

Leitlinien zum „pränatalen Schnelltest“

Ziel des „pränatalen Schnelltests“ an unkultivierten Fruchtwasserzellen im 2. Trimenon

Grundsätzlich ist im Rahmen pränataler Untersuchungen ein möglichst frühzeitig vorliegendes Ergebnis von wesentlicher Bedeutung. Ein so genannter „pränataler Schnelltest“ kann zu diesem Zweck an unkultivierten Fruchtwasserzellen im 2. Trimenon einer Schwangerschaft durchgeführt werden. Dieser Test dient dem Nachweis bzw. Ausschluss der häufigsten autosomalen Trisomien und möglicher numerischer gonosomaler Aberrationen. Ein hierbei erzielter unauffälliger Befund kann wesentlich zur Beruhigung der Schwangeren beitragen.

Hierfür stehen derzeit verschiedene Techniken zur Verfügung. Zu nennen sind hier insbesondere die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), die Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie die Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)-basierende Verfahren. In einigen Labors wird der „präinatale Schnelltest“ auch für Chorionzellen angeboten – hierfür gelten prinzipiell ebenfalls die hier aufgeführten Leitlinien, allerdings unter Berücksichtigung der Besonderheiten des Untersuchungsgutes Chorion (Stichwort: erhöhte Gefahr der mütterlichen Kontamination – siehe auch Leitlinien zur zytogenetischen Labordiagnostik). Hier wird insbesondere empfohlen bei früher Amniozentese und Chorionuntersuchung das Geschlecht nicht vor der 12. bzw. 14. SSW bekannt zu geben (vgl. Erklärung zur pränatalen Geschlechtsdiagnostik, Kommission für Öffentlichkeitsarbeit und ethische Fragen).

Indikationen zur Durchführung

Ein „pränataler Schnelltest“ ist in erster Linie dann einzusetzen, wenn es aus medizinischen Gründen geboten ist, eine Diagnose zum Nachweis der häufigsten autosomalen Trisomien und möglichen numerischen gonosomalen Aberrationen früher als mit den bisherigen, insbesondere bänderungszytogenetischen Methoden zu erhalten.

Für den „pränatalen Schnelltest“ gilt allgemein:

Das Labor, das einen „pränatalen Schnelltest“ erbringt, sollte das Angebot einer humangenetischen Beratung sicherstellen und die Karyotypisierung durchführen können. Ein Labor sollte vor dem Angebot eines „pränatalen Schnelltestes“ Erfahrungen an mindestens 50 Kontrollfällen gesammelt haben. Hierunter sollten sich auch auffällige Fälle befinden. Das Labor sollte regelmäßig an externen Qualitätskontrollen teilnehmen. Der pränatale Schnelltest ist nur in Verbindung mit einer konventionellen Karyotypisierung durchzuführen. Darüber hinaus sind folgende Punkte zu beachten:

- Ein „pränataler Schnelltest“ führt bei Nutzung geeigneter Sonden bzw. Zielbereiche im menschlichen Genom mit großer Wahrscheinlichkeit zum Nachweis oder Ausschluss einer Trisomie 13, 18, 21, einer Triploidie und möglicher numerischer gonosomaler Aberrationen.
- Über einen „pränatalen Schnelltest“ im 2. Trimenon können ca. 80–90% aller Fälle mit einer Chromosomen-

anomalie erkannt werden. Bei alleiniger Anwendung eines „pränatalen Schnelltests“ werden nicht alle diagnostischen Möglichkeiten ausgeschöpft, die sich nach dem invasiven Eingriff der Amniozentese routinemäßig über die Karyotypisierung ergeben. Ein „pränataler Schnelltest“ kann somit eine Karyotypisierung nicht ersetzen. Er ist ein Ergänzungsverfahren, dessen Bedeutung ausschließlich im rasch vorliegenden Ergebnis liegt.

