

# Prüfplan

## für wissenschaftliche Untersuchungen

**Studientitel:**

Reducing false positives in screening (ReFaPo-Studie)

Studie zur Erforschung der Falsch-Positivrate beim Ersttrimester-Screening und bei der zellfreien fetalen DNA-Analyse

**Kurztitel:**

ReFaPo-Studie

**Version des Prüfplans:**

Version: 1.0

## Inhaltsverzeichnis

1	Prüfärzte .....	3
2	Unterschriften .....	4
3	Abkürzungen.....	5
4	Einleitung.....	6
4.1	Überblick über die derzeit möglichen Screening-Untersuchungen .....	6
4.1.1	Mütterliches Alter .....	6
4.1.2	Ersttrimester-Screening.....	6
4.1.3	Analyse der zellfreien DNA.....	8
5	Problem- und Fragestellung .....	10
5.1	Unterschiedliche Schwellenwerte.....	10
5.2	Vorangehende Ultraschall-Untersuchung.....	10
5.3	Ergebnislose cfDNA-Analysen .....	10
5.4	Konkrete Fragestellung der Studie .....	11
5.4.1	H0-Hypothese.....	11
5.4.2	H1-Hypothese.....	11
5.4.3	Primärer Endpunkt .....	11
5.4.4	Sekundäre Endpunkte .....	11
6	Studienablauf / Studiendesign .....	12
6.1	Studienkollektiv .....	12
6.2	Studienablauf .....	12
6.2.1	Ultraschall-Untersuchung vor der Randomisierung.....	12
6.2.2	Studienrekrutierung .....	12
6.3	Einschlusskriterien.....	13
6.4	Ausschlusskriterien.....	13
7	Power-Kalkulation .....	14
8	Umgang mit Daten .....	15
8.1	Datendokumentation .....	15
8.2	Datenarchivierung.....	16
9	Abbruchkriterien .....	17
10	Ethische Belange .....	17
11	Kosten für die Patientin und Sponsoring der Studie .....	18
12	Literatur.....	19

# 1 Prüferärzte

## Studienverantwortlicher Prüferärzte:

### **Prof. Dr. med. Karl Oliver Kagan**

Leitender Oberarzt Pränataldiagnostik  
Department für Frauengesundheit Tübingen  
Calwerstraße 7  
72076 Tübingen  
Tel: +49 7071 29 82200

### **PD Dr. med. Harald Abele**

Stellv. Ärztlicher Direktor Forschungsinstitut für Frauengesundheit Tübingen  
Leitender Arzt Perinatologie  
Department für Frauengesundheit Tübingen  
Calwerstraße 7  
72076 Tübingen  
Tel: +49 7071 29 87096

### **Prof. Dr. Diethlem Wallwiener**

Ärztlicher Direktor  
Department für Frauengesundheit Tübingen  
Calwerstraße 7  
72076 Tübingen  
Tel: +49 7071 29 82246

### **Prof. Dr. Sara Brucker**

Ärztliche Direktorin Forschungsinstitut für Frauengesundheit Tübingen  
Calwerstraße 7  
72076 Tübingen  
Tel: +49 7071 29 87091

## Prüferärzte:

PD Dr. Markus Hoopmann  
OÄ Dr. Britta Yazdi  
OÄ Dr. Bettina Haas  
Dr. Philipp Wagner  
Dr. Sybille Lessmann-Bechle

Department für Frauengesundheit Tübingen  
Calwerstraße 7  
72076 Tübingen  
Tel: +49 7071 29 84807

## 2 Unterschriften

Tübingen, den ~~26/09/2022~~22/10/2015

Prof. Karl Oliver Kagan

PD Dr. Harald Abele

Prof. Diethelm Wallwiener

Prof. Sara Brucker

### 3 Abkürzungen

β-hCG	Freies beta human chorionic gonadotropin
cfDNA	zellfreie fetale DNA
ETS	Erst-Trimester Screening
MoM	Multiple of the median
NT	Nackentransparenz
PAPP-A	Pregnancy-associated plasma protein
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
SSW	Schwangerschaftswoche

## 4 Einleitung

Die demographische Entwicklung in der industrialisierten Welt und insbesondere das immer höhere durchschnittliche Lebensalter der Frauen in dem eine Schwangerschaft angestrebt wird, erfordern die Etablierung geeigneter Methoden, den Verlauf und die fetale Entwicklung während der Schwangerschaft vorauszusagen und dabei möglichst komplikationsarm zu sein. So ist heute das Screening auf Chromosomenstörungen ein zentraler Bestandteil der Pränataldiagnostik [1-3]. Ein Großteil der werdenden Eltern wünscht bereits im ersten Trimenon einen weitreichenden Ausschluss von Chromosomenstörungen (insbesondere Trisomie 21) und Fehlbildungen [4]. Das Screening auf Trisomie 21 ist vor allem von Interesse, da die Wahrscheinlichkeit dieser Erkrankung mit dem mütterlichen Alter ansteigt und etwa die Hälfte aller Chromosomenstörungen ausmacht [5].

In den vergangenen Jahrzehnten wurden zahlreiche Untersuchungsmethoden entwickelt, um die Testgüte der Screening-Untersuchungen zu steigern [6-10]. Den unterschiedlichen Ansätzen immanent ist, dass sie das individuelle Risiko einer Patientin für eine Chromosomenstörung bestimmen. Bei einem erhöhten Risiko, welches in der Regel als Risiko über einem bestimmten Schwellenwert definiert wird, wird zur definitiven Abklärung eine Fruchtwasserpunktion oder eine Chorionzottenbiopsie durchgeführt.

