



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
«ΒΑΣΙΚΩΝ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (ΒΒΕ)»  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ**  
**ΕΜΒΡΥΙΚΟΥ DNA ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΥ**  
**ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ.**

**Δρ. ΠΡΟΔΡΟΜΟΣ Η. ΣΑΚΑΛΟΓΛΟΥ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ – ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ**

Επιβλέπουσα: Μαρίκα Σύρρου, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
«ΒΑΣΙΚΩΝ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (ΒΒΕ)»  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ**  
**ΕΜΒΡΥΙΚΟΥ DNA ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΥ**  
**ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ.**

**Δρ. ΠΡΟΔΡΟΜΟΣ Η. ΣΑΚΑΛΟΓΛΟΥ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ – ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ**

Επιβλέπουσα: Μαρίκα Σύρρου, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

**ΠΡΟΔΡΟΜΟΣ Η. ΣΑΚΑΛΟΓΛΟΥ**

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης**

**«Γενωμική ανάλυση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο πλαίσιο μη επεμβατικού  
προγεννητικού ελέγχου.»**

**Ημερομηνία παρουσίασης: 18/12/2020**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μαρίκα Σύρρου, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής**

**Εξεταστική Επιτροπή**

**Βεζυράκη Πατρώνα, Καθηγήτρια Φυσιολογίας**

**Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής**

**Σύρρου Μαρίκα, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής**

## Πρόλογος

Ο προγεννητικός έλεγχος αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της καθημερινής μαιευτικής πράξης και προσφέρεται σε τακτά χρονικά διαστήματα καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ώστε να διασφαλιστεί η υγεία του εμβρύου και της μητέρας. Για την πραγματοποίησή του απαιτείται η ανάλυση εμβρυϊκού γενετικού υλικού που λαμβάνεται με επεμβατικές μεθόδους όπως η αμνιοπαρακέντηση και η βιοψία τροφοβλάστης και εφαρμόζεται για τη διάγνωση ανευπλοειδίας του εμβρύου. Οι τεχνικές όμως αυτές έχουν μικρό αλλά υπαρκτό κίνδυνο αποβολής (~1%). Για το λόγο υπήρχε μεγάλο ενδιαφέρον η ανακάλυψη μη επεμβατικών τρόπων λήψης εμβρυϊκού γενετικού υλικού έτσι ώστε η προγεννητική διάγνωση να μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις εγκύους, ανεξαρτήτως ηλικίας ή αντικειμενικού κινδύνου να αποκτήσουν παιδί με κάποιο γενετικό νόσημα. Η ανακάλυψη ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA) στην κυκλοφορία της μητέρας, επέτρεψε την ανάπτυξη μη επεμβατικών προγεννητικών ελέγχων (Non Invasive Prenatal Testing, NIPT) και σήμερα η ανάπτυξη μεθόδων και τεχνολογιών για τη βέλτιστη αξιοποίηση και ενίσχυση του cffDNA, αποτελεί το βασικό τομέα έρευνας.

# Περιεχόμενα

Προγεννητικός Έλεγχος .....	11
Ορισμοί.....	11
Προγεννητικός έλεγχος για ανευπλοειδίες .....	12
<b>Ιστορική αναδρομή και τρέχουσες πρακτικές προγεννητικού ελέγχου για ανευπλοειδίες στο έμβρυο.....</b>	<b>12</b>
<b>Ανάπτυξη των υπερηχογραφικών δεικτών .....</b>	<b>19</b>
<b>Ανάπτυξη των βιοδεικτών στον ορό/πλάσμα και στα ούρα.....</b>	<b>22</b>
<b>Επεμβατικές Τεχνικές Προγεννητικού Ελέγχου .....</b>	<b>25</b>
<b>Μη Επεμβατική Προγεννητική Διάγνωση (NIPD).....</b>	<b>26</b>
<b>Κυκλοφορούντα εμβρυϊκά κυττάρα στο περιφερικό αίμα της εγκύου .....</b>	<b>26</b>
<b>Ελεύθερο εμβρυϊκό εξωκυτταρικό DNA στο περιφερικό αίμα της εγκύου (cffDNA) .</b>	<b>27</b>
<b>Η δυσκολία στη γενετική διάγνωση των μονογονιδιακών νοσημάτων και η εργαστηριακή προσέγγιση.....</b>	<b>29</b>
<b>Αρχική στρατηγική στην NIPD .....</b>	<b>29</b>
<b>A. Στόχευση σε έναν γενετικό τόπο.....</b>	<b>29</b>
<b>B. Αξιοποίηση πληροφοριακών πατρικών νουκλεοτιδικών παραλλαγών σε γενετική σύνδεση με το υπεύθυνο γονίδιο για άμεση και έμμεση διάγνωση του εμβρυϊκού γονοτύπου πατρικής προέλευσης .....</b>	<b>31</b>
<b>Η σύγχρονη προσέγγιση στην NIPD .....</b>	<b>33</b>
<b>Μεθοδολογίες Γενετικής Διάγνωσης στην NIPD- Παραδείγματα εφαρμογών.....</b>	<b>34</b>
<b>Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, RT-PCR) .....</b>	<b>34</b>
<b>Πολλαπλή φθορίζουσα PCR (Multiplex fluorescent PCR) .....</b>	<b>37</b>
<b>PCR σε συνδυασμό με πυροφωσφορόλυση (Pyrophosphorolysis-Activated Polymerization) .....</b>	<b>39</b>
<b>Αλληλοειδική επέκταση κατά μια βάση ολιγονουκλεοτιδίου εκκινητή και ταυτοποίηση των προϊόντων πολυμερισμού .....</b>	<b>40</b>
<b>Ψηφιακή PCR (digitalPCR, dPCR).....</b>	<b>42</b>
<b>Μαζική Παράλληλη Αλληλούχιση με τεχνολογία αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS) .....</b>	<b>46</b>
<b>Roche 454 FLX .....</b>	<b>48</b>
<b>Illumina Genome Analyzer (GA)/Solexa .....</b>	<b>52</b>
<b>ABI SOLiD .....</b>	<b>57</b>

PGM /Ion Torrent .....	61
<b>Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα του εμβρυικού κλάσματος.....</b>	<b>63</b>
Εμβρυϊκό κλάσμα (FF).....	63
Ηλικία κύησης.....	63
Εμβρυϊκή ανευπλοειδία.....	64
Μητρικό βάρος.....	65
Μέγεθος του πλακούντα.....	66
Αριθμός εμβρύων.....	67
<b>Η σημασία της NIPD και η κλινική της αξιολόγηση .....</b>	<b>69</b>
<b>Συμπεράσματα .....</b>	<b>72</b>
<b>Συζήτηση.....</b>	<b>73</b>
<b>Περίληψη.....</b>	<b>74</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>76</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>77</b>



## Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1. Υπέρηχος αυχενικής διαφάνειας.....	14
Εικόνα 2. Εκτίμηση του κινδύνου απόκτησης εμβρύου με Σύνδρομο Down σε συνάρτηση με την ηλικία της μητέρας. Το ποσοστό κινδύνου αυξάνεται σταδιακά περίπου μέχρι την ηλικία των 34 χρόνων και στη συνέχεια σημειώνεται εκθετική αύξηση, με τις γυναίκες κοντά στα 50 να έχουν ρίσκο >3%. (Morris, Mutton and Alberman, 2002).....	16
Εικόνα 3. Απεικόνιση των σημαντικότερων χρονικών σημείων στην εξέλιξη του προγεννητικού ελέγχου για το σύνδρομο Down (Sillence et al., 2013).....	17
Εικόνα 4. Η επίπτωση των υπερηχογραφικών χαρακτηριστικών στα έμβρυα με ευπλοειδία (μαύρο), T21 (μπλε), T18 (πράσινο) και T13 (πορτοκαλί) (Nicolaidis, 2011). (CRL; crown-rump length).....	21
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της αξιοποίησης αλληλουχιών του γονιδίου RASSF1A στην NIPD. ....	31
Εικόνα 6. Οι πληροφοριακές πατρικές νουκλεοτιδικές παραλλαγές είναι αυτές που διαφοροποιούνται από αυτές της εγκύου και υποδεικνύονται από τους κύκλους. Οι αλλαγές στον λευκό κύκλο είναι ενδεικτικές για το φυσιολογικό πατρικό αλληλόμορφο ενώ στον κόκκινο για το παθολογικό. ....	32
Εικόνα 7. Τρόπος διαχείρισης του αρνητικού εργαστηριακού αποτελέσματος για τον έλεγχο φύλου στην περίπτωση φυλοσύνδετου νοσήματος (Page-Christiaens GC et al., 2006). ....	36
Εικόνα 8. Τρόπος διαχείρισης του αρνητικού εργαστηριακού αποτελέσματος για τον έλεγχο γονιδίου RHD σε RhD αρνητική έγκυο (Chan KC et al., 2006). ....	37
Εικόνα 9. Η αρχή της πυροφωσφορόλυσης (Phylipsen et al., 2012) .....	39

Εικόνα 10. Η αρχή της αλληλοειδικής επέκτασης κατά μια βάση ολιγονουκλεοτιδίου εκκινητή (Mini Sequencing – SnaPshot PCR) χρησιμοποιώντας ddNTPs σημασμένα με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές. Τα ολιγονουκλεοτίδια ταυτοποιούνται με ηλεκτροφόρηση αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή (capillary electrophoresis-automatic sequencer).....	41
Εικόνα 11. Διαχωρισμός των προϊόντων αλληλοειδικής επέκτασης ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών κατά μια βάση (Single allele base extension reaction assay-SABER) χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF mass spectrometry). Ο διαχωρισμός βασίζεται μετρώντας τον συνολικό «χρόνο πτήσης» των ολιγονουκλεοτιδίων μετά την εξαέρωσή τους και την εξαναγκασμένη κίνησή τους σε ηλεκτρικό πεδίο.....	42
Εικόνα 12 Απόλυτη ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του υπό εξέταση δείγματος μέσω του αλγορίθμου Poisson. Για δείγματα που περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις μορίων-στόχων, ο αριθμός των στόχων είναι ίσος με τον αριθμό των θετικών σταγονιδίων, καθώς κάθε σταγονίδιο περιέχει ένα μόνο μόριο. Αντίθετα, για δείγματα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις μορίων-στόχων, ο αριθμός των παρόντων στόχων υπερβαίνει τον αριθμό των σταγονιδίων και έτσι ορισμένα σταγονίδια περιέχουν πολλαπλά (2 έως 3) μόρια-στόχους. Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση των αντιγράφων, ο αριθμός των θετικών σταγονιδίων ( $p$ ) υπολογίζεται με τον αλγόριθμο Poisson. (Koo, 2014).....	44
Εικόνα 13. Η βασική αρχή του digital PCR. Το DNA υπόστρωμα διασπείρεται σε σταγονίδια (drops) ή κελιά (chambers), ώστε κάθε σταγονίδιο ή κελί να περιέχει κατά προτίμηση 1 αντίγραφο DNA. Η ανάπτυξη του φθορισμού μετράται ανά σταγόνα ή κελί και αντιπροσωπεύει τον απόλυτο αριθμό των αντιγράφων DNA στο υπό εξέταση δείγμα. ....	45
Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της πλατφόρμας αλληλούχισης Roche 454 FLX. (Mardis ER., 2008).....	51
Εικόνα 15. Απεικόνιση του ρευστού θαλάμου (flow cell) της Illumina.....	53

Εικόνα 16. Απεικόνιση της μεθοδολογίας αλληλούχησης με την πλατφόρμα της Illumina.( Ansorge WJ, 2009).....	56
Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλούχησης με την πλατφόρμα ABI Solid.( Anton Valouev et al., 2008) .....	60
Εικόνα 18. Chip 318 του Ion Torrent. ....	62
Εικόνα 19. Σχέση μεταξύ ηλικίας κύησης , εμβρυϊκού κλάσματος και BMI. Χρησιμοποιήθηκε πολυωνυμικό μοντέλο για το ποσοστό του εμβρυϊκού κλάσματος σε σχέση με την ηλικία κύησης και το δείκτη μάζας σώματος της μητέρας (BMI). Οι γραμμές παλινδρόμησης αναφέρονται στις διάφορες τιμές BMI. (Kinnings et al, 2015)	64
Εικόνα 20. Σχέση μεταξύ ηλικίας κύησης , εμβρυϊκού κλάσματος και πλοειδίας του εμβρύου. Οι γραμμές που προκύπτουν από την πολυωνυμική ποσοτική παλινδρόμηση αναφέρονται σε δείγματα από κυήσεις που ταξινομούνται ως ευπλοειδικές, με τρισωμία 21, με τρισωμία 18 ή με τρισωμία 13. (Kinnings et al, 2015). ....	65
Εικόνα 21. Σχέση μεταξύ μητρικού δείκτη μάζας σώματος (BMI) και εμβρυϊκού κλάσματος. Οι γραμμές παλινδρόμησης αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ηλικίες κύησης. ( Kinnings et al, 2015).....	66

## Προγεννητικός Έλεγχος

Ο προγεννητικός έλεγχος πραγματοποιείται σε εγκυμοσύνες υψηλού κινδύνου για διαταραχές, όπως χρωμοσωματικές ανευπλοειδίες, ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα, συγγενή καρδιακή νόσο, αυτοσωματικές υπολειπόμενες διαταραχές κ.α.. Έχει εκτιμηθεί ότι υπάρχει πιθανότητα περίπου 2-3% να γεννηθεί ένα παιδί με συγγενή γενετική διαταραχή και το ποσοστό κινδύνου αυξάνεται όταν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό για κάποια διαταραχή (Teew et al., 2010). Η εφαρμογή του προγεννητικού ελέγχου στην κλινική πράξη περιλαμβάνει επεμβατικές τεχνικές, όπως δειγματοληψία χοριακών λαχνών (CVS) και αμνιοπαρακέντηση, σε γυναίκες με εγκυμοσύνες υψηλού κινδύνου. Παρά το υψηλό ποσοστό επιτυχίας των τρεχουσών προσεγγίσεων που εφαρμόζονται στον προγεννητικό έλεγχο (ποσοστό ανίχνευσης 80-90%), η εξέλιξη των διαγνωστικών εργαλείων προγεννητικού ελέγχου θα μπορούσαν να βελτιώσουν περαιτέρω την ειδικότητα και την ευαισθησία των διαγνωστικών ελέγχων καθώς και να μειώσουν τον αριθμό των γυναικών που υποβάλλονται σε επεμβατικές διαγνωστικές εξετάσεις μειώνοντας την πιθανότητα αποβολής του εμβρύου και λοιπών πιθανών επιπλοκών στην κύηση.

## Ορισμοί

Η αξιοπιστία μίας μεθόδου προγεννητικού ελέγχου αντικατοπτρίζεται από τις τιμές διαφόρων δεικτών, όπως είναι το ποσοστό ανίχνευσης (Detection Rate, DR), το ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (False Positive Rate, FR), το θετικό ποσοστό ελέγχου (Screen Positive Rate, SPR) καθώς και ο δείκτης πιθανότητας θετικού αποτελέσματος (Odds of A Positive Result, OAPR). Ο δείκτης DR αναφέρεται στην ευαισθησία της διαγνωστικής μεθόδου και ως εκ τούτου προσδιορίζει τον αριθμό των κυήσεων με παθολογικά ευρήματα στο σύνολο των κυήσεων που ελέγχθηκαν. Ο δείκτης FR αφορά τον αριθμό κυήσεων που διαγνώστηκαν ως παθολογικές ενώ στην πραγματικότητα είναι φυσιολογικές. Ο δείκτης SPR περιλαμβάνει τα ψευδώς θετικά και τα αληθώς θετικά αποτελέσματα και αντικατοπτρίζει την

πιθανότητα μία κύηση να βρεθεί πάνω από το όριο κινδύνου και να χαρακτηριστεί ως υψηλού κινδύνου και στη συνέχεια να υποβληθεί σε προγεννητικό έλεγχο (McEwan, Godfrey and Wilkins, 2012). Η επίτευξη χαμηλών τιμών FPR's / SPR's είναι απαραίτητη ώστε να μειωθεί ο αριθμός των κύσεων που υποβάλλονται άσκοπα σε επεμβατικές τεχνικές προγεννητικού ελέγχου όπως είναι η λήψη χοριακών λαχνών και η αμνιοπαρακέντηση. Ο δείκτης OAPR αναφέρεται στην πιθανότητα οι κύσεις υψηλού κινδύνου μετά τον προγεννητικό έλεγχο να χαρακτηριστούν ως παθολογικές (Wald, 2008). Ο θετικός προγνωστικός δείκτης (Positive Predictive Value, PPV) και ο αρνητικός προγνωστικός δείκτης (Negative Predictive Value, NPV) επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αξιολογηθεί η αξιοπιστία ενός διαγνωστικού ελέγχου. Οι PPV και NPV αναφέρονται στην αναλογία των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων τα οποία είναι πραγματικά θετικά και αρνητικά αντίστοιχα, με υψηλές τιμές των δεικτών να υποδεικνύουν αυξημένη ακρίβεια (Pencina et al., 2008). Παρόλα αυτά, οι PPV και NPV εξαρτώνται από τον επιπολασμό του «θετικού» αποτελέσματος, για παράδειγμα των εμβρύων με Τρισωμία 21 στον γενικό πληθυσμό.

## **Προγεννητικός έλεγχος για ανευπλοειδίες**

### **Ιστορική αναδρομή και τρέχουσες πρακτικές προγεννητικού ελέγχου για ανευπλοειδίες στο έμβρυο.**

Πριν την ανάπτυξη των υπερήχων, ο προγεννητικός έλεγχος μπορούσε θεωρητικά να γίνει με ακτινογραφικές μεθόδους, με τους γνωστούς κινδύνους της ακτινοβολίας, σε σχετικά προχωρημένη ηλικία κύησης και δίνοντας κυρίως πληροφορίες για τη σκελετική διάπλαση του εμβρύου. Η ανάπτυξη της υπερηχογραφίας έχει δώσει τις τελευταίες δεκαετίες μεγάλη ώθηση στον προγεννητικό έλεγχο, που γίνεται τώρα με αυξημένη αξιοπιστία.

Το 1866, ο Langdon Down παρατήρησε ότι οι ασθενείς με τρισωμία 21 έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό: το δέρμα τους υπολείπεται σε ελαστικότητα, δίνοντας την εντύπωση

ότι έχει πολύ μεγαλύτερη επιφάνεια σε σχέση με το σώμα και το επίπεδο πρόσωπο με τη μικρή μύτη. Το 1990 έγινε αντιληπτό ότι η περίσσεια δέρματος των ασθενών με σύνδρομο Down μπορεί να ανιχνευθεί υπερηχογραφικά ως αύξηση του πάχους της αυχενικής διαφάνειας, κατά τον τρίτο μήνα της ενδομήτριας ζωής. Το πάχος της εμβρυϊκής αυχενικής διαφάνειας στο υπερηχογράφημα της 11<sup>ης</sup>-13<sup>ης</sup> +6 εβδομάδας κύησης μπορεί να συνδυαστεί με την ηλικία της μητέρας, ώστε να παρέχει μια αποτελεσματική μέθοδο διαλογής πληθυσμού για τρισωμία 21. Για ένα ποσοστό επεμβατικού ελέγχου της τάξης του 5%, περίπου το 75% των τρισωματικών κυήσεων μπορούν να ανιχνευθούν. Επιπλέον, όταν λαμβάνονται υπόψη η ελεύθερη β-hCG και η σχετιζόμενη με την κύηση πρωτεΐνη-A του πλάσματος (PAPP-A) στον ορό της μητέρας κατά την 11<sup>η</sup>-13<sup>η</sup>+6 εβδομάδα, το ποσοστό ανίχνευσης των χρωμοσωματικών ανωμαλιών είναι 85–90%. Το 2001 βρέθηκε ότι στο 60–70% των εμβρύων με τρισωμία 21, το ρινικό οστό δεν είναι ορατό στο υπερηχογράφημα της 11<sup>ης</sup>-13<sup>ης</sup> +6 εβδομάδας. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η εξέταση του ρινικού οστού κατά το υπερηχογράφημα του πρώτου τριμήνου, σε συνδυασμό με τους βιοχημικούς δείκτες, μπορεί να αυξήσει το ποσοστό ανίχνευσης σε περισσότερο από 95%. Επιπρόσθετα, η αυξημένη αυχενική διαφάνεια, εκτός από τον ρόλο της στην εκτίμηση του κινδύνου για τρισωμία 21, μπορεί να ανιχνεύσει ένα σημαντικό τμήμα άλλων χρωμοσωματικών ανωμαλιών και σχετίζεται με μείζονες ανωμαλίες της καρδιάς και των μεγάλων αγγείων, καθώς και με ένα ευρύ φάσμα γενετικών συνδρόμων. Άλλα οφέλη της υπερηχογραφικής εξέτασης της 11<sup>ης</sup>-13<sup>ης</sup> +6 εβδομάδας περιλαμβάνουν την επιβεβαίωση της βιωσιμότητας του εμβρύου, τον ακριβή υπολογισμό της ηλικίας κύησης, την πρόιμη ανίχνευση μείζονων εμβρυϊκών ανωμαλιών και τη διάγνωση των πολύδυμων κυήσεων. Ο πρώιμος έλεγχος παρέχει επίσης αξιόπιστο καθορισμό της χοριονικότητας, η οποία είναι ο βασικός καθοριστικός παράγοντας της έκβασης των πολύδυμων κυήσεων.

Ο έλεγχος (screening) για χρωμοσωματικές ανωμαλίες, με συνδυασμό της εμβρυϊκής αυχενικής διαφάνειας και της μητρικής ηλικίας, στηρίζεται κυρίως σε δύο παρατηρήσεις που έγιναν πριν από 100 και πλέον χρόνια. Η πρώτη παρατήρηση έγινε από τον Dr. Langdon Down, ο οποίος, το 1866, ανέφερε ότι το δέρμα των προσβεβλημένων ατόμων φαίνεται να

είναι πολύ μεγάλο για το σώμα τους. Η δεύτερη παρατήρηση έγινε από τους Frazer και Mitchell το 1876, οι οποίοι παρατήρησαν μία συσχέτιση μεταξύ της τρισωμίας 21 και της προχωρημένης ηλικίας της μητέρας. Τώρα είναι γνωστό ότι το επιπλέον δέρμα των εμβρύων με σύνδρομο Down μπορεί να απεικονιστεί υπερηχογραφικά σαν αυξημένη αυχενική διαφάνεια (Εικόνα 1), κατά τους πρώτους τρεις μήνες της ενδομήτριας ζωής. Επιπλέον, η αυξημένη αυχενική διαφάνεια στις 10-14 εβδομάδες της κύησης είναι μία συχνή φαινοτυπική έκφραση πολλών χρωμοσωματικών βλαβών, καρδιακών ανωμαλιών και γενετικών συνδρόμων.



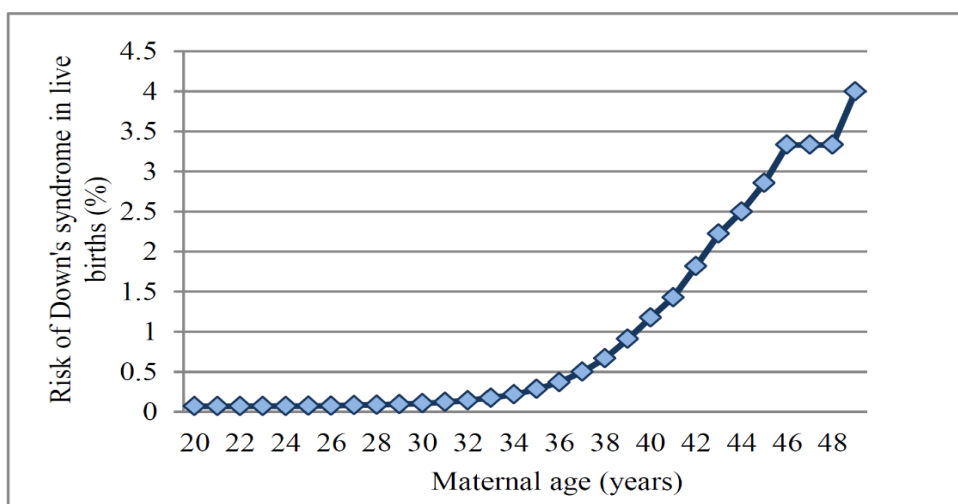
Εικόνα 1. Υπέρηχος αυχενικής διαφάνειας

Ως ανευπλοειδία ορίζεται η απόκλιση από τον φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων και οδηγεί σε νοσηρότητα ή/και θνησιμότητα. Χρωμοσωματικές ανωμαλίες ανιχνεύονται σε 1 στις 160 γεννήσεις και οι τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 21 (Down Syndrome), 18 (Edwards syndrome) και 13 (Patau syndrome) αποτελούν την πλειοψηφία των ανευπλοειδιών στις γεννήσεις, πέραν των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Nussbaum et al., 2007; Driscoll and Gross, 2009). Το σύνδρομο Down αποτελεί την πιο συχνή ανευπλοειδία που συναντάται στα

έμβρυα με συχνότητα εμφάνισης 1 στις 800 γεννήσεις (Ehrich et al., 2011). Παρόλα αυτά ο κίνδυνος τρισωμίας 21 σχετίζεται με την ηλικία της μητέρας και αυξάνεται εκθετικά από την ηλικία των 35 χρόνων και φτάνοντας σε ποσοστό 1 στις 35 γεννήσεις για μητέρες άνω των 46 χρόνων (Morris, Mutton and Alberman, 2002).

Οι Snijders et al συνδύασαν δεδομένα από μελέτες στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης, μετά από αμνιοπαρακέντηση και στο πρώτο τρίμηνο, μετά από λήψη χοριακών λαχνών, για να υπολογίσουν την επίπτωση μιας ευρείας ποικιλίας χρωμοσωματικών βλαβών, σε διαφορετικές ηλικίες κύησης, σε συσχέτιση με τη συχνότητα των τρισωμιών σε νεογνά που γεννιούνται ζωντανά. Ο κίνδυνος από τη μητρική ηλικία και από την ηλικία της κύησης υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας την επίπτωση της τρισωμίας 21 για τις συγκεκριμένες ηλικίες της μητέρας σε νεογνά που γεννήθηκαν ζωντανά και τη σχετική συχνότητα σε μια δεδομένη ηλικία κύησης (Εικόνα 2). Για κάθε χρωμοσωματική βλάβη, είναι δυνατό να υπολογιστεί ο ρυθμός της ενδομήτριας θνησιμότητας (Πίνακας 1, Πίνακας 2) από τις διαφορές στην επίπτωση στις 40 εβδομάδες και στην επίπτωση της χρωμοσωματικής βλάβης σε μια δεδομένη ηλικία κύησης. Για παράδειγμα, στην τρισωμία 21, εάν η επίπτωση σε 40 εβδομάδες είναι 1, η επίπτωση στις 16 και 12 εβδομάδες είναι 1,46 και 1,69 αντίστοιχα. Ο ρυθμός της ενδομήτριας θνησιμότητας μεταξύ 16 και 40 εβδομάδων είναι 32% ( $1,46 - 1/1,46$ ) και μεταξύ 12 και 40 εβδομάδων είναι 41% ( $1,69 - 1/1,69$ ).





Εικόνα 2. Εκτίμηση του κινδύνου απόκτησης εμβρύου με Σύνδρομο Down σε συνάρτηση με την ηλικία της μητέρας. Το ποσοστό κινδύνου αυξάνεται σταδιακά περίπου μέχρι την ηλικία των 34 χρόνων και στη συνέχεια σημειώνεται εκθετική αύξηση, με τις γυναίκες κοντά στα 50 να έχουν ρίσκο >3%. (Morris, Mutton and Alberman, 2002).

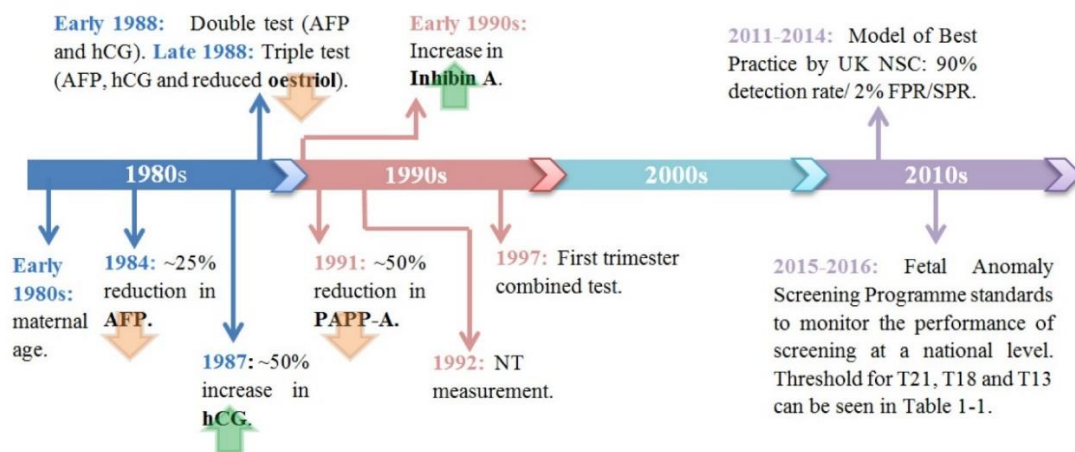
Πίνακας 1. Υπολογισθείς κίνδυνος για τρισωμίες 21, 18 και 13 σε σχέση με την ηλικία της μητέρας και την ηλικία της κήσεως.

Ηλικία μητέρας	Τρισωμία 21			Τρισωμία 18			Τρισωμία 13		
	12η εβδ.	20η εβδ.	40η εβδ.	12η εβδ.	20η εβδ.	40η εβδ.	12η εβδ.	20η εβδ.	40η εβδ.
20	1/898	1/1175	1/1527	1/2484	1/4897	1/18013	1/7826	1/14656	1/42423
25	1/795	1/1040	1/1352	1/2200	1/4336	1/15951	1/6930	1/12978	1/37567
30	1/526	1/688	895	1/1456	1/2869	1/10554	1/4585	1/8587	1/24856
35	1/210	1/274	356	1/580	1/1142	1/4202	1/1826	1/3419	1/9896
40	1/57	1/74	97	1/157	1/310	1/1139	1/495	1/927	1/2683

Πίνακας 2. Πιθανότητες για ενδομήτριο θάνατο σε έμβρυα με χρωμοσωματικές ανωμαλίες.

Χρωμοσωματική ανωμαλία	Πιθανότητα για ενδομήτριο θάνατο	
	Από τις 12 έως τις 40 εβδομάδες	Από τις 16 έως τις 40 εβδομάδες
Τρισωμία 21	41%	32%
Τρισωμία 18	86%	74%
Τρισωμία 13	82%	71%
Σύνδρομο Turner	75 %	52%
47.XXX	~5%	-3%
47.XXY	-5%	-3%
47.XYY	-5%	-3%
Τριπλοειδισμός	>99%	>99%

Η μητρική ηλικία με DR<35% ως μοναδικός προγνωστικός δείκτης, είχε ως αποτέλεσμα πολλά παθολογικά έμβρυα να διαφύγουν του διαγνωστικού ελέγχου καθώς και μεγάλος αριθμός φυσιολογικών εμβρύων να εκτεθούν σε επεμβατικές τεχνικές αυξάνοντας το ρίσκο αποβολής του κυήματος (Haddow et al., 1992). Μεταξύ 1989 και 2008, το ποσοστό των μητέρων ηλικίας 35 ετών και άνω αυξήθηκε από 9% έως 20%, αντίστοιχα, πραγματοποιώντας τον έλεγχο μόνο με βάση την ηλικία της μητέρας μη βιώσιμη. Η σταδιακή εισαγωγή διαφόρων βιοχημικών και υπερηχογραφικών δεικτών από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 έχει βελτιώσει σημαντικά την ευαισθησία και αξιοπιστία των σημερινών πρακτικών προγεννητικού ελέγχου έως περίπου 95%. (Rozenberg et al., 2006; Ehrich et al., 2011) (Εικόνα 3. Απεικόνιση των σημαντικότερων χρονικών σημείων στην εξέλιξη του προγεννητικού ελέγχου για το σύνδρομο Down (Sillence et al., 2013).



Εικόνα 3. Απεικόνιση των σημαντικότερων χρονικών σημείων στην εξέλιξη του προγεννητικού ελέγχου για το σύνδρομο Down (Sillence et al., 2013).

