

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
(Direktor: Univ. - Prof. Dr. D. Neumeier)

**Serumbestimmungen von freiem β -hCG und PAPP-A
mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassays –
Einfluss auf die diagnostische Trennschärfe beim
Ersttrimester-Screening**

Javier Urbano Ortiz Velásquez

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. P. B. Lippa

2. Univ. - Prof. Dr. K.-Th. M Schneider

Die Dissertation wurde am 31.03.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.07.2010 angenommen.

Für Claudia, Camila Sofia und Ana Isabel

INHALTSVERZEICHNIS 3-4

1 EINLEITUNG 5-15

2 ZIELE DER ARBEIT 16

3 MATERIAL UND METHODEN 17-21

3.1 Probenmaterial

3.2 Freies β -hCG und PAPP-A-Bestimmung

3.3 Statistische Auswertung

4 ERGEBNISSE 22-34

4.1 Charakterisierung der Studienpopulation

4.2 Charakterisierung des freien β -hCG- und PAPP-A-Profiles

4.3 Methodenvergleich

4.3.1 KRYPTOR freies β -hCG aktuell versus (vs.) KRYPTOR freies β -hCG original

4.3.2 Elecsys freies β -hCG vs. KRYPTOR freies β -hCG

4.3.3 Elecsys freies β -hCG vs. IMMULITE 2000 freies β -hCG

4.3.4 KRYPTOR PAPP-A aktuell vs. KRYPTOR PAPP-A original

4.3.5 Elecsys PAPP-A vs. KRYPTOR PAPP-A aktuell

4.3.6 Elecsys PAPP-A vs. IMMULITE 2000 PAPP-A

4.4 Charakterisierung des Risikos für Trisomie 21

5 DISKUSSION 35-57

5.1 Statistischer Methodenvergleich

5.1.1 KRYPTOR freies β -hCG aktuell vs. KRYPTOR freies β -hCG original

5.1.2 Elecsys freies β -hCG vs. KRYPTOR freies β -hCG aktuell

5.1.3 Elecsys freies β -hCG vs. IMMULITE 2000 freies β -hCG

5.1.4 KRYPTOR PAPP-A aktuell vs. KRYPTOR PAPP-A original

5.1.5 Elecsys PAPP-A vs. KRYPTOR PAPP-A aktuell

5.1.6 Elecsys PAPP-A vs. IMMULITE 2000 PAPP-A

5.2 Risikoabschätzung für Trisomie 21

5.2.1 Hintergrundrisiko

5.2.2 Serumwerte

5.2.3 Adjustiertes Risiko

5.2.3.1 AR bei unauffälligen freien β -hCG (< 2,0 MoM)- sowie PAPP-A (>0,50 MoM)-Werten und niedrigem HR (< 1:300)

5.2.3.2 AR bei unauffälligen freien β -hCG (< 2,0 MoM)- sowie PAPP-A (> 0,50 MoM)-Werten und hohem HR (\geq 1:300)

5.2.3.3	AR bei freiem β -hCG-Wert $\geq 2,0$ MoM sowie unauffälligem PAPP-A-Wert ($> 0,50$ MoM) und niedrigem HR	
5.2.3.4	AR bei freiem β -hCG-Wert $\geq 2,0$ MoM sowie unauffälligem PAPP-A-Wert ($> 0,50$ MoM) und hohem HR	
5.2.3.5	AR bei PAPP-A-Wert $\leq 0,50$ MoM sowie unauffälligem freien β -hCG-Wert ($< 2,0$ MoM) und niedrigem HR	
5.2.3.6	AR bei PAPP-A-Wert $\leq 0,50$ MoM sowie unauffälligem freien β -hCG-Wert ($< 2,0$ MoM) und hohem HR	
5.2.3.7	AR bei freiem β -hCG-Wert $\geq 2,0$ MoM sowie PAPP-A-Wert $\leq 0,50$ MoM und niedrigem HR	
5.2.3.8	AR bei freiem β -hCG-Wert $\geq 2,0$ MoM sowie PAPP-A-Wert $\leq 0,50$ MoM und hohem HR	
5.2.3.9	Verteilung des AR bei allen Patientinnen des Studienkollektivs	
5.3	Mögliche Strategien zur Verbesserung der Aussagekraft des Ersttrimester- Screenings	
5.4	Prädiktion geburtshilflicher Komplikationen durch Serumhormone	
5.5	Neue Serummarker für Trisomie 21	
5.6	Nicht invasive Pränataldiagnostik	
6	ZUSAMMENFASSUNG	58-59
6.1	Hintergrund	
6.2	Material und Methoden	
6.3	Ergebnisse	
6.4	Schlussfolgerung	
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	60
8	LITERATURVERZEICHNIS	61-78
9	DANKSAGUNG	79
10	ERKLÄRUNG	80
11	LEBENS LAUF	81-84

1. EINLEITUNG

Der englische Neurologe und Apotheker John Langdon-Down (1828 – 1896) beschrieb das nach ihm benannte Down-Syndrom 1866 zum ersten mal unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten als eigenständiges, von anderen Erkrankungen und Behinderungen abgrenzbares Syndrom. Erst 1959 erkannte der französische Genetiker Jerome Lejeune die Trisomie 21 als genetische Ursache des Syndroms (Bianchi 2000, S. 1007).

Es werden vier Formen der Trisomie 21 unterschieden (Jones 1997, S. 10, Nicolaidis 1998, S. 314, Antonarakis 1990, S. 968):

1. Freie Trisomie 21 (ca. 95%): Sie entsteht aufgrund meiotischer Non-disjunction. In allen Körperzellen ist das Chromosom 21 komplett dreifach vorhanden.
2. Translokations-Trisomie 21 (ca. 3%): Eines der Chromosomen 21 hat sich an ein anderes Chromosom angelagert. Oft an eines der Nummern 13, 14, 15 oder 22, selten auch an eines mit der Nummer 21, so dass es in allen Körperzellen drei Kopien des Chromosoms 21 gibt.
3. Mosaik-Trisomie 21 (ca. 2-3%): Sie entsteht durch mitotische Non-disjunction, erst nach der ersten Zellteilung einer befruchteten Eizelle. Es gibt nicht nur Körperzellen mit dem dreifachen Chromosom 21 sondern auch gleichzeitig eine Zelllinie mit dem üblichen Chromosomensatz.
4. Partielle Trisomie 21: Dieser Typus ist äußerst selten. Die Chromosomen 21 liegen zwar wie üblich zweifach in allen Körperzellen vor, allerdings ist ein Teil eines der beiden Chromosomen 21 verdoppelt, wodurch eines der Chromosomen 21 etwas länger als das andere ist. Die Erbsinformationen in diesem Abschnitt liegen somit dreifach vor.

Die Trisomie 21 zählt nicht zu den Erbkrankheiten im engeren Sinne. Ihre verschiedenen Formen entstehen spontan und können nur dann im Sinne einer Erbkrankheit vererbt werden, wenn die Mutter bereits selbst Down-Syndrom hat.

Mit zunehmendem Alter der Mutter steigt die Wahrscheinlichkeit für die Geburt eines Kindes mit Trisomie 21 (Baraitser 2001, S. 1). Dies lässt vermuten, dass generell Schädigungen von Eizellen, sei es durch äußere Einflüsse wie Strahlung oder durch

den natürlichen Vorgang des Alterns, die Fehlerhäufigkeit während der Meiose steigert. Die Wahrscheinlichkeit für eine Frau im Alter von 25 Jahren mit einem Kind mit Down-Syndrom schwanger zu werden, liegt bei weniger als 0,1%, im Alter von 35 Jahren bei 0,3%, im Alter von 40 Jahren bei 1% und im Alter von 48 Jahren bei 9%. Dennoch werden in den westlichen Ländern die meisten Babys mit Down-Syndrom, die lebend zur Welt kommen, von Müttern unter 35 Jahren geboren.

Die Trisomie 21 ist die bei Neugeborenen häufigste Chromosomenaberration. In Abhängigkeit von der mütterlichen Altersverteilung in einer Bevölkerung liegt die durchschnittliche Häufigkeit (Prävalenz) zwischen etwa 1:500 bis 1:800. In Deutschland liegt die Prävalenz zurzeit (2006) bei etwa 1:500 (Statistisches Bundesamt) und es werden jährlich ca. 1200 Kinder mit Down Syndrom geboren. Neben für das Syndrom als typisch geltenden körperlichen Merkmalen sind in der Regel die kognitiven Fähigkeiten des betroffenen Menschen in unterschiedlichem Maße beeinträchtigt.

Die erste Screening-Methode für Trisomie 21 wurde in den frühen siebziger Jahren eingeführt. Sie basierte auf der Assoziation mit fortgeschrittenem mütterlichen Alter. Da die Amniozentese ein Fehlgeburtsrisiko und Kosten mit sich brachte, wurde sie nur schwangeren Frauen mit einer mütterlichen Alter von mindestens 40 Jahren angeboten. Als sich die Fruchtwasseruntersuchung weiter verbreitete und „sicher“ zu sein schien, wurde die Gruppe der „Hoch-Risiko Patientinnen“ neu definiert mit einem Mindestalter von 35 Jahren, die 5% der schwangeren Bevölkerung darstellte (Snijders 2004, S. 12). In dieser Gruppe sind ca. 20-30% der Trisomie 21 Babys enthalten. In den letzten Jahren hat sich das mütterliche Alter in den meisten Industrieländern erhöht, was nun zu etwa 15% der Patientinnen in der „Hoch-Risiko Gruppe“ führt.

In den späten achtziger Jahren wurde eine neue Screening-Methode eingeführt, die nicht nur das mütterliche Alter, sondern auch die Konzentration verschiedener fetoplazentarer Produkte im mütterlichen Serum berücksichtigte (Haddow 1999, S. 380). Nach 16 Schwangerschaftswochen (SSW) unterscheiden sich die medianen mütterlichen Serumkonzentrationen für Alpha-Fetoprotein (AFP), unkonjugiertes Östriol (μE_3), humanes Chorion Gonadotrophin (hCG) (totales und freies β) und

Inhibin-A in Trisomie 21-Schwangerschaften ausreichend von normalen Schwangerschaften. Diese Screening-Methode ist effektiver als das mütterliche Alter allein und für die gleiche Rate invasiver Tests (etwa 5%) kann sie etwa 60 - 70% der Feten mit Trisomie 21 identifizieren (Cuckle 2000, S. 98). Eine exakte Berechnung des Schwangerschaftsalters ist zwingend notwendig, da schon eine Abweichung von nur drei Tagen mit einer signifikant höheren falsch-positiven Rate assoziiert sein kann.

Im Jahre 1992 ergab eine Studie, bei der bei 827 Feten die Nackentransparenz (NT) vor Chorionzottenbiopsien für eine Karyotypisierung gemessen wurde, dass bei einem hohen Prozentsatz der chromosomal abnormalen Feten die NT erhöht war (Nicolaidis 1992, S. 868).

Daher wurde in den neunziger Jahren ein Screening basierend auf dem mütterlichen Alter und der fetalen Nackentransparenzmessung zwischen 11 - 13+6 SSW eingeführt. Es wurde gezeigt, dass diese Methode bei einem Risiko cut-off von 1:300 etwa 75% der von Trisomie 21 betroffenen Feten für eine falsch-positive Rate von 5% identifizieren kann (Snijders 1998 S. 345, Pandya 1995, S. 957).

Die NT ist definiert als eine physiologische kutane Flüssigkeitsansammlung im Bereich des fetalen Nackens im ersten Schwangerschaftstrimenon. Sonographisch stellt sie sich als echoleerer Raum zwischen Haut und bindegewebigen Anteilen der Halswirbelsäule dar (Abbildung 1).

Eine erhöhte NT ist mit Trisomie 21 vergesellschaftet (Abbildung 2) (Nicolaidis 2004, S. 50, Gasiorek-Wiens 2001, S. 646). Die Inzidenz dieser Anomalien hängt von der Dicke der NT ab, nicht vom Erscheinungsbild. Die fetale NT steigt mit der Scheitel-Steiß-Länge (SSL) (Abbildung 3) und daher ist die Berücksichtigung des Schwangerschaftsalters für die Beurteilung wesentlich, ob eine vorgegebene NT erhöht ist (Schuchter 1998, S. 281). In einer Studie an 96 127 Schwangerschaften betrug der Median bzw. die 95. Perzentile bei einer SSL von 38 mm jeweils 1.3 mm bzw. 2.2 mm, bei einer SSL von 84 mm jeweils 1.9 mm bzw. 2.7 mm (Snijders 1998, S. 344).

Die pathophysiologischen Grundlagen der Entstehung einer erhöhten NT sind noch unklar. Zur Zeit werden Störungen im Abfluss des lymphatischen oder venösen Systems, temporäre kardiale Funktionsstörungen, intrathorakale Kompression, eine

Einleitung

veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, fetale Anämie, fetale Hypoproteinämie oder fetale Infektion diskutiert (Axt-Fliedner 2009, S. 558 - 559, Eiben 2000, S. 1174).



Abbildung 1: Messung der Nackentransparenz



**Abbildung 2: Erhöhte Nackentransparenz
(> 95. P.) bei Trisomie 21**



Abbildung 3: Messung der Scheitel-Sreiß-Länge

Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine angemessene Ausbildung von Ultraschalldiagnostikern und die Beibehaltung einer Standardtechnik für die Messung der NT wesentliche Vorbedingungen für die Durchführung eines solchen Screenings sind. Außerdem hängt der Erfolg des Screening-Programms von der Präsenz eines Systems von wiederkehrender Auditierung der Ergebnisse und andauernder Beurteilung der Ultraschallbilder ab (Snijders 2002, S. 358, Schielen 2006, S. 716, Sheppard 2007, S. 107, Evans 2007, S. 401). Die in Großbritannien registrierte gemeinnützige Organisation Fetal Medicine Foundation (FMF) hat einen Prozess von Ausbildung und Qualitätssicherung weltweit etabliert, um das NT-Screening angemessen in die klinische Praxis einzuführen.

Bereits anfangs der 90er-Jahre konnte gezeigt werden, dass die freie Untereinheit des β -hCG bei Trisomie-21-Schwangerschaften erhöht ist. Weiter wurde nachgewiesen, dass das schwangerschaftsassozierte Plazentaprotein-A (PAPP-A) bei aneuploiden Schwangerschaften erniedrigt ist im Vergleich zu Euploiden (Zimmermann 2002, S. 625). Die Detektionsrate für Trisomie 21 mittels mütterlichen Alters und der Serumbiochemie beträgt 65% bei einer falsch-positiven Rate von 5%. Anschließend wurde das mütterliche Alter mit der fetalen NT und mütterlichen Serumbiochemie durch die Bestimmung von freiem β -hCG und PAPP-A im ersten Trimenon kombiniert, um so 85-90% der betroffenen Feten identifizieren zu können,

bei einer falsch-positiven Rate von 5% (Soergel 2006, S. 267). Es besteht keine signifikante Assoziation zwischen der fetalen NT und dem freien β -hCG und PAPP-A im mütterlichen Serum weder bei der Trisomie 21 noch bei chromosomal normalen Schwangerschaften. Deswegen sind die NT und biochemische Marker kombinierbar, um ein effektiveres Screening als durch jede Methode für sich zu erreichen (Spencer 1999, S. 233).

Humanes Choriongonadotropin (hCG) ist ein Glykohormon (~37 kDa), das aus zwei nicht kovalent gebundenen Untereinheiten, der α - und β -Kette (~15 bzw. 22 kDa), besteht. Diese Untereinheiten können daher auch in freier oder ungebundener Form vorliegen (Pierce 1981, S. 469). Das Protein wird von Trophoblastgewebe produziert und dient dazu, den Gelbkörper während der ersten Schwangerschaftswochen zu erhalten (Cole 1997, S. 2233). Darüber hinaus beeinflusst es auch die Steroidproduktion. Das natürliche Vorkommen von hCG ist auf Blut und Urin von Schwangeren beschränkt. Die hCG-Konzentration steigt im ersten Schwangerschaftstrimester exponentiell an und erreicht in der 10. SSW ihren Höchstwert. Der Hormonspiegel fällt in den folgenden Schwangerschaftswochen (~11-16) auf etwa ein Fünftel der Höchstkonzentration und bleibt auf diesem Niveau bis zum Ende der Schwangerschaft. Bei nicht schwangeren Frauen kann hCG von trophoblastischen und nicht trophoblastischen Tumoren sowie Keimzelltumoren mit trophoblastischen Komponenten produziert werden (Marcillac 1992, S. 3904, Alfthan 1996, S. 107).

Die α -Untereinheit ist identisch mit den α -Untereinheiten der homologen Hypophysenhormone FSH, LH und TSH. Die zugeordnete β -Untereinheit ist für das jeweilige Hormon spezifisch und somit für die unterschiedliche biologische Aktivität verantwortlich. Die β -Untereinheiten des hCG und des LH sind strukturell sehr ähnlich, worin die im Wesentlichen gleiche biologische Aktivität dieser beiden Hormone begründet liegt.

Im Serum von Schwangeren befindet sich vorwiegend intaktes hCG, wobei ein kleiner Teil der α - und β -Untereinheiten in freier Form zirkuliert. Der Anteil an freiem β -hCG im Vergleich zu intaktem hCG liegt bei durchschnittlich ca. 1%. Als Folge der Proteindegradationsprozesse können noch weitere hCG-Varianten in Blut und Urin nachgewiesen werden (z.B. nicked hCG, nicked β -hCG, β Core-Fragment) (Kardana 1992, S. 26). Jedoch nur das zusammengesetzte intakte Hormon ist biologisch aktiv.

Bei Vorliegen einer Trisomie 21 ist die mütterliche Serumkonzentration des freien β -hCG mit etwa 2.0 Multiple of the Median (MoM) höher als bei chromosomal normalen Feten (Nicolaidis 2003, S. 315, Nicolaidis 2000, S. 151, Eiben 2005, S. 282).

Das PAPP-A ist ein großes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 200 kDa und gehört zur Metzincin-Superfamilie der Zink-Peptidasen. PAPP-A wurde erstmals aus dem Serum schwangerer Frauen isoliert und seine Konzentration zeigt bis zum Ende der Schwangerschaft einen ständigen Anstieg. PAPP-A wird vom Trophoblast produziert und in das mütterliche Serum abgegeben; Es zirkuliert dort hauptsächlich (> 99%) als heterotetramerer 2:2 Komplex zusammen mit zwei Untereinheiten der Proform des eosinophilen Major-Basic-Proteins (proMBP) (Overgaard 2003, S. 2106). Die physiologische Funktion von PAPP-A ist noch unbekannt. In-vitro-Studien zeigten, dass das PAPP-A eine Protease für Insulin-like-growth-factor-bindende Proteine (IGFBP) ist. Es hemmt die IGFBP-4 und -5, so dass der Spiegel an freiem Insulin-like-growth-factor (IGF)-II erhöht ist, der wiederum eine Schlüsselrolle sowohl in plazentaren als auch in fetalen Wachstumsprozessen spielt (Giudice 2002, S. 2365, Sun 2002, S. 5238, Laursen 2001, S. 36, Lawrence 1999, S. 3153).

Bei Trisomie 21-Schwangerschaften ist seine mütterliche Serumkonzentration mit etwa 0.50 MoM erniedrigt (Nicolaidis 2003, S. 315, Nicolaidis 2000, S. 151, Eiben 2005, S. 282).

Die Konzentration der mütterlichen Serummarker (freies β -hCG, PAPP-A) wird durch eine Reihe exogener und endogener Faktoren beeinflusst:

- Maternales Gewicht: Bei erhöhtem Gewicht sind beide Marker vermindert (Spencer 2003, S. 853).
- Ethnische Gruppe: Beide Marker sind erhöht bei asiatischen und afrokaribischen Patientinnen (Leung 2006, S. 141, Spencer 2005, S. 368).
- Mehrlingsschwangerschaften: Beide Marker sind erhöht (Spencer 2008 S. 51).
- Nikotinkonsum: Der PAPP-A-Spiegel sinkt ca. 15-20% ab (Spencer 2004, S. 169, Kagan 2007, S. 851, Ardawi 2007, S. 1397).
- In-vitro-Fertilisation (IVF): Das freie β -hCG ist erhöht; das PAPP-A ist erniedrigt (Liao 2001, S. 1502, Kagan 2008, S. 496).

- Insulinpflichtiger Diabetes mellitus: Das PAPP-A ist vermindert (Spencer 2007, S. 22).
- Gravidität: Bei höherer Anzahl vorhergegangenen Graviditäten ist die Serumkonzentration beider Marker erhöht (Spencer 2007, S. 22).