### 4.1 Überblick über die derzeit möglichen Screening-Untersuchungen

#### 4.1.1 Mütterliches Alter

Zu Beginn der 1980er Jahre konnte nur auf der Basis des mütterlichen Altersrisikos das Risikokollektiv für eine Trisomie 21 beschrieben werden. Zur Bestimmung des Risikokollektivs wurde ein Schwellenwert von 35 Jahren verwendet, da zur damaligen Zeit 5% der Schwangeren 35 Jahre alt oder älter waren. Durch das zunehmend ansteigende Alter der Schwangeren sind heute annähernd 25% der weiblichen Bevölkerung 35 Jahre oder älter, wodurch die Sinnhaftigkeit des Altersscreenings bereits in Frage gestellt wird. Die Detektionsrate liegt bei nur etwa 50%, was ebenfalls nicht mit einem modernen Screening-Test in Einklang gebracht werden kann. Dennoch stellt das mütterliche Alter auch weiterhin ein Bestandteil der komplexeren Screening-Algorithmen dar [11].

#### 4.1.2 Ersttrimester-Screening

Anfang der 1990er Jahre konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Nicolaides zeigen, dass eine Risikoevaluation im ersten Trimenon mithilfe der fetalen Nackentransparenz (NT) deutlich effektiver ist [7,12]. Aus diesem Ansatz entwickelte sich das kombinierte Ersttrimester-Screening (ETS), das auch heute noch den Goldstandard in der Risikobeurteilung darstellt und von vielen Ländern in die gesetzliche Regelversorgung von Schwangerschaften übernommen wurde [13,14].

In Deutschland wird die Untersuchung als IGEL-Leistung angeboten.

Das Konzept basiert auf der Messung der fetalen NT in der 12. bis 14. SSW und der Bestimmung der Serummarker freies beta-hCG und PAPP-A im mütterlichen Blut. Die fetale NT ist von der Größe des Feten abhängig und etwa 2,0 mm dick [15]. Bei etwa 75% der Feten mit einer Trisomie 21 liegt die fetale NT über der 95. Perzentile. Die **Abbildungen 1 a und b** zeigen einen Feten mit einer normalen und einer erhöhten NT bei einer Trisomie 21 in der 13.SSW. Da die Serummarker vom Gestationsalter und einigen weiteren mütterlichen und Schwangerschafts-spezifischen Charakteristika abhängen, werden diese in MoM (Multiple of median) angegeben. Bei

Trisomie 21 findet man eine Verdopplung des freien beta-hCGs – also 2 MoM – und eine Halbierung des PAPP-As – also 0,5 MoM [16].

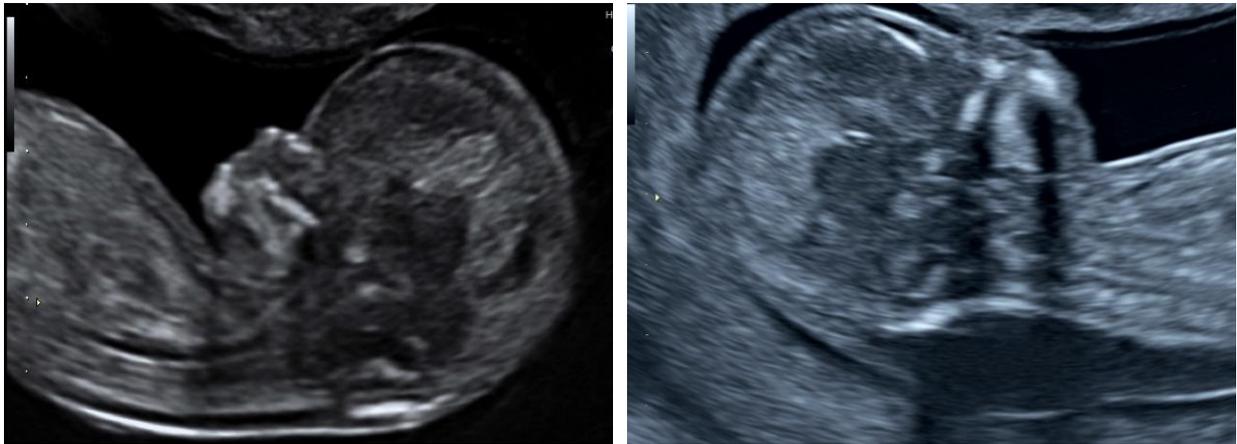


Abbildung 1a und 1b. Normale NT (links) und erhöhte NT (rechts) bei einem Feten mit Trisomie 21.

Die sonographischen und biochemischen Parameter werden mit dem mütterlichen Altersrisiko über Wahrscheinlichkeitsquotienten kombiniert, so dass für die Patientin ein persönliches Risiko berechnet werden kann.

Die Detektions- und Falsch-Positivrate ist abhängig vom verwendeten Schwellenwert (Abbildung 2) [10]. Ein allgemein akzeptierter Cut-off wie beim Alters-Screening ist nicht verfügbar, sondern abhängig von der anvisierten Testgüte. Häufig wird in Deutschland zur Beratung ein Schwellenwert von 1:150 verwendet. Die Detektionsrate dabei liegt dabei bei etwa 90% bei einer Falsch-Positivrate von 3% [2,17].

