Nicht invasive Chromosomendiagnostik aus maternalem Blut: Möglichkeiten und Grenzen

PD Dr. rer. nat. Markus Stumm
Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik Kudamm-199
stumm@kudamm-199.de

lifecodexx

Nicht invasive Diagnostik - Warum?

- 35 Jahre alte Patientin 13+1 SSW

- First Trimester Screening:
  NT 1,8 mm, free ß-hCG 2,96 MoM, PAPP-A 0,71 MoM
  Trisomie 21 Risiko 1:41
- Second Trimester Quadruple-Test:
  hCG 3,1 MoM, Inhibin A 3,12 MoM
  Trisomie 21 Risiko >1:10

- Amniozentese: 46,XY
- **Blasensprung und Abort!!!**

lifecodexx

Das aktuelle Dilemma

- Nicht invasive Risiskoberechnung
  - kein zusätzliches Abortrisiko
  - hohes Risiko für falsch positive oder falsch negative Ergebnisse (5-10%)
- Invasive genetische Diagnostik
  - zusätzliches Abortrisiko (0.5-1.0%)
  - geringes Risiko für falsch positive oder falsch negative Ergebnisse (<1%)

lifecodexx

Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik Kudamm-199

lifecodexx

Grundlagen für die NIPD von Aneuploidien

- I

m mütterlichen Blut zirkulierende zellfreie fetale DNA (cffDNA)

- N

achweis cffDNA-Fragmente im mütterlichen Serum und Plasma

Eigenschaften der cffDNA:

- Trophoblasten (Plazenta)
- kurze Fragmente < 300bp
- ab 4.SSW detektierbar
- Anteil zwischen 2-40%
- Halbwertszeit von ~ 15 Min.
- 2 Std. nach Geburt nicht mehr nachweisbar

- N

ext Generation Sequencing (NGS) -Technologie ist seit ca. 5 Jahren verfügbar

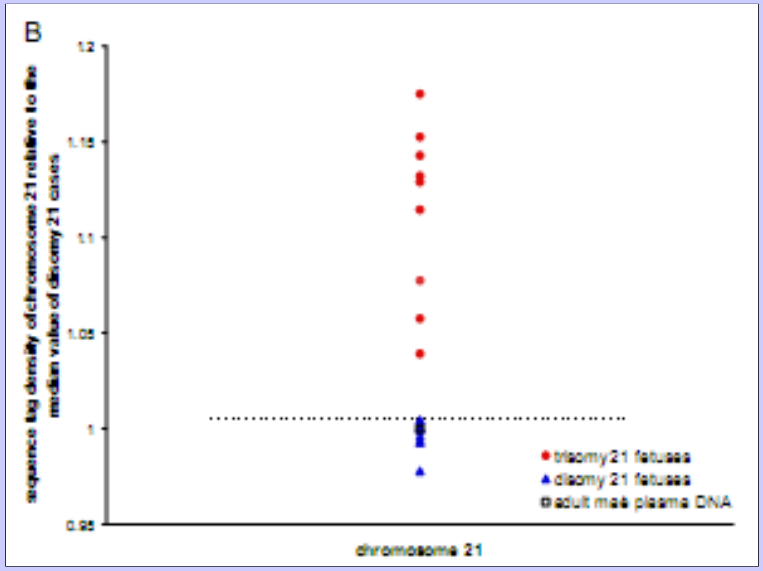
lifecodexx

Albig . Becker . Bürger . Entezami . Fuchs . Hagen . Knoll . Lange . Stumm . Wegner

