Maastricht University

Noninvasive prenatal screening and diagnosis

Citation for published version (APA):

Mersy, E. (2016). *Noninvasive prenatal screening and diagnosis: from bench to clinic*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. https://doi.org/10.26481/dis.20161207em

Document status and date:
Published: 01/01/2016

DOI:
10.26481/dis.20161207em

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

• A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
• The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
• The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the “Taverne” license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 25 Apr. 2024

Summary

Fetal cell-free DNA (cfDNA) is present in the blood circulation of pregnant women. Fetal cfDNA has increasingly been used in prenatal care, and in prenatal screening and diagnosis of genetic disorders. The analysis of fetal cfDNA in maternal plasma offers the possibility for a safe and highly reliable screening test for fetal aneuploidy. Furthermore, it provides a safe alternative to the invasive procedures for prenatal diagnosis of single-gene disorders. In this thesis, prenatal detection of genetic disorders through analysis of fetal cfDNA in maternal plasma was investigated, from bench to clinic. The aims of this thesis were to develop novel noninvasive prenatal diagnostic tests (**Part I**) and to investigate the responsible application of cfDNA-based testing in prenatal screening (**Part II**).

Chapter 1 defines the terms prenatal screening and diagnosis and provides a historical overview of the applications of cfDNA from its discovery until today. The aims of this thesis are presented with an outline of the two parts, subdivided in individual chapters.

Part I: Design of noninvasive prenatal diagnostic tests

Sex determination was one of the first clinical applications of fetal cfDNA testing and is routinely used in European countries. Delay of the test result or even failure of the test can occur, particularly when the presence of fetal cfDNA in the plasma sample cannot be proven. In **Chapter 2** the development is described of a novel fast single-tube noninvasive fetal sex determination assay, in which a gender-independent fetoplacental marker is incorporated in the test, requiring no extra time or expenses by the laboratory. The assay combines amplification of Y-linked amelogenin (*AMELY*) cfDNA with one-step reverse transcription PCR of trophoblast-derived cell-free RNA (cfRNA). In a proof-of-principle study, 75 blinded plasma samples from pregnant women were tested to find out whether the fetal sex could be determined and whether cfRNA was a reliable fetoplacental marker in this process. The fetal sex was correctly determined in all 75 pregnant women without failure or false results. It was concluded that amplification of trophoblast-derived cfRNA is a reliable marker for the confirmation of the presence of fetoplacentally derived nucleic acids in noninvasive fetal sex determination.

A current challenge is developing universal noninvasive prenatal diagnostic (NIPD) assays for the detection of single-gene disorders, and in particular disorders caused by nucleotide repeat expansions. In **Chapter 3** a novel assay is presented for NIPD of myotonic dystrophy type 1 (DM1) in the cfDNA. DM1 is a single-gene disorder, caused

by expansion of a CTG trinucleotide repeat in the dystrophia myotonica protein kinase gene (*DMPK*). Single molecule molecular inversion probes (smMIPs) containing common repeat flanking single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the targeted sequence were designed for targeted next-generation sequencing (NGS). We are the first to use smMIPs for haplotype-based NIPD. SmMIPs enable precise quantification of the variation in the cfDNA and are robust to relatively small amounts and poor quality of source DNA. As a proof of concept, the smMIP NIPD assay was applied to cfDNA isolated from the plasma of a woman carrying a fetus affected with DM1, as diagnosed by invasive prenatal testing. After sequencing the SNP markers from the pregnant woman, and from the father and a previous child (= reference) with DM1, informative SNPs for the mutated allele of the father and reference were selected. Subsequently, the cfDNA was sequenced to determine the fetal inheritance, calculated from the percentage of the informative SNPs in the cfDNA reads. In this study, it was demonstrated that the assay could detect the paternal mutated *DMPK* allele in the fetal cfDNA.

