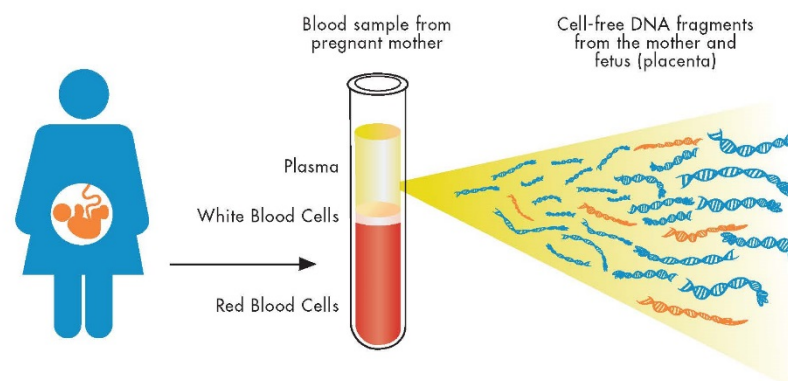


SGY Koulutuspäivät 2015

Kotka 16.04.2015

Non-invasiivinen prenataalitutkimus (NIPT)



Kristiina Aittomäki
Genetiikan ylilääkäri, HYKS
Professori, Helsingin yliopisto

Sidonnaisuudet

- Synnytysten ja naistentautien sekä perinnöllisyyslääketieteen erikoislääkäri
- Perinnöllisyyslääketieteen professori, HY
- Genetiikan ylilääkäri, HUSLAB
- Asiantuntijalääkäri (genetiikka) AstraZeneca, Merck
- STM, THL työryhmien asiantuntijajäsen
- VL Medi, VL Familia hallituksen jäsen

Äidin iän vaikutus kromosomipoikkeavuuden esiintyvyyteen

%

6

Ernest B. Hook, M.D., Genetics Section, Bureau of Maternal and Child Health, New York State Department of Health

5

4

3

2

1

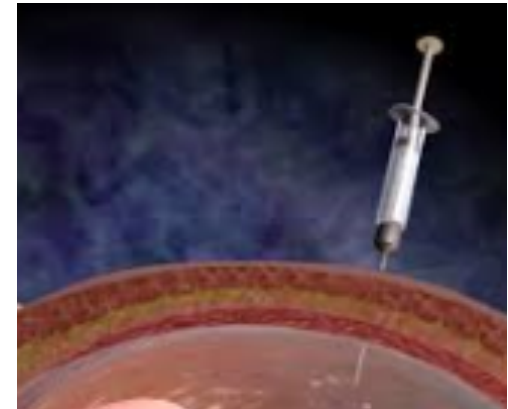
0

Sikiödiagnostiikan ja
Sikiöseulontojen kehittyminen

25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45

Nykyisen seulonnan ongelmia

- Ikäseulonnalla > 37 v. Löydetään 35% 21-trisomioista,
- 70% 21-trisomioista syntyy < 37 v. äideille
- Yhdistelmäseulonnalla löytyy n. 80% 21-trisomioista, vääriä negatiivisia n. 20%
- valtaosa seulaposiitivisista on vääriä positiivisia
- Seulaposiitiviseille tehdään invasiivinen tutkimus
- Suurin osa invasiivista tutkimuksista ”tarpeettomia”, keskenmenon riski!
- Tehokkaampia menetelmiä tarvittiin



Sikiöseulonta äidin verinäytteestä

- Sikiön solut äidin verinäytteessä Herzenberg et al. 1979
- 1980-luvulta alkaen aktiivista tutkimusta sikiöseulontojen kehittämiseksi äidin verenkierron sikiöperäisistä soluista
- 1996 NIH rahoittama monikeskustutkimus, tarkoituksena verrata äidin veren sikiöperäisten solujen ja sikiön verinäytteiden välistä diagnostista

- Haasteita mm:
 - Sikiön solujen pieni määrä
 - Sikiöperäisten solujen eristys äidin verenkierrossa
- (Bianchi et al. PNAS 1996)

FETAL ERYTHROBLASTS FROM MATERNAL
BLOOD IDENTIFIED WITH
2,3-BISPHOSPHOGLYCERATE (BPG) AND
IN SITU HYBRIDIZATION (ISH) USING
Y-SPECIFIC PROBES

HARRIET VON KOSKULL AND NINA GAHMBERG
Laboratory of Prenatal Genetics, Departments I and II of Obstetrics and Gynaecology,
Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland

PRENATAL DIAGNOSIS, VOL. 15: 149-154 (1995)

Early report**Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum**

Y M Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F Chamberlain, Vik Rai, Ian L Sargent, Christopher W G Redman, James S Wainscoat

- plasma- ja seeruminäyte 30 äidiltä, joilla poikasikiö
- 24 (80%) plasmanäytteessä todettiin sikiön Y-kromosomaalisia DNA sekvenssejä
- 21 (70%) äitien seeruminäytteessä todettiin sikiön Y-kromosomaalisia DNA sekvenssejä
- 5 (17%) Y-kromosomi positiivisia näytteitä eristettäessä tumallisten (sikiöperäisten) punasolujen DNA samasta verimäärästä
- 13 kontrollinäytettä tyttösikiötä odottavilta äideiltä ja 10 naiselta jotka eivät olleet raskaana, olivat kaikki negatiivisia

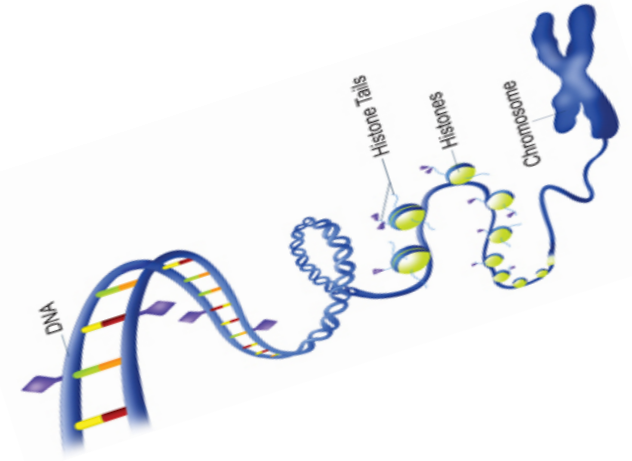
Geeneistä genomiikkaan

The Human Genome Project

- ihmisen koko perimän sekvenssi,
- julkaistiin v. 2000

Genomiikka = erilaiset koko perimän kattavat tutkimukset

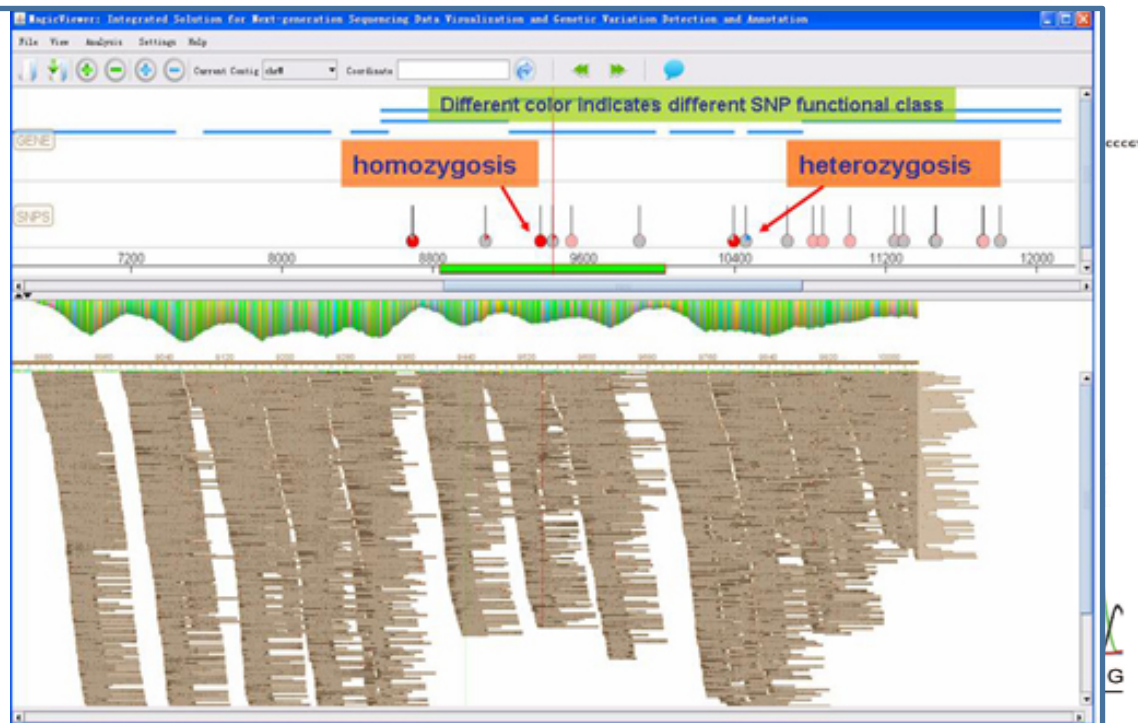
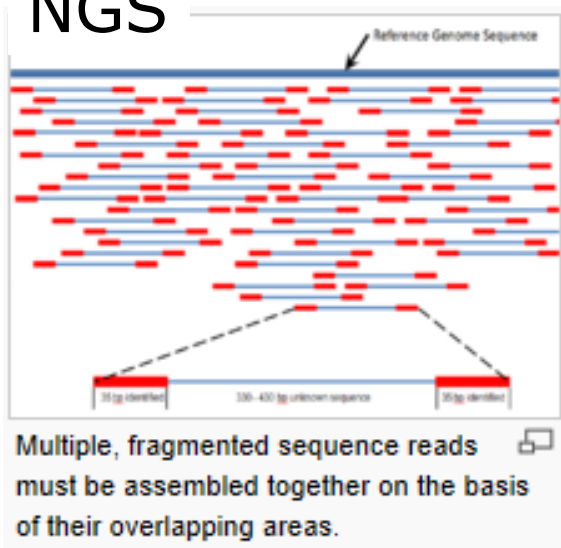
Merkittävä kehitys tiedossa ja teknologiassa ovat muuttaneet vision geneettisen tiedon käytöstä kaikkialla lääketieteessä, myös prenataali- ja preimplantaatiodiagnostiikassa