Die Serumbestimmungen von freiem β -hCG und PAPP-A werden mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (Sandwich-Prinzip) mit einer Gesamtanalysezeit von je 18 Minuten an einem MODULAR ANALYTICS <E170> (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt:

- 1. Inkubation: 10 μ L Probe für die freie β -hCG-Bestimmung bzw. 15 μ L Probe für die PAPP-A-Bestimmung, ein biotinylierter monoklonaler β -hCG- bzw. PAPP-A-spezifischer Antikörper und ein mit Ruthenium(II)-Bipyridyl-Komplex markierter monoklonaler freies β -hCG- bzw. PAPP-A-spezifischer Antikörper bilden einen Sandwich-Komplex (Abbildung 4).
- 2. Inkubation: Nach Zugabe von Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln wird der Immun-Komplex mit Hilfe der Biotin-Streptavidin Wechselwirkung fest an die Oberfläche gebunden (Abbildung 5).
- Das Reaktionsgemisch wird in die Meßzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Danach werden mit ProCell die ungebundenen Substanzen entfernt (Abbildung 6, 7).
- Durch Anlegen einer Spannung wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen (Abbildung 8, 9).

Einleitung

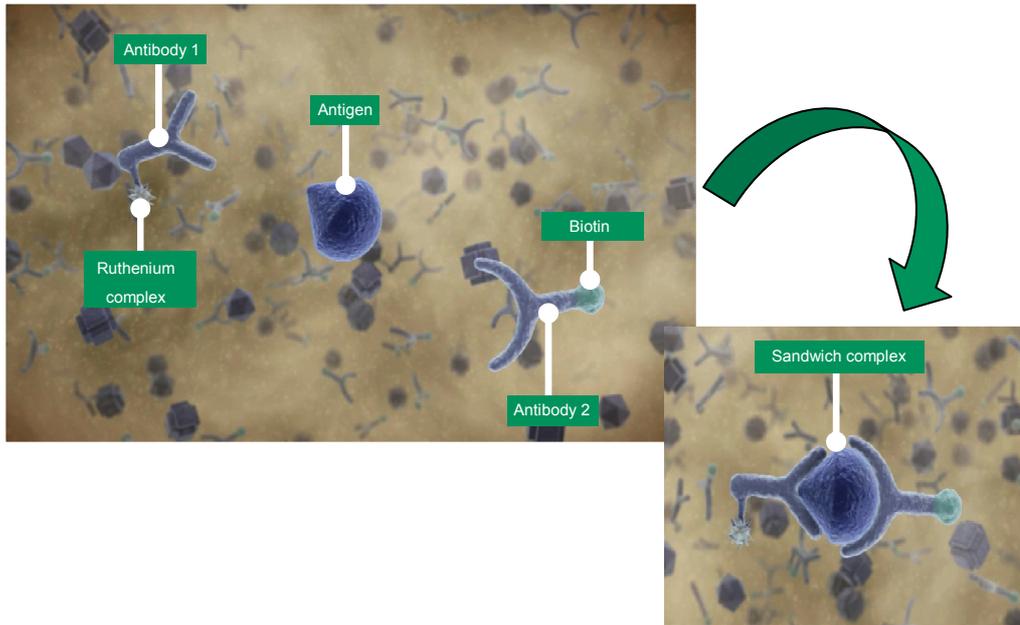
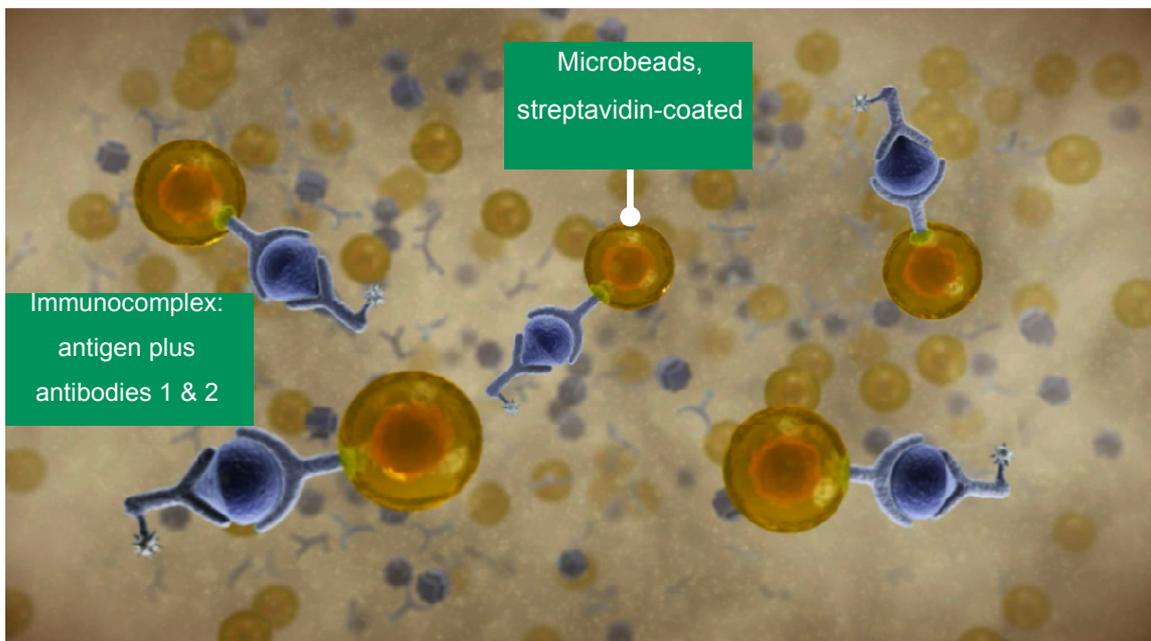


Abbildung 4: Immunkomplexbildung während der Inkubation



**Abbildung 5: Bindung des Immunkomplexes an die Microbeads
mittels der Biotin/Streptavidin Wechselwirkung**

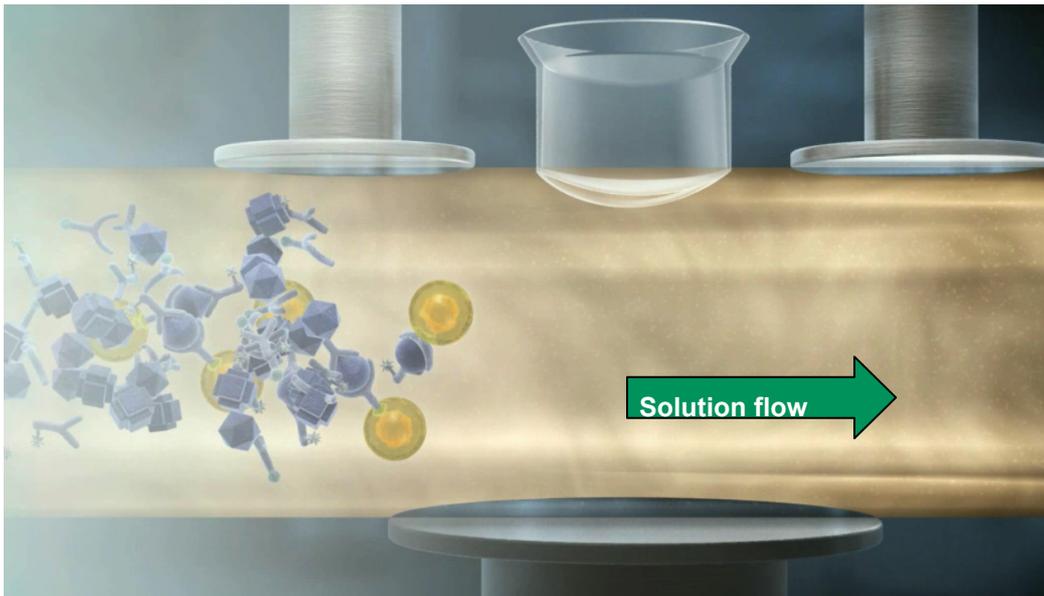


Abbildung 6: Transfer der Reaktionslösung zur Messzelle

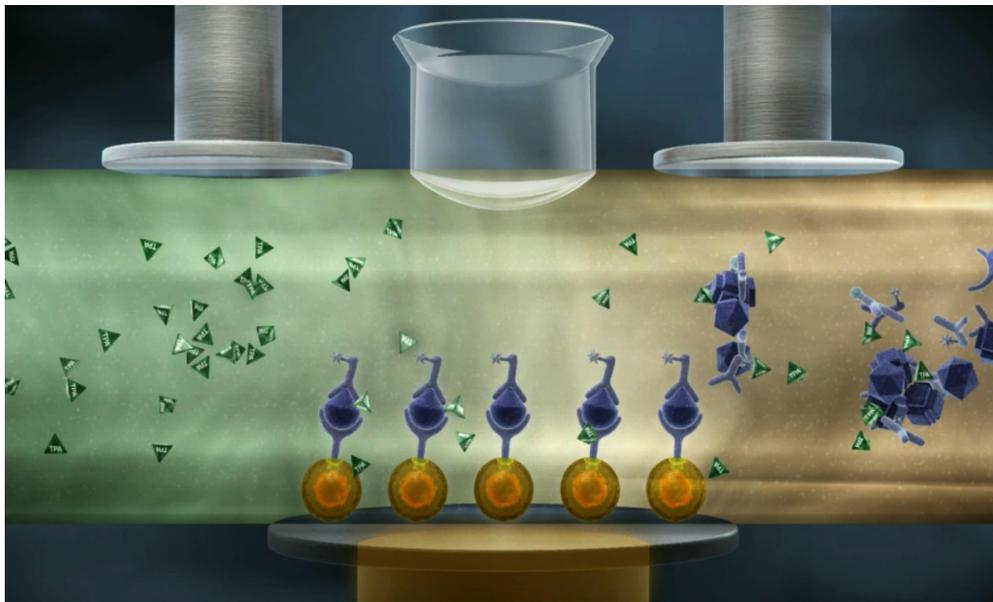


Abbildung 7: Bound-from-Free Trennung durch magnetische Anheftung der Microbeads

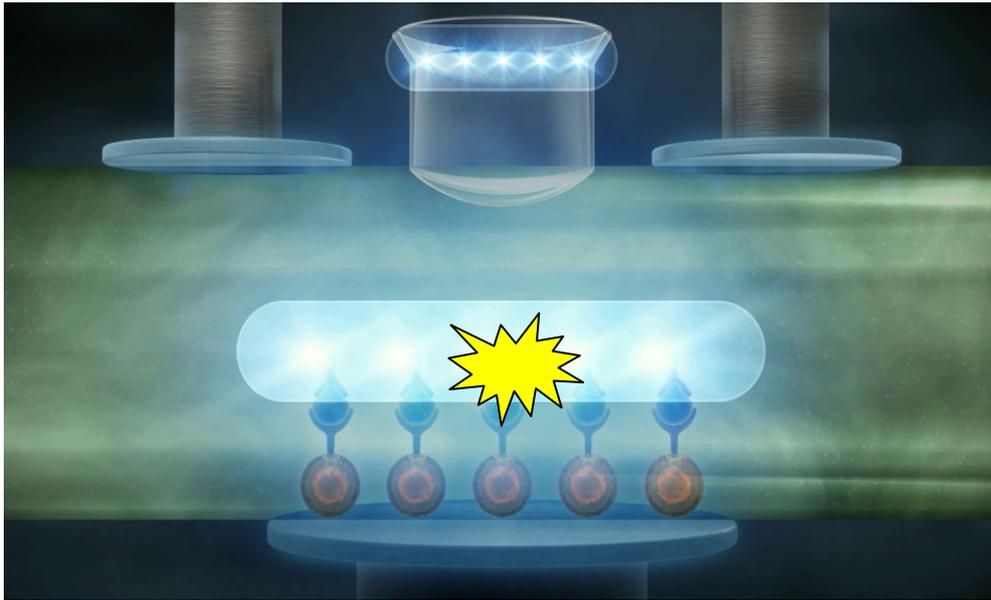


Abbildung 8: Detektion mittels Photomultiplier

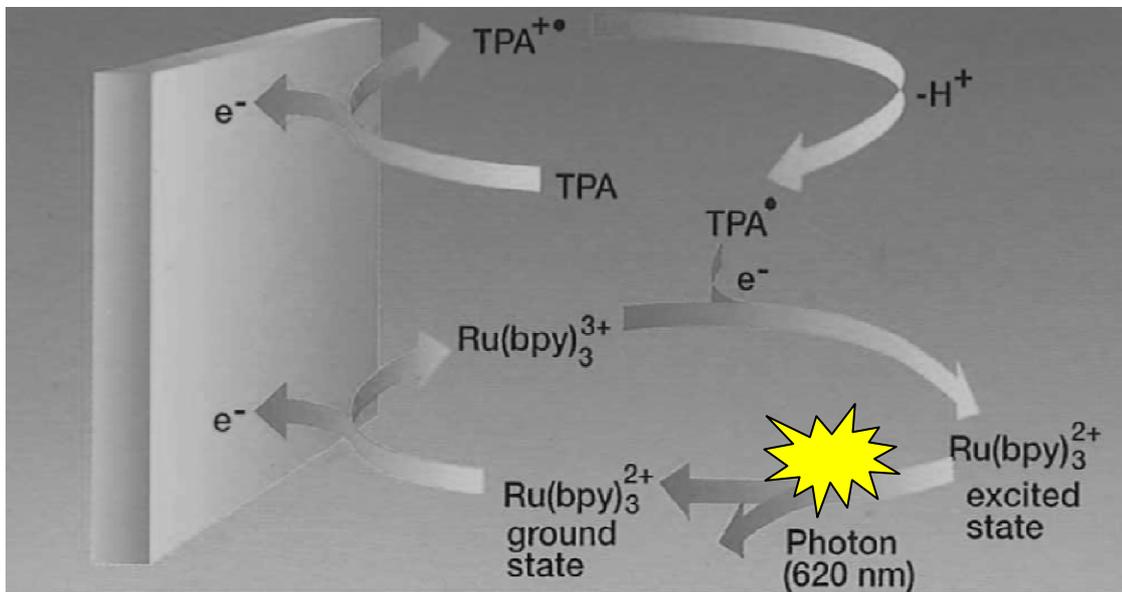


Abbildung 9: Die Electrochemilumineszenz-Reaktion

2. ZIELE DER ARBEIT

Aufgrund der gegenwärtigen Altersstruktur der Schwangeren ist bei einem Aneuploidiescreening alleinig auf der Basis des mütterlichen Alters eine niedrige Detektionsrate sowie ein sehr hoher Anteil screen-positiver und damit falsch-positiver Fälle zu erwarten. Dies führt in der Folge zu einer höheren Rate an invasiven Eingriffen mit dem damit verbundenen Abortrisiko. Moderne Konzepte zur Risikoabschätzung umfassen ein gezieltes Ersttrimesterscreening, welches nicht nur das mütterliche Alter sondern auch die Messung der NT sowie der maternalen Serumproteine freies β -hCG und PAPP-A berücksichtigt.

Die Entwicklung neuer Messsysteme der o.g. Serumhormone sollte die diagnostische Trennschärfe des Ersttrimester-Screenings verbessern.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- Einfluss von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer der Blutproben auf die Messergebnisse.
- Beurteilung der Durchführung des neuen Elecsys freies β -hCG- bzw. PAPP-A-Tests der Firma Roche Diagnostics GmbH auf MODULAR ANALYTICS <E170>.
- Vergleich der Messergebnisse der neuen Elecsys-Tests mit den Ergebnissen von zwei zugelassenen und in der Praxis häufig angewendeten Messsysteme: KRYPTOR (B.R.A.H.M.S. AG) und IMMULITE 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics).
- Einfluss der einzelnen Messmethoden auf die diagnostische Diskriminationsfähigkeit des Ersttrimester-Screenings bei euploiden Feten.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenmaterial

Wir untersuchten in April 2007 Serum-Restproben von Patientinnen, bei denen von April 2001 bis Juni 2006 ein I. Trimesterscreening durch FMF-zertifizierte Ultraschalldiagnostiker in der Abteilung für Perinatalmedizin an der Frauenklinik rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt wurde, auf freies β -hCG und PAPP-A durch drei verschiedene Messmethoden.

Voraussetzung für die Verwendung einer Restprobe war eine Einlingsgravidität; ein Gestationsalter von 10+0 bis 13+6 Schwangerschaftswochen, durch sonographische Messung der Scheitel-Steiß-Länge bestätigt bzw. berechnet; eine unauffällige Sonoanatomie des Fetus sowie die Geburt in unserer Abteilung eines phänotypisch unauffälligen Kindes auf chromosomale bzw. genetische Alterationen.

Nicht berücksichtigt wurden Restproben bei einer durch in-vitro-Fertilisation (IVF) bzw. intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) konzipierten Schwangerschaft, das Bekanntsein einer akuten und/oder chronischen Erkrankung wie primäre bzw. sekundäre Hepatopathie (Hepatitis B, Hepatitis C, Leberadenom, Hämochromatose, Morbus Wilson), das Vorhandensein eines Diabetes mellitus Typ 1-2, rheumatischer Erkrankungen, multipler Sklerose, von Karzinomen bzw. einer anderen Schwangerschaftserkrankung zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

Die Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München begutachtete die Studie und stimmte ihr zu.

3.2 Freies β -hCG- und PAPP-A-Bestimmung

Die bei -80° C gefrorenen Serum-Restproben wurden während einer Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf die Geräte MODULAR ANALYTICS <E170> (Roche Diagnostics GmbH), KRYPTOR (B.R.A.H.M.S AG) und IMMULITE 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics) des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität

München, mit den entsprechenden Reagenzien, von einer einzigen, langjährig erfahrenen medizinisch-technischen Assistentin analysiert.

Die neuen Elecsys freies β -hCG- bzw. PAPP-A-Tests der Firma Roche Diagnostics GmbH wurden auf MODULAR ANALYTICS <E170> durchgeführt. Es musste sichergestellt werden, dass die Temperatur der Blutproben, Kalibratoren und Kontrollen zur Messung 20-25° C beträgt. Auf den Geräten befindliche Proben, Kalibratoren und Kontrollen wurden wegen möglicher Verdunstungseffekte innerhalb von 2 Stunden vermessen. Die Ergebnisse wurden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Diese wird durch eine 2-Punkt-Kalibration und eine über den Reagenzbarcode mitgelieferte Masterkurve gerätespezifisch generiert.

Der freie β -hCG- bzw. der PAPP-A-Messbereich beträgt jeweils 0,1-190 IU/L bzw. 4-10000 mIU/L (definiert durch die untere Nachweisgrenze und das Maximum der Masterkurve). Werte oberhalb des Messbereichs wurden automatisch durch MODULAR ANALYTICS <E170> oder manuell um den Faktor 10 (entsprechend bis 1900 IU/L bzw. bis 100000 mIU/L) mit Elecsys Diluent Universal (Roche Diagnostics GmbH) verdünnt. Ergebnisse nach manueller Verdünnung müssen mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Nach Verdünnung durch das Gerät, berücksichtigt die Software automatisch die Verdünnung bei der Berechnung der Probenkonzentrationen.

Die Durchführung der freien β -hCG- bzw. PAPP-A-Bestimmung der standardisierten IVD-Methoden KRYPTOR der Firma B.R.A.H.M.S AG (Immunfluoreszenztest mit der sogenannten TRACE-Technologie -Time Resolved Amplified Cryptate Emission-) sowie IMMULITE 2000 der Firma Siemens Healthcare Diagnostics (immunometrischer Chemilumineszenzassay) erfolgte nach den in der Testanleitung angegebenen Vorschriften. Es wurden die in der Testanleitung vorgesehenen Reagenzien und Materialien verwendet.

Die Analytkonzentration der drei Geräte wurde in IU/L für freies β -hCG (WHO-Standard 75/551, World Health Organisation's First International Reference Preparation of Chorionic Gonadotropin Beta Subunit Human, 1st IRP 75/551) und in mIU/L für PAPP-A (WHO IRP 78/610) angegeben.

Diese retrospektiv erstellten Ergebnisse hatten keinerlei Auswirkungen auf die Behandlung und/oder die Risikoberechnung der Schwangeren.

3.3 Statistische Auswertung

Die Datensammlung wurde in einer Tabelle in Excel 7.0-Format für Windows eingetragen.

Alle im Rahmen der Studie erhobenen Daten wurden in pseudonymisierter Form, d.h. ohne Nennung des Namens oder anderer personenbezogener Daten, die unmittelbar Rückschlüsse auf die Person zulassen (z.B. der Initialen, des Geburtsdatums oder Patientenummer), gesammelt und zur Datenauswertung gespeichert.

Der Methodenvergleich wurde anonymisiert mittels Regressionsanalyse nach Passing-Bablok (Passing 1983, S. 709 – 720, Bablok 1985, S. 77) mit der Software WinMC version 1.5 (Roche Diagnostics GmbH) durch die Abteilung Clinical trials der Firma Roche Diagnostics in Penzberg durchgeführt.

Die Koeffizienten (Intercept und Slope) der Regressionsgeraden nach Passing und Bablok beschreiben die Übereinstimmung der beiden zu vergleichenden Messmethoden.