- Mit einem „pränatalen Schnelltest“ können in aller Regel keine chromosomalen Strukturanomalien erfasst werden. Bei Mosaiken ist die diagnostische Aussagekraft des Tests eingeschränkt. Zellmosaik der analysierten Chromosomen können in der Regel nur im FISH-basierenden Test erfasst werden.
- Die Erfassungsrate an chromosomalen Aberrationen durch einen „pränatalen Schnelltest“ kann in den verschiedenen „Indikationsgruppen“ unterschiedlich sein.
- Ein „pränataler Schnelltest“ kann in einem geringen Teil der Fälle zu keinem verwertbaren Ergebnis führen (z.B. mütterliche Kontamination, Hintergrund bei der Auswertung oder Polymorphismen der Zentromersonden). Hier ist sicherzustellen, dass eine nicht erfolgreich durchführbare Analyse beim Auftraggeber nicht als auffälliges Ergebnis fehl interpretiert wird. Grundsätzlich sollten nur makroskopisch unauffällige Fruchtwasserproben für einen Schnelltest verwendet werden. Bei blutiger Kon-

tamination besteht ein hohes Risiko einer Fehldiagnose durch maternale Zellkontamination insbesondere bei weiblichen Testergebnissen, hierauf sollte im Befundbrief eingegangen werden.

- Das Vorgehen, das sich aus einem pathologischen Befund bei einem „pränatalen Schnelltest“ ergibt, ist sehr weitgehend vom Einzelfall abhängig. In aller Regel ist eine Bestätigung des Ergebnisses über die Karyotypisierung erforderlich. Die Befundmitteilung sollte im Rahmen einer genetischen Beratung erfolgen.
- Jede invasive vorgeburtliche Diagnostik, auch in Verbindung mit einem „Pränatalen Schnelltest“, sollte mit dem Angebot einer genetischen Beratung verbunden sein. Die Mitteilung des Ergebnisses sollte bei unauffälligen Befunden in aller Regel, bei auffälligen Befunden in jedem Fall im Rahmen einer humangenetischen Beratung erfolgen. (Leitlinie Genetische Beratung: medgen 19 (2007) 452-454)

Speziell für den FISH-basierenden „pränatalen Schnelltest“ gilt:

Der FISH-basierende „pränatale Schnelltest“ an unkultivierten Fruchtwasserzellen ist ein molekular-zytogenetisches Untersuchungsverfahren, das der raschen Diagnostik der häufigsten numerischen Chromosomenaberrationen dient. Er kann innerhalb von 5–24 Stunden zu einem Ergebnis führen.

- Pro Sonde sollten mindestens 30 Interphasekerne ausgewertet werden. Wenn dies nicht eingehalten werden konnte, muss im Befundbrief darauf eingegangen werden.
- Durch qualitätssichernde Maßnahmen müssen die Grenzwerte für unauffällige und auffällige Ergebnisse laborintern regelmäßig ermittelt bzw. kontrolliert werden. Zwingend wird dies insbesondere bei einem Wechsel der verwendeten FISH Sonden. Zur Orientierung dienen hierbei folgende Werte:
 - a) $\geq 90\%$ der Interphasekerne mit unauffälligem Signalmuster – unauffälliges Ergebnis

- b) $> 60\%$ der Interphasekerne mit auffälligem Signalmuster – auffälliges Ergebnis
- c) $10\text{--}60\%$ der Interphasekerne mit auffälligem Signalmuster – kontrollbedürftiges Ergebnis, eventuell vorliegendes Mosaik

Kontrollbedürftige Ergebnisse können einerseits Anlass für die Erweiterung der Auswertung auf insgesamt 100 Interphasekerne für die fragliche Sonde, und/oder für eine erweiterte zytogenetische Analyse sein (z.B. zur Mosaikerkennung) bzw. bei unzureichender Qualität der Hybridisierung für eine Wiederholungsuntersuchung.

- Obwohl der FISH-basierende „pränatale Schnelltest“ in $>98\%$ der auswertbaren Fälle ein verlässliches Ergebnis liefert ist zu beachten, dass falsch-positive oder falschnegative Ergebnisse auftreten können. Dies ist möglich durch das Vorliegen von Zentromerheteromorphismen, Signalsplitting, zusätzlichen kleinen Markerchromosomen oder Derivatvchromosomen. Hierauf ist ggf. in geeigneter Form im Befund hinzuweisen.

