

De maternale bloedtest op foetale trisomie 21, de heilige graal binnen handbereik!

A.T.J.I. Go, D. Oepkes en J.M.G. van Vugt

Inleiding*

In maart van dit jaar was het weer zover. In de verschillende kranten verschenen artikelen over de ontwikkeling van een bloedtest op het downsyndroom en dat het onderzoek weer verder gevorderd is, bijna beschikbaar voor de patiëntenzorg. Collega's Oudejans en van Lith verschenen in interviews op radio en televisie. In de zomer van 2003 stond op de voorpagina van de *Telegraaf* ook al een artikel over de bloedtest op het downsyndroom die bijna beschikbaar was. In december 2009 verschenen rond de promotie van Go een aantal krantenartikelen met deze belofte. De media, maar vooral ook het publiek reageert na dergelijke berichtgeving altijd met gretig enthousiasme. "Is de test beschikbaar, zo ja waar?" De ziekenhuizen waar de onderzoekers werken worden 'platgebeld' of krijgen e-mails van patiënten die graag willen weten hoe ze toegang kunnen krijgen tot deze test. Is het niet in Nederland, dan zijn enkelen bereid om het buiten de grenzen te zoeken. De beschikbaarheid van een diagnostische bloedtest op trisomie 21 lijkt vele zwangere vrouwen en hun partners een geweldige manier om een vruchtwaterpunctie of een vlokkentest, en zo de kans op een iatrogene miskraam, te omzeilen.

Toch was het deze keer in maart anders. Het was anders omdat er recent grotere patiëntenstudies met veelbelovende resultaten zijn gepubliceerd en het was anders omdat deze keer ook de professionals elkaar opzochten om de situatie in breed verband te bespreken en gezamenlijk een strategie vast te stellen hoe de mogelijkheden van deze test voor Nederland te onderzoeken.

In dit artikel zal de recente geschiedenis van de ontwikkeling van een bloedtest op trisomie 21 en de huidige stand van zaken beknopt worden besproken. Ingegaan zal worden op de situatie in Nederland en het op te zetten klinisch onderzoek en implementatietraject van een dergelijke test in Nederland, tot slot zal kort gefilosofeerd worden over mogelijke ontwikkelingen.

**Voor uitgebreide en gedetailleerde informatie over technische mogelijkheden en ontwikkelingen verwijs ik u naar een recent gepubliceerde review in Human Reproduction Update van Go et al.¹*

Recente geschiedenis en ontwikkelingen

Om chromosoomafwijkingen bij een foetus te kunnen vaststellen is een invasieve procedure, zoals een vruchtwaterpunctie of vlokkentest, nodig om foetale cellen te verkrijgen. Het nadeel van deze testen is dat er een kans bestaat op een iatrogene miskraam. De wens tot onderzoek naar foetale trisomie 21, waarvan de kans toeneemt met de leeftijd van de zwangere, is de meest gangbare reden voor vrouwen om voor een invasieve prenatale test te kiezen.² Het zou ideaal zijn als een prenataal diagnostische test met dezelfde mogelijkheden als de huidige diagnostische test beschikbaar zou zijn, zonder het risico op een iatrogene miskraam. Al tientallen jaren geldt de ontwikkeling van een dergelijke test als een zeer uitdagend onderzoeksdoel.

Aanwezigheid van foetale cellen in de moederlijke circulatie is intensief bestudeerd, maar het is niet mogelijk gebleken een test te ontwikkelen die geschikt is voor klinisch gebruik.³ In het bloed van zwangere vrouwen kan ook *cell-free fetal*-DNA en placenta-mRNA gedetecteerd worden.⁴⁻⁶ Dit foetaal en placentair genetisch materiaal kan gebruikt worden voor een potentieel zeer groot aantal diagnostische tests. Genetische verschillen tussen moederlijk en foetaal celvrij DNA kunnen gebruikt worden voor de ontwikkeling van prenatale testen. Het meest voor-de-hand liggende voorbeeld is de aanwezigheid van het Y-chromosoom bij een mannelijke foetus. De ontwikkeling van een niet-invasieve prenatale test om het foetale geslacht te bepalen verliep succesvol en is in Nederland geïmplementeerd voor de indicatie geslachtsgebonden afwijking bij de foetus en congenitaal adrenogenitaal syndroom.⁷ Ook niet-invasieve bepaling van de foetale RhD-status in zwangerschappen van een RhD-negatieve zwangere heeft zijn weg naar de kliniek gevonden.^{8,9}