Massiivinen rinnakkaissekvensointi (MPS)

- Uuden sukupolven sekvensointi (NGS)
- High-throughput menetelmä, jossa lyhyitä DNA-fragmentteja luetaan rinnakkain samassa reaktiossa
- Valtavasti lisääntynyttä sekvensointikapasiteetti
- Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen tutkimus!

NGS





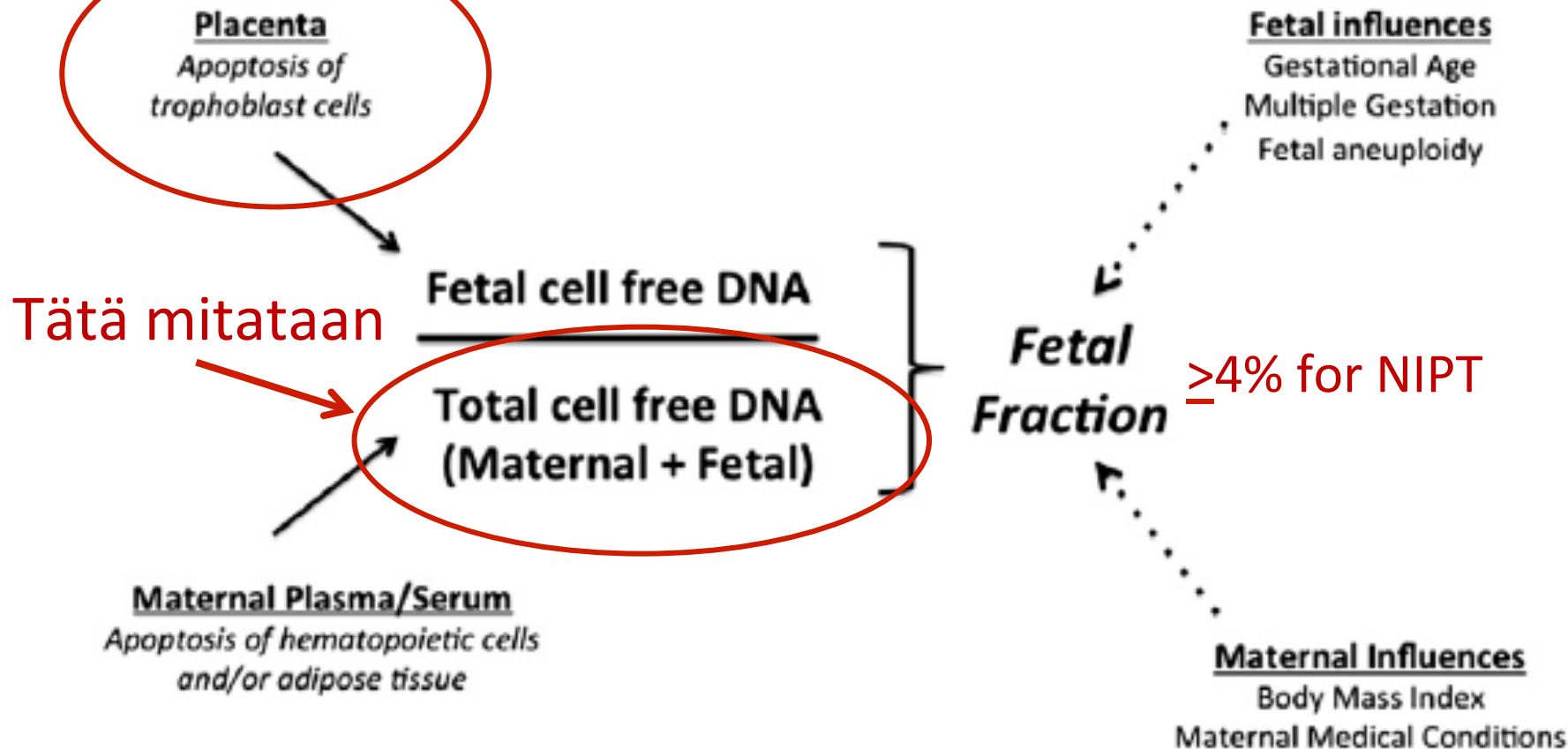
NIPT kehittyy

cffDNA raskauden aikana

- Cell free fetal DNA (cffDNA) todettavissa äidin plasmassa h. 5-7 alkaen
- Sikiön DNA:ta vapautuu jatkuvasti apoptoottisista soluista ja se häviää tunneissa äidin verenkierrasta
- 3%-10% äidin veren cfDNAsta on fetoplasentaalista alkuperää
- Sikiön cfDNA:n erottaminen äidin cfDNA:sta ei ole mahdollista
- äidin ja sikiön cfDNA:n suhteellisen osuuden määrittäminen voidaan tehdä
- määrä tavallisesti $\sim 1\mu\text{g}/20\text{ ml}$ äidin verta

Fetal fraction of cfDNA

Origins in the placenta!



cffDNA:n analysointi

- Verinäyte 2 erityisputkeen (Streck™)
- näyte centrifugoidaan solujen ja solufragmenttien poistamiseksi
- useita menetelmiä vapaan DNAn analysointiin
 - Kvantitatiivinen (Z-score metodi)
 - Sequenom (genomin shotgun sekvensointi cffDNA)
 - Verinata (genomin shotgun sekvensointi ei cffDNA määrittystä)
 - Ariosa (targetoitu amplifointi ja cffDNA fraktio SNP frekvenssillä)
 - Ei-quantitatiivinen SNP-pohjainen tutkimus (Natera)

cffDNA for NIPT

- useat kaupalliset laboratoriot tarjoavat NIPT-tutkimusta
- analysoidaan äidin plasman koko cfDNA
- kvantitatiivinen diagnoosi perustuu kromosomispesifisten DNA-fragmenttien määrään
- 21-trisomia
 - Kromosomi 21 muodostaa 1.5% of koko genomista
 - 21-trisomiassa kromosomin 21 määrä lisääntyy 50% (0.75%)
 - 21-trisomiassa kromosomi 21 2.25% koko genomista
- jos cffDNA osuus 10%, cfDNA:n muutos T21 on hyvin vähäinen
- muutos mahdollista detektoida vain uusilla menetelmillä



Directed analysis of selected chromosomal regions

Figure S2. Schematic of cell-free DNA (cfDNA) analysis using directed analysis of selected chromosomal regions (DANSR).