**Table 4.** Modeled detection rates of trisomy 21 and trisomies 18 or 13 and FPR in first-trimester screening for fetal trisomies by the algorithm for trisomy 21 using various combinations of biomarkers at fixed risk cutoffs

Risk cutoff for T21 (1:x)	NT, PAPP-A, $\beta$ -hCG			NT, PAPP-A, $\beta$ -hCG, AFP, PLGF			NT, PAPP-A, $\beta$ -hCG, AFP, PLGF, DV PIV		
	FPR, %	DR T21, %	DR T18/13, %	FPR, %	DR T21, %	DR T18/13, %	FPR, %	DR T21, %	DR T18/13, %
100	2.0	86.4	65.8	1.9	89.1	66.0	1.2	93.1	76.7
200	3.5	89.9	69.8	3.2	92.0	70.4	2.0	94.9	80.6
300	4.7	91.7	71.9	4.3	93.5	72.7	2.7	95.8	82.7
400	5.8	92.9	73.3	5.3	94.5	74.2	3.3	96.4	84.1
500	6.8	93.7	74.4	6.2	95.2	75.4	3.9	96.8	85.2
1,000	11.3	95.9	77.7	9.9	96.9	78.8	6.2	97.8	88.1
1,500	15.0	96.9	79.8	12.9	97.6	80.8	8.1	98.2	89.6
2,000	18.1	97.5	81.3	15.4	98.1	82.1	9.7	98.5	90.6
2,500	20.8	97.9	82.5	17.6	98.4	83.2	11.1	98.7	91.3
3,000	23.3	98.2	83.5	19.5	98.6	84.1	12.3	98.8	91.8
3,500	25.5	98.4	84.4	21.3	98.8	84.8	13.4	99.0	92.3
4,000	27.5	98.6	85.1	22.8	98.9	85.5	14.5	99.1	92.6
5,000	31.2	98.8	86.4	25.7	99.1	86.5	16.4	99.2	93.2
6,000	34.4	99.0	87.4	28.1	99.3	87.4	18.1	99.3	93.6
7,000	37.1	99.2	88.2	30.2	99.4	88.1	19.6	99.4	94.0
8,000	39.6	99.3	89.0	32.1	99.4	88.7	21.0	99.4	94.3

Rates are standardized so that they relate to the pregnant population of England and Wales in 2011 [13].

Abbildung 2. Detektions- und Falsch-Positivraten bei unterschiedlichen Risiko-Schwellenwerten in Screening auf Trisomie 21 mittels ETS basierend auf dem mütterlichen Altersrisiko, der fetalen NT, PAPP-A und dem freien beta-hCG [10].

Die erhöhte NT ist zudem auch als Marker für andere Chromosomenstörungen bekannt. Daher wird in der Regel ab einer NT von 3,5mm zu einer Karyotypisierung mittels invasiver Diagnostik geraten, unabhängig von dem schlussendlich berechneten Risiko für Trisomie 21 [18].

#### 4.1.3 Analyse der zellfreien DNA

In den vergangenen Jahren bahnt sich ein Paradigmenwechsel im Screening auf Trisomie 21 an [9,19]. Lo et al. zeigten Ende der 1990er Jahre, dass im mütterlichen Blut freie DNA zu finden ist, die der Schwangerschaft zuzuordnen ist [20]. Obwohl sich der Begriff zellfreie fetale DNA (cfDNA) etabliert hat, ist die DNA nicht fetalen sondern plazentaren Ursprungs und umfasst etwa 10% der gesamten freien DNA im mütterlichen Plasma. Durch die Entwicklung neuer Hochdurchsatzsequenziergeräte („Next Generation Sequencing“) ist es möglich geworden, die zellfreie DNA zeitnah zu amplifizieren und zu sequenzieren, wodurch eine Auswertung in der Schwangerschaft möglich wurde.

Da eine isolierte Betrachtung der schwangerschaftsspezifischen DNA-Fragmente technisch schwierig ist, wird die gesamte zellfreie DNA der Mutter und des Feten zur Auswertung verwendet. Die Unterschiede in der Anzahl der cfDNA Fragmente zwischen einer fetalen Trisomie und einem normalen Befund sind dabei entsprechend gering. So kann etwa 0,75% des humanen Genoms dem einzelnen Chromosom 21 zugeordnet werden. Bei einem unauffälligen Karyotyp beträgt der Anteil somit 1,5%, bei einer Trisomie 21 entsprechend 2,25%. Sind beispielsweise 10% der freien DNA im mütterlichen Blut einer Schwangerschaft mit Trisomie 21 zuzuordnen, so ergibt sich:  $1,5\% \text{ (Anteil des Chromosoms 21 am maternalen Genom)} \times 0,9 \text{ (90\% maternale DNA)} + 2,25 \text{ (fetaler Anteil des Chromosom 21 bei Trisomie 21 am fetalen Genom)} \times 0,1 \text{ (10\% fetale DNA)} = 1,575\%$  versus 1,5%. Ein entsprechender Algorithmus muss also zwischen 1,5% und 1,575% differenzieren können. Bei abnehmender fetaler DNA-Konzentration im mütterlichen Blut wird dieser Abstand geringer, wodurch die Trennschärfe des Tests abnimmt [9].

Die statistische Beurteilung, ob die Menge an chromosomen-spezifischer DNA dem Erwartungsmaß entspricht oder übersteigt, d.h. eine Trisomie vorliegt, erfolgt meist über z-scores. Dabei wird die Abweichung vom Erwartungswert als Mehrfaches der Standardabweichung angegeben. In der Regel wird häufig ein Schwellenwert von 3,0 verwendet. Bei Verwendung dieses Grenzwertes liegen 99,9% der Werte euploider Feten unterhalb des Schwellenwerts, das heißt im Normalbereich, wodurch sich eine Falsch-Positivrate von 0,1% ergibt.

Neuere Algorithmen verwenden einen Wahrscheinlichkeitsquotienten, der aus dem Ergebnis der cfDNA-Analyse ermittelt wird. Dieser wird oft mit dem mütterlichen Altersrisiko und dem Gestationsalter kombiniert, woraus sich analog zum ETS ein adjustierte Risiko ergibt [21].

Im Allgemeinen wird für das Screening auf Trisomie 21 durch die cfDNA-Analyse eine Detektionsrate von 99% und eine Falsch-Positivrate von 0,1% angegeben. Bei Verwendung des Algorithmus aus mütterlichem Alter und cfDNA bezieht sich die angeführte Testgüte auf einen Risiko-Schwellenwert von 1:100 [9].