Der Intercept (Schnittpunkt mit der Y-Achse) beschreibt die mittlere Abweichung der Messungen (den sogenannten „Bias“ oder „systematischer Fehler“) wenn der Anstieg der Regressionsgeraden (Slope) gleich eins ist, d.h. wenn keine zu- oder abnehmende Abweichung der Messwerte mit steigendem Wertniveau (proportionaler Fehler) zu verzeichnen ist. Wenn der Geradenanstieg (Slope) ungleich eins ist, d.h. ein proportionaler Fehler vorliegt, gibt der Intercept die mittlere Abweichung der Messverfahren bei einem Messwert von 0 unter der Referenzmethode (X-Achse) an.

Der Anstieg der Regressionsgeraden (Slope) beschreibt den mittleren (d.h. zu erwartenden) absoluten Zuwachs in der Messdifferenz beider Verfahren, je Anstieg des Messwertes auf der Referenzskala um eine Einheit (proportionaler Fehler).

Für beide Koeffizientenschätzungen wurden 95% Konfidenzintervalle (KI) angegeben, welche die Unsicherheit der Stichprobeninformation (Fallzahl und Datenvariabilität) zum Ausdruck bringen. So besitzt letztendlich jeder in einem solchen Konfidenzintervall enthaltenen Parameterwert die 95%ige

Wahrscheinlichkeit dem wahren zugrundeliegenden Koeffizienten (Intercept bzw. Slope) in der Grundgesamtheit (d.h. einer Regressionsgeraden basierend auf n gegen unendlich Messwertpaaren) zu entsprechen. Für eine adäquate Beurteilung der tatsächlich zu Grunde liegenden Übereinstimmung der Messverfahren sind daher die Konfidenzintervallgrenzen beider Koeffizienten zur Interpretation heranzuziehen. Der Korrelationskoeffizient r nach Pearson quantifiziert die Stärke des Zusammenhangs der Messwerte der Methoden. Dieser kann nur Werte zwischen -1 und + 1 annehmen. Bei einem linearen Zusammenhang der Messwerte der einen mit den Messwerten der anderen Methode wäre $r = 1$. Bei fehlender Korrelation wäre $r = 0$. Je näher r bei - 1 oder + 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang. Ein positiver Korrelationskoeffizient kennzeichnet einen gleichsinnigen, ein negativer einen gegensinnigen Zusammenhang.

Die Ergebnisse wurden außerdem mit dem Bland-Altman Diagramm dargestellt (Bland 1986, S. 308). Es ist eine graphische Darstellungsmethode für den Vergleich zweier Methoden. In dieser Sonderform eines Streudiagramms werden die normalisierten Differenzen der beiden Messmethoden $((Y-X)/(0.5*(Y+X)))$ gegen die geordneten Rangzahlen der Mittelwerte der beiden Methoden $((X+Y)/2)$ aufgetragen. Dieses Diagramm bietet eine optische Beurteilung darüber, wie hoch die Schwankungsbreite der Übereinstimmung ist, ob eine Messmethode prinzipiell höher oder tiefer misst als die andere und ob die Abweichung der Methoden oder die Streuung der Abweichungen von der Höhe der Werte abhängig ist.

Zusätzlich werden, um das Ausmaß der individuellen Abweichungen zu quantifizieren, sogenannte Grenzen der individuellen Übereinstimmung (limits of agreement) berechnet. Diese entsprechen dem 2,5ten bzw. 97.5ten Verteilungsperzentil der gemessenen Differenzen, d.h. also, dass 95% der individuellen Abweichungen der Messwerte zwischen beiden Messverfahren in diesem Intervall erwartet werden können.

Außerdem wurde der 95% KI für den Mittelwert berechnet ($\text{Mittelwert} \pm 1,96 * (SD/\sqrt{n})$). Wenn 0 außerhalb dieses Intervalls liegt, gibt es eine statistische signifikante Differenz der Messwerte ($p < 0,05$).

Die Risikoberechnungen für Trisomie 21 (Hintergrund- und adjustiertes Risiko) wurden für die 3 verschiedenen Messmethoden (MODULAR ANALYTICS <E170>,

KRYPTOR, IMMULITE 2000) mit Hilfe der Software SsdwLab (Version 5.0) beim Patientinnenkollektiv identisch durchgeführt. Die Software verwendet den von Palomaki beschriebenen Algorithmus unter Verwendung der bereits veröffentlichten mathematischen Berechnung der multivariaten Verteilung nach Gauß (Palomaki 1987, S. 460-463, Reynolds 1990, S. 452). Das Hintergrundrisiko (HR) hängt vom mütterlichen Alter und dem Gestationsalter ab. Die Risikoanalyse, die auf dem Alter der Mutter, der Bestimmung der Nackenfaltentransparenz sowie den Ergebnissen der biochemischen Parameter basiert, wird als adjustiertes Risiko (AR) bezeichnet. Das AR wird dadurch ermittelt, dass das HR mit den Wahrscheinlichkeitsquotienten (likelihood ratios, LR) der durchgeführten Screening-Tests multipliziert wird. Eine LR eines Screening-Tests wird wiederum dadurch ermittelt, dass der Anteil der Feten mit einer Chromosomenstörung und einem bestimmten Messwert durch den Anteil der normalen Feten mit dem gleichen Messwert dividiert wird. Jeder durchgeführte Screening-Test muss berücksichtigt werden, indem die LR mit dem a-priori-Risiko multipliziert wird. Das neue Risiko ist dann das a-priori-Risiko für jeden weiteren Screening-Test, wenn die Tests unabhängig voneinander sind.

Die Messung der Serumproteine (freies β -hCG und PAPP-A) wurde unter Berücksichtigung verschiedener Korrekturfaktoren wie z.B. Gewicht, Rauchverhalten und ethnische Herkunft der Schwangeren durchgeführt und in Multiple of the Median (MoM) umgewandelt. Der MoM erlaubt eine vom Labor unabhängige, einheitliche Beurteilung der Werte sowie eine Vergleichbarkeit unabhängig vom Gestationsalter. Als cutoff-Werte im Sinne einer Hochrisikosituation wurden freies β -hCG $\geq 2,0$ MoM, sowie PAPP-A $\leq 0,50$ MoM und ein AR $\geq 1:300$ gewählt. Die freie β -hCG- sowie die PAPP-A-Werte bei der Messmethode KRYPTOR wurden als original und aktuell bezeichnet, wobei original sich auf die Messungen des Ersttrimester-Screenings und aktuell sich auf die der Studie beziehen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Bei 785 Patientinnen wurde das Ersttrimester-Screening im o.g. Zeitraum durchgeführt. 283 von denen entbanden in unserer Abteilung für Perinatalmedizin.

70 Patientinnen (24,7%) erfüllten die Einschlusskriterien nicht. Bei 10 Patientinnen (3,5%) war die Akte zur Datensammlung nicht verfügbar und bei 12 Patientinnen (4,2%) war die Restprobe zur freien β -hCG- sowie PAPP-A-Bestimmung unzureichend.

Die Restproben von 191 Patientinnen (67,5%) wurden analysiert.

Das mütterliche Alter bei der Untersuchung war 19 - 34 Jahre bei 110 Patientinnen (57,6%) sowie 35 - 44 Jahre bei 81 Patientinnen (42,4%).

Zum Zeitpunkt der Untersuchung war das Altersrisiko für Trisomie 21 $< 1:300$ bei 82 Patientinnen (42,9%) sowie $\geq 1:300$ bei 109 Patientinnen (57,1%).

4.2 Charakterisierung des freien β -hCG- und PAPP-A-Profiles

Tabelle 1. Freies β -hCG-Wert bei den verschiedenen Messsystemen

	Mittelwert IU/L	Median IU/L	Minimum IU/L	Maximum IU/L
KRYPTOR original	51,48	39,60	11,80	274,70
KRYPTOR aktuell	53,87	42,70	12,41	283,70
MODULAR <E170> (Elecsys)	46,64	35,56	10,09	260,20
IMMULITE 2000	60,32	48,30	13,00	395,00

Tabelle 2. PAPP-A-Wert bei den verschiedenen Messsystemen

	Mittelwert mIU/L	Median mIU/L	Minimum mIU/L	Maximum mIU/L
KRYPTOR original	3659,55	3015,00	434,00	11940,00
KRYPTOR aktuell	3833,77	3136,00	433,20	12810,00
MODULAR <E170> (Elecsys)	3927,17	3153,00	457,90	13910,00
IMMULITE 2000	2626,93	2070,00	270,00	10000,00

4.3 Methodenvergleich

4.3.1 KRYPTOR freies β -hCG aktuell versus (vs.) KRYPTOR freies β -hCG original

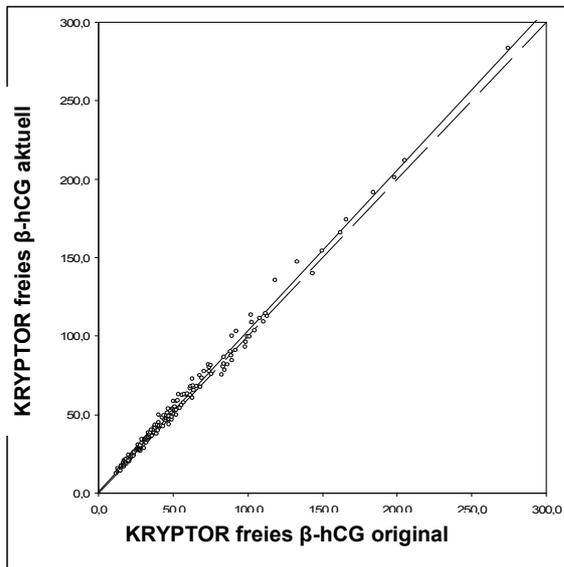


Abbildung 10. Passing/Bablok Regression

Bei einem Probenumfang (n) von 191 ergibt die Regressionsanalyse einen Korrelationskoeffizienten (r) von $>0,99$ sowie eine Steigung von 1,024 (1,009 – 1,038 95%-KI).

Der Schnittpunkt mit der Y-Achse liegt bei 1,07 (0,63 – 1,68 95% KI) IU/L.

Geradengleichung: $Y = 1,024 * X + 1,07$

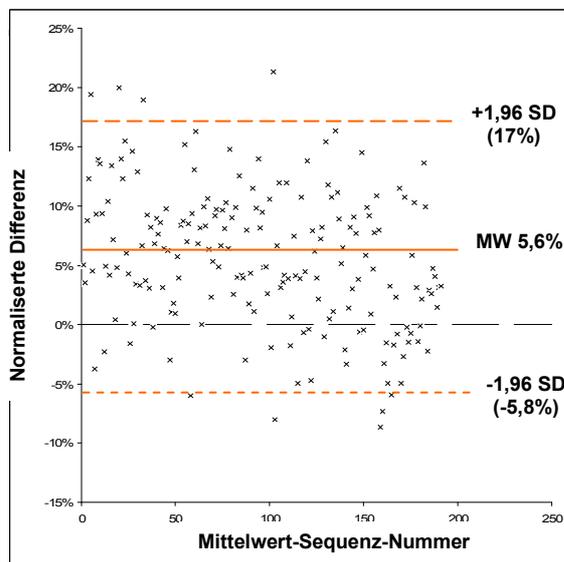
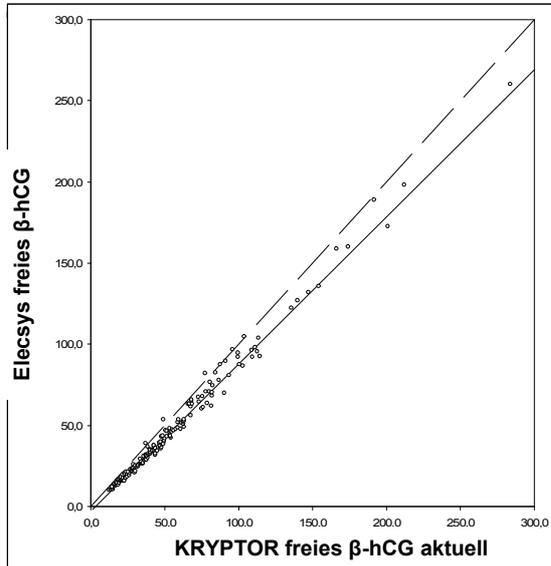


Abbildung 11. Bland-Altman-Plot

Die Bland-Altman-Darstellung ergibt einen Mittelwert bzw. ein Median der normalisierten Differenzen von jeweils + 5,6% (+/- 11,4%) bzw. + 5,3%

95% KI für den Mittelwert (+ 4%, + 7,2%)

4.3.2 Elecsys freies β -hCG vs. KRYPTOR freies β -hCG aktuell

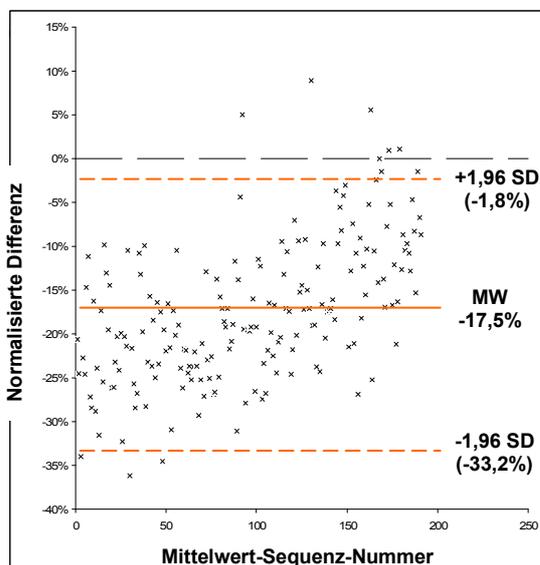


Bei einem Probenumfang (n) von 191 ergibt die Regressionsanalyse einen Korrelationskoeffizienten (r) von $>0,99$ sowie eine Steigung von $0,906$ ($0,887 - 0,925$ 95%-KI).

Der Schnittpunkt mit der Y-Achse liegt bei $-2,797$ ($-2,082$ bis $-3,437$ 95%-KI) IU/L.

Geradengleichung: $Y = 0,906 * X - 2,797$

Abbildung 12. Passing/Bablok Regression

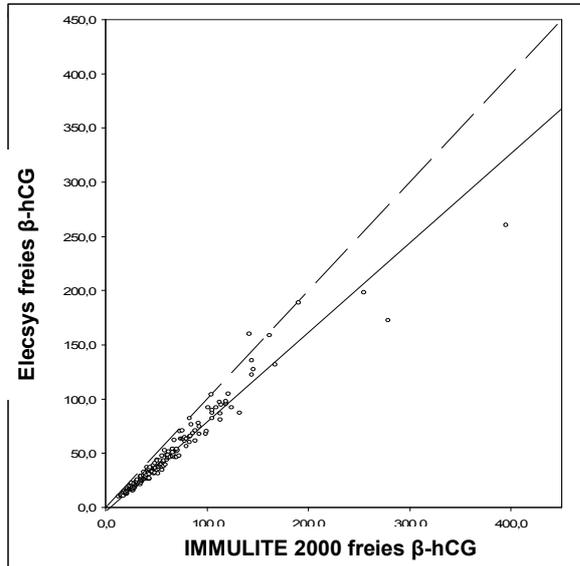


Die Bland-Altman-Darstellung ergibt einen Mittelwert bzw. ein Median der normalisierten Differenzen von jeweils $-17,5\%$ ($\pm 15,7\%$) bzw. $-18,4\%$

95%-KI für den Mittelwert ($-19,7\%$, $-15,3\%$)

Abbildung 13. Bland-Altman-Plot

4.3.3 Elecsys freies β -hCG vs. IMMULITE 2000 freies β -hCG

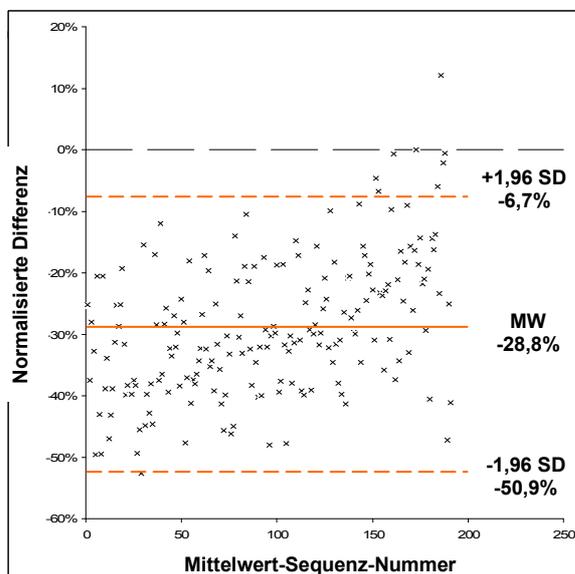


Bei einem Probenumfang (n) von 191 ergibt die Regressionsanalyse einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,97 sowie eine Steigung von 0,826 (0,800 – 0,851 95%-KI).

Der Schnittpunkt mit der Y-Achse liegt bei – 3,699 (-2,660 bis -4,762 95%-KI) IU/L.

Geradengleichung: $Y = 0,826 * X - 3,699$

Abbildung 14. Passing/Bablok Regression

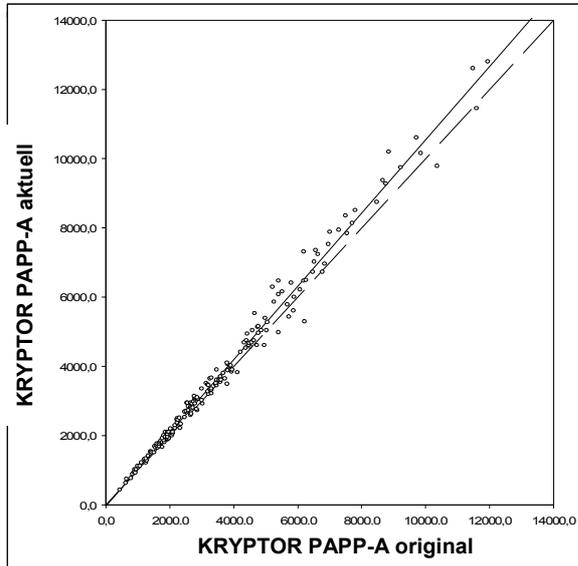


Die Bland-Altman-Darstellung ergibt einen Mittelwert bzw. ein Median der normalisierten Differenzen von jeweils – 28,8% (+/- 22,1%) bzw. – 30%

95%-KI für den Mittelwert (-31,9%, - 25,7%)

Abbildung 15. Bland-Altman-Plot

4.3.4 KRYPTOR PAPP-A aktuell vs. KRYPTOR PAPP-A original

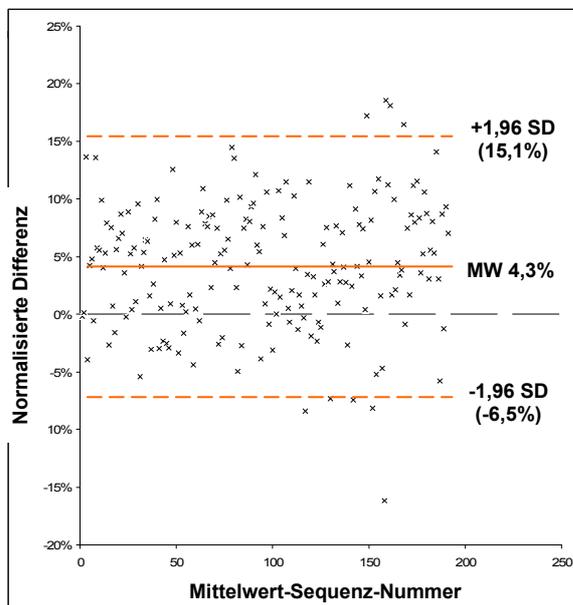


Bei einem Probenumfang (n) von 191 ergibt die Regressionsanalyse einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,99 sowie eine Steigung von 1,058 (1,040 – 1,077 95%-KI).

Der Schnittpunkt mit der Y-Achse liegt bei – 30,7 (-59,3 bis +16,3 95%-KI) mIU/L.