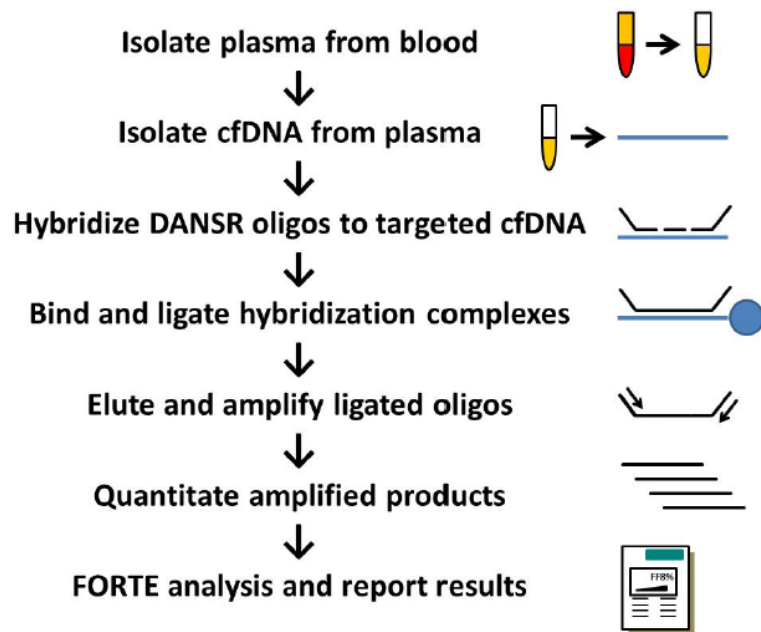


Figure S1. Chromosomal locations of DANSR assays.



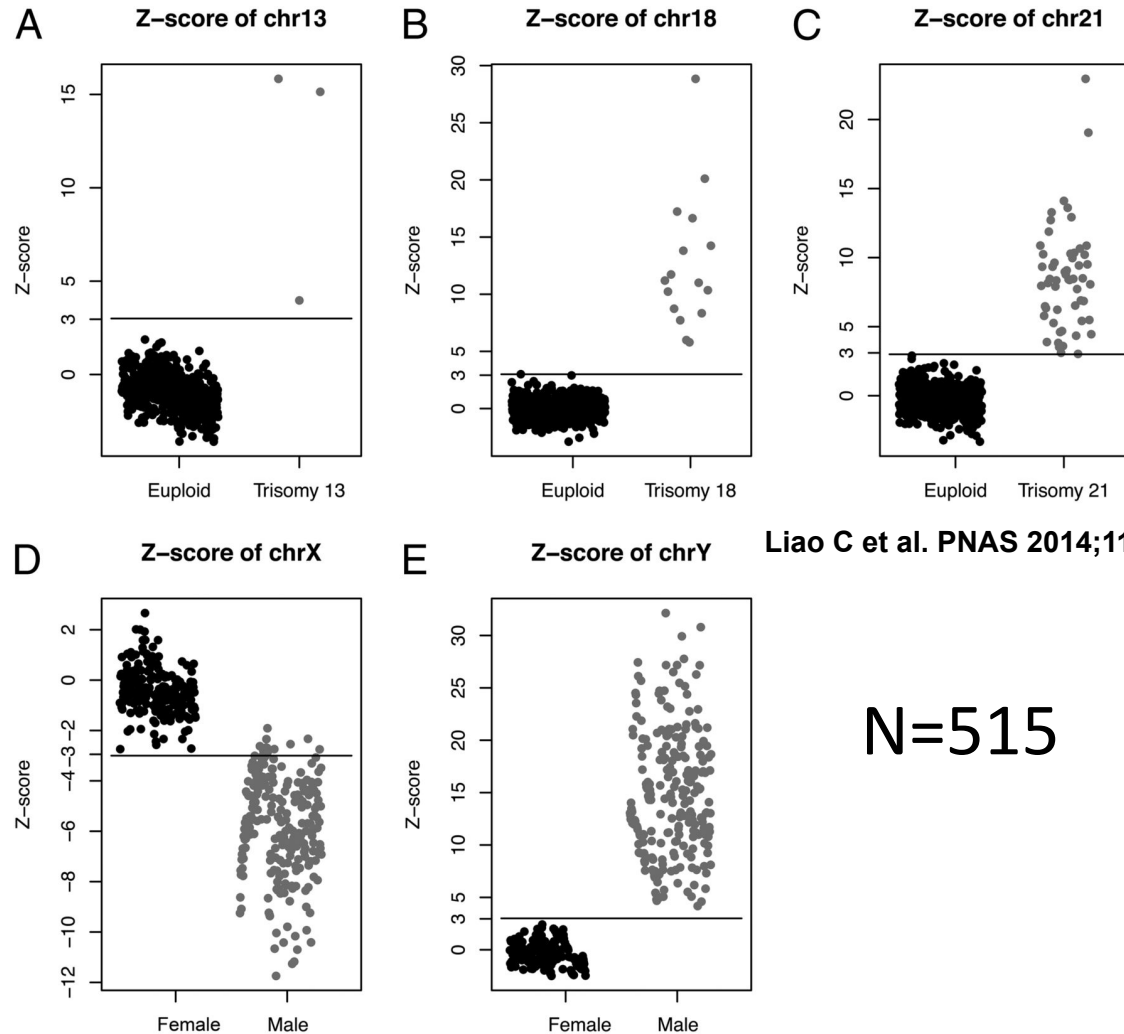
The DANSR assays are plotted as vertical lines along the Genome Reference Consortium human build 37 for chromosomes 13 (A), 18 (B), and 21(C).

Trisomian detekointi

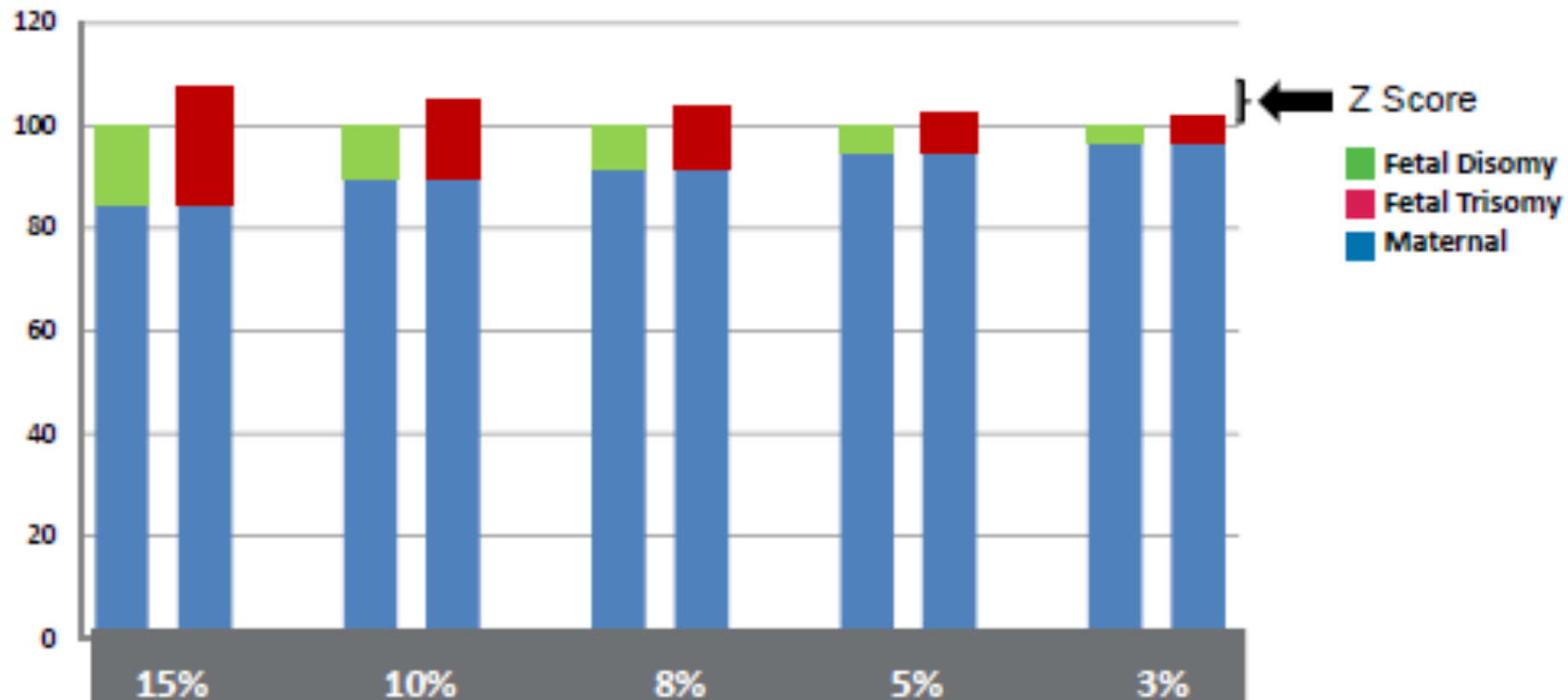
- Kromosomin koosta voidaan päätellä, kuinka usein siihen liittyvä DNA-sekvenssi esiintyy genomissa
- Esim. voidaan päätellä kuinka usein kr. 21 sekvenssi esiintyy verrattuna johonkin toiseen kromosomiin.
- Z-score ilmoittaa kuinka usein tutkitun kromosomin sekvenssi todetaan verrattuna kontrolli kromosomiin tutkittavassa näytteessä
- 21-trisomiassa suurentunut sekvenssien määrää aiheuttaa korkeamman Z-scoren