Στην εικόνα 3 αποτυπώνονται τα χρονικά σημεία που ανακαλύφθηκαν διάφοροι βιοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα για τον προγεννητικό έλεγχο της ανευλοειδίας όπως είναι η Α-εμβρυική πρωτεΐνη (alpha-fetoprotein, AFP), η β-χοριακή γοναδοτροπίνη (Beta- human chorionic gonadotropin, β-hCG), η Α-ινχιμίνη (Inhibin A) και η πρωτεΐνη πλάσματος Α σχετιζόμενη με την εγκυμοσύνη (pregnancy associated plasma protein A, PAPP-A) καθώς και η εισαγωγή ποικίλων προγνωστικών ελέγχων. Το πιο

διαδεδομένο προγνωστικό τεστ πρώτου τριμήνου, συνδυάζει την ηλικία της μητέρας, την μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας και τους δείκτες PAPP-A και β-hCG.

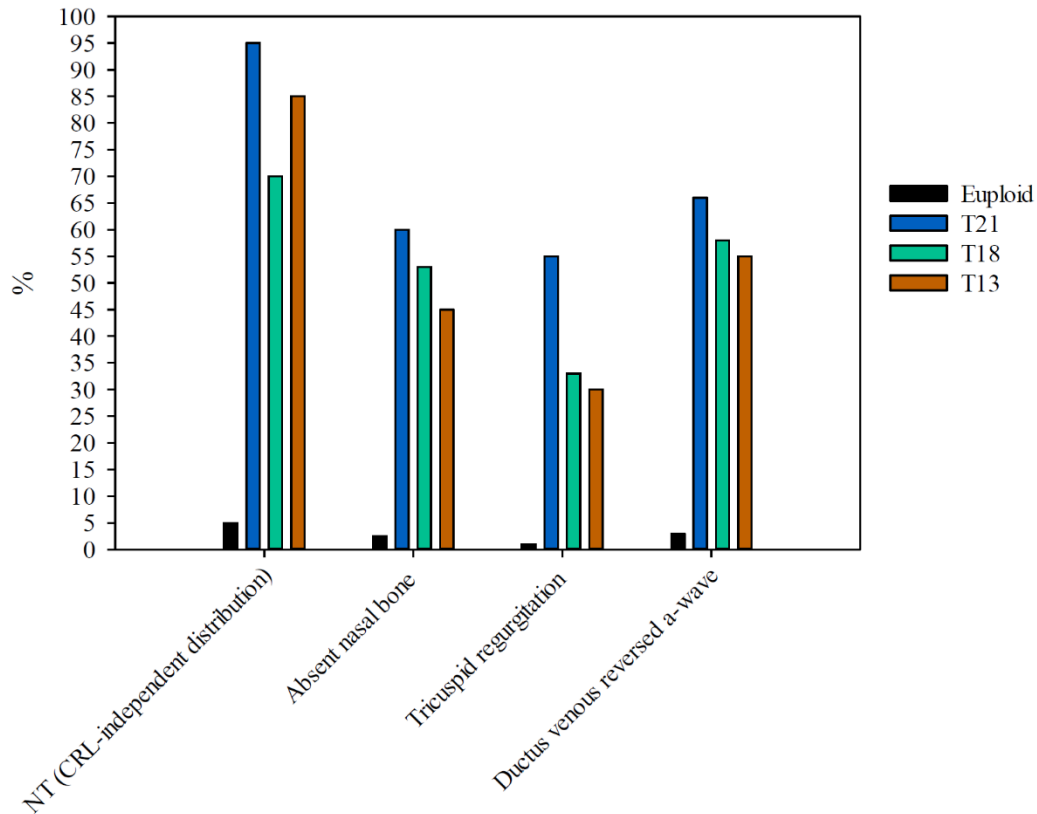
Η αυχενική διαφάνεια αποτελεί τον πιο ζωτικής σημασίας υπερηχογραφικό δείκτη σε σχέση με όλους τους δείκτες στον προγνωστικό προγεννητικό έλεγχο για ανευλοειδίες. Η αυχενική διαφάνεια αφορά στην μέτρηση του πάχους του υποδόριου υγρού πίσω από τον αυχένα του εμβρύου και πραγματοποιείται μεταξύ 11 και 14 εβδομάδων κύησης. Όλα τα έμβρυα εμφανίζουν αυχενική διαφάνεια το μέγεθος της οποίας αυξάνει φυσιολογικά με την ηλικία κύησης. Κάθε κύηση χαρακτηρίζεται από ένα βασικό κίνδυνο (a priori) το έμβρυο να φέρει κάποια χρωμοσωματική ανωμαλία ο οποίος εξαρτάται από την ηλικία της μητέρας και της κύησης. Η μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας ενός εμβρύου με δεδομένο κεφαλουραίο μήκος, εκφράζει μια πιθανότητα η οποία πολλαπλασιαζόμενη με τον βασικό κίνδυνο, δίνει τον νέο κίνδυνο (Souka et al., 1998). Επομένως όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της αυχενικής διαφάνειας, τόσο μεγαλώνει και ο κίνδυνος το έμβρυο να φέρει χρωμοσωματικές και/ή δομικές ανωμαλίες (Souka et al., 2005). Σύμφωνα με την μελέτη των Nicolaides et al. (1992), η αυχενική διαφάνεια  $NT \geq 3$  μεταξύ 10<sup>ης</sup>-14<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης, είναι σημαντικός δείκτης ότι το έμβρυο μπορεί να φέρει χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Για τιμές  $NT \geq 3$  ο κίνδυνος μπορεί να αυξάνεται περισσότερο από δέκα φορές ενώ για  $NT < 3$  ο κίνδυνος του εμβρύου να φέρει χρωμοσωματικές ανωμαλίες μειώνεται έως και 3 φορές (Nicolaides et al., 1992). Η αυχενική διαφάνεια παραμένει ένας σημαντικός δείκτης για την εκτίμηση του κινδύνου το έμβρυο να φέρει ανευλοειδίες. Παρόλα αυτά, σήμερα στην καθημερινή κλινική πράξη, εφαρμόζεται πεπεμβατικός προγεννητικός έλεγχος για τιμές  $NT \geq 3,5\text{mm}$  ή για τιμή πάνω από 1 στα 150 όσον αφορά το συνδυαστικό τεστ (Lichtenbelt et al., 2015). Το συνδυαστικό τεστ του πρώτου τριμήνου εισήχθη το 1997 και συνδυάζει την αυχενική διαφάνεια, την ηλικία της μητέρας και τους βιοχημικούς δείκτες β-hCG και PAPP-A (Wald and Hackshaw, 1997) (Εικόνα 3). Μελέτες έχουν δείξει ότι το συνδυαστικό τεστ του πρώτου τριμήνου μπορεί να ανιχνεύσει περίπου το 85-90% των περιπτώσεων εμβρύων με σύνδρομο Down με 5% ψευδώς θετικά αποτελέσματα (FPR) (Spencer and Nicolaides, 2003; Nicolaides et al., 2005; Jaques et al., 2007; Valinen et al., 2007). Για τον υπολογισμό του συνολικού κινδύνου ανευλοειδίας

του εμβρύου απαιτείται ο διαγνωστικός έλεγχος πρώτου και δευτέρου τριμήνου. Σε συνάρτηση με την ηλικία της μητέρας, ελέγχονται η αυχενική διαφάνεια του εμβρύου και τα επίπεδα της PAPP-A στον ορό μεταξύ 10+3 και 13+6 εβδομάδων κύησης, ενώ το διάστημα μεταξύ 15<sup>ης</sup> και 18<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης συνυπολογίζονται τα επίπεδα στον ορό των AFP, fβ-hCG, ελεύθερης οιστραδιόλης (uE3) και Inhibin A (Benn, 2002). Ο συνδυασμός των τεστ πρώτου και δευτέρου τριμήνου αυξάνει την ευαισθησία και ταυτόχρονα μειώνει το FPR αλλά υπάρχει προβληματισμός αν οι γυναίκες που στο τεστ πρώτου τριμήνου εμφανίζουν υψηλό ποσοστό κινδύνου θα πρέπει να περιμένουν μέχρι να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος του δευτέρου τριμήνου προτού υποβληθούν σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Οι γυναίκες που εμφανίζουν υψηλό ποσοστό κινδύνου στον έλεγχο του πρώτου τριμήνου, υποβάλλονται σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο (λήψη χοριακών λαχνών, Chorionic Villi Sampling, CVS) ενώ σε γυναίκες με μέτριο/χαμηλό ποσοστό κινδύνου πραγματοποιείται ο διαγνωστικός έλεγχος δευτέρου τριμήνου. Αν το ποσοστό κινδύνου βρεθεί υψηλό, τότε υποβάλλονται σε αμνιοπαρακέντηση για προγεννητικό έλεγχο (Nicolaidis, 2011).

### **Ανάπτυξη των υπερηχογραφικών δεικτών**

Ο υπέρηχος κατά την κύηση πραγματοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας, της ηλικίας κύησης και του αριθμού των εμβρύων, αλλά χρησιμοποιείται επίσης ως εργαλείο για την ανίχνευση σοβαρών δομικές ανωμαλίες (Blaas, 2014). Η υπερηχογραφική απεικόνιση παίζει σημαντικό ρόλο στην προγεννητική εξέταση και αντικατέστησε τον ορολογικό έλεγχο για τον εντοπισμό ανωμαλιών του νευρικού σωλήνα. Υπάρχει πληθώρα μελετών για τη συνεισφορά της υπερηχογραφικής απεικόνισης στην εκτίμηση κινδύνου ανευπλοειδίας του εμβρύου κατά το πρώτο και δεύτερο τρίμηνο της κύησης (Benacerraf, Frigoletto and Cramer, 1987; Stoll et al., 1993; Hill, 1996; Nyberg and Souter, 2001; Rozenberg et al., 2006; Kagan et al., 2009; Abele et al., 2015). Η αύξηση του πάχους του υποδόριου υγρού πίσω από τον αυχένα του εμβρύου ήταν ο πρώτος υπερηχογραφικός δείκτης για το σύνδρομο Down και ο μοναδικός που συγκαταλέγεται στο

συνδυαστικό προγνωστικό τεστ (Εικόνα 3). Η αυξημένη αυχενική διαφάνεια μπορεί να αποτελέσει δείκτη και για άλλες χρωμοσωματικές ανωμαλίες όπως στα σύνδρομα Edwards (T18) και Patau (T13) (Cicero et al., 2003). Επιπλέον, η μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας σχετίζεται με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις του εμβρύου, όπως ανωμαλίες της καρδιάς (Hyett et al., 1997), δυσπλασίες και γενετικά σύνδρομα (Souka et al., 1998). Πέραν της αυχενικής διαφάνειας, έχουν αξιολογηθεί και άλλοι υπερηχογραφικοί δείκτες για τον προγεννητικό υπερηχογραφικό έλεγχο της τρισωμίας 21 (Stressig et al., 2011; McEwan, Godfrey and Wilkins, 2012; Blaas, 2014). Στον έλεγχο του πρώτου τρίμηνου, παρατηρείται απουσία του ρινικού οστού στο 60-70% των εμβρύων με τρισωμία 21 και στο 2% των φυσιολογικών εμβρύων, ενώ ανιχνεύονται ανωμαλίες της ροής στο φλεβώδη πόρο στο 80% των εμβρύων με τρισωμία 21 και στο 5% των φυσιολογικών εμβρύων. Άλλοι υπερηχογραφικοί δείκτες όπως ο εξόμφαλος, η μεγακύστη, και η μονήρης ομφαλική αρτηρία είναι υψηλότερη στα έμβρυα με τρισωμία 21 σε σχέση με τα φυσιολογικά έμβρυα. Όπως προέκυψε από τις μελέτες, ο συνδυασμός των παραπάνω δεικτών με την ηλικία της μητέρας είχε ως αποτέλεσμα την οριακή βελτίωση του DR περίπου στο 33% σε σχέση μόνο με την ηλικία της μητέρα που είναι DR 29% (Stressig et al., 2011). Στην Εικόνα 4 απεικονίζονται τα ποσοστά ανίχνευσης των υπερηχογραφικών δεικτών παράλληλα με την αυχενική διαφάνεια. Παρόλα αυτά, κάποιοι από τους δείκτες εμφανίζουν διαφορές μεταξύ των φυλών οπότε θα πρέπει η επιλογή των υπερηχογραφικών δεικτών να προσαρμόζεται στον πληθυσμό ελέγχου. Για παράδειγμα, η ατελής ανάπτυξη του ρινικού οστού παρατηρείται μόνο στο 1-3% των φυσιολογικών κυήσεων στον έλεγχο πρώτου τριμήνου ενώ στον Αφρικανικό πληθυσμό το ποσοστό ανέρχεται στο 10% (McEwan, Godfrey and Wilkins, 2012).



Εικόνα 4. Η επίπτωση των υπερηχογραφικών χαρακτηριστικών στα έμβρυα με ευλοειδία (μαύρο), T21 (μπλε), T18 (πράσινο) και T13 (πορτοκαλί) (Nicolaidis, 2011). (CRL; crown-rump length).

Στις πρώτες εβδομάδες και κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου, γίνεται ο έλεγχος του εμβρύου με υπερηχογράφημα ανάπτυξης – Doppler, εξέταση που μελετά την ανάπτυξη και τη θρέψη του εμβρύου, παρακολουθώντας την ροή του αίματος στα αγγεία και στον πλακούντα. Το υπερηχογράφημα αυτό μας δίνει πληροφορίες για τη λειτουργία του πλακούντα και την κατάσταση του εμβρύου. Διενεργείται από την 28<sup>η</sup> εβδομάδα έως και τον τοκετό, συνήθως όμως μεταξύ 32<sup>ης</sup>-34<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης. Με το υπερηχογράφημα 3ου τριμήνου γίνεται μέτρηση της ποσότητας του αμνιακού υγρού και εκτίμηση των κινήσεων του εμβρύου που παρέχουν πληροφορίες για την καλή του κατάσταση. Επιπλέον ελέγχονται η θέση και η μορφολογία του πλακούντα. Η εξέταση της ανατομίας του 3<sup>ου</sup> τριμήνου πραγματοποιείται λαμβάνοντας συγκεκριμένες υπερηχογραφικές τομές, όπως αυτές καθορίζονται από τα αντίστοιχα πρωτόκολλα του FMF, οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι

εμφανίζουν την υψηλότερη ευαισθησία στην ανίχνευση πιθανών ανωμαλιών κατά την προχωρημένη αυτή ηλικία της κύησης.

Αν και γίνεται προσπάθεια να εξετασθούν με λεπτομέρεια όλα τα ανωτέρω ανατομικά στοιχεία, το υπερηχογράφημα ανάπτυξης – Doppler δεν είναι το κατάλληλο για να εξετασθεί η ανατομία του εμβρύου, γιατί το έμβρυο είναι πλέον μεγάλο και δεν είναι δυνατό να απεικονιστεί το ίδιο καθαρά, όπως στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο. Τέλος, εξετάζονται ο τράχηλος της μήτρας και η ροή του αίματος στις μητριάιες αρτηρίες. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσδιοριστεί ο κίνδυνος πρόωρου τοκετού, προεκλαμψίας και υπολειπόμενης σωματικής ανάπτυξης του εμβρύου. Στις περιπτώσεις που το έμβρυο έχει την κατάλληλη θέση, γίνεται απεικόνισή του με την μέθοδο της τρισδιάστατης (3D και 4D) υπερηχογραφίας. Η συχνότητα του καρδιακού παλμού του εμβρύου, οι κινήσεις του και οι συσπάσεις της μήτρας ελέγχονται επίσης με το καρδιοτοκογράφημα (NST), το οποίο σε συνδυασμό με το Doppler αποτελούν το βιοφυσικό προφίλ του εμβρύου και προσφέρει επιπρόσθετες πληροφορίες για τον πιθανό κίνδυνο ενδομήτριου θανάτου (Whitworth et al, 2010; Abramowicz, 2013).

### **Ανάπτυξη των βιοδεικτών στον ορό/πλάσμα και στα ούρα**

Για την επίτευξη υψηλότερης προγνωστικής αξίας, συνδυαστικά με την αυχενική διαφάνεια, εκτελούνται εξετάσεις αίματος για την ανίχνευση και την μέτρηση των πρωτεϊνών PAPP-A, hCG καθώς και της PLGF. Ο συνδυασμός της αυχενικής διαφάνειας με παραμέτρους όπως το ιστορικό της εγκύου (ηλικία εγκύου, ηλικία κύησης), λοιπούς υπερηχογραφικούς δείκτες, όπως παρουσία ή απουσία ρινικού οστού και τη μέτρηση β-hCG και της PAPP-A στον ορό της εγκύου, επιτρέπει τον ασφαλέστερο υπολογισμό μιας τελικής συνδυασμένης πιθανότητας για το σύνδρομο Down και τις λοιπές τρισωμίες. Ο συνδυαστικός αυτός έλεγχος πρώτου τριμήνου (cFTS) φτάνει σε ποσοστό ανίχνευσης ανωμαλιών το 90% και ψευδώς θετικών περίπου 5% (Alfirevic et al, 2017).

**PAPP-A:** Η ορμόνη PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein-A) παράγεται από το έμβρυο και από τον πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος της μητέρας. Τα χαμηλά επίπεδά της κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου μπορούν να συσχετιστούν με χρωμοσωματικές ανωμαλίες στο έμβρυο, όπως είναι οι τρισωμίες 21, 18 και 13. Επίσης χαμηλά επίπεδα PAPP-A στο αίμα την 8η έως 14η εβδομάδα της κύησης, μπορούν να υποδηλώνουν αυξημένο κίνδυνο για την ομαλή έκβαση της εγκυμοσύνης όπως ενδομήτρια αναστολή της ανάπτυξης, πρόωρο τοκετό, προεκλαμψία ή και απώλεια του εμβρύου.

**β-hCG:** Η ορμόνη β-χοριακή γοναδοτροπίνη (β-hCG) συντίθεται και εκκρίνεται από τον πλακούντα και η μέτρησή της χρησιμοποιείται για την έγκαιρη διάγνωση της εγκυμοσύνης. Τα επίπεδά της αυξάνονται γρήγορα στην αρχή της εγκυμοσύνης και στη συνέχεια μειώνονται μεταξύ της 10ης και 20ης εβδομάδας. Τα επίπεδα μπορεί να είναι υψηλότερα σε μια κύηση εμβρύου με σύνδρομο Down, ενώ συχνά παρατηρούνται χαμηλότερες τιμές από το συνηθισμένο σε μια εγκυμοσύνη εμβρύου με τρισωμία 18. Οι τιμές των β-hCG και PAPP-A σε μία κύηση αντιπροσωπεύουν ένα λόγο πιθανότητας ο οποίος πολλαπλασιάζεται με τον a priori κίνδυνο ώστε να υπολογιστεί ο νέος κίνδυνος. Όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα της β-hCG και όσο χαμηλότερα τα επίπεδα της PAPP-A, τόσο υψηλότερος είναι ο κίνδυνος για τρισωμία 21 (Provider Handbook, 2009).

**PLGF:** Η πρωτεΐνη PLGF είναι μία πρωτεΐνη, παράγεται κατά κύριο λόγο από τα τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα και διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση. Τα επίπεδά της αυξάνονται καθώς αυξάνεται η ηλικία κύησης και μειώνονται όσο αυξάνεται το μητρικό βάρος. Συνδυαστικά με τις υπόλοιπες εξετάσεις πρώτου τριμήνου μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα αντίχενωσης ανευπολειδίας. Τα ευρήματα μελετών αποδεικνύουν ότι τα επίπεδα της PLGF στον ορό της μητέρας μειώνονται στις 11-13 εβδομάδες κύησης εμβρύου με σημαντικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες (τρисωμία 13, 18, 21, μονοσωμία Turner). Εκτιμάται ότι η εξέταση μέσω ενός συνδυασμού μητρικής ηλικίας και των τριών βιοχημικών δεικτών (PLGF, PAPP-A και β-hCG) θα αναγνώριζε περίπου το



70% και το 80% των κήσεων με ανευλοειδίες (Zaragoza et al, 2009), ενώ ο συνδυαστικός έλεγχος με την αυχενική διαφάνεια και την μέτρηση ρινικού οστού καθώς και με προσθήκη βιοδεικτών επιπλέον βιοδεικτών μπορεί να ανιχνεύσει το 98% των εμβρύων με τρισωμία 21 και 95% με τρισωμία 18 και 13 (Carmichael et al, 2017).

Στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης προσδιορίζονται τα επίπεδα τεσσάρων βασικών βιοδεικτών: της α-φετοπρωτεΐνης, της ινχιπίνης A, της οιστριόλης (E3) και της β-χοριακής γοναδοτροπίνης.

**Α-φετοπρωτεΐνη:** Η α-φετοπρωτεΐνη (AFP) είναι μια πρωτεΐνη που παράγεται κυρίως στο ήπαρ του εμβρύου και απελευθερώνεται στον εμβρυϊκό ορό και στο αμνιακό υγρό. Στο τέλος του πρώτου τριμήνου απελευθερώνεται στην μητρική κυκλοφορία με τα επίπεδά της να αυξάνονται σταθερά μέσα στο δεύτερο τρίμηνο. Αυξημένα επίπεδα της AFP παρατηρούνται σε κήσεις όπου τα έμβρυα παρουσιάζουν ελλείμματα ανοικτού νωτιαίου σωλήνα (ONTDs) και ομφαλοκήλη, ενώ είναι μειωμένη στα έμβρυα με σύνδρομο Down. Διαταραχές στα επίπεδα της AFP σχετίζονται με την παρουσία της δισχιδούς ράχης, της ανεγκεφαλίας, της ατρησίας οισοφάγου. Η AFP σε συνδυασμό με την β-hCG και την ελεύθερη οιστριόλη συνθέτουν το A-τεστ.

**Ινχιπίνη A:** Η πρωτεΐνη ινχιπίνη A (Dimeric Inhibin-A) παράγεται από τις ωθήκες και τον εμβρυϊκό πλακούντα. Στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξάνονται ενώ μειώνονται μετά την 10η εβδομάδα της εγκυμοσύνης και παραμένουν σταθερά μεταξύ της 15ης και της 20ης εβδομάδας. Αποτελεί πολύ καλό δείκτη για τη διάγνωση της τρισωμίας 21 μετά την 13<sup>η</sup> εβδομάδα, διότι τα επίπεδά της είναι πιο αυξημένα σε σχέση με φυσιολογικές κήσεις.

**Ελεύθερη οιστριόλη:** Πρόκειται για μια ορμόνη που παράγεται από τους εμβρυϊκούς αδένες, το εμβρυϊκό ήπαρ και τον πλακούντα. Τα επίπεδά της αυξάνονται καθ 'όλη τη διάρκεια της κύησης. Σε συνδυασμό με τα επίπεδα ινχιπίνης A, β-hCG και AFP μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία τρισωμίας 21 στο κύημα.

## Επεμβατικές Τεχνικές Προγεννητικού Ελέγχου

Ο επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος διενεργείται με την εφαρμογή επεμβατικών τεχνικών με σκοπό τη λήψη δείγματος αμνιακού υγρού, χοριακών λαχνών ή εμβρυικού αίματος, με τη χρήση πολύ λεπτής βελόνας. Ο επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος εφαρμόζεται σε περιπτώσεις κυήσεων με αυξημένο κίνδυνο για χρωμοσωματικές ανωμαλίες, γενετικά σύνδρομα ή γονιδιακά νοσήματα όπως η μεσογειακή αναιμία και η κυστική ίνωση.

Η λήψη χοριακών λαχνών (CVS) πραγματοποιείται μεταξύ 10<sup>ης</sup> και 13<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης λόγω υπερηχογραφικών ευρημάτων, οικογενειακού ιστορικού ή/και προχωρημένης ηλικίας της μητέρας (άνω του 35ου έτους). Ο κίνδυνος αποβολής κατά την CVS, που οφείλεται στην διαδικασία της βιοψίας, υπολογιζόταν περίπου στο 1-2%. Το δείγμα ελέγχεται για χρωμοσωματικές ανωμαλίες μέσω της καρυοτυπικής ανάλυσης έπειτα από καλλιέργεια του δείγματος. Η ανάλυση των χρωμοσωμάτων μπορεί να γίνει με τον κλασσικό καρυότυπο (G-banding). Η πιθανότητα ψευδώς θετικού ή ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος της γενετικής ανάλυσης, υπόκειται σε περίπτωση αστοχίας λήψης κατάλληλου υλικού ή «επιμόλυνσής» του με κύτταρα της μητέρας ή στο φαινόμενο μωσαϊκισμού του πλακούντα, το οποίο αναφέρεται στην παρουσία μιας χρωμοσωμικής ανωμαλίας σε ένα μετρήσιμο ποσοστό πλακουντιακών κυττάρων που, όμως, δεν ανιχνεύεται στο έμβρυο. Η συχνότητα εμφάνισής του κατά την εφαρμογή της μεθόδου υπολογίζεται σε 1-2% των κυήσεων στο πρώτο τρίμηνο (Robinson et al, 1997; Redaelli et al, 2005; Goodfellow et al, 2011; Nagamatsu et al, 2014).

Η αμνιοπαρακέντηση πραγματοποιείται μεταξύ 15<sup>ης</sup> και 18<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης όπου το αμνιακό υγρό λαμβάνεται διακοιλιακά και τα εμβρυϊκά κύτταρα συλλέγονται εύκολα με απλή φυγοκέντρηση. Ο καρυότυπος αποτελεί την μεθοδολογία αναφοράς για την ανίχνευση χρωμοσωματικών ανωμαλιών για πάνω από 30 χρόνια (Los et al., 2001; Boormans et al., 2008). Τα κύτταρα του αμνιακού υγρού αποτελούν ικανοποιητική πηγή εμβρυϊκού DNA στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται στην προγεννητική διάγνωση μεθοδολογίες που

βασίζονται στην PCR. Η ποσότητα του DNA όμως είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή που απομονώνεται από τις χοριακές λάχνες. Σημαντικό είναι ότι ο κίνδυνος επιμόλυνσης του εμβρυϊκού DNA από μητρικό είναι σχετικά μεγάλος, όταν δεν προηγείται καλλιέργεια των εμβρυϊκών κυττάρων. Το DNA που απομονώνεται 10-14 ημέρες μετά από καλλιέργεια των αμνιακών κυττάρων είναι περισσότερο και περιορίζει τον κίνδυνο της μητρικής επιμόλυνσης. Για το λόγο αυτό εφαρμόζονται εναλλακτικές τεχνικές που προφέρουν αποτελέσματα σε συντομότερο χρόνο, όπως η ποσοτική φθορίζουσα PCR (quantitative fluorescent polymerase chain reaction, QF-PCR) και η MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) (Choy et al., 2014).

Η λήψη σε όλες τις περιπτώσεις κατευθύνεται υπερηχογραφικά ώστε να γίνει με ασφάλεια χωρίς να επηρεαστεί η περαιτέρω ανάπτυξη του εμβρύου. Οι ανωτέρω διαδικασίες θεωρούνται παρεμβατικές, πραγματοποιούνται σε εξειδικευμένα κέντρα από έμπειρους γυναικολόγους, αλλά παρ' όλα αυτά ενέχουν έναν μικρό αλλά υπαρκτό κίνδυνο ~1-2% αποβολής του κυοφορούμενου εμβρύου.

## **Μη Επεμβατική Προγεννητική Διάγνωση (NIPD)**

Η προγεννητική διάγνωση σε εμβρυϊκό ιστό περιλαμβάνει επεμβατικές τεχνικές για τη λήψη του ιστού και ενέχει τον μικρό αλλά υπαρκτό κίνδυνο αποβολής ενώ επιπλέον, κατά γενική ομολογία, προκαλεί σωματική και ψυχολογική δυσφορία στην έγκυο. Αυτός είναι και ο λόγος που συστηματικά αναζητήθηκαν από την επιστημονική κοινότητα εναλλακτικές πηγές εμβρυϊκού DNA, που μπορούν να ληφθούν δυνητικά από όλες τις εγκύους εύκολα και ανώδυνα σε οποιοδήποτε στάδιο της εγκυμοσύνης και χωρίς να επηρεάσουν το κύημα.

## **Κυκλοφορούντα εμβρυϊκά κυττάρα στο περιφερικό αίμα της εγκύου**

Ήδη από τη δεκαετία του '50, είχε αποδειχτεί ότι εμβρυϊκά κύτταρα περνούν στο περιφερικό αίμα της εγκύου. Από το 1997 είναι γνωστή η ύπαρξη αλληλουχιών DNA

εμβρυϊκής προέλευσης στο πλάσμα και στον ορό εγκύων. Οι διαπιστώσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια και από πολλές άλλες επιστημονικές ομάδες και άνοιξαν τον δρόμο για την ανάπτυξη της μη επεμβατικής Προγεννητικής Διάγνωσης (Non Invasive Prenatal Diagnosis-NIPD). Για πολλά χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών επικεντρώθηκε στην απομόνωση των εμβρυϊκών κυττάρων: τροφοβλαστικών, λεμφοκυττάρων και ερυθροβλαστών με τη λογική ότι το κάθε ένα περιέχει ολόκληρο το γονιδίωμα του εμβρύου. Τα εμβρυϊκά λεμφοκύτταρα κυκλοφορούν σχεδόν από την 15η εβδομάδα κύησης στην μητρική κυκλοφορία, όμως έχουν την ικανότητα να παραμένουν για χρόνια μετά τον τοκετό και συνεπώς υπάρχει μεγάλος κίνδυνος λήψης κυττάρων από προηγούμενη εγκυμοσύνη (Schroder et al 1974, Ciaranfi et al, 1977, Bianchi et al., 1996). Απομονώνοντας τα κύτταρα και αναπτύσσοντας ευαίσθητες μεθόδους γενετικής διάγνωσης, η NIPD γίνεται εφικτός στόχος. Παρ' όλα αυτά, ο αριθμός των εμβρυϊκών κυττάρων είναι περιορισμένος (1:105 - 1:109 μητρικά κύτταρα) και η απομόνωσή τους δύσκολη, χρονοβόρα και ακριβή. Η απομόνωση βασίστηκε στη χρήση αντισωμάτων έναντι μεμβρανικών αντιγόνων ενώ δοκιμάστηκε και η αποκόλληση των κυττάρων από αντικειμενοφόρες πλάκες με laser με βάση τη μορφολογία τους. Η έλλειψη ειδικών αντισωμάτων, η πολυπλοκότητα της διαδικασίας απομόνωσης, το κακής ποιότητας γενετικό υλικό στα κύτταρα αυτά (αποπτωτικά), σε συνδυασμό με το αυξημένο κόστος οδήγησε σχεδόν στην εγκατάλειψη της προσπάθειας και το ενδιαφέρον εστιάστηκε στο ελεύθερο εξωκυτταρικό εμβρυϊκό DNA (cell free fetal DNA- cffDNA) στη μητρική κυκλοφορία (Bertero et al., 1988).

### **Ελεύθερο εμβρυϊκό εξωκυτταρικό DNA στο περιφερικό αίμα της εγκύου (cffDNA)**

Το 1997, ο Dennis Lo και οι συνεργάτες του, εντόπισαν την παρουσία του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο πλάσμα και στον ορό της μητέρας εφαρμόζοντας την τεχνική της PCR για αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος σε δείγματα εγκύων (Lo et al, 1997) ενώ σε επόμενη μελέτη το 1998 παρατήρησαν ότι τα επίπεδα του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA είναι πολύ

χαμηλά στην αρχή της εγκυμοσύνης και αυξάνονται δραματικά καθώς αυτή εξελίσσεται (Lo et al, 1998). Το cfDNA στη μητρική κυκλοφορία προέρχεται από την απόπτωση και νέκρωση των συγκυτιοτροφοβλαστικών κυττάρων του πλακούντα. Αυτό αποδεικνύεται από την παρουσία επιγενετικών τροποποιήσεων στο DNA του πλάσματος της εγκύου, οι οποίες είναι συμβατές με αυτές που παρουσιάζει ο πλακούντας καθώς και από την ανίχνευση του cfDNA στη μητρική κυκλοφορία κατά τη δημιουργία του πλακούντα και πριν τη διαμόρφωση του εμβρυϊκού κυκλοφοριακού συστήματος. Το cfDNA είναι ανιχνεύσιμο από τη 18η μέρα μετά την εμφύτευση του εμβρύου, αποικοδομείται ταχύτατα στο περιφερικό αίμα με χρόνο ημιζώης 16.3 min και αποτελείται, σε ποσοστό 80%, από θραύσματα μεγέθους μικρότερου από 200 bp (Yu et al, 2014). Το cfDNA συνυπάρχει στο πλάσμα με το ελεύθερο DNA της εγκύου (cell free DNA – cfDNA) που φυσιολογικά υπάρχει σαν αποτέλεσμα της ομοιόστασης σε κάθε άτομο. Το εμβρυϊκό κλάσμα (FF) έχει θετική συσχέτιση με την ηλικία κύησης (αυξάνεται όσο αυξάνονται οι εβδομάδες) και αρνητική με το μητρικό βάρος (όσο αυξημένος είναι ο δείκτης μάζας σώματος, τόσο μειώνεται το εμβρυϊκό κλάσμα) (Poop et al, 2013). Το FF αναφέρεται και υπολογίζεται με real-time qPCR (ποσοτικοποιημένη PCR σε πραγματικό χρόνο) (Zimmermann et al, 2005). Ένα ποσοστό περίπου στο 8% είναι ικανοποιητικό για τις περισσότερες μεθόδους NIPT με βάση το cfDNA, ενώ μεταξύ 4-8% θεωρείται οριακό και η ευαισθησία μειώνεται (Norton et al, 2012). Ποσοστό μικρότερο από 4% είναι υπεύθυνο για το 0,5%-3% των «no calls», δηλαδή των απαντήσεων χωρίς θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα (Norwitz & Levy, 2013; Livergood et al, 2017). Η τροφοδότηση μέσω του πλακούντα είναι συνεχής καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης, αποτελεί το 3-6% του ολικού cfDNA στο 1ο τρίμηνο της κύησης και μπορεί να φθάσει στο  $\approx$ 10% κατά τη 10η εβδομάδα της κύησης. Φαίνεται ότι φυσιολογικά αυξάνεται καθώς εξελίσσεται η εγκυμοσύνη. Μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης του cfDNA έχει παρατηρηθεί επίσης σε κύσεις με έμβρυα που φέρουν χρωμοσωματικές ανωμαλίες, καθώς και σε επιπλοκές στην κύηση, όπως η προεκλαμψία.