Part II: Noninvasive prenatal screening for fetal chromosome disorders

The search for a noninvasive prenatal test that could reliably detect fetal trisomies 13, 18 and 21 started very soon after the discovery of fetal cfDNA in maternal plasma. The use of NGS, allowing to identify the chromosomal origin of each sequenced cfDNA molecule, and to calculate the over- or underrepresentation of any chromosome in maternal plasma led to a practical screening test that could be used routinely. In 2011 the first diagnostic accuracy studies were published using NGS to detect fetal trisomies 13, 18 and 21 in maternal plasma. In **Chapter 4** an overview is provided of all studies evaluating the diagnostic accuracy of molecular techniques for noninvasive detection of trisomy 21 between 1997 and the beginning of 2012. The quality of the studies and the diagnostic parameters were evaluated using the QUADAS-2 tool. We noted that NGS-based detection of fetal trisomy 21 in the cfDNA exhibits a high sensitivity and specificity and an excellent negative predictive value. However, we also reported for the first time that the positive predictive value shows large variation between pregnant women, and can be as low as 50% in case of a low *a priori* probability for having a fetus with trisomy 21. Furthermore, we concluded that additional large prospective studies would allow more precise estimates about sensitivity, specificity and predictive values in high-risk and low-risk pregnancies. Finally, we predicted that noninvasive detection of trisomy 21 in the cfDNA was likely to be implemented as a replacement for the current serum screening test.

Immediately after publication of **Chapter 4**, the variable positive predictive value was also reported by others. Since a false positive result can lead to the abortion of a healthy fetus, independent validation by an invasive procedure followed by rapid aneuploidy detection or karyotyping is recommended by the International Society for Prenatal Diagnosis. In the chorionic villi or amniocytes, rapid aneuploidy detection, karyotyping or array can confirm the presence of an aneuploidy in the fetus. The term "noninvasive prenatal testing" (NIPT) was formulated, referring to cfDNA-based tests that are used as a screening test and require a confirmation by a follow-up test. In the years following our publication, large prospective studies have allowed more precise estimates about sensitivity, specificity and predictive values in high-risk and low-risk pregnancies. As we predicted, the goal since 2011 has been to replace current screening tests, such as the first trimester combined test (FCT), with NIPT, or to offer NIPT as a second tier screening test. A rapid global use of NIPT for fetal aneuploidy was seen, mostly offered in a commercial setting. Since 2013, some NIPT assays can detect submicroscopic chromosomal abnormalities and sex chromosome imbalances. Clinically significant microdeletion and microduplication syndromes can now be detected, such as DiGeorge syndrome (22q11.2 deletion). The sex chromosome disorders that can be detected include monosomy X and sex chromosome trisomies (47,XXX; 47,XXY and 47,XYY).

Nowadays, several countries are working on the implementation of NIPT in their prenatal trisomy screening program. In **Chapter 5** different hypothetical NIPT implementation strategies are compared for such a national screening program. For this, a quantitative analysis was conducted. Decision trees were created to illustrate all plausible implementation strategies in a theoretical cohort of 100 000 pregnant women. This resulted in five screening programs: classical screening by the FCT, pre-selection of high-risk women prior to NIPT by the FCT, NIPT as the first screening test at 10 weeks and at 13 weeks, and the simultaneous conductance of NIPT and the FCT. Our results suggested that the most favorable screening program may be a program in which NIPT is offered to all women at 13 weeks of gestation as the first screening test (13-week NIPT). The conclusions of **Chapter 5**, drawn for the implementation of trisomy 21 screening, are also applicable for broad NIPT assays targeting trisomies 13 and 18, and submicroscopic chromosome aberrations and fetal sex chromosome disorders.

In some countries, NIPT for sex chromosome disorders is not available yet. Furthermore, critics may argue that NIPT for sex chromosome aneuploidy is beyond

the scope of a worthwhile prenatal screening test, given that these abnormalities often result in a very mild phenotype. In **Chapter 6**, we assess pregnant women's opinions about NIPT for sex chromosome trisomies (SCTs) within the broader context of the expansion of disorders included in the NIPT panel. Individual semi-structured interviews were conducted with eight pregnant women that only have access to NIPT in case of an increased risk for trisomy 13, 18 or 21 after the FCT or on the basis of their personal history, through a national public health setting. Before the start of the interview, information was provided about SCTs and the possibilities and limitations of NIPT for SCTs. After ascertaining that the information about SCTs and NIPT for SCTs was clear for the participants, their ideas regarding NIPT for SCTs and the expansion of the spectrum of detectable disorders by NIPT were explored. The interviewees expressed a variety of opinions concerning NIPT for SCTs. Four of them agreed with adding SCTs to the NIPT panel. The overall opinion of these women was that they wanted to choose for themselves which disorders in the NIPT panel they wished to screen for, and which conditions they wanted to confirm by invasive testing.