NGS für nicht-invasiven Nachweis fetaler Aneuploidien

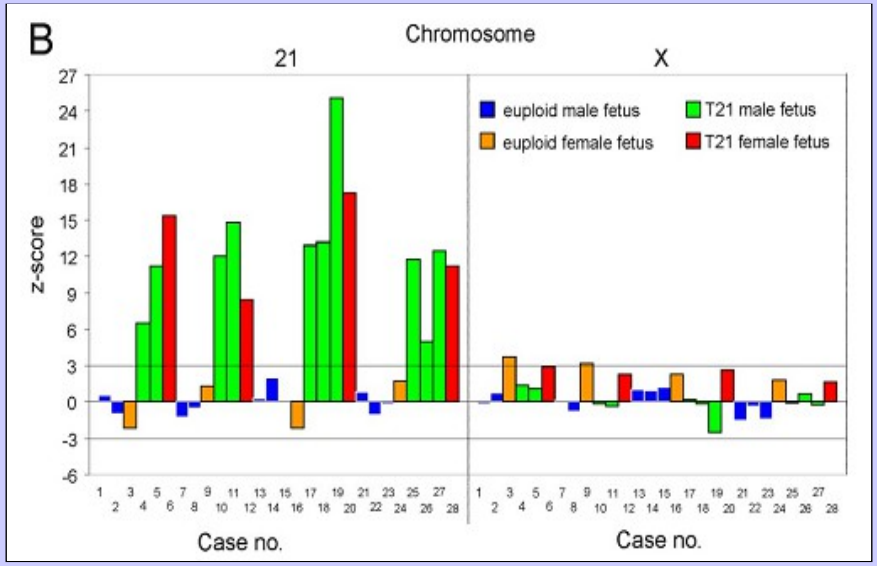
Proof of concept Studien

Fan et al. *PNAS* 2008



cffDNA von 18 Schwangeren
6/6 Euploid
9/9 Trisomie 21
1/1 Trisomie 13
2/2 Trisomie 18

Chiu et al. *PNAS* 2008



cffDNA von 18 Schwangeren
14/14 Euploid
14/14 Trisomie 21

100% Sensitivität und Spezifität

lifecodexx

FuE – Technologie I

Blutabnahme

Gewinnung von Plasma

Extraktion zellfreier DNA

Erstellung einer Bibliothek

Amplifizierung/Quantifizierung Bibliothek

⇩

Next-Gen Sequenzierung

lifecodexx

FuE – Technologie II

Bio-IT: Datenanalyse

Chiu et al. PNAS 2008

z-score > 3 = Trisomie 21

lifecodexx

Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik Kudamm-199

FuE – Bioinformatische Auswertung

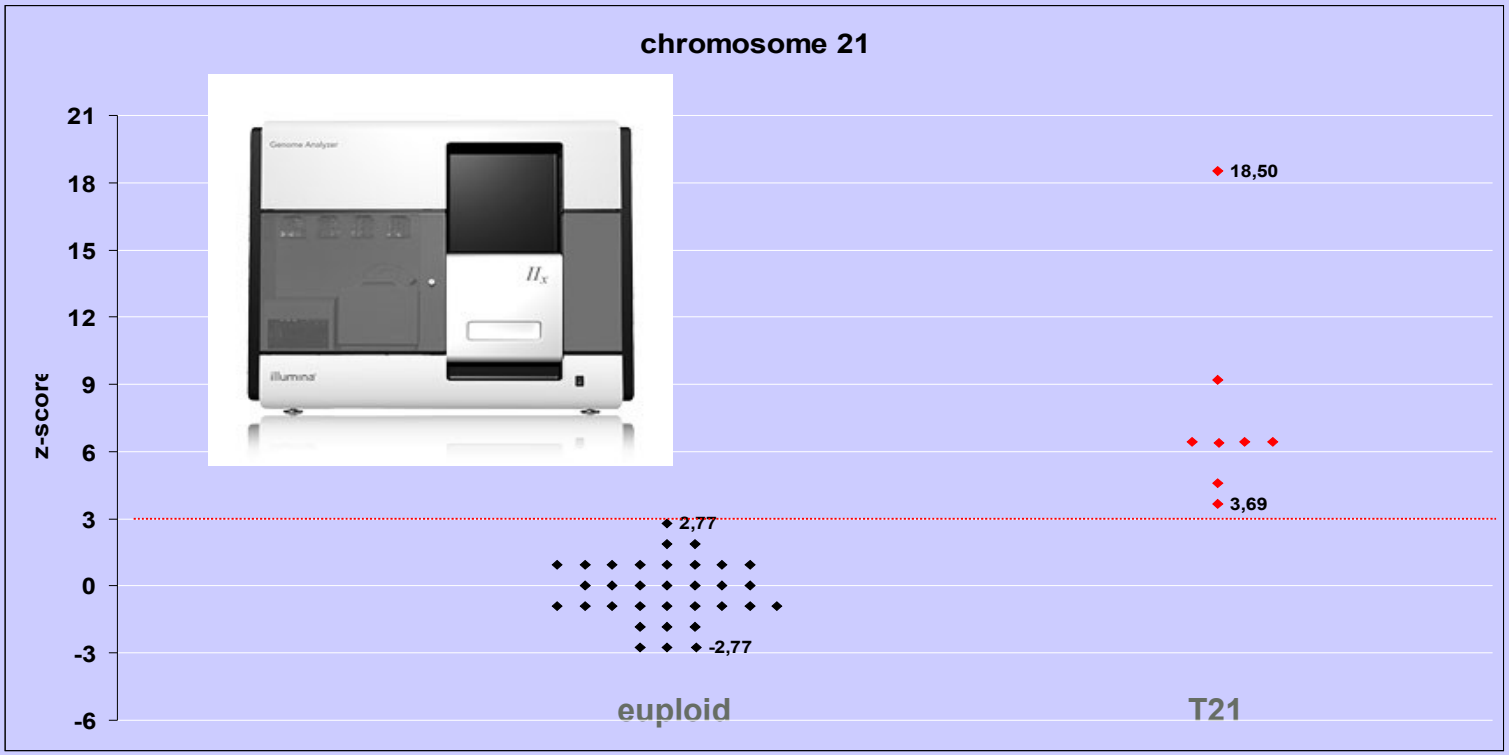
Pro Probe (Single-Read Sequencing) werden:

- **14.215.466 Mill. 36b-reads erzeugt**
- **6.050.212 unique matched reads gegen hg 18**
- **5.624.965 unique matched reads ohne mismatch (UMR-0mm)**
- **für Chromosom 21 (euploid): 71.473 UMR-0mm**
- **%chr21 (euploid): 1,25% vs. %chr21 (T21): 1,32%**

Differenz Euploidie versus Trisomie 21 = 0,07%

lifecodexx

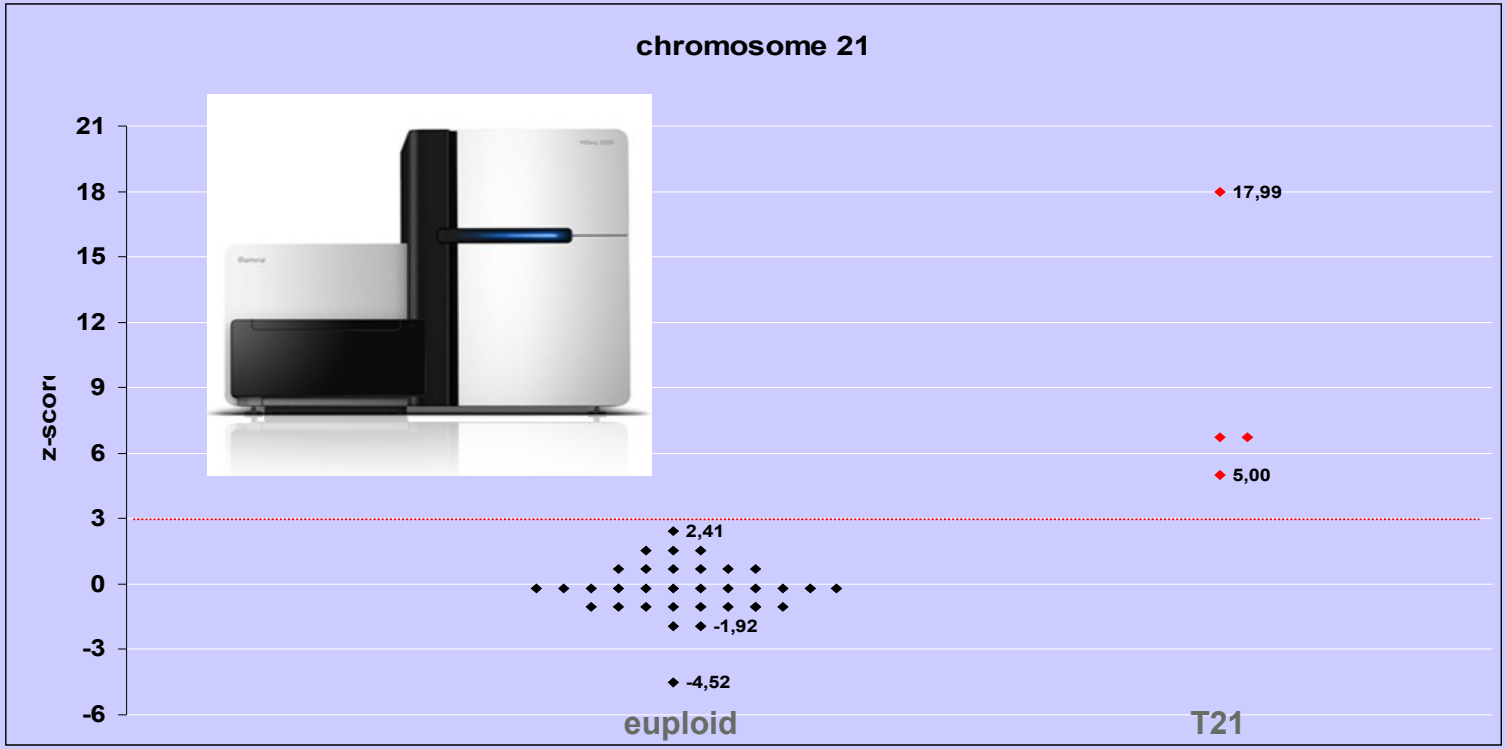
Nachweis T21 mittels GAIIx-Sequenziergerät