Geradengleichung: $Y = 1,058 * X - 30,7$

Abbildung 16. Passing/Bablok Regression

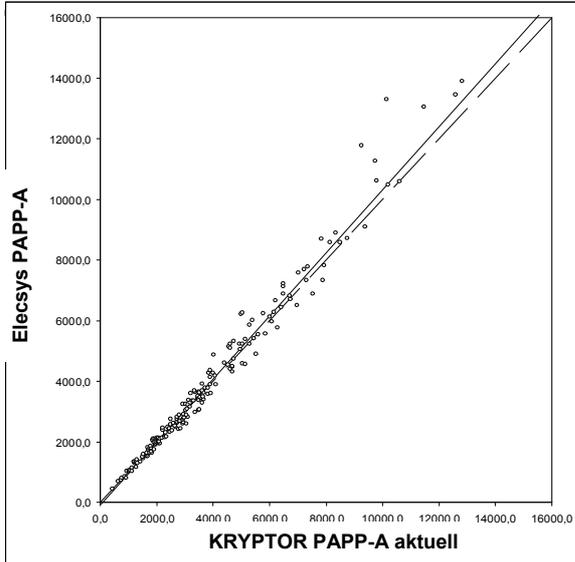


Die Bland-Altman-Darstellung ergibt einen Mittelwert bzw. ein Median der normalisierten Differenzen von jeweils + 4,3% (+/- 10,8%) bzw. + 4,5%

95%-KI für den Mittelwert (+2,8%, +5,8%)

Abbildung 17. Bland-Altman-Plot

4.3.5 Elecsys PAPP-A vs. KRYPTOR PAPP-A aktuell

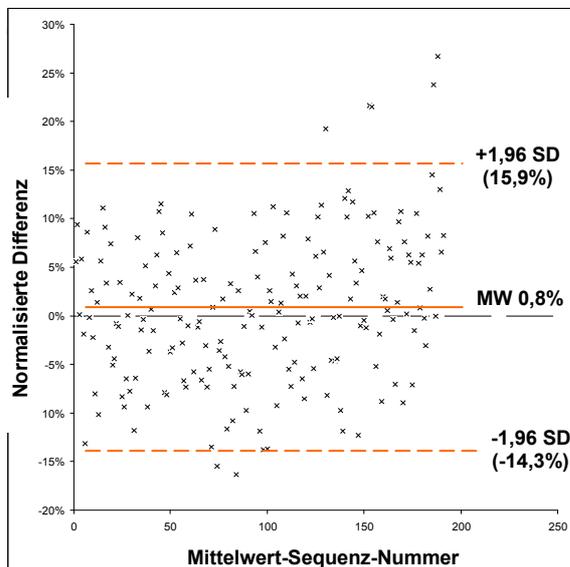


Bei einem Probenumfang (n) von 191 ergibt die Regressionsanalyse einen Korrelationskoeffizienten (r) 0,99 sowie eine Steigung von 1,041 (1,017 – 1,067 95%-KI).

Der Schnittpunkt mit der Y-Achse liegt bei – 95,953 (-164 bis -35 95%-KI) IU/L.

Geradengleichung: $Y = 1,041 * X - 95,95$

Abbildung 18. Passing/Bablok Regression

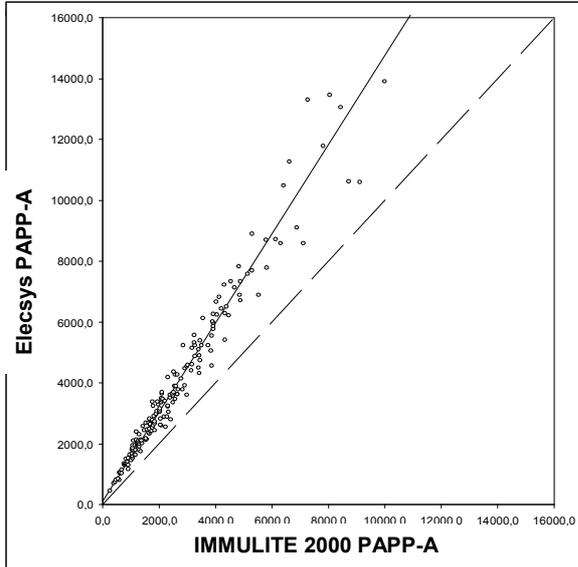


Die Bland-Altman-Darstellung ergibt einen Mittelwert bzw. ein Median der normalisierten Differenzen von jeweils + 0,8% (+/- 15,1%) bzw. + 0,2%

95%-KI für den Mittelwert (-1,3%, +2,9%)

Abbildung 19. Bland-Altman-Plot

4.3.6 Elecsys PAPP-A vs. IMMULITE 2000 PAPP-A

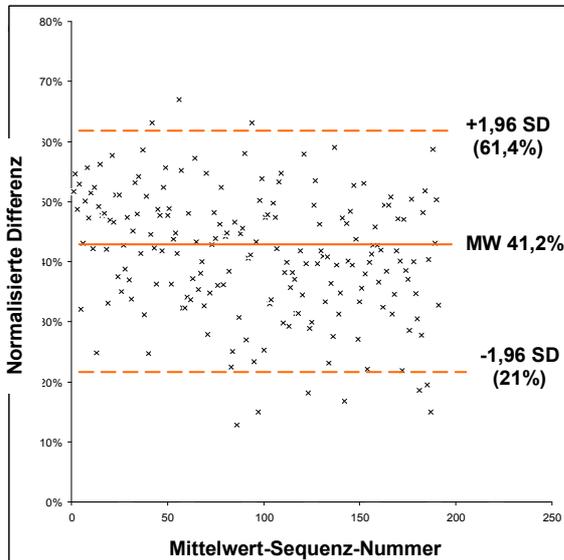


Bei einem Probenumfang (n) von 191 ergibt die Regressionsanalyse einen Korrelationskoeffizienten (r) von 0,98 sowie eine Steigung von 1,464 (1,420 – 1,504 95%-KI).

Der Schnittpunkt mit der Y-Achse liegt bei + 120,75 (32 – 187 95%-KI) mIU/L.

Geradengleichung: $Y = 1,464 * X + 120,75$

Abbildung 20. Passing/Bablok Regression



Die Bland-Altman-Darstellung ergibt einen Mittelwert bzw. ein Median der normalisierten Differenzen von jeweils + 41,2% (+/- 20,2%) bzw. + 41,8%

95%-KI für den Mittelwert (+38,3%, +44,1%)

Abbildung 21. Bland-Altman-Plot

4.4 Charakterisierung des Risikos für Trisomie 21

Tabelle 3. Verteilung der Patientinnen bezogen auf freies β -hCG- sowie PAPP-A-Cutoff-Werte

	Freies β -hCG < 2,0 MoM	Freies β -hCG \geq 2,0 MoM	PAPP-A > 0,50 MoM	PAPP-A \leq 0,50 MoM
MODULAR <E170> (Elecsys)	154 (80,6%)	37 (19,4%)	177 (92,7%)	14 (7,3%)
KRYPTOR aktuell	141 (73,8%)	50 (26,2%)	170 (89%)	21 (11%)
IMMULITE 2000	144 (75,4%)	47 (24,6%)	131 (68,6%)	60 (31,4%)

Tabelle 4. HR gegen AR bei Patientinnen mit unauffälligen freien β -hCG (< 2,0 MoM)- sowie PAPP-A (> 0,50 MoM)- Werten auf MODULAR ANALYTICS <E170> mit Elecsys-Reagenz

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	57	0
HR \geq 1:300	83	2

Tabelle 5. HR gegen AR bei Patientinnen mit unauffälligen freien β -hCG (< 2,0 MoM)- sowie PAPP-A (> 0,50 MoM)- Werten auf KRYPTOR-System aktuell

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	46	0
HR \geq 1:300	73	4

Tabelle 6. HR gegen AR bei Patientinnen mit unauffälligen freien β -hCG (< 2,0 MoM)- sowie PAPP-A (> 0,50 MoM)- Werten auf IMMULITE 2000-System

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	36	1
HR \geq 1:300	56	2

Ergebnisse

Tabelle 7. HR gegen AR bei Patientinnen mit freien β -hCG-Werten $\geq 2,0$ MoM bei unauffälligem PAPP-A-Wert ($> 0,50$ MoM) auf MODULAR ANALYTICS <E170> mit Elecsys-Reagenz

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	18	0
HR \geq 1:300	6	11

Tabelle 8. HR gegen AR bei Patientinnen mit freien β -hCG-Werten $\geq 2,0$ MoM bei unauffälligem PAPP-A-Wert ($> 0,50$ MoM) auf KRYPTOR-System aktuell

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	23	2
HR \geq 1:300	10	12

Tabelle 9. HR gegen AR bei Patientinnen mit freien β -hCG-Werten $\geq 2,0$ MoM bei unauffälligem PAPP-A-Wert ($> 0,50$ MoM) auf IMMULITE 2000-System

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	17	4
HR \geq 1:300	10	5

Ergebnisse

Tabelle 10. HR gegen AR bei Patientinnen mit PAPP-A-Werten $\leq 0,50$ MoM bei unauffälligem freien β -hCG-Wert ($< 2,0$ MoM) auf MODULAR ANALYTICS <E170> mit Elecsys-Reagenz

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	6	0
HR \geq 1:300	5	1

Tabelle 11. HR gegen AR bei Patientinnen mit PAPP-A-Werten $\leq 0,50$ MoM bei unauffälligem freien β -hCG-Wert ($< 2,0$ MoM) auf KRYPTOR-System aktuell

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	8	1
HR \geq 1:300	7	2

Tabelle 12. HR gegen AR bei Patientinnen mit PAPP-A-Werten $\leq 0,50$ MoM bei unauffälligem freien β -hCG-Wert ($< 2,0$ MoM) auf IMMULITE 2000-System

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	19	2
HR \geq 1:300	15	13

Ergebnisse

Tabelle 13. HR gegen AR bei Patientinnen mit freien β -hCG-Werten $\geq 2,0$ MoM sowie PAPP-A-Werten $\leq 0,50$ MoM auf MODULAR ANALYTICS <E170> mit Elecsys-Reagenz

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	1	0
HR \geq 1:300	0	1

Tabelle 14. HR gegen AR bei Patientinnen mit freien β -hCG-Werten $\geq 2,0$ MoM sowie PAPP-A-Werten $\leq 0,50$ MoM auf KRYPTOR-System aktuell

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	2	0
HR \geq 1:300	0	1

Tabelle 15. HR gegen AR bei Patientinnen mit freien β -hCG-Werten $\geq 2,0$ MoM sowie PAPP-A-Werten $\leq 0,50$ MoM auf IMMULITE 2000-System

	AR < 1:300	AR \geq 1:300
HR < 1:300	1	2
HR \geq 1:300	0	8

Ergebnisse

Tabelle 16. Verteilung des AR bei allen Patientinnen des Studienkollektivs

	AR < 1:300	AR ≥ 1:300
MODULAR ANALYTICS <E170> (Elecsys)	176	15
KRYPTOR	169	22
IMMULITE 2000	154	37

5. DISKUSSION

Nach den Mutterschaftsrichtlinien in Deutschland muss bei jeder Schwangeren im Alter ab 35 Jahren die Möglichkeit der pränatalen Diagnostik erörtert werden (mütterliche Altersindikation). Traditionell erfolgt das Screening auf Trisomie 21 anhand des mütterlichen Alters. Dabei wird Schwangeren, die 35 Jahre oder älter sind, eine Amniozentese oder eine Chorionzottenbiopsie angeboten. Dies betrifft ca. 20% der Schwangeren. Die Detektionsrate der Feten mit Trisomie 21 liegt dabei aber unter 50%, da die meisten Kinder mit Trisomie 21 von jüngeren Frauen geboren werden, weshalb eine Risikoabschätzung allein auf dieser Basis zunehmend als ineffektiv zu betrachten und unter Berücksichtigung weiterer Parameter verbesserungswürdig ist.

Alternativ zur Risikoabschätzung allein auf der Basis des maternalen Alters wurde vor zwei Jahrzehnten zwischen der 15. und 20. SSW den sogenannten Triple-Test (AFP, uE3, hCG) zur Abschätzung des Risikos für eine Trisomie 21 aus dem mütterlichen Blut eingesetzt. Wie sich gezeigt hat, können mit Hilfe dieses Tests unter optimierten Bedingungen etwa 50-70% aller Trisomie-21-Schwangerschaften bei einer falsch-positiven Rate von 5% entdeckt werden. Kritiker bemängeln an diesem Testsystem insbesondere die geringe Spezifität.

Als Alternative zum Triple-Test steht heute das Ersttrimester-Screening zur Verfügung, welches zwischen der 11+0 und 13+6 SSW durchgeführt werden kann.

Im Jahre 1866 bemerkte Langdon Down, dass gemeinsame Merkmale von Patienten mit Trisomie 21 in einer unelastischen, für den Körper zu groß erscheinenden Haut, sowie einem flachen Gesicht mit kleiner Nase bestehen.

In den 90-er Jahren wurde realisiert, dass diese überschüssige Haut von Individuen mit Trisomie 21 durch Ultraschall als erhöhte Nackentransparenz im dritten Monat des intrauterinen Lebens darstellbar gemacht werden kann. Die fetale Nackentransparenz von 11-13+6 SSW wurde mit dem mütterlichen Alter kombiniert, um eine effektive Screeningsmethode für die Trisomie 21 zu erhalten. Für eine Rate von 5% invasiver Tests können so etwa 75% der Trisomie 21-Fälle identifiziert werden.

Wenn die freie β -Kette des humanen Chorion Gonadotropins (freies β -hCG) und das schwangerschaftsassozierte Plasma Protein-A (PAPP-A) im mütterlichen Serum von 11 - 13+6 SSW ebenfalls berücksichtigt werden, beträgt die Trisomie 21-Detektionsrate 85-90% bei einer falsch-positiven Rate von 5%.

Sechs prospektive Studien haben die Durchführbarkeit und Effektivität des kombinierten Screenings aus fetaler NT und mütterlichem Screening mittels freiem β -hCG und PAPP-A bestätigt. In den kombinierten Daten mit einer Gesamtzahl von 44.613 Schwangerschaften, einschließlich 215 Trisomie 21 Schwangerschaften, betrug die Detektionsrate für Trisomie 21 87%, für eine falsch-positive Rate von 5% (Krantz 2000, S. 212, Bindra 2002, S. 223, Spencer 2000, S. 1274, Spencer 2003, S. 284, Schuchter 2002, S. 213, Wapner 2003, S. 1409).

Zusätzlich zur Rolle bei der Risikoschätzung für Trisomie 21 kann eine erhöhte Nackentransparenz auch einen hohen Prozentsatz anderer Chromosomenanomalien identifizieren. Dieser Ultraschall-Parameter ist mit vielen fetalen Fehlbildungen sowie einem breiten Spektrum genetischer Syndrome assoziiert (Witters 2007, S. 1, Nicolaidis 2002, S. 311 – 313, Breathnach 2007, S. 656, Tul 1999, S. 1038, Spencer 2000, S. 498, Pandya 1995, S. 18, Stenhouse 2004, S. 774, Schneider 2002, S. 842).

Andere Vorteile der Ultraschalluntersuchung von 11 - 13+6 SSW sind die Feststellung der Vitalität des Feten, die genaue Datierung der Schwangerschaftswoche, die frühe Diagnose schwerwiegender fetaler Anomalien und die Erkennung von Mehrlingen sowie derer Chorionizität, die den entscheidenden Parameter für den Ausgang von Mehrlingsschwangerschaften darstellt.

Die vorliegende Studie zeigt, dass wir eine neue maternale Serum-Messmethode zur Verfügung haben, die eine bessere Detektionsrate für Feten ohne Trisomie 21 im Vergleich zu aktuell zugelassenen Messmethoden hat.

Wie bei der Einführung ein jeder neuen Methode in die klinische Praxis ist es wesentlich, dass unsere Ergebnisse mit denen aus einem größeren Patientenkollektiv verglichen werden.

5.1 Statistischer Methodenvergleich

Das neue Elecsys-Analysensystem wurde für freies β -hCG und PAPP-A mit dem KRYPTOR- und dem IMMULITE-2000-System verglichen. Ein Methodenvergleich KRYPTOR aktuell vs. KRYPTOR original war zusätzlich notwendig, um eventuelle lagerungsbedingte Messwertveränderungen nachzuweisen. Der nachgewiesene Effekt war zwar statistisch signifikant aber analytisch unerheblich, da die anderen Methoden (Elecsys, IMMULITE 2000) zusammen mit KRYPTOR aktuell zeitnah gemessen wurden.

Die absoluten freien β -hCG- sowie PAPP-A-Werte bei den verschiedenen Messsystemen werden in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst. Der Vergleich sowohl der Mittel- als auch der Median- wie auch der Minimum- und Maximumwerte zeigt, dass MODULAR <E170> (Elecsys) freies β -hCG am niedrigsten und PAPP-A am höchsten misst.

5.1.1 KRYPTOR freies β -hCG aktuell vs. KRYPTOR freies β -hCG original (Abbildungen 10, 11)

Die Messungen bei KRYPTOR freies β -hCG aktuell sind statistisch signifikant höher ($p < 0,05$) als die bei KRYPTOR freies β -hCG original. Der 95%-KI für den Mittelwert ergab sich zu + 4% bzw. + 7,2%.

Aus der Steigung der Passing/Bablok-Regressionsgerade geht davor, dass der Zuwachs der Messdifferenz + 2,4 % von KRYPTOR freies β -hCG original ist.

Die Kryptor-aktuell-Messungen zeigen mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von 0,99 einen hervorragenden linearen Zusammenhang mit den Kryptor-original-Messungen.

Der Mittelwert bzw. der Median der normalisierten Differenzen ergaben sich zu + 5,6 % bzw. + 5,3%. Die 95% Grenzen der individuellen Übereinstimmung (limits of agreement) ergeben sich zu – 5,8% bzw. + 17%.

5.1.2 Elecsys freies β -hCG vs. KRYPTOR freies β -hCG aktuell (Abbildungen 12, 13)

Die Messungen bei der Elecsys- sind statistisch signifikant niedriger ($p < 0,05$) als die bei der KRYPTOR-Methode. Der 95%-KI für den Mittelwert ergab sich zu $- 19,7\%$ bzw. $- 15,3\%$.

Aus der Steigung der Passing/Bablok-Regressionsgerade geht davor, dass der Zuwachs der Messdifferenz $- 9,4 \%$ von KRYPTOR freies β -hCG aktuell ist.

Die Elecsys-Methode zeigt mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von $0,99$ einen hervorragenden linearen Zusammenhang mit der KRYPTOR-aktuell-Methode.

Der Mittelwert bzw. der Median der normalisierten Differenzen ergaben sich zu $- 17,5 \%$ bzw. $- 18,4 \%$. Die 95% Grenzen der individuellen Übereinstimmung (limits of agreement) ergeben sich zu $- 1,8\%$ bzw. $- 33,2\%$.

5.1.3 Elecsys freies β -hCG vs. IMMULITE 2000 freies β -hCG (Abbildung 14, 15)

Die Messungen bei der Elecsys- sind statistisch signifikant niedriger ($p < 0,05$) als die bei der IMMULITE 2000-Methode. Der 95%-KI für den Mittelwert ergab sich zu $- 31,9\%$ bzw. $- 25,7\%$.

Aus der Steigung der Passing/Bablok-Regressionsgerade geht davor, dass der Zuwachs der Messdifferenz $- 17,4\%$ von IMMULITE 2000 ist.

Die Elecsys-Methode zeigt mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von $0,97$ einen hervorragenden linearen Zusammenhang mit der IMMULITE 2000-Methode.

Der Mittelwert bzw. der Median der normalisierten Differenzen ergaben sich zu $- 28,8\%$ bzw. $- 30\%$. Die 95% Grenzen der individuellen Übereinstimmung (limits of agreement) ergeben sich zu $- 50,9\%$ bzw. $- 6,7\%$.

5.1.4 Kryptor PAPP-A aktuell vs. Kryptor PAPP-A original (Abbildungen 16, 17)

Die Messungen bei KRYPTOR PAPP-A aktuell sind statistisch signifikant höher ($p < 0,05$) als die bei KRYPTOR PAPP-A original. Der 95%-KI für den Mittelwert ergab sich zu $+ 2,8\%$ bzw. $+ 5,8\%$.

Aus der Steigung der Passing/Bablok-Regressionsgerade geht davor, dass der Zuwachs der Messdifferenz $+ 5,8\%$ von KRYPTOR PAPP-A original ist.

Die Kryptor-aktuell-Messungen zeigen mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von 0,99 einen hervorragenden linearen Zusammenhang mit den Kryptor-original-Messungen.

Der Mittelwert bzw. der Median der normalisierten Differenzen ergaben sich zu + 4,3% bzw. + 4,5%. Die 95% Grenzen der individuellen Übereinstimmung (limits of agreement) ergeben sich zu – 6,5% bzw. + 15,1%.

5.1.5 Elecsys PAPP-A vs. Kryptor PAPP-A aktuell (Abbildungen 18, 19)

Die Messungen bei der Elecsys- sind tendenziell höher jedoch statistisch nicht signifikant als die bei der KRYPTOR-Methode. Der 95%-KI für den Mittelwert ergab sich zu – 1,3% bzw. + 2,9%.

Aus der Steigung der Passing/Bablok-Regressionsgerade geht davor, dass der Zuwachs der Messdifferenz + 4,1% von KRYPTOR PAPP-A aktuell ist.

Die Elecsys-Methode zeigt mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von 0,99 einen hervorragenden linearen Zusammenhang mit der KRYPTOR-Methode.

Der Mittelwert bzw. der Median der normalisierten Differenzen ergaben sich zu + 0,8% bzw. + 0,2%. Die 95% Grenzen der individuellen Übereinstimmung (limits of agreement) ergeben sich zu – 14,3% bzw. + 15,9%.

5.1.6 Elecsys PAPP-A vs. IMMULITE 2000 PAPP-A (Abbildungen 20, 21)

Die Messungen bei der Elecsys- sind statistisch signifikant höher ($p < 0,05$) als die bei der IMMULITE 2000-Methode. Der 95%-KI für den Mittelwert ergab sich zu + 38,3% bzw. + 44,1%.