## Η δυσκολία στη γενετική διάγνωση των μονογονιδιακών νοσημάτων και η εργαστηριακή προσέγγιση

Το γεγονός ότι στο πλάσμα της εγκύου, το εμβρυϊκό DNA συνυπάρχει με το μητρικό και αποτελεί έως το 10% του συνολικού cfDNA, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι είναι κατακερματισμένο, και ότι το ήμισυ των εμβρυϊκών αλληλομόρφων έχουν μεταβιβαστεί από τη μητέρα άρα κατά το ήμισυ όμοιο με το μητρικό, καθιστά τη γενετική διάγνωση του εμβρυϊκού γονότυπου ένα εξαιρετικά δύσκολο εγχείρημα γι' αυτό και αποτελεί, τεχνικά, μεγάλη πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα.

## Αρχική στρατηγική στην NIPD

### A. Στόχευση σε έναν γενετικό τύπο

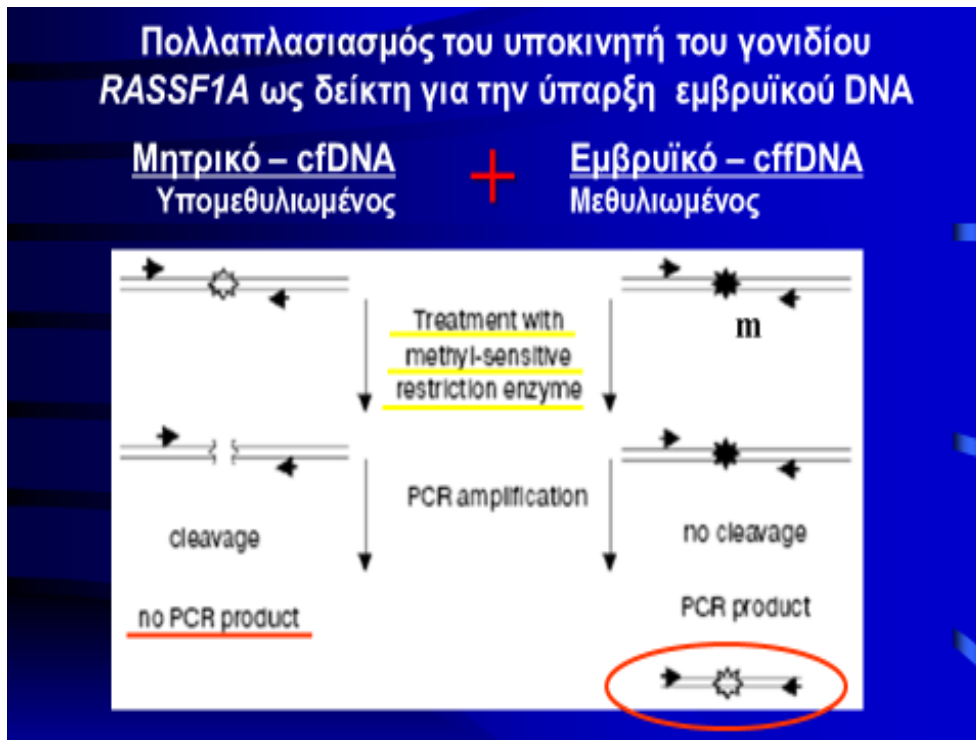
Σε πρώτη φάση και για αρκετά χρόνια αναζητήθηκαν, βελτιστοποιήθηκαν και εφαρμόστηκαν μεθοδολογίες με στόχο τον εντοπισμό-διαφοροποίηση του εμβρυϊκού DNA παρουσία του μητρικού. Αυτό γινόταν στοχεύοντας αλληλουχίες/αλληλόμορφα που έχουν κληρονομηθεί από τον πατέρα και απουσιάζουν ή διαφοροποιούνται στη μητέρα όπως εντοπισμός: **α)** αλληλουχιών σε φυλετικά γονίδια στο χρωμόσωμα Y ή εξωνίων του γονιδίου RhesusD σε Rhesus αρνητικές εγκύους αλλά και **β)** νουκλεοτιδικών παραλλαγών.

Όλες οι μεθοδολογίες βασίζονταν στην PCR μέσω της οποίας ενισχύονταν ένας ή δύο γενετικοί τύποι. Επιλέγονταν μέθοδοι με **α)** μεγάλη ευαισθησία οι οποίες βελτιστοποιούνταν ώστε να μπορούν να ενισχύσουν τις αλληλουχίες-στόχο σε επίπεδο ενός αντιγράφου DNA και **β)** μεγάλη ειδικότητα ώστε να πολλαπλασιάζουν μόνο τις εμβρυϊκές αλληλουχίες παρουσία των μητρικών. Το βασικό πρόβλημα κατά την εφαρμογή αυτής της προσέγγισης στην NIPD ήταν η αξιολόγηση του αρνητικού αποτελέσματος. Η απουσία προϊόντος από την PCR δεν ήταν δυνατό να εξασφαλίσει για παράδειγμα την ύπαρξη ενός RHD αρνητικού

εμβρύου ή ενός θήλεος εμβρύου ή την απουσία της εμβρυϊκής μετάλλαξης με πατρική προέλευση, αφού πολύ απλά θα μπορούσε να μην είχε δουλέψει η ίδια η αντίδραση της PCR (συνηθισμένο στην εργαστηριακή πράξη) ή η αναλογία του cffDNA να είναι χαμηλή ή να μην απομονώθηκε καν cffDNA λόγω αποτυχίας της ίδιας της διαδικασίας απομόνωσης. Για τον λόγο αυτό διάφορες ερευνητικές ομάδες αναγκάστηκαν στην πορεία να επεκτείνουν τον έλεγχο εφαρμόζοντας στο cffDNA από την ίδια αρχική απομόνωση, ένα δεύτερο PCR για να πολλαπλασιάσουν κάποιους άλλους γενετικούς τόπους όπως:

- i. αλληλουχίες στο χρωμόσωμα Y,
- ii. πολυμορφισμούς ενθέσεων/ελλειμμάτων σε διαφορετικά χρωμοσώματα (Bi-Allelic Insertion/ Deletion Polymorphisms) και
- iii. αλληλουχιών με διαφορετικό προφίλ μεθυλίωσης μεταξύ εμβρυϊκού και μητρικού DNA σε ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως SERPINB5, RASSF1A.

Ο πολλαπλασιασμός αλληλουχιών στο χρωμόσωμα Y ήταν ακατάλληλος στις περιπτώσεις που κυοφορούνταν θήλυ έμβρυο (50%). Στην περίπτωση των πολυμορφισμών διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό ετεροζυγωτίας ήταν χαμηλό και έπρεπε να ελεγχθούν πολλοί πολυμορφισμοί με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος για την ολοκλήρωση της NIPD αλλά και το κόστος (εφαρμόζονταν για τον κάθε ένα μια PCR πραγματικού χρόνου, RT-PCR). Αντίθετα ο έλεγχος των αλληλουχιών γονιδίων με διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης αποδείχτηκε μια πολύ καλή προσέγγιση για την επιβεβαίωση της ύπαρξης cffDNA αφού η ανάλυση τέτοιου είδους αλληλουχιών μπορεί να εφαρμοστεί για κάθε εγκυμοσύνη (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της αξιοποίησης αλληλουχιών του γονιδίου RASSF1A στην NIPD.

## **Β. Αξιοποίηση πληροφοριακών πατρικών νουκλεοτιδικών παραλλαγών σε γενετική σύνδεση με το υπεύθυνο γονίδιο για άμεση και έμμεση διάγνωση του εμβρυϊκού γονότυπου πατρικής προέλευσης**

Αρκετές επιστημονικές ομάδες ακολουθούν τη στρατηγική του ελέγχου του DNA των υποψήφιων γονέων στην περιοχή που εντοπίζεται το γονίδιο/υπεύθυνη μετάλλαξη πριν την NIPD, ώστε να εντοπιστούν πληροφοριακές πολυμορφικές πατρικές νουκλεοτιδικές παραλλαγές (Εικόνα 6). Αυτές οι αλλαγές στοχεύονται-αναζητούνται στη συνέχεια κατά την NIPD. Η πρόβλεψη του πατρικού γονότυπου του εμβρύου μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ανάλυσης γενετικής σύνδεσης (linkage analysis). Με αυτή την προσέγγιση μπορεί να επιβεβαιωθεί όχι μόνο η παρουσία του παθολογικού πατρικού αλληλόμορφου αλλά και η παρουσία του φυσιολογικού πατρικού και μάλιστα περισσότερες από μια φορές. Κατά συνέπεια, με αυτή την προσέγγιση μειώνεται η πιθανότητα μη αποτελέσματος, όπως εάν στοχεύαμε σε έναν μόνο γενετικό τόπο ή μια νουκλεοτιδική παραλλαγή, αφού εφόσον έχει απομονωθεί cffDNA, εάν δεν πάρουμε σήμα για μια παραλλαγή, θα πάρουμε από κάποια άλλη. Αυτό σημαίνει ότι αυξάνεται η αξιοπιστία της NIPD χωρίς να χρειάζεται να





Denaturation Temperature, COLD-PCR). Η COLD-PCR είναι ιδιαίτερα φθηνή μέθοδος, δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό παρά μόνο ένα απλό PCR και θα μπορούσε να εφαρμοστεί σαν πρώτο στάδιο στην NIPD, καθώς στη συνέχεια ο εντοπισμός των προϊόντων της PCR από τα πατρικά αλληλόμορφα θα μπορούσε να γίνει με πολλές άλλες μεθοδολογίες. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος δεν εφαρμόστηκε κλινικά. Κάποιοι έστρεψαν το ενδιαφέρον τους στη χρήση τροποποιημένων ολιγονουκλεοτιδίων (peptide Nucleic Acid, PNA), τα οποία υβριδοποιούνται επιλεκτικά στο μητρικό DNA (το μπλοκάρουν) καλύπτοντας την περιοχή του υπό εξέταση SNP και εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των μητρικών σε αντίθεση με τις πατρικής προέλευσης εμβρυϊκές αλληλουχίες, οι οποίες πολλαπλασιάζονται. Μια μεθοδολογία που επίσης προτάθηκε για τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό των εμβρυϊκών αλληλουχιών ήταν η πυροφωσφορόλυση. Αναπτύχθηκαν όμως και μεθοδολογίες, στις οποίες αξιοποιήθηκε εξειδικευμένος εξοπλισμός, όπως φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry-Time of Flight, MALDI-TOF) ή αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή (capillary electrophoresis-automatic sequencer). Η μέθοδος που επίσης χρησιμοποιήθηκε σε ευρεία κλίμακα και σχεδόν μονοπώλησε το ενδιαφέρον για αρκετά χρόνια ήταν η PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR, RT-PCR).

Συμπερασματικά, σε κάθε περίπτωση, είτε ο στόχος είναι ο εντοπισμός μιας γενετικής περιοχής είτε περισσότερων, εφαρμόζοντας στην NIPD την παραπάνω στρατηγική, μπορεί να προβλεφθεί ο γονότυπος του εμβρύου κατά το ήμισυ, δηλαδή μόνο ό,τι έχει κληρονομήσει το έμβρυο από τον πατέρα. Ο χαρακτηρισμός των αλληλόμορφων που μεταβιβάζονται από τη μητέρα αποτελούσε ένα απροσπέλαστο πρόβλημα. Ευνόητο είναι επίσης ότι δεν ήταν δυνατό να επιχειρηθεί NIPD για τις περιπτώσεις που η μητέρα έφερε ένα αυτοσωματικό επικρατητικό νόσημα.

## **Η σύγχρονη προσέγγιση στην NIPD**

Με την εξέλιξη των μεθόδων γενετικής διάγνωσης και την ανάπτυξη της τεχνολογίας, δόθηκε η δυνατότητα γενετικής διάγνωσης με το ψηφιακό PCR (Digital PCR, dPCR) αλλά και η δυνατότητα μαζικής παράλληλης αλληλούχισης του DNA με τη χρησιμοποίηση της σύγχρονης τεχνολογίας αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing-NGS). Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν όχι μόνο την ταυτοποίηση αλλά και την απόλυτη ποσοτικοποίηση των αλληλουχιών DNA μητρικής και εμβρυϊκής προέλευσης στο cfDNA που απομονώνεται από το πλάσμα της εγκύου. Το αποτέλεσμα είναι ότι με την εφαρμογή αυτών των τεχνολογιών σε συνδυασμό με επεξεργασία των αποτελεσμάτων με κατάλληλα προσαρμοσμένα στατιστικά μοντέλα, η πρόβλεψη του πλήρους εμβρυϊκού γονοτύπου αποτελεί πια έναν εφικτό στόχο. Πολλά εργαστήρια σήμερα δραστηριοποιούνται στην ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογιών για NIPD μονογονιδιακών νοσημάτων με την τεχνολογία του NGS και οι ενδείξεις είναι πολύ ενθαρρυντικές για να καταλήξει κανείς ότι η τεχνολογία αυτή αποτελεί το παρόν και το μέλλον στην NIPD.

## **Μεθοδολογίες Γενετικής Διάγνωσης στην NIPD- Παραδείγματα εφαρμογών**

Οι μεθοδολογίες που σχεδιάστηκαν και δοκιμάστηκαν στην NIPD είναι πάρα πολλές. Στη συνέχεια θα γίνει προσπάθεια να παρουσιαστούν κάποιες αντιπροσωπευτικές μεθοδοι-μεθοδολογικές προσεγγίσεις.

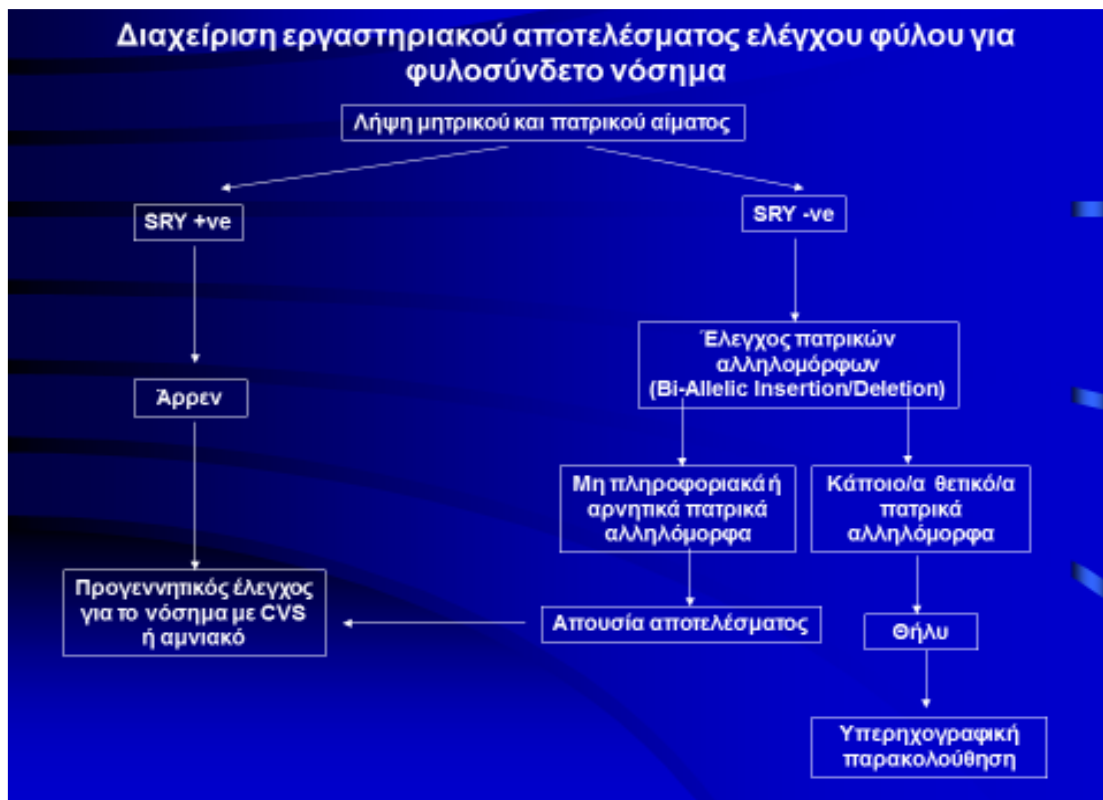
### **Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, RT-PCR)**

Πρόκειται για μια εφαρμογή της PCR κατά την οποία τα προϊόντα πολλαπλασιασμού σημαίνονται με χημικό τρόπο και εκπέμπουν φθορισμό ανάλογο της ποσότητας του προϊόντος. Ο φθορισμός των δειγμάτων παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια της PCR και καταγράφεται ανά κύκλο για κάθε δείγμα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης και με

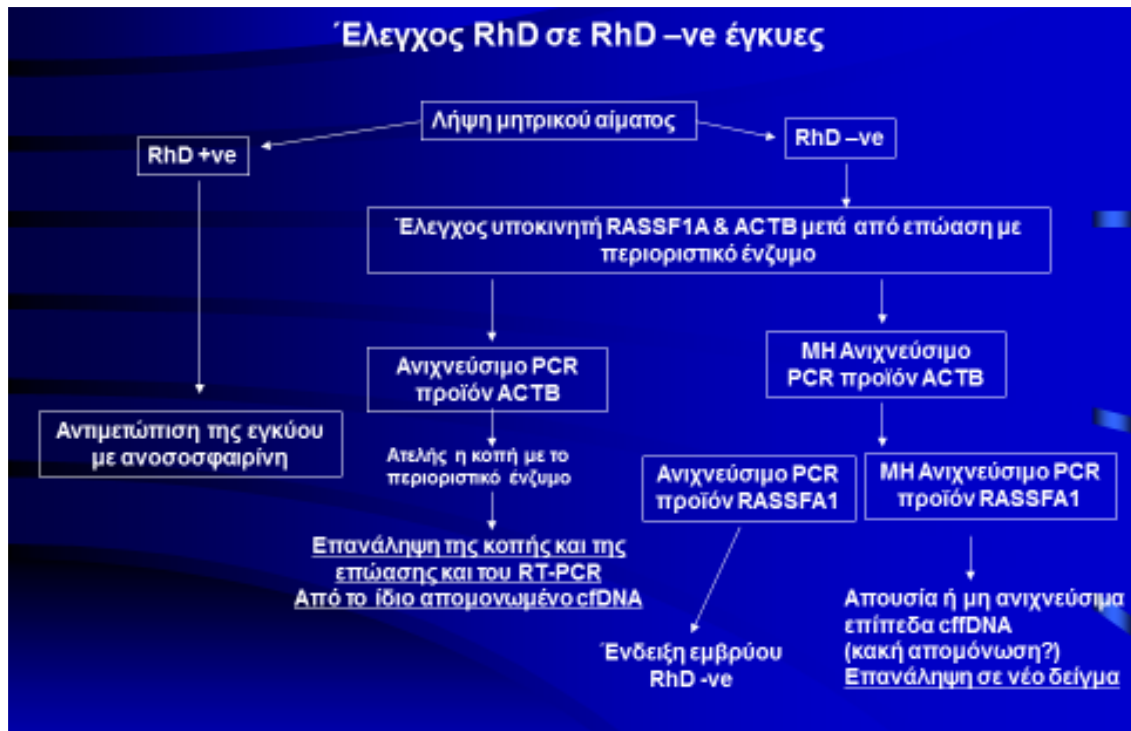
κατάλληλο λογισμικό γίνεται η επεξεργασία του σήματος του φθορισμού. Σύμφωνα με την αρχή του ποσοτικού PCR, ο κύκλος κατά τον οποίο ο φθορισμός από το προϊόν καθίσταται ανιχνεύσιμος ορίζεται ως «Threshold Cycle» ή CT (είναι ουσιαστικά ο κύκλος ένταξης στη εκθετική φάση της PCR) και εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του DNA που αναλύεται. Ο CT του κάθε δείγματος παραβάλλεται με το CT πρότυπων δειγμάτων γνωστής αρχικής συγκέντρωσης DNA, τα οποία πολλαπλασιάζονται ταυτόχρονα με τα υπό εξέταση δείγματα. Με βάση την αρχική συγκέντρωση και το CT των πρότυπων δειγμάτων, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη για να μπορεί να υπολογιστεί στη συνέχεια η αρχική συγκέντρωση του DNA των υπό εξέταση δειγμάτων. Τα προϊόντα της PCR μπορούν να ανιχνευτούν χρησιμοποιώντας μη ειδικούς ή ειδικούς φθορισμομετρικούς δείκτες. Στους μη ειδικούς δείκτες ανήκει το SYBR Green όπου ο φθορισμός αντιπροσωπεύει οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA έχει πολλαπλασιαστεί κατά την PCR, ενώ οι ειδικοί δείκτες είναι ολιγονουκλεοτίδια ανιχνευτές, όπως οι Taqmanprobes, Molecular beacon probes, Scorpions και Light Cycler FRET probes, οι οποίοι υβριδοποιούνται στην αλληλουχία του DNA στόχου και ο φθορισμός αντιστοιχεί στο ειδικό προϊόν που πολλαπλασιάζεται στην PCR(διαβάστε περισσότερα εδώ). Ανάλογα με τις δυνατότητες του συστήματος RT-PCR που είναι διαθέσιμο αλλά και τη σήμανση των ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών, μπορεί στην ίδια PCR να ελεγχθούν περισσότερες από μία γενετικές περιοχές ταυτόχρονα (multiplexRT-PCR).

Η ποσοτική RT-PCR είναι μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε από ένα πλήθος εργαστηρίων στην NIPD, κυρίως για τον προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου και τον καθορισμό του συστήματος RhD. Για την NIPD, το RT-PCR θα πρέπει να βελτιστοποιηθεί ώστε να μπορεί να πολλαπλασιάσει το DNA στόχο ακόμα και αν υπάρχει ένα αντίγραφο DNA της περιοχής. Για τον λόγο αυτό, το αραιό πρότυπο δείγμα της καμπύλης αναφοράς αντιστοιχεί σε 6,6pg DNA που είναι η ποσότητα DNA που περιέχει ένα ανθρώπινο κύτταρο (6,6pg DNA χαρακτηρίζονται ως 1 genome equivalent). Για τον προσδιορισμό του φύλου, πολλαπλασιάζονται αλληλουχίες στο γονίδιο SRY, στα πολλαπλά αντίγραφα DYS14 στο γονίδιο TSPY και στο γονίδιο Amelogenin. Για τον προσδιορισμό του γονιδίου RHD, πολλαπλασιάζονται τα εξώνια 5, 7 και 10 του γονιδίου μεμονωμένα ή σε multiplex RT-PCR

με εκκινητές κατάλληλα σχεδιασμένους, ώστε να διαφοροποιούνται οι αλληλουχίες του γονιδίου RHD από αυτές του RHCE και του ψευδογονιδίου RHDψ και του υβριδικού γονιδίου RHD-CE-Ds. Αν και η ευαισθησία της μεθόδου είναι μεγάλη, η αξιολόγηση του αρνητικού αποτελέσματος, όπως αναφέρθηκε, δημιουργεί διαγνωστικό πρόβλημα και απαιτεί επιπλέον δοκιμασίες για την επιβεβαίωση της ύπαρξης εμβρυϊκού DNA. Στην Εικόνα 7 και στην Εικόνα 8 παρατίθενται μεταφρασμένα δύο λογικά διαγράμματα που περιγράφουν τον τρόπο διαχείρισης του αρνητικού αποτελέσματος στον προσδιορισμό των εμβρυϊκών αλληλουχιών.



Εικόνα 7. Τρόπος διαχείρισης του αρνητικού εργαστηριακού αποτελέσματος για τον έλεγχο φύλου στην περίπτωση φυλοσύνδετου νοσήματος (Page-Christiaens GC et al., 2006).



Εικόνα 8. Τρόπος διαχείρισης του αρνητικού εργαστηριακού αποτελέσματος για τον έλεγχο γονιδίου RHD σε RhD αρνητική έγκυο (Chan KC et al., 2006).

## Πολλαπλή φθορίζουσα PCR (Multiplex fluorescent PCR)

Για τον προσδιορισμό του RhD του κυοφορούμενου εμβρύου καθώς και του φύλου, σχεδιάστηκαν στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών δύο πολύ απλά στην εφαρμογή τους πρωτόκολλα που βασίζονται στο πολλαπλό PCR. Τα πρωτόκολλα αυτά εφαρμόζονται ακόμα και σήμερα σε επίπεδο διάγνωσης καθώς προσφέρουν αξιόπιστη διάγνωση επιβεβαιώνοντας ταυτόχρονα την παρουσία ή την απουσία του cfDNA και εξασφαλίζοντας την αξιοπιστία του αρνητικού αποτελέσματος.

Στο πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό του RhD, πολλαπλασιάζονται ταυτόχρονα με πολλαπλό φθορίζον PCR:

- i. α) δύο αλληλουχίες του γονιδίου RHD και συγκεκριμένα των εξωνίων 7 και 10, που είναι ενδεικτικά για την ύπαρξη του γονιδίου στην περίπτωση που το έμβryo είναι RHD θετικό,
- ii. β) αλληλουχία του γονιδίου SRY, ενδεικτική στην περίπτωση αρρένων εμβryών,

- iii. γ) αλληλουχία του ογκοκατασταλτικού γονιδίου RASSF1A, το οποίο είναι μεθυλιωμένο στον πλακούντα (δεν εκφράζεται), ενώ στην έγκυο είναι μη μεθυλιωμένο (εκφράζεται),
- iv. δ) του γονιδίου της ακτίνης ACTB που είναι μη μεθυλιωμένο αφού εκφράζεται και στον πλακούντα και στην έγκυο.

Το ολικό cffDNA, που απομονώνεται από το πλάσμα της μητέρας, επωάζεται με περιοριστικό ένζυμο (methylated sensitive restriction enzyme) για να κοπούν όλες οι μη μεθυλιωμένες αλληλουχίες από τα γονίδια RASSF1A και ACTB (οι μητρικής προέλευσης αλληλουχίες από το γονίδιο RASSF1A και όλες οι αλληλουχίες από το γονίδιο ACTB), αφήνοντας ανέπαφες μόνο τις μεθυλιωμένες αλληλουχίες από το εμβρυϊκής προέλευσης RASSF1A. Τα προϊόντα κοπής από το περιοριστικό ένζυμο αποτελούν το υπόστρωμα για την πραγματοποίηση του πολλαπλού φθορίζοντος PCR. Τα προϊόντα από τον πολλαπλασιασμό της PCR ταυτοποιούνται στη συνέχεια με βάση το μέγεθός τους σε αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή (capillary electrophoresis-automatic sequencer).

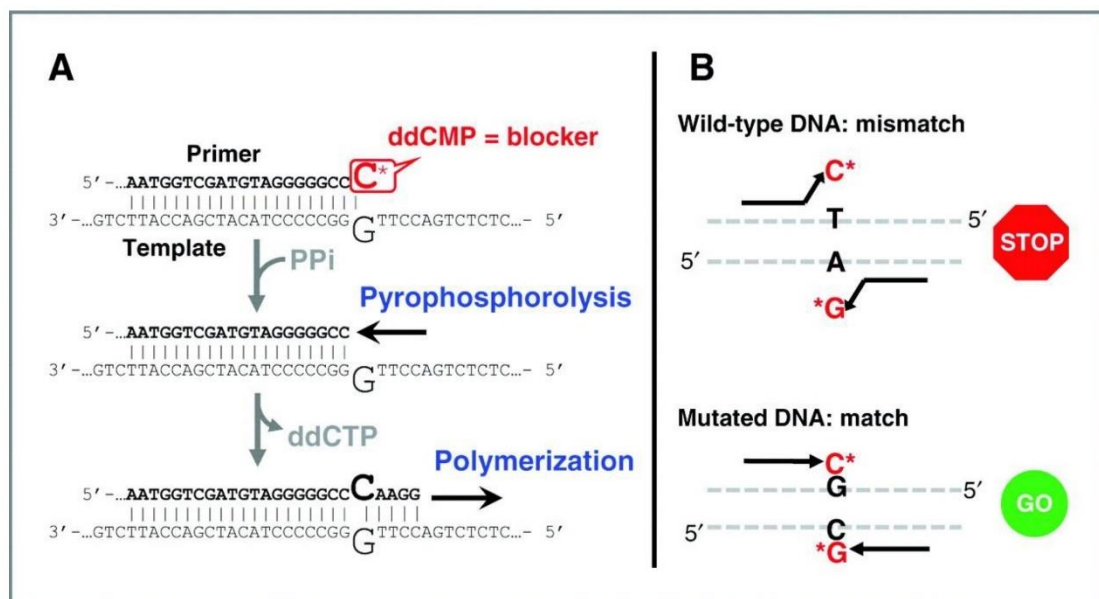
Το πρωτόκολλο βελτιστοποιήθηκε σε μεμονωμένα λεμφοκύτταρα, που σημαίνει ότι έχει ευαισθησία σε επίπεδο ενός αντιγράφου DNA. Στην περίπτωση που κυοφορείται έμβρυο αρνητικό για RHD, η αξιοπιστία της διάγνωσης εξασφαλίζεται από: την παρουσία προϊόντος PCR από το γονίδιο SRY (θετικό μόνο εάν το έμβρυο είναι αγόρι) και προϊόντος από το γονίδιο RASSF1A σε κάθε περίπτωση. Παρ' όλα αυτά, η μη αποτελεσματική κοπή των μη μεθυλιωμένων αλληλουχιών από το ένζυμο θα μπορούσε να είναι μια αιτία διαγνωστικού σφάλματος αφού θα έδινε ψευδή εικόνα για την ύπαρξη του cffDNA. Αυτός είναι και ο λόγος της ενσωμάτωσης στο PCR και πολλαπλασιασμού αλληλουχιών του ACTB, δηλαδή ο έλεγχος της κοπής των μη μεθυλιωμένων αλληλουχιών.

Στο πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου, πολλαπλασιάζονται ταυτόχρονα με πολλαπλό φθορίζον PCR α) δύο αλληλουχίες στο χρωμόσωμα Y και συγκεκριμένα στα DYS14 και στο γονίδιο SRY, που πολλαπλασιάζονται μόνο στην περίπτωση που κυοφορείται άρρεν έμβρυο β) αλληλουχία του ογκοκατασταλτικού γονιδίου RASSF1A για την επιβεβαίωση της παρουσίας cffDNA και τον έλεγχο της

αξιοπιστίας ενός αρνητικού αποτελέσματος για το φύλο και γ) του γονιδίου ACTB για τον έλεγχο της ολοκληρωτικής κοπής των μη μεθυλιωμένων αλληλουχιών από το μητρικής προέλευσης RASSF1A.