In etwa 3% der Untersuchungen ist die fetale Fraktion der zellfreien DNA im mütterlichen Blut nicht hoch genug um die Analyse erfolgreich durchzuführen. Durch einen erneuten und komplexeren Auswertungsversuch kann der Anteil auf 2% gesenkt werden. In diesen Fällen muss auf eine alternative Risikoberechnung verwiesen werden [22]. In der Regel wird auf das ETS zurückgegriffen.

Die cfDNA-Analyse ist heute klinisch verfügbar und wird ebenfalls als IGEL-Leistung angeboten. Die Kosten der Analyse betragen je nach Anbieter etwa €400 - €600.

Dem Vorteil der hervorragenden Testgüte der cfDNA-Analyse im Screening auf Trisomie 21 steht der Nachteil der Fokussierung auf diese Chromosomenstörung gegenüber. Es werden wohl auch Risiken für eine Trisomie 18, 13 und gonosomale Aberrationen berechnet. Die Testgüte ist aber ähnlich hoch wie die der detaillierten Ultraschalluntersuchung auf fetale Fehlbildungen in der 12. – 14.SSW, welche ein integraler Bestandteil des ETS darstellt [23-25]. Insofern sollte die cfDNA-Analyse erst nach einer detaillierten Ultraschalluntersuchung und nach Messung der fetalen NT durchgeführt werden. Bei Auffälligkeiten oder einer NT  $\geq 3,5$ mm wird zu einer Karyotypisierung mittels invasiver Diagnostik geraten. Nur bei einer unauffälligen Ultraschalluntersuchung ist die cfDNA-Analyse sinnvoll, da das Risiko anderer Chromosomenstörungen vernachlässigbar gering ist und somit nur das Risiko einer Trisomie 21 als relevantes Restrisiko verbleibt [9].

## 5 Problem- und Fragestellung

Die veröffentlichten Kennzahlen des ETS mit einer Detektionsrate von etwa 90% bei einer Falsch-Positivrate von 3% und der cfDNA-Analyse von 99% und einer Falsch-Positivrate von 0,1% zeigen klar die Überlegenheit der cfDNA-Analyse im Screening auf Trisomie 21 [26]. Dennoch müssen in der täglichen Praxis der Anwendung einige Aspekte berücksichtigt werden, die die Testgüten relevant beeinflussen und die Überlegenheit der cfDNA-Analyse in Frage stellen. Diese wurde in den vergangenen Arbeiten nicht berücksichtigt, die in der Regel beide Untersuchungsmethoden direkt gegeneinander als primäre Screening-Verfahren verglichen

### 5.1 Unterschiedliche Schwellenwerte

Während bei der cfDNA-Analyse ein Schwellenwert von 1:100 verwendet wird, liegt der Cut-off beim ETS bei 1:150. In Abbildung 2 ist aufgezeigt, dass das ETS dadurch eine Falsch-Positivrate von etwa 3,0% aufweist [10,21]. Bei einem Risiko von 1:100 liegt die Falsch-Positivrate bei etwa 2,0%. Angesichts der erhöhten Altersstruktur der zu erwartenden Bevölkerung im Vergleich zu den englischen Screening-Studien ist eine Falsch-Positivrate von 2,5% realistisch.

### 5.2 Vorgehende Ultraschall-Untersuchung

Wie bereits beschrieben, ist die eingehende Ultraschall-Untersuchung und Messung der fetalen NT vor einer cfDNA-Analyse von großer Bedeutung. Bei Fehlbildungen oder einer fetalen  $NT \geq 3,5\text{mm}$  wird von Risikoanalyse mittels cfDNA-Analyse oder per ETS abgeraten. Dies hat zur Folge, dass die angegebene Falsch-Positivrate des ETS wiederum als zu hoch beschrieben wird. Da 3,5mm für die fetale NT die 99. Perzentile darstellt, muss mit einer Reduktion der Falsch-Positivrate beim ETS um 1,0% auf etwa 1,5% gerechnet werden. Die Falsch-Positivrate der cfDNA-Analyse wird durch die Beschränkung der Untersuchung auf Feten ohne Fehlbildung und einer  $NT < 3,5\text{mm}$  nicht beeinflusst.

### 5.3 Ergebnislose cfDNA-Analysen

In etwa 3% der Fälle bleibt die cfDNA-Analyse ergebnislos. Durch eine erneute Blutabnahme und Analyse kann die Rate ergebnisloser Analysen auf 2% gesenkt werden. In diesen Fällen wird in der Regel auf das ETS mit zurückgegriffen, wodurch sich die Falsch-Positivrate der cfDNA-Analyse insgesamt erhöht:

- Falsch-Positivrate cfDNA-Analyse 0,1%
- Ergebnislose cfDNA-Analyse 2%
  - ETS mit 1:100 als Schwellenwert und einer Falsch-Positivrate von 1,5% (s.o.)
  - = 1% von 1,5%
  - = 0,03%
- Gesamt-Falsch-Positivrate 0,13%

Für den Vergleich unterschiedlicher Screening-Tests ist vor allem die Falsch-Positivrate von Bedeutung. Diese sollte möglichst gering gehalten werden, da absolut gesehen wesentlich mehr Schwangere von einer niedrigen Falsch-Positivrate profitieren.

## 5.4 Konkrete Fragestellung der Studie

In der geplanten prospektiven und randomisierten Studie soll daher überprüft werden, ob nach vorangehendem Ausschluss von fetalen Fehlbildungen bzw. einer NT  $\geq 3,5$ mm und unter Berücksichtigung des oben beschriebenen Alternativwegs bei ergebnisloser cfDNA-Analyse und bei Verwendung des gleichen Schwellenwerts von 1:100 das ETS eine signifikant höhere Falsch-Positivrate im Vergleich zur cfDNA-Analyse aufweist.