Aus der Steigung der Passing/Bablok-Regressionsgerade geht davor, dass der Zuwachs der Messdifferenz + 46,4% von IMMULITE 2000 ist. Obwohl alle Werte im gesamten Bereich höher liegen, wird der Unterschied nach oben größer. Die Abweichung ist also proportional zum Wert.

Trotz der o.g. Unterschiede zeigt die Elecsys-Methode mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von 0,98 einen hervorragenden linearen Zusammenhang mit der IMMULITE 2000-Methode, weil 92 % der Messwerte im unteren und mittleren Bereich liegen.

Der Mittelwert bzw. der Median der normalisierten Differenzen ergaben sich zu + 41,2% bzw. + 41,8%. Die 95% Grenzen der individuellen Übereinstimmung (limits of agreement) ergeben sich zu + 21% bzw. + 61,4%.

5.2 Risikoabschätzung für Trisomie 21

5.2.1 Hintergrundrisiko

Als „Spätgebärende“ wird eine Frau bezeichnet, die ab einem Alter von 35 Jahren Mutter wird. Seit Beginn der 1990er-Jahre nimmt die „späte“ Mutterschaft kontinuierlich zu. Im Jahr 1991 waren 9,6 % aller Frauen, die ein Kind bekamen, älter als 34 Jahre. Innerhalb von neun Jahren verdoppelte sich dieser Anteil auf 18,1% (im Jahr 2000). Er stieg bis 2006 nochmals auf fast ein Viertel aller Gebärenden (23,8%) (BAQ – Bayerische Arbeitsgemeinschaft für Qualitätssicherung in der stationären Versorgung (2005): Geburtshilfe – Jahresauswertung 2005. Modul 16/1). Es kann also eine starke Verlagerung von Familiengründungs- und Familienerweiterungsprozessen ins mittlere Lebensalter beobachtet werden.

In der 11+0 bis 13+6 SSW ist ein HR von $\geq 1:300$ nach der SsdwLab (Version 5.0)-Software schon ab einem Alter von 33 Jahren 8 Monaten und 15 Tagen gegeben. Deswegen werden 57,1 % der Patientinnen unserer Studie als Hochrisiko-Kollektiv bezeichnet, obwohl 42,4 % des Studienkollektivs in der Altersgruppe zwischen 35 – 44 Jahren waren.

Die Altersstruktur der untersuchten Patientengruppe mit einem Anteil Schwangerer über 34 Jahre von 42,4 % zeigt einen fast doppelt so hohen Anteil wie im Bundesdurchschnitt. Das liegt daran, dass in unserer Abteilung für Perinatalmedizin als Perinatalzentrum Level I ein sehr hoher Anteil von Risikoschwangerschaften betreut wird.

5.2.2 Serumwerte

Die Verteilung der umgewandelten Serumwerte in MoM wird in der Tabelle 3 gezeigt.

Die niedrigste freie β -hCG- sowie die höchste PAPP-A-Messung von allen drei Messsystemen durch die Elecsys-Methode spiegeln sich im höchsten Anteil an unauffälligen (niedriges Risiko) Cutoff-Werten wider.

80,6 % der Proben bei der Elecsys-Methode hatten einen freien β -hCG-Wert $< 2,0$ MoM gefolgt von der IMMULITE 2000-Methode mit 75,4% und der KRYPTOR-aktuell-Methode mit 73,8 %.

Die PAPP-A-Werte zeigten ein MoM $> 0,50$ in 92,7 % der Proben bei der Elecsys-Methode gefolgt von der KRYPTOR-aktuell-Methode mit 89 % und der IMMULITE 2000-Methode mit 68,6 %.

5.2.3 Adjustiertes Risiko

Die folgenden gezeigten AR-Daten beinhalten immer eine normale NT-Messung und werden durch die variablen MoM-Serumwerte und das variable HR beeinflusst.

Wenn das AR $\geq 1:300$ ist, würde man einen unnötigen invasiven Eingriff empfehlen, da keines der Neugeborenen dieser Studie eine chromosomale Alteration hatte.

5.2.3.1 AR bei unauffälligen **freien β -hCG ($< 2,0$ MoM)-** sowie **PAPP-A ($> 0,50$ MoM)-** Werten und **niedrigem HR ($< 1:300$)** (Tabellen 4, 5, 6):

Sowohl bei der Elecsys- als auch bei der KRYPTOR-Methode haben alle Patientinnen (57/57 bzw. 46/46) ein niedriges AR. Bei der IMMULITE-Methode hat 1 Patientin (1/37 = 2,7%) ein hohes AR.

Es handelt sich im Falle der IMMULITE 2000-Messung um eine 29-jährige Patientin mit einem HR von 1:554, freien β -hCG-Wert von 1,93 MoM, PAPP-A-Wert von 0,77 MoM und NT von 2,5 mm, deren AR 1:186 ist. Der freie β -hCG-Wert im oberen Normbereich (1,93 MoM) sowie die NT auf der 95. P. könnten eine mögliche Erklärung für das erhöhte AR sein.

5.2.3.2 AR bei unauffälligen **freien β -hCG ($< 2,0$ MoM)-** sowie **PAPP-A ($> 0,50$ MoM)-** Werten und **hohem HR ($\geq 1:300$)** (Tabellen 4, 5, 6):

Ein sehr hoher Anteil der Patientinnen haben ein niedriges AR trotz des hohen HR bei allen drei Messmethoden: Elecsys 83/85 (97,6%), IMMULITE 2000 56/58

(96,6%), KRYPTOR 73/77 (94,8%). Man würde trotzdem aufgrund des erhöhten AR bei der Elecsys-, IMMULITE 2000- bzw. KRYPTOR-Methode jeweils in 2,4% (2/85), 5,2% (2/58) bzw. 3,4% (4/77) der Fälle einen unnötigen invasiven Eingriff empfehlen.

5.2.3.3 AR bei freiem β -hCG-Wert $\geq 2,0$ MoM sowie unauffälligem PAPP-A-Wert ($> 0,50$ MoM) und niedrigem HR (Tabellen 7, 8, 9):

Bei der Elecsys-Methode haben alle Patientinnen (18/18) ein niedriges AR trotz des erhöhten freien β -hCG-MoM.

Man würde aufgrund des erhöhten freien β -hCG-Wertes bei der KRYPTOR- bzw. IMMULITE-Methode jeweils in 8% (2/25) bzw. 19% (4/21) der Fälle einen unnötigen invasiven Eingriff empfehlen.

5.2.3.4 AR bei freiem β -hCG-Wert $\geq 2,0$ MoM sowie unauffälligem PAPP-A-Wert ($> 0,50$ MoM) und hohem HR (Tabellen 7, 8, 9):

66,6% (10/15) der Patientinnen bei der IMMULITE 2000-, 45,5% (10/22) bei der KRYPTOR- und 35,3% (6/17) bei der Elecsys-Methode haben ein niedriges AR trotz der erhöhten β -hCG-Wert und HR.

Man würde aufgrund des erhöhten freien β -hCG-Wertes sowie des erhöhten HR bei der Elecsys- bzw. KRYPTOR- bzw. IMMULITE 2000-Methode in jeweils 64,7% (11/17) bzw. 54,5% (12/22) bzw. 33,3% (5/15) der Fälle einen unnötigen invasiven Eingriff empfehlen.

5.2.3.5 AR bei PAPP-A-Wert $\leq 0,50$ MoM sowie unauffälligem freiem β -hCG-Wert ($< 2,0$ MoM) und niedrigem HR (Tabellen 10, 11, 12):

Alle 6 Patientinnen bei der Elecsys-Methode haben ein niedriges AR trotz des erhöhten PAPP-A-Wertes.

Man würde aufgrund des niedrigen PAPP-A-Wertes bei der KRYPTOR- bzw. IMMULITE 2000-Methode jeweils in 11,1% (1/9) bzw. 9,5% (2/21) der Fälle einen unnötigen invasiven Eingriff empfehlen.

5.2.3.6 AR bei PAPP-A-Wert $\leq 0,50$ MoM sowie unauffälligem freien β -hCG-Wert ($< 2,0$ MoM) und hohem HR (Tabellen 10, 11, 12):

83,3% (5/6) der Patientinnen bei der Elecsys-, 77,8% (7/9) bei der KRYPTOR- und 53,6% (15/28) bei der IMMULITE 2000-Methode haben ein niedriges AR und man würde deswegen trotz des niedrigen PAPP-A-Wertes sowie des erhöhten HR auf einen invasiven Eingriff verzichten.

Bei der Elecsys- bzw. KRYPTOR- bzw. IMMULITE 2000-Methode würde man jeweils in 16,7% (1/6) bzw. 22,2% (2/9) bzw. 46,4% (13/28) der Fälle aufgrund des niedrigen PAPP-A-Wertes sowie des erhöhten HR einen unnötigen invasiven Eingriff empfehlen.

5.2.3.7 AR bei freiem β -hCG-Wert $\geq 2,0$ MoM sowie PAPP-A-Wert $\leq 0,50$ MoM und niedrigem HR (Tabellen 13, 14, 15):

Alle Patientinnen bei der Elecsys- (1/1) sowie der KRYPTOR-Methode (2/2) haben ein niedriges AR trotz des erhöhten freien β -hCG-Wertes sowie des niedrigen PAPP-A-Wertes. Die auffälligen freien β -hCG- und PAPP-A-Werte bei der Elecsys- sowie KRYPTOR-Methode beeinflussten bei Patientinnen mit niedrigem HR das AR nicht, wobei nur wenige Patientinnen diese Merkmale hatten.

Man würde in 66% (2/3) der Fälle bei der IMMULITE 2000-Methode aufgrund des erhöhten freien β -hCG-Wertes und des niedrigen PAPP-A-Wertes trotz eines niedrigen HR einen unnötigen invasiven Eingriff empfehlen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass es nur 3 Patientinnen in dieser Gruppe gab.

5.2.3.8 AR bei freiem β -hCG-Wert $\geq 2,0$ MoM sowie PAPP-A-Wert $\leq 0,50$ MoM und hohem HR (Tabellen 13, 14, 15):

Bei allen 3 Methoden haben die Patientinnen aufgrund des erhöhten freien β -hCG-Wertes sowie des niedrigen PAPP-A-Wertes und des hohen HR ein erhöhtes AR: Elecsys 1/1, KRYPTOR 1/1, IMMULITE 2000 8/8.

5.2.3.9 Verteilung des AR bei allen Patientinnen des Studienkollektivs (Tabelle 16):

- Elecsys-Methode: 176/191 (92,1%) Patientinnen haben ein niedriges AR, 15/191 (7,9%) haben ein erhöhtes AR
- KRYPTOR-Methode: 169/191 (88,5%) Patientinnen haben ein niedriges Risiko, 22/191 (11,5%) haben ein erhöhtes AR
- IMMULITE 2000-Methode: 154/191 (80,6%) Patientinnen haben ein niedriges AR, 37/191 (19,4%) haben ein erhöhtes AR

Bei einem cut-off-Wert von 1:300 zeigen drei verschiedene Studien des kombinierten Ersttrimester-Screenings (Alter, NT, freies β -hCG, PAPP-A) eine Spezifität von 93,2 – 96% sowie eine falsch-positive Rate von 4 – 6,8% (Bindra 2002, S. 220, Spencer 2003, S. 284, Soergel 2006, S. 266). Die maternalen Serumproteine wurden durch die KRYPTOR-Methode bestimmt.

Wir haben bei allen drei Methoden, bedingt durch eine niedrige Spezifität (Elecsys 92,1%, KRYPTOR 88,5%, IMMULITE 2000 80,6%) auch eine höhere falsch-positive Rate (Elecsys 7,9%, KRYPTOR 11,5%, IMMULITE 2000 19,4%) erreicht (Abbildung 22).

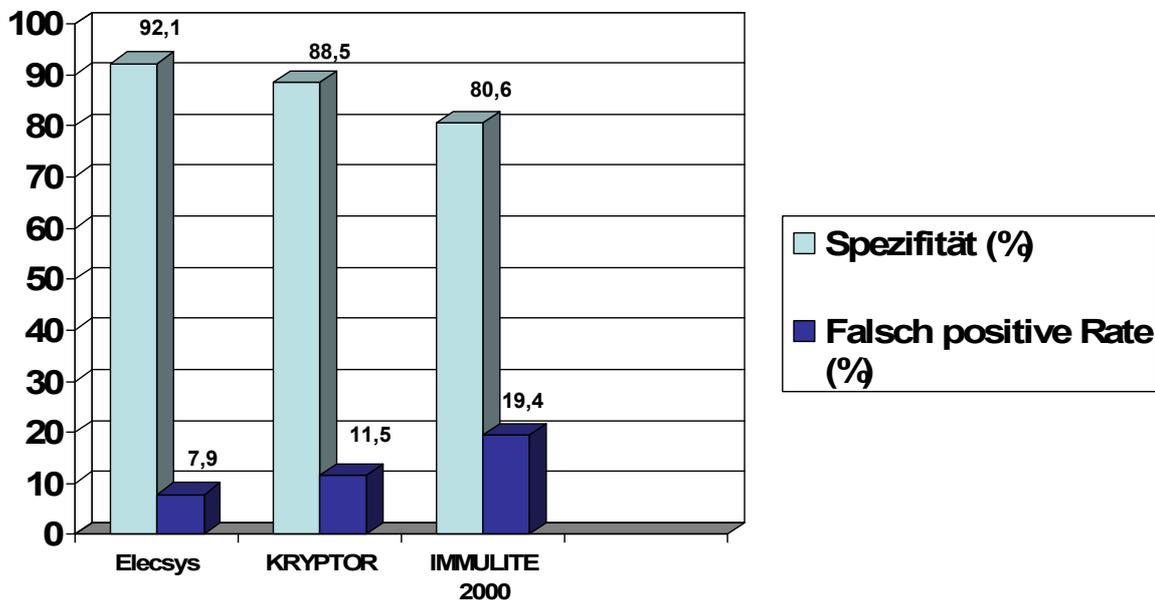


Abbildung 22: Spezifität und falsch-positive Rate der drei Messmethoden

Diese Unterschiede könnten sich durch verschiedene Faktoren erklären:

Das Risiko für Trisomie 21 wurde in den o.g. Studien durch die FMF-London-Software (PIA Fetal Database) berechnet. Sie ist zwar die, die am häufigsten zum

Einsatz zur Risikoberechnung kommt, erlaubt aber die Messung der Serumwerte nur durch die KRYPTOR-Methode und wurde deswegen im Rahmen unserer Studie nicht benutzt;

Der Anteil der Patientinnen der Studienpopulation ≥ 35 Jahre ist nur etwa 17% in der Studie von Spencer bzw. 26,4% in der Studie von Soergel. Das führt zu einem dtl. kleineren Anteil an Patientinnen mit erhöhtem HR im Vergleich zu unserem Kollektiv (42,4% ≥ 35 Jahre), was wiederum eine niedrige falsch-positive Rate widerspiegeln könnte. Das mütterliche Alter ist ≥ 35 Jahre in 47,1% der Patientinnen in der Studie von Bindra, wobei hier das Alter der gesamten Studienkollektiv und nicht nur der Patientinnen mit eukaryoten Kinder berücksichtigt wurde;

Unser Studienkollektiv ($n = 191$) ist das kleinste im Vergleich zu den o.g. Studien (Bindra $n = 14\ 240$) (Spencer $n = 11\ 105$) (Soergel $n = 2\ 188$), so dass eventuelle Bias nicht ausgeglichen werden könnten.

Man würde aufgrund des erhöhten AR bei der Elecsys-, KRYPTOR- bzw. IMMULITE 2000-Methode in jeweils 7,9%, 11,5% bzw. 19,4% der Fälle (falsch-positive Rate) einen unnötigen invasiven Eingriff empfehlen.

Wenn man nur das HR unseres Studienkollektives berücksichtigt, würde man in 42,4% der Fälle einen invasiven Eingriff empfehlen, d.h. durch das AR könnte bei allen drei Methoden bei einem großen Anteil der Patientinnen von einem solchen Eingriff abgeraten werden. Trotzdem bliebe bei chromosomal unauffälligen Neugeborenen der Prozentsatz zur Empfehlung eines invasiven Eingriffes hoch.

5.3 Mögliche Strategien zur Verbesserung der Aussagekraft des Ersttrimester-Screenings

Bei Schwangerschaften mit Trisomie 21 ist das freie β -hCG höher als bei euploiden Schwangerschaften; der Unterschied ist bei 13+0 SSW größer als bei 11+0 SSW.

Das PAPP-A ist im Gegensatz dazu niedriger als bei euploiden Schwangerschaften; der Unterschied ist bei 11+0 SSW größer als bei 13+0 SSW.

Der Unterschied zu den euploiden Schwangerschaften ist bei PAPP-A bei 11+0 SSW stärker ausgeprägt als der Unterschied des freien β -hCG bei 13+0 SSW (Borrell 2004, S. 544). Dadurch ist die Screening-Performance der Serumbiochemie bei 11+0 SSW besser als bei 13+0 SSW. Gleichsam ist die Screening-Performance mittels

der fetalen NT bei 11+0 SSW besser als bei 13+0 SSW. Daher ist die gesamte Screening-Performance mit 11 vollen SSW besser als bei 13 vollen SSW (Kagan 2008, S. 622).

Mit der Einführung von neuen biochemischen und/oder sonographischen Parametern könnte man die Erkennungsrate sowohl der chromosomal unauffälligen Neugeborenen als auch der Trisomie 21-Feten verbessert werden. Das hätte einen deutlichen positiven Effekt bezüglich der Beratung der Schwangeren und einer Reduktion der möglichen Komplikationen eines invasiven Eingriffs.

In dem letzten Jahrzehnten gab es eine rasante Entwicklung sowohl bei sonographischen als auch bei mütterlichen Serum-Parameter im Rahmen des Ersttrimester-Screenings.

Im Jahr 2001 wurde beschrieben, dass das Nasenbein (Abbildung 23) bei 60-70% der Trisomie-21-Feten zwischen 11+0-13+6 SSW nicht sichtbar ist (Cicero 2001, S. 1666, Cicero 2006, S. 109, Kagan 2009, S. 259). Für eine falsch positive Rate von 5% kann die Untersuchung des fetalen Nasenbeins die Detektionsrate des Ersttrimester-Screenings auf mehr als 95% erhöhen (Cicero 2003, S. 310, Cicero 2005, S. 980). Chromosomal normale Feten zeigen ein fehlendes Nasenbein mit einer Inzidenz von 1% bei einer kaukasischen, jedoch in 10% bei einer afro-karibischen Population.

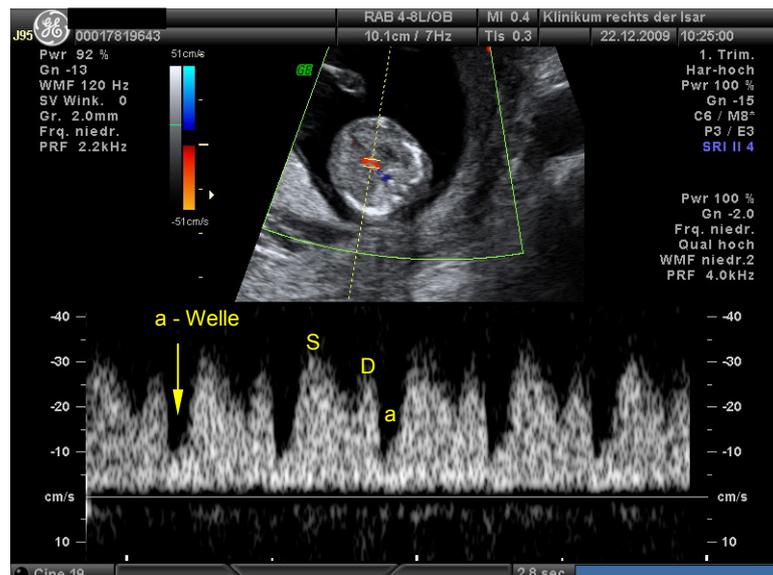


Abbildung 23: Darstellung des Nasenbeins

Derzeit können weitere fetale Ultraschallmarker wie erhöhter Widerstand im Ductus venosus, Trikuspidalklappen-Regurgitation sowie frontomaxillärer Winkel in das Ersttrimesterscreening integriert werden. Da die Untersuchung dieser zusätzlichen Parameter zeitaufwendig ist und erfahrene Untersucher erfordert, werden sie nicht routinemäßig durchgeführt. Sie könnten jedoch in hoch spezialisierten Zentren Einsatz finden, um das Risiko von Patientinnen mit grenzwertigen Ergebnissen nach Ersttrimester-Screening aus NT und Serumbiochemie zu re-evaluieren.