- 42 Proben sequenziert (Anzahl reads: 14.461.145, UMR-0mm: 5.583.713)
- alle (8) T21-Proben korrekt identifieziert; z-score>3

lifecodexx

Nachweis T21 mittels HiSeq2000-Sequenziergerät



- 38 Proben mit QC: >10 x10^6 reads; Anzahl reads: 15.026.828; UMR-0mm: 5.397.409
- alle (4) T21-Proben korrekt nachgewiesen; z-score>3

lifecodexx

Studies	Lifecodexx 2010	Lifecodexx 2011	LifeCodexx 2012
Patients	42	38	500
Sensitivity	100%	100%	aim: 100%
Specifity	100%	100%	aim: 99%
Inclusion criteria	increased risk patients phlebotomy after invasive procedure full karyotyping	increases risk patients phlebotomy after invasive procedure full Karyotyping	increased risk patients Phlebotomy **prior** invasive procedure full karyotyping
Sample collection	5-10 ml EDTA-blood 2-4 ml plasma	10 ml EDTA-blood >3,5 ml plasma	**10 ml Streck** >3,5 ml plasma
DNA extraction	QIAmp circulating nucleic acid Kit	QIAmp circulating nucleic acid Kit	QIAmp circulating nucleic acid Kit
Sequencing	GAIIX; 2-plexing	HiSeq; 4-plexing	HiSeq 2000, 5-plexing
Bio-IT analysis	z-score: =/>3 - T21 hg18, repeat-masked UMR-0MM	z-score: =/>3 - T21 hg 18, repeat-masked UMR-0mm	z-score: =/>3 - T21 hg18, repeat-masked UMR-0mm
References	42 euploid	27 euploid	15+ euploid
QC	2,3 Mill. Reads	5 Mill. reads	10 Mill. reads