In **Chapter 7** the results of the individual studies are put into perspective. The results of **Part I** are discussed along the following themes: 1) improving noninvasive fetal sex determination, 2) noninvasive evaluation of cell-free RNA levels in maternal plasma, 3) development and implementation of NIPD of single-gene disorders. The results of **Part II** are discussed in these topics: 1) NIPT of trisomies 13, 18 and 21 from 2011 until now, 2) broadening the scope of noninvasive prenatal screening, 3) false positive and false negative NIPT results, and 4) autonomous reproductive choice. It is concluded that the investigation of responsible application of cfDNA-based testing in prenatal screening is at least as important as the exploration of what can be detected in the cfDNA. Parallel with technical innovations, further empirical research is required, in particular with regard to the organization and implementation of NIPT and NIPD in the different national health systems, the preferences of pregnant couples, and the optimal path to informed decision making.

Samenvatting

In het bloed van zwangere vrouwen is celvrij DNA aanwezig dat afkomstig is van de foetus. De analyse van foetaal celvrij DNA wordt in toenemende mate gebruikt voor prenatale screening en diagnostiek van genetische aandoeningen. Het analyseren van foetaal celvrij DNA in een maternaal plasmamonster biedt de mogelijkheid voor een betrouwbare foetale aneuploïdie screeningstest. Bovendien is het een veilig alternatief zonder risico voor de foetus voor invasieve procedures (vlokkentest en vruchtwaterpunctie) bij prenatale diagnostiek van monogene aandoeningen. Wij bestudeerden de prenatale detectie van genetische aandoeningen via het analyseren van foetaal celvrij DNA in het maternaal plasma, van het laboratorium tot in de klinische praktijk. De doelstellingen van deze thesis waren het ontwikkelen van nieuwe niet-invasieve prenatale diagnostische testen (**Deel I**) en het bestuderen van de verantwoorde toepassing van de analyse van celvrij foetaal DNA voor prenatale screening (**Deel II**).

In **Hoofdstuk 1** worden de termen prenatale screening en diagnostiek uitgelegd en wordt een historisch overzicht gegeven van de toepassingen van de analyse van foetaal celvrij DNA, sinds de ontdekking ervan tot op heden. De doelstellingen van deze thesis worden beschreven, met een overzicht van de twee delen en de individuele hoofdstukken.

Deel I: De ontwikkeling van niet-invasieve prenatale diagnostische testen

Foetale geslachtsbepaling was één van de eerste klinische toepassingen van de analyse van foetaal celvrij DNA. Het wordt routinematig uitgevoerd in Europese landen als er kans is op een geslachtsgebonden aandoening of als er een ambigue genitaal wordt gezien tijdens prenatale echografie. Wanneer de aanwezigheid van foetaal celvrij DNA in het plasmamonster niet bewezen kan worden, kunnen de testresultaten van de reguliere test niet of vertraagd afgegeven worden. In **Hoofdstuk 2** wordt de ontwikkeling van een nieuwe niet-invasieve test voor foetale geslachtsbepaling, volledig uitgevoerd in één pipetteerbuisje, beschreven. Een geslachtsonafhankelijke foetoplacentaire marker is ingebouwd in de test, wat geen extra tijd of uitgaven van het laboratorium vraagt om de aanwezigheid van foetoplacentaire nucleïnezuren aan te tonen in het maternaal plasma. Onze nieuwe test combineert amplificatie van celvrij DNA van het gen *AMELY*, afkomstig van het Y-chromosoom, met *one-step reverse transcription* PCR van celvrij RNA, afkomstig van de trofoblast van de placenta. In een *proof of principle* studie werden 75 plasmamonsters van zwangere vrouwen getest om te onderzoeken of het geslacht juist bepaald kon worden, en of het celvrij RNA een

betrouwbare marker was voor de aanwezigheid van foetaal materiaal tijdens dit proces. Het foetaal geslacht werd correct bepaald bij alle 75 zwangere vrouwen zonder testfalen. De conclusie was dat amplificatie van celvrij RNA, afkomstig van de trofoblast van de placenta, een betrouwbare marker was voor het bevestigen van de aanwezigheid van foetoplacentaire nucleïnezuren tijdens niet-invasieve foetale geslachtsbepaling.