Die drei Phasen der fetalen Ductus venosus-Blutflusskurven sind ein Abbild der intrakardialen Druckverhältnisse: „S-Welle“ während der Systole, „D-Welle“ während der passiven Ventrikelfüllung in der frühen Diastole und „a-Welle“ während der atrialen Kontraktion der späten Diastole (Hasenöhr 2008, S. 44). Zu jeder Zeit ist die Flussrichtung herzwärts gerichtet und die Ableitung somit positiv (Abbildung 24). Der Fluss des Ductus venosus im I. Trimenon wird als pathologisch bei Rückwärtsfluss der a-Welle bewertet. Letzterer wird bei 3% der euploiden Feten bzw. bei 65% der Feten mit Trisomie 21 festgestellt. Die zusätzliche Verwendung des Ductus venosus verbessert die Ergebnisse des kombinierten Screenings wie folgt: Detektionsrate 95% bei einer falsch positiven Rate von 2,5% (Maiz 2009, S. 512).

Zwischen 11+0 - 13+6 SSW ist ein abnormaler Ductusfluss zusätzlich mit Herzfehlern sowie einem ungünstigen Schwangerschaftsausgang assoziiert (Matias 1998, S. 383).



**Abbildung 24: Normaler Ductus venosus –
Fluss mit positiver a-Welle**

Typische Dopplerkurven des Flusses über eine Trikuspidalklappe zeigen zwei separaten Spitzen: Die 1. Spitze (E-Welle) repräsentiert den frühdiaastolischen Einfluss in den Ventrikel, die 2. Spitze (A-Welle) die spätdiaastolische Vorhofkontraktion (Tulzer 2008, S. 196). In der Frühschwangerschaft ist die E-Welle in Relation zur A-Welle noch relativ klein (Abbildung 25). Zwischen zwei aufeinander folgenden Einflussignalen (während der Systole) wird normalerweise kein Fluss registriert.

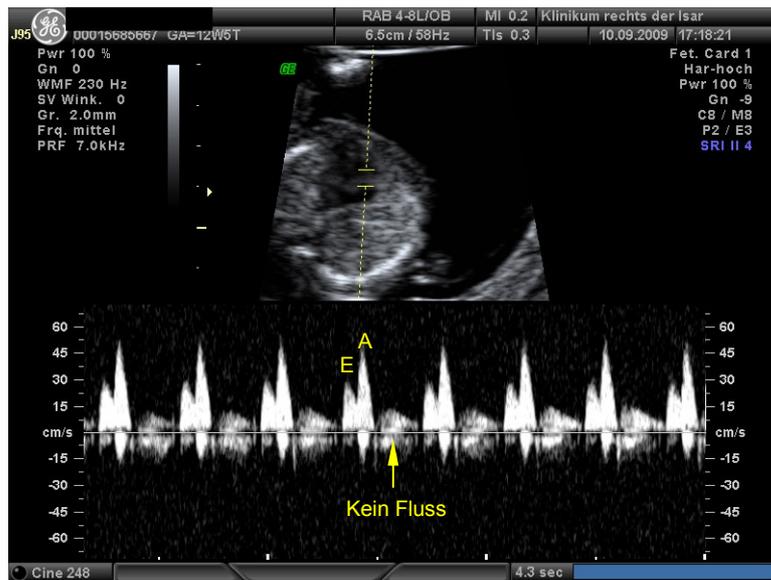


Abbildung 25: Normaler Trikuspidal-Fluss

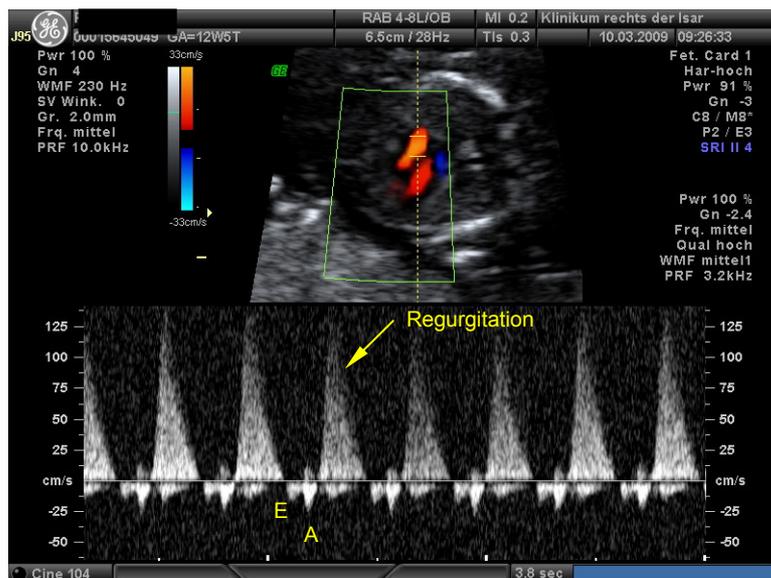


Abbildung 26: Trikuspidalklappen-Regurgitation bei Trisomie 21

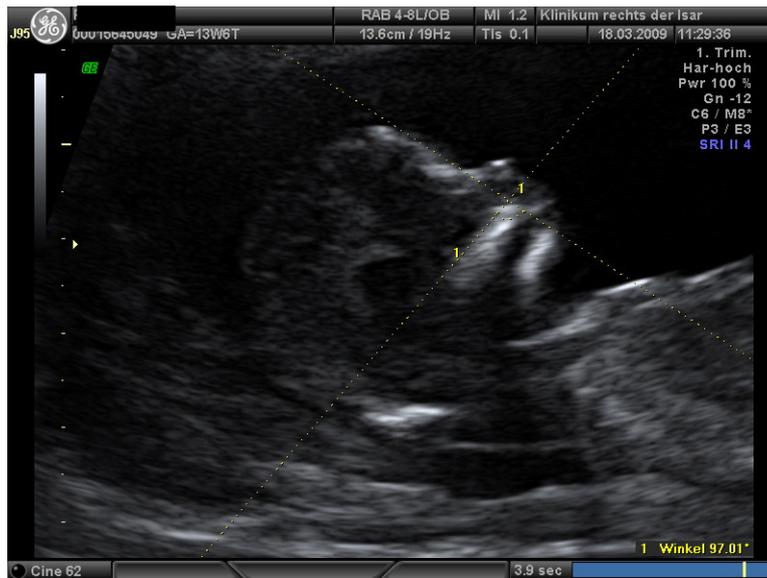
Eine Trikuspidalklappen-Regurgitation liegt vor, wenn diese ca. die Hälfte der Systole betrifft und eine Spitzengeschwindigkeit von mehr als 60 cm/s aufweist (Abbildung 26). Diese findet man bei 1% der euploiden Feten und 55% der Feten mit Trisomie 21 in der 11+0 – 13+6. Somit kann die Detektionsrate auf 95% bei einer falsch-positiven Rate von 2,5% verbessert werden (Kagan 2009, S. 20).

Bei euploiden Feten nimmt der mediane Gesichtswinkel mit der SSL ab (Abbildung 27). Bei einer SSL von 45 mm liegt der Median bei 84°, bei 84 mm bei 76° (Borenstein 2007, S. 739).

Der Gesichtswinkel liegt über der 95. Perzentile bei 5% der euploiden Feten bzw. bei 45% der Feten mit Trisomie 21 (Abbildung 28), so dass seine zusätzliche Verwendung zu einer Verbesserung der Detektionsrate von 90% auf 94% bei einer falsch-positiven Rate von 5% führt (Borenstein 2008, S. 5).



Abbildung 27: Messung des Gesichtswinkels bei einem euploiden Fetus (75°)



**Abbildung 28: Gesichtswinkel (97°)
bei Trisomie 21**

In einer Schwangerschaft mit euploidem Fetus steigt die fetale Herzfrequenz (FHF) von ca. 110 Schlägen pro Minute (SpM) in der 5. SSW auf 170 SpM in der 10. SSW und fällt dann wieder auf 150 SpM nach 14 Wochen (Liao 2000, S. 611).

Bei Trisomie 21 ist die FHF leicht erhöht und die 95. Perzentile wird nur in 15% der Fälle überschritten, sodass sie einen kleinen Einfluss auf die Detektionsrate von Trisomie 21 hat.

Nicolaides und Kollegen demonstrierten in ihrer modelltheoretischen Studie mit 75821 Patientinnen, dass bei 2,5% der Studienpatientinnen das geschätzte Risiko für Trisomie 21 $\geq 1:100$ (hohes Risiko), bei 16% zwischen 1:101 und 1:1000 (mittleres Risiko) und bei 81,5% $< 1:1000$ (niedriges Risiko) war. Die Risikoeinschätzung erfolgte anhand vom Alter der Mutter, NT, freies β -hCG und PAPP-A. In der Hochrisikogruppe konnten 81,5% der Fälle als Trisomie 21 bestätigt werden, in der Gruppe mit mittlerem Risiko 15,5% und in der Niedrigrisikogruppe 3%.

Zur weiteren Risikostratifizierung der Feten in der mittleren Risikogruppe wurden die bereits erläuterten Methoden der Nasenbeindarstellung, Trikuspidalinsuffizienz und des Widerstands im Ductus venosus angewendet zum so genannten individuellen risikoorientierten zweistufigen Screening. Dadurch konnte man die Leistung des Ersttrimester-Screenings durch eine niedrigere falsch-positive Rate (2 - 3%) bei

gleichbleibender Entdeckungsrate (90%) verbessert werden (Nicolaides 2005, S. 224 - 225).

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass ein effektiveres Screening auf Trisomie 21 durch die Kombination folgenden Parameter in der 11+0 – 13+6 SSW erfolgen kann:

- Mütterliches Alter
- Mütterliche Blutuntersuchung auf die Plazentaprodukte freies β -hCG und PAPP-A
- Eine Ultraschalluntersuchung mit:
 - Messung der fetalen NT
 - Darstellung des fetalen Nasenbeins
 - Untersuchung des Blutflusses im Ductus venosus
 - Untersuchung des Blutflusses über die Trikuspidalklappe
 - Darstellung des fetalen Gesichtswinkels

Dadurch kann der Anteil der Schwangeren, die eine invasive Diagnostik benötigen, von ca. 20% (Population \geq 35 Jahre) auf ca. 3% reduziert und gleichzeitig die Detektionsrate für Trisomie 21 und andere Chromosomenstörungen von 50% auf 95% erhöht werden.

Es gibt zwei Methoden, um die neuen Marker in das Trisomie 21-Screening einzubinden. Beide weisen ähnliche Detektions- und falsch-positive Raten auf:

- Verwendung eines, mehrerer oder aller Marker bei allen Schwangerschaften
- Verwendung der neuen Marker in dem Anteil von Schwangerschaften, die nach dem kombinierten Screening (mütterliches Alter, NT, Serumbiochemie) ein intermediäres Risiko von 1:101 bis 1:1000 haben.

Vor dem Ersttrimester-Screening ist stets eine individuelle Beratung der Schwangeren und die sachgerechte Aufklärung über die Aussagefähigkeit und mögliche Konsequenzen des Screenings durch den zertifizierten Gynäkologen bzw. den Humangenetiker notwendig (Zerres 2003, S. 2132). Große Bedeutung kommt der Ergebnismitteilung nach dem Ersttrimester-Screening zu. Diese Post-Screening-Beratung verlangt großes Einfühlungsvermögen der beratenden Personen. Da

zwischen der 10. SSW und dem Geburtstermin über 40% aller Schwangerschaften mit fetaler Trisomie 21 in einem natürlichen Abort enden, sollte der Risikobefund einen dementsprechenden Hinweis für die Schwangeren enthalten. Vergleicht man mit dem Triple-Test, kann die Schwangere den Karyotyp ihres Kindes bei einem auffälligen Risikobefund im ersten Trimester um Wochen früher abklären lassen. Außerdem sollte die Schwangere über die Möglichkeit einer weiteren Ultraschalluntersuchung zwischen der 19. und der 22. SSW, den sogenannten Organscreening, informiert werden.

5.4 Prädiktion geburtshilflicher Komplikationen durch Serumhormone

In den vergangenen Jahren wurde zunehmend diskutiert, ob Veränderungen verschiedener Serumhormone im ersten Trimenon zur Identifizierung von Risikogruppen herangezogen werden können.

2% aller Schwangeren entwickeln eine Präeklampsie. Sie ist eine der häufigsten Ursachen für die perinatale und maternale Morbidität und Mortalität. Die frühzeitige Identifikation der Patientinnen, die ein hohes Risiko für Präeklampsie haben, könnte das Outcome dieser Schwangerschaften deutlich verbessern. Eine gestörte Plazentation gilt als einer der grundlegenden Mechanismen für eine Präeklampsie. Untertützt wird die Theorie durch den pathologischen Blutfluss in den Aa. Uterinae und durch die reduzierten Plazentaprodukte im maternalen Serum bei einer Präeklampsie (Plasencia 2008, S. 143) (Spencer 2005, S. 952). Bei PAPP-A-Werten unterhalb der fünften Perzentile ist das Risiko für Präeklampsie erhöht (Spencer 2008, S. 9). Aus der Messung im ersten Trimenon von mütterlichem Blutdruck, Widerstand der Aa. Uterinae und PAPP-A im mütterlichen Serum kann man ein kombiniertes Screening auf Präeklampsie entwickeln (Plasencia 2007, S. 748, Poon 2009, S. 31, Poon 2009, S. 817).

Außerdem wurden reduzierte maternale Serumwerte von ADAM12s und Plazenta-Protein 13, sowie erhöhte Serumwerte von Inhibin A und Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9) im ersten Trimenon als potentielle maternale Serummarker für

Präeklampsie beschrieben (Spencer 2008, S. 214, Khalil 2009, S. 787, Akolekar 2009, S. 757, Poon 2009, S. 558)

Die Vorhersagefähigkeit geburtshilflicher Komplikationen der biochemischen Marker (PAPP-A, freies β -hCG) im ersten Trimenon wurde in verschiedenen Studien geprüft. Wenn der PAPP-A-Wert unter der 5. Perzentile liegt (0,415 MoM), sind die odds ratios für Frühgeburt vor der 37. SSW bzw. vor der 34. SSW jeweils 1.92 bzw. 2.35; für small-for-gestational age (SGA) Feten unterhalb der 10. bzw. der 5. Perzentile jeweils 2.70 bzw. 3.21 und für eine Fehlgeburt bzw. intrauterinen Fruchttod (IUFT) jeweils 3.3 bzw. 1.9. Bei niedrigen freien β -hCG-Werten ist das Risiko für Fehlgeburten bzw. IUFT erhöht. Ihre Assoziation mit dem Risiko für Frühgeburten ist sehr umstritten. Niedrige β -hCG-Werte sind mit dem Risiko für SGA-Feten nicht vergesellschaftet (Spencer 2008, S. 149, Spencer 2008, S. 16, Spencer 2006, S. 639).

5.5 Neue Serummarker für Trisomie 21

ADAM12s ist ein Glykoprotein, das vom Trophoblast produziert wird, und als Protease für IGFBP-3 und -5 wirkt, so dass es sich am fetalen Wachstum beteiligt (Spencer 2008, S. 338, Spencer 2007, S. 1233).

Laigaard zeigte, dass die ADAM12s-Serumwerte vor der 10+0 SSW bei Trisomie 21-Schwangerschaften deutlich geringer als die der Kontrollgruppe sind (Laigaard 2003, S. 1090, Laigaard 2006, S. 977).

Spätere Studien in der 11+0 bis 13+6 SSW konnten diese Ergebnisse nicht reproduzieren, so dass aktuell angenommen wird, dass ADAM12s ein Potential als Marker für Trisomie 21, aber nur im Frühstadium des ersten Trimenons (vor der 10+0 SSW), haben könnte (Spencer 2008, S. 422, Poon 2009, S. 508.e4, Spencer 2008, S. 210)

Der Plazenta-Wachstumsfaktor (PIGF) wurde auch als Marker für Trisomie 21 im ersten Trimenon (11+0 – 13+6 SSW) geprüft. Als Angiogenese-Mediator spielt er eine große Rolle in der Trophoblastinvasion. In einer Fall-Kontroll-Studie mit 609 euploiden- und 90 Trisomie 21-Feten zeigte Zaragosa, dass die maternalen PIGF-Serumwerte signifikant niedriger in der Trisomie 21-Schwangerschaften [PIGF MoM

0.707 (0.493 - 0.904)] als in der euploiden Gruppe [PIGF MoM 0.991 (0.799 – 1.286)] sind (Zaragosa 2009, S. 385). Diese Ergebnisse müssen noch durch prospektive Studien bestätigt werden.

5.6 Nicht invasive Pränataldiagnostik

Trotz weit entwickelter Screeningsprogramme liegen falsch-positive Resultate weiterhin im Prozentbereich, was als Konsequenz eine große Anzahl von invasiven Eingriffen nach sich zieht, die weiterhin ein Abortrisiko von bis zu 1% tragen. Auch wenn die Zahl klein erscheint, endet etwa eine von 2000 gescreenten Schwangeschaften demnach unnötig im Abort mit teilweise traumatischen Auswirkungen für die Betroffenen (Zimmermann 2007, S. 165). Außerdem bleiben etwa 5 – 10% der von Trisomie 21 betroffenen Schwangerschaften unauffällig im Screening und werden nicht vor der Geburt erkannt. Ziel der Forschung ist es daher, das Screening spezifischer zu gestalten und neue, gefahrlose Wege der genetischen Analyse zu definieren.

In den 80er- und 90er-Jahren konzentrierte sich die Forschung nicht invasiver Pränataldiagnostik auf Anreicherungs- und Analysenmethoden jeder erdenklichen Zellart fetaler oder plazentarer Herkunft, die im mütterlichen Blut gefunden werden kann (Bianchi 1995, S. 850 – 852, Bianchi 1997, S. 827, De la Cruz 1998, S. 380, Bianchi 1999, S. 994). Trotz größter Anstrengungen haben diese Methoden bislang keinen durchschlagenden Erfolg gebracht, weil die Zahl fetaler Zellen zu gering (0 – 20 Zellen in 20 mL mütterliches Blut bzw. eine fetale Zelle pro 100 000 bis 10 000 000 maternalen Zellen) und unbeständig ist, um sie zuverlässig vor dem dominierenden Hintergrund mütterlicher Blutzellen zu identifizieren (Wapner 2009, S. 261). Technologische Entwicklungen können in der Zukunft zu einer Wiederbelebung dieser Strategie führen (Bianchi 2000, S. 104, Bianchi 2002, S. 614, Seppo 2008, S. 820).

Die Entdeckung zellfreier fetaler Desoxyribonukleinsäure (DNS) im Plasma sowie im Serum schwangerer Frauen eröffnete 1997 neue Möglichkeiten der nicht invasiven genetischen Analyse der Feten (Lo 1997, S. 486). Es wurde die DNS männlichen Feten mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Amplifikation einer Y-chromosomalen

Sequenz nachgewiesen. Kurz danach wurde auch der Nachweis des paternal vererbten Rhesus-D-Gens bei Rhesus-negativen Schwangeren demonstriert (Lo 1998, S. 1736). Beide nachgewiesenen Sequenzen, das Y-Chromosom und das Rhesus-D-Gen im Falle der Rhesus-negativen Mutter, werden heute mittels kinetischer PCR („real-time PCR“) in klinischen Situationen angewandt (Finning 2004, S. 122, Van der Schoot 2006, S. 56, Lo 2000, S. 1904).

Geschlechts- und Rhesus-Tests zielen auf Sequenzen, die im mütterlichen Erbgut nicht vorhanden sind. Daher ist der Nachweis mittels PCR relativ einfach und falsch positive Ergebnisse kommen äußerst selten vor.

Es hat sich gezeigt, dass die Menge fetaler DNS mit dem Gestationsalter korreliert (Lo 1998, S. 772, Jackson 2003, S. 838). Schon ab dem ersten Schwangerschaftsmonat können geringe Mengen fetaler DNS nachgewiesen werden. Die Konzentration steigt langsam während der ersten zwei Trimester und stärker gegen Ende der Schwangerschaft an. Die mittlere Konzentration der fetalen DNS liegt bei etwa 25 Genomen pro mL im Früh- und bei etwa 300 Genomen im Spätstadium der Schwangerschaft, was etwa 3 – 6% der gesamten zellfreien DNS im Blut ausmacht. Der Nachweis zellfreier fetaler DNS ist schon ab der 10. SSW mit fast hundertprozentigem Erfolg möglich (Rijnders 2003, S. 1043). In der klinischen Anwendung ist jedoch eine positive Kontrolle, die das Vorhandensein von genügend fetaler DNS sicherstellt unerlässlich, da ein falsch-negatives Resultat erhebliche Risiken birgt.

Gering erhöhte fetale DNS-Konzentrationen wurden im Zusammenhang mit Trisomie 21 und anderen fetalen Aneuploidien gefunden (Lo 1999, S. 1749). Dieser Befund konnte nur teilweise bestätigt werden (Zhong 2000, S. 797, Hromadnikova 2002, S. 4, Gerovassili 2007, S. 109). Das ist mitunter eine Konsequenz des Problems, dass die genaue absolute Konzentration der fetalen DNS relativ schwer zu bestimmen ist, und die Aufbereitung der Patientenproben sowie die Quantifizierung mittels kinetischer PCR eine gewisse Unsicherheit in den Datenlagen mit sich bringen (Johnson 2004, S. 519). Die Abweichungen im Zusammenhang mit fetalen Aneuploidien erscheinen zu klein, um im Vergleich zu der natürlichen Schwankung zwischen verschiedenen Patientenproben klinisch relevante Aussagen zu ermöglichen.

