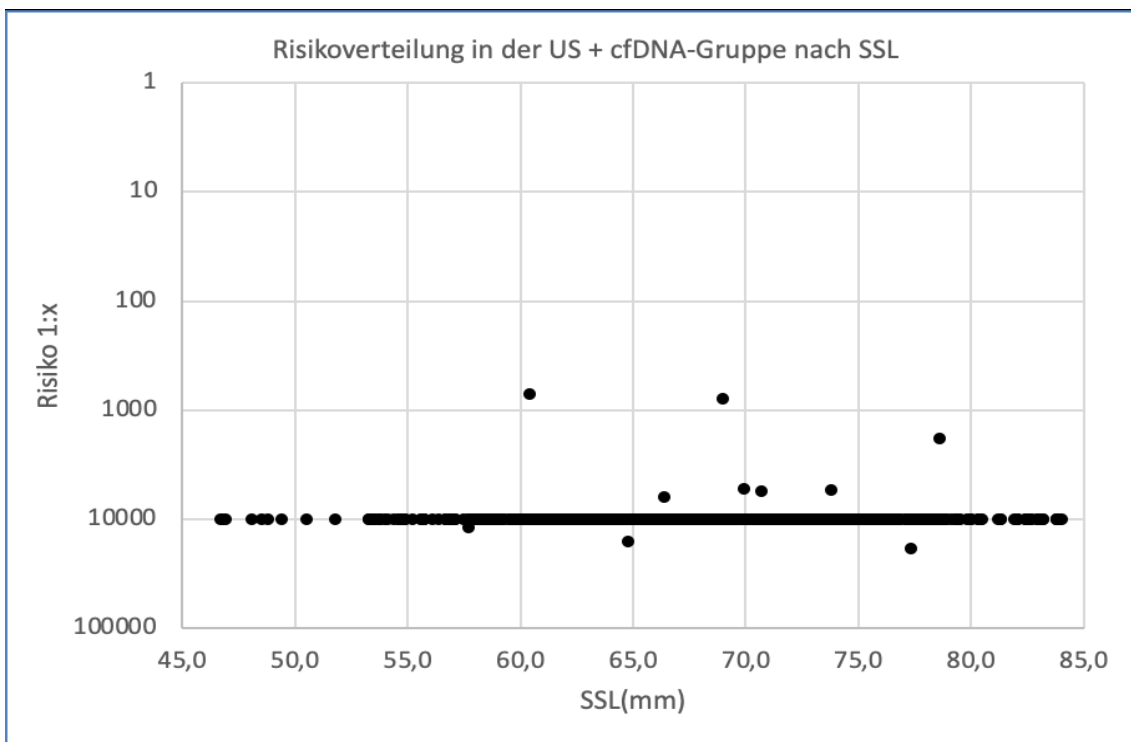


Abbildung 15: Risikoverteilung für eine T21 in dem Studienarm Ultraschall und cfDNA-Analyse nach SSL (Kagan et al. 2018). US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse; SSL, Scheitel-Steiß-Länge; T21, Trisomie 21.

### 3.3 Nicht-auswertbare cfDNA-Analysen

Die cfDNA-Analyse blieb bei insgesamt 17 (2,5 %) Patientinnen nach der ersten Probenentnahme ergebnislos. Nach erneuter Blutentnahme konnte bei 7 weiteren Patientinnen ein Ergebnis ermittelt werden, 10 (1,5 %) Analysen blieben ohne Ergebnis. Die Serumwerte der 10 Patientinnen ohne cfDNA-Analyseergebnis sind in 3.2 beschrieben. Das mütterliche Gewicht dieser Subpopulation gegenüber dem der 678 Patientinnen mit erfolgreichen cfDNA-Analysen ist in Abbildung 16 dargestellt. Das mediane Gewicht der Patientinnen mit cfDNA-Analyseergebnis lag bei 65,2 kg (IQA 59,0 – 73,3 kg), der Patientinnen ohne Ergebnis bei 84,8 kg (IQA 69,4 – 98,2 kg); es lag ein statistisch signifikanter Unterschied vor ( $p = 0,011$ ).

Die Zeit zwischen Untersuchung und Ergebnisermittlung wurde durch fehlgeschlagene cfDNA-Analysen statistisch signifikant verlängert ( $p < 0,001$ ). So lag die mediane Anzahl von Tagen zwischen Untersuchung und Ergebnisermittlung, entweder durch eine erfolgreiche wiederholte cfDNA-Analyse oder durch die Entscheidung eine Risikoanalyse mittels kombinierten ETS nach erfolglosen cfDNA-Analysen durchzuführen, bei 12 Tagen (IQA 9 – 19 Tage) für Patientinnen mit primär fehlgeschlagenen cfDNA-Analysen und bei 7 Tagen (IQA 6 – 8 Tage) für Patientinnen mit primär erfolgreicher cfDNA-Analyse.

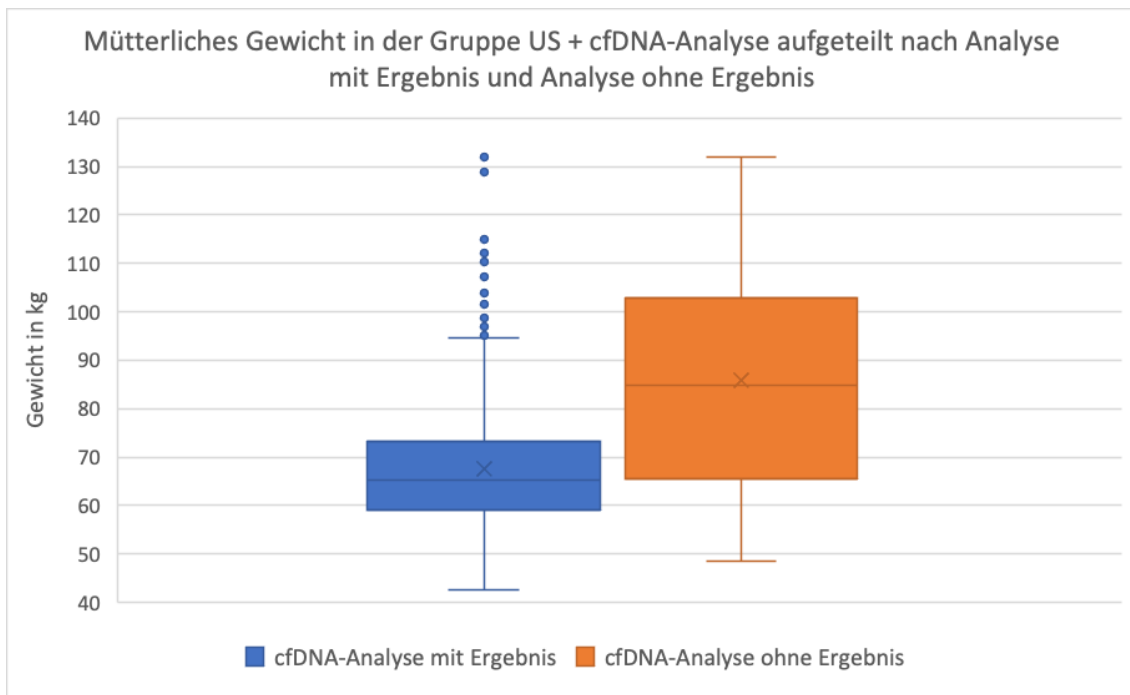


Abbildung 16: Mütterliches Gewicht in kg zum Zeitpunkt des Ultraschalls und primären cfDNA-Analyse aufgeteilt in die Subpopulationen mit und ohne Ergebnisse in der cfDNA-Analyse. US, Ultraschall; cfDNA, zellfreie DNA-Analyse.

### 3.4 Zusätzliches Screening, Screening-positive Fälle und invasive Diagnostik

Insgesamt ließen 38 (5,2 %) Patientinnen aus Studienarm 1, die dem Normalkollektiv ohne erhöhtes Risiko für eine T21-Schwangerschaft, eine zusätzliche cfDNA-Analyse durchführen. 23 (60,5 %) Patientinnen hatten zuvor ein ermitteltes individuelles Risiko von  $< 1:100$  und  $> 1:999$ , 12 (31,6 %) Patientinnen von  $< 1:1000$  und  $> 1:4999$  und 3 (7,9 %) Patientinnen von  $< 1:5000$  und  $> 1:10.000$ . Im Studienarm Ultraschall mit cfDNA-Analyse wurden keine zusätzlichen Screeningtest durchgeführt (Kagan et al. 2018).

Aus dem Hochrisikokollektiv, bestehend aus 17 Patientinnen des kombinierten ETS, entschieden sich 9 (52,9 %) Patientinnen für eine zusätzliche cfDNA-Analyse und 6 (35,3 %) für eine invasive Diagnostik. 2 (11,8 %) Patientinnen entschieden sich gegen weitere Testungen. Aus dem Normalkollektiv der kombinierten ETS-Gruppe entschieden sich 6 (0,9 %) Patientinnen für weitere invasive Diagnostik, davon 3 mit einem individuellen Risiko von  $< 1:100$  und  $>$

1:999, 2 von < 1:1000 und > 1:4999 und 1 Patientin von < 1:5000 und > 1:10.000. Somit wurden in dem Studienarm kombiniertes ETS insgesamt 12 (1,7 %) invasive Diagnostiken durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurden in dem Studienarm Ultraschall und cfDNA-Analyse nur bei 2 (0,3 %) Patientinnen aus dem Normalkollektiv eine invasive Diagnostik durchgeführt, in diesem Studienarm waren keine Schwangerschaften der Hochrisikogruppe zugeordnet (Kagan et al. 2018). Es wurden statistisch signifikant mehr invasive Diagnostiken im Studienarm kombiniertes ETS durchgeführt als im Studienarm Ultraschall mit cfDNA-Analyse ( $p = 0,007$ ).

### 3.5 Erkannte Fehlbildungen mittels Ultraschalls vor und nach Risikoberechnung

Wie in 3 Ergebnisse berichtet wurde, wurden 31 Patientinnen wegen einer erhöhten NT und/oder Fehlbildungen aus dem Studienkollektiv ausgeschlossen (Tabelle 7), davon 9 wegen einer erhöhten NT, 10 wegen einer erhöhten NT und Fehlbildungen und 12 wegen Fehlbildungen. Von den insgesamt 7 Fällen mit T21 wurden 3 Feten wegen einer erhöhten NT, 2 Feten wegen einer erhöhter NT und kardialen Fehlbildungen und 2 Feten wegen Fehlbildungen, einem Herzvitium und einer Ductus venosus-Agenesie, auffällig. 4 von 9 (44,4 %) Feten, die mit einer erhöhten NT auffielen, wurden abschließend als euploid und gesund diagnostiziert.

Neben allen Fällen mit T21 in der Gesamtpopulation wurden auch alle weiteren Fälle von Chromosomaberrationen bereits nach dem feindiagnostischen Ultraschall als „Hochrisiko“ klassifiziert und von der Randomisierung ausgeschlossen. Hierunter fanden sich ein Fall mit T18, zwei Fälle mit T13, ein Fall von Triploidie, ein Fall von Monosomie X und eine strukturelle Chromosomenaberration in Form von einem Chromosom 4p- Syndrom. Alle Feten mit numerischen Chromosomenaberrationen, anders als die T21, fielen durch Herzvitien auf, der Fall von T18 zusätzlich mit einem spinalen Defekt, die

Fälle mit T13 zusätzlich mit Polydaktylien und erhöhter NT oder LKGS und der Fall mit Triploidie mit erhöhter NT und diversen Fehlbildungen.

Die am häufigsten diagnostizierten Fehlbildungen waren Herzvitien bei 10 (32,3 %) Feten. Weiter wurden 5 (16,1 %) Extremitätenfehlbildungen inklusiv eines Falls von Phokomelie, 3 (9,7 %) Fehlbildungen des Urogenitaltrakts, 3 (9,7 %) ZNS-Defekte, 3 (6,5 %) LKGS, 2 (6,5 %) Diaphragmahernien und je ein (3,2 %) Fall von Hydrothorax, langem Philtrum, Body-stalk-Anomalie, Hydrops fetalis, Ductus venosus-Agenesie, Retrognathie, Thoraxzyste und Mesenterialzyste diagnostiziert.

Im Anschluss an das ETS wurden im Verlauf bei 3 Patientinnen aus dem Normalkollektiv im Rahmen des 2. Trimester-Screenings auf Fehlbildungen solche entdeckt. Hierbei handelte es sich um einen Fall von Bardet-Biedl-Syndrom, welches durch eine polyzystische Hufeisenniere und Polydaktylie an Händen und Füßen beidseits auffiel und zwei Fällen von Herzvitien, einer Transposition der großen Arterien und einer Fallot-Tetralogie.

Tabelle 7: Sonographische Befunde für den Studienausschluss von 31 Patientinnen aufgrund von erhöhter NT und/oder Fehlbildungen (Adaptiert von Kagan et al. 2018).  
 NT, Nackentransparenz; SSL, Scheitel-Steiß-Länge; T, Trisomie, C, Chromosom; LKGS, Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte.

	<b>Karyotyp</b>	<b>SSL</b>	<b>NT</b>	<b>Fehlbildung</b>
<b>Erhöhte NT</b>	T21	55,6	4,5	-
	T21	66,5	9,3	-
	T21	61,8	3,7	-
	euploid, C4p-	82,0	3,6	Chromosom 4p- Syndrom
	euploid	62,6	3,6	-
	euploid	53,1	4,3	-
	euploid	71,6	3,6	-
	euploid	65,4	3,6	-
	euploid	58,0	6,6	Noonan-Syndrom
<b>Erhöhte NT und Fehlbildung</b>	T21	53,8	3,9	Herzvitium
	T21	72,5	3,7	Herzvitium
	T13	55,5	6,0	Herzvitium, Polydaktylie
	Triploidie	52,3	4,9	Herzvitium, abnormale Fossa posterior, bilateraler Hydrothorax, echogene Nieren, abnormale Hände
	euploid	68,7	4,2	Cornelia de Lange Syndrom mit langem Philtrum, Extremitätenfehlbildung, LKGS
	euploid	48,3	6,9	Diaphragmahernie, LKGS
	euploid	66,0	4,0	Herzvitium
	euploid	53,2	5,2	Body-stalk Anomalie
	euploid	84,0	4,8	Occipitale Enzephalozele
euploid	57,2	6,5	Hydrops fetalis unklarer Genese	
<b>Fehlbildung</b>	T21	70,2	3,2	Ductus venosus-Agenesie
	T21	73,3	1,9	Herzvitium
	T18	60,0	1,4	Herzvitium, spinaler Defekt
	T13	79,5	3,5	Herzvitium, Polydaktylie, LKGS
	Monosomie X	46,0	3,5	Herzvitium
	euploid	72,2	3,1	Diaphragmahernie, Retrognathie
	euploid	83,7	2,3	Obstruktive Uropathie
	euploid	67,5	1,5	Robertssyndrom, Phokomelie
	euploid	63,2	2,8	Thoraxzyste
	euploid	65,2	2,8	Herzvitium
	euploid	61,1	1,8	Mesenterialzyste
	euploid	65,8	3,2	Obstruktive Uropathie

## 4 Diskussion

Mit dieser Studie konnten wir zeigen, dass im ETS auf T21 ein Screening basierend auf einer detaillierten feindiagnostischen Ultraschalluntersuchung in der 12. – 14. SSW mit anschließender cfDNA-Analyse oder kombinierten ETS im Falle von ergebnislosen cfDNA-Analysen, die FPR signifikant gegenüber dem aktuellen Goldstandard, dem kombinierten ETS, verringert ist (Kagan et al. 2018). Die Studiengruppen unterschieden sich statistisch gesehen nicht in Bezug auf die maternalen Charakteristika mütterliches Alter, Gestationsalter, mütterlichem Gewicht, kaukasischer Herkunft, Raucherstatus und assistierter Reproduktion. Auch war kein statistischer Unterschied in den Risikoparametern SSL, NT-Messung und  $\Delta$ NT signifikant. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde beim Vergleich der MoM-Werte von  $\beta$ -hCG im mütterlichen Serum zwischen den 10 Patientinnen, die aufgrund einer ergebnislosen cfDNA-Analyse eine Risikoberechnung mittels kombinierten ETS erhielten, und der Studiengruppe kombiniertes ETS ermittelt, nicht jedoch bei den MoM-Werten für PAPP-A.

In der Gruppe Ultraschall mit cfDNA-Analyse wurden keine Patientinnen als Screening-positiv klassifiziert, in der Gruppe des kombinierten ETS waren es 2,5 % der Patientinnen. Da keiner dieser Fälle anschließend tatsächlich mit einer T21 diagnostiziert wurde, entspricht dieser Anteil auch der FPR des jeweiligen Studienarms. Bei den hier ermittelten FPR ist jedoch die mütterliche Alterstruktur der Studienpopulation und der Einfluss der FPR aus der Teilpopulation der fehlgeschlagenen cfDNA-Analysen, zu beachten. Unsere Studienkohorte wies eine erhöhte Alterstruktur im Vergleich zur mütterlichen Altersstruktur in Deutschland in 2015 auf. Nach Altersstandardisierung auf diese übergeordnete Kohorte läge die FPR bei 2,2 % in der Gruppe des kombinierten ETS. Diese ermittelte FPR des kombinierten ETS ist auch auf die Teilpopulation der Gruppe Ultraschall mit cfDNA-Analyse ohne cfDNA-Analyseergebnis anzuwenden. Da in unserer Kohorte nur 10 cfDNA-Analysen ergebnislos blieben, ist es nicht verwunderlich, dass keine falsch-positiven Fälle



in dieser Gruppe zu finden sind (FPR 2,5 % \* 10 Fälle absolut = 0,25 erwartete falsch-positive Fälle). Mit zunehmender Fallzahl ist zu erwarten, dass sich in dieser Teilpopulation die FPR für das kombinierte ETS zeigt.

Ziel war der Vergleich der FPR der Screeningmethoden, nicht der Vergleich der DR. Nichtsdestotrotz wurden alle T21 Fälle in unserer Studie erkannt (Kagan et al. 2018). Norton et al. berichten in der NEXT-Studie, einer Evaluation von über 15.000 Schwangeren, von einer DR von 79 % bei einer FPR von 5,4 % für das kombinierte ETS bei einer Risikoschwelle von 1:270 (Norton et al. 2015). Im Vergleich dazu stehen die Ergebnisse von Wright et. al., die bei einer Risikoschwelle von 1:270 eine DR von etwa 90 % und einer FPR von etwa 4,5 % (Tabelle 3) ermittelten. Die geringere DR der NEXT-Studie wurde von den Autoren damit begründet, dass die DR in einer Standardscreening-Situation wahrlich unter den ermittelten Werten von strengen experimentellen Gegebenheiten liegen (Norton et al. 2015). Jedoch erfolgte in der NEXT-Studie keine automatische Klassifizierung in das Hochrisikokollektiv bei einer erhöhten NT und es wurde keine detaillierte Ultraschalluntersuchung auf Fehlbildungen, mit anschließender Hochrisikoklassifikation aller auffälligen Untersuchungen, durchgeführt. In unserer Studie wurden alle T21-Fälle durch die detaillierte Ultraschalluntersuchung erkannt, eine Risikobewertung mittels kombiniertem ETS oder cfDNA-Analyse musste nicht durchgeführt werden. Falls auch wir die fetale Sonoanatomie außer Acht gelassen hätten, wären primär 2 Fälle mit T21, sowie 3 Fälle mit anderen Chromosomaberrationen und 7 Fälle mit euploiden Feten, die jedoch Fehlbildungen aufwiesen (Tabelle 7), nicht als Hochrisikoschwangerschaften identifiziert worden.