## PCR σε συνδυασμό με πυροφωσφορόλυση (Pyrophosphorolysis-Activated Polymerization)

Σύμφωνα με τη μέθοδο, σχεδιάζονται ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές PCR, τα οποία στο 3' άκρο τους έχουν ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο συμπληρωματικό με τη νουκλεοτιδική παραλλαγή που εξετάζεται. Το νουκλεοτίδιο αυτό παρουσία πυροφωσφορικού (PPi) υδρολύεται από την πολυμεράση μέσω αντίδρασης φωσφορόλυσης και αποδεσμεύεται μόνο εάν υπάρχει συμπληρωματικότητα με τη νουκλεοτιδική παραλλαγή που εξετάζεται. Τότε μόνο μπορεί να επεκταθεί ο εκκινητής και να δώσει προϊόν PCR στην αντίδραση που ακολουθεί. Εάν δεν υπάρχει συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο, τότε δεν παράγεται προϊόν στην PCR. Τα προϊόντα της αντίδρασης μπορούν να εκτιμηθούν σε απλό πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Η αρχή της πυροφωσφορόλυσης (Phylipsen et al., 2012)



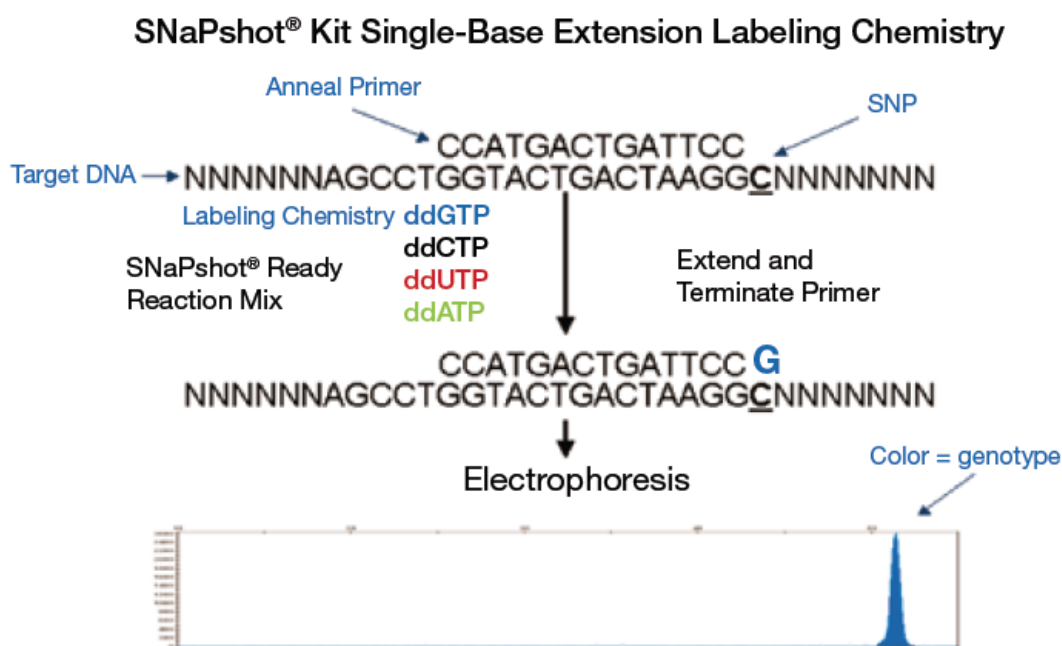
Η μέθοδος εφαρμόστηκε για NIPD για Μεσογειακή Αναιμία. Συγκεκριμένα, από ένα πάνελ 24αρων πολυμορφικών νουκλεοτιδικών παραλλαγών που βρίσκονταν σε γενετική σύνδεση με το γονίδιο HBB, επιλέγονταν τα πληροφοριακά πατρικά, αναλύοντας το γενομικό DNA των υποψηφίων γονέων. Στη συνέχεια, για κάθε πληροφοριακή πατρική νουκλεοτιδική παραλλαγή, εφαρμόζοταν το πρωτόκολλο της πυροφωσφορόλυσης σε συνδυασμό με PCR. Τέλος, τα προϊόντα της PCR ελέγχονταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η μέθοδος δεν είχε ευρεία εφαρμογή.

### **Αλληλοειδική επέκταση κατά μια βάση ολιγονουκλεοτιδίου εκκινητή και ταυτοποίηση των προϊόντων πολυμερισμού**

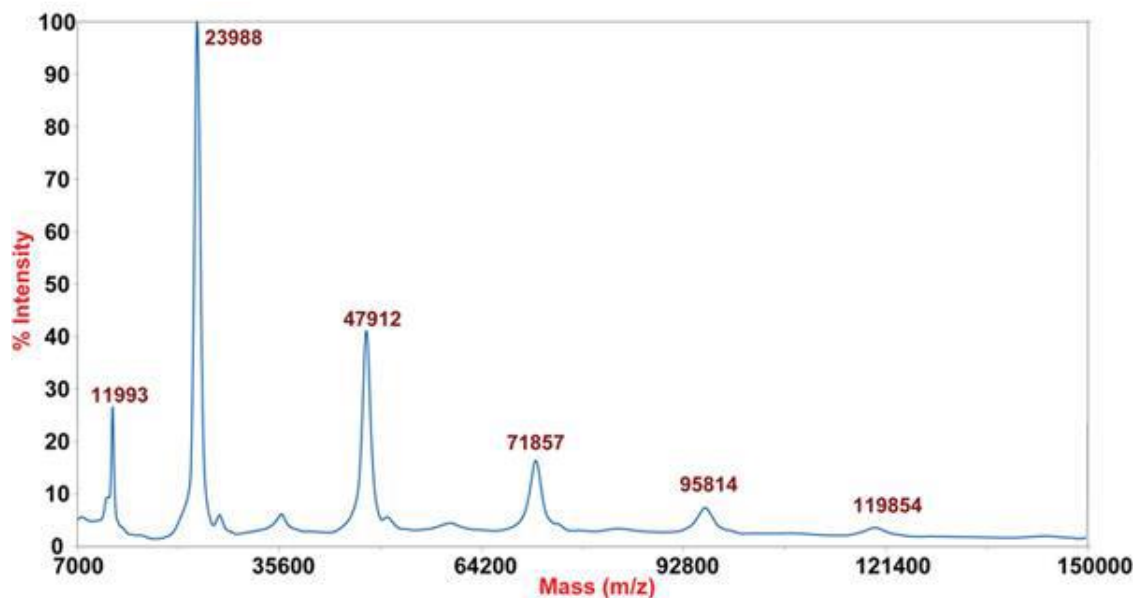
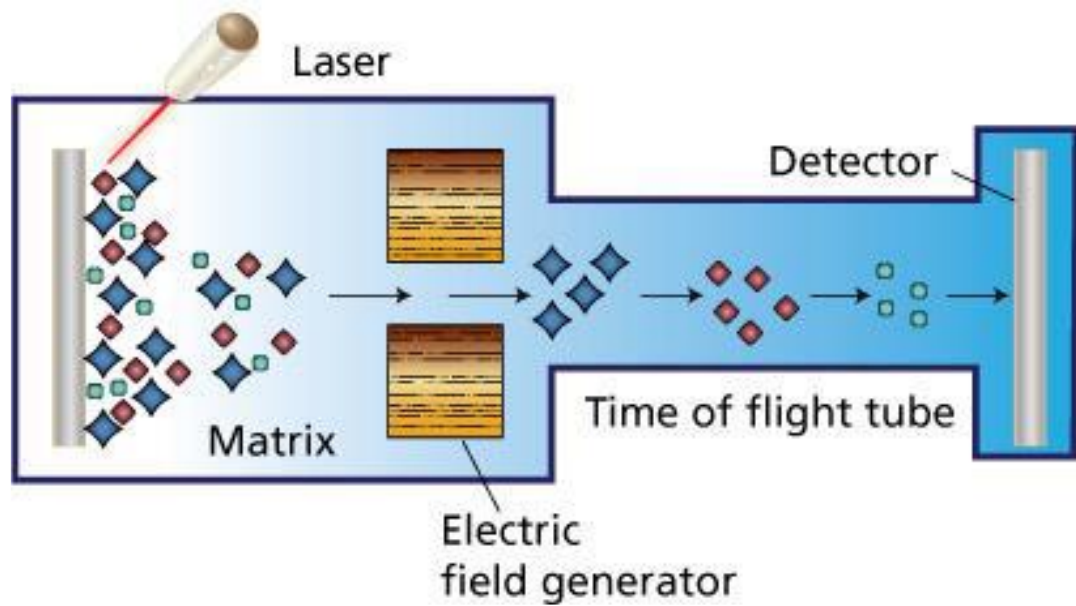
Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή, σχεδιάζονται ολιγονουκλεοτίδια «εκκινητές», των οποίων το 3' άκρο είναι συμπληρωματικό με την περιοχή της νουκλεοτιδικής παραλλαγής που ελέγχεται και φτάνει μια βάση πριν την αλλαγή. Μετά την υβριδοποίηση των εκκινητών στη θέση στόχο, γίνεται αντίδραση πολυμερισμού (επέκτασης) των ολιγονουκλεοτιδίων κατά μια βάση παρουσία πολυμεράσης και αποκλειστικά των τεσσάρων διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs). Με τη μέθοδο αυτή, μπορούν να ελεγχθούν ταυτόχρονα πολλές πληροφοριακές πατρικές νουκλεοτιδικές παραλλαγές, σχεδιάζοντας ολιγονουκλεοτίδια διαφορετικού μήκους και κατά συνέπεια Μοριακού Βάρους, ενσωματώνοντας στο 5' άκρο του καθενός μια νουκλεοτιδική ουρά διαφορετικού μεγέθους (Εικόνα 10). Τα προϊόντα της αντίδρασης επέκτασης των ολιγονουκλεοτιδίων ταυτοποιούνται στη συνέχεια με βάση τημάζα-μέγεθος.

Κάποιες ερευνητικές ομάδες εφάρμοσαν διαχωρισμό των ολιγονουκλεοτιδίων μετά την αντίδραση (Single allele base extension reaction assay-SABER) χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF mass spectrometry). Η προσέγγιση αυτή είναι απαιτητική εργαστηριακά διότι θα πρέπει να εξασφαλιστεί απόλυτα η καθαρότητα των προϊόντων επέκτασης για να γίνει η ταυτοποίηση. Επιπλέον, απαιτεί εξειδικευμένο και πολύ ακριβό εξοπλισμό, ο οποίος δεν είναι κοινός στα εργαστήρια γενετικής (Εικόνα 11).

Στην περίπτωση όπου κατά την αντίδραση επέκτασης χρησιμοποιηθούν ddNTPs σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική (SnaPshot Kit Single-Base Extension Labeling Chemistry) (Εικόνα 10), τα ολιγονουκλεοτίδια από την αντίδραση επέκτασης μπορούν να διαχωριστούν στη συνέχεια με βάση το μέγεθός τους και να ταυτοποιηθούν σύμφωνα με τον φθορισμό τους (fragment analysis) με ηλεκτροφόρηση σε αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή (capillary electrophoresis-automatic sequencer). Η μέθοδος αυτή είναι λιγότερο απαιτητική εργαστηριακά. Ωστόσο, απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό, ο οποίος όμως είναι διαθέσιμος σχεδόν σε όλα τα εργαστήρια που προσφέρουν σήμερα γενετική διάγνωση. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί στην NIPD για Κυστική Ίνωση.



Εικόνα 10. Η αρχή της αλληλοειδικής επέκτασης κατά μια βάση ολιγονουκλεοτιδίου εκκινητή (Mini Sequencing – SnaPshot PCR) χρησιμοποιώντας ddNTPs σημασμένα με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές. Τα ολιγονουκλεοτίδια ταυτοποιούνται με ηλεκτροφόρηση αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή (capillary electrophoresis-automatic sequencer).

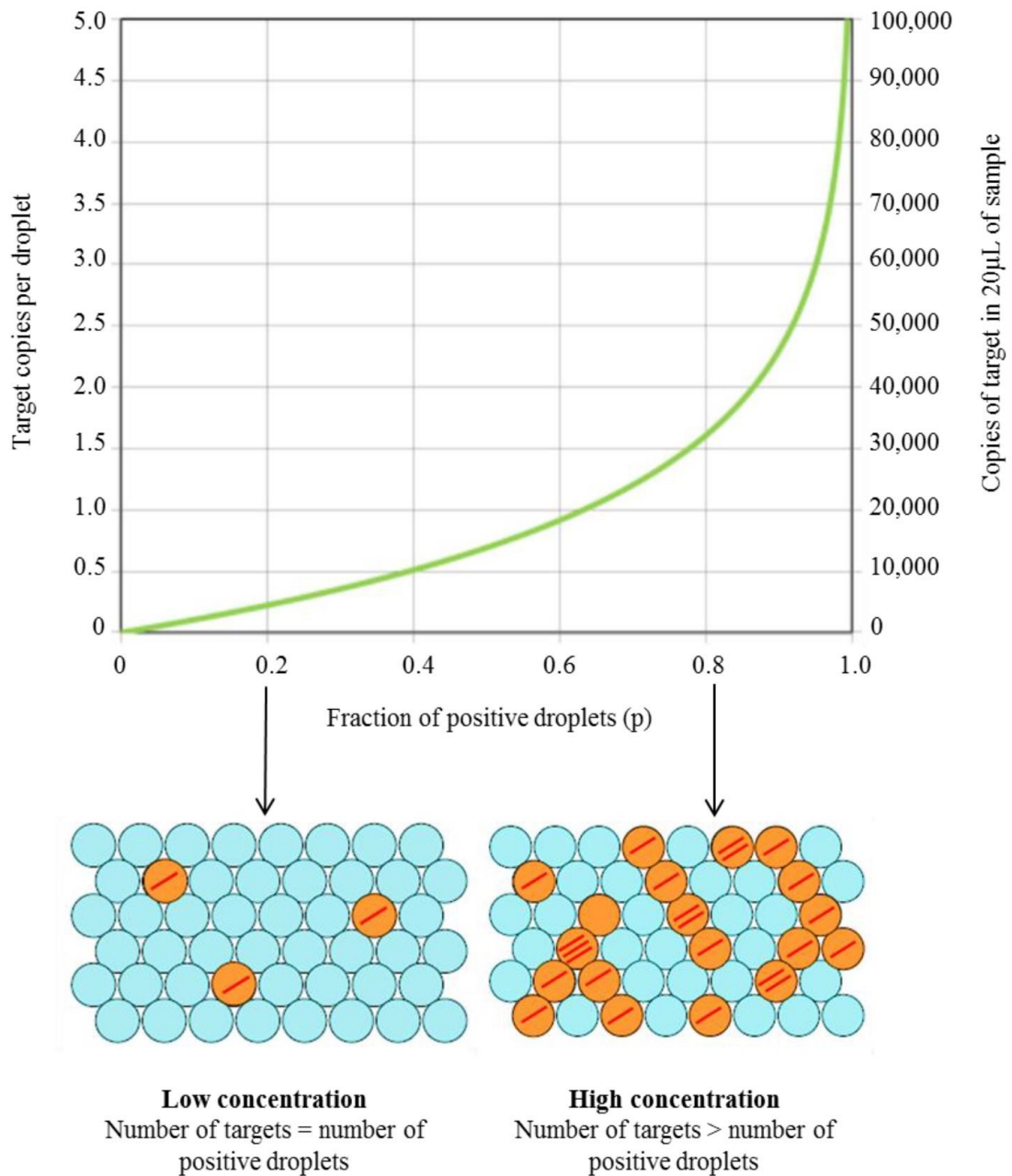


Εικόνα 11. Διαχωρισμός των προϊόντων αλληλοειδικής επέκτασης ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών κατά μια βάση (Single allele base extension reaction assay-SABER) χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF mass spectrometry). Ο διαχωρισμός βασίζεται μετρώντας τον συνολικό «χρόνο πτήσης» των ολιγονουκλεοτιδίων μετά την εξαέρωσή τους και την εξαναγκασμένη κίνησή τους σε ηλεκτρικό πεδίο.

## Ψηφιακή PCR (digitalPCR, dPCR)

Η dPCR αποτελεί μια εξελιγμένη μορφή RT-PCR που προσφέρει απόλυτη ποσοτικοποίηση χωρίς πρότυπα διαλύματα και κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Βασίζεται στη χωροθετική διασπορά των μορίων του DNA στόχου, ώστε η PCR να πραγματοποιείται

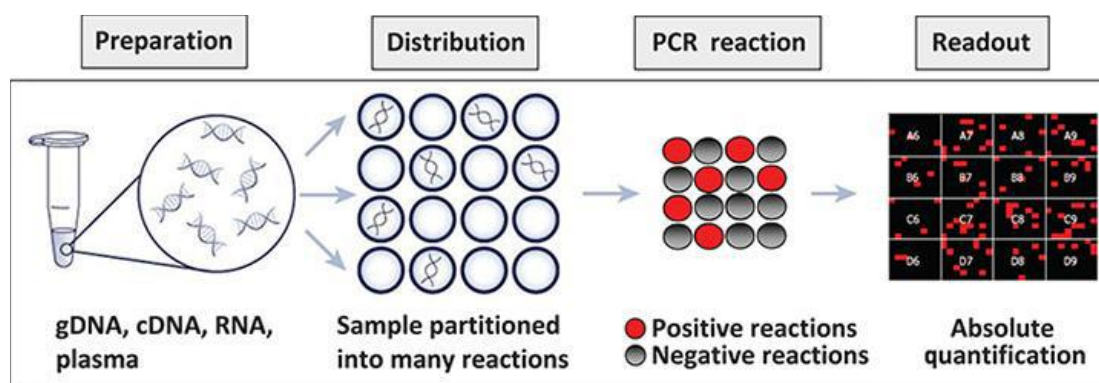
χωριστά κατά μέσο όρο σε ένα μόριο (1, 2 ή και κανένα νουκλεοτιδικό μόριο στόχο). Πραγματοποιείται με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών, παρόμοιων με αυτούς που χρησιμοποιούνται στην RT-PCR. Σε αντίθεση με το RT-PCR, η ανάπτυξη του φθορισμού ελέγχεται για κάθε μεμονωμένη αντίδραση (σταγονίδιο ή chamber), όχι κατά τη διάρκεια αλλά μετά την ολοκλήρωση της PCR, όταν δηλαδή έχει φτάσει στη φάση κορεσμού της PCR και όχι στην εκθετική φάση. Αυτός είναι και ο λόγος που χαρακτηρίζεται ως ποσοτικό PCR τελικού σημείου. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του υπό εξέταση δείγματος πραγματοποιείται με στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Poisson statistic analysis) (Εικόνα 12)



Εικόνα 12 Απόλυτη ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του υπό εξέταση δείγματος μέσω του αλγορίθμου Poisson. Για δείγματα που περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις μορίων-στόχων, ο αριθμός των στόχων είναι ίσος με τον αριθμό των θετικών σταγονιδίων, καθώς κάθε σταγονίδιο περιέχει ένα μόνο μόριο. Αντίθετα, για δείγματα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις μορίων-στόχων, ο αριθμός των παρόντων στόχων υπερβαίνει τον αριθμό των σταγονιδίων και έτσι ορισμένα σταγονίδια περιέχουν πολλαπλά (2 έως 3) μόρια-στόχους. Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση των αντιγράφων, ο αριθμός των θετικών σταγονιδίων ( $p$ ) υπολογίζεται με τον αλγόριθμο Poisson. (Κοο, 2014)

Ανάλογα με τον τρόπο και το μέσο διασποράς, το δείγμα διασπείρεται είτε σε μικροσυστοιχία διαμερισμάτων επιπέδου νανολίτρων μέσω πεπιεσμένου αέρα (π.χ. Το σύστημα BioMarkSystem της Fluidigm) που επιτρέπει ταυτόχρονα την ανάλυση έως και 39.960 αντιδράσεων) είτε σε χιλιάδες ή και εκατομμύρια μικροσταγονίδια υδατικής φάσης σε

«λάδι», οπότε μιλάμε για το «droplet digital PCR –ddPCR». Υπάρχουν διάφορα συστήματα τέτοιου τύπου PCR, όπως το σύστημα QX100TM της Bio-Rad, που επιτρέπει 20.000 αντιδράσεις, ή το σύστημα RainDropTM της Raindance Technology, USA, που επιτρέπει εντοπισμό 1 μεταλλαγμένου αντιγράφου DNA σε 200.000 πραγματοποιώντας 1.000.000 αντιδράσεις (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Η βασική αρχή του digital PCR. Το DNA υπόστρωμα διασπείρεται σε σταγονίδια (drops) ή κελιά (chambers), ώστε κάθε σταγονίδιο ή κελί να περιέχει κατά προτίμηση 1 αντίγραφο DNA. Η ανάπτυξη του φθορισμού μετράται ανά σταγόνα ή κελί και αντιπροσωπεύει τον απόλυτο αριθμό των αντιγράφων DNA στο υπό εξέταση δείγμα.

Το dPCR χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη μεθοδολογίας για NIPD, όπως στην περίπτωση της αιμορροφιλίας. Σημαντική ήταν η συμβολή του για την ανάπτυξη και εφαρμογή μαθηματικών μοντέλων με σκοπό την ποσοτικοποίηση του cfDNA στο ολικό cfDNA και την πρόβλεψη-διάγνωση του γονοτύπου του εμβρύου χρησιμοποιώντας δύο αλληλοειδικούς ανιχνευτές με διαφορετικό σήμα φθορισμού για το κάθε αλληλόμορφο.

Συμπερασματικά, για την ανάπτυξη μεθοδολογίας με dPCR χρειάζεται σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών και ανιχνευτών, όπως ακριβώς και στο RT-PCR απαιτείται περίπου ο ίδιος χρόνος και έχει παρόμοιο κόστος ανά αντίδραση. Το dPCR όμως έχει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία στον εντοπισμό νουκλεοτιδικών μορίων DNA που μειωθούν και είναι ιδανικό για τον καρκίνο ή την NIPD. Διαθέτει επίσης πολύ μεγάλη ειδικότητα, αφού ο πολλαπλασιασμός του cfDNA γίνεται χωρίς ανταγωνισμό από τις αλληλουχίες των μητρικών cfDNA. Αυτοί είναι και οι λόγοι που έχει μεγαλύτερη αξιοπιστία στην εκτίμηση

του αριθμού των εμβρυϊκών μορίων DNA που φέρουν τη μεταλλαγμένη ή τη φυσιολογική αλληλουχία. Δίνει επίσης τη δυνατότητα πρόβλεψης του γονότυπου του εμβρύου ακόμα και όταν φέρει τη μητρική μετάλλαξη (με στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων). Παρ' όλα αυτά, απαιτεί εξειδικευμένο και πολύ ακριβό εξοπλισμό.

## **Μαζική Παράλληλη Αλληλούχιση με τεχνολογία αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS)**

Η NGS αφορά μια τεχνολογία που μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος ή στοχεύει στην ανάλυση της αλληλουχίας μιας ομάδας γονιδίων που σχετίζονται με συγκεκριμένο φαινότυπο. Από το 2005 μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές τεχνολογίες και παρότι η τεχνολογία του κάθε συστήματος είναι διαφορετική, φαίνεται πως έχουν παρόμοια στάδια κατά τη διαδικασία τους. Τα βασικά βήματα για την εφαρμογή των περισσότερων μεθόδων NGS περιλαμβάνουν:

- i. Δημιουργία μιας βιβλιοθήκης θραυσμάτων DNA (DNA fragment library), που προκύπτουν είτε με τυχαίο κατακερματισμό του γενομικού DNA είτε με ενίσχυση με PCR επιλεγμένων τμημάτων DNA.
- ii. Σύνδεση στα άκρα καθενός θραύσματος με αντίδραση λιγάσης, ολιγονουκλεοτιδίων με συγκεκριμένη αλληλουχία προσαρμογέων «adapters» για να αλληλεπιδράσουν, ανάλογα με την πλατφόρμα, με τα «flowcells» ή τα «beads», ώστε να γίνει στη συνέχεια πολλαπλασιασμός όλων των τμημάτων ταυτόχρονα (clonal amplification).
- iii. Αλληλούχιση ανάλογα με τη χημεία του κάθε συστήματος.
- iv. Στοιχισμός της καθεμιάς αλληλουχίας με την αλληλουχία αναφοράς.
- v. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με προσαρμοσμένα στατιστικά πακέτα (Bioinformatics).
- vi. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της επεξεργασίας.

Η NGS επιτρέπει την αλληλούχιση (read) από εκατοντάδες χιλιάδες σε δεκάδες εκατομμύρια τμήματα DNAs σε κάθε εφαρμογή/δείγμα (Run). Το κάθε «read»

αντιπροσωπεύει την αλληλούχιση ενός μοναδικού μορίου DNA. Η κάθε αλληλουχία (μόριο DNA) της περιοχής που ελέγχεται, παραβάλλεται με την αλληλουχία αναφοράς και δίδονται η αλλαγή/γές προσδιορίζοντας ακριβώς και τον αριθμό των μορίων DNA που τις εμφανίζουν. Αυτό καθιστά την NGS ως την ιδανική μέθοδο στην περίπτωση της NIPD.

Στην περίπτωση των μονογονιδιακών νοσημάτων, ο έλεγχος πραγματοποιείται στοχεύοντας στις περιοχές και στα γονίδια που σχετίζονται με το νόσημα με σκοπό την μείωση του κόστους ανά δείγμα. Συγκεκριμένα, πολλαπλασιάζονται οι περιοχές που ενδιαφέρουν και στη συνέχεια γίνεται μαζική παράλληλη αλληλούχιση (Massive parallel sequencing) των περιοχών αυτών. Για τη διάγνωση υπάρχουν δύο προσεγγίσεις. Η πρώτη πραγματοποιείται μέσω γενετικά συνδεδεμένων πολυμορφικών νουκλεοτιδικών παραλλαγών (haplotype analysis) ενώ η δεύτερη με απευθείας αλληλούχιση και εντοπισμό των μεταλλάξεων του γονιδίου που ευθύνεται για το νόσημα που ενδιαφέρει.

Η διάγνωση του εμβρύου για μονογονιδιακά νοσήματα μέσω γενετικά συνδεδεμένων πολυμορφικών νουκλεοτιδικών παραλλαγών (haplotype analysis) γίνεται υπολογίζοντας αρχικά την αναλογία του cffDNA και στη συνέχεια τη σχετική δόση του εμβρυϊκού απλοτύπου (Relative Haplotype Dosage – RHDO) για μια σειρά παραλλαγών στην ευρύτερη γενομική περιοχή που μας ενδιαφέρει, όπου η μητέρα είναι ετεροζυγώτης. Γενικά, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των πληροφοριακών παραλλαγών που μπορούν να αναλυθούν στο cffDNA και όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του cffDNA τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να καθοριστεί ο γονότυπος του κυοφορούμενου εμβρύου.

Ο χαρακτηρισμός του γονοτύπου του εμβρύου με στοχευμένη αλληλούχιση του γονιδίου βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό των μορίων DNA που φέρουν τη μετάλλαξη και στον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του εμβρυϊκού αλληλόμορφου. Γενικά, η στοχευμένη αλληλούχιση με την τεχνολογία NGS, που εφαρμόζεται στην NIPD μονογονιδιακών νοσημάτων, παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία και προσαρμοστικότητα στις ανάγκες του νοσήματος/νοσημάτων αλλά και στον αριθμό των εξεταζόμενων δειγμάτων, αφού υπάρχει η δυνατότητα σχεδιασμού ομάδας τμημάτων DNA (panels) για τον ταυτόχρονο



έλεγχο πολλών μεταλλάξεων/γονιδίων αλλά και διαφορετικών δειγμάτων. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα πρωτόκολλα NIPD με NGS, όπως για: σκελετικές δυσπλασίες, σύνδρομο Frasier, Αυτοσωματική υπολειπόμενη πολυκυστική νόσο των νεφρών, νόσο Wilson, β Μεσογειακή Αναιμία, Κυστική Ίνωση.

Στη συνέχεια θα εξετάσουμε κάποιες από τις τεχνολογίες (πλατφόρμες) που χρησιμοποιούνται καθώς και την εξέλιξή τους, αναφέροντας τα πλεονεκτήματα αλλά και τα μειονεκτήματά τους.

### **Roche 454 FLX**

Το συγκεκριμένο σύστημα ήταν το πρώτο που χρησιμοποιήθηκε για εμπορική χρήση (2004). Η αρχή της συγκεκριμένης τεχνολογίας βασίζεται στην πυροανάλυση-pyrosequencing (αναφέρεται παραπάνω). Τα βήματα που ακολουθούνται μετά από την απομόνωση του DNA μέχρι το στάδιο της αλληλούχισης αναφέρονται παρακάτω. Αρχικά, γίνεται τυχαία κατάτμηση του DNA (μέγεθος τμημάτων 400-600 βάσεις). Στη συνέχεια, τα άκρα των θραυσμάτων γίνονται λεία (τυφλά) και προστίθενται αντάπτορες (A και B). Οι αντάπτορες είναι δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 44 βάσεων. Ξεκινώντας από το 5' άκρο προς το 3', οι αντάπτορες φέρουν μια αλληλουχία 20 νουκλεοτιδίων (εκκινητής) για τη διαδικασία της ενίσχυσης, μια αλληλουχία 20 νουκλεοτιδίων για τη διαδικασία της αλληλούχισης (εκκινητής) και μια μη παλινδρομική αλληλουχία 4 βάσεων (αναφέρεται ως «κλειδί»), η οποία περιέχει το κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο μια φορά. Η αλληλουχία «κλειδί» είναι απαραίτητη στο στάδιο κατά την αλληλούχιση (δείτε παρακάτω). Οι αντάπτορες A και B δε φέρουν την ίδια αλληλουχία και ο B φέρει επιπλέον στο 5' άκρο του μια θέση πρόσδεσης της στρεπταβιδίνης (τμήμα αλληλουχίας της βιοτίνης-biotin tag). Η προσθήκη των ανταπτόρων A και B οδηγεί στον σχηματισμό των παρακάτω συνδυασμών: **α)** θραύσματα DNA που φέρουν τους αντάπτορες A και B **β)** θραύσματα DNA που φέρουν μόνο τους αντάπτορες A εκατέρωθεν και **γ)** θραύσματα DNA που φέρουν μόνο τους αντάπτορες B εκατέρωθεν. Τα τμήματα DNA που περιέχουν τον βιοτινυλιωμένο αντάπτορα B θα