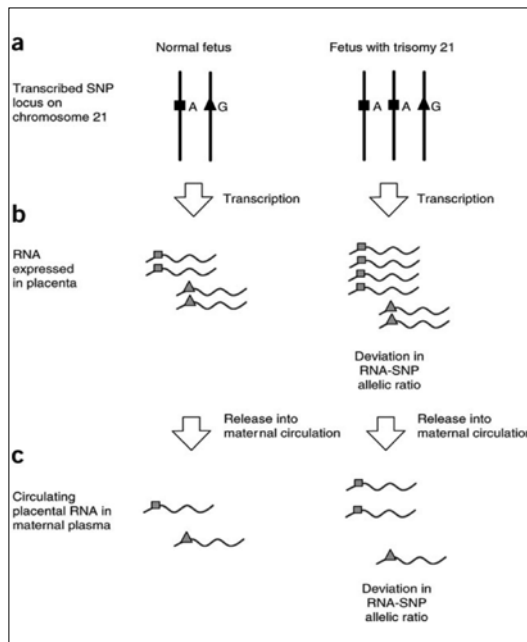
Voor aneuploidiedetectie ligt de situatie ingewikkelder. Voor bijvoorbeeld trisomie 21 geldt dat hetzelfde chromosoom 21 zowel bij de moeder als bij de foetus voorkomt.

Het is goed om vooraf vast te stellen aan welke voorwaarden een test voor niet-invasieve aneuploidiede-

tectie idealiter zou moeten voldoen:

1. specificiteit en sensitiviteit grenzend aan 100%;
2. beschikbaar en zo mogelijk toepasbaar voor alle zwangerschappen;
3. uitvoerbaar vanaf het eerste trimester;
4. geschikt en dus uitvoerbaar voor populatiebrede implementatie;
5. tegen redelijke kosten;
6. praktisch uitvoerbaar in klinische setting;
7. technisch uitvoerbaar in routine laboratorium setting.

Om onderscheid te kunnen maken tussen foetale trisomie en disomie 21 zijn ingenieuze strategieën ontwikkeld. Een uitdaging hierbij is dat van het circulerend *cell-free*-DNA in moederlijk bloed slechts 3-6% (range 0,4-11%) foetaal van origine is.¹⁰ De ontwikkelingen op technologisch gebied hebben recent een enorme vlucht genomen, waardoor met verschillende technieken het nu mogelijk blijkt om foetaal genetisch materiaal in moederlijk bloed betrouwbaar te onderzoeken. Grofweg kan onderscheid gemaakt worden tussen *targeted* testen en kwantitatieve testen. Bij *targeted* testen wordt eerst het gedeelte van het foetale DNA waarin men geïnteresseerd is geïdentificeerd en vervolgens wordt dat specifieke DNA gebruikt voor de test, bijvoorbeeld op trisomie 21. Bij kwantitatieve testen wordt al het *cell-free*-DNA gekwantificeerd.



Figuur 1. Schematische weergave van de allelratio-strategie. Gebruikmakend van de allelratio van een specifieke heterozygote SNP op celvrij foetaal mRNA, kan aneuploidie van de foetus onderzocht worden in het plasma van een zwanger vrouw.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Medicine* 2007;13(2):218-23.

Targeted testen

Een voorbeeld van *targeted* testen is de RNA-*single nucleotide polymorphisme* (SNP) allelratiostrategie, een ingenieuze strategie ontwikkeld door Lo et al.¹¹, waarbij gebruik gemaakt wordt van de verhouding tussen de allelen, waarop een specifiek SNP gelegen op een specifiek stukje gen aanwezig is. Het principe wordt weergegeven in figuur 1. In de studie van Lo et al. werd de hypothese gesteld dat verschillen in allelratio die bij een foetus aanwezig zijn, ook in het plasma van een zwangere vrouw terug gevonden kan worden. De strategie werd getest in placentamateriaal en in plasmasamples verkregen van trisomie 21 en euploïde zwangerschappen. De sensitiviteit bleek bij deze eerste studie 90% en de specificiteit 96,5%. Het grote nadeel van deze benadering is dat de toepasbaarheid afhangt van het heterozygotiepercentage. Voor de geteste SNP op PLAC4 (gelegen op chromosoom 21) is het heterozygotiepercentage 0,45. Dat betekent dat de test voor minder dan 50% van de zwangere vrouwen bruikbaar is. Het is een mogelijkheid om meerdere SNP's te combineren om tot een hogere populatiedekking te komen. Op basis van studies lijkt dat inderdaad mogelijk.¹² Er zijn nog geen publicaties verschenen waarin de diagnostische waarde van deze techniek in grote patiëntengroepen getest is. Het komende jaar kan wel een grote studie verwacht worden waarin de diagnostische waarde van een techniek geanalyseerd wordt, die gebruik maakt van tandem-SNP's. Met de strategie, die gebruik maakt van tandem-SNP's, bleek in de eerste studie met 27 samples alle trisomie 21-zwangerschappen gedetecteerd te kunnen worden.¹³