Eine mögliche weitere Verzerrung der ermittelten DR ist der Umgang mit Fehlgeburten. In unserer Studie wurden Fehlgeburten nach einem unauffälligen Screening nicht karyotypisiert. Hierdurch kann die DR überschätzt werden, da in diesem Kollektiv mit einer höheren Anzahl falsch-negativer Fälle zu rechnen ist. Snijders et al. berichteten von einer Spontanabortrate von T21-Feten von 30 % zwischen der 12. und 40. SSW und 21 % zwischen der 16. und 40. SSW

(Snijders et al. 1999). Lathi et al. zeigten, dass chromosomale Störungen der häufigste Grund für Spontanaborte sind und eine Chromosomenanalyse in über 50 % eine Erklärung für die Fehlgeburt liefert (Lathi et al. 2011). Es ist also davon auszugehen, dass auch chromosomale Störungen Ursache für Fehlgeburten in unserem Kollektiv waren. Jedoch ist die klinische Relevanz der mangelnden Sensitivität in diesen Fällen außer für das Wiederholungsrisiko fraglich, wenn die Prognose infaust ist.

Es wird darüber debattiert, an welcher Stelle die cfDNA-Analyse in das ETS integriert werden soll. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, entweder die cfDNA-Analyse als erste Screeningmethode oder im Anschluss als eine zweite Screeningetappe nach einer Vorselektion eines Subkollektivs unter Miteinbeziehung einer detaillierten Ultraschalluntersuchung (Salomon et al. 2017; Oepkes et al. 2016). Da das alleinige Screening mittels cfDNA-Analyse zwar eine hohe Testgüte für die T21, T18 und T13 aufweist, jedoch andere Fehlbildungen und Komplikationen nicht nachweisen kann, ist ein solcher Ansatz als nicht sinnvoll zu betrachten. Daher werden Varianten der 2. Möglichkeit, die cfDNA-Analyse nach einer detaillierten Ultraschalluntersuchung, diskutiert (Kozlowski et al. 2019). Der erste Ansatz entspricht dem Weg unseres Studienarms 2, der invasiven Abklärung aller auffälligen Befunde in der detaillierten Ultraschalluntersuchung mit anschließender cfDNA-Analyse anstelle von Auswertung der Serummarker. Testversager können anschließend mittels gleichzeitig abgenommener und asservierter Serumprobe und kombiniertem ETS oder zusammen mit auffälligen Tests durch eine invasive Diagnostik abgeklärt werden.

Alternativ kommt ein 2-Stufen-Model in Betracht. Die initiale Handhabung verläuft nach aktuellen Standards, nach einer detaillierten Ultraschalluntersuchung werden auffällige Befunde mittels invasiver Diagnostik abgeklärt, für unauffällige Befunde wird mittels kombiniertem ETS ein individuelles Risikoprofil erstellt. Bei einem hohen Risiko ist wieder die invasive Diagnostik mittel der Wahl, bei einem geringen Risiko entfallen weitere Schritte.

Im intermediären Risikobereich erfolgt ähnlich dem Prinzip der weiteren Abklärung durch die Ultraschallmarker NB, TI und DV-Fluss die cfDNA-Analyse (Abele et al. 2015; Kagan et al. 2009a; Kagan et al. 2009c; Maiz et al. 2009). Die Definition des intermediären Risikobereichs entscheidet über die tatsächliche DR und FPR (Kozlowski et al. 2019).

Nicolaides et al. schätzten, dass bei Durchführung der cfDNA-Analyse überhalb einem Risiko von 1:3000 im kombinierten ETS die DR bei 97 % und die Screening-positiv-Rate bei 0,4 % lägen (Nicolaides et al. 2013). Ähnlich wurde in der RAPID-Studie allen Patientinnen mit einem Risiko  $> 1:1000$  für die T21 im kombinierten ETS oder Quadruple-Test die Durchführung einer cfDNA-Analyse angeboten, falls das Risiko bei  $\geq 1:150$  lag auch eine invasive Diagnostik. Die Ergebnisse stimmten mit dem mathematischen Modell überein (Chitty et al. 2016). Miltoft et al. berichteten von 6449 Patientinnen die nach Risikoermittlung durch das kombinierte ETS anschließend bei einem Risiko  $\geq 1:1000$  eine cfDNA-Analyse erhielten. Die Autoren verglichen anschließend ihre konventionelle Vorgehensweise, einer anschließenden invasiven Diagnostik an das kombinierte ETS bei einem ermittelten Risiko  $\geq 1:300$ , mit einem „contingent screening“, bei welchem unter einem Risiko von 1:1000 keine weiteren Untersuchungen, einem Risiko zwischen 1:100 und 1:1000 eine cfDNA-Analyse und bei einem Risiko  $\geq 1:100$  oder einer auffälligen cfDNA-Analyse eine invasive Diagnostik durchgeführt wurde. In beiden Fällen waren die DR bei 100 %, jedoch konnte die FPR signifikant von 3 % der konventionellen Methode auf 1,2 % durch das „contingent screening“ reduziert werden (Miltoft et al. 2018). Ähnlich wurde bei Gil et al. ein intermediäres Risiko zwischen den Werten 1:101 bis 1:2500 nach dem kombinierten ETS definiert, in dem eine cfDNA-Analyse angeboten wurde, bei einem Risiko  $\geq 1:100$  auch eine invasive Diagnostik. Bei einem Studienkollektiv von 11.692 Patientinnen, davon 47 Fälle mit T21, wurde eine DR von 91,5 % ermittelt. Es entschieden sich jedoch nur 38 % der Frauen aus der Hochrisikogruppe für eine invasive Diagnostik, 91,5 % der Frauen mit intermediärem Risiko ließen eine cfDNA-Analyse durchführen. Insgesamt betrug die Rate der invasiven Diagnostik 2,7

% (Gil et al. 2016). Prodan et al. verglichen die Daten des kombinierten ETS und der cfDNA-Analyse retrospektiv bei knapp 2500 Schwangerschaften, davon 163 mit T21 und setzten die Schwellenwerte für das Hochrisikokollektiv auf  $\geq 1:10$  und für das intermediäre Risiko zwischen  $< 1:10$  und  $\geq 1:1000$ . Screening-positiv waren alle Fälle mit einem Risiko  $\geq 1:10$ , auffälliger oder ergebnisloser cfDNA-Analyse. Verglichen wurde dies mit einer primären cfDNA-Analyse, auch hier wurden Patientinnen bei auffälligen oder ergebnislosen cfDNA-Analysen als Screening-positiv kategorisiert. Mit einer alleinigen cfDNA-Analyse läge die DR bei 100 %, die FPR bei 1,3 % wegen Testversagern. Durch ein primäres Screening mittels kombiniertem ETS müsste eine cfDNA-Analyse bei nur etwa 27 % der Patientinnen durchgeführt werden, die DR und FPR lägen bei 98,4 % und 0,7 % (Prodan et al. 2022).

Insgesamt sind für die Entscheidung eine cfDNA-Analyse allen Patientinnen außer den Hochrisikoschwangerschaften oder nur denen mit einem intermediären Risiko zwei Faktoren entscheidend. Zum einen ist die allgemeine Durchführung der cfDNA-Analyse eine Kostenfrage, jedoch wird dieser Aspekt von immer geringerer Relevanz sein, da die Kosten stetig seit der Testeinführung sinken (Cuckle et al. 2022). Zum anderen stellen ergebnislose cfDNA-Analysen Fragen für das weitere Verfahren auf. In der multizentrischen NEXT-Studie wurden 15.841 Patientinnen eingeschlossen, zuvor 488 (3 %) wegen ergebnislosen cfDNA-Analysen ausgeschlossen. In der Gruppe ohne cfDNA-Analyseergebnis befanden sich 13 Aneuploidien, in der Gruppe der eingeschlossenen Patientinnen 38. Somit lag die Prävalenz von Aneuploidien mit 2,7 % in der Gruppe der ergebnislosen cfDNA-Analysen über jener der Gesamtkohorte (0,4 %). Dieser Effekt ist nochmals bei ergebnislosen cfDNA-Analysen aufgrund von einer FF  $< 4$  % verstärkt; hier lag die Prävalenz für Aneuploidien bei 4,7 % (Norton et al. 2015). Da einige Chromosomenstörungen, insbesondere die T18, T13 und Triploidie, einen negativen Einfluss auf die FF haben und somit in einem höheren Maße in der Gruppe der Testversager zu finden sind, ist ein Ansatz alle ergebnislosen cfDNA-Analysen als Screening-positiv zu kategorisieren (Hui und Bianchi 2020;

DEGUM 2020b). Dies führt jedoch zu einer Zunahme der FPR. Wären die Fälle ohne Ergebnis in der NEXT-Studie jedoch als Screening-negativ klassifiziert worden, hätte die cfDNA-Analyse nur 38 von 51 (74,5 %) T21-Fällen detektiert. Bardi et al. unterstreichen hier noch einmal die Wichtigkeit einer ausführlichen Ultraschalluntersuchung mit Beurteilung der fetalen Sonoanatomie. Von 311 Frauen mit 2 ergebnislosen cfDNA-Analysen im Abstand von etwa 2 Wochen wurden bei 6 von 13 (46 %) Feten nach einer auffälligen Ultraschalluntersuchung eine genetische Störung diagnostiziert, im Gegensatz dazu war dies nur bei 4 von 298 (1,3%) Feten mit normaler fetaler Sonoanatomie der Fall. Interessanterweise lag der durchschnittliche mütterliche BMI der Gruppe mit fetalen Auffälligkeiten unter dem der Gruppe ohne fetale Auffälligkeiten (25,5 kg/m<sup>2</sup> im Gegensatz zu 28,8 kg/m<sup>2</sup>). Die Autoren erklären dies durch zwei verschiedene Gründe für die geringe FF, bei erhöhtem BMI durch den mehrfach vorbeschriebenen Verdünnungseffekt der fetalen Anteile der cfDNA und bei fetalen Anomalien durch eine abnormale Plazenta (Bardi et al. 2022; Revello et al. 2016; Wang et al. 2013; Scott et al. 2018). Auch in unserer Studienpopulation lag das mütterliche Gewicht in der Gruppe nicht auswertbarer cfDNS-Analysen über dem der Gruppe mit Ergebnissen.

Im Gegensatz zu dem oben Aufgeführten ist ein Argument für eine allgemeine Durchführung der cfDNA-Analyse bei allen Schwangeren, das Beibehalten der hohen DR. Auch wenn hohe DR bei Restriktion der cfDNA-Analyse auf Patientinnen mit einem intermediären Risiko erreicht werden, so liegen dennoch 1,5 % bis 5 % der T21-Schwangerschaften, abhängig vom verwendeten Schwellenwert, im Niedrigrisikokollektiv (Santorum et al. 2017; Nicolaides et al. 2013; Nicolaides et al. 2005; Kagan et al. 2009b; Kagan et al. 2015a). Um eine DR von 99 % zu erreichen, darf die cfDNA-Analyse folglich nicht auf eine Subpopulation beschränkt werden und jeder Testversager bedarf einer invasiven Abklärung (Grati und Kagan 2017).

#### 4.1 Studienausschluss aufgrund auffälligen US

Unsere Ergebnisse zeigen den ausgesprochen hohen Wert einer detaillierten Ultraschalluntersuchung im ETS. Alle 12 (0,79 %) Fälle von Aneuploidien und 2 (0,13 %) Fälle mit anderen genetischen Defekten wurden bereits durch diese vor Ermittlung eines individuellen Risikos mit einem Screeningverfahren wegen einer erhöhten NT und/oder Fehlbildungen detektiert.

Des Weiteren wurden 13 (0,86 %) Fälle mit fetalen Fehlbildungen ohne Aneuploidie detektiert. Dies liegt oberhalb der von Syngelaki et al. berichteten DR von 0,47% im Rahmen einer detaillierten Ultraschalluntersuchung bei über 100.000 Frauen zwischen der 12. und 14. SSW nach Ausschluss aller Aneuploidien. Weiter unterteilten die Autoren fetale Fehlbildungen in immer detektierbar, nicht detektierbar und potenziell detektierbar ein (Syngelaki et al. 2019). In unserem Studienkollektiv wurden alle Fälle der immer detektierbaren Fehlbildungen erkannt sowie 9 von 12 Fällen der potenziell detektierbaren Fälle. 2 Fälle von kardialen Defekten sowie 1 Fall eines Bardet-Biedl-Syndroms mit Polydaktylie und renaler Fehlbildung wurden im 2. Trimesterscreening erkannt, postnatal wurde von keinen weiteren Fehlbildungen berichtet.

Auch wenn formal gesehen die FPR im Screening auf T21 in diesem Kollektiv bei 24 von 31 Fällen, also bei 77,4 % lag, wurden bei 27 (87,1 %) Feten genetische Störungen und/oder Fehlbildungen detektiert. Lediglich 4 (12,9 %) Feten, die initial nur mit einer erhöhten NT auffielen, wiesen anschließend einen normalen Karyotyp und keine genetische Störung oder Fehlbildung auf. Schlussendlich hat dies eine größere Aussagekraft über den Gesundheitszustand des Fötus und nicht der alleinige Ausschluss einer T21.

Die hohe DR von Fehlbildungen in unserer Studie ist durch die hohe Expertise der Untersucher zu erklären; es sollte nicht davon ausgegangen werden, dass derselbe Standard ubiquitär vorhanden ist und somit dieselbe DR erreicht werden kann.

## 4.2 Weitere Aspekte des kombinierten ETS

Unabhängig von den gängigen Trisomien ist eine erhöhte NT auch ein Marker für andere chromosomale Aberrationen, genetische Defekte und Fehlbildungen (Souka et al. 2005). Wegen der Breite der möglichen Ursachen empfiehlt die DEGUM bei Auffälligkeiten in der detaillierten Ultraschalluntersuchung eine invasive Diagnostik mit anschließender Karyotypisierung und Microarray, insbesondere da der Anteil an genetischen Störungen, die nicht den gängigen Trisomien oder nicht durch ein Karyogramm diagnostizierbar sind, mit der NT zunimmt (Kozlowski et al. 2019; Bardi et al. 2020; Hui und Bianchi 2020; Hui et al. 2021). Maya et al. empfehlen die Chromosomenanalyse mittels Microarray bereits ab einer NT von 3,0 mm. In ihrer Analyse von 770 Feten ohne Fehlbildungen, fanden sich bei 8 (1,7 %) von insgesamt 462 Feten mit einer NT  $\leq 2,9$  mm, bei 11 (6,5 %) von 170 mit einer NT zwischen 3,0 und 3,4 mm und bei 19 (13,8 %) von 138 mit einer NT  $\geq 3,5$  mm pathologische copy number variations. Gruppenübergreifend waren 10 von 38 Fällen nur mittels einer Microarray-Analyse detektierbar (Maya et al. 2017). Hui et al. ermittelten eine Rate von 2,1 % bei NT-Messungen zwischen 3,0 und 3,4 mm und von 21,5 % bei NT-Messungen  $\geq 3,5$  mm von atypischen, nur mittels Microarray-Analyse detektierbaren, Chromosomenstörungen, wenn fetale Fehlbildungen mit berücksichtigt wurden (Hui et al. 2021).

Ähnlich der Empfehlungen bei erhöhter NT gilt auch die Empfehlung zur invasiven Diagnostik mit Karyotypisierung und Microarray bei Unterschreiten der Serummarker  $\beta$ -hCG und PAPP-A von einem Wert von 0,2 MoM, beziehungsweise im Fall von  $\beta$ -hCG zusätzlich einem Überschreiten von 5,0 MoM, da auch in diesen Fällen das Risiko für andere Chromosomenstörungen als den gängigen Trisomien erhöht ist (Kozlowski et al. 2019; Tørring et al. 2015; Petersen et al. 2014). Beispielsweise zeigten Petersen et al., dass wenn PAPP-A 0,2 MoM unterschreitet, in 21,4 % Chromosomenstörungen, davon 23,5 % atypische Befunde, zu finden sind. Bei Unterschreiten von 0,2 MoM von  $\beta$ -hCG waren es 56,6 %, davon 37,2 % atypisch. Insgesamt wurden 200.000

Schwangerschaften untersucht, davon 1122 Fälle mit Chromosomenstörungen und 262 Fälle, die nicht durch eine alleinige cfDNA-Analyse detektiert werden konnten (Petersen et al. 2014).

Um diese seltenen genetischen Erkrankungen weiterhin detektieren zu können, sollten weder die Ultraschalluntersuchung noch die Serummarker aus dem ETS wegrationalisiert werden. Obwohl die Serumbiochemie bei der Erfassung dieser Auffälligkeiten nützlich sein kann, zeigen unsere Daten, dass seltene Chromosomenstörungen, genetische Erkrankungen und Fehlbildungen durch eine detaillierte Ultraschalluntersuchung bei geringer FPR und exzellenter DR im Großteil der Bevölkerung zu finden sind.

Unabhängig vom ETS auf Aneuploidien wird zum selben Zeitpunkt das Screening auf Präeklampsie durchgeführt, eine Erkrankung mit deutlich höherer Prävalenz etwa um den Faktor 10, im Vergleich zu fetalen genetischen Anomalien und etwa 100.000 maternalen Todesfällen pro Jahr (Wagner et al. 2018; Kozłowski et al. 2019). Daher kann argumentiert werden, dass die mütterlichen Serummarker nicht aus dem Screeningprotokoll weggelassen werden können. Jedoch zeigten O’Gorman et al., dass bei einer 10 % FPR das ETS für frühe und späte Präeklampsie (< 37. und > 37. SSW) ohne Serummarker PAPP-A oder PIGF, nur gering niedrigere DR liefern, als wenn diese Marker mit einbezogen werden (O’Gorman et al. 2016). Um dieselbe DR zu erreichen, könnte der Schwellenwert zur Definition des Hochrisikokollektivs gesenkt werden (Kagan et al. 2018).

#### 4.3 Weitere Aspekte der cfDNA-Analyse

Zwischenzeitlich wurde es möglich, das Screening mittels cfDNA-Analyse auf gonosomale Störungen, Mikrodeletionen und -duplikationen, monogene Erkrankungen und strukturelle Chromosomenstörungen zu erweitern. Auch ein „genome wide“ Screening kann durchgeführt werden (van der Meij et al. 2019). Hierbei wird die cfDNA-Analyse gezielt auf jede Erkrankung mit spezifischer DR



und FPR erweitert, sodass auch ausreichend große, prospektive Studien zur Validierung notwendig sind. Da diese momentan nicht vorhanden sind, lehnt die DEGUM eine Empfehlung zur Testausweitung über die gängigen Trisomien hinaus, ab (Kozlowski et al. 2019).

Des Weiteren haben seltene genetische Erkrankungen bei gleicher DR und FPR aufgrund ihrer Prävalenz einen niedrigen PPW, seltene Trisomien haben beispielsweise eine Prävalenz von etwa 0,3 % bis 0,8 % (Benn 2016). Bei einer DR von 99 %, FPR von 0,1 % und Prävalenz von 1:500, wie bei der T21, liegt der PPW bei 66,4 %. Verringert sich die Prävalenz um den Faktor 10, liegt der PPW nur noch bei 16,5 %. Gleichzeitig werden die FPR der einzelnen Teilttest miteinander zu einer gesamten FPR addiert. Insgesamt nimmt somit die hervorragende Testgüte der cfDNA-Analyse auf die T21 mit zusätzlichen Testerweiterungen ab.

