

# Noninvasiv prænatal test er et gennembrud inden for prænatal screening

Louise Stig Hornstrup<sup>1</sup>, Louise Ambye<sup>2</sup>, Steen Sørensen<sup>2</sup> & Finn Stener Jørgensen<sup>1</sup>

## STATUSARTIKEL

1) Ultralydklinikken, Gynækologisk Obstetrisk Afdeling, Hvidovre Hospital  
2) Klinisk Biokemisk Afdeling, Hvidovre Hospital

Ugeskr Læger  
2015;177:V09140465

Den genteknologiske udvikling har i de seneste år gjort det muligt at undersøge et fosters kromosomer ud fra en blodprøve fra den gravide kvinde [1], hvilket er et gennembrud inden for prænatal screening. Allerede i 1969 fandt man føtale celler i moderens blod [2], og i 1997 fandt man cirkulerende fragmenteret cellefrit føtalt DNA, som stammede fra placenta, i det materielle blod [3, 4]. Cellefrit føtalt DNA udgør ca. 10% af det totale frie DNA i moderens perifere blod ved en gestationsalder på ca. 10 uger [5]. Dette materiale har vist sig at være meget velegnet til prænatal screening [1, 4]. Frit føtalt DNA elimineres meget hurtigt og er forsvundet fra moderens blod 1-2 dage post partum, hvilket betyder, at man ikke risikerer interferens med frit føtalt DNA fra en tidligere graviditet [4]. I bl.a. USA har man siden 2011 kunnet tilbyde kvinder med høj risiko for at få et barn med bl.a. Downs syndrom (trisomi 21) screening ved undersøgelse af cellefrit føtalt DNA [6]. Testen bliver udbudt af private laboratorier, og i flere andre lande – herunder Danmark – er der igangsat initiativer med henblik på snarlig ibrugtagning af metoden. Det er dog ikke fuldt afklaret, hvilken gruppe af gravide kvinder der bør tilbydes denne noninvasive prænatale test (NIPT), eller hvordan man med metoden bedst kan supplere de eksisterende screeningstilbud.

Formålet med denne artikel er at beskrive de mest brugte teknikker til anvendelse af cellefrit føtalt DNA til screening for kromosomafvigelse. Ydermere vil vi diskutere den mulige fremtidige anvendelse af NIPT i relation til det eksisterende prænatale screeningsprogram i Danmark.

## NUVÆRENDE PRÆNATAL SCREENING I FØRSTE TRIMESTER I DANMARK

I Danmark tilbydes alle gravide screening for kromosomanomalier i form af en måling af den frie  $\beta$ -kæde af humant choriongonadotropin (hCG $\beta$ ) og *pregnancy associated plasma protein-A* (PAPP-A) i den gravide kvindes blod ved en gestationsalder på 8-14 uger (doubletesten) og en ultralydskanning med måling af fosterets nakkefold ved en gestationsalder på 11-14 uger. Der foretages en risikoberegning ud fra moderens alder, nakkefoldens tykkelse og doubletesten. Hvis man ved denne undersøgelse påviser, at kvinden

har en forhøjet risiko for at være gravid med et foster med trisomi 21 (Downs syndrom), trisomi 18 (Edwards syndrom) eller trisomi 13 (Patau syndrom), tilbydes hun en invasiv diagnostisk undersøgelse i form af en moderkageprøve (chorion villus-sampling) ved en gestationsalder på 11-14 uger eller en fostervandsprøve (amniocentese) fra fulde 15 ugers gestationsalder. Ulempen ved de to invasive teknikker er en procedurerelateret abortrisiko på 0,5-1% [7]. Den nuværende screening har en forholdsvis høj *screen-positiv rate* (ca. 5%) og en høj falsk negativ rate (ca. 10%) [7]. Der udføres i Danmark mere end 2.000 invasive procedurer hvert år, uden at fostrene har kromosomfejl [8]. Ca. 10% af de gravide får ikke foretaget screeningsundersøgelsen i første trimester. I Danmark fødes der hvert år ca. 20 børn med Downs syndrom.