Kwantitatieve testen

Veelbelovend en van recente datum is de kwantitatieve strategie waarbij gebruik gemaakt wordt van *massively parallel sequencing* (MPS) ook wel *next generation sequencing* genoemd. Hierbij worden miljoenen korte stukjes DNA gesequenced door gebruik te maken van het zogenaamde *high-throughput shotgun sequencing*. Over- en onderrepresentatie van chromosomen kan zo aangetoond worden. In de studie door Fan et al. bleek het mogelijk om onderscheid te maken tussen foetussen met trisomie 21 (6), trisomie 18 (1) en trisomie 13 (1) ten opzichte van foetus met normaal aantal chromosomen (6).¹⁴ Een tweede studie afkomstig van een andere onderzoeksgroep werd enkele maanden later gepubliceerd. Ook in deze studie kon onderscheid gemaakt worden tussen trisomie 21- en disomie 21-samples.¹⁵ Het voordeel van deze benadering is dat in eenzelfde sample meerdere aneuploidie tegelijk bestudeerd kunnen worden. In de eerste studie werd beschreven dat er per apparaat zestien samples per week bepaald kunnen worden. Te verwachten valt dat de ontwikkeling op dit gebied snel gaat en dat het aantal samples

dat per week per apparaat bepaald kan worden zal toenemen en dat de kosten per sample zullen dalen. Studies waarbij 96 samples parallel worden getest, worden op dit moment uitgevoerd.

Een doorbraak in de ontwikkeling van een bloedtest om trisomie 21 in het bloed van een zwangere te diagnosticeren is de publicatie van grotere patiëntenstudies. Twee recent gepubliceerde studies waarin de testeigenschappen op 'geblindeerde' samples werden onderzocht in respectievelijk 314 en 480 samples, rapporteerden een sensitiviteit van 100% in beide, en een specificiteit van 97,7% en 99,7% (zie tabel 1).^{16,17}

Situatie in Nederland

In Nederland worden desgewenst alle zwangeren gecounseld over prenatale screening, waarbij men mag kiezen voor de eerstetrimestercombinatietest (CT) om de kans op trisomie 21, 18 en 13 te bepalen. Een belangrijke vraag is wat de plaats zou zijn van een nieuwe bloedtest op trisomie 21 met aan diagnostiek grenzende testeigenschappen. In de literatuur over de niet-invasieve genetische testen wordt als het grote voordeel en de motivatie voor de ontwikkeling van dergelijke testen de diagnostische waarde genoemd, de vervanger van de vruchtwaterpunctie en de vlokkentest. Echter de situatie is op dit moment zo dat het detectiepercentage op grond van de huidige studies weliswaar 100% blijkt te zijn maar het fout-positieve percentage 0,3-2,1%. Het lijkt de auteurs ondenkbaar dat een zwangerschap afgebroken wordt terwijl er een kans bestaat dat er geen foetale trisomie 21 aanwezig blijkt te zijn. Naar verwachting zal een invasieve diagnostische test, die 100% zekerheid verschaft, een onderdeel van de diagnostiek blijven. Aan de andere kant, stel dat een zwangere vrouw, die ervoor kiest om een screenende test op trisomie 21 te laten uitvoeren, kan kiezen tussen verschillende screenende testen. Eén met een detectiepercentage van 75- 85% en een fout-positief percentage variërend van 5 tot 12% of één met detectiepercentage van 100% en een fout-positief percentage van 0,3-2,1%. Welke van de twee testen zal zij kiezen? Welke van