#### 4.4 Fazit für Beratung und Ausblick für weitere Untersuchungen

Ein Vorteil der cfDNA-Analyse sind die ausgezeichnete DR und der PPW bei dem Screening auf die häufigen Trisomien, insbesondere der T21 (Gil et al. 2017; Norton et al. 2015). Nachteilig ist jedoch ein geringer PPW bei seltenen genetischen Störungen, dass alleinig die Berechnung des Risikos für die Trisomien 21, 18, 13 und gonosomalen Aberrationen als sinnvoll anzusehen ist. Jedoch kommt es bei etwa 2 % aller cfDNA-Analysen zu Testversagern und wegen des vergangenen Zeitintervalls kann die Probenentnahme für die biochemischen Parameter häufig nicht zwischen der 12. bis 14. SSW wiederholt werden (Grati und Kagan 2017). Insbesondere ist hier an das mütterliche Gewicht und dem Vorliegen von Chromosomenstörungen zu denken (Ashoor et al. 2013; Galeva et al. 2019). Zusätzlich können strukturelle Fehlbildungen, die in über 90 % nicht chromosomal bedingt sind, nicht erfasst werden (Kozlowski et al. 2019; Queißer-Luft und Spranger 2006). Daher sollte die cfDNA-Analyse erst nach einer unauffälligen detaillierten Ultraschalluntersuchung mit NT-Messung angeboten werden, da hier lediglich ein relevantes Risiko für eine T21

aufgrund der Prävalenz verbleibt. Bei einer auffälligen Untersuchung oder einer  $NT \geq 3,5$  mm sollte direkt zu einer invasiven Diagnostik mit Karyotypisierung geraten werden (Kozlowski et al. 2019).

Zwischenzeitlich wurde die cfDNA-Analyse erst 2016 „um der Schwangeren eine Auseinandersetzung mit ihrer individuellen Situation“ „mit dem Ziel der Vermeidung der (...) invasiven Maßnahmen“ und 2020 allgemein als Kassenleistung zugänglich (Gemeinsamer Bundesausschuss 2016, 2021). Um genau die oben beschriebenen Mängel des NIPT in der Versorgung Schwangerer zu korrigieren, veröffentlichte unterdessen die DEGUM die „10 goldenen Regeln zur Durchführung eines NIPT-Tests:

- 1) NIPT erfordert eine ärztliche Aufklärung und genetische Beratung nach Gendiagnostikgesetz (GenDG).
- 2) NIPT erlaubt derzeit zuverlässige Aussagen zur Wahrscheinlichkeit einer Trisomie 21, 18, 13, aber keine Aussagen zu strukturellen Fehlbildungen. Diese machen jedoch den Großteil der perinatal relevanten Anomalien aus. Auch lassen sich die meisten anderen Chromosomenstörungen und syndromale Erkrankungen nicht erkennen.
- 3) NIPT erfordert eine qualifizierte Ultraschall-Untersuchung, idealerweise vor der Blutabnahme und nach der 12. SSW.
- 4) Bei sonographisch nachgewiesenen Fehlbildungen oder erhöhter Nackentransparenz ist die diagnostische Punktion (CVS oder Amniozentese) Mittel der Wahl, um Chromosomenstörungen erkennen zu können und um einen unnötigen Zeitverlust bis zur endgültigen Diagnose zu vermeiden.
- 5) Im Rahmen einer NIPT-Untersuchung sollten grundsätzlich der fetale bzw. schwangerschaftsspezifische Anteil an der zellfreien DNA angegeben werden. Die „Fetal fraction“ ist ein Qualitätsparameter mit großem Einfluss auf die Testgüte.
- 6) Ein ergebnisloser NIPT ist ein abklärungsbedürftiger Befund. In diesem Kollektiv finden sich mehr Chromosomenstörungen, insbesondere Trisomien 13 und 18 sowie Triploidien.

- 7) NIPT ist ein Screening-Test. Bei einem auffälligen NIPT ist eine diagnostische Punktion obligat anzubieten. Die Indikationsstellung zum Schwangerschaftsabbruch darf nicht auf einem isolierten NIPT-Befund beruhen.
- 8) NIPT auf Veränderungen der Geschlechtschromosomen sollte nicht routinemäßig durchgeführt werden.
- 9) Der Einsatz von NIPT zur Bestimmung des Risikos für seltene autosomale Aneuploidien, strukturelle Chromosomenstörungen, insbesondere Mikrodeletionen und monogenetische Erkrankungen beim Feten kann derzeit nicht generell empfohlen werden.“
- 10) Bei Zwillingschwangerschaften, nach künstlicher Befruchtung und bei Adipositas hat NIPT eine höhere Versagerquote und es liegen nur eingeschränkte Daten zur Testgüte vor.“ (DEGUM 2020b)

Durch die Kostenübernahme durch die Krankenkassen ist von einem weiteren Anstieg der cfDNA-Analysen auszugehen, unter anderem wegen der vermeintlich deutlich höheren Sicherheit in der Risikobewertung (unveröffentlichte Daten aus den studienbegleitenden Fragebögen). Dies wird auch durch eine höhere Rate von zusätzlich durchgeführten cfDNA-Analysen (38 Patientinnen oder 5,2 %) aus dem Normalkollektiv in unserem kombinierten ETS-Studienarm demonstriert; es wurden keine zusätzlichen Screeningtests in der Gruppe Ultraschall mit cfDNA-Analyse durchgeführt. Auch die Rate an invasiver Diagnostik im Normalkollektiv war in der Gruppe des kombinierten ETS höher mit 6 Fällen gegenüber von 2 in der Gruppe Ultraschall mit cfDNA-Analyse. Jedoch wünscht sich die große Mehrheit der Schwangeren eine Beurteilung des gesamten gesundheitlichen Zustandes ihres ungeborenen Kindes und nicht eine isolierte Aussage zum Risiko einer T21 (Wagner et al. 2018). Sowohl das Ursachenspektrum für gesundheitliche Einschränkungen als auch der Wunsch der Mehrheit der Schwangeren, all diese zu erfassen, rechtfertigt nicht die alleinige Betrachtung der gängigen Trisomien im ETS. Daher ist nur ein ETS basierend auf einer detaillierten Ultraschalluntersuchung als sinnvoll anzusehen. Ob das weitere Screening alleinig durch eine cfDNA-

Analyse oder nur für das Intermediärrisikokollektiv nach vorgeschaltetem kombinierten ETS erfolgt, hängt von strukturellen, wirtschaftlichen und mütterlichen Faktoren ab. Insgesamt ist die DR für die T21 in beiden Ansätzen ähnlich.

## 5 Limitationen

Diese Studie wurde lediglich an einem einzelnen Zentrum, spezialisiert auf die Pränataldiagnostik, durchgeführt. Alle Untersucher sind mindestens nach DEGUM Stufe II zertifiziert und somit für die gezielte Abklärung von Verdachtsbefunden und der Betreuung von Risikopatientinnen geschult (DEGUM 2020a). Somit ist von einer hohen Identifikationsrate von fetalen Fehlbildungen und/oder Auffälligkeiten zu rechnen. Es ist davon auszugehen, dass diese Expertise nicht ubiquitär verbreitet ist. Jedoch stützt sich das angewandte Sonographieprotokoll für unser ETS auf die ISUOG-Empfehlungen und sollte daher allgemein reproduzierbar sein (Kagan et al. 2018).

Unsere Studienkohorte wies eine ältere Altersstruktur im Vergleich zur gesamten Population in Deutschland auf. Um dies zu berücksichtigen, wurde eine rechnerische Anpassung der FPR an die mütterliche Altersstruktur in Deutschland 2015 vorgenommen. Um die ermittelte FPR mit internationalen Studien zu vergleichen, müsste eine Anpassung auf eine genormte Altersstruktur einer Referenzgruppe vorgenommen werden.

Durch die Größe der Studienpopulation ist davon auszugehen, dass die gesamte FPR für ein Screeningmodell, basierend auf einer detaillierten Ultraschalluntersuchung, cfDNA-Analyse und anschließendem kombinierten ETS bei erfolglosen cfDNA-Analysen, in dieser Studie unterschätzt wurde. Eine auf die Allgemeinbevölkerung gerechnete FPR würde sich anteilig aus der FPR für die cfDNA-Analyse und der FPR des kombinierten ETS bei ergebnislosen cfDNA-Analysen zusammensetzen.

Der vorrangige Ausschluss der 31 (2,0 %) Hochrisikopatientinnen wegen erhöhter NT und/oder Fehlbildungen führte zu einer Reduktion der FPR. Alle sieben Fälle von T21 waren in dieser Gruppe zu finden. Jedoch waren die anderen 24 Fälle, auch wenn andere fetale Störungen vorlagen, formal falsch-positiv. Wenn diese 31 Hochrisikopatientinnen in die Analyse eingeschlossen

wären, hätte sich die FPR um rein rechnerisch 1,7 % (24 falsch-positive Patientinnen auf ein Gesamtkollektiv von 1407 Patientinnen) erhöht (Kagan et al. 2018).

## 6 Zusammenfassung

*Zielsetzung* In dieser randomisiert-kontrollierte Studie sollte die Risikobewertung des kombinierten Ersttrimesterscreenings (ETS) mit der einer detaillierten Ultraschall (US)-Untersuchung und der zellfreien DNA (cfDNA)-Analyse verglichen werden.

*Methoden* Bei Schwangeren mit einer normalen detaillierten US-Untersuchung zwischen der 12. – 14. SSW wurde das Aneuploidierisiko entweder mittels kombinierten ETS oder zusätzlicher cfDNA-Analyse ermittelt. Bei ergebnislosen cfDNA-Analysen wurde das Risiko mittels ETS bestimmt. Das primäre Ergebnis war die Falsch-positiv-Rate (FPR) im Screening auf die Trisomie 21 (T21). Fälle mit einem T21-Risiko  $> 1:100$  ohne entsprechenden Karyotyp wurden als falsch-positiv betrachtet. Die Ergebnisse wurden mit einem 95 % CI mit der Clopper-Pearson-Methode verglichen.

*Ergebnisse* Bei 1518 Einlingsschwangerschaften wurde ein ETS durchgeführt. 31 (2,0 %) Schwangerschaften wurden wegen einem auffälligen US ausgeschlossen. 24 Frauen wünschten keine Teilnahme und bei weiteren 24 Fällen konnte das Endergebnis nicht ermittelt werden. Je 688 Schwangerschaften wurden in den kombinierte ETS-Studienarm und in den US mit cfDNA-Analyse-Studienarm randomisiert. Maternales Alter, Gewicht und BMI, Ethnizität, Verwendung von assistierter Reproduktion und Raucherstatus unterschieden sich zwischen den beiden Studienarmen nicht. In der Gruppe US mit cfDNA-Analyse war das mediane Risiko für eine T21 1:10000. In keinem Fall lag das Risiko über 1:100 (95 % CI, 0,0 – 0,5 %). Beim kombinierten ETS lag das mediane Risiko für eine T21 bei 1:3787 und in 17 Fällen war das Risiko größer als 1:100, was einer FPR von 2,5 % (95 % CI, 1,5 – 3,9 %) entspricht.

*Fazit* Unsere Studie zeigte, dass die ETS-Risikobewertung für Trisomie 21, mit einer detaillierten US-Untersuchung und anschließender cfDNA-Testung, eine signifikante Reduktion der FPR verglichen zum kombinierten ETS bewirkt. Dieser Herangehensweise vermeidet die Bestimmung der mütterlichen Serummarker  $\beta$ -hCG und PAPP-A (Kagan et al. 2018).

## Sponsoring

Die Firma Cenata GmbH (Tübingen, Germany) übernahm die Kosten für die cfDNA-Analyse (400€ pro Analyse). Die Testkits für den Harmony® Pränatal Test wurden von Roche/Ariosa Diagnostics, Inc. (San Jose, CA, USA) bereitgestellt (Kagan et al. 2018).



## Literaturverzeichnis

- Abele, Harald; Wagner, Philipp; Sonek, Jiri; Hoopmann, Markus; Brucker, Sara; Artunc-Ulkumen, Burcu; Kagan, Karl Oliver (2015): First trimester ultrasound screening for Down syndrome based on maternal age, fetal nuchal translucency and different combinations of the additional markers nasal bone, tricuspid and ductus venosus flow. In: *Prenat. Diagn.* 35 (12), S. 1182–1186. DOI: 10.1002/pd.4664.
- Alberman, E; Nicholson, A; Wald, K (1992): Severe learning disability in young children; likely future trends.
- Ashoor, G.; Syngelaki, A.; Poon, L. C. Y.; Rezende, J. C.; Nicolaides, K. H. (2013): Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 41 (1), S. 26–32. DOI: 10.1002/uog.12331.
- AWMF (Hg.) (2016): Down-Syndrom im Kindes- und Jugendalter. Konsensbasierte Leitlinie (S2k) der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ) und der beteiligten Fachgesellschaften, Berufsverbände und weiterer Organisationen. Online verfügbar unter [https://register.awmf.org/assets/guidelines/027-051I\\_S2k\\_Down-Syndrom-Kinder-Jugendliche\\_2016-09-abgelaufen.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/027-051I_S2k_Down-Syndrom-Kinder-Jugendliche_2016-09-abgelaufen.pdf), zuletzt geprüft am 31.01.2023.
- Badeau, Mylène; Lindsay, Carmen; Blais, Jonatan; Nshimyumukiza, Leon; Takwoingi, Yemisi; Langlois, Sylvie et al. (2017): Genomics-based non-invasive prenatal testing for detection of fetal chromosomal aneuploidy in pregnant women. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 11 (11), CD011767. DOI: 10.1002/14651858.CD011767.pub2.
- Ball, Robert H.; Caughey, Aaron B.; Malone, Fergal D.; Nyberg, David A.; Comstock, Christine H.; Saade, George R. et al. (2007): First- and second-trimester evaluation of risk for Down syndrome. In: *Obstetrics and gynecology* 110 (1), S. 10–17. DOI: 10.1097/01.aog.0000263470.89007.e3.
- Bardi, Francesca; Bet, Bo B.; Pajkrt, Eva; Linskens, Ingeborg H.; Bekker, Mireille N.; Sistermans, Erik A. et al. (2022): Additional value of advanced ultrasonography in pregnancies with two inconclusive cell-free DNA draws. In: *Prenat. Diagn.* 42 (11), S. 1358–1367. DOI: 10.1002/pd.6238.
- Bardi, Francesca; Bosschieter, Pien; Verheij, Joke; Go, Attie; Haak, Monique; Bekker, Mireille et al. (2020): Is there still a role for nuchal translucency measurement in the changing paradigm of first trimester screening? In: *Prenat. Diagn.* 40 (2), S. 197–205. DOI: 10.1002/pd.5590.
- Benacerraf, Beryl R.; Barss, Vanessa A.; Laboda, Lane A. (1985): A sonographic sign for the detection in the second trimester of the fetus with Down's syndrome. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 151 (8), S. 1078–1079. DOI: 10.1016/0002-9378(85)90385-0.

Benn, P. (2016): Expanding non-invasive prenatal testing beyond chromosomes 21, 18, 13, X and Y. In: *Clinical genetics* 90 (6), S. 477–485. DOI: 10.1111/cge.12818.

Bianchi, D. W.; Flint, A. F.; Pizzimenti, M. F.; Knoll, J. H.; Latt, S. A. (1990): Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (9), S. 3279–3283. DOI: 10.1073/pnas.87.9.3279.

Bianchi, D. W.; Simpson, J. L.; Jackson, L. G.; Elias, S.; Holzgreve, W.; Evans, M. I. 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. In: *Prenat. Diagn.* 22 (7), S. 609–615. DOI: 10.1002/pd.347.

Binkert, F.; Schinzel, A. (2002): Impact of prenatal diagnosis on the prevalence of live births with Down syndrome in the eastern half of Switzerland 1980-1996. In: *Swiss Med Wkly.* DOI: 10.4414/smw.2002.10009.

Bull, Marilyn J. (2020): Down Syndrome. In: *The New England journal of medicine* 382 (24), S. 2344–2352. DOI: 10.1056/NEJMra1706537.

Bundesamt für Justiz: Gendiagnostikgesetz. GenDG. Online verfügbar unter <http://www.gesetze-im-internet.de/gendg/>, zuletzt geprüft am 05.08.2022.

Chitty, Lyn S.; Wright, David; Hill, Melissa; Verhoef, Talitha I.; Daley, Rebecca; Lewis, Celine et al. (2016): Uptake, outcomes, and costs of implementing non-invasive prenatal testing for Down's syndrome into NHS maternity care: prospective cohort study in eight diverse maternity units. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 354, i3426. DOI: 10.1136/bmj.i3426.

Chiu, Rossa W. K.; Chan, K. C. Allen; Gao, Yuan; Lau, Virginia Y. M.; Zheng, Wenli; Leung, Tak Y. et al. (2008): Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. In: *PNAS* 105, S. 20458–20463. Online verfügbar unter [doi/10.1073/pnas.0810641105](https://doi.org/10.1073/pnas.0810641105).

Cicero, S.; Dezerega, V.; Andrade, E.; Scheier, M.; Nicolaides, K. H. (2003): Learning curve for sonographic examination of the fetal nasal bone at 11-14 weeks. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 22 (2), S. 135–137. DOI: 10.1002/uog.176.

Cuckle, H. S.; Wald, N. J.; Thompson, S. G. (1987): Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. In: *British journal of obstetrics and gynaecology* 94 (5), S. 387–402. DOI: 10.1111/j.1471-0528.1987.tb03115.x.

Cuckle, Howard; Benn, Peter; Pergament, Eugene (2013): Maternal cfDNA screening for Down syndrome--a cost sensitivity analysis. In: *Prenat. Diagn.* 33 (7), S. 636–642. DOI: 10.1002/pd.4157.

Cuckle, Howard; Heinonen, Seppo; Anttonen, Anna-Kaisa; Stefanovic, Vedran (2022): Cost of providing cell-free DNA screening for Down syndrome in Finland

using different strategies. In: *Journal of perinatal medicine* 50 (3), S. 233–243. DOI: 10.1515/jpm-2021-0467.

Cuckle, Howard; Maymon, Ron (2016): Development of prenatal screening--A historical overview. In: *Seminars in perinatology* 40 (1), S. 12–22. DOI: 10.1053/j.semperi.2015.11.003.

DEGUM (2020a): Mehrstufenkonzept & Zertifizierung. Online verfügbar unter <https://www.degum.de/fachgebiete/sektionen/gynaekologie-geburtshilfe.html>, zuletzt geprüft am 16.1.23.

DEGUM (2020b): 10 goldene Regeln für die Durchführung eines NIPT-Tests. Unter Mitarbeit von Board der Sektion Gynäkologie und Geburtshilfe. Hg. v. Deutsche Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin. Online verfügbar unter [https://www.degum.de/fileadmin/dokumente/sektionen/Gynaekologie\\_und\\_Geburtshilfe/Informationen\\_zum\\_Fach/NIPT-10-goldene-Regeln\\_AK\\_v2020-02-17.pdf](https://www.degum.de/fileadmin/dokumente/sektionen/Gynaekologie_und_Geburtshilfe/Informationen_zum_Fach/NIPT-10-goldene-Regeln_AK_v2020-02-17.pdf), zuletzt geprüft am 03.11.2022.

Demko, Zachary; Prigmore, Brittany; Benn, Peter (2022): A Critical Evaluation of Validation and Clinical Experience Studies in Non-Invasive Prenatal Testing for Trisomies 21, 18, and 13 and Monosomy X. In: *Journal of clinical medicine* 11 (16). DOI: 10.3390/jcm11164760.