## DNA-TEKNIKKER TIL NONINVASIV PRÆNATAL TEST

Som beskrevet i indledningen kan cellefrit DNA isoleres fra det materielle blod, og DNA'et kan benyttes til analyse allerede fra en gestationsalder på syv uger [9]. Oftest venter man dog til uge 10 for at undgå falsk negative test, idet fraktionen af cellefrit føtalt DNA stiger med stigende gestationsalder [10].

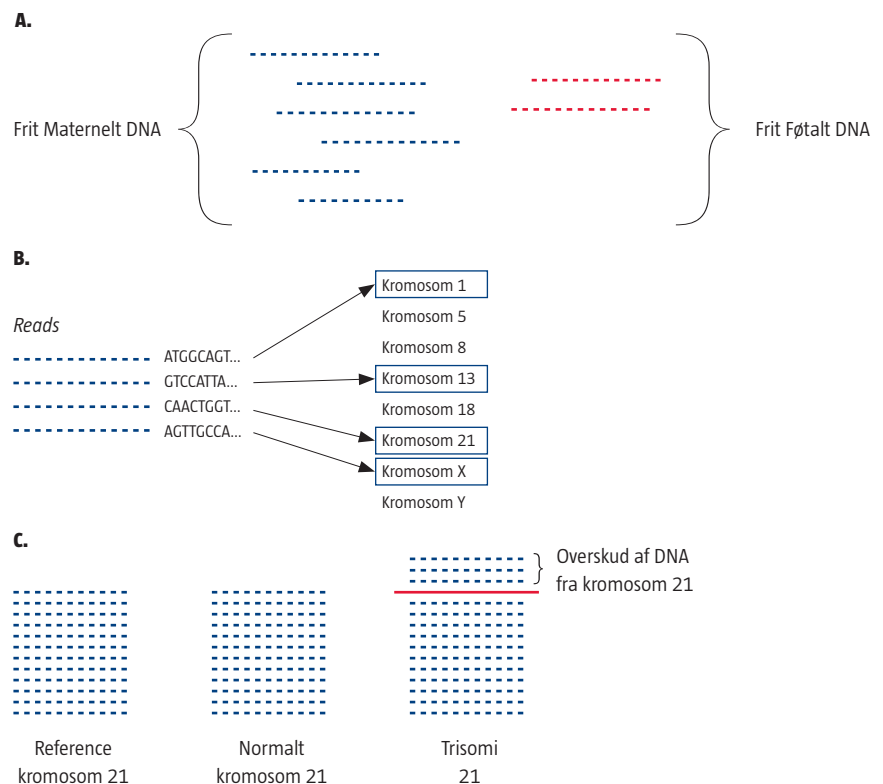
Selve testen bygger på *next generation sequencing* [1, 4], hvor man opformerer millioner af mindre stykker DNA, som er isoleret fra blodet (**Figur 1**).

Dernæst bestemmes den præcise rækkefølge af baserne i DNA'et, også kaldet sekventering. Alle disse stykker af DNA-basepar – såkaldte *reads* – sammenlignes med et humant referencegenom (det samlede genmateriale fra et menneske), og pga. den unikke rækkefølge af basepar sorteres DNA-stykkerne svarende til de forskellige kromosomer. Antallet af *reads* for hvert kromosom sammenholdes med det antal, man finder hos en gravid kvinde med et foster med normal kromosombesætning, og hvis antallet af *reads* for et bestemt kromosom overstiger det normale – f.eks. for kromosom 21 – tyder det på overskydende kromosommateriale.

Det er vigtigt at kende fraktionen af frit føtalt cirkulerende DNA. Er fraktionen for lille, vil det ikke være muligt at detektere stigningen i antallet af *reads* for det pågældende kromosom. En forklarende grund

FIGUR 1

*Next generation sequencing*/noninvasiv prænatal test-eksempel på detektion af trisomi 21. **A.** Ca. 10% af frit cirkulerende DNA i det materielle blod er cellefrit, føtalt DNA (markeret med rød). **B.** En blodprøve fra den gravide tages, DNA'et oprenses, og millioner af mindre DNA-stykker – såkaldte *reads* – opformeres og sekventeres (den eksakte baserækkefølge bestemmes). Bioinformatik benyttes til at placere *reads* korrekt (*mapping*) i forhold til kromosomerne fra et human referencegenom. **C.** Antallet af *reads* tælles for udvalgte sekvenser. I det viste eksempel er der yderst til højre overskydende DNA-materiale svarende til kromosom 21, der indikerer, at fosteret har trisomi 21.