Een uitdaging in de huidige tijd is het ontwikkelen van universele niet-invasieve prenatale diagnostische (NIPD) testen voor de detectie van monogene aandoeningen, en in het bijzonder aandoeningen veroorzaakt door een nucleotide repeat expansie. In **Hoofdstuk 3** wordt een nieuwe test besproken voor NIPD van myotone dystrofie type 1 (DM1). DM1 is een monogene aandoening die veroorzaakt wordt door een expansie van een CTG trinucleotide repeat in het *dystrophia myotonica protein kinase* gen (*DMPK*). Er werden *single molecule molecular inversion probes (*smMIPs) ontworpen met een frequente repeat flankerende single nucleotide polymorfisme (SNP) in hun doelsequentie. Hiermee konden we NIPD uitvoeren middels op next-generation sequencing (NGS) gebaseerde haplotypering. We zijn de eerste onderzoeksgroep die smMIPs gebruiken voor NIPD. SmMIPs laten precieze kwantificatie van een variant in het celvrij DNA toe, en zijn robuust, ook voor relatief kleine hoeveelheden en slechte kwaliteit van het DNA. Als *proof of concept* werd de smMIPs NIPD test toegepast op cfDNA dat geïsoleerd werd uit het plasma van een vrouw die zwanger was van een foetus met DM1. Na het sequencen van de SNP markers van de zwangere vrouw, en van de vader en een eerder kind (= index patiënt) met DM1, werden informatieve SNPs voor het gemuteerde allel van de vader en de index geselecteerd. Vervolgens werd het cfDNA gesequencet voor het bepalen van de foetale overerving, wat berekend wordt uit de percentages van de informatieve SNPs in de cfDNA reads. In deze studie werd aangetoond dat de smMIPs NIPD test de paternaal overgeërfde DMPK mutatie kon aantonen in het moederlijk bloedplasma.

Deel II: Niet-invasieve prenatale screening voor foetale chromosoom aandoeningen

De zoektocht naar een niet-invasieve prenatale test die betrouwbaar de foetale trisomieën 13, 18 en 21 kan detecteren, werd snel na het ontdekken van celvrij DNA gestart. NGS laat het toe om de chromosomale origine van elke gesequencete DNA molecule te identificeren, en zo een teveel of te weinig van elk chromosoom in het maternale plasma te bepalen. In 2011 werden de eerste diagnostische studies gepubliceerd waarin NGS werd gebruikt voor de detectie van de foetale trisomieën 13, 18 en 21 in het maternale plasma. In **Hoofdstuk 4** wordt een overzicht gegeven van alle van 1997 tot 2012 gepubliceerde studies die de diagnostische waarde van een moleculaire techniek voor de niet-invasieve detectie van trisomie 21 evalueerden. De kwaliteit en de diagnostische parameters van de studies werden beoordeeld, via de QUADAS-2 beoordeling. We vonden dat de detectie van foetale trisomie 21 in het celvrij DNA op basis van NGS zowel een hoge sensitiviteit als een hoge specificiteit, en een uitstekende negatieve voorspellende waarde had. We rapporteerden echter ook voor het eerst dat de positieve voorspellende waarde veel variatie tussen zwangere vrouwen vertoonde, en dat deze zelfs kleiner dan 50% kan zijn bij een laag *a priori* risico op een foetus met trisomie 21. We concludeerden dat grotere prospectieve studies nodig waren om meer precieze inschattingen te maken van de sensitiviteit, specificiteit, en voorspellende waardes in hoog-risico en laag-risico zwangerschappen. Ten slotte voorspelden we dat niet-invasieve detectie van trisomie 21 in het celvrij DNA waarschijnlijk geïmplementeerd zou worden als vervanging voor de huidige serum screening test.

Onmiddellijk na het publiceren van het artikel uit **Hoofdstuk 4**, werd de variabele positief voorspellende waarde van niet-invasieve detectie van trisomie 21 ook gerapporteerd door anderen. Aangezien een vals positief resultaat kan leiden tot het aborteren van een gezonde foetus, is een onafhankelijke validatie nodig in foetaal materiaal, verkregen via een invasieve procedure. In de vlokken of het vruchtwater kan snelle aneuploïdie detectie, karyotypering, of array diagnostiek aantonen of er werkelijk sprake is van een aneuploïdie. Dit advies is vastgelegd in een richtlijn van de International Society for Prenatal Diagnosis. De term “niet-invasief prenataal testen” (NIPT) werd vervolgens gepreciseerd, verwijzend naar testen op basis van celvrij DNA die gebruikt worden als screeningstest en een bevestiging met een follow-up test vragen. Het is sinds 2011 de bedoeling om de huidige screeningstesten, zoals de eerste trimester combinatie test (CT) te vervangen door NIPT, of om NIPT aan te bieden als

tweede screeningstest bij een verhoogd risico na de CT. Sinds 2013 kunnen sommige NIPT assays ook submicroscopische chromosomale afwijkingen en numerieke geslachtschromosoomafwijkingen detecteren. Klinisch significante microdeletie- en microduplicatiesyndromen kunnen nu getest worden, zoals DiGeorge syndroom (22q11.2 deletie). Tot de numerieke geslachtschromosoomafwijkingen die kunnen gevonden behoren monosomie X en de trisomieën van de geslachtschromosoom (47,XXX;47,XXY;47,XYY).