Deutscher Ärztetag (2011): (Muster-)Berufsordnung für die in Deutschland tätigen Ärztinnen und Ärzte - MBO-Ä 1997 - \*) in der Fassung der Beschlüsse des 114. Deutschen Ärztetages 2011 in Kiel. Hg. v. Deutscher Ärztetag. Online verfügbar unter [https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/\\_old-files/downloads/MBO\\_08\\_20112.pdf](https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/_old-files/downloads/MBO_08_20112.pdf), zuletzt geprüft am 16.01.2023.

Dhallan, Ravinder; Guo, Xin; Emche, Sarah; Damewood, Marian; Bayliss, Philip; Cronin, Michael et al. (2007): A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. In: *The Lancet* 369 (9560), S. 474–481. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60115-9.

Eiben, Bernd; Glaubitz, Ralf; Kagan, Karl Oliver (2014): Nichtinvasive Pränataldiagnostik. In: *Medizinische Genetik* 26 (4), S. 382–390. DOI: 10.1007/s11825-014-0021-3.

Ekelund, Charlotte K.; Jørgensen, Finn Stener; Petersen, Olav Bjørn; Sundberg, Karin; Tabor, Ann (2008): Impact of a new national screening policy for Down's syndrome in Denmark: population based cohort study. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 337, a2547. DOI: 10.1136/bmj.a2547.

EUROCAT (Hg.) (2020): EUROCAT Data Prevalence Charts and Tables. European Commission. Online verfügbar unter [https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence\\_en](https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence_en), zuletzt aktualisiert am 20.12.2020, zuletzt geprüft am 31.1.23.

European Union (2021): European Platform on Rare Diseases Registration. Hg. v. European Union. Online verfügbar unter <https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence/export/>, zuletzt geprüft am 04.08.2022.

Fan, H. Christina; Blumenfeld, Yair J.; Chitkara, Usha; Hudgins, Louanne; Quake, Stephen R. (2008): Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (42), S. 16266–16271. DOI: 10.1073/pnas.0808319105.

Fan, H. Christina; Quake, Stephen R. (2007): Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. In: *Analytical chemistry* 79 (19), S. 7576–7579. DOI: 10.1021/ac0709394.

Fetal Medicine Foundation (2022): Nuchal translucency scan. Online verfügbar unter <https://fetalmedicine.org/fmf-certification-2/nuchal-translucency-scan>, zuletzt geprüft am 06.09.2022.

Galeva, S.; Gil, M. M.; Konstantinidou, L.; Akolekar, R.; Nicolaides, K. H. (2019): First-trimester screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in singleton and twin pregnancies: factors affecting test failure. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 53 (6), S. 804–809. DOI: 10.1002/uog.20290.

Gemeinsamer Bundesausschuss (2016): Richtlinien 2016. des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“). Hg. v. Bundesanzeiger AT 19.07.2016 B5. Online verfügbar unter [www.g-ba.de](http://www.g-ba.de).

Gemeinsamer Bundesausschuss (2021): Richtlinien 2022. des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“). Online verfügbar unter [www.g-ba.de](http://www.g-ba.de), zuletzt geprüft am 11.05.2022.

Gil, M. M.; Accurti, V.; Santacruz, B.; Plana, M. N.; Nicolaides, K. H. (2017): Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 50 (3), S. 302–314. DOI: 10.1002/uog.17484.

Gil, M. M.; Revello, R.; Poon, L. C.; Akolekar, R.; Nicolaides, K. H. (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. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 47 (1), S. 45–52. DOI: 10.1002/uog.15783.

Grati, F. R.; Kagan, K. O. (2017): Rate of no result in cell-free DNA testing and its influence on test performance metrics. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 50 (1), S. 134–137. DOI: 10.1002/uog.17330.

Hennig, Wolfgang (2002): Genetik. 3. überarbeitete und erweiterte Aufl. Berlin [etc.]: Springer.

Hill, Melissa; Barrett, Angela; Choolani, Mahesh; Lewis, Celine; Fisher, Jane; Chitty, Lyn S. (2017): Has noninvasive prenatal testing impacted termination of

- pregnancy and live birth rates of infants with Down syndrome? In: *Prenat. Diagn.* 37 (13), S. 1281–1290. DOI: 10.1002/pd.5182.
- Hoopmann, M.; Kagan, K. O. (2013): Ersttrimesterultraschall. In: Ulrich Gembruch, Horst Steiner und Kurt Hecher (Hg.): *Ultraschalldiagnostik in Geburtshilfe und Gynäkologie*. Berlin, Heidelberg: SpringerMedizin, S. 61–76.
- Hoppen, Thomas (2021): Bestandsaufnahme gut 150 Jahre nach der Erstbeschreibung. In: *Pädiatrie* 33 (1), S. 40–45. DOI: 10.1007/s15014-020-3657-2.
- Hui, Lisa; Bianchi, Diana W. (2020): Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know. In: *Prenat. Diagn.* 40 (2), S. 155–163. DOI: 10.1002/pd.5620.
- Hui, Lisa; Pynaker, Cecilia; Bonacquisto, Leonard; Lindquist, Anthea; Poulton, Alice; Kluckow, Eliza et al. (2021): Reexamining the optimal nuchal translucency cutoff for diagnostic testing in the cell-free DNA and microarray era: results from the Victorian Perinatal Record Linkage study. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 225 (5), 527.e1-527.e12. DOI: 10.1016/j.ajog.2021.03.050.
- Juneau, Kara; Bogard, Patrick E.; Huang, Stephanie; Mohseni, Morassa; Wang, Eric T.; Ryvkin, Paul et al. (2014): Microarray-based cell-free DNA analysis improves noninvasive prenatal testing. In: *Fetal diagnosis and therapy* 36 (4), S. 282–286. DOI: 10.1159/000367626.
- Kagan, K. O.; Abele, H.; Hoopmann, M. (2013): Ersttrimesterscreening. In: Ulrich Gembruch, Horst Steiner und Kurt Hecher (Hg.): *Ultraschalldiagnostik in Geburtshilfe und Gynäkologie*. Berlin, Heidelberg: SpringerMedizin, S. 77–106.
- Kagan, K. O.; Cicero, S.; Staboulidou, I.; Wright, D.; Nicolaidis, K. H. (2009a): Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 33 (3), S. 259–264. DOI: 10.1002/uog.6318.
- Kagan, K. O.; Eiben, B.; Kozlowski, P. (2014): Kombiniertes Ersttrimesterscreening und zellfreie fetale DNA – „Next Generation Screening“. In: *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)* 35 (3), S. 229–236. DOI: 10.1055/s-0034-1366353.
- Kagan, K. O.; Etchegaray, A.; Zhou, Y.; Wright, D.; Nicolaidis, K. H. (2009b): Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 34 (1), S. 14–18. DOI: 10.1002/uog.6412.
- Kagan, K. O.; Hoopmann, M.; Hammer, R.; Stressig, R.; Kozlowski, P. (2015a): Screening for chromosomal abnormalities by first trimester combined screening and noninvasive prenatal testing. In: *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)* 36 (1), S. 40–46. DOI: 10.1055/s-0034-1385059.

Kagan, K. O.; Sroka, F.; Sonek, J.; Abele, H.; Lüthgens, K.; Schmid, M. et al. (2018): First-trimester risk assessment based on ultrasound and cell-free DNA vs combined screening: a randomized controlled trial. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 51 (4), S. 437–444. DOI: 10.1002/uog.18905.

Kagan, K. O.; Staboulidou, I.; Syngelaki, A.; Cruz, J.; Nicolaides, K. H. (2010): The 11-13-week scan: diagnosis and outcome of holoprosencephaly, exomphalos and megacystis. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 36 (1), S. 10–14. DOI: 10.1002/uog.7646.

Kagan, K. O.; Valencia, C.; Livanos, P.; Wright, D.; Nicolaides, K. H. (2009c): Tricuspid regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11+0 to 13+6 weeks of gestation. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 33 (1), S. 18–22. DOI: 10.1002/uog.6264.

Kagan, K. O.; Wright, D.; Nicolaides, K. H. (2015b): First-trimester contingent screening for trisomies 21, 18 and 13 by fetal nuchal translucency and ductus venosus flow and maternal blood cell-free DNA testing. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 45 (1), S. 42–47. DOI: 10.1002/uog.14691.

Kagan, K. O.; Wright, D.; Spencer, K.; Molina, F. S.; Nicolaides, K. H. (2008a): First-trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 31 (5), S. 493–502. DOI: 10.1002/uog.5332.

Kagan, Karl O.; Wright, Dave; Valencia, Catalina; Maiz, Nerea; Nicolaides, Kypros H. (2008b): 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. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 23 (9), S. 1968–1975. DOI: 10.1093/humrep/den224.

Kagan, Karl Oliver (2009): Entwicklung eines neuen pränatalen Screening-Algorithmus für Trisomie 21, 18 und 13 in der 11+0 - 13+6 SSW. kumulative Habilitationsschrift. Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, Tübingen. Medizinische Fakultät.

Kagan, Karl Oliver; Avgidou, Kyriaki; Molina, Francisca S.; Gajewska, Katarzyna; Nicolaides, Kypros H. (2006): Relation between increased fetal nuchal translucency thickness and chromosomal defects. In: *Obstetrics and gynecology* 107 (1), S. 6–10. DOI: 10.1097/01.AOG.0000191301.63871.c6.

Kageleiry, Andrew; Samuelson, David; Duh, Mei Sheng; Lefebvre, Patrick; Campbell, John; Skotko, Brian G. (2017): Out-of-pocket medical costs and third-party healthcare costs for children with Down syndrome. In: *American journal of medical genetics. Part A* 173 (3), S. 627–637. DOI: 10.1002/ajmg.a.38050.

- Karim, J. N.; Roberts, N. W.; Salomon, L. J.; Papageorghiou, A. T. (2017): Systematic review of first-trimester ultrasound screening for detection of fetal structural anomalies and factors that affect screening performance. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 50 (4), S. 429–441. DOI: 10.1002/uog.17246.
- Kozlowski, Peter; Burkhardt, Tilo; Gembruch, Ulrich; Gonser, Markus; Kähler, Christiane; Kagan, Karl-Oliver et al. (2019): Empfehlungen der DEGUM, der ÖGUM, der SGUM und der FMF Deutschland zum Einsatz von Ersttrimester-Screening, früher Fehlbildungsdiagnostik, Screening an zellfreier DNA (NIPT) und diagnostischen Punktionen. In: *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)* 40 (2), S. 176–193. DOI: 10.1055/a-0631-8898.
- Lathi, Ruth B.; Gray Hazard, Florette K.; Heerema-McKenney, Amy; Taylor, Joanne; Chueh, Jane Tsung (2011): First trimester miscarriage evaluation. In: *Seminars in reproductive medicine* 29 (6), S. 463–469. DOI: 10.1055/s-0031-1293200.
- Liao, A. W.; Heath, V.; Kametas, N.; Spencer, K.; Nicolaides, K. H. (2001): First-trimester screening for trisomy 21 in singleton pregnancies achieved by assisted reproduction. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 16 (7), S. 1501–1504. DOI: 10.1093/humrep/16.7.1501.
- Liao, Gary J. W.; Lun, Fiona M. F.; Zheng, Yama W. L.; Chan, K. C. Allen; Leung, Tak Y.; Lau, Tze K. et al. (2011): Targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA permits efficient and unbiased detection of fetal alleles. In: *Clinical chemistry* 57 (1), S. 92–101. DOI: 10.1373/clinchem.2010.154336.
- Lo, Y. M.; Tein, M. S.; Lau, T. K.; Haines, C. J.; Leung, T. N.; Poon, P. M. et al. (1998): Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. In: *American journal of human genetics* 62 (4), S. 768–775. DOI: 10.1086/301800.
- Lo, Y. M. Dennis; Chan, K. C. Allen; Sun, Hao; Chen, Eric Z.; Jiang, Peiyong; Lun, Fiona M. F. et al. (2010): Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. In: *Science translational medicine* 2 (61), 61ra91. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001720.
- Lo, Y. M. Dennis; Corbetta, Noemi; Chamberlain, Paul F.; Rai, Vik; Sargent, Ian L.; Redman, Christopher W. G.; Wainscoat, James S. (1997): Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. In: *The Lancet* 350 (9076), S. 485–487. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0.
- Lo, Y. M. Dennis; Lun, Fiona M. F.; Chan, K. C. Allen; Tsui, Nancy B. Y.; Chong, Ka C.; Lau, Tze K. et al. (2007a): Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (32), S. 13116–13121. DOI: 10.1073/pnas.0705765104.
- Lo, Y. M. Dennis; Tsui, Nancy B. Y.; Chiu, Rossa W. K.; Lau, Tze K.; Leung, Tse N.; Heung, Macy M. S. et al. (2007b): Plasma placental RNA allelic ratio

permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. In: *Nature medicine* 13 (2), S. 218–223. DOI: 10.1038/nm1530.

Maiz, N.; Valencia, C.; Kagan, K. O.; Wright, D.; Nicolaides, K. H. (2009): Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 33 (5), S. 512–517. DOI: 10.1002/uog.6330.

Mardis, Elaine R. (2008): Next-generation DNA sequencing methods. In: *Annual review of genomics and human genetics* 9, S. 387–402. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.

Maya, I.; Yacobson, S.; Kahana, S.; Yeshaya, J.; Tenne, T.; Agmon-Fishman, I. et al. (2017): Cut-off value of nuchal translucency as indication for chromosomal microarray analysis. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 50 (3), S. 332–335. DOI: 10.1002/uog.17421.

Merz, E.; Thode, C.; Alkier, A.; Eiben, B.; Hackelöer, B. J.; Hansmann, M. et al. (2008): A new approach to calculating the risk of chromosomal abnormalities with first-trimester screening data. In: *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)* 29 (6), S. 639–645. DOI: 10.1055/s-2008-1027958.

Merz, E.; Thode, C.; Eiben, B.; Faber, R.; Hackelöer, B. J.; Huesgen, G. et al. (2011): Individualized correction for maternal weight in calculating the risk of chromosomal abnormalities with first-trimester screening data. In: *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)* 32 (1), S. 33–39. DOI: 10.1055/s-0029-1246001.

Miltoft, C. B.; Rode, L.; Ekelund, C. K.; Sundberg, K.; Kjaergaard, S.; Zingenberg, H.; Tabor, A. (2018): Contingent first-trimester screening for aneuploidies with cell-free DNA in a Danish clinical setting. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 51 (4), S. 470–479. DOI: 10.1002/uog.17562.

Morgan, S.; Delbarre, A.; Ward, P. (2013): Impact of introducing a national policy for prenatal Down syndrome screening on the diagnostic invasive procedure rate in England. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 41 (5), S. 526–529. DOI: 10.1002/uog.12384.

Nicolaides, K. H.; Brizot, M. L.; Snijders, R. J. (1994): Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. In: *British journal of obstetrics and gynaecology* 101 (9), S. 782–786. DOI: 10.1111/j.1471-0528.1994.tb11946.x.

Nicolaides, K. H.; Spencer, K.; Avgidou, K.; Faiola, S.; Falcon, O. (2005): Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. In: *Ultrasound in obstetrics &*



*gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 25 (3), S. 221–226. DOI: 10.1002/uog.1860.

Nicolaides, K. H.; Wright, D.; Poon, L. C.; Syngelaki, A.; Gil, M. M. (2013): First-trimester contingent screening for trisomy 21 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 42 (1), S. 41–50. DOI: 10.1002/uog.12511.

Noble, J. (1998): Natural history of Down's syndrome: a brief review for those involved in antenatal screening. In: *Journal of medical screening* 5 (4), S. 172–177. DOI: 10.1136/jms.5.4.172.

Norton, Mary E.; Jacobsson, Bo; Swamy, Geeta K.; Laurent, Louise C.; Ranzini, Angela C.; Brar, Herb et al. (2015): Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. In: *The New England journal of medicine* 372 (17), S. 1589–1597. DOI: 10.1056/NEJMoa1407349.

Oepkes, D.; Bartha, J. L.; Schmid, M.; Yaron, Y. (2016): Benefits of contingent screening vs primary screening by cell-free DNA testing: think again. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 47 (5), S. 542–545. DOI: 10.1002/uog.15758.

O'Gorman, Neil; Wright, David; Syngelaki, Argyro; Akolekar, Ranjit; Wright, Alan; Poon, Leona C.; Nicolaides, Kypros H. (2016): Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 11-13 weeks gestation. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 214 (1), 103.e1-103.e12. DOI: 10.1016/j.ajog.2015.08.034.

Penrose, L. S. (1933): The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. In: *Journal of genetics* 88 (1), S. 9–14. DOI: 10.1007/s12041-009-0002-5.

Petersen, O. B.; Vogel, I.; Ekelund, C.; Hyett, J.; Tabor, A. (2014): Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: population-based study from a country with existing first-trimester screening. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 43 (3), S. 265–271. DOI: 10.1002/uog.13270.

Prodan, Natalia Carmen; Wiechers, Cornelia; Geipel, Annegret; Walter, Adeline; Siegmann, Hans Jörg; Kozlowski, Peter et al. (2022): Universal Cell Free DNA or Contingent Screening for Trisomy 21: Does It Make a Difference? A Comparative Study with Real Data. In: *Fetal diagnosis and therapy* 49 (3), S. 85–94. DOI: 10.1159/000523738.

Queißer-Luft, Annette; Spranger, Jürgen (2006): Fehlbildungen bei Neugeborenen. In: *Deutsches Ärzteblatt* 103 (38), S. 2464–2471. Online verfügbar unter <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=52795>, zuletzt geprüft am 05.08.2022.

Revello, R.; Sarno, L.; Ispas, A.; Akolekar, R.; Nicolaides, K. H. (2016): Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood:

consequences of a failed result. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 47 (6), S. 698–704. DOI: 10.1002/uog.15851.

Rose, Nancy C.; Barrie, Elizabeth S.; Malinowski, Jennifer; Jenkins, Gabrielle P.; McClain, Monica R.; LaGrave, Danielle; Leung, Marco L. (2022): Systematic evidence-based review: The application of noninvasive prenatal screening using cell-free DNA in general-risk pregnancies. In: *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 24 (7), S. 1379–1391. DOI: 10.1016/j.gim.2022.03.019.

Salomon, L. J.; Alfirevic, Z.; Audibert, F.; Kagan, K. O.; Paladini, D.; Yeo, G.; Raine-Fenning, N. (2017): ISUOG updated consensus statement on the impact of cfDNA aneuploidy testing on screening policies and prenatal ultrasound practice. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 49 (6), S. 815–816. DOI: 10.1002/uog.17483.

Salomon, L. J.; Alfirevic, Z.; Bilardo, C. M.; Chalouhi, G. E.; Ghi, T.; Kagan, K. O. et al. (2013): ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 41 (1), S. 102–113. DOI: 10.1002/uog.12342.

Salomon, L. J.; Sotiriadis, A.; Wulff, C. B.; Odibo, A.; Akolekar, R. (2019): Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of literature and updated meta-analysis. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 54 (4), S. 442–451. DOI: 10.1002/uog.20353.

Santorum, M.; Wright, D.; Syngelaki, A.; Karagioti, N.; Nicolaides, K. H. (2017): Accuracy of first-trimester combined test in screening for trisomies 21, 18 and 13. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 49 (6), S. 714–720. DOI: 10.1002/uog.17283.

Savva, George M.; Morris, Joan K.; Mutton, David E.; Alberman, Eva (2006): Maternal age-specific fetal loss rates in Down syndrome pregnancies. In: *Prenat. Diagn.* 26 (6), S. 499–504. DOI: 10.1002/pd.1443.

Scott, Fergus Perry; Menezes, Melody; Palma-Dias, Ricardo; Nisbet, Debbie; Schluter, Philip; Da Silva Costa, Fabricio; McLennan, Andrew Cameron (2018): Factors affecting cell-free DNA fetal fraction and the consequences for test accuracy. In: *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 31 (14), S. 1865–1872. DOI: 10.1080/14767058.2017.1330881.

Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin, Number 226 (2020). In: *Obstetrics and gynecology* 136 (4), e48-e69.

Snijders, R. J.; Sundberg, K.; Holzgreve, W.; Henry, G.; Nicolaides, K. H. (1999): Maternal age- and gestation-specific risk for trisomy 21. In: *Ultrasound*

*in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 13 (3), S. 167–170. DOI: 10.1046/j.1469-0705.1999.13030167.x.

Snijders, R. J.M.; Noble, P.; Sebire, N.; Souka, A.; Nicolaides, K. H. (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. In: *The Lancet* 352 (9125), S. 343–346. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)11280-6.

Song, Ken; Musci, Thomas J.; Caughey, Aaron B. (2013): Clinical utility and cost of non-invasive prenatal testing with cfDNA analysis in high-risk women based on a US population. In: *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 26 (12), S. 1180–1185. DOI: 10.3109/14767058.2013.770464.

Souka, Athena P.; Kaisenberg, Constantin S. von; Hyett, Jonathan A.; Sonek, Jiri D.; Nicolaides, Kypros H. (2005): Increased nuchal translucency with normal karyotype. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 192 (4), S. 1005–1021. DOI: 10.1016/j.ajog.2004.12.093.

Sparks, Andrew B.; Struble, Craig A.; Wang, Eric T.; Song, Ken; Oliphant, Arnold (2012a): Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 206 (4), 319.e1-9. DOI: 10.1016/j.ajog.2012.01.030.

Sparks, Andrew B.; Wang, Eric T.; Struble, Craig A.; Barrett, Wade; Stokowski, Renee; McBride, Celeste et al. (2012b): Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. In: *Prenat. Diagn.* 32 (1), S. 3–9. DOI: 10.1002/pd.2922.

Spencer, K.; Bindra, R.; Nix, A. B. J.; Heath, V.; Nicolaides, K. H. (2003a): Delta-NT or NT MoM: which is the most appropriate method for calculating accurate patient-specific risks for trisomy 21 in the first trimester? In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 22 (2), S. 142–148. DOI: 10.1002/uog.186.

Spencer, K.; Crossley, J. A.; Aitken, D. A.; Nix, A. B. J.; Dunstan, F. D. J.; Williams, K. (2002): Temporal changes in maternal serum biochemical markers of trisomy 21 across the first and second trimester of pregnancy. In: *Annals of clinical biochemistry* 39 (Pt 6), S. 567–576. DOI: 10.1177/000456320203900604.

Spencer, K.; Spencer, C. E.; Power, M.; Moakes, A.; Nicolaides, K. H. (2000a): One stop clinic for assessment of risk for fetal anomalies: a report of the first year of prospective screening for chromosomal anomalies in the first trimester. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 107 (10), S. 1271–1275. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2000.tb11619.x.

Spencer, Kevin; Bindra, Renu; Cacho, Anna Maria; Nicolaides, Kypros H. (2004): The impact of correcting for smoking status when screening for chromosomal anomalies using maternal serum biochemistry and fetal nuchal translucency thickness in the first trimester of pregnancy. In: *Prenat. Diagn.* 24 (3), S. 169–173. DOI: 10.1002/pd.819.

Spencer, Kevin; Bindra, Renu; Nicolaides, Kypros H. (2003b): Maternal weight correction of maternal serum PAPP-A and free beta-hCG MoM when screening for trisomy 21 in the first trimester of pregnancy. In: *Prenat. Diagn.* 23 (10), S. 851–855. DOI: 10.1002/pd.708.

Spencer, Kevin; Ong, Charas Y. T.; Liao, Adolfo W. J.; Nicolaides, Kypros H. (2000b): The influence of ethnic origin on first trimester biochemical markers of chromosomal abnormalities. In: *Prenat. Diagn.* 20 (6), S. 491–494. DOI: 10.1002/1097-0223(200006)20:6<491::AID-PD844>3.0.CO;2-3.

Statistische Bundesamt (Destatis): Lebendgeborene: Deutschland, Jahre, Alter der Mutter, Lebendgeburtenfolge. Unter Mitarbeit von Statistische Bundesamt (Destatis). Hg. v. Statistische Bundesamt (Destatis). Online verfügbar unter <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=previous&levelindex=1&step=1&itel=Ergebnis&levelid=1659691932804&acceptscookies=false#abreadcrumb>, zuletzt geprüft am 05.08.2022.

Statistische Bundesamt (Destatis) (28.03.2018): Geburtenanstieg setzte sich 2016 fort. Online verfügbar unter [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2018/03/PD18\\_115\\_122.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2018/03/PD18_115_122.html), zuletzt geprüft am 05.08.2022.

Statistisches Bundesamt (2016): Maternal age distribution at birth in Germany 2015. Hg. v. Statistische Bundesamt (Destatis). Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Geburten/Tabellen/GeburtenMutterBiologischesAlter.html>, zuletzt geprüft am 01.07.2017.

Stokowski, Renee; Wang, Eric; White, Karen; Batey, Annette; Jacobsson, Bo; Brar, Herb 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. In: *Prenat. Diagn.* 35 (12), S. 1243–1246. DOI: 10.1002/pd.4686.

Stumm, Markus; Entezami, Michael; Trunk, Nastasja; Beck, Martina; Löcherbach, Julia; Wegner, Rolf-Dieter et al. (2012): Noninvasive prenatal detection of chromosomal aneuploidies using different next generation sequencing strategies and algorithms. In: *Prenat. Diagn.* 32 (6), S. 569–577. DOI: 10.1002/pd.3862.

Syngelaki, A.; Hammami, A.; Bower, S.; Zidere, V.; Akolekar, R.; Nicolaides, K. H. (2019): Diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities on routine ultrasound examination at 11-13 weeks' gestation. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 54 (4), S. 468–476. DOI: 10.1002/uog.20844.

- Syngelaki, Argyro; Chelemen, Teodora; Dagklis, Themistoklis; Allan, Lindsey; Nicolaides, Kypros H. (2011): Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11-13 weeks. In: *Prenatal diagnosis* 31 (1), S. 90–102. DOI: 10.1002/pd.2642.
- Szabó, J.; Gellen, J. (1990): Nuchal fluid accumulation in trisomy-21 detected by vaginosonography in first trimester. In: *The Lancet* 336 (8723), S. 1133. DOI: 10.1016/0140-6736(90)92614-N.
- Tong, Yu K.; Ding, Chunming; Chiu, Rossa W. K.; Gerovassili, Ageliki; Chim, Stephen S. C.; Leung, Tak Y. et al. (2006): Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. In: *Clinical chemistry* 52 (12), S. 2194–2202. DOI: 10.1373/clinchem.2006.076851.
- Tørring, Niels; Petersen, Olav Bjørn; Becher, Naja; Vogel, Ida; Uldbjerg, Niels (2015): First trimester screening for other trisomies than trisomy 21, 18, and 13. In: *Prenat. Diagn.* 35 (6), S. 612–619. DOI: 10.1002/pd.4584.
- Valenti, Carlo; Schutta, Edward J.; Kehaty, Tehila (1968): PRENATAL DIAGNOSIS OF DOWN'S SYNDROME. In: *The Lancet* 292 (7561), S. 220. DOI: 10.1016/s0140-6736(68)92656-1.
- van der Meij, Karuna R. M.; Sistermans, Erik A.; Macville, Merryn V. E.; Stevens, Servi J. C.; Bax, Caroline J.; Bekker, Mireille N. et al. (2019): TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands. In: *American journal of human genetics* 105 (6), S. 1091–1101. DOI: 10.1016/j.ajhg.2019.10.005.
- Wagner, P.; Hoopmann, M.; Kagan, K. O. (2018): Das Ersttrimester-Screening. In: *Gynäkologe* 51 (1), S. 12–18. DOI: 10.1007/s00129-017-4165-5.
- Wagner, Philipp; Sonek, Jiri; Klein, Jessika; Hoopmann, Markus; Abele, Harald; Kagan, Karl Oliver (2017): First-trimester ultrasound screening for trisomy 21 based on maternal age, fetal nuchal translucency, and different methods of ductus venosus assessment. In: *Prenat. Diagn.* 37 (7), S. 680–685. DOI: 10.1002/pd.5065.
- Wald, N. J.; Rodeck, C.; Hackshaw, A. K.; Walters, J.; Chitty, L.; Mackinson, A. M. (2003): First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). In: *Health technology assessment (Winchester, England)* 7 (11), S. 1–77. DOI: 10.3310/hta7110.
- Wald, Nicholas J; Densem, James W.; George, Lynne; Muttukrishna, Shauti; Knight, Philip G. (1996): Prenatal screening for Down's syndrome using inhibin-A as a serum marker. In: *Prenat. Diagn.* 16 (2), S. 143–153. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0223(199602)16:2<143::AID-PD825>3.0.CO;2-F.
- Wald, Nicholas J; Kennard, Anne; Hackshaw, Allan; McGuire, Ali (1997): Antenatal Screening for Down's Syndrome. In: *Journal of medical screening* 4, S. 181–246.

Wang, Eric; Batey, Annette; Struble, Craig; Musci, Thomas; Song, Ken; Oliphant, Arnold (2013): Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. In: *Prenatal diagnosis* 33 (7), S. 662–666. DOI: 10.1002/pd.4119.

Wright, D.; Kagan, K. O.; Molina, F. S.; Gazzoni, A.; Nicolaides, K. H. (2008): A mixture model of nuchal translucency thickness in screening for chromosomal defects. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 31 (4), S. 376–383. DOI: 10.1002/uog.5299.

Wright, D.; Spencer, K.; Kagan K, K.; Tørring, N.; Petersen, O. B.; Christou, A. et al. (2010): First-trimester combined screening for trisomy 21 at 7-14 weeks' gestation. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 36 (4), S. 404–411. DOI: 10.1002/uog.7755.

Wright, D.; Syngelaki, A.; Bradbury, I.; Akolekar, R.; Nicolaides, K. H. (2014): First-trimester screening for trisomies 21, 18 and 13 by ultrasound and biochemical testing. In: *Fetal diagnosis and therapy* 35 (2), S. 118–126. DOI: 10.1159/000357430.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Natürliche Geburtsprävalenz einer Trisomie 21 nach mütterlichem Alter bei Geburt (Adaptiert von Noble 1998). _____	13
Abbildung 2: Normale Nackentransparenz (links) und erhöhte Nackentransparenz (rechts) bei einem Fötus mit Trisomie 21. _____	18
Abbildung 3: Anteilige Darstellung der Ursachen für große Fehlbildungen. ____	28
Abbildung 4: Ursprung des zusätzlichen Chromosom 21-Genmaterials in Prozent an der Gesamtanzahl aller Trisomien 21. _____	31
Abbildung 5: Flussdiagramm zur Formationsdarstellung des Studienkollektivs und der Studienarme für das kombinierte ETS und für Ultraschall mit cfDNA-Analyse. _____	49
Abbildung 6: Mütterlichen Alters in Jahren in der Gruppe des kombinierten ETS und der Gruppe des Ultraschalls und cfDNA-Analyse (US + cfDNA) zum Zeitpunkt der ETS-Untersuchung. _____	51
Abbildung 7: Gestationsalter in Wochen zum Zeitpunkt der ETS-Untersuchung in der Gruppe des kombinierten ETS und der Gruppe des Ultraschalls und cfDNA-Analyse (US + cfDNA). _____	51
Abbildung 8: Mütterliches Gewicht in kg zum Zeitpunkt der ETS-Untersuchung in der Gruppe des kombinierten ETS und der Gruppe des Ultraschalls und cfDNA-Analyse (US + cfDNA). _____	52
Abbildung 9: Verteilung der NT-Messungen in der Gruppe des kombinierten ETS nach SSL der Feten. Die Linien repräsentieren die 5., 50., 95. und 99. Perzentile. _____	54
Abbildung 10: Verteilung der NT-Messungen in der Gruppe Ultraschall mit cfDNA-Analyse nach SSL der Feten. Die Linien repräsentieren die 5., 50., 95. und 99. Perzentile. _____	54
Abbildung 11: Verteilung der individuellen Risiken ermittelt durch das kombinierte ETS und durch Ultraschall mit cfDNA-Analyse (US + cfDNA) als absolute Fallanzahl in Risikokategorien. _____	56
Abbildung 12: Risikoverteilung für eine T21 in dem Studienarm kombiniertes ETS nach mütterlichem Alter in Jahren zum Untersuchungszeitpunkt. _____	57
Abbildung 13: Risikoverteilung für eine T21 in dem Studienarm kombiniertes ETS nach SSL. _____	57
Abbildung 14: Risikoverteilung für eine T21 in dem Studienarm Ultraschall und cfDNA-Analyse nach mütterlichem Alter in Jahren zum Untersuchungszeitpunkt. _____	58
Abbildung 15: Risikoverteilung für eine T21 in dem Studienarm Ultraschall und cfDNA-Analyse nach SSL. _____	58
Abbildung 16: Mütterliches Gewicht in kg zum Zeitpunkt des Ultraschalls und primären cfDNA-Analyse aufgeteilt in die Subpopulationen mit und ohne Ergebnisse in der cfDNA-Analyse. _____	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wahrheitsmatrix für richtige und falsche Screening-Klassifikationen.	12
Tabelle 2: Mediane MoM-Werte in Down-Syndrom-Schwangerschaften und Detektionsraten bei einer 5% Falsch-positiv-Rate für individuelle Marker (ohne Verwendung des mütterlichen Alters) nach Gestationsalter (Wald et al. 2003).	15
Tabelle 3: Detektions- und Falsch-positiv-Raten bei unterschiedlichen Risikoschwellenwerten in Screening auf Trisomie 21 mittels ETS basierend auf dem mütterlichen Altersrisiko, der NT, PAPP-A und $\beta$ -hCG (Ausschnitt aus Wright et al. 2014).	17
Tabelle 4: Merkmale der 1376 Frauen im Randomisierungskollektiv für das ETS auf T21 bei kombiniertem ETS oder bei US mit cfDNA-Analyse. Ergebnisse sind als absolute Anzahl, n (prozentualer Anteil, %) oder Median (Interquartilabstand) angegeben.	50
Tabelle 5: Risikoparameter im ETS auf T21 basierend auf dem kombinierten ETS oder Ultraschall mit cfDNA-Analyse (US + cfDNA). Daten sind als Mediane (IQA) oder n (%) angegeben. *Das individuelle Risiko wurde in diesen Fällen mittels kombiniertem ETS ermittelt.	53
Tabelle 6: Verteilung der individuellen Risiken ermittelt durch das kombinierte ETS und durch Ultraschall mit cfDNA-Analyse (US + cfDNA) in Risikokategorien. Daten sind als Mediane (IQA) oder n (%) angegeben.	56
Tabelle 7: Sonographische Befunde für den Studienausschluss von 31 Patientinnen aufgrund von erhöhter NT und/oder Fehlbildungen.	63



# Frage-, Aufklärungs- und Einwilligungsbögen

## 1. Fragebogen im Rahmen der ReFaPo-Studie an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Ausbildung (höchster Grad):

### 1. Frage

Wissen Sie, wozu die heutige Untersuchung dienen soll?

*(bitte nur eine Antwort ankreuzen)*

- Sie bestätigt, dass mein Kind gesund ist
- Sie erlaubt mir den sicheren Ausschluss einer Trisomie 21 (Down Syndrom)
- Sie erlaubt mir eine Einschätzung über mein Risiko für ein Kind mit Trisomie 21 (Down Syndrom)
- Weiß nicht

### 2. Frage

Haben Sie eine Vorstellung von Kindern mit Trisomie 21 (Down Syndrom)?

*(bitte nur eine Antwort ankreuzen)*

- ja
- nein

Wenn ja: welche?

---

### 3. Frage

Kennen Sie andere Chromosomenstörungen?

*(bitte nur eine Antwort ankreuzen)*

- ja
- nein

Wenn ja: welche?

---

4. Frage

Wie besorgt sind Sie, dass Ihr ungeborenes Kind an Trisomie 21 (Down Syndrom) erkrankt ist?

*(bitte nur eine Antwort ankreuzen)*

- 1 (sehr)
- 2
- 3
- 4
- 5 (gar nicht)

5. Frage

Wissen Sie was mit Detektions-, Falsch-Positivrate und persönlichem Risiko, Screening-Test und diagnostischem Test gemeint ist?

*(bitte jeweils nur eine Antwort ankreuzen)*

Detektionsrate

- ja
- nein

Falsch-Positivrate

- ja
- nein

Persönliches Risiko

- ja
- nein

Screening-Test

- ja
- nein

Diagnostischer Test

- ja
- nein

6. Frage

Wie hoch schätzen Sie Ihr persönliches Risiko für ein Kind mit Trisomie 21 ein?

*(bitte als 1 in x (z.B. 1: 100) oder als % (z.B. 0,5%) angeben)*

Antwort: 1 in \_\_\_ oder \_\_\_%

7. Frage

Welches ist der wichtigste Nachteil der Fruchtwasseruntersuchung oder der Chorionzottenbiopsie?

*(bitte jeweils nur eine Antwort ankreuzen)*

- Ein 10% Risiko für eine mit dem Eingriff assoziierte Fehlgeburt
- Ein 5% Risiko für eine mit dem Eingriff assoziierte Fehlgeburt
- Ein 0,1-0,2% Risiko für eine mit dem Eingriff assoziierte Fehlgeburt
- Es gibt kein mit dem Eingriff assoziiertes Risiko
- Keine Ahnung

8. Frage

Wie viele Kinder mit Trisomie 21 (Down Syndrom) können mittels Ersttrimester-Screening erkannt werden (Detektionsrate)?

*(bitte jeweils nur eine Antwort ankreuzen)*

- 20-30%
- 40-50%
- 70-80%
- 90-100%
- Keine Ahnung

9. Frage

Wie viele Kinder mit Trisomie 21 (Down Syndrom) können mittels zellfreier DNA-Analyse erkannt werden (Detektionsrate)?

*(bitte jeweils nur eine Antwort ankreuzen)*

- 20-30%
- 40-50%
- 70-80%
- 90-100%
- Keine Ahnung

10. Frage

Was ist Ihnen an einem Screening-Test wichtig?

*(Zu jeder Antwort bitte eine Schulnote zwischen 1 (sehr wichtig) bis 5 (nicht wichtig) angeben)*

- Möglichst alle Kinder mit einer Trisomie werden erkannt:
- Möglichst wenige gesunde Kinder werden als auffällig klassifiziert:
- Eine Fruchtwasserpunktion / Chorionzottenbiopsie zu vermeiden:
- Kurze Bearbeitungszeit:
- Möglichst früh in der Schwangerschaft durchführbar:
- Geringe Kosten:
- Möglichst viele kindliche Erkrankungen werden erkannt

11. Frage

Welchen Screening-Test würden Sie bevorzugen:

*(bitte jeweils nur eine Antwort ankreuzen)*

- Ersttrimester-Screening
- zellfreie fetale DNA-Analyse
- Keinen der beiden Tests

12. Frage

Wie viele schwangeren Frauen bei denen das Ersttrimester-Screening ein erhöhtes Risiko für Trisomie 21 (Down Syndrom) zeigt, erwarten tatsächlich ein Kind mit der Erkrankung (Positiver Vorhersagewert)?

*(bitte jeweils nur eine Antwort ankreuzen)*

- 3-6%
- 10-20%
- 30-50%
- 60-100%
- Keine Ahnung

13. Frage

Wie viele schwangeren Frauen bei denen die zellfreien DNA-Analyse ein erhöhtes Risiko für Trisomie 21 (Down Syndrom) zeigt, erwarten tatsächlich ein Kind mit der Erkrankung (Positiver Vorhersagewert)?