til en for lille fraktion er overvægt hos den gravide, ligesom rygning og etnicitet kan influere på niveauet [11]. Kromosom 21 udgør 1,5% af det humane genom. Hvis den føtale fraktion af frit cirkulerende DNA udgør 10%, vil DNA fra kromosom 21 stige til ca. 1,58% i graviditeter med trisomi 21. Denne lille stigning kan påvises med *next generation sequencing*-teknologien [1].

Der er principielt to forskellige sekventeringsteknikker: *massively parallel shotgun sequencing* (MPSS), hvor man benytter sekventering, således at hele genomet repræsenteres, og *targeted sequencing*, hvor der specifikt sekventeres bestemte regioner af interesse i genomet. For at opnå et validt resultat kræves der for begge teknikker, at genmaterialet dækkes af et minimum af sekventerings-*reads*. Med MPSS-teknikken kræves der 20-25 mio. *reads* fra hele genomet, for at analysen for trisomi 21 er pålidelig [1]. På nuværende tidspunkt udgør de kromosomer, som primært undersøges ved NIPT (trisomi 21, 18 og 13) kun en lille del af den totale MPSS-datamængde. Alligevel foretrækkes MPSS til screening for trisomi. Dette skyldes, at man forventer, at MPSS på sigt vil kunne anvendes til undersøgelse for andre former for kromosomale abnormiteter (store insertioner og deletioner). Sammenlignes laboratorie- og analysetid med

pris pr. prøve for henholdsvis *targeted sequencing* og MPSS, er der ikke den store forskel. Pris pr. prøve i offentligt regi vil formentlig blive på ca. 5.000 kr. og analysetiden være ca. en uge. Pris og svartid forventes begge at falde.

#### ANVENDELSE AF NONINVASIV PRÆNATAL TEST TIL SCREENING

Som tidligere nævnt anvendes NIPT primært med henblik på screening for autosomale trisomier (trisomi 21, 18 og 13). Teknikken kan ligeledes anvendes til screening for kønskromosomaneuploidier som Klinefelters syndrom (47, XXY) og Turners syndrom (45, X) [12], men med en dårligere detektionsrate. Fosterets køn kan også bestemmes ved denne metode, idet tilstedeværelsen af genmateriale fra Y-kromosomet i moderens blod vil betyde, at hun bærer på en dreng. Dette kan have klinisk betydning ved arvelige kønsbundne sygdomme, eksempelvis Duchennes muskeldystrofi [13]. Teknikken forventes snart at kunne benyttes til detektion af arvelige sygdomme, hvor faderen bærer en sygdomsfremkaldende mutation [14]. Endvidere er der inden for de seneste par år rapporteret om succesfuld brug af teknikken til detektion af recessive sygdomme [14] og til sekventering af hele fosterets genom [15, 16]. Disse analyser er dog

TABEL 1

Oversigt over første trimester-test til prænatal screening.

	Maternelt alder + doubletest + nakkefoldsskanning (kombineret screening)	Noninvasiv prænatal test på cellefrit føtalt DNA
Tidspunkt for test, uger	8-14	≥ 10
Procedure	Maternelt blod + ultralydsskanning	Maternelt blod
Risiko for foster	Ingen	Ingen
Detektionsrate, %	Ca. 90 <sup>a</sup> for trisomi 21 [7]	99,2 for trisomi 21 [21]
Falsk positiv rate, %	Ca. 5 for trisomi 21 [7]	0,09 for trisomi 21 [21]

a) Inklusive efterfølgende invasiv test til højrisikogruppen.

TABEL 2

Testkarakteristika for noninvasiv prænatal test til screening for trisomier og kønskromosomaneuploidier.