lifecodexx

Multi-center Study Probenrekrutierung abgeschlossen

Characteristics	Palomaki 2011	Ehrich 2011	Chiu 2011	Sehnert 2011
Multiplexing	4-plex	4-plex	2-plex[1]	NR
Down syndrome (N)	212	39	86	13
Euploid / non-Down syndrome	1,484	410	146	34
Illumina Platform	HiSeq 2000	GAIIx	GAIIx	GAIIx
Performed in CLIA laboratory	Yes	No	No	No
Simulate Practice?	Yes	No	No	No
Flow cells	76	>15	> 16	NR
Study Population	N Amer, S Amer, Europe, Australia	US	Hong Kong, Netherlands, UK	US
Gestational age in weeks (mean, range)	15 (8 – 22)	16 (8 – 36)	13 (NR)	15 (10-28)
Trimester 1st/2nd (%)	50/50	NR	88/12	58/42
Failures (n/N, %)	13/1696 (<1)	18/467 (3.9)	11/764 (1.4)	0/47
Detection Rate (%)	209/ 212 (98.6)	39/39 (100)	86/86 (100)	13/13 (100)
False Positive rate (%)	3/1471 (0.2)	1/410 (0.2)	3/146 (2.1)	0/34 (0)
Throughput (samples / week)	250	NR	NR	NR
Required volume	>3.5 mL	> 3.5 mL	>2 mL	~4 mL[3]
Available 2nd sample	Yes	No	No	Yes
Fetal fraction estimated	All	All	Males only	NR
Turn-around time[2] (days)	8.8[4]	10[5]	NR	NR

lifecodexx

Nicht invasive Diagnostik - Warum?

- 35 Jahre alte Patientin 13+1 SSW

- First Trimester Screening:
  NT 1,8 mm, free ß-hCG 2,96 MoM, PAPP-A 0,71 MoM
  Trisomie 21 Risiko 1:41
- Nicht invasive Pränataldiagnostik:
  Unauffälliger Befund für Chromosom 21

  Kontrollultraschall im 2. Trimester:
  Unauffälliger Befund
- **Verzicht auf invasive Diagnostik**

lifecodexx

Nicht invasive Diagnostik - Wann?

- **Angebot für Schwangere mit erhöhtem Risiko für Trisomie 21; mit Erweiterungsoption für T13 und T18**
- **Ergänzung zur bisherigen nicht-invasiven Risikoabschätzung (Erstrimesterscreening)**
- **Bei auffälligem Erstrimesterscreening und unauffälligem Test: Entlastung der Schwangeren, Kontrollultraschall im 2. Trimester**
- **Bei unauffälligem 2. Ultraschall und unauffälligem Testergebnis: Weitere Entlastung der Schwangeren, Verzicht auf invasive Pränataldiagnostik**
- **Bei auffälligem Erstrimesterscreening und auffälligem Testergebnis: Empfehlung einer invasiven Pränataldiagnostik zur Sicherung der Diagnose**

Zusammenfassung

- **Massively Parallel Sequencing (MPS) = sehr präzise und robuste Methode für den nicht-invasiven Nachweis einer Trisomie 21**
- **MPS ist anwendbar in Verbindung mit anderen nicht-invasiven PND-Methoden**
- **Schwangere mit erhöhtem Risiko für eine Trisomie 21 können von der Untersuchungsmethode profitieren**
- **Invasive pränatale Eingriffe können deutlich reduziert werden**
- **Damit würde dann auch die Rate der eingriffbedingten Fehlgeburten sinken**

Chiu *et al.* 2011 BMJ

„ … trisomy 21 among high risk pregnancies. If referrals for amniocentesis or chorionic villus sampling were based on the sequencing test results, about 98% of the invasive diagnostic procedures could be avoided. „

Palomaki *et al.* 2011 Genetics in Medicine

„ … yet be considered diagnostic. However, offering MPSS testing to women already at high risk for Down syndrome can reduce procedure-related losses by up to 96%, while maintaining high detection. Confirmation by invasive testing is still needed. This …

lifecodexx

Ausblick – Nachweis anderer Trisomien

Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik Kudamm-199

lifecodexx

Albig . Becker . Bürger . Entezami . Fuchs . Hagen . Knoll . Lange . Stumm . Wegner

Anwendung unterschiedlicher Algorithmen

Spezifische Algorithmen können die Test Sensitivität und Spezifität erhöhen

Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik Kudamm-199

lifecodexx

Albig . Becker . Bürger . Entezami . Fuchs . Hagen . Knoll . Lange . Stumm . Wegner

Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik Kudamm-199

Anwendung von Target Enrichment Systemen

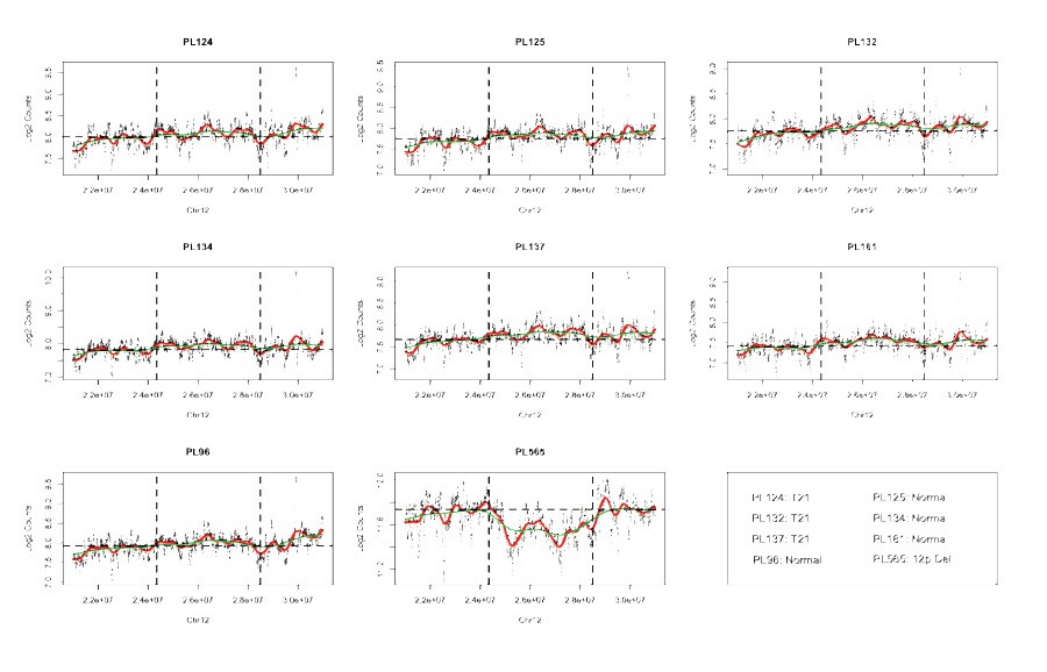
Spezifische Sequenzanreicherungen ermöglichen die Detektion anderer Trisomien

Nachweis einer Trisomie 13

lifecodexx

Noninvasive Prenatal Diagnosis of a Fetal Microdeletion Syndrome

N ENGL J MED 365;19 NEJM.ORG NOVEMBER 10, 2011



lifecodexx

Ausblick - Kostenreduktion

lifecodexx

Albig . Becker . Bürger . Entezami . Fuchs . Hagen . Knoll . Lange . Stumm . Wegner

DANSR-Assay
Digital ANalysis of Selected Regions

ABSTRACT

Objective To develop a novel prenatal assay based on selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal Trisomy 21 (T21) and Trisomy 18 (T18).

Methods Two hundred ninety-eight pregnancies, including 39 T21 and seven T18 confirmed fetal aneuploidies, were analyzed using a novel, highly multiplexed assay, termed digital analysis of selected regions (DANSR™). Cell-free DNA from maternal blood samples was analyzed using DANSR assays for loci on chromosomes 21 and 18. Products from 96 separate patients were pooled and sequenced together. A standard *Z*-test of chromosomal proportions was used to distinguish aneuploid samples from average-risk pregnancy samples. DANSR aneuploidy discrimination was evaluated at various sequence depths.

Results At the lowest sequencing depth, corresponding to 204 000 sequencing counts per sample, average-risk cases where distinguished from T21 and T18 cases, with *Z* statistics for all cases exceeding 3.6. Increasing the sequencing depth to 410 000 counts per sample substantially improved separation of aneuploid and average-risk cases. A further increase to 620 000 counts per sample resulted in only marginal improvement. This depth of sequencing represents less than 5% of that required by massively parallel shotgun sequencing approaches.