*(bitte jeweils nur eine Antwort ankreuzen)*

- 3-6%
- 10-20%
- 30-50%
- 60-100%
- Keine Ahnung

14. Frage

Welche weitere Untersuchung würden Sie durchführen, wenn Sie nach Abschluss der Screening-Untersuchung ein erhöhtes Risiko für ein Kind mit Trisomie 21 (Down Syndrom) hätten?

*(bitte jeweils nur eine Antwort ankreuzen)*

- Eine Fruchtwasseruntersuchung bzw. Chorionzottenbiopsie
- cfDNA-Analyse
- Keine weitere Untersuchung, da auch ein auffälliges Ergebnis keinen Einfluss auf den Fortgang der Schwangerschaft hätte
- Feindiagnostik in der 21.SSW, obwohl mir bewusst ist, dass diese Untersuchung in Hinblick auf das Screening auf Trisomie 21 (Down Syndrom) den Untersuchungen im ersten Trimenon unterlegen ist.
- Ich kann die Frage erst beantworten, wenn ich tatsächlich mit einem erhöhten Risiko konfrontiert bin.

**2 Wochen nach Abschluss des Screening-Tests und nach Abschluss der Schwangerschaft:**

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

*1. Frage*

Sind Sie mit dem durchgeführten Screening-Test (Ersttrimester-Screening, zellfreie DNA-Analyse) zufrieden?

*(bitte nur eine Antwort ankreuzen)*

- ja
- nein

Wenn nein: Warum?

*2. Frage*

Hätten Sie lieber den anderen Screening-Test gehabt?

*(bitte nur eine Antwort ankreuzen)*

- ja
- nein

Wenn ja: Warum?

*3. Frage*

Konnte der Screening-Test Ihre Bedenken, dass Ihr Kind eine Trisomie 21 (Down Syndrom) haben könnte, verringern?

*(bitte nur eine Antwort ankreuzen)*

- ja
- nein
- Hatte keine Bedenken

*4. Frage*

Haben Sie nach Abschluss des Screening-Tests weitere Maßnahmen zur Abklärung des Trisomie 21-Risikos ergriffen (Beispiel: Fruchtwasserpunktion, Chorionzottenbiopsie, Ersttrimester-Screening, zellfreie DNA-Analyse)?

*(bitte nur eine Antwort ankreuzen)*

- ja
- nein

Wenn ja: Welche und Warum?

*5. Frage*

Was haben Sie an dem durchgeführten Screening-Test geschätzt?

*(Zu jeder Antwort bitte eine Schulnote zwischen 1 (sehr wichtig) bis 5 (nicht wichtig) angeben)*

- Möglichst alle Kinder mit einer Trisomie werden erkannt:
- Möglichst wenige gesunde Kinder werden als auffällig klassifiziert:
- Eine Fruchtwasserpunktion / Chorionzottenbiopsie wurde vermieden:
- Kurze Bearbeitungszeit:
- Möglichst früh in der Schwangerschaft durchführbar:
- Präzise Angabe des Risikos:
- Geringe Kosten (unter dem Aspekt, dass die cfDNA-Analyse normalerweise etwa €400-600 und das ETS €150-200 kostet):

*6. Frage*

Würden Sie den durchgeführten Screening-Test weiterempfehlen?

- ja
- nein

Wenn nein, warum?

# Universitätsklinikum Tübingen

## Department für Frauengesundheit

Geschäftsführender Ärztlicher Direktor  
Prof. Dr. med. Diethelm Wallwiener

Stv. Geschäftsführende Ärztliche Direktorin  
Prof. Dr. med. Sara Brucker

Department für Frauengesundheit · Calwerstraße 7 · 72076 Tübingen

## Universitäts-Frauenklinik

Ärztlicher Direktor  
Prof. Dr. med. Diethelm Wallwiener

## Forschungsinstitut für Frauengesundheit

Ärztliche Direktorin  
Prof. Dr. med. Sara Brucker

www.uni-frauenklinik-tuebingen.de  
Diethelm.Wallwiener@med.uni-tuebingen.de  
Sara.Brucker@med.uni-tuebingen.de

## Aufklärung und Einverständniserklärung

### ReFaPo-Studie (Reducing false positives in screening)

### Studie zur Erforschung der Falsch-Positivrate beim Ersttrimester-Screening und bei der zellfreien fetalen DNA-Analyse

Sehr geehrte Patientin,

wir freuen uns, dass Sie für das Ersttrimester-Screening zu uns gekommen sind. Neben einer klinischen Versorgung auf höchstem Niveau sind wir stetig bemüht die Screeningmethoden in der Pränataldiagnostik zu verbessern. Wir führen daher derzeit eine Studie durch, die sich mit der Testgüte unterschiedlicher Screening-Untersuchungen befasst.

Gerne möchten wir Sie zur Teilnahme an dieser Studie einladen.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden zahlreiche Untersuchungsmethoden entwickelt, um das Screening auf die fetale Trisomie 21 (Down-Syndrom) während der Schwangerschaft zu steigern. Den unterschiedlichen Ansätzen immanent ist, dass sie das individuelle Risiko einer Patientin für eine Chromosomenstörung bestimmen.

### Ersttrimester-Screening

Das kombinierte Ersttrimester-Screening (ETS) stellt den Goldstandard der Risikobeurteilung für das Vorliegen einer Trisomie 21 dar und wurde von vielen Ländern in die gesetzliche Regelversorgung von Schwangerschaften übernommen. In Deutschland wird es als sogenannte IGEL-Leistung (Individuelle Gesundheitsleistung) angeboten – zu der Sie heute bei uns sind.

#### Call-Center

☎ (07071) 29-82224  
☎ (07071) 29-4500

#### Porte/Notfälle

☎ (07071) 29-82681  
☎ (07071) 29-5381

#### Privatanmeldung

☎ (07071) 29-82212  
☎ (07071) 29- 5289  
☎ (07071) 29-86301  
☎ (07071) 29- 5293

#### Universitäts-Brustzentrum

DKG-DGS-zertifiziert, DEGUM III-zertifiziert  
☎ Call-Center

#### Gynäkologisches Krebszentrum

DKG-zertifiziert  
**Dysplasiezentrum**  
DKG, DGGG, AGO, AG CPC-zertifiziert  
☎ Call-Center

#### Tumorboard

☎ (07071) 29-84809  
☎ (07071) 29- 5291

#### Universitäts-

#### Beckenbodenzentrum

AGUB-zertifiziert  
☎ Call-Center

#### Perinatalzentrum

Pränataldiagnostik Level I DEGUM III-zertifiziert

#### Pränataldiagnostik

☎ (07071) 29-84807

#### Kreißsaal

☎ (07071) 29-83111

#### Schwangerenambulanz

☎ (07071) 29-86250

#### Zentrum für ambulante und minimal-invasive Chirurgie

MIC III-zertifiziert  
☎ Call-Center

#### Kinderwunsch- und Endometriosezentrum

Level I-zertifiziert  
☎ (07071) 29-83117

#### Sekretariat Prof. Wallwiener

☎ (07071) 29-82246

☎ (07071) 29- 2202

#### Sekretariat Prof. Brucker

☎ (07071) 29-80791

☎ (07071) 29- 4663

#### Universitätsklinikum Tübingen

Anstalt des öffentlichen Rechts  
Sitz Tübingen  
Geissweg 3 - 72076 Tübingen  
Telefon (07071) 29-0  
www.medizin.uni-tuebingen.de  
Steuer-Nr. 86156/09402  
USt-ID: DE 146 889 674

#### Aufsichtsrat

Hartmut Schrade  
(Vorsitzender)

#### Vorstand

Prof. Dr. Michael Bamberg (Vorsitzender)  
Gabriele Sonntag (Stellv. Vorsitzende)  
Prof. Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt  
Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth  
Klaus Tischler

#### Banken

Baden-Württembergische Bank Stuttgart  
(BLZ 600 501 01) Konto-Nr. 7477 5037 93  
IBAN: DE41 6005 0101 7477 5037 93  
SWIFT-Nr.: SOLADEST600

Kreissparkasse Tübingen  
(BLZ 641 500 20) Konto-Nr. 14 144  
IBAN: DE79 6415 0020 0000 0141 44  
SWIFT-Nr.: SOLADES1TUB



Das Konzept basiert auf der Messung der fetalen Nackentransparenz (NT) und der Bestimmung der Serummarker freies beta-hCG und PAPP-A im mütterlichen Blut. Diese Parameter werden mit dem mütterlichen Altersrisiko kombiniert, so dass für die Patientin ein persönliches Risiko für das Vorliegen einer Trisomie 21 berechnet werden kann.

Die erhöhte NT ist zudem auch als Marker für andere Chromosomenstörungen bekannt. Daher wird in der Regel ab einer NT von 3,5mm zu einer Karyotypisierung mittels invasiver Diagnostik geraten, unabhängig von dem schlussendlich berechneten Risiko für Trisomie 21.

#### **Zellfreie fetale DNA**

In den vergangenen Jahren bahnt sich ein Paradigmenwechsel im Screening auf Trisomie 21 an. Ende der 1990er Jahre wurde gezeigt, dass im mütterlichen Blut freie DNA zu finden ist, die der Schwangerschaft zuzuordnen ist. Durch die Entwicklung neuer Hochdurchsatzsequenziergeräte („Next Generation Sequencing“) ist es möglich geworden, die zellfreie DNA (cfDNA) zeitnah auszuwerten, wodurch eine Beurteilung in der Schwangerschaft möglich wurde. Durch Kombination des mütterlichen Altersrisikos und der cfDNA-Analyse kann das persönliche Risiko für eine Trisomie 21 bestimmt werden. Die cfDNA-Analyse wird bereits klinisch angewendet und wird auch bei uns als IGEL-Leistung angeboten.

Die Testgüte der cfDNA-Analyse ist generell besser als die des ETS. Der vordergründig besseren Testgüte der cfDNA-Analyse stehen jedoch einige negative Aspekte gegenüber, so dass der Unterschied weniger markant erscheint. So werden bei beiden Tests unterschiedliche Schwellenwerte verwendet und die Bewertung der vorangehenden Ultraschalluntersuchung bleibt außer Acht. Zudem wird in 2% der Fälle trotz Re-Analyse kein Ergebnis bei der cfDNA-Analyse möglich. In diesen Fällen muss auf das ETS zurückgegriffen werden.

**Daher soll in der vorliegenden Studie geprüft werden, ob die cfDNA-Analyse nach vorangehendem Ausschluss von fetalen Fehlbildungen bzw. einer  $NT \geq 3,5\text{mm}$  und unter Berücksichtigung des oben beschriebenen Alternativwegs bei ergebnisloser cfDNA-Analyse und bei Verwendung des gleichen Schwellenwerts von 1:100 eine niedrigere Falsch-Positivrate wie das ETS aufweist.**

### **Ablauf der Studie**

Da die Ultraschalluntersuchung keine Auffälligkeiten ergeben haben, können Sie an der Studie teilnehmen. Dazu werden Sie zufällig in zwei Gruppen eingeteilt:

#### **Studien-Arm 1**

Bestimmung des freien beta-hCG und PAPP-As und Berechnung des Trisomie 21-Risikos mittels kombiniertem ETS wie bisher.

#### **Studien-Arm 2**

cfDNA-Analyse und Berechnung des Trisomie 21-Risikos mittels mütterlichem Altersrisiko und cfDNA. Die cfDNA-Analyse erfolgt durch die Firma Cenata, Tübingen. Zum Zeitpunkt der Blutabnahme zur cfDNA-Analyse wird ein weiteres Serumröhrchen abgenommen, zentrifugiert und in den Laborräumen der Universitäts-Frauenklinik eingefroren. Die Archivierung der Serumprobe erfolgt pseudonymisiert. Sollte die cfDNA-Analyse ergebnislos bleiben, kann die Messung des PAPP-As und beta-hCGs aus der Serumprobe erfolgen. Die Serumprobe kann nicht erst nach Abbruch der cfDNA-Analyse abgenommen werden, 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 in Anspruch nehmen kann. Die Probe wird nach Abschluss der Untersuchung verworfen, es sei denn die Patientin willigt der Archivierung im Rahmen der Biobank des Gesamtklinikums ein.

Das Risiko wird Ihnen wie bisher durch den behandelnden Arzt nach Abschluss der Risikoberechnung mitgeteilt. Wie bisher entscheiden Sie selbst entsprechend des persönlichen Risikos, ob weitere Maßnahmen (Fruchtwasserpunktion, Chorionzottenbiopsie) notwendig sind. Dabei helfen wir Ihnen gerne. Für die Studie wird das Ergebnis ab einem Risiko von 1:100 als auffällig klassifiziert.

Obwohl die cfDNA-Analyse unter normalen Umständen etwa €400-€600 kostet, entstehen Ihnen im Rahmen der Studie keine zusätzlichen Kosten.

Nach Geburt Ihres Kindes möchten wir von Ihnen wissen, ob Ihr Kind gesund zur Welt gekommen ist.

Wir möchten Ihnen zudem vor der Randomisierung, nach Abschluss des Screening-Prozesses und nach Geburt Ihres Kindes ein paar Fragen stellen, um Ihre Zufriedenheit mit dem Screening-Verfahren zu beurteilen.

Wir verpflichten uns selbstverständlich im Rahmen dieser Studie zur Wahrung der ärztlichen Schweigepflicht und gemäß dem Bundesdatenschutzgesetz zum vertraulichen Umgang mit allen erhobenen Daten. Da alle Angaben auch für die weitere Betreuung während der Schwangerschaft und der Geburt sind,

werden die Informationen wie bisher auch in unserer klinischen Datenbank gespeichert.

Die Auswertung, Weitergabe und Veröffentlichung von Daten erfolgt ausschließlich in pseudonymisierter Form, also ohne Nennung von personenidentifizierenden Daten wie Name, Geschlecht, Geburtsdatum, Adresse oder Telefonnummer.

**Verantwortliche Ärzte:**

**Prof. Dr. med. Karl Oliver Kagan**

Leitender Oberarzt Pränataldiagnostik  
Departement für Frauengesundheit Tübingen  
Calwerstraße 7  
72076 Tübingen  
Tel: +49 7071 29 82200

**PD Dr. med. Harald Abele**

Stellv. Ärztlicher Direktor Forschungsinstitut für Frauengesundheit Tübingen  
Leitender Arzt Perinatalogie  
Departement für Frauengesundheit Tübingen  
Calwerstraße 7  
72076 Tübingen  
Tel: +49 7071 29 87096

**Prof. Dr. med. Diethelm Wallwiener**

Ärztlicher Direktor  
Departement für Frauengesundheit Tübingen  
Calwerstraße 7  
72076 Tübingen  
Tel: +49 7071 29 82246

## Einverständniserklärung:

Name der Probandin:

---

Hiermit bestätige ich, dass ich über die ReFaPo-Studie aufgeklärt wurde.

Aufklärender Arzt:

---

Meine Fragen sind alle ausreichend beantwortet worden. Mir ist bewusst, dass mit meiner Teilnahme zunächst kein persönlicher Nutzen verbunden ist, wobei mir mit der Studie in jedem Fall kein Nachteil entsteht. Ich habe verstanden, dass die Universitäts-Frauenklinik nochmals im Verlauf der Schwangerschaft auf mich zukommen möchte, um mir ein paar Fragen zu stellen.

Weiterhin wurde ich darüber informiert, dass durch die Studie keinerlei Risiken und Nebenwirkungen für mich und mein Kind entstehen. Ich wurde darüber informiert, dass die Teilnahme an den Untersuchungen vollkommen freiwillig ist und dass mein Einverständnis jederzeit und ohne Angabe von Gründen oder Nachteilen widerrufen werden kann, ohne dass dadurch Nachteile für mich oder mein Kind entstehen. Ferner wurde ich darüber aufgeklärt, wie mit meinen persönlichen Daten verfahren wird.

Ich möchte an der ReFaPo-Studie zur Verbesserung des Screenings auf Trisomie 21 in der Schwangerschaft teilnehmen. Die Universitäts-Frauenklinik darf sich mit mir nach Abschluss der Schwangerschaft in Verbindung setzen und sich nach dem Outcome erkundigen?

- ja  
 nein

Die Universitäts-Frauenklinik darf mich im Verlauf der Schwangerschaft nochmals kontaktieren, um sich nach meiner Zufriedenheit zum durchgeführten Screening-Test zu erkundigen.

- ja  
 nein

---

Ort, Datum, Unterschrift

## Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsfrauenklinik Tübingen, Abteilung Pränatale Diagnostik und Medizin unter Betreuung von Prof. Dr. med. Karl Oliver Kagan durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Karl Oliver Kagan, er hat zudem das Manuskript korrigiert und Abbildung 2 zur Verfügung gestellt.

Sämtliche Untersuchungen wurden durch die Ärzte der Abteilung Pränatale Diagnostik und Medizin an der Universitätsfrauenklinik Tübingen durchgeführt, namentlich Dr. Bettina Haas, Prof. Dr. Markus Hoopmann, Prof. Dr. Karl Oliver Kagan, Dr. Sybille Lessmann-Bechle, Dr. Philipp Wagner und Dr. Britta Yazdi.

Die Datenerfassung erfolgte von mir, den oben genannten Ärzten der Abteilung Pränatale Diagnostik und Medizin an der Universitätsfrauenklinik Tübingen, sowie den weiteren Doktoranden der Abteilung Pränatale Diagnostik und Medizin an der Universitätsfrauenklinik Tübingen Herr Peter Cornelius, Herr Markus Mader, Frau Vanessa Maier und Herr Andreas Sroka.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich und in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Karl Oliver Kagan.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 15.02.2023

## Veröffentlichung

# First-trimester risk assessment based on ultrasound and cell-free DNA *vs* combined screening: a randomized controlled trial

K. O. KAGAN<sup>1</sup>®, F. SROKA<sup>1</sup>, J. SONEK<sup>2</sup>, H. ABELE<sup>1</sup>, K. LÜTHGENS<sup>3</sup>, M. SCHMID<sup>4</sup>, P. WAGNER<sup>1</sup>, S. BRUCKER<sup>1</sup>, D. WALLWIENER<sup>1</sup> and M. HOOPMANN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Women's Health, University Women's Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany; <sup>2</sup>Fetal Medicine Foundation USA, Dayton, OH, USA and Division of Maternal Fetal Medicine, Wright State University, Dayton, OH, USA; <sup>3</sup>Cenata GmbH, Tuebingen, Germany; <sup>4</sup>Roche Sequencing Solutions Inc., Ariosa Diagnostics Inc., San Jose, CA, USA

**KEYWORDS:** aneuploidy; cfDNA; first trimester; nuchal translucency; trisomy 21

### ABSTRACT

**Objective** This was a randomized controlled trial to compare risk assessment by first-trimester combined screening (FTCS) with an approach that combines a detailed ultrasound examination at 11–13 weeks' gestation and cell-free DNA (cfDNA) analysis.

**Methods** Pregnant women with a normal first-trimester ultrasound examination at 11–13 weeks' gestation (fetal nuchal translucency (NT)  $\leq 3.5$  mm and no fetal defects) were randomized into one of two groups. In the first group, risk of aneuploidy was assessed using FTCS based on the most recent UK Fetal Medicine Foundation algorithm. In the second group, risk assessment was based on ultrasound findings and cfDNA analysis. An additional tube of blood was collected for FTCS in case the cfDNA analysis was uninformative. Primary outcome was false-positive rate in screening for trisomy 21. A case was considered false positive if the karyotype was not trisomy 21 and if the risk for trisomy 21 was  $>1:100$ , irrespective of the method of risk calculation. Results were compared using 95% CIs using the Clopper–Pearson method.