Op dit moment werken verschillende landen aan de implementatie van NIPT in hun prenataal trisomie screeningsprogramma. In **Hoofdstuk 5** worden verschillende hypothetische NIPT implementatie-strategieën voor een nationaal screeningsprogramma vergeleken. Hiervoor werd een kwantitatieve analyse uitgevoerd. Er werden beslisbomen ontworpen om mogelijke implementatie-strategieën te illustreren in een theoretisch cohort van 100 000 zwangere vrouwen. Dit resulteerde in vijf hypothetische screeningsprogramma's: klassieke screening met behulp van de CT, selectie van hoog-risico vrouwen vóór NIPT met behulp van de CT, NIPT als de eerste screeningstest tijdens de 10e zwangerschapsweek of tijdens de 13e zwangerschapsweek, en het simultaan uitvoeren van NIPT en CT. Onze resultaten tonen aan dat het meest gunstige screeningsprogramma mogelijk een programma is waarin NIPT als eerste screeningstest wordt aangeboden aan alle vrouwen tijdens de 13e zwangerschapsweek. De conclusies van **Hoofdstuk 5**, die werden gebaseerd op screening voor trisomie 21, zijn ook van toepassing voor uitgebreidere NIPT voor bijvoorbeeld trisomie 13 en 18, submicroscopische chromosoomafwijkingen en numerieke geslachtschromosoomafwijkingen.

NIPT voor numerieke geslachtschromosoomafwijkingen is nog niet algemeen beschikbaar. Het is de vraag of NIPT voor geslachtschromosoomaneuploïdie binnen de reikwijdte van een prenatale screeningtest zou moeten vallen, aangezien de aandoeningen die het gevolg zijn van een aneuploïdie van de geslachtschromosomen vaak leiden tot een mild fenotype. In **Hoofdstuk 6** onderzoeken we de mening van zwangere vrouwen over NIPT voor geslachtschromosoomtrisomieën, binnen de bredere context van de uitbreiding van het aantal aandoeningen dat in het NIPT panel geïncludeerd kunnen worden. Er werden individuele semi-gestructureerde interviews gehouden met acht zwangere vrouwen die op dit moment enkel toegang tot NIPT hebben bij een verhoogd risico op trisomie 13, 18 of 21, na de CT of op basis van hun voorgeschiedenis. Vóór aanvang van de interviews werd informatie gegeven over geslachtschromosoomtrisomieën en de mogelijkheden en beperkingen van NIPT voor

deze aandoeningen. Nadat werd vastgesteld dat deze informatie duidelijk was voor de deelnemers, werden hun ideeën over NIPT voor deze aandoeningen en de uitbreiding van het spectrum van detecteerbare aandoeningen via NIPT geëxploreerd. De geïnterviewden hadden diverse meningen over NIPT voor geslachtschromosoomtrisomieën. Vier van hen vonden het toevoegen van geslachtschromosoomtrisomieën aan het NIPT panel een goed idee. De algemene opinie van deze vrouwen was dat zij zelf wilden kiezen voor welke aandoeningen in het NIPT panel zij wensten te laten screenen, en welke aandoeningen zij wilden laten bevestigen met een invasieve test.

In **Hoofdstuk 7** worden de resultaten van de beschreven studies in perspectief geplaatst. De resultaten van **Deel I** worden bediscussieerd in de volgende thema's: 1) verbetering van niet-invasieve foetale geslachtsbepaling, 2) niet-invasieve analyse van celvrij RNA in maternaal plasma, 3) ontwikkeling en implementatie van NIPD van monogene aandoeningen. De resultaten van **Deel II** worden besproken in de volgende onderwerpen: 1) NIPT van trisomie 13, 18 en 21 vanaf 2011 tot nu, 2) het uitbreiden van de reikwijdte van niet-invasief prenataal screenen, 3) vals positieve en vals negatieve NIPT resultaten, en 4) autonome reproductieve keuze. We concluderen dat naast het ontwikkelen van nieuwe niet-invasieve prenatale diagnostische testen, het eveneens belangrijk is om het proces van verantwoorde prenatale screening met behulp van celvrij foetaal DNA te bestuderen. Parallel aan de technische innovaties, is er verder onderzoek noodzakelijk, in het bijzonder naar de organisatie en implementatie van NIPT en NIPD in verschillende nationale gezondheidszorgsystemen, de voorkeuren van zwangere koppels, en de optimale weg tot het maken van geïnformeerde keuzes.