	Trisomi 21	Trisomi 18	Trisomi 13	Turners syndrom (45,X)	Andre kønskromosomaneuploidier	Reference
Detektionsrate, %	99,2	96,3	91,0	90,3	93,0	[21]
Falsk positiv rate, %	0,09	0,13	0,13	0,23	0,14	[21]

vanskeligere, idet de kræver mere avanceret bioinformatik og en højere sekventeringskapacitet, men de kan formentlig blive klinisk mulige i fremtiden.

Der er gennem de senere år udført en del større studier, hvor man har evalueret NIPT til screening for trisomier. I hovedparten af disse studier har man testet kvinder, som har haft en høj risiko for, at der hos fosteret var kromosomale aneuploidier (høj alder, positiv screening vha. serologi/skanning eller tidligere graviditet med aneuploidi) [4], men der er for nylig publiceret studier, hvori der også er inkluderet kvinder med lav risiko for aneuploidier, dvs. en standardscreeningspopulation [6, 17-20]. I en metaanalyse af Gil *et al* er resultaterne af studier fra perioden januar 2011-januar 2015 af NIPT til screening for trisomi 21, 18 og 13 samt kønskromosom aneuploidier sammenfattet [21]. Detektionsraten for trisomi 21 var 99,2%, og falsk positiv raten var 0,09% (Tabel 1). Detektionsraterne for trisomi 18 og 13 var henholdsvis 96,3% og 91,0%, og tilsvarende falske positive rater henholdsvis 0,13% og 0,13% (Tabel 2). Detektionsraten for Turners syndrom var 90,3% (falsk positiv rate 0,23%) og for andre kønskromosomaneuploidier 93,0% (falsk positiv rate 0,14%). Der findes endnu kun få studier, hvori man har undersøgt testens værdi hos tvillinger, men det tyder på, at detektionsraten for trisomi 21 er noget lavere i tvillingegraviditeter end i singletongraviditeter [21].

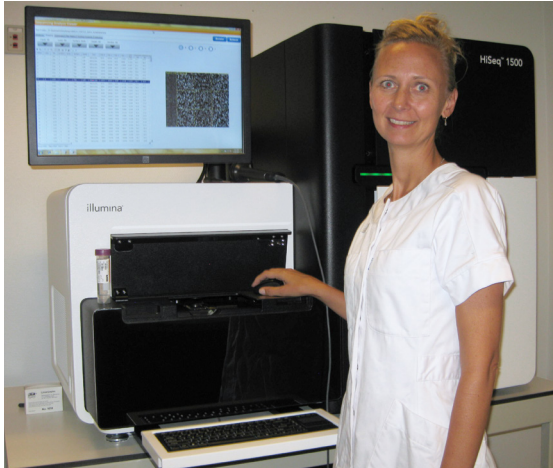
Analysen er mest robust til screening for trisomi 21, hvilket kan hænge sammen med, at basesammensætningen (især GC-indholdet), kromosomstørrelsen og antallet af repetitive DNA-sekvenser varierer for de forskellige kromosomer [22]. Desuden er de fleste trisomi 21-fostre meiotisk opstået, og *confined placental mosaicism* (placentamosaicisme) for trisomi 21 er sjælden. Placentamosaicisme kan generelt udgøre et problem ved NIPT. Ved denne tilstand har fosteret et normalt antal kromosomer, men en procentdel af cellerne i placenta har trisomi, hvilket kan medføre et falsk positivt svar ved NIPT.