### 5.4.1 H0-Hypothese

Die cfDNA-Analyse weist nach vorangehendem Ausschluss von fetalen Fehlbildungen bzw. einer NT  $\geq 3,5$ mm und unter Berücksichtigung des oben beschriebenen Alternativwegs bei ergebnisloser cfDNA-Analyse und bei Verwendung des gleichen Schwellenwerts von 1:100 keine niedrigere Falsch-Positivrate wie das ETS auf.

### 5.4.2 H1-Hypothese

Die cfDNA-Analyse weist nach vorangehendem Ausschluss von fetalen Fehlbildungen bzw. einer NT  $\geq 3,5$ mm und unter Berücksichtigung des oben beschriebenen Alternativwegs bei ergebnisloser cfDNA-Analyse und bei Verwendung des gleichen Schwellenwerts von 1:100 eine niedrigere Falsch-Positivrate wie das ETS auf.

### 5.4.3 Primärer Endpunkt

- Falsch-Positivrate nach ETS und nach cfDNA-Analyse

### 5.4.4 Sekundäre Endpunkte

- Anzahl und Anteil nicht rekrutierbarer Schwangerschaften aufgrund von Fehlbildungen und erhöhter NT (im Screening-Kollektiv).
- Zeitintervall zwischen Beratung und Ergebnismitteilung an die Schwangere nach ETS und nach cfDNA-Analyse
- Anzahl und Anteil ergebnisloser Auswertungen nach ETS und nach cfDNA-Analyse
- Anzahl und Anteil ergebnisloser Auswertungen nach ETS und nach cfDNA-Analyse
- Anzahl und Anteil an Schwangeren, die sich zur invasiven Diagnostik entschieden haben nach ETS und nach cfDNA-Analyse
- Zufriedenheit nach ETS und nach cfDNA-Analyse (Auswertung anhand eines Fragebogens, siehe unten).

## 6 Studienablauf / Studiendesign

### 6.1 Studienkollektiv

An der Universitäts-Frauenklinik werden pro Jahr etwa 1200 ETS-Untersuchungen bei Schwangeren „aus dem Normalkollektiv“ durchgeführt. Die Schwangeren werden von den lokalen Frauenärzten zur Untersuchung überwiesen, ohne dass vorab eine entsprechende Vor-Untersuchung erfolgt ist und ohne dass vorab eine Vorauswahl aufgrund einer auffälligen Ultraschall-Untersuchung erfolgt ist. ~~Die Abrechnung erfolgt als Igel-Leistung für €150.~~ Diese Patientinnen sollen - in Abhängigkeit von der Einwilligung zur Studienteilnahme - für die Studie rekrutiert werden.

### 6.2 Studienablauf

#### 6.2.1 Ultraschall-Untersuchung vor der Randomisierung

Zunächst erfolgt bei allen Schwangeren, die sich zum ETS in der Frauenklinik in der 12.-14.SSW vorstellen, eine eingehende Ultraschall-Untersuchung zum Ausschluss von fetalen Fehlbildungen und der Messung der fetalen NT. Sollten Fehlbildungen oder eine erhöhte NT darstellbar sein, wird in üblicher Weise eine invasive Diagnostik empfohlen. Diese Patientinnen können nicht für die Studie rekrutiert werden (Studienausschluss - siehe 6.4).

#### 6.2.2 Studienrekrutierung

Bei unauffälliger Voruntersuchung kann die Patientin für die Studie rekrutiert werden. Nach eingehender Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patientin (siehe Anhang) wird randomisiert zwischen

- Studien-Arm 1  
Bestimmung des freien beta-hCG und PAPP-As und Berechnung des Trisomie 21-Risikos mittels kombiniertem ETS. Beta-hCG und PAPP-A werden durch das Labor Enders, Stuttgart bestimmt. Mithilfe des Software-Programms „Viewpoint“ von GE Healthcare, München wird das Risiko für Trisomie 21 durch den primär beratenden und rekrutierenden Arzt berechnet. Die Ergebnismitteilung an die Schwangere erfolgt ebenfalls durch den primär beratenden und rekrutierenden Arzt. Die Datendokumentation erfolgt im Software-Programm „Viewpoint“ (zur ausführlichen Beschreibung der Datenakquise siehe Kapitel 8).
- Studien-Arm 2  
cfDNA-Analyse und Berechnung des Trisomie 21-Risikos mittels mütterlichem Altersrisiko und cfDNA. Die cfDNA-Analyse erfolgt durch die Firma Cenata, Tübingen. Das Ergebnis der cfDNA-Analyse inkl. des Risikos für Trisomie 21 erfolgt an den primär beratenden und rekrutierenden Arzt. Die Ergebnismitteilung an die Schwangere erfolgt ebenfalls durch den primär beratenden und rekrutierenden Arzt.  
Zum Zeitpunkt der Blutabnahme zur cfDNA-Analyse wird ein weiteres Serumröhrchen abgenommen, zentrifugiert und in den Laborräumen der Universitäts-Frauenklinik eingefroren. Die Archivierung der Serumprobe erfolgt pseudononymisiert. Sollte die cfDNA-Analyse kein Ergebnis erbringen, kann die Messung des PAPP-As und beta-hCGs aus der Serumprobe erfolgen. Die Serumprobe kann nicht erst nach Abbruch der cfDNA-Analyse abgenommen werden, da die Messung der Serummarker nur in der 12.-14.SSW validiert ist und der gesamte cfDNA-Analyseprozess bei zunächst erfolgloser primärer Auswertung bis

zu 4 Wochen in Anspruch nehmen kann. Die Probe wird nach Abschluss der Untersuchung verworfen, es sei denn die Patientin willigt der Archivierung im Rahmen der Biobank des Gesamtklinikums ein.