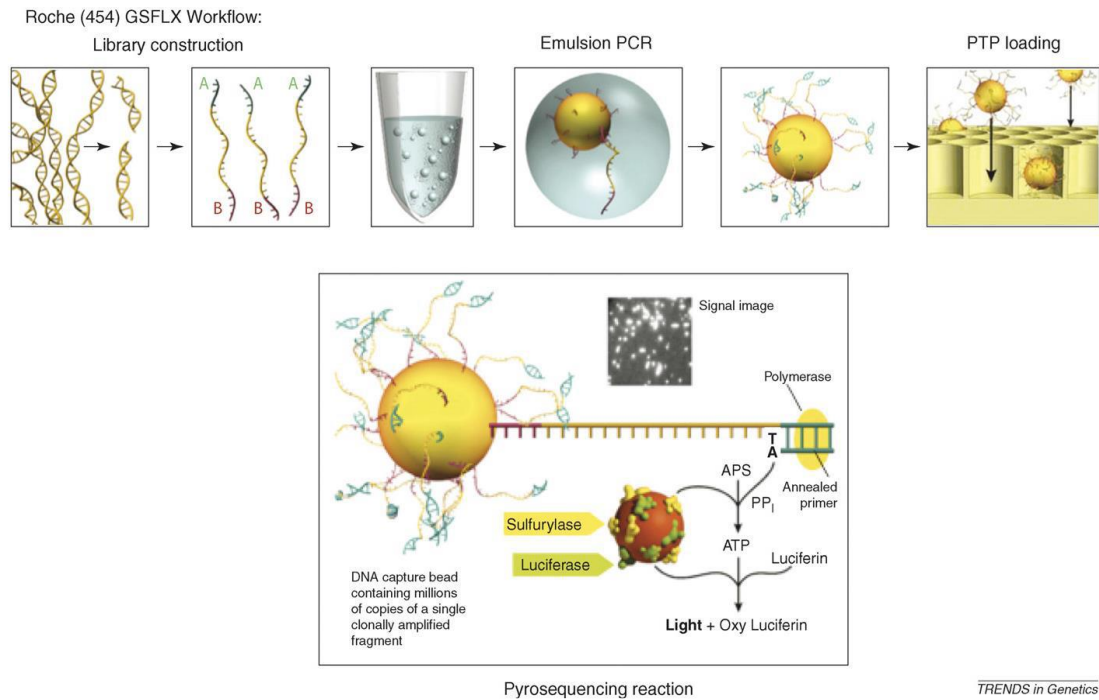
προσδεθούν στα σφαιρίδια που φέρουν τη στρεπταβιδίνη. Επομένως, τα τμήματα που φέρουν μόνο τους αντάπτορες A εκατέρωθεν, θα απομακρυνθούν με πλύσεις. Γίνεται αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των μονόκλωνων τμημάτων DNA που φέρουν τους αντάπτορες A και B (τα τμήματα DNA που φέρουν μόνο τους αντάπτορες B εκατέρωθεν παραμένουν προσδεμένα στα σφαιρίδια). Τα θραύσματα που απελευθερώθηκαν, συλλέγονται σε σφαιρίδια, τα οποία φέρουν τη συμπληρωματική αλληλουχία 20 βάσεων για τη διαδικασία της ενίσχυσης του αντάπτορα B. Η σύνδεση στα σφαιρίδια γίνεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύνδεση ενός μονόκλωνου μορίου με το σφαιρίδιο. Ακολουθεί η διαδικασία της ενίσχυσης των τμημάτων. Η ενίσχυση των τμημάτων πραγματοποιείται με μια τεχνική ενίσχυσης του DNA, γνωστή και ως emulsion PCR ή αλλιώς γαλακτωματοποίηση (e-PCR). Κατά την τεχνική αυτή, το κάθε σφαιρίδιο απομονώνεται σε ένα ξεχωριστό μικκύλιο νερού-λαδιού. Σε αυτό το σημείο, θα πρέπει να αναφέρουμε πως στα μικκύλια, πέρα από τα σφαιρίδια που φέρουν ένα μονόκλωνο DNA, θα υπάρχουν και σφαιρίδια στα οποία δε θα έχει προσδεθεί μονόκλωνο DNA. Μέσα στο κάθε μικκύλιο περιέχονται επίσης αντιδραστήρια PCR. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται μέσα στο κάθε μικκύλιο με αποτέλεσμα κάθε σφαιρίδιο να φέρει ~106 αντίγραφα δίκλωνων μορίων DNA στο τέλος της αντίδρασης. Με το τέλος της ενίσχυσης, απελευθερώνονται τα σφαιρίδια. Τα δίκλινα μόρια, τα οποία βρίσκονται πάνω στα σφαιρίδια, γίνονται μονόκλινα με την επώασή τους σε ειδικό διάλυμα. Όπως αναφέραμε παραπάνω, πέρα από τα σφαιρίδια στα οποία υπάρχουν τμήματα μονόκλωνου DNA στην επιφάνειά τους, υπάρχουν και σφαιρίδια στα οποία δεν είχε προσδεθεί μονόκλωνο DNA. Για την απομάκρυνση των συγκεκριμένων σφαιριδίων ακολουθείται ένα στάδιο εμπλουτισμού, κατά το οποίο συλλέγονται τα σφαιρίδια που φέρουν μια ικανή ποσότητα αντιγράφων για αλληλούχιση. Τα σφαιρίδια επωάζονται μαζί με την πολυμεράση καθώς και μια πρωτεΐνη πρόσδεσης μονόκλωνου DNA.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η διαδικασία της μαζικής αλληλούχισης. Η αλληλούχιση πραγματοποιείται με τη διαδικασία της πυροανάλυσης (αναφέρεται παραπάνω). Η αντίδραση της αλληλούχισης πραγματοποιείται σε ένα πλακάκι (slide) στο οποίο υπάρχουν ανοικτά

πηγάδια (PicoTiterPlate, PTP). Το κάθε πλακάκι κατασκευάζεται από το κόψιμο ενός κομματιού οπτικών ινών (παρασκευάζεται από την απομάκρυνση και σύντηξη οπτικών ινών). Η αντίδραση της αλληλούχησης πραγματοποιείται μέσα στο κάθε πηγάδι και η δέσμη φωτός (πρωτόνιο) που θα παραχθεί, ανιχνεύεται από τη βάση του κάθε πηγαδιού. Τα σφαιρίδια που φέρουν τα μονόκλωνα τμήματα του DNA (διάμετρος ~ 28 μm), καθώς και ένα μείγμα μικρότερων σφαιριδίων που φέρουν ακινητοποιημένα στην επιφάνειά τους τα ένζυμα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της δέσμης φωτός από το ελεύθερο πυροφωσφορικό (luciferase και sulfurylase), προστίθενται στα πηγαδάκια ταυτόχρονα με μια διαδικασία φυγοκέντρησης. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο, ώστε σε κάθε πηγαδάκι να αντιστοιχεί ένα σφαιρίδιο που φέρει τα μονόκλωνα τμήματα του DNA.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αλληλούχησης, η μια πλευρά του PTP θα δράσει ως μια κυψελίδα ροής (flow cell). Κάθε φορά, ποσότητα από συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο εισέρχεται στο πηγαδάκι. Ανάλογα με τον αν θα υπάρξει ή όχι σύνδεση του συγκεκριμένου νουκλεοτιδίου, θα υπάρξει και παραγωγή ή όχι φωτός. Η δέσμη φωτός αναγνωρίζεται από έναν ειδικό ανιχνευτή CCD (charge couple device-συσκευή συζευγμένου φορτίου). Στη συνέχεια γίνονται πλύσεις με προσθήκη απυράσης, έτσι ώστε να αποδιαταχθούν τα νουκλεοτίδια, τα οποία δεν έχουν ενσωματωθεί στην αλυσίδα. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία με την προσθήκη ενός άλλου νουκλεοτιδίου και η αντίδραση της πυροανάλυσης επαναλαμβάνεται.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφέρουμε πως στην αρχή της αντίδρασης εισέρχονται τα νουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στην αλληλουχία «κλειδί», που βρίσκεται στον αντίπαρο. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται, έτσι ώστε να γίνει μια προσαρμογή του σήματος που απελευθερώνεται από την πρόσδεση του κάθε νουκλεοτιδίου (calibration) και αναγνωρίζεται από το λογισμικό που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της κάθε βάσης. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η διαδικασία της μεθόδου ξεκινώντας από την κατασκευή της βιβλιοθήκης.



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της πλατφόρμας αλληλούχισης Roche 454 FLX. (Mardis ER., 2008)

Μειονέκτημα της μεθόδου παραμένει ο ακριβής προσδιορισμός των επαναλήψεων μιας βάσης σε περιοχές όπου επαναλαμβάνεται μια συγκεκριμένη βάση ή αλλιώς ομοπολυμερή (π.χ. επαναλήψεις της βάσης A). Βέβαια, λόγω της ειδικής κάθε φοράς διαδικασίας που χρειάζεται για την ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου, η συγκεκριμένη τεχνολογία εμφανίζει πολύ σπάνια λάθη στην αναγνώριση των βάσεων. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, η συγκεκριμένη τεχνολογία εμφανίζει έναν σημαντικό τύπο λαθών, ο οποίος είναι αποτέλεσμα της ένθεσης-έλλειψης (λόγω των ομοπολυμερικών περιοχών) παρά της λανθασμένης αντικατάστασης βάσεων και μετέπειτα ανάλυσης.

Το 2005, οπότε και κυκλοφόρησε το συγκεκριμένο μηχάνημα, είχε τη δυνατότητα ανάγνωσης μέχρι και 150 βάσεων με αντίγραφα ανάγνωσης (reads) μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, έως και λίγο παραπάνω από 200000. Τα δεδομένα από την κάθε αλληλούχιση έφταναν τα 20Mb. Το 2008, κυκλοφόρησε ένα νέο μηχάνημα, το 454 GS FLX Titanium, όπου το μέγεθος ανάγνωσης μπορούσε να φτάσει μέχρι και τις 700 βάσεις με ακρίβεια 99.9%. Τα δεδομένα από την κάθε αντίδραση έφταναν τα 0.7Gb και ο χρόνος για την

ολοκλήρωση της αντίδρασης ήταν μέσα σε 24 ώρες. Στα τέλη του 2009, η εταιρία Roche προχώρησε στον συνδυασμό 2 μηχανημάτων του GS Junior και του 454 συστήματος αλληλούχησης με σκοπό την απλούστευση του τρόπου παρασκευής της βιβλιοθήκης και της επεξεργασίας των δεδομένων. Τα δεδομένα από την κάθε αντίδραση φτάνουν τα 14Gb. Σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνολογίες παραμένει ο χρόνος που απαιτείται από την έναρξη της αντίδρασης μέχρι την ολοκλήρωσή της (10 ώρες) αλλά σημαντικό μειονέκτημά της παραμένει το υψηλό κόστος της ( $\$12.56 \times 10^{-6}$  ανά βάση-τιμή στην οποία συμπεριλαμβάνονται μόνο τα αντιδραστήριά της).

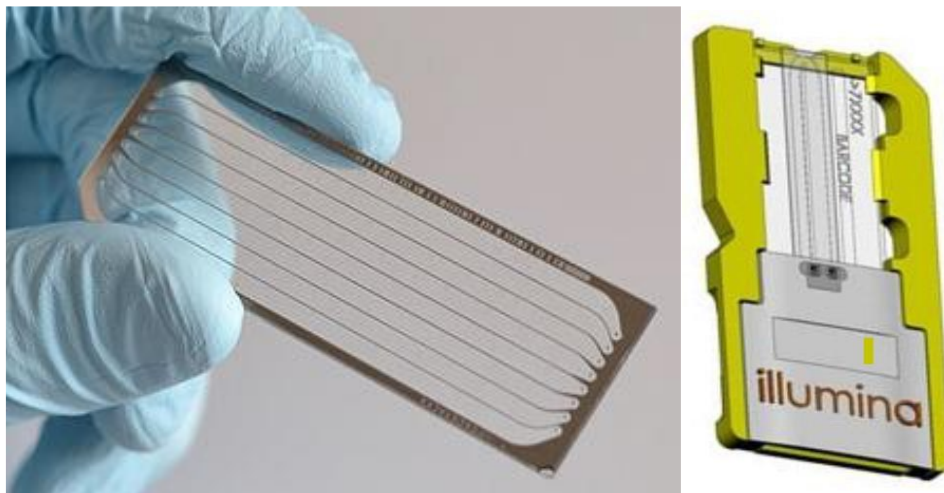
### **Illumina Genome Analyzer (GA)/Solexa**

Η αρχική εταιρία (Solexa) εμφάνισε το Genome Analyzer για πρώτη φορά το 2006. Έναν χρόνο αργότερα, η εταιρία εξαγοράστηκε από την Illumina. Η αρχή της συγκεκριμένης πλατφόρμας για την αντίδραση της αλληλούχησης στηρίζεται στην αλληλούχηση μέσω σύνθεσης (sequencing by synthesis). Όπως και στην προηγούμενη πλατφόρμα, μετά την απομόνωση του DNA ακολουθεί ο σχηματισμός της βιβλιοθήκης. Το DNA θραυσατοποιείται σε αρκετά τμήματα και στη συνέχεια τα άκρα γίνονται λεία (τυφλά άκρα). Τα τμήματα φωσφορυλιώνονται και στο 3' άκρο των θραυσμάτων DNA προστίθεται μια βάση A. Η προσθήκη της βάσης A χρειάζεται για την πρόσδεση των ανταπτόρων, καθώς οι αντάπτορες έχουν μια βάση T (συμπληρωματική στην A των θραυσμάτων) που προεξέχει στο 3' άκρο τους. Οι αντάπτορες (A και B) της συγκεκριμένης τεχνολογίας περιέχουν τις περιοχές πρόσδεσης P7 και P5 καθώς και αλληλουχίες συμπληρωματικές για την πρόσδεση των εκκινητών κατά τη διαδικασία της αλληλούχησης. Τα θραύσματα που περιλαμβάνουν τους αντάπτορες συλλέγονται με βάση το μέγεθός τους.

Η πρόσδεση των θραυσμάτων DNA δεν πραγματοποιείται σε σφαιρίδια αλλά σε μια σταθερή επιφάνεια, γνωστή και ως ρευστό θάλαμο (flow cell)(Εικόνα 15). Σκοπός είναι η πραγματοποίηση όλων των σταδίων μετά τη θραυσατοποίηση και την προσθήκη των ανταπτόρων στη συγκεκριμένη επιφάνεια. Η επιφάνεια αυτή είναι «καλυμμένη» με

συμπληρωματικές αλληλουχίες των περιοχών P7 και P5. Ο ρευστός θάλαμος αποτελείται από 8 κλειστά γυάλινα κανάλια (γνωστά και ως λωρίδες), στο καθένα από τα οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί διαφορετικό δείγμα. Ο ρευστός θάλαμος επιτρέπει στην επιφάνειά του την ενίσχυση των τμημάτων και συγκεκριμένα την «ενίσχυση μέσω γέφυρας», ενώ χρησιμοποιεί τη DNA πολυμεράση για την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων DNA ή ομάδας αντιγράφων (cluster). Σε κάθε κανάλι μπορεί να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές βιβλιοθήκες αλλά μια βιβλιοθήκη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και στα 8 κανάλια.

Η πρόσδεση των θραυσμάτων στον ρευστό θάλαμο δε μπορεί να πραγματοποιηθεί εφόσον τα μόρια είναι δίκλινα. Για τον λόγο αυτό, μετά την προσθήκη των ανταπτόρων, πραγματοποιείται ένα στάδιο αποδιάταξης, ώστε τα δίκλινα μόρια να γίνουν μονόκλινα. Στη συνέχεια, τα μονόκλινα μόρια DNA (μέσω του ενός άκρου τους) υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των περιοχών P7 ή P5 πάνω στον ρευστό θάλαμο.



Εικόνα 15. Απεικόνιση του ρευστού θαλάμου (flow cell) της Illumina.

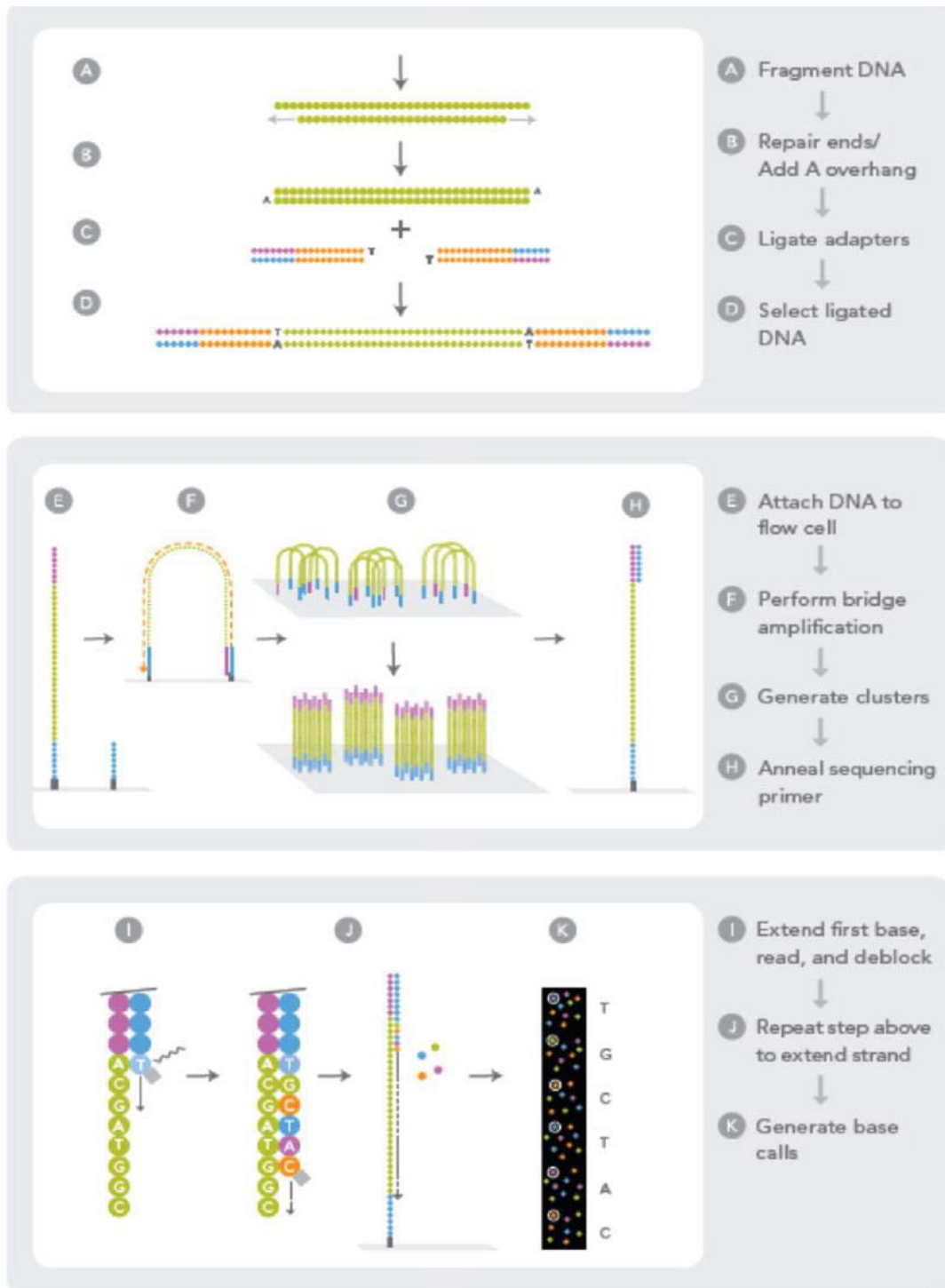
Μετά την πρόσδεση των μονόκλωνων DNA, ο υβριδισμός παρατείνεται με τέτοιο τρόπο ώστε το ελεύθερο άκρο του προσδεδεμένου μονόκλωνου DNA (μέσω της αλληλουχίας του ελεύθερου αντάπτορα) να προσδεθεί σε μια διπλανή συμπληρωματική αλληλουχία του. Με αυτόν τον τρόπο, σχηματίζεται μια δομή «γέφυρας». Με την προσθήκη πολυμεράσης και

νουκλεοτιδίων, το μόριο στη δομή γέφυρας γίνεται δίκλωνο από μονόκλωνο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το μονόκλωνο DNA δρα ως εκμαγείο και ο αντάπτορας ως εκκινητής για τη δημιουργία της συμπληρωματικής αλυσίδας. Ακολουθεί αποδιάταξη ώστε το δίκλωνο μόριο να γίνει μονόκλωνο. Το τμήμα DNA που έχει απελευθερωθεί, στη συνέχεια προσδένεται σε παραπλήσιο αντάπτορα και δημιουργεί με τη σειρά του μια δομή «γέφυρας». Στο τελικό στάδιο, τα συμπληρωματικά τμήματα DNA (σε σχέση με το αρχικό μονόκλωνο DNA) απελευθερώνονται αφήνοντας μόνο τα μονόκλινα τμήματα που είναι ίδια με το αρχικό. Δημιουργούνται ~1000 αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA (cluster). Σε αυτό το στάδιο, είναι σημαντικός ο αριθμός των αντιγράφων που έχουν δημιουργηθεί. Λίγα αντίγραφα θα μειώσουν την απόδοση της αλληλούχισης, ενώ πολλά αντίγραφα θα δημιουργήσουν υπερκάλυψη τμημάτων, κάτι το οποίο δρα αρνητικά στην ποιότητα των αποτελεσμάτων και μπορεί να οδηγήσει, σε σπάνιες περιπτώσεις, σε αποτυχία της αντίδρασης.

Το επόμενο στάδιο είναι η διαδικασία της αλληλούχισης, η οποία, όπως αναφέρθηκε, στηρίζεται στη διαδικασία της αλληλούχισης μέσω σύνθεσης (sequencing by synthesis). Η βασική ιδέα της συγκεκριμένης μεθόδου έγκειται στη δυνατότητα ταυτοποίησης παραλλαγών σε συγκεκριμένες θέσεις με τη χρήση του διαφορετικού υβριδισμού των σημασμένων νουκλεοτιδίων σε ένα πλακάκι όπου υπάρχουν ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές. Με βάση τα παραπάνω, η αντίδραση πραγματοποιείται ως εξής: ο εκκινητής (η αλληλουχία πρόσδεσης του βρίσκεται στον αντάπτορα) υβριδίζεται στο μονόκλωνο DNA, στη συνέχεια προστίθενται ταυτόχρονα και τα 4 νουκλεοτίδια και μια τροποποιημένη πολυμεράση. Το κάθε νουκλεοτίδιο έχει υποστεί τις παρακάτω τροποποιήσεις: **α)** είναι σημασμένο με έναν συγκεκριμένο φθορισμό και **β)** η ομάδα του  $-OH$  στο 3' άκρο του είναι χημικά αποκλεισμένη, έτσι ώστε σε έναν μόνο κύκλο να ενσωματώνεται ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Με τον τρόπο αυτό, είναι σίγουρο πως θα ενσωματωθεί μόνο ένα νουκλεοτίδιο, του οποίου η ταυτότητα θα αναγνωριστεί από τον φθορισμό του. Με την τοποθέτηση του σωστού νουκλεοτιδίου, το σήμα λαμβάνεται από έναν ειδικό ανιχνευτή CCD (charge couple device-συσσκευή συζευγμένου φορτίου). Στη συνέχεια, αφαιρείται με χημικό τρόπο η χημικά

αποκλεισμένη ομάδα του – OH και προχωράει ο επόμενος κύκλος με την είσοδο πολυμεράσης και νουκλεοτιδίων. Ο αριθμός των κύκλων καθορίζεται από τις ρυθμίσεις του μηχανήματος οδηγώντας στην ταυτοποίηση μιας αλληλουχίας ~35 βάσεων. Είναι δυνατή η ταυτοποίηση μεγαλύτερης αλληλουχίας αν και φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η αλληλουχία των βάσεων τόσο αυξάνεται και ο ρυθμός λαθών. Η ταυτοποίηση της αλληλουχίας και ουσιαστικά η ονομασία των βάσεων (base calling) γίνεται από ειδικό αλγόριθμο, ο οποίος αξιολογεί τα δεδομένα από το μηχάνημα και απομακρύνει αλληλουχίες χαμηλής ποιότητας. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η διαδικασία που ακολουθείται για την πλατφόρμα της Illumina.





Εικόνα 16. Απεικόνιση της μεθοδολογίας αλληλούχισης με την πλατφόρμα της Illumina. ( Ansorge WJ, 2009)

Σε αντίθεση με το 454 της Roche, το Solexa παρουσιάζει συνήθως λάθη κατά την αντικατάσταση βάσεων και όχι τόσο σε ενθέσεις ή ελλείμματα. Τα λάθη, τα οποία προκύπτουν κατά την ανάλυση των δεδομένων, είναι κατά μέσο όρο της τάξεως του 1- 1.5%.

Το ποσοστό αυτό πέφτει στο 0.1% ή και λιγότερο με μετρήσεις ποιότητας, οι οποίες σχετίζονται με την κάθε αναγνώριση της βάσης.

Στην αρχή, τα δεδομένα του μηχανήματος έφταναν το 1G/αντίδραση. Με διάφορες αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα στάδια της διαδικασίας, τα δεδομένα έφταναν τα 20G/αντίδραση στην αρχή του 2009 ενώ μέχρι το τέλος του 2009 έφταναν τα 50G/αντίδραση. Στις αρχές του 2010, η Illumina παρουσίασε ένα νέο μηχάνημα, το HiSeq 2000 (είχε την ίδια βασική αρχή με το GA), του οποίου τα δεδομένα έφταναν τα 200G/αντίδραση ενώ στη συνέχεια έφτανε έως τα 600G/αντίδραση (αντίδραση η οποία μπορούσε να έχει ολοκληρωθεί σε 8 ημέρες). Μέχρι στιγμής, από όλες τις πλατφόρμες που θα μελετήσουμε, το HiSeq 2000 παραμένει το πιο φτηνό μηχάνημα όσον αφορά την αντίδραση της αλληλούχισης, καθώς φτάνει τα \$0.02/εκατομμύριο βάσεων. Το 2011 κυκλοφόρησε στην αγορά το MiSeq. Είναι ένα μικρό σε μέγεθος μηχάνημα αλληλούχισης σχεδιασμένο για μικρά εργαστήρια και στοχεύει κυρίως σε κλινικές εφαρμογές, παρέχοντας δεδομένα μέσα σε 10 ώρες, συμπεριλαμβανομένου και του χρόνου προετοιμασίας του δείγματος και της βιβλιοθήκης. Η τεχνολογία του φέρει αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με το HiSeq 2000.

## **ABI SOLiD**

Η πλατφόρμα του SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) κυκλοφόρησε εμπορικά το 2008. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες πλατφόρμες, η τεχνολογία της δε στηρίζεται στην αλληλούχιση με τη χρήση μιας πολυμεράσης αλλά στην αλληλούχιση με τη χρήση μιας λιγάσης.

Η δημιουργία της βιβλιοθήκης στη συγκεκριμένη πλατφόρμα μπορεί να παρασκευαστεί με 2 τρόπους: **α)** τυχαία θραυσματοποίηση του DNA (60-110νουκλεοτίδια) ή **β)** δημιουργία «συζευγμένων τμημάτων» (mate-paired) (600-6kbp). Η πρώτη μέθοδος οδηγεί, όπως και στις προηγούμενες πλατφόρμες, στην κατάτμηση του DNA σε τυχαία τμήματα. Στη

συνέχεια, τα άκρα γίνονται λεία (τυφλά άκρα) και προστίθενται οι αντάπτορες P1 και P2. Όπως και στην προηγούμενη πλατφόρμα, επιλέγονται τα τμήματα με το κατάλληλο μέγεθος. Στην περίπτωση της δημιουργίας βιβλιοθήκης με «συζευγμένα τμήματα», ακολουθείται η τυχαία κατάτμηση του DNA αλλά αυτή τη φορά τα τμήματα είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος. Η επιλογή των τμημάτων πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση. Μετά, τα άκρα των τμημάτων γίνονται λεία (τυφλά άκρα), γίνεται μεθυλίωση των τμημάτων και προσθήκη ανταπτόρων (φέρουν τη θέση κοπής του ενζύμου EcoP15I). Οι αντάπτορες αυτοί συνδέουν τα 2 άκρα του DNA μέσω ενός βιτινυλιωμένου εσωτερικού αντάπτορα, κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα το τμήμα να γίνει κυκλικό. Το ένζυμο EcoP15I κόβει 25-27 νουκλεοτίδια από τις μη μεθυλιωμένες θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου (βρίσκονται στον CAP προσδέτη). Αποτέλεσμα της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι η ύπαρξη ενός γραμμικού μορίου, το οποίο φέρει στις άκρες τις αλληλουχίες που θα αλληλουχηθούν και στο κέντρο έναν αντάπτορα. Στη συνέχεια, προστίθενται οι αντάπτορες στα άκρα της βιβλιοθήκης για να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της ενίσχυσης.

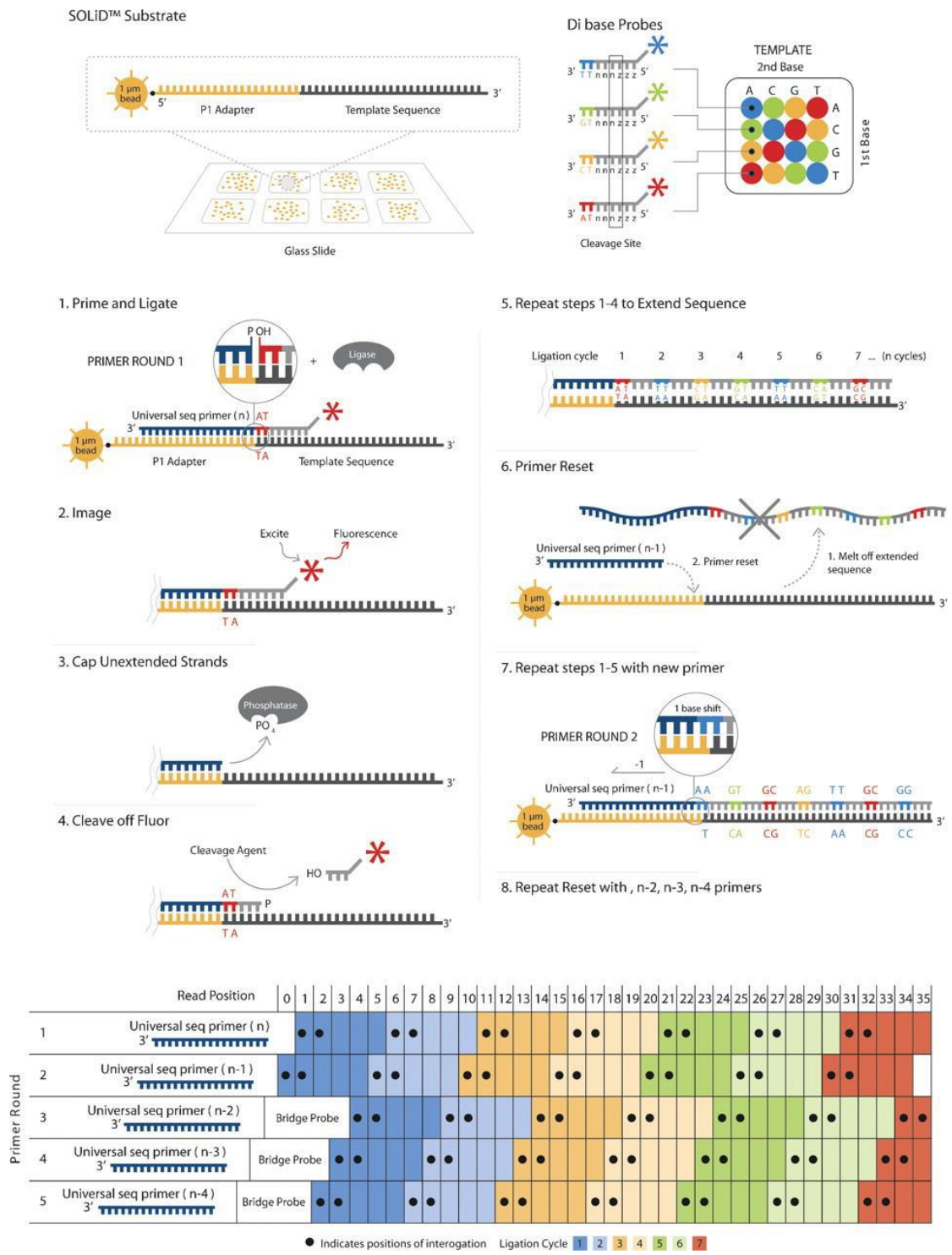
Η διαδικασία της ενίσχυσης είναι ίδια, όπως στην πλατφόρμα 454. Το μονόκλωνο DNA προσδένεται στο σφαιρίδιο μέσω του αντάπτορα P1 και ακολουθεί η διαδικασία της γαλακτωματοποίησης (e-PCR) για την ενίσχυση των τμημάτων.

Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της ενίσχυσης, τα σφαιρίδια απελευθερώνονται. Όπως και με το 454, συλλέγονται τα σφαιρίδια που φέρουν στην επιφάνειά τους τμήματα DNA. Στο σημείο αυτό, το 3' άκρο των τμημάτων, που βρίσκονται στα σφαιρίδια, τροποποιείται ώστε να είναι δυνατή η ομοιοπολική σύνδεση των σφαιριδίων στα πλακάκια. Τα σφαιρίδια «φορτώνονται» στα πλακάκια δίνοντας τη δυνατότητα διαχωρισμού του σε ένα, τέσσερα ή οκτώ τμήματα. Ακολουθεί η διαδικασία της αλληλούχισης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η συγκεκριμένη πλατφόρμα ακολουθεί τη διαδικασία της αλληλούχισης με τη χρήση μιας λιγάσης.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη λειτουργία και ευαισθησία της λιγάσης. Η λιγάση είναι ένα ένζυμο με δυνατότητα επιδιόρθωσης αλλά και σύνδεσης 2 τμημάτων DNA με

φωσφοδιεστερικό δεσμό. Κατά τη διαδικασία αυτή, ένας εκκινητής συμπληρωματικός στην αλληλουχία του αντάπτορα P1, προσδένεται στο τμήμα DNA. Στη συνέχεια, προστίθεται μια βιβλιοθήκη από οκταμερή ολιγονουκλεοτίδια. Τα ολιγονουκλεοτίδια εμφανίζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά: **α)** είναι σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές (χρησιμοποιούνται 4 διαφορετικές χρωστικές). Συνήθως η θέση της χρωστικής βρίσκεται στη θέση 6 του οκταμερούς και **β)** υπάρχει μια περιοχή 2 νουκλεοτιδίων η οποία είναι διαφορετική και περιέχει συγκεκριμένα νουκλεοτίδια σε κάθε οκταμερές. Στην αρχή, οι θέσεις που ήταν διαφορετικές σε κάθε οκταμερές βρίσκονταν στη θέση 4 και 5, ενώ πλέον βρίσκονται στις θέσεις 1 και 2. Για την περιγραφή της συγκεκριμένης διαδικασίας θεωρούμε ότι τα γνωστά νουκλεοτίδια βρίσκονται στη θέση 5 και 6. Οι υπόλοιπες θέσεις στα οκταμερή περιέχουν τυχαία νουκλεοτίδια. Ακολουθεί η υβριδοποίηση του σωστού οκταμερούς και στη συνέχεια η σύνδεσή του με τη βοήθεια του ενζύμου της λιγάσης. Σε αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθεί πως αν δεν έχει ενσωματωθεί το σωστό οκταμερές και οι βάσεις που προστίθενται δεν είναι συμπληρωματικές με το αρχικό DNA, τότε η δραστηριότητα της λιγάσης είναι μειωμένη και επομένως δεν επιτυγχάνεται η σύνδεση. Το μηχάνημα κάνει λήψη μιας εικόνας και στα 4 κανάλια (αντιστοιχώντας στον φθορισμό της κάθε χρωστικής) και επεξεργάζεται τα δεδομένα για την ίδια θέση στο ίδιο σφαιρίδιο. Κάθε χρωστική σχετίζεται με 4 πιθανούς δινουκλεοτιδικούς συνδυασμούς του οκταμερούς. Στη συνέχεια, το οκταμερές κόβεται με χημικό τρόπο μεταξύ των θέσεων 5 και 6 και απομακρύνεται η χρωστική (μαζί με τα νουκλεοτίδια 6-8 του οκταμερούς). Τα τμήματα DNA, στα οποία δεν έχει γίνει επέκταση, τροποποιούνται (cap) και στη συνέχεια επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία (υβριδοποίηση οκταμερούς- χρήση λιγάσης-φθορισμός-αποκοπή χρωστικής). Η συγκεκριμένη διαδικασία επιτρέπει την αλληλούχιση κάθε 4ης και 5ης βάσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ~ 10 φορές και στη συνέχεια ο εκκινητής αποδεσμεύεται και τα τμήματα που έχουν ενωθεί απομακρύνονται. Ακολουθεί μια νέα διαδικασία αλληλούχισης, μόνο που αυτή τη φορά ο εκκινητής φέρει ένα νουκλεοτίδιο λιγότερο και επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τώρα την αλληλούχιση κάθε 3ης και 4ης βάσης. Η διαδικασία αλλαγής του εκκινητή επαναλαμβάνεται για ακόμα 4 φορές οδηγώντας

ουσιαστικά στην παραγωγή 50 συνεχόμενων νουκλεοτιδίων. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται συνοπτικά η πλατφόρμα του SOLiD.



Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλούχισης με την πλατφόρμα ABI Solid. (Anton Valouev et al., 2008)

Πώς όμως γίνεται η σωστή ανάκληση των βάσεων, αν θεωρήσουμε ότι υπάρχουν μόνο τέσσερις χρωστικές και οι πιθανοί συνδυασμοί από τη χρήση των δινουκλεοτιδίων είναι 16; Τα δεδομένα, μόνο από την προσθήκη των δινουκλεοτιδίων, δε θα ήταν ικανά από μόνα τους να καθορίσουν την αλληλουχία των βάσεων. Σημαντικό ρόλο για τη μετέπειτα επεξεργασία των δεδομένων κατέχει η γνώση του πρώτου δινουκλεοτιδίου, καθώς η πρώτη βάση του νεοσυντιθέμενου κλώνου αντιστοιχεί στην τελευταία βάση του εκκινήτη. Μια εναλλακτική μέθοδος είναι η χρήση διαφορετικών δινουκλεοτιδίων με χρωστική σε κάθε γύρο αλλαγής εκκινήτη.

Στην αρχή, η συγκεκριμένη πλατφόρμα είχε τη δυνατότητα αλληλούχισης έως 35 βάσεις και τα δεδομένα από την κάθε αντίδραση έφταναν τα 3Gb. Η ακρίβεια της μεθόδου έφτανε το 99.85%. Στο τέλος του 2010, κυκλοφόρησε μια νέα παραλλαγή του μηχανήματος, το SOLiD 5500xl, με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, τα οποία αφορούσαν το μέγεθος των παραγόμενων τμημάτων (έφτανε τις 85 βάσεις), την ακρίβεια (99.9%) και τα δεδομένα (30G/ αντίδραση). Μια αντίδραση χρειαζόταν 7 μέρες με το κόστος να ανέρχεται στα \$40X10<sup>-9</sup>.

## **PGM /Ion Torrent**

Το 2010, η Ion Torrent κυκλοφόρησε στην αγορά το PGM (Personal Genome Machine). Όπως και το MiSeq, το Ion Torrent είναι ένα μικρό σε μέγεθος μηχάνημα, το οποίο απευθύνεται σε μικρά εργαστήρια. Χρησιμοποιεί την τεχνολογία αλληλούχισης ημιαγωγού (semiconductor sequencing technology). Στηρίζεται στο γεγονός, σύμφωνα με το οποίο, κατά την ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου από την πολυμεράση στην έλικα του DNA, απελευθερώνεται ένα πρωτόνιο. Η ανίχνευση του πρωτονίου γίνεται μέσω αλλαγών που παρατηρούνται στο pH. Όπως και στις προηγούμενες πλατφόρμες, γίνεται κατάτμηση του DNA (μέγεθος τμημάτων ~200bp). Γίνεται σύνδεση των ανταπτόρων στα τμήματα DNA και στη συνέχεια τα τμήματα αυτά προσδένονται σε σφαιρίδια. Γίνεται ενίσχυση των τμημάτων μέσω γαλακτωματοποίησης (emulsion PCR). Ακολουθεί η πρόσδεση των σφαιριδίων σε chips (ευαίσθητα ως προς την απελευθέρωση πρωτονίων). Για την πραγματοποίηση της

αλληλούχισης, προστίθεται η πολυμεράση, διάφορα διαλύματα και ένα είδος νουκλεοτιδίου κάθε φορά (π.χ. Αδερίνες). Κατά την ενσωμάτωση του νουκλεοτιδίου στη αλυσίδα του DNA, η απελευθέρωση του πρωτονίου οδηγεί σε μείωση του pH. Όπως και στο 454, μετά την ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων, ακολουθούν πλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας του συγκεκριμένου είδους νουκλεοτιδίου και στη συνέχεια προστίθεται το επόμενο είδος νουκλεοτιδίου (π.χ. κυτοσίνες). Αποτελεί ένα από τα πρώτα μηχανήματα τα οποία δε χρειάζονται κάμερες για την ανίχνευση των νουκλεοτιδίων ούτε χρωστικές για την αλληλούχιση των τμημάτων ούτε τροποποιήσεις των νουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα να μειώνεται το κόστος και να γίνεται πιο απλή η διαδικασία της αλληλούχισης. Για την αλληλούχιση 200 βάσεων, απαιτούνται 2 ώρες ενώ η διαδικασία για την παρασκευή της βιβλιοθήκης είναι λιγότερη από 6 ώρες για 8 δείγματα. Μέχρι σήμερα, η εταιρία έχει καλυτερέψει τα «chips» καθώς το τελευταίο (318) μπορεί να δώσει δεδομένα που θα κυμαίνονται από 600Mb- 2Gb σε χρονικό διάστημα, το οποίο κυμαίνεται από 4-7 ώρες. Παρακάτω παρουσιάζεται ένα chip 318.



Εικόνα 18. Chip 318 του Ion Torrent.

# Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα του εμβρυϊκού κλάσματος

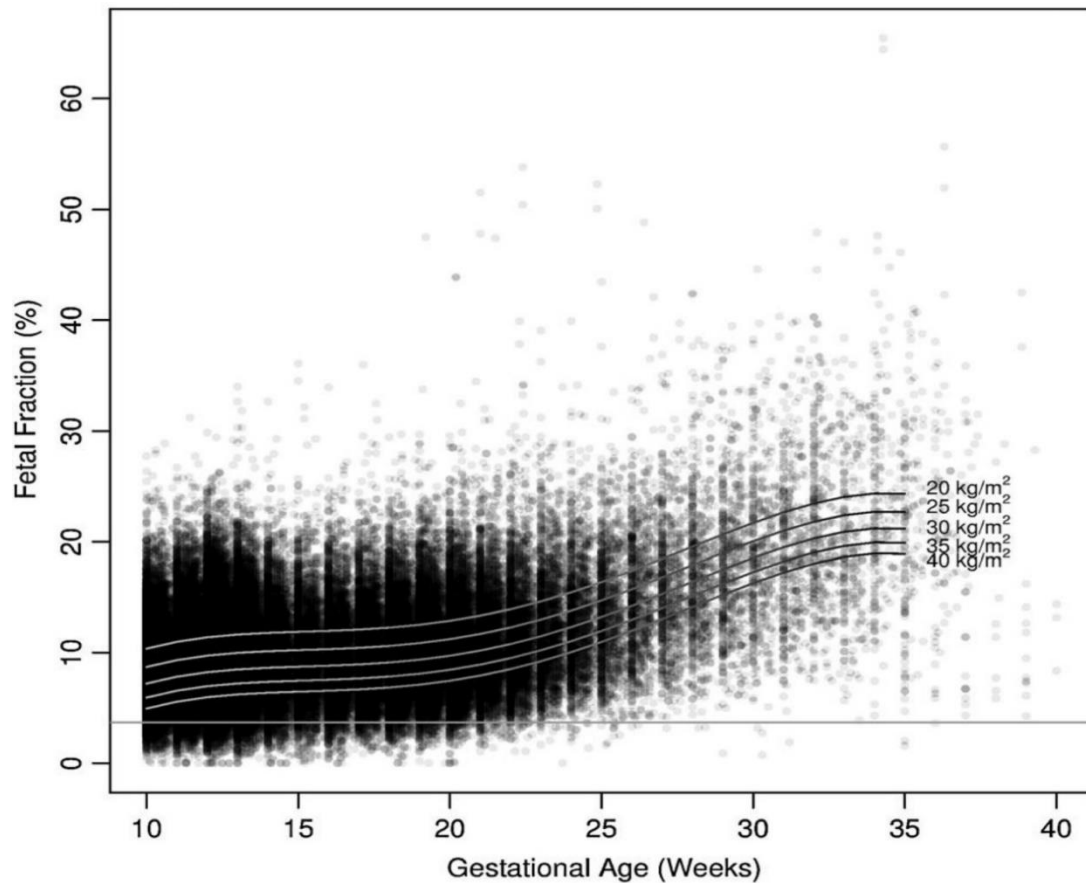
## Εμβρυϊκό κλάσμα (FF)

Ένας βασικός παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά την εργαστηριακή απόδοση των μεθοδολογιών NIPT που βασίζεται στο cfDNA είναι το εμβρυϊκό κλάσμα (fetal fraction, ff), το οποίο αφορά στο ποσοστό του ολικού cfDNA στο μητρικό πλάσμα, που προέρχεται από το έμβρυο/πλακούντα (2Wang et al, 2013). Όσο μικραίνει το ποσοστό FF, τόσο πιο δύσκολο είναι για το NIPT να ανιχνεύσει ανωμαλίες στο έμβρυο. Η μέση τιμή του εμβρυϊκού κλάσματος μεταξύ 10ης και 14ης εβδομάδας κύησης έχει εκτιμηθεί ότι είναι περίπου 10%. Μελέτες έχουν αναδείξει ποικίλους βιολογικούς παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό εμβρυϊκού κλάσματος, όπως είναι η ηλικία κύησης, η εμβρυϊκή ανευλοειδία, το βάρος της μητέρας, το κάπνισμα, το μέγεθος του πλακούντα καθώς επίσης το αν πρόκειται για μονήρη ή δίδυμη κύηση (Struble et al, 2014; Palomaki et al, 2015; Revello et al, 2016).

## Ηλικία κύησης

Το εμβρυϊκό κλάσμα αυξάνεται με την πάροδο της κύησης. Μελέτες έχουν δείξει ότι στην ηλικία των 10 έως 12,5 εβδομάδων, το εμβρυϊκό κλάσμα αυξάνεται με ρυθμό 0,44% / εβδομάδα, ενώ σταθεροποιείται σε ποσοστό του 0,083% / εβδομάδα μεταξύ 12,5 και 20 εβδομάδων κύησης. Από την 20η περίπου εβδομάδα και έπειτα ο ρυθμός αύξησης παραμένει σταθερός σε 0,821% / εβδομάδα. Στις 30 εβδομάδες κύησης, το εμβρυϊκό κλάσμα έχει υπερδιπλασιαστεί (~20%) σε σύγκριση με αυτό που παρατηρείται σε κύηση έως και 20 εβδομάδες (~9%) (Kinnings et al, 2015). Για την εφαρμογή του NIPT, η ιδανική ηλικία κύησης είναι από την 10η εβδομάδα και έπειτα, όπου έχουμε ένα επιθυμητό ποσοστό FF στην μητρική κυκλοφορία.



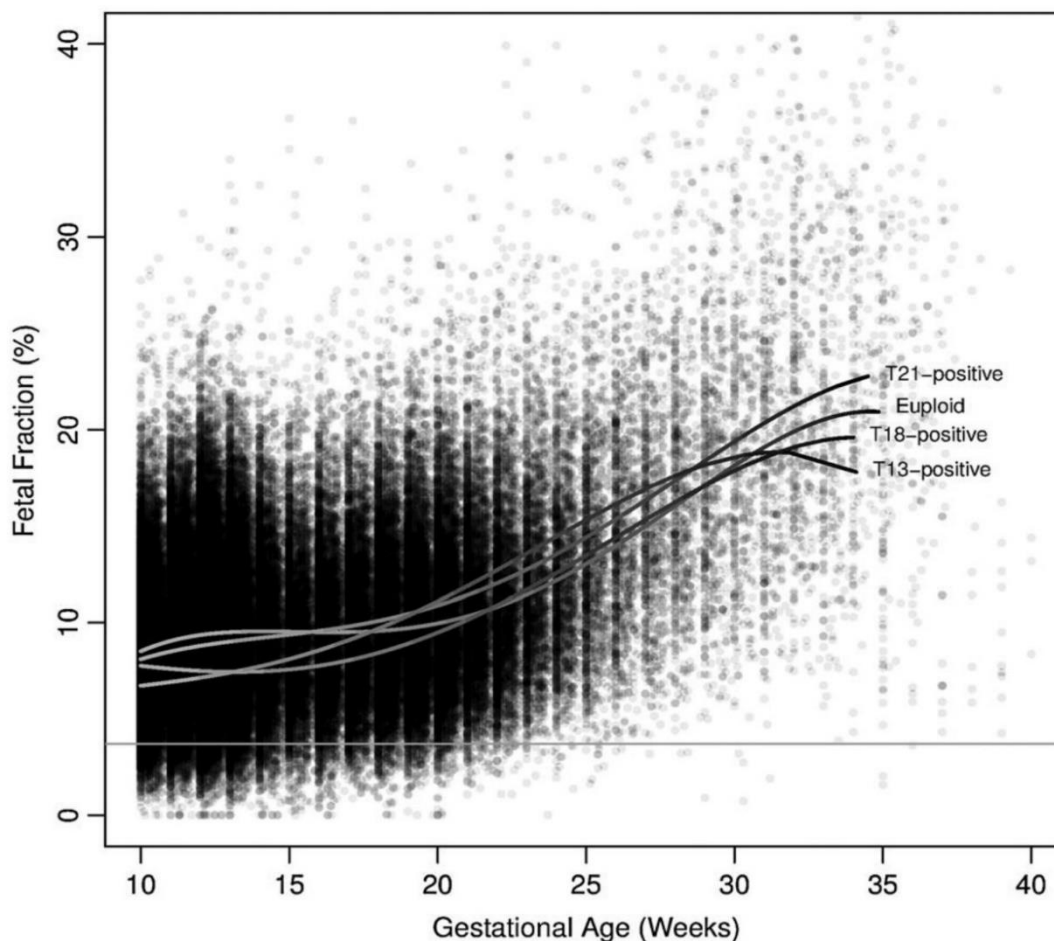


Εικόνα 19. Σχέση μεταξύ ηλικίας κύησης, εμβρυϊκού κλάσματος και BMI. Χρησιμοποιήθηκε πολυωνυμικό μοντέλο για το ποσοστό του εμβρυϊκού κλάσματος σε σχέση με την ηλικία κύησης και το δείκτη μάζας σώματος της μητέρας (BMI). Οι γραμμές παλινδρόμησης αναφέρονται στις διάφορες τιμές BMI. (Kinnings et al, 2015)

## Εμβρυϊκή ανευπλοειδία

Η κατάσταση πλοειδίας του εμβρύου μπορεί να επηρεάσει τη σχέση μεταξύ της ηλικίας κύησης και του εμβρυϊκού κλάσματος (Εικόνα 20). Κυήσεις που χαρακτηρίστηκαν με τρισωμία 21, εμφανίζουν παρόμοια εμβρυϊκά κλάσματα με δείγματα ευπλοειδικών κυήσεων μέχρι και την 16η περίπου εβδομάδα κύησης, ενώ τα δείγματα των κυήσεων με τρισωμία 21 παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα FFs κατά τη διάρκεια της υπόλοιπης εγκυμοσύνης. Οι αναλογίες αυτές δεν φαίνεται να είναι αντιπροσωπευτικές για όλες τις ανευπλοειδικές καταστάσεις του εμβρύου. Κυήσεις με τρισωμία 18 έχουν πολύ χαμηλότερα ποσοστά FF σε σχέση με τα ευπλοειδικά έμβρυα μέχρι και την 21η εβδομάδα κύησης, ενώ μετά παρουσιάζουν πολύ όμοια τάση. Κυήσεις με τρισωμία 13 παρουσιάζουν το χαμηλότερο

FF τις πρώτες εβδομάδες της κύησης, ενώ κατά την 18η εβδομάδα κύησης το ποσοστό είναι υψηλότερο σε σχέση με τα ευπλοειδικά δείγματα και κατά την 20η εβδομάδα κύησης, εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό εμβρυικού κλάσματος μέχρι την 28η περίπου εβδομάδα κύησης (Rava et al, 2014; Hall et al, 2014).

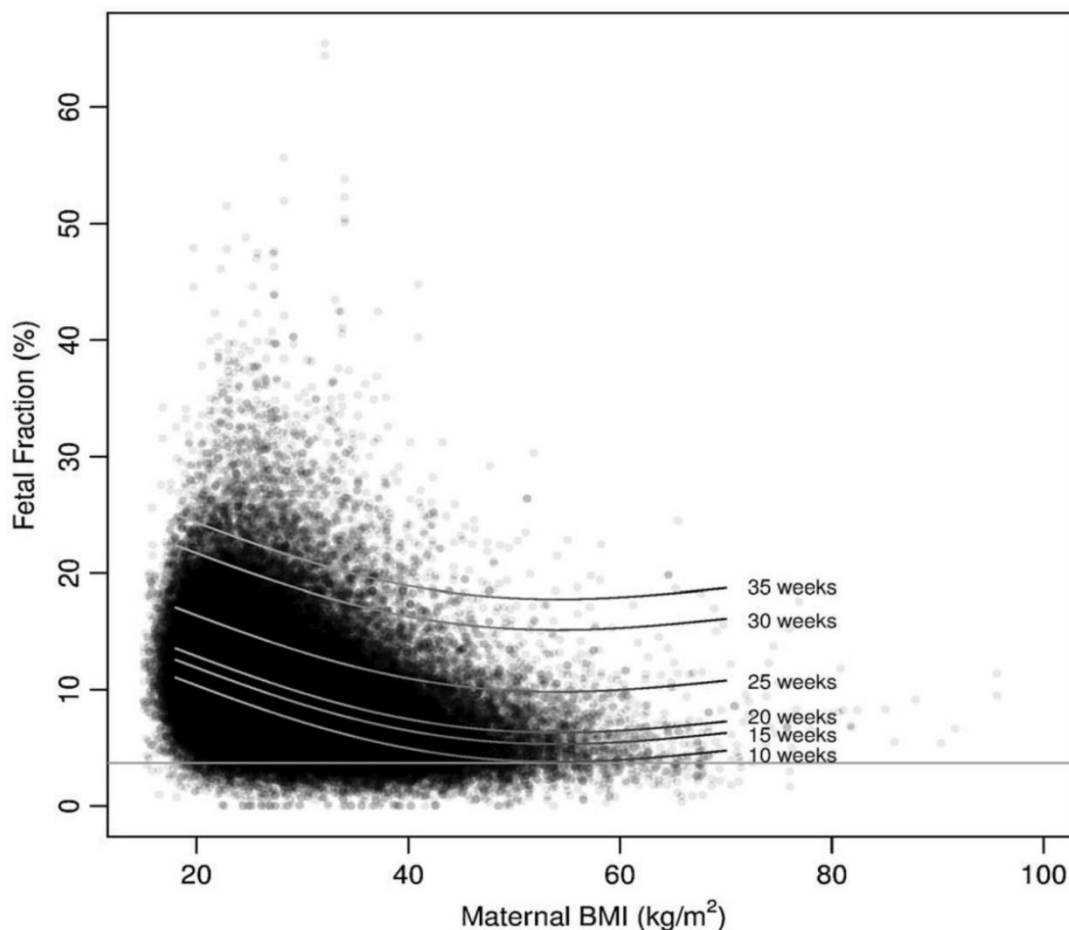


Εικόνα 20. Σχέση μεταξύ ηλικίας κύησης, εμβρυικού κλάσματος και πλοειδίας του εμβρύου. Οι γραμμές που προκύπτουν από την πολυωνυμική ποσοτική παλινδρόμηση αναφέρονται σε δείγματα από κύησεις που ταξινομούνται ως ευπλοειδικές, με τρισωμία 21, με τρισωμία 18 ή με τρισωμία 13. (Kinnings et al, 2015).

## Μητρικό βάρος

Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) της μητέρας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο ποσοστό εμβρυικού κλάσματος. Αύξηση του BMI οδηγεί σε μείωση του FF (Εικόνα 21) και οφείλεται στην πληθώρα λιποκυττάρων που βρίσκονται στην κυκλοφορία της γυναίκας με αυξημένο βάρος. Γυναίκες με σωματικό βάρος 100 κιλά, σε ένα ποσοστό 7% έχουν εμβρυικό

κλάσμα <4%, το οποίο είναι το ελάχιστο όριο για την έκδοση αποτελέσματος για ορισμένα εργαστήρια. Όταν το βάρος της μητέρας φτάσει τα 160 κιλά τότε το ποσοστό εκτοξεύεται από 7% στο 50%. Έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση στο FF καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης σε γυναίκες με BMI 35 ή παραπάνω είναι ελάχιστη (Rolnik et al, 2018).



Εικόνα 21. Σχέση μεταξύ μητρικού δείκτη μάζας σώματος (BMI) και εμβρυϊκού κλάσματος. Οι γραμμές παλινδρόμησης αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ηλικίες κύησης. (Kinnings et al, 2015).

## Μέγεθος του πλακούντα

Είναι γνωστό ότι το μικρό μέγεθος του πλακούντα συσχετίζεται συνήθως με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου. Για το λόγο αυτό, το μειωμένο ποσοστό εμβρυϊκού κλάσματος έχει συνδεθεί με το μικρό μέγεθος του πλακούντα (Kirbas et al, 2016).

## Αριθμός εμβρύων

Η εφαρμογή του NIPT σε πολύδυμες κύσεις καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη καθώς η ανάλυση του cffDNA είναι πιο περίπλοκη. Σε δίδυμες κύσεις που αφορούν σε μονοχοριονικά δίδυμα, η αξιολόγηση του κινδύνου ανευπλοειδίας είναι παρόμοια με αυτή των μονήρων εγκυμοσύνων. Δεδομένου ότι τα έμβρυα φέρουν το ίδιο γενετικό υλικό θα δίνουν τα ίδια αλληλόμορφα του cffDNA στη μητρική κυκλοφορία (σχεδόν πάντοτε αμφότερα τα έμβρυα είναι φυσιολογικά ή ανευπλοειδικά ταυτόχρονα). Εν αντιθέσει, στην πλειοψηφία των διχοριονικών κύσεων είναι διζυγωτικά έμβρυα. Σε αυτές τις περιπτώσεις κάθε έμβρυο συνεισφέρει με διαφορετική ποσότητα cffDNA στην μητρική κυκλοφορία (Gil et al, 2014, Struble et al, 2014). Το γεγονός αυτό μπορεί να δημιουργήσει σύγχυση στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και σε αύξηση των λανθασμένων διαγνώσεων (Qu et al, 2013). Οι Sarno et al, 2016 σύγκριναν την κατανομή του FF και του ποσοστού αποτυχίας αποτελέσματος σε 438 δίδυμες και 10.698 μονήρεις κύσεις, ενώ μελετήθηκε, για τις δίδυμες κύσεις, αξιολογήθηκε η ακρίβεια ελέγχου για τις τρισωμίες 21, 18 και 13 με cffDNA κατά το πρώτο τρίμηνο (10η – 13η εβδομάδα κύησης). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 και 4. Διαπιστώθηκε ότι σε δίδυμες κύσεις που υποβάλλονται σε NIPT πρώτου τριμήνου για τρισωμίες, το εμβρυϊκό κλάσμα είναι χαμηλότερο και το ποσοστό αποτυχίας υψηλότερο σε σύγκριση με τις μονήρεις. (Sarno et al, 2016).

Τα υψηλά ποσοστά FF, αυξάνουν τη διακριτική ικανότητα ανάμεσα στις ευπλοειδείς και τις ανευπλοειδείς εγκυμοσύνες, ενώ στην αντίθετη περίπτωση, μια χρωμοσωμική ανωμαλία θα μπορούσε να καλυφθεί από τη συντριπτική αναλογία του ευπλοειδικού μητρικού cffDNA, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων (Palomaki et al, 2012; Sparks et al, 2012).

Πίνακας 3. Κατανομή του FF και ποσοστό αποτυχίας.

	Μονήριες (10.698)	Δίδυμες (438)
FF	11,0%	8,0%
Ποσοστό αποτυχίας	2,9%	9,4%
Ποσοστό αποτυχίας λόγω IVF	9,5%	56,2%

FF:fetal fraction (εμβρυϊκό κλάσμα), IVF:In Vitro Fertilization (εξωσωματική γονιμοποίηση) Πηγή: Sarno et al., 2016

Η τεχνολογία του NGS δίνει τη δυνατότητα το χαμηλό FF να μπορεί να αντισταθμιστεί εν μέρει από υψηλότερο βάθος αλληλούχησης, αυξάνοντας τον αριθμό των παραγόμενων reads. Η μέτρηση του εμβρυϊκού cffDNA αποτελεί το βασικό παράγοντα ποιότητας στην πλειονότητα των προσεγγίσεων του NIPT, για να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία της ερμηνείας των αποτελεσμάτων (Ehrlich et al, 2011; 2Sparks et al, 2012). Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι είναι εφικτό να αυξηθεί το κλάσμα cffDNA με επιλεκτικό εμπλουτισμό των βραχέων θραυσμάτων cffDNA. Ο επιλεκτικός εμπλουτισμός του cffDNA στο NIPT εν μέρει ελαττώνει ελαφρώς την εξειδίκευση, παρόλα αυτά προσφέρει τη δυνατότητα εφαρμογής του NIPT σε δείγματα φτωά σε cffDNA και μειώνει σχεδόν στο ήμισυ τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που προκαλούνται από το χαμηλό FF, βελτιώνοντας τη συνολική απόδοση του NIPT στην κλινική πράξη (Hu et al, 2019). Το όριο του 4% εμβρυϊκού κλάσματος για την ανίχνευση ανευπλοειδιών στο NIPT είναι μία εκτίμηση που προέκυψε μέσω στατιστικών μοντέλων βάσει των απαιτήσεων για την επίτευξη επαρκούς βάθους ανάγνωσης στην αλληλούχηση ως συνάρτηση του FF για την ανίχνευση εμβρυϊκών ανευπλοειδιών (Fan & Quake, 2010; Canick et al, 2013). Ωστόσο, δεν υπάρχουν διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα για το πραγματικό όριο ανίχνευσης αυτών των προσεγγίσεων NIPT (δηλαδή το χαμηλότερο FF με ανιχνεύσιμη ανευπλοειδία), υποστηρίζοντας την προαναφερθείσα υπόθεση και η χρήση της παραπάνω cut-off τιμής δεν θα ήταν απαραίτητα κατάλληλη για όλες τις μεθοδολογίες ελέγχου με cffDNA. Η μελέτη των Fiorentino et al, απέδειξε ότι το ελάχιστο επίπεδο FF που απαιτείται για την ακριβή αξιολόγηση της ανευπλοειδίας πρέπει να σχετίζεται με το πραγματικό όριο ανίχνευσης της

εκάστοτε προσέγγισης NIPT που χρησιμοποιείται και όχι να είναι κατ'ανάγκη σταθερό στο 4% για όλες τις μεθοδολογίες ελέγχου cffDNA (Fiorentino et al, 2016).

Πίνακας 4. Ποσοστά ανίχνευσης τρισωμιών στον έλεγχο 1ου τριμήνου.

	Μονήρεις (10.530)	Δίδυμες (417)
DR T21	98,7% (156/158)	100% (8/8)
DR T18 & T13	80,3% (49/61)	60% (3/5)
FPR	0,22 (23/10.311)	0,23% (1/404)

*DR: detection rate (ποσοστό ανίχνευσης), T21: τρισωμία 21, T18: τρισωμία 18, T13: τρισωμία 13, FPR: false positive rate (ποσοστό ψευδώς θετικών)  
Πηγή: Sarno et al., 2016*

Η ακριβής εκτίμηση του εμβρυϊκού κλάσματος επιτυγχάνεται με διάφορες μεθόδους, που βασίζονται στο μήκος και τον γονιδιωματικό τόπο των θραυσμάτων στο DNA που αλληλουχείται. Μελέτες που συνέκριναν τις διάφορες μεθόδους εκτίμησης του FF δεν διαπίστωσαν διαφορές στην ακρίβεια μεταξύ αυτών που βασίζονται στο μήκος των θραυσμάτων του DNA που αλληλουχείται και αυτών που βασίζονται στις γονιδιωματικές τους θέσεις και πως ο συνδυασμός διαφόρων χαρακτηριστικών των δειγμάτων οδηγεί σε έναν προγνωστικό παράγοντα που έχει ανώτερη ακρίβεια πρόβλεψης σε σχέση με την εκάστοτε μεμονωμένη προσέγγιση (Gazdarica et al, 2019).

## Η σημασία της NIPT και η κλινική της αξιολόγηση

Ο προγεννητικός έλεγχος πρώτου τριμήνου σε κύηση, μέχρι και το 2013, βασιζόταν στο συνδυασμό της αυχενικής διαφάνειας και της ανίχνευσης της PAPP-A και της β-hCG στο αίμα της εγκύου.

Η χρήση του cffDNA προσέφερε σημαντικές δυνατότητες ανίχνευσης χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου, χωρίς να θέτει σε κίνδυνο την έγκυο ή το έμβρυο, όπως συμβαίνει με τις επεμβατικές μεθόδους προγεννητικής διάγνωσης. Η εφαρμογή

του NIPT σε ομάδες υψηλού κινδύνου, μπορεί να αποτρέψει μία επεμβατική μέθοδο μειώνοντας το ποσοστό από 54% στο 18,6%, μειώνοντας έτσι και τις πιθανές σχετιζόμενες αποβολές από 29 σε 10 (Sacco et al, 2019).

Σήμερα, σε αντίθεση με την NIPD για την πρόβλεψη των χρωμοσωματικών ανωμαλιών του κυοφορούμενου εμβρύου, δεν υπάρχει μια συνολική εκτίμηση για την εφαρμογή της NIPD για τα μονογονιδιακά νοσήματα. Δεν έχουν καθοριστεί επίσημα από την επιστημονική κοινότητα οι βασικές κατευθυντήριες γραμμές για την εφαρμογή μιας τεχνικής ούτε υπάρχει επίσημη τοποθέτηση-κατεύθυνση σχετικά με την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της NIPD (best practice guidelines). Για την κάθε μέθοδο που εφαρμόζεται σε διαγνωστικό επίπεδο, το κάθε εργαστήριο θέτει τις δικές του τιμές για τις δυνατότητες και την αξιοπιστία της διάγνωσης.

Με NIPD στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική ελέγχονται σήμερα μόνο εμβρυϊκά γονίδια ή μεταλλάξεις που διαφοροποιούνται από τα αντίστοιχα μητρικά και έχουν κληρονομηθεί από τον πατέρα ή έχουν δημιουργηθεί εκ νέου στη σύλληψη de novo. Γενικά, τα εργαστήρια που προσφέρουν NIPD και για συγκεκριμένα μόνο νοσήματα το καθένα, είναι μεμονωμένα. Στην Αγγλία, για παράδειγμα, και σε περιορισμένο αριθμό εργαστηρίων, μέσα από το Εθνικό Σύστημα Υγείας προσφέρεται NIPD για:

- i. Προσδιορισμό του φύλου για φυλοσύνδετα νοσήματα με βαριά κλινική συμπτωματολογία (όπως η Μυϊκή Δυστροφία Duchene, DMD) ή για φύλο-εξαρτώμενα νοσήματα (όπως συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων λόγω έλλειψης του ενζύμου 21-υδροξυλάση, (Congenital Adrenal Hyperplasia).
- ii. Έλεγχο του γονιδίου FGFR3 για μεταλλάξεις που σχετίζονται με νοσήματα/σύνδρομα, όπως αχονδροπλασία, υποχονδροπλασία, σύνδρομο Muenke, Thanatophoric δυσπλασία τύπου I και II και Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση
- iii. Έλεγχο του γονιδίου FGFR2 για μεταλλάξεις που σχετίζονται με σύνδρομα, όπως Antley-Bixler, Crouzon, Jackson-Weiss, Pfeiffer και Apert.