**Results** Between October 2015 and December 2016, 1518 women with singleton pregnancy underwent first-trimester screening. Thirty-one (2.0%) pregnancies were not eligible for randomization due to increased NT ( $> 3.5$  mm) and/or fetal defect. After exclusion of women who declined randomization ( $n = 87$ ) and cases of fetal death and loss to follow-up ( $n = 24$ ), 688 pregnancies were randomized into the FTCS arm and 688 into the ultrasound + cfDNA analysis arm. There were no differences in maternal and gestational age, maternal weight and BMI, ethnicity, use of assisted reproduction

and cigarette smoking between the two arms. In the ultrasound + cfDNA analysis arm, median risk for trisomy 21 was 1 in 10 000. None of the cases had a risk above 1:100 (95% CI, 0.0–0.5%). In the FTCS arm, the median risk for trisomy 21 was 1 in 3787 and in 17 cases, the risk was higher than 1:100, which corresponds to 2.5% (95% CI, 1.5–3.9%) of the FTCS study-arm population.

**Conclusion** Our study has shown that first-trimester risk assessment for trisomy 21 that includes a detailed ultrasound examination as well as NT measurement and is followed by cfDNA testing is associated with a significant reduction in the false-positive rate compared with FTCS. This approach obviates the need for maternal serum free  $\beta$ -human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A in screening for fetal aneuploidy. Copyright © 2017 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd.

### INTRODUCTION

There is an ongoing debate regarding how cell-free DNA (cfDNA) screening can best be incorporated into current prenatal screening algorithms for chromosomal abnormalities. Although the test performance of cfDNA screening is better than that of first-trimester combined screening (FTCS), at present, the cost of cfDNA testing is generally deemed too high for it to be adopted as the primary method of screening<sup>1,2</sup>. In addition, FTCS includes a detailed ultrasound examination of the fetus that allows for an early detection of a significant proportion of fetal structural defects<sup>3</sup>. The combination of a detailed fetal ultrasound examination and nuchal translucency (NT) measurement also increases

Correspondence to: Prof. K. O. Kagan, University of Tuebingen, Calwerstrasse 7, 72076 Tuebingen, Germany (e-mail: kokagan@gmx.de)

Accepted: 7 September 2017

the detection rates of chromosomal abnormalities that are currently not detectable by cfDNA analysis<sup>4–8</sup>. Therefore, many see significant value in a contingent model in which FTCS serves as a triage examination for determining whether cfDNA analysis is required. Depending on the computed risk for trisomy 21 (T21) and the presence of major defects, the pregnancy is classified as at high, low or intermediate risk. The high-risk group is offered invasive testing and the low-risk group is managed expectantly. cfDNA testing is performed in the intermediate-risk group only. This approach reduces the false-positive rate (FPR) of FTCS and, depending on the applied cut-off, it can also increase the detection rate. Furthermore, it significantly decreases the number of pregnancies in which cfDNA analysis is performed. The number of cfDNA tests performed can be adjusted by changing the cut-offs used to define the various risk groups.

This contingent screening approach to cfDNA testing can be challenged in several ways. Firstly, there are still some pregnancies affected by T21 that are present in the 'low-risk' group. Those would remain unidentified if cfDNA analysis is not performed in this group<sup>2,9</sup>. Since the exclusion of the low-risk group from cfDNA analysis is based on economic considerations, this approach may become difficult to justify as the cost of cfDNA testing decreases further<sup>10</sup>. The recommendation to proceed straight to invasive diagnosis in the high-risk group is somewhat harder to contest, especially in the presence of an increased NT or fetal structural defects. This group includes a significant number of fetuses that have a chromosomal abnormality that is detectable only through invasive testing and not by cfDNA analysis<sup>4–8</sup>.

An approach in which every woman with a normal ultrasound examination at 11–13 weeks' gestation undergoes cfDNA testing for aneuploidy may be a reasonable, though less cost-effective, option. Under these circumstances, the need for biochemical markers, such as free  $\beta$ -human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG) and pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), is questionable. However, first-trimester biochemical markers may be useful in cases in which cfDNA analysis is uninformative<sup>11</sup>. In these cases, the best risk assessment would likely be based on FTCS (reflex approach), especially when a redraw of maternal blood for repeat cfDNA testing is challenging for logistical reasons. Such an approach would require storage of a serum sample at the time of the cfDNA testing since it is often too late to draw blood for maternal serum marker analysis when it becomes apparent that cfDNA analysis will not yield a result.

In this randomized controlled trial, we set out to compare the screening performance of FTCS with an approach that uses the combination of a detailed ultrasound examination and cfDNA analysis. In the latter, a combined test was performed only if cfDNA testing was uninformative. FPR was used as primary outcome parameter as, in terms of absolute numbers, this is the most crucial parameter in screening that is of major importance to physicians, health authorities and patients alike.

## METHODS

This was a randomized controlled study of women undergoing first-trimester screening, performed at the prenatal medicine department of the University of Tuebingen, Germany.

In our department, first-trimester risk assessment is performed routinely at 11–13 weeks' gestation. In addition to crown–rump length and NT measurements, it also includes a detailed ultrasound examination based on ISUOG guidelines<sup>12,13</sup>. All operators who perform this examination are certified by the UK Fetal Medicine Foundation (FMF). A specific risk for aneuploidy is not calculated if the NT measurement is  $>3.5$  mm or if a fetal anomaly is identified. These cases are deemed to be at a very high risk for chromosomal abnormalities and are offered invasive testing.

For the purposes of this study, pregnant women with a normal first-trimester ultrasound examination were randomized into two groups. In the first group, the risk of aneuploidy was assessed using FTCS (maternal and gestational age, fetal NT thickness, and maternal levels of serum PAPP-A and free  $\beta$ -hCG). The combined risk for T21 was computed based on the most recent FMF algorithm<sup>12,14–17</sup>. In the second group, risk assessment was based on ultrasound findings and cfDNA screening (US+cfDNA group).

cfDNA analysis was performed by Cenata GmbH (Tuebingen, Germany) using the Harmony® Prenatal Test (Roche/Ariosa Diagnostics, Inc., San Jose, CA, USA) as described previously<sup>18–20</sup>. In brief, chromosome-selective cfDNA analysis was performed using DANSR™ (Digital ANalysis of Selected Regions) and included a simultaneous microarray-based assay of non-polymorphic (chromosomes 13, 18, 21, X and Y) and polymorphic loci to estimate chromosome proportion and fetal fraction. The FORTE™ (Fetal fraction Optimized Risk of Trisomy Evaluation) algorithm was used to provide patient-specific risk assessments for trisomy.

In cases in which cfDNA analysis was performed, an additional tube of blood was collected in anticipation of an uninformative cfDNA testing result in a certain proportion of cases. This serum sample was centrifuged at 4000 rpm for 5 min, aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In cases in which no result was obtained by cfDNA analysis, the serum sample was thawed gently and free  $\beta$ -hCG and PAPP-A levels were measured. The risk for T21 was then computed using the FTCS method.

Irrespective of the method of risk calculation used (FTCS or US+cfDNA), an invasive test was offered to patients with risk  $>1$  in 100. This is in concordance with the guidelines of the UK National Screening Committee and the risk cut-off that the Harmony Prenatal Test uses to define a 'high-risk' result. All pregnant women and healthcare providers were informed about the risk assessment as soon as the results were available.

Exclusion criteria were maternal age  $<18$  years, CRL measurement  $>84$  mm or  $<45$  mm, and multiple

pregnancy, including vanishing twins. The clinically relevant ultrasound and screening information was recorded in the Viewpoint database (GE Healthcare, Munich, Germany). Information on maternal weight and height was extracted from patient records. Ethnicity, smoking status and mode of conception were assessed using a questionnaire and this information was also recorded in the Viewpoint database. Outcome data were added as soon as they became available. The primary-analysis population included participants for whom both the screening results and results of newborn examination or genetic testing (pre- or postnatal) were available.

Potential trial participants were given written information about the study and were counseled by a member of the perinatal medicine department staff. All women who agreed to participate in the trial provided written informed consent. Randomization was done by our local research institute in a 1:1 ratio (FTCS *vs* US+cfDNA), using computer-generated random numbers. The study was set up as an investigator-initiated trial. Approval for the study was obtained from the local ethics committee (No. 572/2015BO1). The study was registered in the International Standard Randomised Controlled Trial Number registry (ISRCTN No. 11174071).

## Statistical analysis

Power calculation was based on the assumption that, in a general population, combined screening with a 1:100 cut-off is associated with a FPR of 2.0%<sup>21</sup>. This rate is based on the maternal age distribution of England and Wales in 2011. However, in previous prospective German first-trimester studies, we have observed a higher proportion of women with advanced maternal age ( $\geq 35$  years). Therefore, FPR was estimated to be 2.5%<sup>22,23</sup>. Since fetuses with increased NT of  $> 3.5$  mm were not randomized in this study, FPR was assumed to be reduced to 1.5%.

For the US+cfDNA arm, we assumed a FPR of 0.1% and a cfDNA testing no-result rate of 3.0%. In the latter cases, we planned to estimate the risk for T21 using FTCS with a 1:100 cut-off. Thus, the final FPR in this arm was estimated to be 0.13%, an increase of 0.03%. To demonstrate a significant difference between the FPRs in the two study arms with a power of 80% and a significance level of 0.05, we estimated that we needed 674 women in each study arm.

The primary focus of the study, FPR in first-trimester screening for T21, was analyzed by comparing 95% CI

**Table 1** Ultrasound findings in 31 pregnancies excluded from study due to increased nuchal translucency (NT) ( $> 3.5$  mm) and/or presence of fetal defect

Karyotype	CRL (mm)	NT (mm)	Fetal defect
T21	55.6	4.5	—
T21	66.5	9.3	—
T21	61.8	3.7	—
T21	53.8	3.9	Cardiac defect
T21	72.5	3.7	Cardiac defect
T21	70.2	3.2	Agenesis of ductus venosus
T21	73.3	1.9	Cardiac defect
T18	60.0	1.4	Spinal defect, cardiac defect
T13	55.5	6.0	Cardiac defect, polydactyly
T13	79.5	3.5	Cardiac defect, polydactyly, facial cleft
Monosomy X	46.0	3.5	Cardiac defect
Triploidy	46.0	3.5	Cardiac defect, abnormal posterior fossa, bilateral hydrothorax, echogenic kidneys, abnormal hands
Normal	58.0	6.6	Noonan syndrome
Normal	68.7	4.2	Cornelia de Lange syndrome: radius aplasia, abnormal hand, cleft palate
Normal	67.5	1.5	Roberts syndrome, phocomelia
Normal	53.2	5.2	Body-stalk anomaly
Normal	48.3	6.9	Diaphragmatic hernia, facial cleft
Normal	72.2	3.1	Diaphragmatic hernia, retrognathia
Normal	66.0	4.0	Cardiac defect
Normal	65.2	2.8	Cardiac defect
Normal	84.0	4.8	Occipital encephalocele
Normal	57.2	6.5	Unexplained fetal hydrops
Normal	83.7	2.3	Obstructive uropathy
Normal	65.8	3.2	Obstructive uropathy
Normal	63.2	2.8	Thoracic cyst
Normal	61.1	1.8	Mesenteric cyst
Normal	66.5	9.3	—
Normal	65.4	3.6	—
Normal	62.6	3.6	—
Normal	53.1	4.3	—
Normal	71.6	3.6	—

CRL, crown-rump length; T13, trisomy 13; T18, trisomy 18; T21, trisomy 21.



using the Clopper–Pearson method and by chi-square test. The FPR for FTCS was calculated as a crude rate but then also adjusted based on the maternal age distribution in Germany in 2015<sup>24</sup>. Median maternal age in this population is 31.0 (interquartile range 27.0–35.0) years and 25.9% of women are 35 years and older. An adjustment for maternal age was not necessary for the cfDNA results as the calculated risk was 1:10 000 or less in 99.0%. Maternal and pregnancy characteristics were compared by Mann–Whitney *U*-test for continuous variables and by chi-square test for categorical variables. *P*-value was assessed at the two-sided significance level of 5%.

## RESULTS

Between October 2015 and December 2016, 1518 women with singleton pregnancy underwent first-trimester screening. Thirty-one (2.0%) pregnancies were not eligible for randomization due to increased NT (> 3.5 mm) and/or fetal defect (Table 1). During the study period, there were seven pregnancies with T21. This is concordant with the expected number of cases based on the maternal age distribution of the study population (expected number and 95% prediction interval 6.8 (1.6–11.9)). All seven of these cases were detected based on increased NT and/or fetal defects. Furthermore, the fetuses with trisomy 18 (T18) and trisomy 13 (T13) were also identified by the

first-trimester ultrasound examination. Thus, our study population did not include fetuses with any of these three trisomies.

Eighty-seven (5.9%) women declined randomization. Out of the remaining 1400 women, 699 were randomized into the FTCS arm and 701 into the US+cfDNA arm. In 24 (1.7%) cases, it was not possible to obtain an outcome, due to either loss to follow-up or a subsequent miscarriage or intrauterine death. Thus, our study population consisted of 688 pregnancies in each group (Figure 1).

Maternal characteristics of the study population are summarized in Table 2. In both groups, median maternal age was 33.9 years and median gestational age at the time of randomization was 12.7 weeks. There were no differences with respect to maternal and gestational age, maternal weight and BMI, ethnicity, use of assisted reproduction, and cigarette smoking between the two arms.

In the US+cfDNA arm, median delta NT was 0.0 mm. The distribution of NT measurements is shown in Figure 2. Median fetal fraction was 12.5%. cfDNA testing was uninformative in 10 (1.5%) cases (Table 3). The risk in these cases was established by FTCS. Median risk for T21 in the US+cfDNA group was 1 in 10 000. None of the cases had a risk for T21, T18 or T13 above 1:100 (95% CI, 0.0–0.5%). The distribution of risk for T21 is shown in Figure 3 and Table 4.

In the FTCS arm, the median values for delta NT, free  $\beta$ -hCG and PAPP-A were 0.0 mm, 0.96 multiples

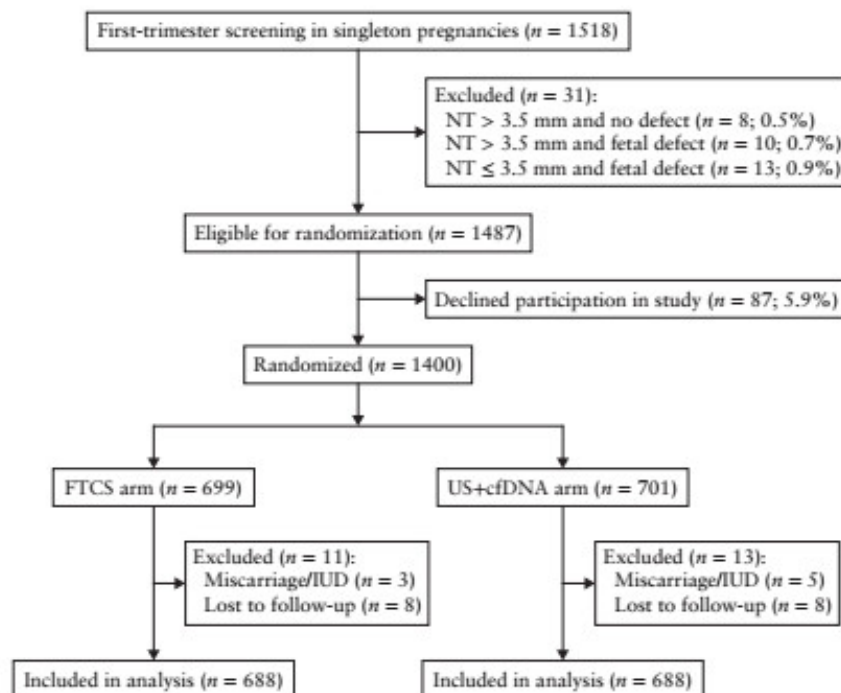


Figure 1 Flowchart showing inclusion of study population and randomization to first-trimester screening for trisomy 21 by first-trimester combined screening (FTCS) or combination of ultrasound examination and cell-free DNA testing (US+cfDNA). IUD, intrauterine death; NT, nuchal translucency thickness.

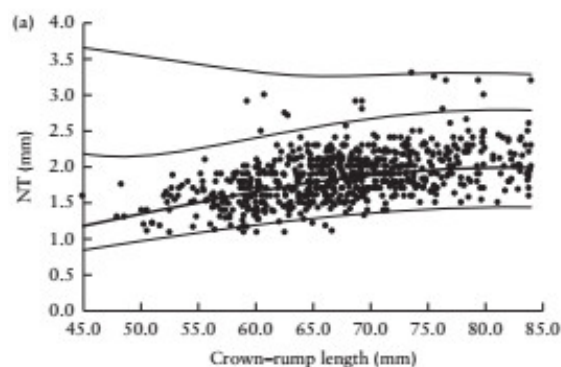
of the median (MoM) and 1.11 MoM, respectively (Table 3). The distribution of risk for T21 is shown in Figure 3. Median risk for T21 was 1 in 3787, and in 17 cases, the risk was higher than 1:100 (Table 4). This corresponds to 2.5% (95% CI, 1.5–3.9%) of the FTCS study-arm population, which is significantly greater than the risk in the US+cfDNA arm (chi-square test,  $P < 0.0001$ ). After standardization for maternal age distribution in Germany, the risk would have been above 1:100 in 15 (2.2% (95% CI, 1.2–3.6%)) pregnancies ( $P < 0.0001$ ).

In the FTCS group, 6 (35.3%) of the 17 women with high risk for T21 opted for invasive testing, and nine (52.9%) for additional cfDNA analysis. Two (11.8%) women decided against any further evaluation. There were six low-risk women in the FTCS group who also elected to have invasive testing, bringing the total number of women who underwent invasive testing to 12 (1.7%) in the FTCS arm. In contrast, in the US+cfDNA group, only two (0.3%) women underwent invasive testing. In all cases, the decision was based on the personal risk for trisomy or personal choice as there were no fetal defects in this group.

**Table 2** Characteristics of 1376 women randomized to first-trimester screening for trisomy 21 by first-trimester combined screening (FTCS) or combination of ultrasound examination and cell-free DNA analysis (US+cfDNA)

Characteristic	FTCS (n = 688)	US+cfDNA (n = 688)	P
Maternal age (years)	33.9 (30.7–36.7)	33.9 (31.0–36.8)	0.498
Gestational age (weeks)	12.7 (12.3–13.1)	12.7 (12.4–13.1)	0.296
Maternal weight (kg)	66.0 (59.1–74.3)	65.4 (59.0–73.7)	0.260
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	23.4 (21.2–26.6)	23.4 (21.2–26.1)	0.596
Caucasian ethnicity	676 (98.3)	672 (97.7)	0.445
Cigarette smoking	23 (3.3)	19 (2.8)	0.531
Assisted reproduction	29 (4.2)	44 (6.4)	0.090

Data are given as n (%) or median (interquartile range).