Sollte das Risiko über 1:100 liegen gilt die Schwangerschaft als „screen-positiv“. Nach Ende der Schwangerschaft oder nach Karyotypisierung mittels invasiver Diagnostik erfolgt die Klassifizierung als Falsch-Positiver Fall bei unauffälligem Karyotyp (primärer Endpunkt) und Richtig-Positiver Fall bei Trisomie 21.

Begleitet werden soll die Studie mit einer Abfrage der Zufriedenheit und dem Wissen über den Screening-Test. Dieser Befragung dient der Überprüfung der Zufriedenheit mit der Studienteilnahme und soll den Studienverantwortlichen helfen auszuschließen, dass mit der Studienteilnahme zusätzlichen Ängste bei den Probandinnen verbunden sind. Die Befragungen sind vor der Randomisierung, nach Abschluss des Screening-Tests und nach Geburt geplant. Hierzu wird vor Randomisierung, vier Wochen nach Abschluss des Screening-Tests und nach Geburt anhand eines Fragebogens die Zufriedenheit und das Wissen über den Screening-Test abgefragt. Dazu wird die Patientin vier Wochen nach Abschluss des Screening-Tests und nach Geburt telefonisch oder wenn die Patientin in der Frauenklinik stationär behandelt wird, persönlich kontaktiert. Die Patientin kann die Befragungen ablehnen und trotzdem in der Studie verbleiben. Die Fragebögen sind im Anhang dieses Protokolls zu finden.

### 6.3 Einschlusskriterien

- Wunsch der Patientin nach einer [Risikobeurteilung einer Trisomie 21m-ETS](#)
- Schwangerschaft in der 12. – 14. SSW
- Sonographisch kein Anhalt für eine fetale Fehlbildung
- $NT < 3,5\text{mm}$
- Unterschriebene Einwilligungserklärung

### 6.4 Ausschlusskriterien

- Fehlendes Einverständnis zur Studienteilnahme
- Sonographischer V.a. fetale Fehlbildung
- $NT \geq 3,5\text{mm}$

## 7 Power-Kalkulation

Erwartet wird in Studien-Arm 1 und 2 jeweils eine Falsch-Positivrate von 1,5% und 0,13%. Das Signifikanzniveau soll bei  $p=0,05$  liegen und die Power bei 0,8.

Daher ergibt sich, dass in beiden Studienarmen  $n=674$  Patientinnen untersucht werden müssen.

Unter Berücksichtigung eines geringen Anteils an Patientinnen, bei denen das Outcome der Schwangerschaft nicht erhoben werden kann, sollen in jedem Studienarm  $n=700$  Patientinnen untersucht werden.

In Studienarm 1 werden daher  $n=10,5$ , d.h. 11 Patientinnen mit einem falsch-positivem Ergebnis erwartet. In Studienarm 2 werden  $n=0,91$ , d.h. 1 Patient mit einem falsch-positivem Ergebnis erwartet.

## 8 Umgang mit Daten

### 8.1 Datendokumentation

Die Dokumentation der im Rahmen der Behandlung erhobenen Daten erfolgt in der in der Pränataldiagnostik etablierten klinischen Datenbank Viewpoint (GE Healthcare). Dies sind im Einzelnen:

- Allgemeine Angaben der Patientin:  
Name, Vorname, Adresse, Geburtsdatum, Frauenarzt, Versicherungsstatus
- Medizinische Anamnese:  
Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme, Allergien, Operationen
- Gynäkologisch-geburtshilfliche Anamnese:  
Anzahl vorausgehender Schwangerschaften und Outcome
- Angaben zur laufenden Schwangerschaft:  
Assistierte Reproduktion?  
Bisheriger Schwangerschaftsverlauf  
Erster Tag der letzten Periodenblutung
- Sonographisch erhobene Daten:  
Plazentasitz und Morphologie  
Scheitel-Steiß-Länge  
Biparietaler Durchmesser  
Abdomen-Umfang  
Femurlänge  
Nackentransparenzdicke  
Herzfrequenz  
Nasenbein  
Trikuspidalklappenfluss  
Ductus venosus – Fluss  
Beurteilung der fetalen Sonoanatomie  
Durchblutung der Aa. uterinae
- Biophysikalisch erhobene Daten:  
Mittlerer arterieller Blutdruck (Jeweils 2 Messungen an beiden Armen)
- Labor-Analysen:  
PAPP-A und beta-hCG durch das Labor Prof. Enders und Partner, Stuttgart  
cfDNA-Analyse durch die Firma Cenata, Tübingen
- Outcome der Schwangerschaft:  
Geburtsdatum, Schwangerschaftswoche, Gewicht, Geburtsmodus, APGAR, pH,  
Komplikationen während der weiteren Schwangerschaft und der Geburt, Fehlbildungen und  
Ergebnis der U1/U2-Untersuchung

### 8.2 Datenschutz

Die Daten werden nach Abschluss der Studie mithilfe des Viewpoint-Programmes abgefragt. Die Ausgabe erfolgt als Microsoft Excel Datei. Diese Abfrage erfolgt ausschließlich durch die Prüferärzte. Für die weitere Auswertung werden die Daten dann pseudonymisiert. Die Rückverfolgbarkeit (Zuordnen der Datensätze) ist ausschließlich den Prüferärzten anhand einer separaten und verschlüsselten Excel-Datei möglich. Die im Rahmen dieser Studie ausgelesenen Daten werden ausschließlich zum Zwecke der beschriebenen wissenschaftlichen Fragestellungen in Excel-Tabellen

aufbereitet und ausgewertet und nicht an Dritte weitergegeben. Es wird dafür Sorge getragen, dass nur an der Studie beteiligte Personen Zugang zu den Daten und Unterlagen erhalten und die ärztliche Schweigepflicht durch die Pseudonymisierung gewahrt bleibt.