Z-score eri näyteryhmissä



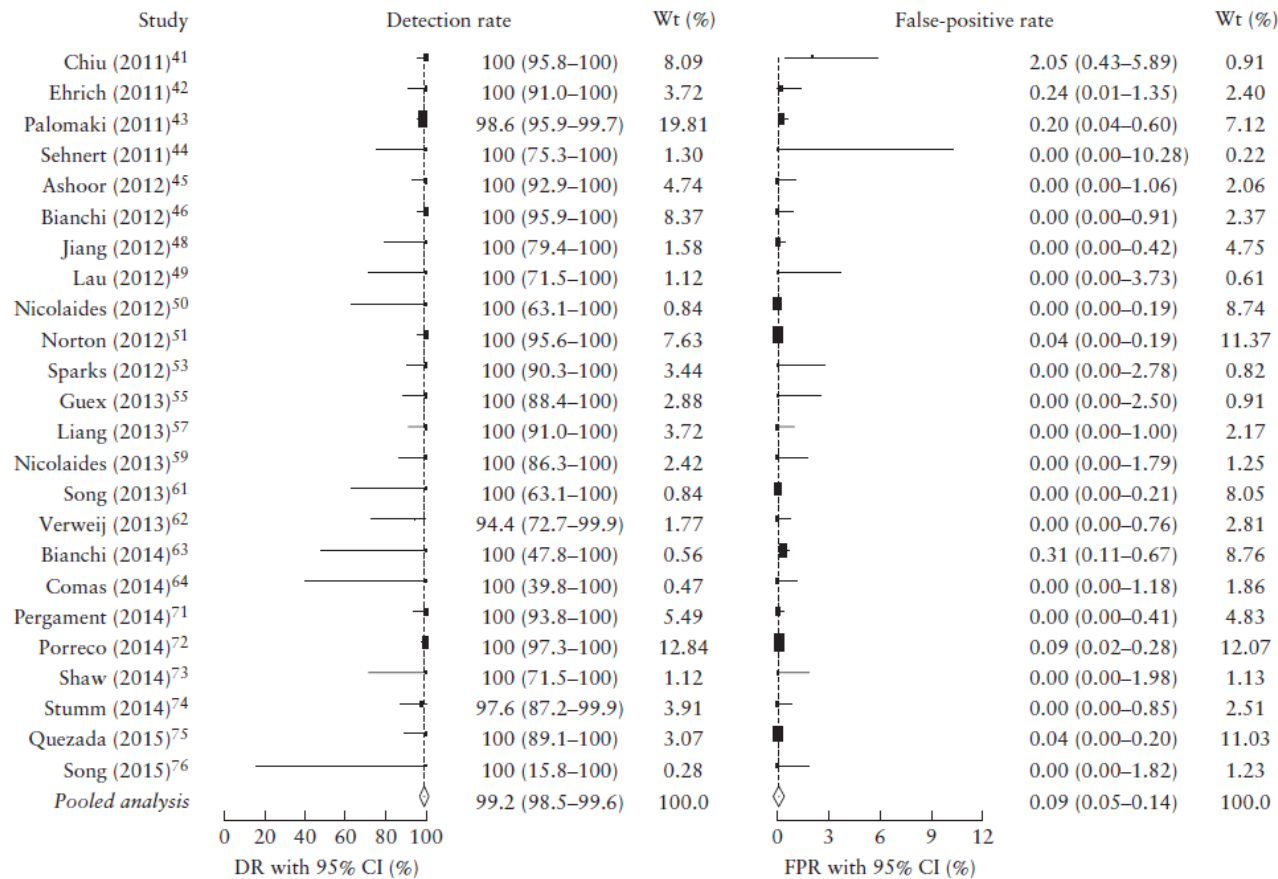
Relative amount of DNA mapping to chromosome of interest