## DISCUSSION

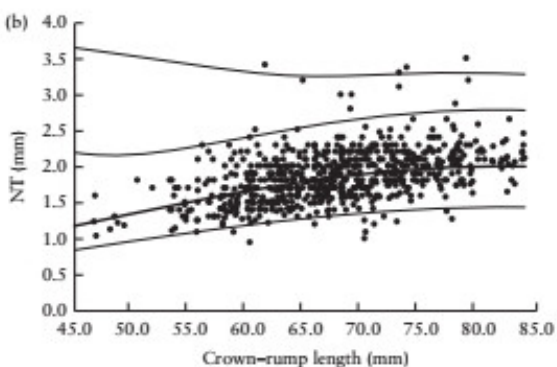
### Main findings

In this study, we have shown that, in screening for T21, a policy that is based on a detailed ultrasound examination at 11–13 weeks' gestation, followed by a cfDNA analysis and FTCS in cases with uninformative cfDNA testing, has a significantly lower FPR than has conventional FTCS. In the US+cfDNA group, there were no false-positive cases, while the age-adjusted FPR in the FTCS group was 2.5%. Our study was specifically designed to compare FPRs between two different screening approaches and not their detection rates. However, all T21 fetuses were identified by a detailed ultrasound examination.

**Table 3** Risk parameters in first-trimester screening for trisomy 21 based on first-trimester combined screening (FTCS) or combination of ultrasound examination and cell-free DNA analysis (US+cfDNA)

Risk parameter	FTCS (n = 688)	US+cfDNA (n = 688)
Maternal age (years)	33.9 (30.7 to 36.7)	33.9 (31.0 to 36.8)
CRL (mm)	67.6 (62.6 to 72.9)	67.7 (62.7 to 72.8)
NT (mm)	1.9 (1.6 to 2.1)	1.8 (1.6 to 2.1)
Delta NT (mm)	0.0 (–0.2 to 0.2)	0.0 (–0.2 to 0.2)
Free β-hCG (MoM)	0.96 (0.64 to 1.44)	—
PAPP-A (MoM)	1.11 (0.76 to 1.51)	—
Fetal fraction	—	12.5 (9.8 to 16.0)
Failed cfDNA tests*	—	10 (1.5)
Free β-hCG in uninformative cfDNA tests (MoM)	—	0.66 (0.37 to 0.90)
PAPP-A in uninformative cfDNA tests (MoM)	—	0.73 (0.67 to 1.23)

Data are given as n (%) or median (interquartile range). \*Risk in these cases was established by subsequent FTCS, β-hCG, β-human chorionic gonadotropin; CRL, crown–rump length; MoM, multiples of the median; NT, nuchal translucency thickness; PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein A.



**Figure 2** Distribution of nuchal translucency thickness (NT) measurements in women randomized to first-trimester screening for trisomy 21 by first-trimester combined screening (a) and those randomized to screening by combination of ultrasound examination and cell-free DNA testing (b). Lines represent 5<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, 95<sup>th</sup> and 99<sup>th</sup> centiles.

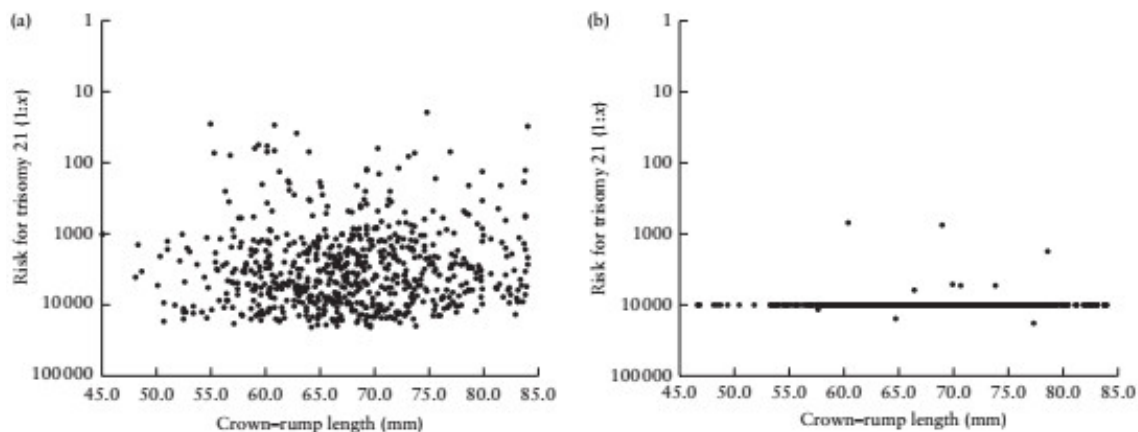


Figure 3 Distribution of risk for trisomy 21 in women randomized to first-trimester screening for trisomy 21 by first-trimester combined screening (a) or combination of ultrasound and cell-free DNA testing (b).

Table 4 Risk distribution in first-trimester screening for trisomy 21 (T21) based on first-trimester combined screening (FTCS) or combination of ultrasound examination and cell-free DNA analysis (US+cfDNA)

	FTCS (n = 688)	US+cfDNA (n = 688)
Median risk for T21	1 in 3787 (1605–8280)	1 in 10 000 (10 000–10 000)
T21 risk > 1:100	17 (2.5)	0 (0)
T21 risk 1:100 to 1:999	79 (11.5)	2 (0.3)
T21 risk 1:1000 to 1:4999	302 (43.9)	1 (0.1)
T21 risk 1:5000 to 1:9999	163 (23.7)	4 (0.6)
T21 risk ≤ 1:10 000	127 (18.5)	681 (99.0)

Data are given as median (interquartile range) or n (%).

#### Comparison with previous studies

There is an ongoing discussion regarding whether cfDNA testing should be offered as first-line screening or as part of a contingent model in which cfDNA analysis is restricted to a group of patients selected based on their previous screening results<sup>25,26</sup>.

The advantage of the first approach lies in its screening performance for T21, which is better than that of any other screening method<sup>1,10</sup>. However, disadvantages of a cfDNA-only approach include that no anatomical assessment of the fetus takes place and that in about 2% of cases the test fails quality metrics and no risk can be computed after the first blood draw<sup>11</sup>. Additionally, current costs of cfDNA analysis have been considered prohibitive in implementing it as a first-line screening test.

Nicolaides *et al.* estimated that using FTCS as primary screening for T21 and performing cfDNA testing for pregnant women with a risk of > 1:3000, the detection and screen-positive rates would be 97% and 0.4%, respectively<sup>27</sup>. Similarly, in the RAPID study, all patients with a risk for T21 ≥ 1 in 1000 based on either FTCS or a quadruple screening test were offered cfDNA analysis.

In those with risk ≥ 1:150, invasive testing was also offered. The results were in line with those predicted by mathematical modeling<sup>28</sup>.

Miltoft *et al.*<sup>29</sup> reported on 6449 women who underwent combined screening for T21. In this study, women with a risk of ≥ 1:1000 underwent cfDNA testing. The authors then compared conventional combined screening with referral for invasive testing at a risk ≥ 1 in 300 with a contingent screening model in which cfDNA screening was offered to those with a risk between 1 in 100 and 1 in 1000. While the detection rate was 100% in both groups, the FPR was reduced significantly from 3% with conventional combined screening to 1.2% with the contingent policy<sup>29</sup>.

The decision to offer cfDNA testing to women in the intermediate-risk group or to all except those in the high-risk group is usually primarily based on financial rather than clinical considerations<sup>30</sup>. However, this is likely to be a temporary limitation as the price of cfDNA testing has been decreasing since its introduction and is expected to continue to do so. Even though limiting cfDNA analysis to the intermediate-risk group offers a high detection rate, approximately 1.5–5% of T21 pregnancies remain in the low-risk group<sup>2,27,31–33</sup>. Therefore, the only way that a 99% detection rate for T21 would be realized, as is possible with a primary cfDNA testing approach, would be not to restrict cfDNA analysis to a small subpopulation. However, our data suggest that such a primary cfDNA testing approach may come with a significant disadvantage if ultrasound is omitted from first-trimester screening.

One could argue that, if first-trimester aneuploidy screening does not involve maternal serum markers, there would be a significant loss in the detection of other chromosomal abnormalities. Abnormal serum marker levels may be useful in identification of rare chromosomal abnormalities but much less so than for the common trisomies<sup>34</sup>. However, our results suggest that a detailed first-trimester ultrasound examination followed by

cfDNA testing in the majority of the population leads to a low FPR and allows for an excellent detection rate of common and rare chromosomal abnormalities as well as fetal structural anomalies. This approach obviates the need for maternal serum free  $\beta$ -hCG and PAPP-A measurements.

Apart from screening for fetal aneuploidy, one can argue that screening for pre-eclampsia is an essential part of first-trimester pregnancy assessment and therefore maternal serum markers cannot be omitted from any protocol<sup>35,36</sup>. O’Gorman *et al.* demonstrated, however, that at a 10% FPR, first-trimester screening for early and late pre-eclampsia (< 37 and > 37 weeks’ gestation) without the serum markers PAPP-A or placental growth factor (PIGF) results in only a slightly lower detection rate than is obtained with inclusion of these serum markers<sup>37</sup>. If screening for pre-eclampsia without biomarkers were to reach the same detection rate, the cut-off that defines the high-risk group could be lowered.

### Limitations of the study

We acknowledge that our study is confined to a single specialized center. The identification of defects in this study was facilitated by expertise in ultrasound examination that may not be available everywhere. However, our first-trimester ultrasound protocol follows ISUOG recommendations<sup>13</sup> and thus should be generally reproducible.

Thirty-one (2.0%) pregnancies were excluded before randomization due to an increased NT measurement of > 3.5 and/or due to fetal anomaly. This group contained all seven cases with T21. Although other fetal problems were identified in the majority of the remaining 24 cases, in screening for T21 specifically, these belonged to the ‘false-positive group’. If all non-T21 cases contained within this group were included in the calculations, the FPR in screening for T21 would increase by about 1.5%, irrespective of whether biochemical markers or cfDNA analysis was used.

### Conclusion

Our study has shown that first-trimester screening for T21 that includes a detailed ultrasound examination as well as NT measurement and is followed by cfDNA testing is associated with a significant reduction in the FPR compared with conventional FTCS. This approach obviates the need for maternal serum free  $\beta$ -hCG and PAPP-A measurements in screening for fetal aneuploidy.

### ACKNOWLEDGMENTS

Cenata GmbH (Tübingen, Germany) performed the cfDNA analysis. Roche/Ariosa Diagnostics, Inc. (San Jose, CA, USA) provided the kits for the Harmony® Prenatal Test.

### Disclosure

M.S. is an employee of Roche Sequencing Solutions Inc.

### REFERENCES

- Gal MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 50: 302–314.
- Santorum M, Wright D, Syngelaki A, Karagiorgi N, Nicolaides KH. Accuracy of first-trimester combined test in screening for trisomies 21, 18 and 13. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 49: 714–720.
- Syngelaki A, Choleman T, Dagkln T, Allan L, Nicolaides KH. Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11–13 weeks. *Prenat Diagn* 2011; 31: 90–102.
- Syngelaki A, Pergament E, Homfray T, Akolekar R, Nicolaides KH. Replacing the combined test by cell-free DNA testing in screening for trisomies 21, 18 and 13: impact on the diagnosis of other chromosomal abnormalities. *Fetal Diagn Ther* 2014; 35: 174–184.
- Norton ME, Baer RJ, Wapner RJ, Kuppermann M, Jelliffe-Pawloski LL, Carrier RJ. Cell-free DNA vs sequential screening for the detection of fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214: 727.e1–727.e6.
- Evans MI, Wright DA, Pergament E, Cuckle HS, Nicolaides KH. Digital PCR for noninvasive detection of aneuploidy: power analysis equations for feasibility. *Fetal Diagn Ther* 2012; 31: 244–247.
- Grande M, Jansen FAR, Blumenfeld YJ, Fisher A, Odibo AO, Haak MC, Borrell A. Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 46: 650–658.
- Maya I, Yacobson S, Kahana S, Yeshaya J, Tenne T, Agnon-Fishman I, Cohen-Vig I, Shohat M, Basel-Vanagaitte L, Shorony R. Cut-off value for normal nuchal translucency evaluated by chromosomal microarray analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 50: 332–335.
- Kagan KO, Wright D, Baker A, Sahota D, Nicolaides KH. 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* 2008; 31: 618–624.
- Norton ME, Jacobson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Bar H, Tomlinson MW, Pereira L, Spitz JL, Holleman D, Cuckle H, Musci TJ, Wapner RJ. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med* 2015; 372: 1589–1597.
- Gezi FR, Kagan KO. Rate of no result in cell-free DNA testing and its influence on test performance metrics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 50: 134–137.
- Wright D, Kagan KO, Molina FS, Gazzoni A, Nicolaides KH. A mixture model of nuchal translucency thickness in screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 376–383.
- Salomon LJ, Alfrevic Z, Bardo CM, Chalouhi GE, Ghi T, Kagan KO, Lau TK, Papageorgiou AT, Raine-Fenning NJ, Stirrenmann J, Suresh S, Tabor A, Timor-Tritsch IE, Toi A, Yeo G. ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41: 102–113.
- Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. Estimating a woman’s risk of having a pregnancy associated with Down’s syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol* 1987; 94: 387–402.
- Sajders BJ, Sundberg K, Holgreve W, Henry G, Nicolaides KH. Maternal age and gestation-specific risk for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999; 13: 167–170.
- Kagan KO, Wright D, Spencer K, Molina FS, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 493–502.
- Nicolaides KH, Syngelaki A, Poon LC, Gal MM, Wright D. First-trimester contingent screening for trisomies 21, 18 and 13 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Fetal Diagn Ther* 2014; 35: 185–192.
- Juncau K, Bogard PE, Huang S, Mohseni M, Wang ET, Rytkin P, Kingsley C, Struble CA, Oliphant A, Zahn JM. Microarray-based cell-free DNA analysis improves noninvasive prenatal testing. *Fetal Diagn Ther* 2014; 36: 282–286.
- Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barret W, Stokowski R, McBride C, Zahn J, Lee K, Shen N, Doshi J, Sun M, Garrison J, Sandler J, Holleman D, Pattee P, Tomita-Mitchell A, Mitchell M, Stuelpmagel J, Song K, Oliphant A. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 2012; 32: 3–9.
- Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. 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* 2012; 206: 319.e1–319.e9.
- Wright D, Syngelaki A, Bradbury I, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomies 21, 18 and 13 by ultrasound and biochemical testing. *Fetal Diagn Ther* 2014; 35: 118–126.
- Wagner P, Sonek J, Klein J, Hoopmann M, Abele H, Kagan KO. First-trimester ultrasound screening for trisomy 21 based on maternal age, fetal nuchal translucency, and different methods of ductus venosus assessment. *Prenat Diagn* 2017; 37: 680–685.
- Abele H, Wagner P, Sonek J, Hoopmann M, Brucker S, Artunc-Ulkumen B, Kagan KO. First trimester ultrasound screening for Down syndrome based on maternal age, fetal nuchal translucency and different combinations of the additional markers nasal bone, tricuspid and ductus venosus flow. *Prenat Diagn* 2015; 35: 1182–1186.
- Statistisches Bundesamt. Maternal age distribution at birth in Germany 2015. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Gesellschaft/Staat/Bevoelkerung/Geburten/Tabellen/GeburtenMutterBiologischesAlter.html> [Accessed 1 July 2017].
- Oepkes D, Bartha JL, Schmid M, Yaron Y. Benefits of contingent screening vs primary screening by cell-free DNA testing: think again. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; 47: 542–545.

26. Salomon LJ, Alfirevic Z, Audibert F, Kagan KO, Paladini D, Yeo G, Raine-Fenning N. ISUOG updated consensus statement on the impact of cfDNA aneuploidy testing on screening policies and prenatal ultrasound practice. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 49: 815–816.
27. Nicolaides KH, Wright D, Poon LC, Syngelaki A, Gil MM. First-trimester contingent screening for trisomy 21 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 42: 41–50.
28. Chitty LS, Wright D, Hill M, Verhoef TL, Daley R, Lewis C, Mason S, McKay F, Jenkins L, Howarth A, Cameron L, McEwan A, Fisher J, Kroese M, Morris S. Uptake, outcomes, and costs of implementing non-invasive prenatal testing for Down's syndrome into NHS maternity care: prospective cohort study in eight diverse maternity units. *BMJ* 2016; 354: i3426.
29. Miihlt CR, Rode L, Ekelund CK, Sundberg K, Kjaergaard S, Zingenberg H, Taber A. Contingent first-trimester screening for aneuploidies with cell-free DNA in a Danish clinical setting. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018; 51: 470–479.
30. Cuckle H, Benn P, Pergament E. Maternal cfDNA screening for Down syndrome – a cost sensitivity analysis. *Prenat Diagn* 2013; 33: 636–642.
31. Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K, Fiolola S, Falcon O. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; 25: 221–226.
32. Kagan KO, Etcheagaray A, Zhou Y, Wright D, Nicolaides KH. Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 34: 14–18.
33. Kagan KO, Hoopmann M, Hammer R, Stressig R, Kozłowski P. Screening for chromosomal abnormalities by first trimester combined screening and noninvasive prenatal testing. *Ultraschall Med* 2015; 36: 40–46.
34. Tørring N, Petersen OB, Becher N, Vogel I, Ulldbjerg N. First trimester screening for other trisomies than trisomy 21, 18, and 13. *Prenat Diagn* 2015; 35: 612–619.
35. Rolnik DL, Wright D, Poon LC, O'Gorman N, Syngelaki A, de Paco Matallana C, Akolekar R, Cicero S, Janga D, Singh M, Molina FS, Persico N, Jani JC, Plasencia W, Papaiannou G, Tenenbaum-Gavish K, Meiri H, Gizraron S, Maclagan K, Nicolaides KH. Aspirin versus placebo in pregnancies at high risk for preterm preeclampsia. *N Engl J Med* 2017; 377: 613–622.
36. Kagan KO, Sonck J, Wagner P, Hoopmann M. Principles of first trimester screening in the age of non-invasive prenatal diagnostic screening for other major defects and pregnancy complications. *Arch Gynecol Obstet* 2017; 31: 3–9.
37. O'Gorman N, Wright D, Syngelaki A, Akolekar R, Wright A, Poon LC, Nicolaides KH. Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 11–13 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214: 103.e1–12.

## Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Karl Oliver Kagan für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas danken. Die hervorragende Betreuung mit ausführlichen Diskussionen zu dem Thema, freundliche Hilfe bei allen aufkommenden Problemen und Unterstützung bei der Erarbeitung des Themas über die gesamte Dauer mit viel Geduld habe ich sehr geschätzt und trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Mit seiner Expertise zu dem Thema wies er mir wiederholt die richtige Richtung. Besonders möchte ich mich auch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, auch über die Zeit der Studie hinaus, sowie den immensen Freiheiten in der Arbeitsplatzgestaltung bedanken, da ich dies nicht als selbstverständlich erachte.

Auch möchte ich allen weiteren Mitarbeitern der Abteilung für Pränatal Diagnostik der Universitätsfrauenklinik Tübingen aus diesem Zeitraum danken. Der freundlich-herzliche, kollegiale Umgang in der Abteilung machte das Arbeiten, auch mit mitgebrachtem Nachwuchs, leicht. Jederzeit konnte ich mich mit allen Fragen direkt an jemanden aus diesem großartigen Team wenden.

Den anderen Mitdoktoranden, Herr Peter Cornelius, Herr Markus Mader, Frau Vanessa Maier und Herr Andreas Sroka möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Absprache danken. Diese erleichterte die Datenerfassung deutlich.

Meiner besten Freundin Frau Heike Müller möchte ich für die strukturelle Hilfe durch Setzung und Überprüfung von Etappenzielen bei den Schreibarbeiten danken.

Ganz besonders möchte ich meinem Ehemann Andreas Sroka danken. Sein liebevoller Ansporn und das Ermöglichen von Freiräumen, ermöglichte mir erst die Fertigstellung dieser Arbeit. Die Kraft, die ich durch dich und unsere wunderbaren Kinder beziehe, haben mich durchhalten lassen.