- iv. Έλεγχο του γονιδίου CYP21A2 που σχετίζεται με τη συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων λόγω έλλειψης του ενζύμου 21- υδροξυλάση,
- v. Έλεγχο του γονιδίου CFTR που σχετίζεται με την Κυστική Ίνωση, για μερικές μόνο από τις συχνότερες μεταλλάξεις που συναντώνται στους πληθυσμούς της Βόρειας Ευρώπης.

Η αξιοπιστία της NIPD μπορεί να είναι υψηλή για τα μεμονωμένα νοσήματα στα οποία εφαρμόζεται. Δε μπορεί όμως να αντικαταστήσει την ασφάλεια και την ακρίβεια της επεμβατικής ΠΔ με τη λήψη τροφοβλάστης ή αμνιακού υγρού. Γενικά, όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία του cfDNA τόσο αυξάνεται και η αξιοπιστία της διάγνωσης. Στις περιπτώσεις χαμηλής περιεκτικότητας σε cfDNA, θα πρέπει να επαναληφθεί η διάγνωση σε μεταγενέστερο στάδιο της εγκυμοσύνης.

Στην περίπτωση των επικρατητικών νοσημάτων που μεταβιβάζονται από τον πατέρα, ένα θετικό αποτέλεσμα στην NIPD θεωρείται αξιόπιστο. Όμως για την ανίχνευση της πατρικής μετάλλαξης στην περίπτωση ενός υπολειπόμενου νοσήματος, όπως για παράδειγμα η Κυστική Ίνωση, απαιτείται ΠΔ με επεμβατική λήψη εμβρυϊκού ιστού, ώστε να ελεγχθεί εάν το έμβryo φέρει και τη μητρική μετάλλαξη.

Στην NIPD είναι απαραίτητη η γενετική συμβουλευτική από ειδικό επιστήμονα τόσο πριν την εφαρμογή της όσο και μετά τη λήψη των αποτελεσμάτων. Η απόφαση για τον τρόπο που θα διαχειριστεί ο θεράπων ιατρός μια εγκυμοσύνη, περιλαμβάνοντας και το ενδεχόμενο της διακοπής, δε μπορεί να βασιστεί ακόμα μόνο στα αποτελέσματα της NIPD.



## Συμπεράσματα

Από το 1997 που αναφέρθηκε η ύπαρξη του cfDNA στο περιφερικό αίμα της εγκύου, ένα πολύ μεγάλο πλήθος μεθόδων γενετικής διάγνωσης σχεδιάστηκαν, δοκιμάστηκαν και αξιολογήθηκαν ως κατάλληλες να προβλέψουν τον εμβρυϊκό γονότυπο. Για τις περισσότερες, προβλήθηκαν κάποια ελπιδοφόρα πρόδρομα αποτελέσματα ενώ για κάποιες άλλες έγιναν και κλινικές δοκιμές. Πολύ λίγες όμως ήταν αυτές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη διάγνωση, όπως για παράδειγμα η ποσοτική RT-PCR για την πρόβλεψη του φύλου του εμβρύου και την κατάσταση του RhD, για να αντικατασταθεί και αυτή στη συνέχεια με το ψηφιακό PCR.

Σήμερα, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στη μαζική παράλληλη αλληλούχιση με NGS. Πολλά κέντρα παγκοσμίως επιχειρούν να σχεδιάσουν πρωτόκολλα NIPD χρησιμοποιώντας πιλοτικά κάποιο μονογονιδιακό νόσημα, εφαρμόζοντας διαφορετικές προσεγγίσεις όσον αφορά την αλληλούχιση αλλά και προσαρμόζοντας-εξελίσσοντας τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, ώστε να εκτιμήσουν τις δυνατότητες της μεθόδου και την αξιοπιστία της στην κλινική εφαρμογή. Καθώς η τεχνολογία της αλληλούχισης συνεχώς εξελίσσεται, αναμένεται να αυξηθεί ο αριθμός των γενετικών διαταραχών, όπως μεταλλάξεις γονιδίων και σύνδρομα μικροδιπλασιασμού και μικροελλειμάτων, που θα μπορούν να ανιχνευθούν με NIPT. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δοκιμών, φαίνεται ότι το μέλλον της NIPD για τα μονογονιδιακά νοσήματα ανήκει στη μαζική παράλληλη αλληλούχιση.

## Συζήτηση

Το κόστος του NIPT παραμένει υψηλό για τους πολίτες στις περισσότερες χώρες. Παρά το συνεχώς μειούμενο κόστος της αλληλούχισης των δειγμάτων, υπάρχει η ανάγκη για τεχνολογική ανάπτυξη ώστε να επιτευχθεί η δυνατότητα ανίχνευσης χρωμοσωματικών ανωμαλιών και διαταραχών μονογονιδιακών νοσημάτων στα πλαίσια του NIPT.

Επιπλέον θα πρέπει να υπάρχει σωστή ενημέρωση στις εγκύους σχετικά με τους κινδύνους, τις επιλογές των διαθέσιμων μεθόδων προγεννητικού ελέγχου, τα οφέλη και τους περιορισμούς.

Τέλος, η τεχνολογία ανίχνευσης του cfDNA και η εφαρμογή της στον NIPT εξελίσσεται συνεχώς οπότε είναι ζωτικής σημασίας οι επαγγελματίες παραμένουν ενήμεροι αυτής της εξελισσόμενης τεχνολογίας ώστε να είναι σε θέση να παρέχουν στους ασθενείς τις πιο αποτελεσματικές, ακριβείς και οικονομικές μεθόδους ανίχνευσης γενετικών διαταραχών.

## «Γενωμική ανάλυση του ελευθέρου εμβρυϊκού DNA στο πλαίσιο μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου»

Πρόδρομος Η. Σακάλογλου

### Περίληψη

Ο προγεννητικός έλεγχος αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της καθημερινής μαιευτικής πράξης και προσφέρεται σε τακτά χρονικά διαστήματα καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ώστε να διασφαλιστεί η υγεία του εμβρύου και της μητέρας. Για την πραγματοποίησή του απαιτείται η ανάλυση εμβρυϊκού γενετικού υλικού που λαμβάνεται με επεμβατικές μεθόδους όπως η αμνιοπαρακέντηση και η βιοψία τροφοβλάστης και εφαρμόζεται για τη διάγνωση ανευπλοειδίας του εμβρύου. Οι τεχνικές όμως αυτές έχουν μικρό αλλά υπαρκτό κίνδυνο αποβολής (~1%). Για το λόγο υπήρχε μεγάλο ενδιαφέρον η ανακάλυψη μη επεμβατικών τρόπων λήψης εμβρυϊκού γενετικού υλικού έτσι ώστε η προγεννητική διάγνωση να μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις εγκύους, ανεξαρτήτως ηλικίας ή αντικειμενικού κινδύνου να αποκτήσουν παιδί με κάποιο γενετικό νόσημα. Η ανακάλυψη ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA) στην κυκλοφορία της μητέρας, επέτρεψε την ανάπτυξη μη επεμβατικών προγεννητικών ελέγχων (Non Invasive Prenatal Testing, NIPT) και σήμερα η ανάπτυξη μεθόδων και τεχνολογιών για τη βέλτιστη αξιοποίηση και ενίσχυση του cffDNA, αποτελεί το βασικό τομέα έρευνας.

Στη παρούσα εργασία αναφέρεται αναλυτικά ο έλεγχος των χρωμοσωματικών ανωμαλιών που μπορεί να συμβούν στο έμβρυο, όπως η τρισωμία 21, 18 και 13 ή η μονοσωμία Turner με την χρήση βιοχημικών και υπερηχογραφικών δεικτών, με μεγαλύτερη έμφαση στην νεότερη τεχνολογία, την χρήση, δηλαδή, του ελευθέρου εμβρυϊκού DNA στην μητρική κυκλοφορία ενώ θα συγκρίνεται και η αποτελεσματικότητα των εκάστοτε μεθόδων.

**Σκοπός:** Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ανασκόπηση των μη επεμβατικών τεχνικών του προγεννητικού ελέγχου, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως στην εγκυμοσύνη για την ανίχνευση κήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου αλλά και άλλων επιπλοκών στην κύηση.

**Συμπέρασμα:** Γίνονται συνεχώς προσπάθειες ώστε οι μη επεμβατικές εξετάσεις προγεννητικού ελέγχου να αποτελέσουν έλεγχο ρουτίνας στις περισσότερες χώρες, η διαγνωστική αξία να γίνεται όλο και μεγαλύτερη, να μειώνεται το κόστος των υπηρεσιών NIPT αλλά και να υπάρχει σωστή ενημέρωση των ιατρών και των ασθενών για τις διαθέσιμες επιλογές NIPT, τις δυνατότητες που προσφέρουν και την αξιολόγηση και ερμηνεία των παραγόμενων αποτελεσμάτων.

**Λέξεις κλειδιά:** μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος (NIPT), ελεύθερο κυκλοφορούν εμβρυϊκό DNA (cffDNA), χρωμοσωματικές ανωμαλίες, βιοχημικοί δείκτες, αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS)

## «Genomic analysis of cell-free fetal DNA for non-invasive prenatal testing»

Prodromos I. Sakaloglou

### Abstract

Prenatal assessment of fetal health is routinely offered throughout pregnancy to ensure that the most effective management can be provided to maintain fetal and maternal well-being. Currently, invasive testing such as amniocentesis and chorionic villi sampling is used for definitive diagnosis of fetal aneuploidy, which is associated with a 1% risk of iatrogenic fetal loss. For this reason, it was of great interest to discover non-invasive ways of obtaining fetal genetic material so that prenatal diagnosis can be applied to all pregnant women, regardless of age or objective risk of having a child with a genetic disease. The discovery of cell-free fetal DNA (cffDNA) in the mother's circulation has allowed the development of Non Invasive Prenatal Testing (NIPT) and today the development of methods and technologies for the optimal utilization and amplification of cffDNA is a key area of research.

**Purpose:** The aim of the present thesis is to describe in detail prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities that may occur in the fetus, such as trisomy 21, 18 and 13 or Turner monosomy using biochemical and ultrasound markers, with greater emphasis on the latest technology, non-invasive prenatal screening techniques.

**Conclusion:** Efforts are constantly being made to make non-invasive prenatal testing a routine screening in most countries, to increase the diagnostic value, to reduce the cost of NIPT services and to properly inform physicians and patients about the available NIPT options and the evaluation and interpretation of the produced results.

**Keywords:** non-invasive prenatal testing/diagnosis (NIPT/NIPD), cell-free fetal DNA (cffDNA), chromosomal abnormalities, biochemical markers, Next-Generation Sequencing (NGS)

## Βιβλιογραφία

Abele, H., Wagner, P., Sonek, J., Hoopmann, M., Brucker, S., Artunc-Ulkumen, B. and Kagan, K. O. (2015) 'First trimester ultrasound screening for Down syndrome based on maternal age, fetal nuchal translucency and different combinations of the additional markers nasal bone, tricuspid and ductus venosus flow'. *Prenatal Diagnosis*, 35 (12). Pp 1182-1186.

Abramowicz, J. S. (2013). Benefits and risks of ultrasound in pregnancy. *Seminars in Perinatology*. 37(5), 295–300.

Agarwal, A., Sayres, L. C., Cho, M. K., Cook-Deegan, R. and Chandrasekharan, S. (2013) 'Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States'. *Prenatal Diagnosis*, 33 (6). pp 521-531

Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyrén P, Uhlén M, Lundeberg J. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem*. 2000 Apr 10; 280(1):103-10.

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta*. 2006 Jan; 363(1-2):83-94. Epub 2005 Sep 13

Aitken DA, Wallace EM, Crossley JA, Swanston IA, van Pareren Y, van Maarle M, Groome NP, Macri JN, Connor JM. (1996). Dimeric inhibin A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy. *The New England Journal of Medicine*. 334(19):1231–6.

Akinlade, F., Cowans, N., Kisanga, M. and Spencer, K. (2012) 'Maternal serum CA 19-9 and CA 15-3 levels in pregnancies affected by trisomy 21'. *Prenatal Diagnosis*, 32 pp 644-648.

Akolekar, R., Syngelaki, A., Sarquis, R., Zvanca, M. and Nicolaides, K.H. (2011). Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11–13 weeks. *Prenatal Diagnosis*, 31: 66–74.

Akolekar, R., Zaragoza, E., Poon, L., Pepes, S. and Nicolaides, K. (2008) 'Maternal serum placental growth factor at 11+ 0 to 13+ 6 weeks of gestation in the prediction of pre-eclampsia'. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 32 (6). pp 732-739.

Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. (2015). Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 45:16–26.

Alberry, M., Maddocks, D., Jones, M., Abdel Hadi, M., Abdel-Fattah, S., Avent, N., & Soothill, P. W. (2007). Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal Diagnosis*, 27(5), 415–418.

Alfirevic, Z. and Callaghan, T. (2014) 'Anti-RhD prophylaxis for RhD negative pregnant women'. *BMJ*, 349 pp g5437.

Alfirevic Z., Navaratnam K., Mujezinovic F. (2017). Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis (Review) (9).

Al-Mufti R, Hambley H, Albaiges G, Lees C, Nicolaides KH. (2000). Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop pre-eclampsia. *Human Reproduction*, 15:1624-8.

Amant, F., Verheecke, M., Wlodarska, I., Dehaspe, L., Brady, P., Brison, N., Vermeesch, J. R. (2015). Presymptomatic Identification of Cancers in Pregnant Women During Noninvasive Prenatal Testing. *JAMA Oncology*, 1(6), 814.

Anker P, Stroun M, Maurice PA. (1975). Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Research*, 35:2375–82.

Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol*. 2009 Apr;25(4):195-203

Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Michalas S. (1998). Fetal blood sampling--indication-related losses. *Prenatal Diagnosis*, 18:934–940.

Ashoor, G., Syngelaki, A., Poon, L. C. Y., Rezende, J. C., & Nicolaides, K. H. (2012). Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 41(1), 26–32.

Ashoor, G., Syngelaki, A., Wagner, M., Birdir, C., & Nicolaides, K. H. (2012). Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(4), 322.e1–322.e5.

Ashoor, G., Syngelaki, A., Wang, E., Struble, C., Oliphant, A., Song, K., & Nicolaides, K. H. (2012). Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 41(1), 21–25.

Avent, N. D. and Chitty, L. S. (2006) 'Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound'. *Prenatal Diagnosis*, 26 (7). pp 598- 603.

Avent, N. D. (2008) 'RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges'. *Prenatal Diagnosis*. Springer, pp 185-201.

Baker, M. (2012) 'Digital PCR hits its stride'. *Nature Methods*, 9 (6). pp 541-544.

Balshem, H., Helfand, M., Schünemann, H. J., Oxman, A. D., Kunz, R., Brozek, J., Norris, S. (2011). GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence. *Journal of Clinical Epidemiology*, 64(4), 401–406.

Banch Clausen, F., Steffensen, R., Christiansen, M., Rudby, M., Jakobsen, M., Jakobsen, T., Krog, G., Madsen, R., Nielsen, K. and Rieneck, K. (2014) 'Routine noninvasive prenatal screening for fetal RHD in plasma of RhD-negative pregnant women—2 years of screening experience from Denmark'. *Prenatal Diagnosis*, 3 (10). pp 1000-1005.

Barrett, A. N., Zimmermann, B. G., Wang, D., Holloway, A. and Chitty, L. S. (2011) 'Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield'. *PLoS One*, 6 (10). pp e25202.

Barrett, A. N., McDonnell, T. C., Chan, K. A. and Chitty, L. S. (2012) 'Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia'. *Clinical Chemistry*, 58 (6). pp 1026-1032.

Bardsley MZ, Kowal K, Levy C, Gosek A, Ayari N, Tartaglia N, Lahlou N, Winder B, Grimes S, Ross JL. (2013). 47,XYY syndrome: clinical phenotype and timing of ascertainment. *J Pediatr*. 163(4):1085-94.

Bayindir, B., Dehaspe, L., Brison, N., Brady, P., Ardui, S., Kammoun, M., Vermeesch, J. R. (2015). Noninvasive prenatal testing using a novel analysis pipeline to screen for all autosomal fetal aneuploidies improves pregnancy management. *European Journal of Human Genetics*, 23(10), 1286–1293.

Benn, P., Chapman, A. (2010). Ethical challenges in providing noninvasive prenatal diagnosis. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 22(2), 128–134.

Benn, P., Borrell, A., Crossley, J., Cuckle, H., Dugoff, L., Gross, S., Yaron, Y. (2011). Aneuploidy screening: a position statement from a committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, January 2011. *Prenatal Diagnosis*, 31(6), 519–522.

Benn, P., Cuckle, H., Pergament, E. (2012). Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol*, 119;1270.

Benn P, Cuckle H, Pergament E. (2013). Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 42(1):15-33.

Benn, P., Borell, A., Chiu, R., Cuckle, H., Dugoff, L., Faas, B., Yaron, Y. (2013). Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 33(7), 622–629.



Benn, P., & Cuckle, H. (2014). Theoretical performance of non-invasive prenatal testing for chromosome imbalances using counting of cell-free DNA fragments in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis*, 34:778–83.

Benn, P., Borrell, A., Chiu, R. W. K., Cuckle, H., Dugoff, L., Faas, B., Yaron, Y. (2015). Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 35(8), 725–734.

Berry SM, Stone J, Norton ME, Johnson D, Berghella V. (2013). Fetal blood sampling. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM), *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 209:170–180.

Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Alani, R. M. (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine*, 6(224), 224ra24–224ra24.

Beulen, L., Faas, B. H. W., Feenstra, I., van Vugt, J. M. G., & Bekker, M. N. (2017). Clinical utility of non-invasive prenatal testing in pregnancies with ultrasound anomalies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 49(6), 721–728.

Bhide, A. & Thilaganathan, B. (2004). Recent advances in the management of placenta previa. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 16(6): 447–51.

Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol*. 1999 Jun; 105(3):574-83.

Bianchi DW, Wilkins-Haug LE, Enders AC, Hay ED. (1993). Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. *Am J Med Genet*, 46(5):542–50.

Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP. (2012). Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol*, 119, 890–901.

Bianchi, D. W., Sehnert, A. J., & Rava, R. P. (2012). Genome-Wide Fetal Aneuploidy Detection by Maternal Plasma DNA Sequencing. *Obstetrics & Gynecology*, 119(6), 1270–1271.

Bianchi, D. W., Lamar Parker, R., Wentworth, J., Madankumar, R., Saffer, C., Das, A. F., Sehnert, A. J. (2014). DNA Sequencing Versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 69(6), 319–321.

Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, (2014). DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *New England Journal of Medicine*, 371(6), 577–578.

Bianchi, D. W., Parsa, S., Bhatt, S., Halks-Miller, M., Kurtzman, K., Sehnert, A. J., & Swanson, A. (2015). Fetal Sex Chromosome Testing by Maternal Plasma DNA Sequencing. *Obstetrics & Gynecology*, 125(2), 375–382.

Boada R, Janusz J, Hutaff-Lee C, Tartaglia N. (2009). The cognitive phenotype in Klinefelter syndrome: a review of the literature including genetic and hormonal factors. *Dev Disabil Res Rev*, 15(4):284-94.

Boon E.M.J.& Faas B.H.W. (2013). Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Prenatal Diagnosis*, 33:563–568.

Bottomley, C., & Bourne, T. (2009). Diagnosing miscarriage. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 23(4), 463–477.

Brison, N., van den Bogaert, K., Dehaspe, L., van den Oever, J. M. E., Janssens, K., Blaumeiser, B., Vermeesch, J. R. (2017). Accuracy and Clinical Value of Maternal Incidental Findings During Noninvasive Prenatal Testing for Fetal Aneuploidies. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 72(8), 469–470.

Buermans HP, den Dunnen JT, 2014“Next generation sequencing technology: Advances and applications”.*Biochim Biophys Acta*,1842(10):1932-1941. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015

Buiting K., Saitoh S., Gross S., Dittrich B., Schwartz, S; Nicholls, RD; Horsthemke, B. (1995). Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 1. *Nature Genetics*, 9 (4): 395–400.

Bull MJ. (2011). Health supervision for children with Down syndrome. *Pediatrics*, 128:393–406.

Bustamante-Aragones A, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, de Alba MR, Gonzalez-Gonzalez C, Glover G, Diego-Alvarez D, Ayuso C, Ramos C. New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma. *J Cyst Fibros*. 2008 Nov;7(6):505-10

Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. (2013). The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenatal Diagnosis*, 33:667-74.

Cereda A., & Carey J. (2012). The trisomy 18 syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 7:81.

Chan, K. C. A., Ding, C., Gerovassili, A., Yeung, S. W., Chiu, R. W. K., Leung, T. N., Lo, Y. M. D. (2006). Hypermethylated RASSF1A in Maternal Plasma: A Universal Fetal DNA Marker that Improves the Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Clinical Chemistry*, 52(12), 2211–2218.

Chan, N., Smet, M.-E., Sandow, R., da Silva Costa, F., & McLennan, A. (2017). Implications of failure to achieve a result from prenatal maternal serum cell-free DNA testing: a historical cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 125(7), 848–855.

Chen CP, Chern SR, Tsai FJ, Lin CY, Lin YH, Wang W. (2005). A comparison of maternal age, sex ratio and associated major anomalies among fetal trisomy 18 cases with different cell division of error. *Prenat Diagn.* 25(4):327-30.

Chen H. (2015). Cri-du-chat Syndrome. Medscape.

Chen, E. Z., Chiu, R. W. K., Sun, H., Akolekar, R., Chan, K. C. A., Leung, T. Y., Lo, Y. M. D. (2011). Noninvasive Prenatal Diagnosis of Fetal Trisomy 18 and Trisomy 13 by Maternal Plasma DNA Sequencing. *PLoS ONE*, 6(7), e21791.

Chen, K. M., White, K., Shabbeer, J., & Schmid, M. (2018). Maternal age trends support uptake of non-invasive prenatal testing (NIPT) in the low-risk population. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 1–4.

Chim SS, Jin S, Lee TY, et al. (2008). Systematic search for placental DNAmethylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. *Clinical Chemistry*, 54:500-11.

Chim, S. S. C., Tong, Y. K., Chiu, R. W. K., Lau, T. K., Leung, T. N., Chan, L. Y. S., Lo, Y. M. D. (2005). Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), 14753–14758.

Chiu, R. W. K., Chan, K. C. A., Gao, Y., Lau, V. Y. M., Zheng, W., Leung, T. Y., Lo, Y. M. D. (2008). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20458–20463.

Chiu, R. W. K., Chim, S. S. C., Wong, I. H. N., Wong, C. S. C., Lee, W.-S., To, K. F., Lo, Y. M. D. (2007). Hypermethylation of RASSF1A in Human and Rhesus Placentas. *The American Journal of Pathology*, 170(3), 941–95..

Chiu, R. W. K., Akolekar, R., Zheng, Y. W. L., Leung, T. Y., Sun, H., Chan, K. C. A., Lo, Y. M. D. (2011). Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*, 342(jan11 1), c7401–c7401.

Cho E. (2015). Whole genome sequencing based noninvasive prenatal test. *J Genet Med*, 12(2):61-65.

Choolani M, Mahyuddin AP, Hahn S. The promise of fetal cells in maternal blood. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012 Oct;26(5):655-67.

Chudova DI, Sehnert AJ, Bianchi DW. (2016). Copy-number variation and false positive prenatal screening results. *N Engl J Med*, 375:97–8.

Committee on Genetics Society for Maternal–Fetal Medicine (2015). Cell-free DNA Screening for Fetal Aneuploidy. *The American College of Obstetricians and Gynecologists*, 126 (3), e31-e37.

Committee on Genetics Society for Maternal–Fetal Medicine (2016). Screening for Fetal Aneuploidy. *Practice Bulletin No. 163. Obstetrics & Gynecology*, 127(5), e123–e137.

Committee Opinion No. 545. (2012). Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstetrics & Gynecology*, 120(6), 1532–1534.

Crane, J. & Cheung, S. (1988). An embryogenic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue. *Prenatal Diagnosis*, 8(2):119–29.

Crider KS, Olney RS, Cragan JD. (2008). Trisomies 13 and 18: population prevalences, characteristics, and prenatal diagnosis, metropolitan Atlanta, 1994-2003. *Am J Med Genet A*. 1;146A(7):820-6.

Curnow, K. J., Wilkins-Haug, L., Ryan, A., Kirkizlar, E., Stosic, M., Hall, M. P., Gross, S. J. (2015). Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism–based noninvasive prenatal test. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 212(1), 79.e1–79.e9.

Dan, S., Wang, W., Ren, J., Li, Y., Hu, H., Xu, Z., Zhang, X. (2012). Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11 105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenatal Diagnosis*, 32(13), 1225–1232.

Dar, P., Curnow, K. J., Gross, S. J., Hall, M. P., Stosic, M., Demko, Z., Benn, P. (2014). Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism–based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 211(5), 527.e1–527.e17.

Dar, P., Curnow, K. J., Gross, S. J., Hall, M. P., Stosic, M., Demko, Z., Benn, P. (2014). Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism–based

noninvasive prenatal aneuploidy testing. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 211(5), 527.e1–527.e17.

De Jong, A., Dondorp, W. J., de Die-Smulders, C. E. M., Frints, S. G. M., & de Wert, G. M. W. R. (2009). Non-invasive prenatal testing: ethical issues explored. *European Journal of Human Genetics*, 18(3), 272–277.

De los Santos T, Schweizer J, Rees CA, Francke U. (2000). Small evolutionarily conserved RNA, resembling C/D box small nucleolar RNA, is transcribed from PWCR1, a novel imprinted gene in the Prader-Willi deletion region, which is highly expressed in brain. *American Journal of Human Genetics*, 67(5):1067–82.

De Souza E, & Morris JK. (2010). Case-control analysis of paternal age and trisomic anomalies. *Arch Dis Child*. 95:893–897.

De Vlaminck, I., Valantine, H. A., Snyder, T. M., Strehl, C., Cohen, G., Luikart, H., Khush, K. K. (2014). Circulating Cell-Free DNA Enables Noninvasive Diagnosis of Heart Transplant Rejection. *Science Translational Medicine*, 6(241), 241ra77–241ra77.

Demaliaj E, Cerekja A, Piazze J. (2012). Sex chromosome aneuploidies. aneuploidy in health and disease. In: Storchova Z, ed. *Aneuploidy in health and disease*. Shanghai: InTech China; 123–40.

Demianczuk NN, Van Den Hof MC, Farquharson D, Lewthwaite B, Gagnon R, Morin L, Salem S, Skoll A. (2003). The use of first trimester ultrasound. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 25(10):864-75.

Devers, P. L., Cronister, A., Ormond, K. E., Facio, F., Brasington, C. K., & Flodman, P. (2013). Noninvasive Prenatal Testing/Noninvasive Prenatal Diagnosis: the Position of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of Genetic Counseling*, 22(3), 291–295.

Dharajiya, N. G., Grosu, D. S., Farkas, D. H., McCullough, R. M., Almasri, E., Sun, Y., Ehrich, M. (2017). Incidental Detection of Maternal Neoplasia in Noninvasive Prenatal Testing. *Clinical Chemistry*, 64(2), 329–335.

Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY, Charoenkwan P, Ng IS, Law HY, Ma ES, Xu X, Wanapirak C, Sanguanserm Sri T, Liao C, Ai MA, Chui DH, Cantor CR, Lo YM. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10762-7.

Dreesen J, Destouni A, Kourlaba G, Degn B, Mette WC, Carvalho F, Moutou C, Sengupta S, Dhanjal S, Renwick P, Davies S, Kanavakis E, Harton G, Traeger-Synodinos J. Evaluation of PCR- based preimplantation genetic diagnosis applied to monogenic diseases: a collaborative

ESHRE PGD consortium study. *Eur J Hum Genet.* 2014 Aug;22(8):1012-8. doi: 10.1038/ejhg.2013.277. Epub 2013 Dec 4.

Duhig K.E., Myers J., Seed P.T., Sparkes J., Lowe J., Hunter R.M., Shennan A.H., Chappell L.C. (2019). Placental growth factor testing to assess women with suspected pre-eclampsia: a multicentre, pragmatic, stepped-wedge cluster-randomised controlled trial. *Lancet*, 393: 1807–18.

Dungan, J. S. (2011). Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *Yearbook of Obstetrics, Gynecology and Women's Health*, 2011, 62–64.

Ehrich, M., Deciu, C., Zwiefelhofer, T., Tynan, J. A., Cagasan, L., Tim, R., van den Boom, D. (2011). Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 204(3), 205.e1–205.e11.

Eiby, S., Kjær, S. K., & Mellekjær, L. (2013). Incidence of Pregnancy-Associated Cancer in Denmark, 1977–2006. *Obstetrics & Gynecology*, 122(3), 608–617.

Fan HC, & Quake SR. (2007). Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 79(19):7576–7579.

Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L., & Quake, S. R. (2008). Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42), 16266–16271.

Fan HC, Blumenfeld YJ, El-Sayed YY, Chueh J, Quake SR. (2009). Microfluidic digital PCR enables rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidy. *Am J Obstet Gynecol*, 200:543.e1–7.

Fan, H. & Quake, S. (2010). Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. *PLoS One*, 5:e10439.

Ferres, M., Hui, L., & Bianchi, D. (2014). Antenatal Noninvasive DNA Testing: Clinical Experience and Impact. *American Journal of Perinatology*, 31(07), 577–582.

Fiorentino, F., Bono, S., Pizzuti, F., Mariano, M., Polverari, A., Duca, S., Spinella, F. (2016). The importance of determining the limit of detection of non-invasive prenatal testing methods. *Prenatal Diagnosis*, 36(4), 304–311.

Flowers, N., Kelley, J., Sigurjonsson, S., Bruno, D. L., & Pertile, M. D. (2015). Maternal mosaicism for a large segmental duplication of 18q as a secondary finding following non-

invasive prenatal testing and implications for test accuracy. *Prenatal Diagnosis*, 35(10), 986–989.

França LT, Carrilho E, Kist TB. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys*. 2002 May;35(2):169-200

Fung, W. L. A., Butcher, N. J., Costain, G., Andrade, D. M., Boot, E., Chow, E. W. C., Bassett, A. S. (2015). Practical guidelines for managing adults with 22q11.2 deletion syndrome. *Genetics in Medicine*, 17(8), 599–609.

Futch T, Spinosa J, Bhatt S, de Feo E, Rava RP, Sehnert AJ. (2013). Initial clinical laboratory experience in noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy from maternal plasma DNA samples. *Prenatal Diagnosis*, 33:569-74.

Gabriel, J.L., & Diskin, L. (2018). Prenatal Testing in Low-Risk Populations: A US Perspective. *Clinical Ethics At the Crossroads of Genetic and Reproductive Technologies*, 313–334.

Galbiati S, Brisci A, Lalatta F, Seia M, Makrigiorgos GM, Ferrari M, Cremonesi L. Full COLD-PCR protocol for noninvasive prenatal diagnosis of genetic diseases. *Clin Chem*. 2011 Jan;57(1):136-8.

Gazdarica, J., Hekel, R., Budis, J., Kucharik, M., Duris, F., Radvanszky, J., Szemes, T. (2019). Combination of Fetal Fraction Estimators Based on Fragment Lengths and Fragment Counts in Non-Invasive Prenatal Testing. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3959.

Gibas LM, Grujic S, Barr MA, Jackson LG. (1987). A simple technique for obtaining high quality chromosome preparations from chorionic villus samples using FdU synchronization. *Prenatal Diagnosis*, 7(5):323–7.

Gil M, Quezada MS, Bregant B, Syngelaki A, Nicolaides KH. (2014). Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first-trimester twin pregnancies. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 35(3):204-11.

Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. (2017). Analysis of cellfree DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 50:302–14.