NIPT tulokset

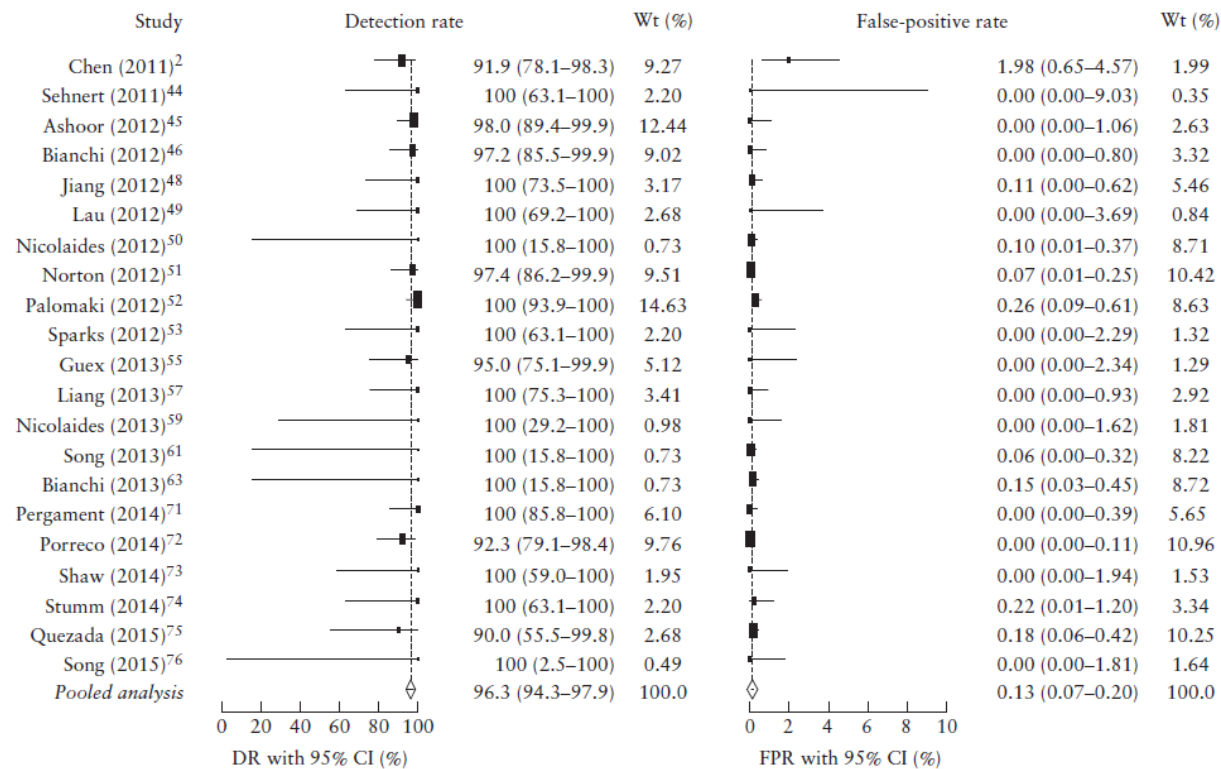
Updated meta-analysis: 21-trisomia



DR=detection rate

FP=false positive rate

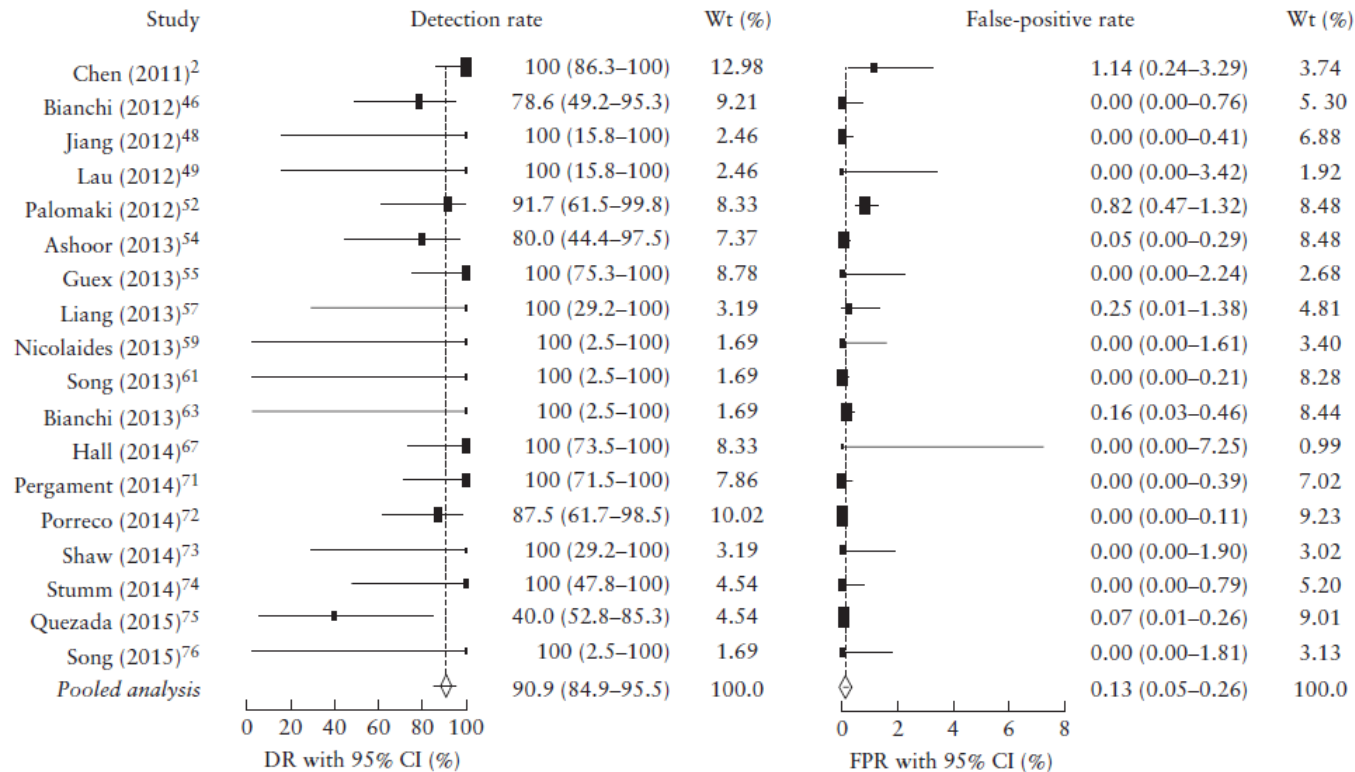
Updated meta-analysis: 18-trisomia



DR=detection rate

FP=false positive rate

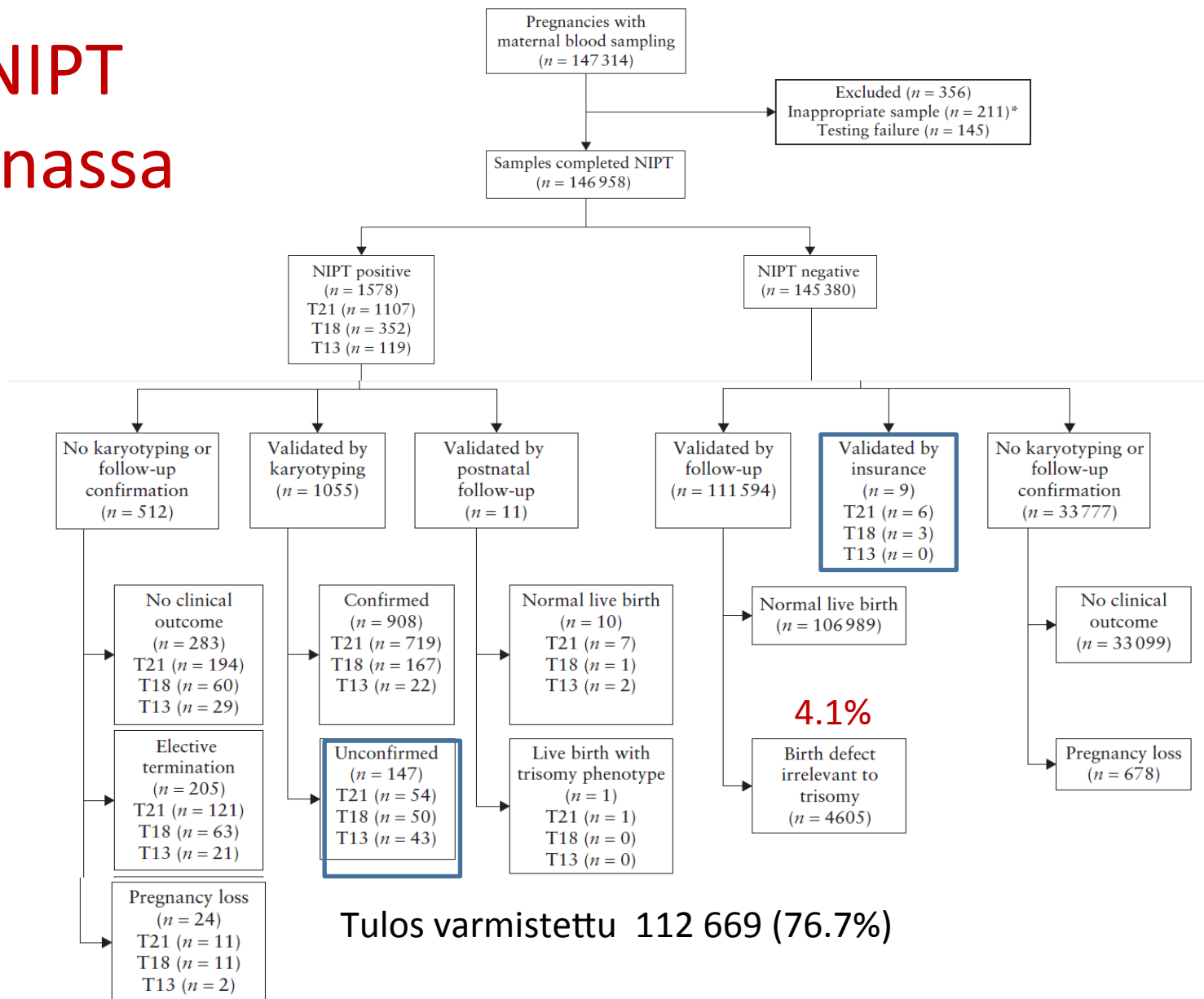
Updated meta-analysis: 13-trisomia



DR=detection rate

FP=false positive rate

NIPT Kiinassa



Tulokset BGI

Table 2 Performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) in detecting trisomies (T) 21, 18 and 13 in pregnancies with outcome data and if results with unconfirmed outcomes were considered as false negative (FN) or false positive (FP)

<i>Trisomy</i>	<i>TP</i> (n)	<i>FP</i> (n)	<i>FN</i> (n)	<i>Sensitivity</i> (% (95% CI))	<i>Specificity</i> (% (95% CI))	<i>PPV</i> (% (95% CI))	<i>NPV</i> (% (95% CI))	<i>Incidence</i> (%)
Overall performance (<i>n</i> = 112 669)								
T21	720	61	6	99.17 (98.52–99.83)	99.95 (99.93–99.96)	92.19 (90.31–94.07)	99.99 (99.99–100)	0.64
T18	167	51	3	98.24 (94.93–99.63)	99.95 (99.94–99.97)	76.61 (70.99–82.23)	100 (99.99–100)	0.15
T13	22	45	0	100 (84.56–100)	99.96 (99.95–99.97)	32.84 (21.59–44.08)	100 (99.99–100)	0.02
Total	909	157	9	99.02 (98.38–99.66)	99.86 (99.84–99.88)	85.27 (83.14–87.40)	99.99 (99.99–100)	0.81
Performance in twin pregnancies (<i>n</i> = 404)								
T21	5	2	0	100 (47.82–100)	99.50 (98.20–99.94)	71.43 (29.04–96.33)	100 (99.08–100)	1.24

Luotettavuudessa ei eroa korkean ja mataln riskin raskauksissa.