### IMPLEMENTERING AF NONINVASIV PRÆNATAL TEST I DEN PRÆNATALE SCREENING OG STATUS I DANMARK

Det er endnu ikke afgjort, hvorledes denne nye screeningsmetode kan indføres i det eksisterende screeningsprogram. Den nuværende første trimester-screening, der også inkluderer en nakkefoldsskanning, giver nogle flere kliniske informationer og mulighed for tidligt at påvise andre lidelser eller misdannelser, hvilket ikke er muligt med NIPT alene. NIPT er for nuværende kun anvendelig til screening for trisomier, og et abnormt resultat skal følges op med en diagnostisk, invasiv test [23]. Det er vigtigt, at den gravide rådgives om dette, og om at testen kan være falsk positiv eller falsk negativ. I et nyligt publiceret dansk studie har man undersøgt, hvor mange genetiske anomalier ud over trisomier man ville have overset, hvis man kun havde udført NIPT i stedet for den nuværende screening [8]. Over en fireårsperiode i Danmark blev 193.638 gravide screenet, og heraf fik 10.205 (5,3%) udført en invasiv test på baggrund af alder, doubletest og nakkefoldsskanning. Ud af disse havde 1.122 (11%) fostre genetiske anomalier, hvoraf igen 262 (23,4%) ikke ville være blevet påvist med NIPT, idet de ikke var trisomier. De »atypiske« anomalier var særligt hyppige blandt kvinder over 45 år, ved nakkefoldstykkelse  $\geq 3,5$  mm eller ved abnorme niveauer af hCG $\beta$  eller PAPP-A. Forfatterne konkluderede på baggrund af dette, at NIPT på nuværende tidspunkt vil være uegnet som eneste screeningstest til alle gravide og ikke bør anvendes ved graviditeter, hvor risikoen ved den nuværende screening er meget høj ( $> 1:100$ ). En diagnostisk invasiv test vil fortsat være det bedste tilbud til disse gravide. En mulighed kunne være at tilbyde NIPT til de kvinder, der har en intermediær risiko for trisomier i det nuværende screeningsprogram (f.eks. 1:300 til 1:1.000), en gruppe, der i dag ikke tilbydes yderligere undersøgelser. Endelig kunne NIPT tilbydes til de kvinder, der har en høj risiko ved den kombinerede screening, men som ikke ønsker en invasiv procedure. Det er i denne situation vigtigt at informere

FIGUR 2

Next generation sequencing-apparatur fra Illumina på Hvidovre Hospital.



om, at NIPT ikke er en diagnostisk test som de nuværende undersøgelser (kromosomundersøgelse og *array*-CGH). Den for tiden faldende pris for NIPT vil formentlig betyde, at man på et tidspunkt vil overveje at tilbyde NIPT til alle gravide som supplement til de nuværende undersøgelser.

Foreløbig bliver screening for autosomale trisomier (trisomi 21, 18 og 13) med NIPT-teknikken ikke udført på danske laboratorier, men på flere private fertilitets- og ultralydklinikker i Danmark tilbyder man NIPT, hvor selve analysen foretages på laboratorier i udlandet. Flere initiativer, der kan bane vejen for indførelse af testen i Danmark, er på vej, bl.a. på Hvidovre Hospital (Figur 2).

## KONKLUSION OG PERSPEKTIV

NIPT på cellefrit føtalt DNA i moderens blod er et gennembrud inden for prænatal screening og vil uden tvivl blive implementeret i det danske screeningstilbud for trisomier. Teknikken har endvidere potentiale til i fremtiden at kunne benyttes til undersøgelse for andre genetiske lidelser. I studier har man fastslået, at NIPT har en høj detektionsrate i forbindelse med screening for særligt trisomi 21. Det er dog vigtigt at informere den gravide om, at NIPT ikke er en diagnostisk test, og hvis resultatet indikerer, at fosteret har trisomi, skal testen følges op af en invasiv prøve.

## FAKTABOKS

Den aktuelle prænatale screening for trisomier i Danmark i første trimester er baseret på en doubletest (blodprøve, hvor *pregnancy associated plasma protein-A* (PAPP-A) og den frie  $\beta$ -kæde af humant choriogonadotropin (hCG $\beta$ ) måles) kombineret med en nakkefoldsskanning. Risikoen for specielt trisomi 21 (Downs syndrom) kan beregnes på grundlag af kvindens alder, doubletesten og størrelsen af fosterets nakkefold.

Detektionsraten for trisomi 21 med det nuværende screeningsprogram er ca. 90%, med en falsk positiv rate på ca. 5%. Der udføres årligt ca. 2.800 invasive procedurer i Danmark på baggrund af dette.

Noninvasiv prænatal test (NIPT) foretages på fragmenteret frit føtalt DNA, der cirkulerer i den gravides blod.