Speziell für den PCR-basierenden „pränatalen Schnelltest“ gilt:

Der PCR-basierende „pränatale Schnelltest“ an unkultivierten Fruchtwasserzellen ist ein molekulargenetisches Untersuchungsverfahren, das der schnellen Diagnostik der häufigsten numerischen Chromosomenstörungen dient. Das Ergebnis liegt in der Regel innerhalb von 4–24 Stunden nach Eingang der Probe im Labor vor. Der Test basiert auf dem qualitativen Nachweis polymorpher Allele von STR-Systemen sowie deren semiquantitativer Dosisabschätzung. In der Regel werden die Chromosomen 13, 18, und 21 sowie die beiden Geschlechtschromosomen untersucht.

- Ein unauffälliger Befund in einem einzelnen STR-Marker kann entweder als eine Homozygotie oder eine Heterozygotie mit 1:1 Ratio vorliegen. Ein auffälliger Befund in einem einzelnen STR-Marker kann sich entweder in Form einer Homozygotie oder einer Heterozygotie mit 2:1 Ratio oder einem 3-Allel-Muster darstellen.

- Bei Single- und Multiplex-PCR-Ansätzen sind die Bedingungen (z.B. Zykluszahl) so zu wählen, dass eine semiquantitative Dosisabschätzung in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion stattfindet.
- Für jedes zu untersuchende Chromosom (Ausnahme Y-Chromosom) sollten mehrere polymorphe STR-Marker eingesetzt werden. Die Auswahl der STR-Marker muss unter Berücksichtigung von Eignungskriterien wie z.B. dem Repeat-Typ (z.B. Tetranukleotidrepeats), dem Heterozygotiegrad, die Größe der Stotter-Banden und/oder die chromosomale Lage der Marker auf der genetischen Karte erfolgen.
- Die STR-Analyse muss mit geeigneten Analyse-Systemen (z.B. Kapillarelektrophoresesystemen) erfolgen, mit denen eine Auftrennung von PCR-Fragmenten bis auf 1bp genau möglich ist. Auswertungen über konventionelle Agarosegele sind für eine 1bp-Trennung und eine Dosisabschätzung nicht ausreichend.
- Auffällige Ergebnisse mit nur einem informativen Marker pro Chromosom sind nicht ausreichend, da bei Abweichungen von der 1:1-Ratio eine Primerbindungs-mutation bei einem der beiden Allele in Betracht gezogen werden muss. Ein 3-Allelmuster in einem STR-System ist durch Interpretation der STR-Marker anderer Chromosomen auf eine eventuelle maternale Kontamination bzw. vorliegen einer Triploidie hin zu prüfen.
- Sind alle STR-Marker für ein Chromosom nicht informativ und/oder liegen durch den Ultraschallbefund besondere Hinweise auf das mögliche Vorliegen einer Trisomie 13, 18, 21, oder eine numerische gonosomale Aberration vor, sollte die Analyse auf weitere Marker ausgedehnt werden. Alternativ dazu kann auch z.B. ein FISH-Test zur Klärung durchgeführt werden. Muss das Ergebnis für ein Chromosom dennoch offen bleiben, muss dies im Befund eindeutig gekennzeichnet sein.
- Bei der Auswertung können bisher nicht beschriebene Allele (außerhalb des Rahmens der kleinsten und größten bisher aufgetretenen Allele) eines

STR-Systemen auftreten und für ein benachbartes STR-System ein 3-Allelmuster vortäuschen.