### **8.3 Datenarchivierung**

Alle Daten werden in der Viewpoint-Datenbank erfasst, welche in der klinischen Routine Anwendung findet. Außer dem Vermerk, dass es sich um eine Studienpatientin handelt, ändert sich die Daten- bzw. Informationsmanagement nicht. In dieser Datenbank werden auch die Ergebnisse der weiteren Ultraschall-Untersuchungen gespeichert. Die Datenbank kann nur in der Frauenklinik geöffnet werden und beinhaltet Informationen, die für das Management der Schwangerschaft von Relevanz ist. Da die für die Studie benötigten Daten klinische Daten sind, die im Rahmen der Behandlung dokumentiert werden, gelten die Datenschutzbestimmungen des Universitätsklinikums. Hier ist eine Langzeitarchivierung über 30 Jahre im digitalen Archiv des Universitätsklinikums (D3-Archiv) vorgesehen. Nach 30 Jahren werden die Daten vernichtet. Alle für die wissenschaftliche Untersuchung ausgelesenen Daten über die Probandinnen werden verschlossen aufbewahrt und spätestens 10 Jahre nach Abschluss der Studie vernichtet. Sollte eine Probandin ihre Teilnahme an der Studie zurückziehen, werden ihre Datensätze aus den Excel-Tabellen sofort entfernt. Die klinischen Daten verbleiben bis zum Ende der Archivierungspflicht in der klinischen Datenbank ViewPoint.

## 9 Abbruchkriterien

Probandinnen werden nur dann in diese Untersuchung eingeschlossen, wenn sie ihr informiertes Einverständnis schriftlich erklären. Die Studie wird für die einzelne Probandin abgebrochen, sobald sie Ihr Einverständnis mündlich oder schriftlich zurückziehen sollte (Freiwilligkeit der Studienteilnahme). Da es sich um eine reine Observationsstudie handelt, sind keine Abbruchkriterien für die gesamte Studie festgelegt.

## 10 Ethische Belange

Die Durchführung der Studie geschieht in Übereinstimmung mit der letzten Revision der Deklaration von Helsinki (2000, Edinburgh, Schottland) und den aktuellen Empfehlungen der Guten Klinischen Praxis (Guideline for GCP, ICH 1996, last revision 2002).

Studienprotokoll, Fragebogen mit Patienteninformation und Einwilligungserklärung werden der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Begutachtung vorgelegt.

Die verantwortlichen Prüfarzte werden die Ethik-Kommission über Protokolländerungen und den Abschluss der Studie informieren. Vor der Aufnahme in die Studie wird jeder Patient über das Wesen, die Ziele, erwartete Vor- und Nachteile durch die Studienteilnahme informiert.

Jede Patientin erklärt ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie durch Unterschrift. Den Probandinnen wird dabei ausreichend Zeit und Gelegenheit gegeben, um über ihre Teilnahme zu entscheiden und offene Fragen zu klären. Die Probandinnen werden ferner über ihr Recht, die Teilnahme an der Studie abzulehnen, bzw. sie zu jedem Zeitpunkt abzubrechen, informiert ohne dass ihnen hierdurch Nachteile während der klinischen Behandlung entstehen.

Das kombinierte ETS bestehend aus dem mütterlichen Alter, der fetalen NT, PAPP-A und freiem beta-hCG (Studien-Arm 1) entspricht der bisher an der Universitäts-Frauenklinik angebotenen Untersuchung. Die Untersuchung entsprechend des Studien-Arms 2 wird ebenfalls in der dargelegten Form an der Universitäts-Frauenklinik angeboten. Beide Untersuchungen sind klinisch etabliert und durch zahlreiche Voruntersuchungen validiert. Die Bestimmungen des GenDG und SchwangerenkonfliktG werden in beiden Studien-Armen berücksichtigt. Auch die Vorgaben der Fetal Medicine Foundation zur Berechnung der Aneuploidie-Risiken werden berücksichtigt.

Wie bisher üblich wird bei fetalen Fehlbildungen oder einer erhöhten NT  $\geq 3,5$ mm eine Abklärung mittels invasiver Diagnostik (Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie) empfohlen. Diese Patientinnen werden nicht für die Studie rekrutiert.

Sollte sich bei der Risikoberechnung ein Trisomie 21-Risiko  $\geq 1:100$  ergeben, gilt die Patientin als screen-positiv, so dass eine invasive Abklärung empfohlen wird. Dies ist aber für die Studie nicht zwingend erforderlich. Der Karyotyp zur Einordnung eines Falsch- oder Richtig-Positiven Ergebnisses erfolgt entweder nachgeburtlich oder nach der invasiven Diagnostik.

Sollte die Patientin mit dem berechneten Risiko nicht zufrieden sein, kann sie jederzeit ein zusätzliche Screening- oder Abklärungsmaßnahme wählen. Auch dies entspricht dem bisherigen klinischen Management. In diesen Fällen können die Daten der Patientin auch weiterhin für die Studie verwendet werden, da die Risikoberechnung entsprechend des Studien-Arms weiterhin erfolgen kann. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die Patientin eine cfDNA-Analyse wünscht aber in den Studien-Arm 1 (PAPP-A und beta-hCG) randomisiert wurde. In diesem Fall müsste sie aber die Kosten der cfDNA-Analyse selbst tragen. Eine invasive Diagnostik ist wie bisher auch jederzeit üblich, die Kosten werden von der Krankenkasse übernommen.

Vor jeder invasiven Diagnostik ist eine eingehende Aufklärung im Sinne des GenDG und SchwangerenkonfliktG notwendig. Diese beinhaltet die Aufklärung über das Fehlgeburtsrisiko der Amniozentese und der Chorionzottenbiopsie in Höhe von 0,1 und 0,2%. Durch die Studie wird eine Reduktion der invasiven Diagnostik erwarten (Falsch-Positivrate in Studien-Arm 1 1,0% und in Studien-Arm 2 0,12%).