de twee testen zult u haar als arts of verloskundige aanraden? Als deze keuze vrij zou zijn van kosten- of capaciteitsaspecten, kiest een weldenkend mens voor de test met de beste testeigenschappen. De auteurs zouden deze 'foetale DNA-bloedtest op trisomie 21' dan ook plaatsen als een screenende test die de CT vervangt. Dat biedt bovendien andere voordelen. De test, laboratoriumbepaling en berekening van de uitslag, kan dan op één plaats uitgevoerd worden. In tegenstelling tot de CT. Bij de CT worden twee testen op verschillende plaatsen uitgevoerd en vervolgens moeten de uitkomsten geïntegreerd worden tot één uitslag. De kwaliteitsbewaking van de beide onderdelen, de laboratoriumbepaling en van de echoscopische *nuchal translucency*-meting is bovendien intensief en tijdrovend. Tijd en kosten die hiermee gemoeid zijn, kunnen sterk gereduceerd worden. Een ander voordeel van deze 'foetale DNA bloedtest op trisomie 21' is dat de termijn waarop de test uitgevoerd kan worden minder begrensd is. In principe kan de test vanaf tien weken zwangerschapsduur verricht worden. De mate van betrouwbaarheid en de wenselijkheid om deze test in het eerste trimester uit te voeren, moet nader onderzocht worden. Het feit dat de vruchtwaterpunctie of vlokkentest als definitieve diagnostische test blijft bestaan, is bij genoemde testeigenschappen een beperkt probleem. Het geeft een bevestiging van alle trisomie 21-zwangerschappen. En het aantal patiënten dat een punctie laat uitvoeren terwijl er een normaal karyogram blijkt te zijn, is zeer beperkt.

Er wordt op dit moment gesproken over het opzetten van een nationaal project dat zich niet alleen richt op keuze van de techniek, de reproduceerbaarheid van de testeigenschappen op Nederlandse bodem en de plaats van de test. Ook kosten- en capaciteitsaspecten zijn belangrijke kwesties en dienen betrokken te worden bij het onderzoek naar deze testen. Onderzoek naar de psychosociale en medisch-ethische aspecten zullen gekoppeld moeten worden. Benadrukt dient te worden dat de waarde van de pretest counseling onverminderd groot blijft. De stelling dat de waarde van de pretest counseling even-

	Chui BMJ 2011	Ehrich AJOG 2011
Techniek	MPS	MPS
	2-plex	4-plex
	2.3 milj reads/sample	3-5 milj reads/sample
Inclusie	314	480
	na CT, verhoogde kans uitslag	na CT, verhoogde kans uitslag
Aantal trisomie 21-samples	36	42
Detectiepercentage	100%	100%
Fout-positief percentage	2,10%	0,30%

Tabel 1. Overzicht van onderzoeksopzet en testeigenschappen van trisomie 21-detectie door middel van MPS-techniek, resultaten van twee patiëntenstudies.

redig toeneemt met de kwaliteit van een dergelijke niet-invasieve prenatale test, kan onderzocht worden.

Toekomstscenario's....

Indien deze foetale DNA-bloedtest op trisomie 21 aan diagnostiekgrenzende testeigenschappen blijkt te bezitten, lijkt het de auteurs een uitgelezen moment om zowel de leeftijdindicatie voor vruchtwaterpunctie of vlokkentest af te schaffen, als de vergoeding voor de test voor elke zwangere in het basispakket te realiseren. Deze ongelijkheid is ook nu al vele gynaecologen een doorn in het oog. Uit een eerste evaluatie van de CT¹⁸ blijkt dat afschaffing van de leeftijdindicatie voor invasieve diagnostiek en realisatie van vergoeding voor de test voor elke zwangere in het basispakket thans reeds aangewezen is.

De vraag is wat de plaats zal worden van de NT-meting. In het kader van de kansbepaling op trisomie zal de NT-meting dan geen functie meer hebben. Een verdikte NT ($\geq 3,5$ mm) kan echter ook een aanwijzing zijn voor andere foetale afwijkingen. Het zou een aparte onderzoekspoot van het grote project kunnen zijn wat de waarde van NT-meting is, los van trisomie 21-detectie. Mogelijk komt er in de toekomst meer ruimte voor de ontwikkeling van mogelijkheden om de invloed van het derde chromosoom 21 uit te schakelen, zodat bij vroege detectie van trisomie 21 niet alleen doorgaan met de zwangerschap of afbreken tot de mogelijkheden behoort, maar wellicht ook foetale behandeling.

Conclusie

Het onderzoek naar niet-invasieve prenatale testen op trisomie 21 maakte de laatste tien jaar een enorme ontwikkeling door, voornamelijk ten gevolge van de technische ontwikkelingen. Vele proof of principle-studies zijn gepubliceerd waarin strategieën en technieken werden onderzocht op kleine aantallen patiëntmateriaal. De resultaten van studies naar testeigenschappen van de MPS-techniek in grote patiëntengroepen zijn veelbelovend, waardoor beschikbaarheid voor de patiëntenzorg een stap dichterbij gekomen is.