- Bei Hinweisen auf eine maternale Kontamination sollte eine mütterliche DNA-Probe vergleichend mitgeführt oder nachuntersucht werden.
- Mosaikbefunde können in Abhängigkeit von der Stärke des Mosaiks nicht immer eindeutig beurteilt werden.
- Eine Monosomie X kann zwar über die Anzahl getesteter Marker statistisch mit hoher Sicherheit nachgewiesen, letztlich jedoch mit dem PCR-basierenden „pränatalen Schnelltest“ nicht nachgewiesen werden. Dies sollte im Rahmen der Befundbesprechung diskutiert und ggf. über einen FISH-basierenden „pränatalen Schnelltest“ und / oder eine Chromosomenanalyse abgesichert werden, insbesondere dann, wenn sich für eine Monosomie X Hinweise aus dem Ultraschallbefund ergeben (z.B. erhöhte Nackentransparenz, Hydrops fetalis).

Obwohl der PCR-basierende „prä-natale Schnelltest“ in über 98% der Fälle ein verlässliches Ergebnis liefert, ist im Befund darauf hinzuweisen, dass eine Aussage nur über numerische Veränderungen der untersuchten Chromosomen zu treffen ist, dass strukturelle Veränderungen und Mosaik nur mit einer Chromosomenanalyse erfasst werden können.

Speziell für den MLPA-basierenden „pränatalen Schnelltest“ gilt:

Der MLPA-basierende prä-natale „prä-natale Schnelltest“ an DNA aus unkultivierten Fruchtwasserzellen ist ein molekulargenetisches Verfahren, das innerhalb von 24 Stunden zu einem Ergebnis führen kann. Bei der MLPA-Technik handelt es sich um semiquantitatives Verfahren, mit dem Aneuploidien der Chromosomen 13, 18, 21, X und Y nachgewiesen werden können. Dabei werden eine Reihe von Sondenpaaren („MLPA-Probes“) an die Ziel-DNA hybridisiert. Die Sequenz der jeweiligen Sondenpaare ist so gewählt, dass sie in direkter Nachbarschaft binden und daher von einer ther-

mostabilen Ligase verknüpft werden können. In einem zweiten Schritt werden die ligierten Sondenpaare dann per PCR amplifiziert. Hierbei korreliert die Menge des jeweiligen sondenspezifischen PCR-Produkts mit der ursprünglichen Menge der Zielsequenz. Die Amplifikationsprodukte werden durch Kapillarelektrophorese der Größe nach getrennt. Dosisunterschiede sind durch Reduktion oder Vergrößerung der Peakhöhen und/oder Peakflächen erkennbar. Durch einen Vergleich des Patienten mit einer Kontrollperson können Abweichungen erkannt werden.

- Durch qualitätssichernde Maßnahmen muss bestimmt werden, ob die Peakhöhe oder die Peakfläche (gegebenfalls auch beide Parameter) unter den verwendeten Bedingungen die verlässlichsten Werte liefert. Dieser Wert wird dann für die entsprechende mathematische Auswertung verwendet (siehe unten). Da einzelne Sonden in Einzelfällen Signalstärken aufweisen, die nicht mit der Menge der Zielsequenz korrelieren (z.B. aufgrund eines Basenaustausches in der Sondenbindungsstelle), muss das verwendete MLPA-Verfahren mindestens 4 Sondenpaare gegen das jeweilige Zielchromosom aufweisen. Jedes Labor sollte eine Validierung anhand einer größeren Zahl bekannter Aneuploidien vornehmen.
- Zwischen verschiedenen Produktversionen und Chargen können Unterschiede in den Signalstärken einzelner Sonden bestehen, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können, wenn man als Referenzwerte Daten alter Produktversionen verwendet. Über entsprechende Kontrollläufe muss die Übertragbarkeit der Daten zu bestehenden Referenzen überprüft werden. Gegebenfalls muss eine Anpassung der Referenzwerte erfolgen.
- Die Auswertung der MLPA-Daten erfolgt durch den Vergleich des Probenlaufs mit Daten von Normalkontrollen. Da zwischen einzelnen Probenläufen Variationen auftreten können, sollten parallel zum Probenlauf Normalkontrollen mitgeführt werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Anzahl und somit auch die Gesamtfläche/-höhe der Signale zwi-

schen weiblichen und männlichen Proben unterschiedlich ist, so dass weibliche und männliche Normalkontrollen mitgeführt werden sollten, sofern das Geschlecht der Probe nicht bekannt ist.

