

## 1 Risikoidentifikation

Laut aktueller Fassung der Mutterschaftsrichtlinie (in Kraft seit 01.01.2022) muss für einen NIPT als Kassenleistung bzgl. der Trisomie 21 eine Sensitivität von mind. 97% und eine Spezifität von mind. 99% und für eine Trisomie 13 eine Spezifität von mindestens 99 % sowie für Trisomie 18 eine Spezifität von 99 % nachgewiesen worden sein. Diese Vorgaben werden von dem am MGZ verwendeten Verfahren VeriSeq NIPT v2 (Illumina) für Einlingsschwangerschaften erfüllt. Für Zwillingschwangerschaften sind die Spezifitätsvorgaben für Trisomie 13 und 18 mit >99,9% laut modellierter Validierungsstudie des Produktbeiblattes des VeriSeq NIPT v2 (Illumina) ebenfalls erfüllt. Für die Trisomie 21 ergab sich dabei eine Sensitivität von 96,4%, welche somit um 0,6% niedriger liegt, als die vorgegebenen 97%. Im Folgenden wird analysiert, ob diese geringfügig niedrigere Sensitivität zu einer relevanten Fehlerrisikoerhöhung bei der Analyse von Zwillingschwangerschaften führen kann.

## 2 Risikobeurteilung

Am MGZ München wurden bis zum November 2022 insgesamt 14236 NIPT-Proben untersucht. In diesem Probenkollektiv wurden 93 Trisomie 21 positive Ergebnisse erfasst (0,65%). Keines der positiven T21 Ergebnisse stammte dabei von einer Probe von einer Zwillingschwangerschaft, so dass eine empirische Sensitivitätsbestimmung bei Zwillingschwangerschaften nicht möglich war. Das NIPT Testergebnis einer einzigen Probe (0,3%) wurde nach Rückmeldung von einer Arztpraxis retrospektiv als falsch-negativ erkannt (Genlab 1034, Probennummer: 102001462, einer von zwei Feten war Trisomie 21 positiv).

Im Rahmen der klinischen Studie des VeriSeq v2 NIPT vom Testhersteller Illumina wurde mit Hilfe eines in silico Populationsmodells ein 95% Konfidenzintervall für den T21-Sensitivitätswert von 86,4-98,9% angegeben <sup>1</sup>. Zusätzlich wurde ein MGZ-Subkollektiv von 3664 Patienten klinisch bzgl. positiver NIPT Ergebnisse nachbeobachtet und dabei eine 100%ige Konkordanz und ein hoher positiv-prädiktiver Wert (PPV) für die T21 beobachtet <sup>2</sup>. Unter der validen Annahme, dass das MGZ über mögliche diskordante NIPT-Ergebnisse von der Patientin oder der verantwortlichen ärztlichen Person unterrichtet würde, ist somit von einer T21-Sensitivität nahe der oberen 95% KI-Grenze (98,9%) auszugehen.

Ein weiterer Indikator für eine höhere Testsensitivität des VeriSeq v2 NIPT bei Zwillingschwangerschaften ist neben der hohen Sequenziertiefe auch der niedrige Absolut-Schwellenwert von 2% für die fetale Fraktion (FF). Dies erlaubt auch bei dizygoten, dichorialen Zwillingsanlagen mit asymmetrischer FF-Verteilung eine zuverlässige Detektion von Trisomien. Bei monozygotischen, monochorialen Schwangerschaften, welche ca. 30% aller Zwillingschwangerschaften ausmachen, tritt eine solch asymmetrische FF-Verteilung nicht auf. Auch wurde festgestellt, dass Zwillingschwangerschaften durchschnittlich eine höhere FF aufweisen als Einlingsschwangerschaften <sup>3</sup>. Dies ist auch im oben erwähnten MGZ Subkollektiv nachweisbar (Einlingsschwangerschaften  $\mu = 11\%$ , Zwillingschwangerschaften 14%).