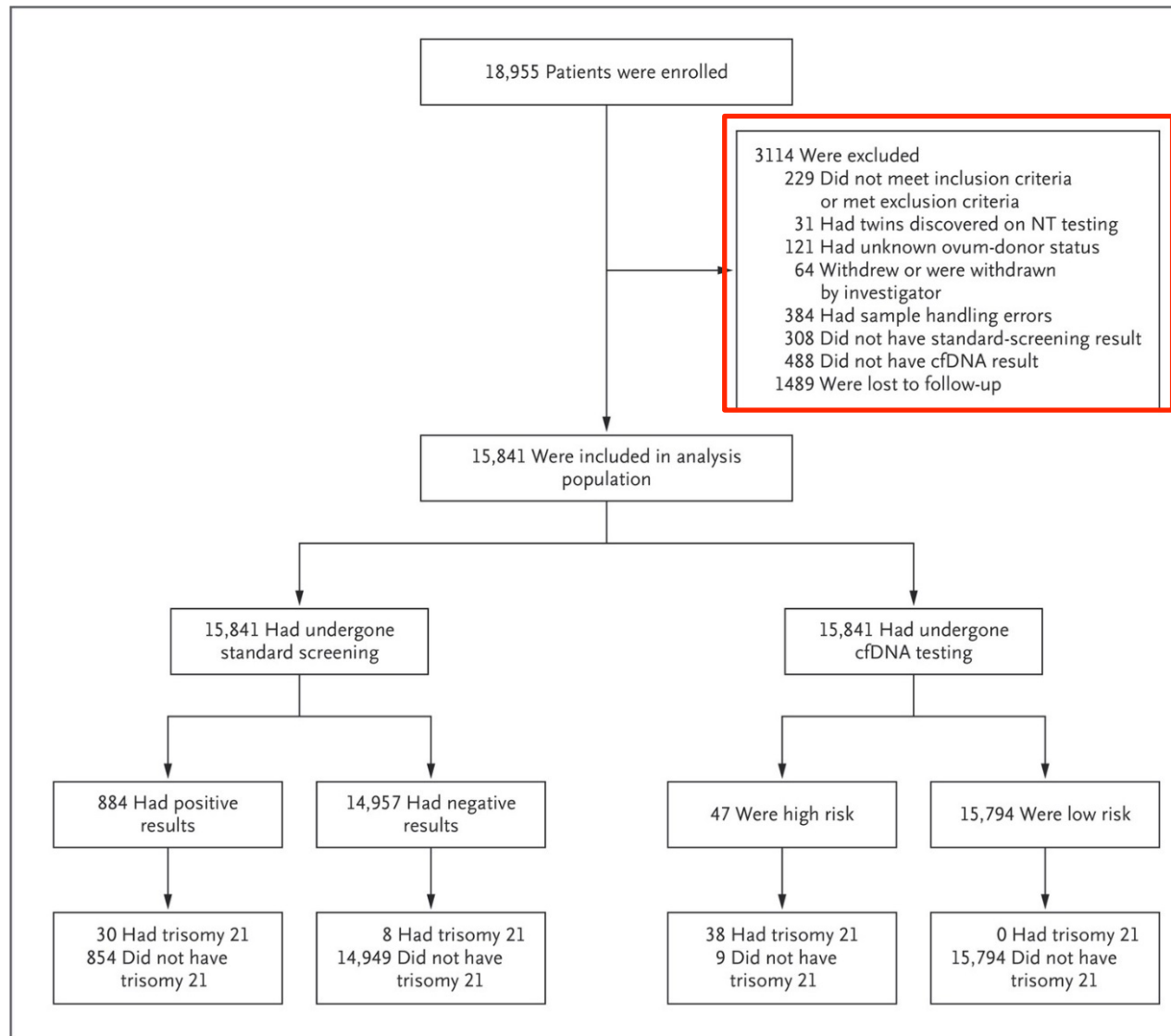
BGI – väärät positiiviset

Table 4 Analysis of biological factors causing 157 false-positive results in pregnant women undergoing non-invasive prenatal testing (NIPT) for trisomies 21, 18 and 13

<i>Contributing factor</i>	<i>Value</i>
Maternal age (years)*	31.65 (21–24)
Gestational age (weeks)*	18.5 (13–27)
Fetal fraction (%)*	9.74 (3.54–21.94)
Suspected maternal CNV†	
Trisomy 21	15 (13) (0.59–6.72 Mb)
Trisomy 18	9 (6) (0.5–3.35 Mb)
Trisomy 13	3 (2) (4.89 – 14 Mb)
Suspected mosaicism/CPM‡	
Trisomy 21	3 (—)§
Trisomy 18	2 (—)¶
Trisomy 13	9 (2 CPM)**
Live birth normal phenotype with no prenatal diagnosis (<i>n</i>)	
Trisomy 21	7
Trisomy 18	1
Trisomy 13	2
NIPT-suspected multiple chromosomal aneuploidy	1 trisomy 13 FP (chr 13, chr 14, chr 20)
Twin pregnancy	2 trisomy 21 FP

Prospektiivinen kansainvälinen monikeskustutkimus

35 keskusta



Kansainvälinen tutkimus 21-trisomia tulokset

Table 2. Test Performance for Trisomy 21 in the Primary Analysis Cohort, According to Maternal Age and Risk.*

Variable	Standard Screening	Cell-free DNA Testing		
	All Patients (N=15,841)	All Patients (N=15,841)	Maternal Age <35 Yr (N=11,994)	Low Risk (N=14,957) [†]
True positive — no.	30	38	19	8
True negative — no.	14,949	15,794	11,969	14,941
False positive — no.	854	9	6	8
False negative — no.	8	0	0	0
Sensitivity (95% CI) — %	78.9 (62.7–90.4)	100 (90.7–100) [‡]	100 (82.4–100)	100 (63.1–100)
Specificity (95% CI) — %	94.6 (94.2–94.9)	99.9 (99.9–100) [§]	99.9 (99.9–100)	99.9 (99.9–100)
Positive predictive value (95% CI) — %	3.4 (2.3–4.8)	80.9 (66.7–90.9) [§]	76.0 (54.9–90.6)	50.0 (24.7–75.3)
Negative predictive value (95% CI) — %	99.9 (99.9–100)	100 (99.9–100) [¶]	100 (99.9–100)	100 (99.9–100)
Positive likelihood ratio	14.6	1755.9	1995.8	1868.6
Negative likelihood ratio	0.22	0	0	0

Norton ME et al. N Engl J Med 2015. DOI: 10.1056/NEJMoa1407349

Löydökset poissuljetuilla potilailla

- 488 (3%) suljettiin pois puuttuvan cfDNA tuloksen vuoksi
- 192 (1.2%) cffDNAn osuus <4%
- 83 (0.5%) cffDNAn osuutta ei voitu määrittää
- 213 (1.3%) suuri vaihtelu tai epäonnistunut tutkimus
- Matalan cffDNAn ryhmässä: naisten paino (med) 93.7 kg vs 65.8kg naisilla joilla tutkimus onnistui ($p < 0.001$)
- Kromosomipoikkeavuuksia yht. 13 (2.7%) eli 1:38 vs
- raskaudet, joissa tulos saatiin (0.4%) eli 1:236

Löydökset naisilla, joilla tulosta ei saatu

- 13 aneuploidiaa
 - 3 x 21-trisomiaa, 2 x 13-trisomia
 - 4 triploidiaa
 - 1 kutakin: 18 trisomia, trisomia 16 mosaikismi, del11p, rakenteellisesti poikkeava kromosomi
- Raskauksissa, joissa cffDNA < 4%
 - 9/192 (4.7%) aneuploidioita
- Korkein riski ryhmässä, jossa tulosta ei saada, koska cffDNA <4%
- jos korkea riski cFTS ja cffDNA <4%, kannattaa tehdä suoraan invasiivinen tutkimus eikä ottaa uutta näytettä

NIPT vai DNA-based noninvasive prenatal screening

Table 1. True and False Positive Cases with Nonmosaic Karyotypes.