Cellefrit føtalt DNA udgør ca. 10% af det totale frie DNA i moderens perifere blod ved en gestationsalder på ca. ti uger.

Fremskridt inden for genteknologi og bioinformatik har muliggjort udvikling af meget præcise og sensitive metoder (*next generation sequencing*), der kan differentiere ændringer i det føtalt DNA på trods af prøvens store mængde DNA fra moderen.

Teknikken benyttes for nuværende primært til screening for trisomi 21, 18 og 13, men er ligeledes anvendelig til kønskromosomaneu-ploidier, dog med en ringere detektionsrate.

Detektionsraten for trisomi 21 med NIPT er i flere udenlandske studier rapporteret at være ca. 99%, med en falsk positiv rate under 0,1%.

Det er vigtigt at informere den gravide om begrænsninger ved testen, herunder at den kan være falsk negativ eller falsk positiv, og at et abnormt resultat skal følges op af en diagnostisk invasiv test.

## SUMMARY

Louise Stig Hornstrup, Louise Ambye, Steen Sørensen  
& Finn Stener Jørgensen:

Non-invasive prenatal testing is a breakthrough  
in prenatal screening

Ugeskr Læger 2015;177:V09140465

Non-invasive prenatal testing (NIPT) using cell-free fetal DNA from the peripheral blood of the pregnant woman has become a possibility within recent years, but is not yet implemented in Denmark. NIPT has proven to be very efficient in the screening for especially trisomi 21. This article summarizes the basics behind the most used NIPT techniques and describes which genetic conditions this method may detect. Finally, the future aspects of implementing NIPT in the prenatal screening programme in Denmark are discussed.

**KORRESPONDANCE:** Louise Stig Hornstrup, Gynækologisk Obstetriske Afdeling, Hvidovre Hospital, Kettegård Allé 30, 2650 Hvidovre.  
E-mail: louisehornstrup@hotmail.com

**ANTAGET:** 15. april 2015

**PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK:** 6. juli 2015

**INTERESSEKONFLIKTER:** Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

## LITTERATUR

1. Norwitz ER, Levy B. Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Rev Obstet Gynecol* 2013;6:48-62.

2. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969;1:1119-22.
3. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
4. Liao GJ, Gronowski AM, Zhao Z. Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation. *Clin Chim Acta* 2014;428:44-50.
5. Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2008;54:1664-72.
6. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014;370:799-808.
7. Føtodbasen. National årsrapport 2013. [www.dfms.dk](http://www.dfms.dk) (1. sep 2014).
8. Petersen OB, Vogel I, Ekelund C et al. Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: population-based study from a country with existing first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;43:265-71.
9. Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA et al. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011;306:627-36.
10. Lo YM, Tein MS, Lau TK et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-75.
11. Poon LC, Musci T, Song K et al. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagn Ther* 2013;33:215-23.
12. Hooks J, Wolfberg AJ, Wang ET et al. Non-invasive risk assessment of fetal sex chromosome aneuploidy through directed analysis and incorporation of fetal fraction. *Prenat Diagn* 2014;34:496-9.
13. Finning KM, Chitty LS. Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:69-75.
14. Bustamante-Aragones A, Rodriguez de AM, Perlado S et al. Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders from maternal blood. *Gene* 2012;504:144-9.
15. Lo YM, Chan KC, Sun H et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2010;2:61ra91.
16. Fan HC, Gu W, Wang J et al. Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature* 2012;487:320-4.
17. Lau TK, Chan MK, Lo PS et al. Clinical utility of noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test – early experience. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25:1856-9.
18. Nicolaidis KH, Syngelaki A, Ashoor G et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:374-6.
19. Fairbrother G, Johnson S, Musci TJ et al. Clinical experience of noninvasive prenatal testing with cell-free DNA for fetal trisomies 21, 18, and 13, in a general screening population. *Prenat Diagn* 2013;33:580-3.
20. Song Y, Liu C, Qi H et al. Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat Diagn* 2013;33:700-6.
21. Gil MM, Quezada MS, Revello R et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:249-66.
22. Chen EZ, Chiu RW, Sun H et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One* 2011;6:e21791.
23. Committee Opinion No. 545. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2012;120:1532-4.