Fetale Ribonukleinsäure (RNS) im Schwangerenblut wurde initial als Y-chromosomale RNS nachgewiesen (Poon 2000, S. 1834). Es wurde gezeigt, dass die RNS-Moleküle mit einem Makrokomples oder Vesikeln noch unbestimmter Identität assoziiert und dadurch vor Degradation geschützt sind, im Gegensatz zu exogener reiner RNS.

Die fetalen DNS und RNS stammen wahrscheinlich überwiegend vom Synzytiotrophoblasten, einer Fusionszelle mit vielen Zellkernen, die in direktem Kontakt mit dem mütterlichen Blut steht. Mit der ständigen Erneuerung des Plazentagewebes werden Mikrovesikel, die unter anderem apoptotische DNS und RNS enthalten, in den mütterlichen Kreislauf eingebracht (Zimmermann 2007, S. 168). Zellfreie fetale DNS und RNS sind im Blut der Schwangeren in großer Zahl messbar, obwohl dieses Material nur eine Halbwertszeit von 15 Minuten besitzt. Nach der Geburt sinken fetale DNS und RNS im Normalfall schnell unter die Nachweisgrenze (Chiu 2006, S. 315, Lo 1999, S. 222)

Zwei Publikationen haben Hoffnungen geweckt, dass die nicht invasive Diagnose der fetalen Trisomie 21 mittels zellfreier Nukleinsäuren (DNS, mRNS) in nächster Zukunft Realität werden kann. Beide Gruppen erzielten Erfolg mit der Analyse von SNPs (single nucleotide polymorphisms).

Eine Forschungsgruppe wählte ein Gen-Transkript -PLAC4 mRNS- aus, das in hohem Grad von der Plazenta exprimiert wird und vom Chromosom 21 kodiert wird (Lo 2007, S. 220). Somit ist kein mütterlicher Hintergrund ähnlicher Sequenzen vorhanden, der den Test negativ beeinflusst. Mittels massenspektrometrischer Methoden kann das Allelverhältnis des PLAC4 mRNS SNPs bestimmt werden. Bei heterozygotem und gesundem Genotyp ist das Verhältnis 1:1, wohingegen bei einer Trisomie 21 das Verhältnis 2:1 (oder 1:2) beträgt.

Bei der anderen Gruppe wurden fetalen SNPs auf den Chromosomen 13 und 21 in zellfreier DNS als Analyseziel gewählt (Dhallan 2007, S. 475). So wurde eine große Zahl an SNPs untersucht, um ein gesichertes Resultat zu erhalten. Aufgrund der kleinen Zahl an untersuchten Schwangerschaften im ersten Trimester betrug die Sensivität im Schwangerschaftsfrühstadium nur 66% (zwei von drei Fällen).

Erhöhte Plasmakonzentrationen beider Nukleinsäuren wurden auch bei zahlreichen Schwangerschaftskomplikationen, wie z.B. Präeklampsie, beobachtet (Zimmermann 2007, S. 168). Analytische Schwierigkeiten, um genaue und in verschiedenen Laboratorien reproduzierbare Messungen zu erlauben, müssen aber noch gelöst werden.

In den vergangenen 30 Jahren wurde versucht, anhand fetaler Zellen sowie fetaler DNS und RNS im mütterlichen Blut fetale Chromosomenstörungen diagnostizieren zu können. Leider waren diese Ansätze bisher ohne großen Erfolg. Die Hoffnung, dass zirkulierende zellfreie Nukleinsäure in Zukunft zumindest eine wichtige Ergänzung zum derzeitigen Screeningansatz bieten werden, erscheint berechtigt. Eine breite klinische Anwendung der fetalen Nukleinsäuren als Screening- bzw. als Diagnose-Instrument wartet auf die Entdeckung von zuverlässigen geschlechts-unabhängigen Markern, die entweder DNS-Polymorphismen, epigenetische Marker oder auch mRNS sein könnten (Bianchi 2004, S. 99).

Obwohl die Forschung dem Ziel des nicht invasiven Nachweises fetaler Aneuploidien immer näher kommt, ist es bis zur routinemäßigen Anwendung noch ein weiter Weg. Deswegen ist es wichtig sowohl die Entdeckungsrate als auch die falsch positive Rate der aktuellen Screenings-Methoden zu verbessern bis die o.g. Methoden verfügbar sind.

Diese Studie zeigt eine mögliche Strategie, um die Vorhersagefähigkeit des schon etablierten kombinierten Ersttrimester-Screenings zu optimieren. Die Ergebnisse sollten aber durch prospektive Studien, die auch Trisomie 21-Schwangerschaften einschließen, bestätigt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Hintergrund

Die Trisomie 21 ist die häufigste Aneuploidie bei Neugeborenen. Ihre Häufigkeit steigt mit zunehmendem mütterlichen Alter. In Deutschland liegt ihre Prävalenz derzeit bei etwa 1:500. In den letzten zwei Jahrzehnten hat die „späte“ Mutterschaft kontinuierlich zugenommen.

Nach der bisherigen Studienlage führt eine kombinierte Risikoberechnung unter Berücksichtigung des Alters, des freien β -hCG und des PAPP-A sowie unter Einbeziehung einer sonographischen NT-Messung zu einer Entdeckungsrate einer Trisomie 21 von ca. 85 – 90% bei einer falsch-positiven Rate von 5%.

Mit der vorliegenden Studie soll die Durchführbarkeit des neuen Elecsys-Analyseverfahrens (Roche Diagnostics GmbH) zur Messung der mütterlichen Serumproteine, freies β -hCG und PAPP-A, sowie der Vergleich seiner Ergebnisse mit zwei zugelassenen Messsystemen und der Einfluss der verschiedenen Methoden in der diagnostischen Aussagefähigkeit des Ersttrimester-Screenings überprüft werden.

6.2 Material und Methoden

Von den Patientinnen, bei denen in der Zeit von April 2001 bis Juni 2006 das kombinierte Ersttrimester-Screening in der Abteilung für Perinatalmedizin des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt wurde und keine Trisomie 21 bei der Geburt vorlag, untersuchten wir im April 2007 die Serum-Restproben auf freies β -hCG und PAPP-A mittels drei verschiedener Messsysteme: MODULAR ANALYTICS <E170> (Roche Diagnostics GmbH) mit dem neuen Elecsys-Test sowie KRYPTOR (B.R.A.H.M.S. AG) und IMMULITE 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics) mit den entsprechenden Reagenzien im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar der TUM .

Der Methodenvergleich wurde durch die Regressionsanalyse nach Passing-Bablok, sowie durch das Bland-Altman Diagramm durchgeführt. Das individuelle adjustierte Risiko für Trisomie 21 der einzelnen Messmethoden wurde durch den Palomaki-

Algorithmus berechnet. Ein Cut-off von $\geq 1:300$ wurde als Hochrisiko-Situation bezeichnet.

6.3 Ergebnisse

Die Restproben von 191 Patientinnen wurden analysiert. Das mütterliche Alter bei der Untersuchung war ≥ 35 Jahre bei 42,4% der Fälle.

Die Elecsys-Methode zeigt einen hervorragenden linearen Zusammenhang mit den Vergleichsmethoden. Am Besten ist die Korrelation mit der KRYPTOR-Methode.

Von den drei verschiedenen Methoden misst der neue Elecsys-Test das freie β -hCG am niedrigsten und das PAPP-A am höchsten, so dass eine bessere Spezifität (92,1% gegen 88,5% bei KRYPTOR und 80,6% bei IMMULITE 2000) des kombinierten Ersttrimester-Screenings bei gleichzeitig niedrigerer falsch-positiven Rate (7,9% gegen 11,5% bei KRYPTOR und 19,4% bei IMMULITE 2000) durch ihn erreicht werden konnte.

6.4 Schlussfolgerung

Der Elecsys-Test verbessert die Leistung des Ersttrimester-Screenings bei der Detektion der euploiden Feten. Unsere Ergebnisse sollten durch neue prospektive Studien mit einer größeren Studienpopulation bestätigt werden. Zusätzlich soll der Einfluss des neuen Tests auf die Sensitivität des kombinierten Screenings geprüft werden.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFP = Alpha-Fetoprotein

AR = Adjustiertes Risiko

β -hCG = Untereinheit β des humanen Chorion-Gonadotropins

DNS = Desoxyribonukleinsäure

FHF = Fetale Herzfrequenz

FMF = Fetal Medicine Foundation

hCG = Humanes Chorion-Gonadotropin

HR = Hintergrundrisiko

IGF = Insulin like growth factor

IGFBP = Insulin-like-growth-factor-bindende Proteine

IUFT = Intrauteriner Fruchttod

KI = Konfidenzintervall

LR = Likelihood ratios

MoM = Multiple of the Median

mRNS = Messenger Ribonukleinsäure

NT = Nackentransparenz

PAPP-A = Schwangerschaftsassoziertes Plazentaprotein-A

PCR = Polymerase-Kettenreaktion

PIGF = Plazenta-Wachstumsfaktor

RNS = Ribonukleinsäure

SD = Standardabweichung

SGA = Small for gestational age

SNPs = Single nucleotide polymorphisms

SpM = Schläge pro Minute

SSL = Scheitel-Steiß-Länge

SSW = Schwangerschaftswochen

uE3 = Unkonjugiertes Östriol

vs. = versus

WHO = World Health Organisation

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Akolekar, R., Minekawa, R., Veduta, A., Romero, X.C., Nicolaides, K.H. Maternal plasma inhibin A at 11-13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Prenat. Diagn.* 29 (2009) 753 – 760
2. Alfthan, H., Stenman, U.H. Pathophysiological importance of various molecular forms of human choriogonadotropin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 125 (1996) 107 – 120
3. Antonarakis, S.E., Adelsberger, P.A., Petersen, M.B., Binkert, F., Schinzel, A.A. Analysis of DNA polymorphisms suggest that most de novo dup(21q) chromosomes in patients with Down syndrome are isochromosomes and not translocations. *Am. J. Hum. Genet.* 47 (1990) 968 – 972
4. Ardawi, M.S.M., Nasrat, H.A., Rouzi, A.A., Qari, M.H., Al-Qahtani, M.H., Abuzenadah, A.M. The effect of cigarette or sheesha smoking on first-trimester markers of down syndrome. *B.J.O.G.* 114 (2007) 1397 – 1401
5. Axt-Fliedner, R., Hartge, D., Chiriac, A., Krapp, M., Berg, C., Geipel, A., Germer, U., Gembruch, U. Long-term outcome for children born after a first-trimester measurement of increased nuchal translucency with a normal karyotype: a retrospectiv analysis. *Ultraschall Med.* 30 (2009) 558 - 563
6. Bablok, W., Passing, H. Applications of statistical procedures in analytical instrument testing. *J. Automat. Chem.* 7 (1985) 74 – 79
7. Baraitser, M., Winter, R.M. Chromosomale anomalien: Trisomie 21 (Downsyndrom). In: "Fehlbildungs-syndrome", Baraitser, M., Winter, R.M., (Hrsg.), Verlag Hans Huber, Bern-Göttingen-Toronto-Seattle, 2001, 2. Auflage, 1 – 14
8. Bianchi, D.W. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential – a review. *Placenta* 25 Suppl. A (2004) 93 – 101

9. Bianchi, D.W. Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell micromerism. *Eur. J. Obstet. Gynecol.* 92 (2000) 103 – 108
10. Bianchi, D.W. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J. Pediatr.* 127 (1995) 847 – 856
11. Bianchi, D.W., Crombleholme, T.M., D'Alton, M.E. Trisomy 21. In: "Fetology: diagnosis and management of the fetal patient", Bianchi, D.W., Crombleholme, T.M., D'Alton, M.E. (Ed.), McGraw Hill, New York-St. Louis-San Francisco-Auckland-Bogotá-Caracas-Lisbon-London-Madrid-Mexico City-Milan-Montreal-New Delhi-San Juan-Singapore-Sydney-Tokyo-Toronto, 2000, 1007 – 1016
12. Bianchi, D.W., Simpson, J.L., Jackson, L.G., Elias, S., Holzgreve, W., Evans, M.I., Dukes, K.A., Sullivan, L.M., Klinger, K.W., Bischoff, F.Z., Hahn, S., Johnson, K.L., Lewis, D., Wapner R.J., De la Cruz, F. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. *Prenat. Diagn.* 22 (2002) 609 – 615
13. Bianchi, D.W., Simpson, J.L., Jackson, L.G., Evans, M.I., Elias, S., Holzgreve, W., Sullivan, L.M., De la Cruz, F. Fetal cells in maternal blood: NIFTY trial interim analysis. *Prenat. Diagn.* 19 (1999) 994 – 995
14. Bianchi, D.W., Williams, J.M., Sullivan, L.M., Hanson, F.W., Klinger, K.W., Shuber, A.P. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am. J. Hum. Genet.* 61 (1997) 822 – 829
15. Bindra, R., Heath, V., Liao, A., Spencer, K., Nicolaides, K.H. One stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: a prospective study of 15,030 pregnancies. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 20 (2002) 219 – 225

16. Bland, J.M., Altman, D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1 (1986) 307 – 310
17. Borrell, A., Casals, E., Fortuny, A., Farre, M.T., Gonce, A., Sanchez, A., Soler, A., Cararach, V., Vanrell, J.A. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat. Diagn.* 24 (2004) 541 – 545
18. Borenstein, M., Persico, N., Kagan, K.O., Gazzoni, A., Nicolaides, K.H. Frontomaxillary facial angle in screening for trisomy 21 at 11+0 to 13+6 weeks. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 32 (2008) 5 – 11
19. Borenstein, M., Persico, N., Kaihura, C., Sonek, J., Nicolaides, K.H. Frontomaxillary facial angle in chromosomally normal fetuses at 11+0 to 13+6 weeks. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 30 (2007) 737 – 741
20. Breathnach, F.M., Malone, F.D., Lambert-Messerlian, G., Cuckle, H.S., Porter, T.F., Nyberg, D.A., Comstock, C.H., Saade, G.R., Berkowitz, R.L., Klugman, S., Dugoff, L., Craigo, S.D., Timor-Tritsch, I.E., Carr, S.R., Wolfe, H.M., Tripp, T., Bianchi, D.W., D'Alton, M.E. First- and second-trimester screening: detection of aneuploidies other than Down syndrome. *Obstet. Gynecol.* 110 (2007) 651 – 657
21. Chui, R.W.K., Lui, W., Cheung, M., Kumta, N., Farina, A., Banzola, I., Grotti, S., Rizzo, N., Haines, C.J., Lo, Y.M.D. Time profile of appearance and disappearance of circulating placenta-derived mRNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 52 (2006) 313 – 316
22. Cicero, S., Avgidou, K., Rembouskos, G., Kagan, K.O., Nicolaides, K.H. Nasal bone in first-trimester screening for trisomy 21. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195 (2006) 109 – 114
23. Cicero, S., Bindra, R., Rembouskos, G., Spencer, K., Nicolaides, K.H. Integrated ultrasound and biochemical screening for trisomy 21 using fetal

- nuchal translucency, absent nasal bone, free β -hCG and PAPP-A at 11 to 14 weeks. *Prenat. Diagn.* 23 (2003) 306 – 310
24. Cicero, S., Curcio, P., Papageorgiou, A., Sonek, J., Nicolaides, K.H. Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11-14 weeks of gestation: an observational study. *Lancet* 358 (2001) 1665 – 1667
25. Cicero, S., Spencer, K., Avgidou, K., Faiola, S., Nicolaides, K.H. Maternal serum biochemistry at 11-13+6 weeks in relation to the presence or absence of the fetal nasal bone on ultrasonography in chromosomally abnormal fetuses: an updated analysis of integrated ultrasound and biochemical screening. *Prenat. Diagn.* 25 (2005) 977 – 983
26. Cole, L.A. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin. Chem.* 43 (1997) 2233 – 2243
27. Cuckle, H. Biochemical screening for Down syndrome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 92 (2000) 97 – 101
28. De la Cruz, F., Shifrin, H., Elias, S., Bianchi, D.W., Jackson, L., Evans, M.I., Simpson, J.L., Holzgreve, W., Klinger, K. Low false-positive rate of aneuploidy detection using fetal cell isolated from maternal blood. *Fetal Diagn. Ther.* 13 (1998) 380
29. Dhallan, R., Guo, X., Emche, S., Damewood, M., Bayliss, P., Cronin, M., Barry, J., Betz, J., Franz, K., Gold, K., Vallecillo, B., Varney, J. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 369 (2007) 474 – 481
30. Eiben, B., Glaubitz, R. First-trimester screening: an overview. *J. Histochem. Cytochem.* 53 (2005) 281 – 283

31. Eiben, B., Goebel, R., von Kaisenberg, C., Hammans, W., Epplen, J.T. Ein neuer Test zur Risikoberechnung für chromosomale Trisomien im ersten Schwangerschaftsdrittel. *Dtsch. Med. Wschr.* 125 (2000) 1173 – 1177
32. Evans, M.I., Van Decruyes, H., Nicolaides, K.H. Nuchal translucency measurements for first-trimester screening: the “price” of inaccuracy. *Fetal Diagn. Ther.* 22 (2007) 401 – 404
33. Finning, K., Martin, P., Daniels, G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1022 (2004) 119 – 123
34. Gasiorek-Wiens, A., Tercanli, S., Kozlowski, P., Kossakiewicz, A., Minderer, S., Meyberg, H., Kamin, G., Germer, U., Bielicki, M., Hackelöer, B.J., Sarlay, D., Kuhn, P., Klapp, J., Bahlmann, F., Pruggmayer, M., Schneider, K.T.M., Seefried, W., Fritzer, E., Von Kaisenberg, C.S. Screening for trisomy 21 by fetal nuchal translucency and maternal age: a multicenter project in Germany, Austria and Switzerland. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 18 (2001) 645 – 648
35. Gerovassili, A., Garner, C., Nicolaides, K.H., Thein, S.L., Rees, D.C. Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities?. *Prenat. Diagn.* 27 (2007) 104 – 110
36. Giudice, L.C., Conover, C.A., Bale, L., Faessen, G.H., Ilg, K., Sun, I., Imani, B., Suen, L.F., Irwin, J.C., Christiansen, M., Overgaard, M.T., Oxvig, C. Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 2359 – 2366
37. Haddow, J.E., Palomaki, G.E. Biochemical screening for neural tube defects and Down syndrome. In: “Fetal medicine: basic science and clinical

- practice”, Rodeck, C.H., Whittle, M.J. (Ed.), Churchill Livingstone, London-Edinburgh-New York-Philadelphia-Sydney-Toronto, 1999, 373 – 388
38. Hasenöhr, G. Normale Flussmuster in den uteroplazentaren und fetalen Gefäßen. In: „Dopplersonographie in Geburtshilfe und Gynäkologie“, Steiner, H., Schneider, K.T.M., (Hrsg.), Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2008, 2. Auflage, 39 – 45
39. Hromadnikova, I., Houbova, B., Hridelova, D., Voslarova, S., Calda, P., Nekolarova, K., Kofer, J., Stejskal, D., Doucha, J., Cinek, O., Vavriec, J. Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *B.M.C. Pregnancy Childbirth* 2 (2002) 4
40. Jackson, L. Fetal cells and DNA in maternal blood. *Prenat. Diagn.* 23 (2003) 837 – 846
41. Johnson, K.L., Dukes, K.A., Vidaver, J., Leshane, E.S., Ramirez, I., Weber, W.D., Bischoff, F.Z., Hahn, S., Sharma, A., Dang, D.X., Hire, L.M., Bianchi, D.W., Simpson, J.L., Holzgreve, W., Elias, S., Klinger, K.W. Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR. *Clin. Chem.* 50 (2004) 516 – 521
42. Jones, K.L. Chromosomal abnormality syndromes: Down syndrome (trisomy 21 syndrome). In: “Smith’s recognizable patterns of human malformation”, Jones, K.L. (Ed.), W.B. Saunders Company, Philadelphia-London-Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo, 1997, fifth edition, 8 – 13
43. Kagan, K.O., Cicero, S., Staboulidou, I., Wright, D., Nicolaides, K.H. Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 33 (2009) 259 – 264
44. Kagan, K.O., Frisova, V., Nicolaides, K.H., Spencer, K. Dose dependency between cigarette consumption and reduced maternal serum PAPP-A levels at 11-13+6 weeks of gestation. *Prenat. Diagn.* 27 (2007) 849 – 853