Chromosomal Abnormality	True Positive Result (N = 238)	False Positive Result (N = 56)
	<i>no./total no. (%)</i>	<i>no./total no. (%)</i>
Trisomy 13	14/26 (54)	12/26 (46)
Trisomy 18	40/52 (77)	12/52 (23)
Trisomy 21	161/177 (91)	16/177 (9)
Monosomy X	8/21 (38)	13/21 (62)
XXX or XXY	15/17 (88)	2/17 (12)
XYY	0/1	1/1 (100)

Placental mosaicism

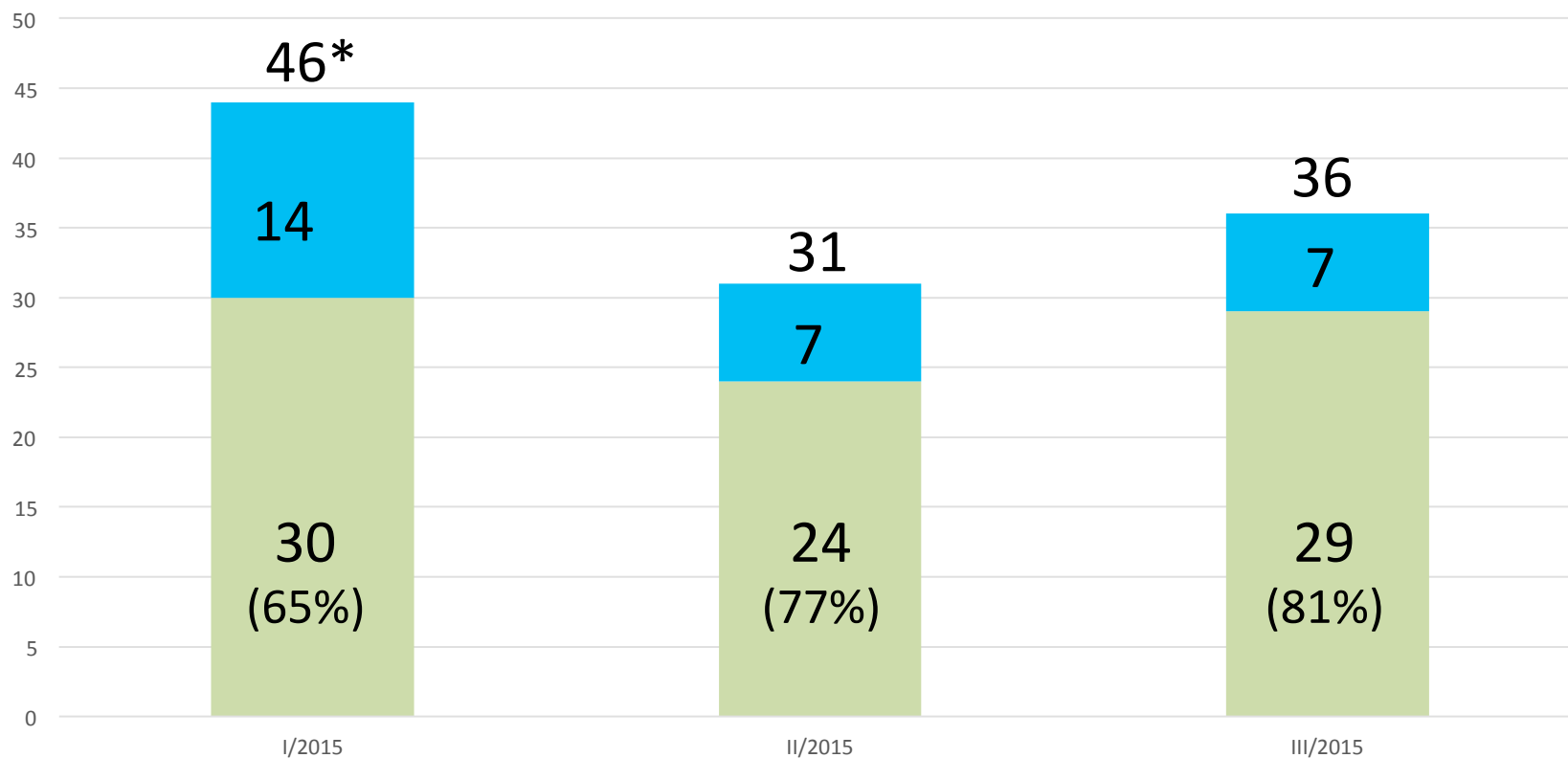
Influence of confined placental mosaicism on the discordance between NIPT results and fetal karyotype.

NIPT result	Fetal karyotype	Explanation	References
Autosomal aneuploidy			
Trisomy 13	46, XX (amniocentesis)	CPM: 46, XX, +13, der (13; 13) (q10; q10) [5] in direct preparation	Mennuti et al. [15]
Trisomy 13	46, XY (fetal tissue)	CPM: 47,XY, +13 in direct preparation	Mennuti et al. [15]
Trisomy 13	46, XY (amniocentesis and cord blood)	CPM:47, XY, +13 [10]/46, XY [12]	Hall et al. [16]
Trisomy 21	46, XX, upd (21) mat	CPM: Trisomy 21	Pan et al. [17]
Trisomy 22	Cord blood normal by sequencing	CPM: Trisomy 22	Choi et al. [18]
Sex chromosome aneuploidy			
47, XXY	46, XY (amniocentesis)	CPM: 49, XXX, +7, +21 [24]/46, XY [6]	Lau et al. [55]

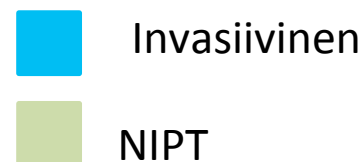
NIPT - HUS Sikiölääkätieteen keskus

- NIPT aloitettiin 12.1.2015
- I-III/2015 neuvonnassa ollut yhteensä 113 potilasta
 - NIPT 83 potilasta (73%)
 - suurempi osuus potilaita joilla riski pieni, <1:200 kuin invasiivisten ryhmässä
 - invasiivinen näyte 28 potilaasta (25%)
 - invasiivisen valinneista 8/28 eli 29 % keskiraskauden seulonnassa seulaan jääneitä, NIPT ryhmässä heitä 2%
 - ei näytettä 2 potilasta (2%)

NIPT - HUS Sikiölääkätieteen keskus



*sis. 2= ei näytettä



NIPT - HUS Sikiölääketieteen keskus

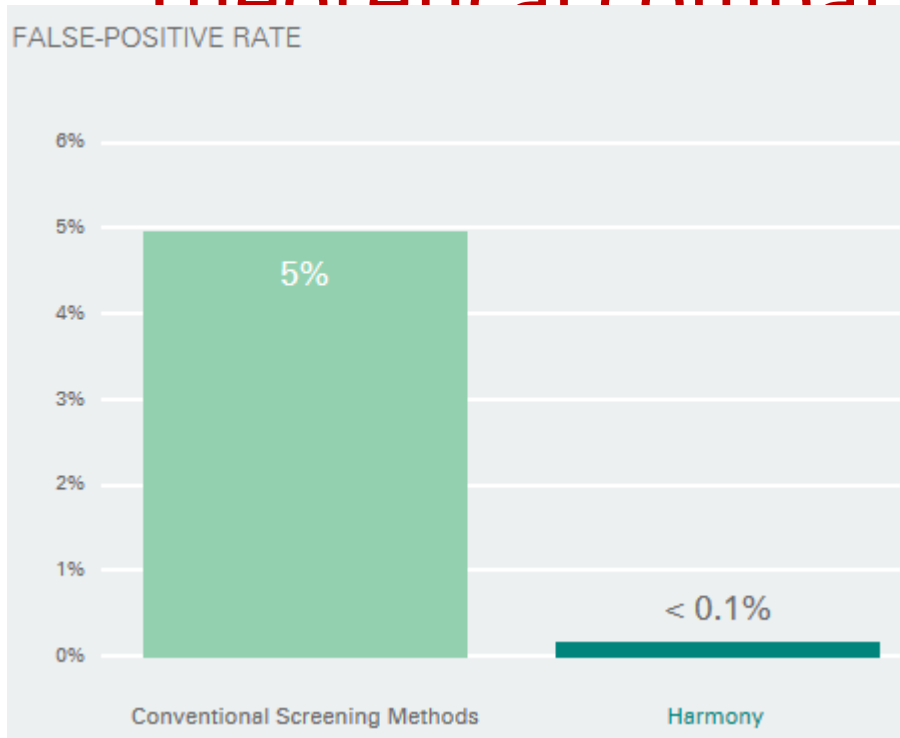
Indikaatiot

- yhdistelmäseulonnassa riski $>1/250$
- sikiön niskaturvotus 3.0 -3.9 mm
- poikkeava tulos keskiraskauden seerumiseulonnassa
- ensimmäinen seula tekemättä + ikä yli 40 v
- aiempi trisomia