- Für die mathematische Auswertung der MLPA-Daten stehen mehrere Normalisierungsverfahren zur Verfügung. Alle diese Verfahren müssen sicherstellen, dass sie unter den jeweiligen Bedingungen eine sichere Unterscheidung zwischen unauffälligen und auffälligen Ergebnissen ermöglichen. Bei der Berechnung wird gegen die gemittelten Werte von Normalkontrollen normiert (Wertsetzung = 1). Idealerweise ergibt sich bei Vorliegen einer Trisomie eine 1.5-fache Signalstärke für die gemittelten Signale des entsprechenden Chromosoms (Wert = 1.5). Bei einem Turner-Syndrom ergibt sich ein Wert von 0.5 in Bezug auf das X-Chromosom im Vergleich zu weiblichen Normalkontrollen. Da die tatsächlichen Werte i.d.R. geringfügig von den Idealwerten abweichen, muss jedes Labor durch qualitätssichernde Maßnahmen die Grenzwerte definieren, bei denen der Probenlauf als negativ, als positiv bzw. uneindeutig gewertet wird.
- Grenzen des Verfahrens: Ein eindeutiger Nachweis einer Triploidie (69,XXX) ist mit dem MLPA-Verfahren nicht möglich. Zwar kann das MLPA-Verfahren Hinweise auf Vorliegen eines Mosaiks liefern, ein eindeutiger Nachweis ist mit dem MLPA-Verfahren aber nicht möglich.
- Verunreinigungen mit maternalem Gewebe/Blut können zu falsch-negativen Testergebnissen führen. Diese Einschränkung des Verfahrens muss im Befund erwähnt werden.

Verfahren zur Konsensbildung

Die **Erstellung der vorangegangenen Version dieser Leitlinie** erfolgte 1998 durch die Sprecher der damaligen Kommission: B. Eiben (Oberhausen) und U. Claussen (Jena) unter Mitwirkung von O. Bartsch (Dresden), W. Engel (Göttingen), J. Epplen (Bochum), F. Gerresheim (Bochum), R. Goebel (Oberhausen), U. Gross

(Ingelheim), H. Haas-Andela (Linden), W. Hammans (Oberhausen), C. Held (Hamburg), H. Höhn (Würzburg), K. Müller (Hannover), P. Miny (Basel), I. Nipper (Münster), M. Pruggmayer (Peine), R. Rauskolb (Northeim), A. Schinzel (Zürich), B. Schlegelberger (Kiel), J. Schmidtke (Hannover), M. Stumm (Magdeburg), R. Schubert (Bonn), B. Schulze (Hannover), G. Schwanitz (Bonn), E. Schwinger (Lübeck), W. Vogel (Ulm), C. Waldenmaier (München), R. Wegner (Berlin), P. Wieacker (Magdeburg).

Erstveröffentlichung: medgen 10 (1998) 319

Verabschiedung der aktualisierten Version durch:

Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GfH)

Vorsitzender: Prof. Dr. A. Reis, Institut für Humangenetik, Universität Erlangen

Berufsverband Deutscher Humangenetiker e.V. (BVDH)

Präsident: Dr. Bernt Schulze, Hannover

Leitlinien-Kommission der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik

Prof. Dr. Manfred Stuhmann-Spangenberg, Hannover (Sprecher)

PD Dr. Thomas Liehr, Jena

PD Dr. Barbara Fritz, Marburg

(Delegierter des BVDH)

Dr. Dieter Gläser, Neu-Ulm

(Delegierter des BVDH)

1. Überarbeitung: 2008 durch die GfH-Leitlinienkommission unter Mitwirkung von G. Rettenberger (Neu-Ulm), H. Gabriel (Osnabrück), A. Weise (Jena) und B. Eiben (Essen)

2. Überarbeitung im Online-Review-Verfahren: 30.3.–30.5.2009 durch GfH-Mitglieder

Verabschiedung: 15.6.2009 durch den Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik

Überprüfung geplant März 2014