Basierend auf den oben genannten Gründen ist die Eintrittswahrscheinlichkeit eines falsch-negativen NIPT-Ergebnisses für T21 bei einer Zwillingschwangerschaft als gering einzustufen.

## 3 Risikobewältigung

Um diese geringe Eintrittswahrscheinlichkeit gemäß dem ALRP-(As Low As Reasonable Practicable)-Prinzip weiter zu reduzieren, wurden für Zwillingschwangerschaften die Qualitätskriterien verschärft. So ist bei Patientinnen mit einem erhöhten Risikoprofil (erhöhtes mütterliches Alter, Strukturauffälligkeiten im Ultraschall feststellbar, o.ä.) eine FF von mind. 6% oder mind. 6 Mio NGS

Reads notwendig, bevor ein Ergebnis berichtet werden kann. Sind diese Kriterien nicht erfüllt, so wird reflexartig eine Wiederholungsanalyse durchgeführt. Diese Verschärfung stellt sicher, dass bei dizygotischen, dichorialen Zwillinganlagen rein rechnerisch eine fetale Fraktion von ca. 3% pro Zwilling vorliegen bzw. die Sequenziertiefe mind. 3 Mio Reads betragen muss.

Zusätzlich wurden 15 artifiziell hergestellte Mischproben (sog. Spike-In Proben) analysiert. Dazu wurde Plasma von Trisomie 21 positiven Proben mit unterschiedlichen fetalen Fraktionen und unterschiedlicher Mosaikgraden mit unauffälligem Plasmen mit übereinstimmender FF und plazentarem Geschlecht 1:1 vermischt. Letzteres imitiert eine dizygote, dichoriale Zwillingsschwangerschaft.

Barcode(Originalprobe)	FF(Original)	FF(Spike-In)	ber. Mosaikgrad	Ergebnis (Spike-In)
102014269	7%	8%	23%	T21
101004000	5%	7%	32%	T21
102015576	18%	19%	44%	T21
102008576	14%	13%	45%	T21
102009662	12%	12%	64%	T21
102013492	10%	11%	67%	T21
102014970	14%	14%	71%	T21
102014965	12%	11%	73%	T21
102014546	8%	7%	75%	T21
101004347	8%	9%	84%	T21
102012591	10%	14%	84%	T21
101001927	9%	11%	88%	T21
101003573	7%	5%	~100%	T21
102014513	5%	6%	~100%	T21
101003573	7%	7%	~100%	T21

Tabelle 1 Analyse von artifiziell hergestellten Mischproben (sog. Spike-In Proben) im „Zwillingsmodus“ des NIPT Auswertalgorithmus. FF = fetale Fraktion. Der angegebene Mosaikgrad stellt eine Berechnung des Auswertalgorithmus dar. Die Probe 101003573 (rote Schriftfarbe) wurde zweimal analysiert (Replikatanalyse).

Es ergab sich eine 100% Konkordanz bzgl. Geschlecht (Daten nicht gezeigt) und eine Sensitivität bzgl. Trisomie 21 von 100 % bei einem FF-Bereich von 5 bis 19% und einer Mosaik-Bandbreite von 23-100%.

Zusammenfassend zeigt dieses Experiment, dass eine Trisomie 21 auch bei niedriger FF oder niedrigem Mosaikgrad zuverlässig detektiert werden kann.

## 4 Literatur

1. DEU\_VeriSeq NIPT Solution v2 Packungsbeilage (1000000086774 v02). 50 (2019).
2. Harasim, T. *et al.* Initial Clinical Experience with NIPT for Rare Autosomal Aneuploidies and Large Copy Number Variations. *J. Clin. Med.* **11**, 372 (2022).
3. Canick, J. A. *et al.* DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations: DNA test for trisomies in multiple gestations. *Prenat. Diagn.* **32**, 730–734 (2012).