Tulokset:

- normaali 81
- poikkeava 2
- cffDNA:n osuus kaikki $> 4\%$ (yleensä $\sim 10\%$)
- uusinta NIPT-näytteitä 0
- NIPT:n perusteella invasiivinen tutkimus 1, ei vielä tulosta

Theoretical comparison of FTS vs NIPT



FTS/Invasive	NIPT
100.000	100.000
200	200
73%	> 99%
146	199
54	2
4990	< 100
50	1

False-negatives T21

False-positives***

Iatrogenic miscarriage****

** Population risk set at 1/500

***False-positive rate of FTS: 4.8%, ***False-positive rate of NIPT: < 0.1%

**** Iatrogenic miscarriage: miscarriage due to invasive procedures: 1%

K Aittomäki 16.4.2015

[Facts Views Vis Obgyn.](#) 2014;6(1):7-12

NIPT monogeenisissä taudeissa

Monogenic disorder	Approach to NIPT
Paternally inherited or de novo autosomal dominant disorders	
Achondroplasia	► Detection or exclusion of paternal or de novo allele reported as diagnostic.
Apert syndrome	► Technologies used include a variety of PCR approaches, dPCR and NGS
Early onset primary dystonia I	
Thanatophoric dysplasia	
Huntington's disease	Not fully accurate. Invasive testing recommended for diagnosis
Autosomal recessive conditions where parents carry different altered alleles	
α -thalassaemia	► Exclusion of paternal allele reduces risk to zero.
β -thalassaemia	► Detection of the paternal allele indicates an increased risk (to 50%) and invasive testing is required for definitive diagnosis.
CAH	► Technologies used include PCR, dPCR and NGS have been reported
Cystic fibrosis	
Leber congenital amaurosis	
Propionic acidemia	
Fraser's syndrome	
Autosomal recessive polycystic kidney disease	
Autosomal recessive conditions where parents carry the same altered allele	
Sickle cell anaemia	Estimation of allelic ratios required, so accurate estimation of fetal fraction needed. Currently can only be done using dPCR ¹⁹ or NGS. ^{20 21} Limited application in female fetuses as there is no reliable universal fetal DNA marker available. Y-chromosome sequences can be used in male-bearing pregnancies
β -thalassaemia	
X-linked conditions	
Haemophilia	Estimation of allelic ratios required, so accurate estimation of fetal fraction required using Y-chromosome sequences. ²²

CAH, congenital adrenal hyperplasia; NGS, next-generation sequencing; NIPT, non-invasive prenatal diagnosis.

Cost-effectiveness

Cost-effectiveness analysis favours NIPT (Ohno et Caughey, 2013)

- For screening with invasive confirmation of findings
- Not as sole diagnostic test

Meta-analysis (DR detection rate, FPR false positive rate)

- T21: DR 99.0% FPR 0.08% (Gil et 2014)
- T18: DR 96.8% FPR 0.15%
- T13: DR 92.1% FPR 0.20%
- 45,X: 88.6% FPR 0.12%
- Twins T21: DR was 94.4% and FPR was 0% (95% CI 0.00-1.84)



NIPT of cfDNA in maternal blood provides effective screening for trisomies.

NIPT väestöseulontana Suomessa

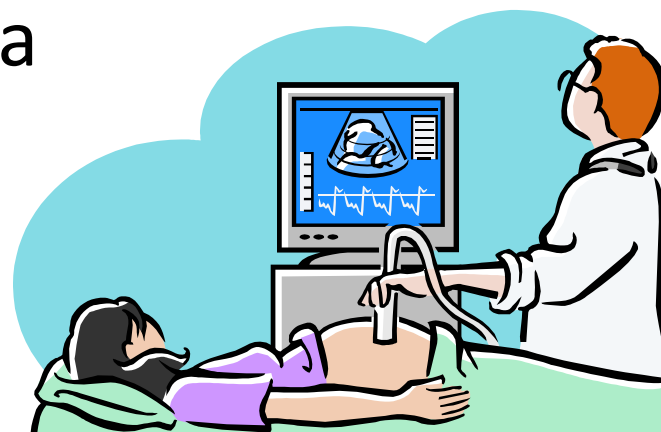
- **NIPT** h 10 kaikissa 58 000 raskaudessa/v
- todetaan 99% 21-tris. ja 80-95% 13- ja 18-tris.
- kustannus = 29 000 000 €
- Invasiivisia tutkimuksia n. 1% n=580 ←

Invasiivinen toimenpide

Keskenmenoja 3-6
- **FTS** kaikissa 58 000 raskaudessa/v
S-seulontakustannus = 1 450 000 €
- Invasiivisia tutkimuksia (seulonta +) 5% n= 2900
Keskenmenoja 15-29

NIPT haasteita

- Jos tehdään väestötason perusseulontana, korkeat kustannukset (23 € vs 500 €/tutkimus)
- Osaa karyotyypitutkimuksessa todettavista poikkeavuuksista ei todeta
- Ei poista UÄ-tutkimusten tarvetta
- Mutaatiotutkimukset tulossa



Best practice in maternal-fetal medicine

4. Screening by analysis of cfDNA in maternal blood has a detection rate of 99% for trisomy 21, 97% for trisomy 18, and 92% for trisomy 13, with a total false-positive rate of 0.4%.
5. Clinical implementation of cfDNA testing should preferably be in a contingent strategy based on the results of first-line screening by the combined test at 11–13 weeks of gestation. In this case, we recommend the strategy below:
 - Combined test risk over 1 in 100: patients can be offered the options of cfDNA testing or invasive testing.
 - Combined test risk between 1 in 101 and 1 in 2500: patients can be offered the option of cfDNA testing.
 - Combined test risk lower than 1 in 2500: there is no need for further testing.

Patients contemplating pregnancy termination following a positive result from cfDNA testing should be advised that the diagnosis should be confirmed by invasive testing before undertaking any further action.

FIGO Committee Report Int J Gyn Obstet 2015

ESHG ja ASHG suositus

1. NIPT -positiivinen tulos tulee aina varmistaa (LVT), jos harkitaan keskeytystä
2. NIPT ei saa johtaa raskaana olevien huonompaan informaatioon.
3. NIPT kohdistuu trisomioihin, mutta muihinkin löydöksiin tulee valmistautua.
4. NIPT ei pidä laajentaa mikrobeleettioihin ja sukukromosomipoikkeavuuksiin, menetetään etu invasiivisten toimenpiteiden vähenemisestä. FPR ja FNR kasvavat.
5. Erilaisten prenataalitutkimusten mahdollisuudet muuttuvat ja samaan aikaan voidaan tehdä testejä. Eri tavoitteet tulee informoida selvästi.
6. Jos trisomiaseulontaa tarjotaan väestölle, huolehdittava testauksen laadusta, koulutuksesta ja testien tasavertaisesta saatavuudesta
7. Seulontaa suunniteltaessa huomioitava lisääntymisautonomia, ei vain laboratorio teknologian ja terveystaloustieteen kysymykset.
8. Tietoonperustuvaa suostumusta tulee kehittää ja mitata sen toteutumista.
9. Tarvitaan yhteiskunnallista keskustelua siitä, tuleeko sikiötutkimuksia laajentaa muuhun kuin vakaviin ja vaikeisiin sairauksiin.
10. Mahdollisuus diagnosoitavien sairauksien hoitoon herättää tarkeitä kysymyksiä lisääntymisautonomiasta ja vanhempien vastuusta.

Lopuksi

- DNA-pohjainen non-invasiivisen sikiöseulonta on tehokasta ja vähentää merkittävästi invasiivisten tutkimusten tarvetta
- Positiivinen tulos tulee varmentaa, mielellään LVT:lla
- Matala cffDNA:n fraktio liittyy tavallista korkeampaan riskiin, joka tulee huomioida neuvonnassa
- Tulevaisuuden seulonta voi sisältää monia erilaisia geneettisiä sairauksia ja alttiuksia, kromosomi-poikkeavuuksien lisäksi (erityisesti alkiodiagnostiikassa)
- Eettisiä näkökulmia tulisi pohtia!



Sequencing the unborn
Mitä ajattelemme tästä?

Kiitos!