Die Patientin kann die Teilnahme an der Studie (Screening-Test und Fragebögen) jederzeit widerrufen. Hierdurch entstehen ihr keine Nachteile. Ihre Daten werden dann nicht in die Auswertung übernommen.

## 11 Kosten für die Patientin und Sponsoring der Studie

Durch die Studie entstehen der Patientin keine Kosten. ~~Wie bisher auch, wird die Ultraschall-Untersuchung und Die Messung der Serummarker PAPP-A und beta-hCG vor der Randomisierung als IGGEL-Leistung für €150 angeboten werden von der Universitäts-Frauenklinik getragen.~~ Die Kosten für die cfDNA-Analyse (€400 pro Analyse) werden vom Sponsor der Studie (Firma Cenata, Tübingen) übernommen. Zusätzliche Sponsoren sind nicht geplant.

Es handelt sich um eine IIT-Studie nach § 15 der Berufsordnung für Ärzte.

## 12 Literatur

1. Kagan KO, Etchegaray A, Zhou Y, Wright D, Nicolaides KH: Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009 Jul;34:14–18.
2. Kagan KO, Wright D, Baker A, Sahota D, Nicolaides KH: 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* 2008;31:618–624.
3. Kagan KO, Hoopmann M, Abele H, Wallwiener D: Future developments in obstetrics. *Gynäkologe* 2012 Aug 16;45:684–689.
4. Nicolaides KH: A model for a new pyramid of prenatal care based on the 11 to 13 weeks' assessment. *Prenat Diagn* 2011 Jan 5;31:3–6.
5. Grati FR, Barlocco A, Grimi B, Milani S, Frascoli G, Di Meco AM, et al.: Chromosome abnormalities investigated by non-invasive prenatal testing account for approximately 50% of fetal unbalances associated with relevant clinical phenotypes. *Am J Med Genet* 2010 Jun;152A:1434–1442.
6. Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG: Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol* 1987 May;94:387–402.
7. Snijders R, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH: 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* 1998 Aug;352:343–346.
8. Kagan KO, Wright D, Valencia C, Maiz N, Nicolaides KH: Screening for trisomies 21, 18 and 13 by maternal age, fetal nuchal translucency, fetal heart rate, free -hCG and pregnancy-associated plasma protein-A. *Human Reproduction* 2008 Jun 20;23:1968–1975.
9. Kagan KO, Eiben B, Kozlowski P: Kombiniertes Ersttrimesterscreening und zellfreie fetale DNA - "Next Generation Screening". *Ultraschall Med* 2014 Jun;35:229–236.
10. Wright D, Syngelaki A, Bradbury I, Akolekar R, Nicolaides KH: First-trimester screening for trisomies 21, 18 and 13 by ultrasound and biochemical testing. *Fetal Diagn Ther* 2014;35:118–126.
11. Kagan K, Schmid M, Hoopmann M, Wagner P, Abele H: Screening Performance and Costs of Different Strategies in Prenatal Screening for Trisomy 21. *Geburtsh Frauenheilk* 2015 Apr 14;75:244–250.
12. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K: Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ* 1992 Apr 4;304:867–869.
13. Ekelund CK, Jørgensen FS, Petersen OB, Sundberg K, Tabor A, Danish Fetal Medicine Research Group: Impact of a new national screening policy for Down's syndrome in Denmark: population based cohort study. *BMJ* 2008;337:a2547–a2547.
14. Morgan S, Delbarre A, Ward P: Impact of introducing a national policy for prenatal Down syndrome screening on the diagnostic invasive procedure rate in England. *Ultrasound Obstet*

- Gynecol 2013 Apr 9;41:526–529.
15. Wright D, Kagan KO, Molina FS, Gazzoni A, Nicolaides KH: A mixture model of nuchal translucency thickness in screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31:376–383.
  16. Kagan KO, Wright D, Spencer K, Molina FS, Nicolaides KH: 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* 2008;31:493–502.
  17. Merz E, Thode C, Eiben B, Faber R, Hackelöer BJ, Huesgen G, et al.: Individualized correction for maternal weight in calculating the risk of chromosomal abnormalities with first-trimester screening data. *Ultraschall in Med* 2011 Feb;32:33–39.
  18. Kagan KO, Avgidou K, Molina FS, Gajewska K, Nicolaides KH: Relation between increased fetal nuchal translucency thickness and chromosomal defects. *Obstet Gynecol* 2006 Jan;107:6–10.
  19. Kagan K, Hoopmann M, Kozlowski P: Assessment of Foetal DNA in Maternal Blood – A Useful Tool in the Hands of Prenatal Specialists. *Geburtsh Frauenheilk* 2012 Dec 12;72:998–1003.
  20. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al.: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997 Aug 16;350:485–487.
  21. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, McBride C, et al.: Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 2012 Jan 6;32:3–9.
  22. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY, Rezende JC, Nicolaides KH: Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013 Jan;41:26–32.
  23. Salomon LJ, Alfirevic Z, Bilardo CM, Chalouhi GE, Ghi T, Kagan KO, et al.: ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013 Jan;41:102–113.
  24. Kagan KO, Staboulidou I, Syngelaki A, Cruz J, Nicolaides KH: The 11-13-week scan: diagnosis and outcome of holoprosencephaly, exomphalos and megacystis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010 Mar 24;36:10–14.
  25. Yazdi B, Abele H, Grischke E, Kagan K: Geburtshilfe. Schwangerenvorsorge im Umbau: Vom Kopf auf die Füße? *Geburtsh Frauenheilk* 2013 May 13;73:295–298.
  26. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH: Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 2015 Mar;45:249–266.