Conclusion Digital analysis of selected regions enables highly accurate, cost efficient, and scalable noninvasive fetal aneuploidy assessment. © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

lifecodexx

PCR templates via intervening bridge oligo: Selektive Analyse von je 384 Loci auf Chromosom 18 und Chromosom 21

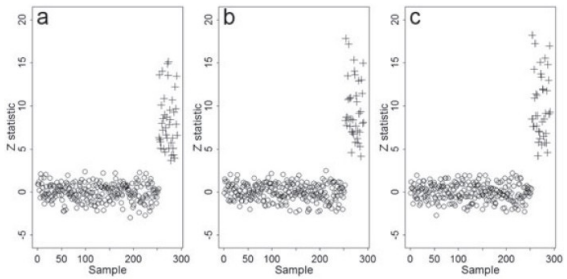


Figure 3 T21 Z statistics at various median per-sample counts. At each median per-sample count, the average-risk samples (open circles) were normally distributed around zero, while the T21 samples (crosses) were at least three standard deviations away. The separation distance was calculated by taking the difference (in Z statistic) between the 5th percentile of the affected samples and the 95th percentile of the average-risk samples. When the median per-sample count was 204 000 (a), the separation distance between average-risk and T21 samples was 4.2. When the median per-sample count was increased to 410 000 (b) and 620 000 (c), the resulting separation distances increased to 5.2 and 5.4, respectively

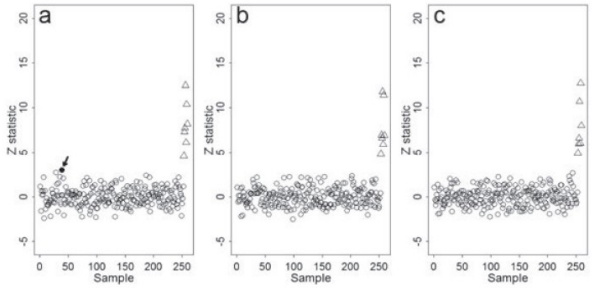


Figure 4 T18 Z statistics at various median per-sample counts. At a median per-sample count of 204 000 (a), the separation distance between average-risk samples (open circles) and T18 samples (triangles) was 4.9. When the median per-sample count was increased to 410 000 (b) and 620 000(c), the separation distances were both 5.2. When the median per-sample count was 204 000, one average-risk sample received a Z statistic of 3.005 (a; black dot, arrow). This sample subsequently received a Z statistic of less than three when we increased the median per-sample count to 410 000

Z-Statistik mit unterschiedlichen Sequence counts (204000, 410000, 620 000) detektiert sicher **39 Trisomie 21-Fälle** und **7 Trisomie 18-Fälle** aus 298 Schwangerschaften

lifecodexx

Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik Kudamm-199

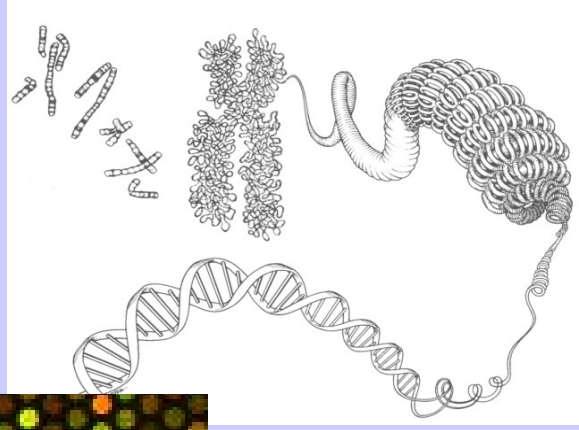
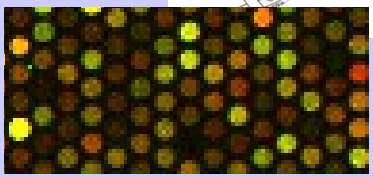
Albig . Becker . Bürger . Entezami . Fuchs . Hagen . Knoll . Lange . Stumm . Wegner

Dr. M. Albig
Prof. Dr. R. Becker
Dr. J. Bürger
PD Dr. M. Entezami
PD Dr. I. Fuchs
Dr. A. Hagen
Dr. U. Knoll
Dr. J. Lange
PD Dr. M. Stumm
Prof. Dr. R.-D. Wegner

stumm@kudamm-199.de

Dr. Wera Hofmann

Nastasja Trunk

Martina Beck

Julia Löcherbach