45. Kagan, K.O., Valencia, C., Livanos, P., Wright, D., Nicolaides, K.H. Tricuspid regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11+0 to 13+6 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 33 (2009) 18 – 22
46. Kagan, K.O., Wright, D., Baker, A., Sahota, D., Nicolaides, K.H. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 31 (2008) 618 – 624
47. Kagan, K.O., Wright, D., Spencer, K., Molina, F.S., Nicolaides, K.H. First-trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 31 (2008) 493 – 502
48. Kardana, A., Cole, L.A. Polypeptide nicks cause erroneous results in assays of human chorionic gonadotropin free β -subunit. *Clin. Chem.* 38 (1992) 26 – 33
49. Khalil, A., Cowans, N.J., Spencer, K., Goichman, S., Meiri, H. First trimester maternal serum placental protein 13 for the prediction of pre-eclampsia in women with a priori high risk. *Prenat. Diagn.* 29 (2009) 781 – 789
50. Krantz, D.A., Hallahan, T.W., Orlandi, F., Buchanan, P., Larsen, J.W.Jr., Macri, J.N. First-trimester Down syndrome screening using dried blood biochemistry and nuchal translucency. *Obstet. Gynecol.* 96 (2000) 207 – 213
51. Laigaard, J., Sorensen, T, Fröhlich, C., Pedersen, B.N., Christiansen, M. Schlott, K., Uldbjerg, N., Albrechtsen, R., Clausen, H.V., Ottesen, B., Wewer, U.M. ADAM12: a novel first-trimester maternal serum marker for Down syndrome. *Prenat. Diagn.* 23 (2003) 1086 – 1091

52. Laigaard, J. Spencer, K., Christiansen, M., Cowans, N.J., Larsen, S.O., Pedersen, B.N. ADAM 12 as a first-trimester maternal serum marker in screening for Down syndrome. *Prenat. Diagn.* 26 (2006) 973 – 979
53. Laursen, L.S., Overgaard, M.T., Soe, R., Boldt, H.B., Sottrup-Jensen, L., Giudice, L.C., Conover, C.A., Oxvig, C. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *F.E.B.S. Lett.* 504 (2001) 36 – 40
54. Lawrence, J.B., Oxvig, C., Overgaard, M.T, Sottrup-Jensen, L., Gleich, G.J., Hays, L.G., Yates III, J.R., Conover, C.A. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 3149 – 3153
55. Leung, T.Y., Spencer, K., Leung, T.N., Fung, T.Y., Lau, T.K. Higher median levels of free β -hCG and PAPP-A in the first trimester of pregnancy in a Chinese ethnic group. *Fetal Diagn. Ther.* 21 (2006) 140 – 143
56. Liao, A.W., Heath, V., Kametas, N., Spencer, K., Nicolaides, K.H. First-trimester screening for trisomy 21 in singleton pregnancies achieved by assisted reproduction. *Hum. Reprod.* 16 (2001) 1501 – 1504
57. Liao A.W., Snijders, R., Geerts, L., Spencer, K., Nicolaides, K.H. Fetal heart rate in chromosomally abnormal fetuses. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 16 (2000) 610 – 613
58. Lo, Y.M.D. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. *Clin. Chem.* 46 (2000) 1903 – 1906
59. Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., Wainscoat, J.S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350 (1997) 485 – 487

60. Lo, Y.M.D., Hjelm, N.M., Fidler, C., Sargent, I.L., Murphy, M.F., Chamberlain, P.F., Poon, P.M.K., Redman, C.W.G., Wainscoat, J.S. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 1734 – 1738
61. Lo, Y.M.D., Lau, T.K., Zhang, J., Leung, T.N., Chang, A.M.Z., Hjelm, N.M., Elmes, R.S., Bianchi, D.W. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin. Chem.* 45 (1999) 1747 – 1751
62. Lo, Y.M.D., Tein, M.S.C., Lau, T.K., Haines, C.J., Leung, T.N., Poon, P.M.K., Wainscoat, J.S., Johnson, P.J., Chang, A.M.Z., Hjelm, N.M. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 768 – 775
63. Lo, Y.M.D., Tsui, N.B., Chiu, R.W., Lau, T.K., Leung, T.N., Heung, M.M., Gerovassili, A., Jin, Y., Nicolaides, K.H., Cantor, C.R., Ding, C. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat. Med.* 13 (2007) 218 – 223
64. Lo, Y.M.D., Zhang, J., Leung, T.N., Lau, T.K., Chang, A.M.Z., Hjelm, N.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1999) 218 – 224
65. Maiz, N., Valencia, C., Kagan, K.O., Wright, D., Nicolaides, K.H. Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18, 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 33 (2009) 512 – 517
66. Marcillac, I., Troalen, F., Bidart, J.M., Ghillani, P., Ribrag, V., Escudier, B., Malassagne, B., Droz, J.P., Lhommé, C., Rougier, P., Duvillard, P., Prade, M., Lugagne, P.M., Richard, F., Poynard, T., Bohuon, C., Wands, J., Bellet,

- D. Free human chorionic gonadotropin β subunit in gonadal and nongonadal neoplasms. *Cancer Res.* 52 (1992) 3901 – 3907
67. Matias, A., Gomes, C., Flack, N., Montenegro, N., Nicolaides, K.H. Screening for chromosomal abnormalities at 10-14 weeks: the role of ductus venosus blood flow. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 12 (1998) 380 – 384
68. Nicolaides, K.H. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191 (2004) 45 – 67
69. Nicolaides, K.H. Screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 21 (2003) 313 – 321
70. Nicolaides, K.H., Azar, G., Byrne, D., Mansur, C., Marks, K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *B.M.J.* 304 (1992) 867 - 869
71. Nicolaides, K.H., Cicero, S., Liao, W. One-stop clinic for assessment of risk of chromosomal defects at 12 weeks of gestation. *Prenat. Neonat. Med.* 5 (2000) 145 – 154
72. Nicolaides, K.H., Heath, V., Cicero, S. Increased nuchal translucency at 11-14 weeks. *Prenat. Diagn.* 22 (2002) 308 – 315
73. Nicolaides, K.H., Spencer, K., Avgidou, K., Faiola, S., Falcon, O. Multicenter Study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 25 (2005) 221 – 226
74. Nicolaidis, P., Petersen, M. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum. Reprod.* 13 (1998) 313 – 319

75. Overgaard, M.T., Sorensen, E.S., Stachowiak, D., Boldt H.B., Kristensen, L., Sottrup-Jensen, L., Oxvig, C. Complex of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 2106 – 2117
76. Palomaki, G.E., Haddow, J.E. Maternal serum alpha-fetoprotein, age, and Down syndrome risk. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156 (1987) 460 – 463
77. Pandya, P.P., Kondylis, A., Hilbert, L., Snijders, R.J.M., Nicolaides, K.H. Chromosomal defects and outcome in 1015 fetuses with increased nuchal translucency. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 5 (1995) 15 – 19
78. Pandya, P.P., Snijders, R.J., Johnson, S.P., De Lourdes Brizot, M., Nicolaides, K.H. Screening for fetal trisomies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10 to 14 weeks of gestation. *B.J.O.G.* 102 (1995) 957 – 962
79. Passing, H., Bablok, W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21 (1983) 709 – 720
80. Pierce, J.G., Parsons, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 50 (1981) 465 – 495
81. Plasencia, W., Maiz, N., Bonino, S. Kaihura, C., Nicolaides, K.H. Uterine artery Doppler at 11 + 0 to 13 + 6 weeks in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 30 (2007) 742 – 749
82. Plasencia, W. Maiz, N., Poon, L., Yu, C., Nicolaides, K.H. Uterine artery Doppler at 11 + 0 to 13 + 6 weeks and 21 + 0 to 24 + 6 weeks in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 32 (2008) 138 – 146

83. Poon, L.C.Y., Chelemen, T., Minekawa, R., Frisova, V., Nicolaides, K.H. Maternal serum ADAM12 (a desintegrin and metalloprotease) in chromosomally abnormal pregnancy at 11-13 weeks. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 200 (2009) 508.e1 – 508.e6
84. Poon, L.C.Y., Kametas, N.A., Maiz, N., Akolehar, R., Nicolaides, K.H. First-trimester prediction of hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertension* 53 (2009) 812 – 818
85. Poon, L.L.M., Leung, T.N., Lau, T.K., Lo, Y.M.D. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 46 (2000) 1832 – 1834
86. Poon, L.C.Y., Maiz, N., Valencia, C., Plasencia, W., Nicolaides, K.H. First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 33 (2009) 23 – 33
87. Poon, L.C.Y., Nekrasova, E., Anastassopoulos, P., Livanos, P., Nicolaides, K.H. First-trimester maternal serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and adverse pregnancy outcome. *Prenat. Diagn.* 29 (2009) 553 – 559
88. Reynolds, T.M., Penney, M.D. The mathematical basis of multivariate risk screening: with special refernce to screening for Down's syndrome associated pregnancy. *Ann. Clin. Biochem.* 27 (1990) 452 – 458
89. Rijnders, R.J., Van der Luijt, R.B., Peters, E.d., Goeree, J.K., Van der Schoot, C.E., Ploss van Amstel, J.K., Christiaens, G.C. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat. Diagn.* 23 (2003) 1042 – 1044
90. Schielen, P.C.J.I., Van Leeuwen-Spruijt, M., Belmouden, I., Elvers, L.H., Jonker, M., Loeber, J.G. Multi-centre first-trimester screening for Down syndrome in the Netherlands in routine clinical practice. *Prenat. Diagn.* 26 (2006) 711 – 718

91. Schneider, K.T.M. Wissenschaftlich begründete moderne Geburtshilfe. *Gynäkologie* 35 (2002) 840 – 844
92. Schuchter, K., Hafner, E., Stangl, G., Metzenbauer, M., Höfinger, D., Philipp, K. The first trimester “combined test” for the detection of Down syndrome pregnancies in 4939 unselected pregnancies. *Prenat. Diagn.* 22 (2002) 211 – 215
93. Schuchter, K., Wald, N., Hackshaw, A.K., Hafner, E., Liebhart, E. The distribution of nuchal translucency at 10-13 weeks of pregnancy. *Preant. Diagn.* 18 (1998) 281 – 286
94. Seppo, A., Frisova, V., Ichetovkin, I., Kim, Y., Evans, M.I., Antsaklis, A., Nicolaides, K.H., Tafas, T., Tsiouras, P., Kilpatrick, M.W. Detection of circulating fetal cells utilizing automated microscopy: potential for noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies. *Prenat. Diagn.* 28 (2008) 815 – 821
95. Sheppard, C., Platt, L.D. Nuchal translucency and first trimester risk assessment: a systematic review. *Ultrasound Q.* 23 (2007) 107 – 116
96. Snijders, R., Nicolaides, K. First trimester diagnosis of chromosomal defects. In: “The 11-13+6 weeks scan”, Nicolaides, K.H. (Ed.), Fetal Medicine Foundation, London, 2004, 7 – 44
97. Snijders, R.J.M., Noble, P., Sebire, N.J., Souka, A., Nicolaides, K.H. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *Lancet* 351 (1998) 343 – 346
98. Snijders, R.J.M., Thom, E.A., Zachary, J.M., Platt, L.D., Greene, N., Jackson, L.G., Sabbagha, R.E., Filkins, K., Silver, R.K., Hogge, W.A., Ginsberg, N.A., Beverly, S., Morgan, P., Blum, K., Chilis, P., Hill, L.M., Hecker, J., Wapner, R.J. First-trimester trisomy screening: nuchal

- translucency measurement training and quality assurance to correct and unify technique. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 19 (2002) 353 – 359
99. Soergel, P., Pruggmayer, M., Schwerdtfeger, R., Mühlhaus, K., Scharf, A. Screening for trisomy 21 with maternal age, fetal nuchal translucency and maternal serum biochemistry at 11-14 weeks: a regional experience from Germany. *Fetal Diagn. Ther.* 21 (2006) 264 – 268
100. Spencer, K. Aneuploidy screening in the first trimester. *Am. J. Med. Genet. Semin. Med. Genet.* 145C (2007) 18 – 32
101. Spencer, K., Bindra, R., Cacho, A.M., Nicolaides, K.H. The impact of correcting for smoking status when screening for chromosomal anomalies using maternal serum biochemistry and fetal nuchal translucency thickness in the first trimester of pregnancy. *Prenat. Diagn.* 24 (2004) 169 – 173
102. Spencer, K., Bindra, R., Nicolaides, K.H. Maternal weight correction of maternal serum PAPP-A and free β -hCG MoM when screening for trisomy 21 in the first trimester of pregnancy. *Prenat. Diagn.* 23 (2003) 851 – 855
103. Spencer, K., Cowans, N.J., Avgidou, K., Molina, F., Nicolaides, K.H. First-trimester biochemical markers of aneuploidy and the prediction of small-for-gestational age fetuses. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 31 (2008) 15 – 19
104. Spencer, K., Cowans, N.J., Avgidou, K., Nicolaides, K.H. First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of impending fetal death. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 28 (2006) 637 – 643
105. Spencer, K., Cowans, N.J., Molina, F., Kagan, K.O., Nicolaides, K.H. First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 31 (2008) 147 – 152

106. Spencer, K., Cowans, N.J., Nicolaides, K.H. Low levels of maternal serum PAPP-A in the first trimester and the risk of pre-eclampsia. *Prenat. Diagn.* 28 (2008) 7 – 10
107. Spencer, K., Cowans, N.J., Stamatopoulou, A. Maternal serum ADAM12s in the late first trimester of pregnancies with trisomy 21. *Prenat. Diagn.* 28 (2008) 422 – 424
108. Spencer, K., Cowans, N.J., Stamatopoulou, A. ADAM12s in maternal serum as a potential marker of pre-eclampsia. *Prenat. Diagn.* 28 (2008) 212 – 216
109. Spencer, K., Cowans, N.J., Stamatopoulou, A. Maternal serum ADAM12s as a marker of rare aneuploidies in the first or second trimester of pregnancy. *Prenat. Diagn.* 27 (2007) 1233 – 1237
110. Spencer, K., Cowans, N.J., Uldbjerg, N., Topping, N. First-trimester ADAM12s as early markers of trisomy 21: a promise still unfulfilled?. *Prenat. Diagn.* 28 (2008) 338 – 342
111. Spencer, K., Heath, V., El-Sheikhah, A., Ong, C.Y.T., Nicolaides, K.H. Ethnicity and the need for correction of biochemical and ultrasound markers of chromosomal anomalies in the first trimester: a study of oriental, asian and afro-caribbean populations. *Prenat. Diagn.* 25 (2005) 365 – 369
112. Spencer, K., Kagan, K.O., Nicolaides, K.H. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: an update of the impact of chorionicity on maternal serum markers. *Prenat. Diagn.* 28 (2008) 49 – 52
113. Spencer, K., Liao, A.W.J., Skentou, H., Cicero, S., Nicolaides, K.H. Screening for triploidy by fetal nuchal translucency and maternal serum free β -hCG and PAPP-A at 10-14 weeks of gestation. *Prenat. Diagn.* 20 (2000) 495 – 499

114. Spencer, K., Souter, V., Tul, N., Snijders, R., Nicolaides, K.H. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free β -human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 13 (1999) 231 – 237
115. Spencer, K., Spencer, C.E., Power, M., Dawson, C., Nicolaides, K.H. Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one stop clinic: a review of three years prospective experience. *B.J.O.G.* 110 (2003) 281 – 286
116. Spencer, K., Spencer, C.E., Power, M., Moakes, A., Nicolaides, K.H. One stop clinic for assessment of risk for fetal anomalies; a report of the first year of prospective screening for chromosomal anomalies in the first trimester. *B.J.O.G.* 107 (2000) 1271 – 1275
117. Spencer, K., Vereecken, A., Cowans, N.J. Maternal serum ADAM12s as a potential marker of trisomy 21 prior to 10 weeks of gestation. *Prenat. Diagn.* 28 (2008) 209 – 211
118. Spencer, K., YU, C.K.H., Cowans, N.J., Otugbah, C., Nicolaides, K.H. Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free β -hCG and with second-trimester uterine artery Doppler. *Prenat. Diagn.* 25 (2005) 949 – 953
119. Stenhouse, E.J., Crossley, J.A., Aitken, D.A., Brogan, K. Cameron, A.D., Connor, J.M. First-trimester combined ultrasound and biochemical screening for Down syndrome in routine clinical practice. *Prenat. Diagn.* 24 (2004) 774 – 780
120. Sun, I.Y.C., Overgaard, M.T., Oxvig, C., Giudice, L.C. Pregnancy-associated plasma protein A proteolytic activity is associated with the human placental trophoblast cell membrane. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 5235 – 5240

121. Tul, N., Spencer, K., Noble, P., Chan, C., Nicolaides, K. Screening for Trisomy 18 by fetal nuchal translucency and maternal serum free β -hCG and PAPP-A at 10-14 weeks of gestation. *Prenat. Diagn.* 19 (1999) 1035 – 1042
122. Tulzer, G. Normale Flussmuster am fetalen Herzen. In: „Dopplersonographie in Geburtshilfe und Gynäkologie“, Steiner, H., Schneider, K.T.M., (Hrsg.), Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2008, 2. Auflage, 193 – 202
123. Van der Schoot, C.E., Soussan, A.A., Koelewijn, J., Bousel, G., Paget-Christiaens, L.G., de Haas, M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 13 (2006) 53 – 57
124. Wapner, R.J., Jenkins, T.M., Khalek, N. Prenatal diagnosis of congenital disorders. In: “Maternal-Fetal medicine. Principles and practice”, Creasy, R.K., Resnik, R., Iams, J.D., Lockwood, C.J., Moore, T.R. (Ed.), Saunders Elsevier, Philadelphia, 2009, sixth edition, 221 – 274
125. Wapner, R., Thom, E., Simpson, J.L., Pergament, E., Silver, R., Filkins, K., Platt, L., Mahoney, M., Johnson, A., Hogge, W.A., Wilson, D., Mohide, P., Hershey, D., Krantz, D., Zachary, J., Snijders, R., Greene, N., Sabbagha, R., MacGregor, S., Hill, L., Gagnon, A., Hallahan, T., Jackson, L. First-trimester screening for trisomies 21 and 18. *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 1405 – 1413
126. Witters, I., Fryns J.R. Fetal nuchal translucency thickness. *Genet. Couns.* 18 (2007) 1 – 7
127. Zaragoza, E., Akolekar, R., Poon, L.C.Y., Pepes, S., Nicolaides, K.H. Maternal serum placental growth factor at 11-13 weeks in chromosomally abnormal pregnancies. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 33 (2009) 382 – 386
128. Zerres, K. Humangenetische Beratung. *Deutsches Ärzteblatt* 100 (2003) 2129 – 2133

129. Zhong, X.Y., Bürk, M.R., Troeger, C., Jackson, L.R., Holzgreve, W., Hahn, S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat. Diagn.* 20 (2000) 795 – 798

130. Zimmermann, B.G. Nicht-invasive Pränataldiagnostik durch Analyse fetaler DNA im mütterlichen Blut. *J. Lab. Med.* 31 (2007) 165 – 170

131. Zimmermann, R. Screening auf Chromosomenanomalien und Fehlbildungen im 1. Trimenon. *Gynäkologe* 35 (2002) 624 – 627

9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Peter Lupp, Ltd. Oberarzt des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die ausgesprochen freundliche und kompetente Betreuung dieser Arbeit, die ich jederzeit in Anspruch nehmen konnte. Ich möchte mich bei ihm für die vielen anregenden Diskussionen und die wertvollen Ratschläge bedanken.

Recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. KTM Schneider, Leiter der Abteilung für Perinatalmedizin der Frauenklinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die Anregung zur Durchführung dieser Arbeit. Seit 2001 unterstützt er mich ununterbrochen bei meiner wissenschaftlichen Ausbildung.

Ich danke Frau Ursula Huber, medizinisch-technische Assistentin des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die Durchführung der Testsysteme.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Jürgen Zitzler, Study Manager der Firma Roche Diagnostics GmbH in Penzberg, und Herrn Dr. Tibor Schuster des Instituts für Medizinische Statistik und Epidemiologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Abschließend habe ich besonders herzlich meiner Ehefrau Claudia Ruetz für die Motivierung und bedingungslose Unterstützung in jedem meiner Lebensabschnitte seit 1993 und für ihr liebevolles Verständnis in guten wie in schlechten Zeiten zu danken. Meinen Töchtern Camila Sofia und Ana Isabel danke ich für die zahlreichen Wochenenden, die sie opferten und ohne ihren Papa verbrachten. Ihr seid die Motivation meines Lebens.

10. ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

**„Serumbestimmungen von freiem β -hCG und PAPP-A mittels
Elektrochemilumineszenz-Immunoassays – Einfluss auf die diagnostische
Trennschärfe beim Ersttrimester-Screening“**

aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München unter Einleitung und Betreuung durch Ltd. OA Prof. Dr. med. Peter Luppä ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebene Hilfsmittel benutzt habe.

Die Unterstützung der Firma Roche Diagnostics GmbH für die vorliegende Dissertation hat sich auf die Bereitstellung der Reagenzien des neuen Elecsys-Tests sowie auf die Unterstützung bei der statistischen Auswertung beschränkt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den 05. März 2010

Unterschrift