Literatuur

- Go AT, Vugt JM van, Oudejans CB. Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities. *Hum Repr Update* 2011;17:372-82.
- Jaarverslag 2005. Werkgroep Prenatale Diagnostiek en Therapie.
- Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY 1 data. *National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. Prenat Diagn* 2002;22(7):609-15.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350(9076):485-7.
- Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46(11):1832-4.
- Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(8):4748-53.
- Rijnders RJ, Christiaens GC, Bossers B, Smagt JJ van der, Schoot CE van der, Haas M de. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet Gynaecol* 2004;103(1):157-64.
- Bianchi D, Avent N, Costa J, Schoot CE van der. Current Commentary: Non-invasive prenatal diagnosis of fetal Rhesus D: ready for prime(r) time. *Obstet Gyn* 2005;106(4):682-3.
- www.sanquin.nl
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Genet* 1998;62(4):768-75.
- Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007;13:218-23.
- Go AT, Visser A, Mulders MA, Blankenstein MA, Vugt JM, Oudejans CB. 44 single-nucleotide polymorphisms expressed by placental RNA: assessment for use in non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Clin Chem* 2007;53:2223-4.
- Ghanta S, Mitchell ME, Ames M, Hildestrand M, Simpson P, Goetsch M, et al. Non-invasive prenatal detection of trisomy 21 using tandem single nucleotide polymorphisms. *PLoS ONE* 2010;5(10), e13184 1-10.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Non-invasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(42):16266-71.
- Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:20458-63.
- Chiu RWK, Akolekar R, Zheng YWL, Leung TY, Sun H, Chan KCA, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale

- validity study. *BMJ* 2011;342:c7401 1-9.
18. Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *AJOG* 2011;204:205,e1-11.

19. Engels MAJ, Heijboer AC, Blankenstein MA, Vugt JMG van. Performance of first trimester combined test in different maternal age groups: reason for adjustment in screening policy? *Prenatal Diagnosis*, in press 2011.

Samenvatting

Sinds 1 januari 2007 wordt aan alle zwangere vrouwen in Nederland de eerstetrimestercombinatietest als screeningstest op trisomie 21 aangeboden. Beschikbaarheid van een niet-invasieve (bloed) test met diagnostische eigenschappen zou ideaal zijn. In bloed van zwangere vrouwen kan foetaal DNA en placenta mRNA gedetecteerd worden. Dit genetische materiaal is een reservoir van mogelijke biomarkers voor de ontwikkeling van niet-invasieve prenatale testen met diagnostische mogelijkheden. In kleine studies en modelsystemen konden technieken en strategieën voor niet-invasieve trisomie 21-detectie worden aangetoond. *Massively parallel sequencing of next generation sequencing* lijkt op dit moment de meest veelbelovende techniek. Dit jaar werden twee grotere patiëntenstudies gepubliceerd met fraaie resultaten; 314 en 480 vroegtwede-trimesterbloedsamples werden getest op trisomie 21. De gevonden testeigenschappen lieten een sensitiviteit van 100% en een specificiteit van respectievelijk 97,7 en 99,7% zien. Implementatie van deze test in Nederland dient bestudeerd te worden.

Trefwoorden

trisomie 21, niet-invasieve, prenatale testen, *next generation sequencing*

Summary

In the Netherlands since 2007 the first trimester combination test, as screening test for trisomy 21, is offered to all pregnant women. The availability of a non-invasive (blood) test with diagnostic qualities would be ideal. In blood of pregnant women foetal DNA and placental mRNA can be detected.

This genetic material provides a reservoir of possible biomarkers for the development of non-invasive prenatal tests with diagnostic potentials. In small studies and model systems strategies and techniques for non-invasive trisomy 21 detection are demonstrated. Massively parallel sequencing or next generation sequencing seems to be the most promising technique. Recently two patient studies have been published with promising results; 314 and 480 early second trimester blood samples have been tested on trisomy 21. Test qualities found, were a sensitivity of 100% and a specificity of respectively 97.7 and 99.7 %. Implementation of this test in the Netherlands should be studied.

Keywords

Trisomy 21, non-invasive, prenatal, massively parallel sequencing

Gemelde (financiële) belangenverstrengeling
geen

Auteurs

Dr. A.T.J.I. Go, gynaecoloog-perinatoloog, Erasmus MC, Rotterdam

Dr. D. Oepkes, gynaecoloog-perinatoloog, LUMC, Leiden

Prof. dr. J.M.G. Van Vugt, gynaecoloog-perinatoloog, hoogleraar Foetale Geneeskunde, UMC St Radboud

Correspondentieadres

Dr. A.T.J.I. Go

E-mail: A.Go@erasmusmc.nl