- Gil, M. M., Quezada, M. S., Revello, R., Akolekar, R., & Nicolaides, K. H. (2015). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45(3), 249–266.
- Go AT, Visser A, van Dijk M, Mulders MA, Eijk P, Ylstra B, Blankenstein MA, van Vugt JM, Oudejans CB. (2008). A novel method to identify syncytiotrophoblast-derived RNA products representative of trisomy 21 placental RNA in maternal plasma. *Methods Mol Biol*, 444:291–302.
- Goldwaser T., & Klugman S. (2018). Cell-free DNA for the detection of fetal aneuploidy. *Fertility and Sterility*, 109(2):195-200.
- Goodfellow LR, Batra G, Hall V, McHale E, Heazell AE. (2011). A case of confined placental mosaicism with double trisomy associated with stillbirth. *Placenta*, 32:699–703.
- Grande, M., Arigita, M., Borobio, V., Jimenez, J. M., Fernandez, S., Borrell, A. (2012). First-trimester detection of structural abnormalities and the role of aneuploidy markers. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 39(2), 157–63.
- Grande, M., Jansen, F. A. R., Blumenfeld, Y. J., Fisher, A., Odibo, A. O., Haak, M. C., & Borrell, A. (2015). Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 46(6), 650–658.
- Grati, F. R., Bajaj, K., Malvestiti, F., Agrati, C., Grimi, B., Malvestiti, B., Ferreira, J. C. P. (2015). The type of feto-placental aneuploidy detected by cffDNA testing may influence the choice of confirmatory diagnostic procedure. *Prenatal Diagnosis*, 35(10), 994–998.
- Grati, F. R., Malvestiti, F., Ferreira, J. C. P. B., Bajaj, K., Gaetani, E., Agrati, C., Simoni, G. (2014). Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genetics in Medicine*, 16(8), 620–624.
- Gregg AR, Gross SJ, Best RG, et al. (2013). ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genetics in Medicine*, 15(5):395–398.
- Gregg, A. R., Skotko, B. G., Benkendorf, J. L., Monaghan, K. G., Bajaj, K., Watson, M. S. (2016). Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine*, 18(10), 1056–1065.
- Gross, S. J., Stosic, M., McDonald-McGinn, D. M., Bassett, A. S., Norvez, A., Dhamankar, R., Benn, P. (2016). Clinical experience with single-nucleotide polymorphism-based non-



invasive prenatal screening for 22q11.2 deletion syndrome. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 47(2), 177–183.

Hall HE, Chan ER, Collins A, Judis L, Shirley S, Surti U, Hoffner L, Cockwell AE, Jacobs PA, Hassold TJ. (2007). The origin of trisomy 13. *Am J Med Genet A*. 1;143A(19):2242-8.

Hall, M. P., Hill, M., Zimmermann, B., Sigurjonsson, S., Westemeyer, M., Saucier, J., Rabinowitz, M. (2014). Non-Invasive Prenatal Detection of Trisomy 13 Using a Single Nucleotide Polymorphism- and Informatics-Based Approach. *PLoS ONE*, 9(5), e96677.

Hassold T, & Chiu D. (1985). Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Human Genetics*, 70:11–7.

Haverty CE, Lin AE, Simpson E, Spence MA, Martin RA. (2004). 47,XXX associated with malformations. *Am J Med Genet A*. 15;125A(1):108-11

Helgeson, J., Wardrop, J., Boomer, T., Almasri, E., Paxton, W. B., Saldivar, J. S., McCullough, R. M. (2015). Clinical outcome of subchromosomal events detected by whole-genome noninvasive prenatal testing. *Prenatal Diagnosis*, 35(10), 999–1004.

Hochstenbach, R., Elferink, M.G., van Zon, P.H.A., Lichtenbelt, K.D., van Harssel, J., Schuring-Blom, H., & Page-Christiaens, G.C.M.L. (2018). Discordant NIPT result in a viable trisomy-21 pregnancy due to prolonged contribution to cfDNA by a demised trisomy-14 cotwin. *Clinical Case Reports*, 6(5): 788–791.

Holzgreve, W., & Hahn, S. (2001). Prenatal diagnosis using fetal cells and free fetal DNA in maternal blood. *Clinics in Perinatology*, 28(2):353-356.

Hu, P., Liang, D., Chen, Y., Lin, Y., Qiao, F., Li, H., Xu, Z. (2019). An enrichment method to increase cell-free fetal DNA fraction and significantly reduce false negatives and test failures for non-invasive prenatal screening: a feasibility study. *Journal of Translational Medicine*, 17(1):124.

Hui L. (2016). Cell-free DNA testing for 22q11.2 deletion syndrome: appraising the viability, effectiveness and appropriateness of screening. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 47(2):137-41.

Huijsdens-van Amsterdam, K., Page-Christiaens, L., Flowers, N., Bonifacio, M. D., Ellis, K. M. B., Vogel, I., Pertile, M. D. (2018). Isochromosome 21q is overrepresented among false-negative cell-free DNA prenatal screening results involving Down syndrome. *European Journal of Human Genetics*.

Johnson, J. M., Chauhan, S. P., Ennen, C. S., Niederhauser, A., & Magann, E. F. (2007). A comparison of 3 criteria of oligohydramnios in identifying peripartum complications: a secondary analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 197(2), 207.e1–207.e8.

Kagan, K. O., Hoopmann, M., Singer, S., Schaeferhoff, K., Dufke, A., & Mau-Holzmann, U. A. (2016). Discordance between ultrasound and cell free DNA screening for monosomy X. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 294(2), 219–224.

Kalousek DK, Barrett IJ, McGillivray BC. (1989). Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18. *Am J Hum Genet*, 44: 338–343.

Kaseniit KE, Hogan GJ, D'Auria KM, Haverty C, Muzzey D. (2018). Strategies to minimize false positives and interpret novel microdeletions based on maternal copy-number variants in 87,000 noninvasive prenatal screens. *BMC Med Genomics*, 19;11(1):90.

Killeen, A. (2004). *Genetic Inheritance. Principles of Molecular Pathology*. Humana Press. p. 41.

Kinnings, S. L., Geis, J. A., Almasri, E., Wang, H., Guan, X., McCullough, R. M., Deciu, C. (2015). Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing. *Prenatal Diagnosis*, 35(8), 816–822.

Kirbas A., Daglar K., Danisman N. (2016). Non-Invasive Prenatal Testing for Aneuploidy: A Review of the Literature. *Medicine Science*, 5:195-209.

Kolialexi, A., Tsangaris, G. T., Sifakis, S., Gourgiotis, D., Katsafadou, A., Lykoudi, A., Papantoniou, N. (2017). Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early-onset preeclampsia. *Expert Review of Proteomics*, 14(3), 269–276.

Kunwoo, K. (2015). Advantages of the single nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *J Genet Med*, 12(2):66-71.

Lam KW, Jiang P, Liao GJ, Chan KC, Leung TY, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to  $\beta$ -thalassemia. *Clin Chem*. 2012 Oct;58(10):1467-75. Epub 2012 Aug 15.

Langlois, S., & Brock, J-A. (2013). Current status in non-invasive prenatal detection of Down syndrome, trisomy 18, and trisomy 13 using cell-free DNA in maternal plasma. *J Obstet Gynaecol Can*, 35: 177–181.

Lau, T. K., Chan, M. K., Salome Lo, P. S., Connie Chan, H. Y., Kim Chan, W. S., Koo, T. Y., Pooh, R. K. (2012). Clinical utility of noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test – early experience. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 25(10), 1856–1859.

Lau, T. K., Cheung, S. W., Lo, P. S. S., Pursley, A. N., Chan, M. K., Jiang, F., Choy, K. W. (2014). Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA: review of 1982 consecutive cases in a single center. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 43(3), 254–264.

Lefkowitz, R. B., Tynan, J. A., Liu, T., Wu, Y., Mazloom, A. R., Almasri, E., Ehrich, M. (2016). Clinical validation of a noninvasive prenatal test for genomewide detection of fetal copy number variants. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(2), 227.e1–227.e16.

Lench N, Barrett A, Fielding S, McKay F, Hill M, Jenkins L, White H, Chitty LS. The clinical implementation of noninvasive prenatal diagnosis for single-gene disorders: challenges and progress made. *Prenat Diagn*. 2013 Jun; 33(6):555–62.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Research*, 37:646–50.

Liu L1, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012, “Comparison of next-generation sequencing systems.” *J Biomed Biotechnol*.

Livergood, M. C., LeChien, K. A., & Trudell, A. S. (2017). Obesity and cell-free DNA “no calls”: is there an optimal gestational age at time of sampling? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 216(4), 413.e1–413.e9.

Lo YM, Mark S. C. Tein, Tze K. Lau, Christopher J. Haines, Tse N. Leung, Priscilla M. K. Poon, James S. Wainscoat, Philip J. Johnson, Allan M. Z. Chang, and N. Magnus Hjelm. (1998). Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *American Journal of Human Genetics*, 62:768–775.

Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., & Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*, 350(9076), 485–487.

Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *American Journal of Human Genetics*, 64:218–224.

Lo, Y. M. D., Tsui, N. B. Y., Chiu, R. W. K., Lau, T. K., Leung, T. N., Heung, M. M. S., Ding, C. (2007). Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nature Medicine*, 13(2), 218–223.

Lo, Y. M. D., Lun, F. M. F., Chan, K. C. A., Tsui, N. B. Y., Chong, K. C., Lau, T. K., Chiu, R. W. K. (2007). Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(32), 13116–13121.

Lo Y M. (2013). Non-invasive prenatal testing using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: from molecular karyotyping to fetal whole-genome sequencing. *Reprod Biomed Online*, 27(6):593-8.

Lockwood CJ, Senyei AE, Dische MR, Casal DC, et al. (1991). Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *New Engl J Med*, 325:669–74.

Luthardt, F. W., & Keitges, E. (2001). Chromosomal Syndromes and Genetic Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*.

Lv W, Wei X, Guo R, Liu Q, Zheng Y, Chang J, Bai T, Li H, Zhang J, Song Z, Cram DS, Liang D, Wu L. Noninvasive prenatal testing for Wilson disease by use of circulating single-molecule amplification and resequencing technology (cSMART). *Clin Chem*. 2015 Jan;61(1):172-81. Mardis ER., 2013“Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*.6:287-303

Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*. 2008 Mar;24(3):133-41.

Masoudi- Nejad A., Narimani Z., Hosseinkhan (2013). Next Generation Sequencing and Sequence Assembly Methodologies and Algorithms. Springer pp.11-38

Maxwell DJ, Johnson P, Hurley P, Neales K, Allan L, Knott P. (1991). Fetal blood sampling and pregnancy loss in relation to indication *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 98:892–897.

Maxwell, S., Dickinson, J. E., Murch, A., & O’Leary, P. (2015). The potential impact of NIPT as a second-tier screen on the outcomes of high-risk pregnancies with rare chromosomal abnormalities. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 55(5), 420–426.

Maynard TM, Meechan DW, Dudevoir ML, Gopalakrishna D, Peters AZ, Heindel CC, Sugimoto TJ, Wu Y, Lieberman JA, Lamantia AS. (2008). Mitochondrial localization and function of a subset of 22q11 deletion syndrome candidate genes. *Mol. Cell. Neurosci*, 39(3):439–51.

McKanna, T., Ryan, A., Krinshpun, S., Kareht, S., Marchand, K., Grabarits, C., Benn, P. (2018). Fetal fraction-based risk algorithm for non-invasive prenatal testing: screening for

trisomy 13, 18, and triploidy in women with low cell-free fetal DNA. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*.

Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):31-46.

Mitchelson R. K., *New High throughput Technologies for DNA sequencing and Genomics* (2007). Edited by Second Edition. Elsevier pp.119-185

Morozova OI, Marra MA.2008,“Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics”*Genomics*;92(5):255-64

Nagamatsu, T., Kamei, Y., Yamashita, T., Fujii, T., & Kozuma, S. (2013). Placental abnormalities detected by ultrasonography in a case of confined placental mosaicism for trisomy 2 with severe fetal growth restriction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(1), 279–283.

Neofytou, M., Brison, N., Van den Bogaert, K., Dehaspe, L., Devriendt, K., Geerts, A., & Vermeesch, J. R. (2018). Maternal liver transplant: Another cause of discordant fetal sex determination using cell-free DNA. *Prenatal Diagnosis*, 38(2):148–150.

Nicolaides K.H., Syngelaki A., Gil M., Atanasova V. and Markova D. (2013). Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenatal Diagnosis*, 33:1–5.

Nicolaides KH, Syngelaki A, Birdir C, Touzet G, Ashoor G. (2012). Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in an average-risk population. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*,, 207(5):374.e1-6.

Nicolaides KH, Wegrzyn P. (2005). First trimester diagnosis of chromosomal defects. *Ginekologia Polska*. 76(1):1–8.

Nicolaides, K.H., Musci, T.J., Struble, C.A., Syngelaki, A., & Gil, M.M. (2013). Assessment of Fetal Sex Chromosome Aneuploidy Using Directed Cell-Free DNA Analysis. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 35(1):1–6.

Norton ME, Rose NC, Benn P. (2013). Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy: clinical assessment and a plea for restraint. *Obstet Gynecol*, 121: 847–850.

Norton, M. E., Brar, H., Weiss, J., Karimi, A., Laurent, L. C., Caughey, A. B., Song, K. (2012). Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 207(2), 137.e1–137.e8.

- Norton, M. E., Jacobsson, B., Swamy, G. K., Laurent, L. C., Ranzini, A. C., Brar, H., Wapner, R. J. (2015). Cell-Free DNA Analysis for Noninvasive Examination of Trisomy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 70(8), 483–484.
- Norwitz ER, & Levy B. (2013). Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 6(2):48–62.
- Norwitz, E. R., McNeill, G., Kalyan, A., Rivers, E., Ahmed, E., Meng, L., Hedriana, H. L. (2019). Validation of a Single-Nucleotide Polymorphism-Based Non-Invasive Prenatal Test in Twin Gestations: Determination of Zygosity, Individual Fetal Sex, and Fetal Aneuploidy. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7), 937.
- Oepkes, D., Yaron, Y., Kozlowski, P., Rego de Sousa, M. J., Bartha, J. L., van den Akker, E. S., Tabor, A. (2014). Counseling for non-invasive prenatal testing (NIPT): what pregnant women may want to know. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 44(1), 1–5.
- Old, R. W., Crea, F., Puszyk, W., & Hultén, M. A. (2007). Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reproductive BioMedicine Online*, 15(2), 227–23..
- Osborne M, Hardisty E, Devers P, Kaiser-Rogers K, Hayden MA, Goodnight W, Vora NL. (2013). Discordant non-invasive testing results in a patient subsequently diagnosed with metastatic disease. *Prenatal Diagnosis*, 33: 609–611.
- Oskarsdóttir S, Vujic M, Fasth A. (2004). Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. *Arch. Dis. Child*, 89(2):148–51.
- Palomaki G. E., Kloza E. M., Lambert-Messerlian G. M., van den Boom D., Ehrich M., Deciu C., Bombard A. T., Haddow J. E., (2015). Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative? *Prenatal Diagnosis*, 35:289-293.
- Palomaki, G. E., Deciu, C., Kloza, E. M., Lambert-Messerlian, G. M., Haddow, J. E., Neveux, L. M., Canick, J. A. (2012). DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genetics in Medicine*, 14(3), 296–305.
- Palomaki, G. E., Kloza, E. M., Lambert-Messerlian, G. M., Haddow, J. E., Neveux, L. M., Ehrich, M., Canick, J. A. (2011). DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genetics in Medicine*, 13(11), 913–920.
- Papageorgiou, E. A., Karagrigoriou, A., Tsaliki, E., Velissariou, V., Carter, N. P., & Patsalis, P. C. (2011). Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nature Medicine*, 17(4), 510–513.

- Papaiouannou GKI, Syngelaki A, Maiz N, Ross JA, Nicolaides KH. (2011). Sonographic markers of aneuploidies at 6-10 weeks of gestation. *Early Human Development*. 87(7):453-6.
- Papaiouannou, G.I., Syngelaki, A., Maiz, N., Ross, J.A., & Nicolaides, K.H. (2011). Ultrasonographic prediction of early miscarriage. *Human Reproduction*, 26(7):1685–1692.
- Park, F., Russo, K., Williams, P., Pelosi, M., Puddephatt, R., Walter, M., Leung, C., Saaid, R., Rawashdeh, H., Ogle, R. and Hyett, J. (2015), Prediction and prevention of early-onset pre-eclampsia: impact of aspirin after first-trimester screening. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 46: 419–423.
- Parker, S. E., Mai, C. T., Canfield, M. A., Rickard, R., Wang, Y., Meyer, R. E. (2010). Updated national birth prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004-2006. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 88(12), 1008–1016.
- Peters, D., Chu, T., Yatsenko, S. A., Hendrix, N., Hogge, W. A., Surti, U., Rajkovic, A. (2011). Noninvasive Prenatal Diagnosis of a Fetal Microdeletion Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 365(19), 1847–1848.
- Petersen, O. B., Vogel, I., Ekelund, C., Hyett, J., & Tabor, A. (2014). Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: population-based study from a country with existing first-trimester screening. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 43(3), 265–271.
- Petrozella, L. N., Dashe, J. S., McIntire, D. D., & Leveno, K. J. (2011). Clinical Significance of Borderline Amniotic Fluid Index and Oligohydramnios in Preterm Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 117(2, Part 1), 338–342.
- Poon LC, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH. (2013). Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 33:215–23.
- Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Chow KC, Lo YMD. (2002). Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry*, 48: 35–41.
- Prefumo, F., Paolini, D., Speranza, G., Palmisano, M., Dionisi, M., & Camurri, L. (2019). The contingent use of cell-free fetal DNA for prenatal screening of trisomies 21, 18, 13 in pregnant women within a national health service: A budget impact analysis. *PLOS ONE*, 14(6), e0218166.
- Provider Handbook, (2009). The California Prenatal Screening Program.

- Qiao, L., Zhang, Q., Liang, Y., Gao, A., Ding, Y., Zhao, N., Zhang, W., Li, H., Wang, T. (2019). Sequencing of short cfDNA fragments in NIPT improves fetal fraction with higher maternal BMI and early gestational age. *American Journal of Translational Research*, 11(7):4450-4459.
- Qu JZ, Leung TY, Jiang P, Liao GJ, Cheng YK, Sun H, Chiu RW, Chan KC, Lo YM. (2013). Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis. *Clinical Chemistry*, 59(2):427-35.
- Rava R.P., Srinivasan A., Sehnert A.J., Bianchi D.W. (2014). Circulating Fetal Cell-Free DNA Fractions Differ in Autosomal Aneuploidies and Monosomy X. *Clinical Chemistry*, 60(1):43–250.
- Redaelli S, Sala E, Roncaglia N, Colombo C, Crosti F, Villa N, et al. (2005). Severe intrauterine growth restriction and trisomy 15 confined placental mosaicism: a case report and review of literature. *Prenatal Diagnosis*, 25:140–7.
- Revello R., Sarno L., Ispas A., Akolekar R., Nicolaides K.H., (2016). Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 47, 698-704.
- Robinson DO, & Jacobs PA. (1999). The origin of the extra Y chromosome in males with a 47,XXY karyotype. *Hum Mol Genet*. 8(12):2205-9.
- Robinson WP, Barrett IJ, Bernard L, Telenius A, Bernasconi F, Wilson RD, Best, R. (1997). Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction. *American Journal of Human Genetics*, 60:917–27.
- Rolnik DL, Yong Y, Lee TJ, Tse C, McLennan AC, da Silva Costa F. (2018). Influence of Body Mass Index on Fetal Fraction Increase With Gestation and Cell-Free DNA Test Failure. *Obstet Gynecol*, 132(2):436-443.
- Sacco, A., Hewitt, H., & Pandya, P. (2019). Women's choices in non-invasive prenatal testing for aneuploidy screening: results from a single centre prior to introduction in England. *Archives of Disease in Childhood*, archdischild–2019–317031.
- Samango-Sprouse, C., Banjevic, M., Ryan, A., Sigurjonsson, S., Zimmermann, B., Hill, M., Rabinowitz, M. (2013). SNP-based non-invasive prenatal testing detects sex chromosome aneuploidies with high accuracy. *Prenatal Diagnosis*, 33(7), 643–649.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7



- Sarno, L., Revello, R., Hanson, E., Akolekar, R., & Nicolaides, K. H. (2016). Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 47(6):705–711.
- Schuring-Blom, H., Lichtenbelt, K., van Galen, K., Elferink, M., Weiss, M., Vermeesch, J. R., & Page-Christiaens, L. (2016). Maternal vitamin B12 deficiency and abnormal cell-free DNA results in pregnancy. *Prenatal Diagnosis*, 36(8), 790–793.
- Schwaederle, M., Husain, H., Fanta, P. T., Piccioni, D. E., Kesari, S., Schwab, R. B., Kurzrock, R. (2016). Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor cell DNA assay. *Oncotarget*, 7(9):9707–17.
- Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J, Rava R. (2011). Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clinical Chemistry*, 57,1042–1049.
- Seval M., Karabulut H., Tükün A, Koç A. (2015). Cell free fetal DNA in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 42(6):787-91.
- Shaw, J. L. V., Diamandis, E. P., Horne, A. W., Barnhart, K., Bourne, T., & Messinis, I. E. (2012). Ectopic Pregnancy. *Clinical Chemistry*, 58(9), 1278–1285.
- Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008 Oct;26(10):1135-45. doi: 10.1038/nbt1486
- Sheth, F., Gohel, N., Liehr, T., Akinde, O., Desai, M., Adeteye, O., & Sheth, J. (2012). Gain of Chromosome 4qter and Loss of 5pter: An Unusual Case with Features of Cri du Chat Syndrome. *Case Reports in Genetics*, 2012, 1–4.
- Sholl, JS: (1987). Abruptio placentae: Clinical management in non-acute cases. *Am J Obstet Gynecol*, 156:40.
- Shubina, J., Trofimov, D. Y., Barkov, I. Y., Stupko, O. K., Goltsov, A. Y., Mukosey, I. S., Sukhikh, G. T. (2017). In silico size selection is effective in reducing false positive NIPS cases of monosomy X that are due to maternal mosaic monosomy X. *Prenatal Diagnosis*, 37(13), 1305–1310.
- Sigafoos J., O'Reilly M. & Lancioni G. (2009), Cri-du-chat, *Developmental Neurorehabilitation*.
- Simon AL, Su B, Demko Z, Rabinowitz M, Harmon ER, Gross SJ. (2015). Detection of complete molar pregnancy by single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal testing. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 46:506-7.

Simoni, G., Brambati, B., Danesino, C., Rossella, F., Terzoli, G. L., Ferrari, M., & Fraccaro, M. (1983). Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Human Genetics*, 63(4), 349–357.

Skrzypek H., & Hui L. (2017). Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy and single gene disorders. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology*, 42:26–38.

Smidt-Jensen S, Christensen B, Lind AM. (1989). Chorionic villus culture for prenatal diagnosis of chromosome defects: reduction of the long-term cultivation time. *Prenatal Diagnosis*, 9(5):309-19.

Snyder MW, Simmons LE, Kitzman JO, Coe BP, Henson JM, Daza RM, et al. (2015). Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. *N Engl J Med*, 372:1639-45.

Snyder, M. W., Simmons, L. E., Kitzman, J. O., Coe, B. P., Henson, J. M., Daza, R. M., Gammill, H. S. (2015). Copy-Number Variation and False Positive Prenatal Aneuploidy Screening Results. *New England Journal of Medicine*, 372(17), 1639–1645.

Snyder MW, Gammill HS, Shendure J. (2015). Copy-number variation and false positive results of prenatal screening. *N Engl J Med*, 373(26):2585.

Souka AP, Von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. (2005). Increased nuchal translucency with normal karyotype. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 192(4):1005–1021.

Srebniak, M. I., Knapen, M. F. C. M., Polak, M., Joosten, M., Diderich, K. E. M., Govaerts, L. C. P., Van Opstal, D. (2017). The influence of SNP-based chromosomal microarray and NIPT on the diagnostic yield in 10,000 fetuses with and without fetal ultrasound anomalies. *Human Mutation*, 38(7), 880–888.

Srinivasan, A., Bianchi, D. W., Huang, H., Sehnert, A. J., & Rava, R. P. (2013). Noninvasive Detection of Fetal Subchromosome Abnormalities via Deep Sequencing of Maternal Plasma. *The American Journal of Human Genetics*, 92(2), 167–176.

Sparks, A. B., Struble, C. A., Wang, E. T., Song, K., & Oliphant, A. (2012). Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(4), 319.e1–319.e9.

Sparks, A. B., Wang, E. T., Struble, C. A., Barrett, W., Stokowski, R., McBride, C., Oliphant, A. (2012). Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenatal Diagnosis*, 32(1), 3–9.

- Stochholm, K., Juul, S., Juel, K., Naeraa, R. W., & Højbjerg Gravholt, C. (2006). Prevalence, Incidence, Diagnostic Delay, and Mortality in Turner Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(10), 3897–3902.
- Struble C. A., Syngelaki A., Oliphant A., Song K., Nicolaides K.H., (2014). Fetal fraction estimate in twin pregnancies using directed cell-free DNA analysis. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 35, 199-203.
- Suciu, I., Galeva, S., Abdel Azim, S., Pop, L., & Toader. (2019). First-trimester screening-biomarkers and cell-free DNA. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 1–171.
- Suo, F., Wang, C., Liu, T., Fang, Y., Wu, Q., Gu, M., & Gou, L. (2018). Non-invasive prenatal testing in detecting sex chromosome aneuploidy: A large-scale study in Xuzhou area of China. *Clinica Chimica Acta*, 481, 139–141.
- Swillen A, Vogels A, Devriendt K, Fryns JP. (2000). Chromosome 22q11 deletion syndrome: update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am. J. Med. Genet*, 97 (2): 128–35.
- Syngelaki, A., Pergament, E., Homfray, T., Akolekar, R., & Nicolaides, K. H. (2014). Replacing the Combined Test by Cell-Free DNA Testing in Screening for Trisomies 21, 18 and 13: Impact on the Diagnosis of Other Chromosomal Abnormalities. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 35(3), 174–184.
- Tang KL, Antshel KM, Fremont WP, Kates WR. (2015). Behavioral and Psychiatric Phenotypes in 22q11.2 Deletion Syndrome. *J Dev Behav Pediatr*, 36 (8):639–50.
- Tartaglia NR, Ayari N, Hutaff-Lee C, Boada R. (2012). Attention- deficit hyperactivity disorder symptoms in children and adolescents with sex chromosome aneuploidy: XXY, XXX, XYY, and XXYY. *J Dev Behav Pediatr*. (33):309–318.
- Tartaglia, NR; Howell, S; Sutherland, A; Wilson, R; Wilson, L (2010). A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 5:8.
- Taylor-Phillips, S., Freeman, K., Geppert, J., Agbebiyi, A., Uthman, O. A., Madan, J., Clarke, A. (2016). Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 6(1), e010002.
- Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I. Gibbs, P. (2016). Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Science Translational Medicine*, 8(346), 346ra92–346ra92.

Tong, Y. K., Ding, C., Chiu, R. W. K., Gerovassili, A., Chim, S. S. C., Leung, T. Y., Lo, Y. M. D. (2006). Noninvasive Prenatal Detection of Fetal Trisomy 18 by Epigenetic Allelic Ratio Analysis in Maternal Plasma: Theoretical and Empirical Considerations. *Clinical Chemistry*, 52(12), 2194–2202.

Tong, Y. K., Ding, C., Chiu, R. W. K., Gerovassili, A., Chim, S. S. C., Leung, T. Y., Lo, Y. M. D. (2006). Noninvasive Prenatal Detection of Fetal Trisomy 18 by Epigenetic Allelic Ratio Analysis in Maternal Plasma: Theoretical and Empirical Considerations. *Clinical Chemistry*, 52(12), 2194–2202.

Tongsong T, Wanapirak C, Kunavikantikul C, Sirirchotiyakul S, Piyamongkol W, Chanprapaph P. (2001). Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 184:719-723.

Tsaliki, E., Papageorgiou, E. A., Spyrou, C., Koumbaris, G., Kypri, E., Kyriakou, S., Patsalis, P. C. (2012). MeDIP real-time qPCR of maternal peripheral blood reliably identifies trisomy 21. *Prenatal Diagnosis*, 32(10), 996–1001.

Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood*. 2011 Mar 31;117(13):3684-91.

Uldbjerg N., (2017). No-call non-invasive prenatal testing gives important information, *Mini Commentary, Obstetricians and Gynaecologists*. 125(7), 856–856.

Van den Berg, C., Van Opstal, D., Brandenburg, H., Wildschut, H. I. J., den Hollander, N. S., Pijpers, L., Los, F. J. (2000). Accuracy of abnormal karyotypes after the analysis of both short- and long-term culture of chorionic villi. *Prenatal Diagnosis*, 20(12), 956–969.

Van Opstal, D., Srebniak, M. I., Polak, J., de Vries, F., Govaerts, L. C. P., Joosten, M., Galjaard, R.-J. H. (2016). False Negative NIPT Results: Risk Figures for Chromosomes 13, 18 and 21 Based on Chorionic Villi Results in 5967 Cases and Literature Review. *PLOS ONE*, 11(1), e0146794.

Van Rijn S, & Swaab H. (2015). Executive dysfunction and the relation with behavioral problems in children with 47,XXY and 47,XXX. *Genes Brain Behav*, (14):200–208.

Venter JC1, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M. Shotgun sequencing of the human genome. *Science*. 1998 Jun 5;280(5369):1540-2

Vora, N. L., Robinson, S., Hardisty, E. E., & Stamilio, D. M. (2017). Utility of ultrasound examination at 10-14 weeks prior to cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 49(4), 465–469.

- Wang, Y., Chen, Y., Tian, F., Zhang, J., Song, Z., Wu, Y., Cheng, W. (2013). Maternal Mosaicism Is a Significant Contributor to Discordant Sex Chromosomal Aneuploidies Associated with Noninvasive Prenatal Testing. *Clinical Chemistry*, 60(1), 251–259.
- Wang, E., Batey, A., Struble, C., Musci, T., Song, K., & Oliphant, A. (2013). Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis*, 33(7), 662–666.
- Wang, S., Huang, S., Ma, L., Liang, L., Zhang, J., & Cram, D. S. (2015). Maternal X chromosome copy number variations are associated with discordant fetal sex chromosome aneuploidies detected by noninvasive prenatal testing. *Clinica Chimica Acta*, 444, 113–116.
- Wang, Y., Liu, X., Zhou, L., Duong, D., Bhuripanyo, K., Zhao, B., Yin, J. (2017). Identifying the ubiquitination targets of E6AP by orthogonal ubiquitin transfer. *Nature Communications*, 8(1).
- Wapner, R. J., Martin, C. L., Levy, B., Ballif, B. C., Eng, C. M., Zachary, J. M., Jackson, L. (2013). Chromosomal Microarray Versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 68(4), 276–278.
- Warren, W. B., Patrick, S. L., & Goland, R. S. (1992). Elevated maternal plasma corticotropin-releasing hormone levels in pregnancies complicated by preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*, 166(4):1198–1207.
- Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., & Schübeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics*, 37(8), 853–862.
- Weeber E, Levenson J, Sweatt J (2002). Molecular genetics of human cognition. *Mol Interv*. 2 (6):376–91, 339.
- Whitworth, M., Bricker, L., Neilson, J. P., & Dowswell, T. (2010). Ultrasound for fetal assessment in early pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. (4): CD007058.
- Wilson KL, Czerwinski JL, Hoskovec JM, Noblin SJ, Sullivan CM, Harbison A, Champion MW, Devary K, Devers P, Singletary CN. (2013). NSGC practice guideline: prenatal screening and diagnostic testing options for chromosome aneuploidy. *J Genet Couns*, 22: 4–15.
- Wolstenholme, J. (1996). Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. *Prenatal Diagnosis*, 16(6):511–24.

- Wulff, C. B., Gerds, T. A., Rode, L., Ekelund, C. K., Petersen, O. B., & Tabor, A. (2016). Risk of fetal loss associated with invasive testing following combined first-trimester screening for Down syndrome: a national cohort of 147 987 singleton pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 47(1), 38–44.
- Yaron Y. (2016). The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon. *Prenatal Diagnosis*, 36(5):391-6.
- Yu, B., Lu, B.-Y., Zhang, B., Zhang, X.-Q., Chen, Y.-P., Zhou, Q., Wang, H.-Y. (2017). Overall evaluation of the clinical value of prenatal screening for fetal-free DNA in maternal blood. *Medicine*, 96(27), e7114.
- Yu, S. C. Y., Chan, K. C. A., Zheng, Y. W. L., Jiang, P., Liao, G. J. W., Sun, H., Lo, Y. M. D. (2014). Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23), 8583–8588.
- Yu, S. C. Y., Jiang, P., Choy, K. W., Chan, K. C. A., Won, H.-S., Leung, W. C., Chiu, R. W. K. (2013). Noninvasive Prenatal Molecular Karyotyping from Maternal Plasma. *PLoS ONE*, 8(4), e60968.
- 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*, 2009;33:382 – 386.
- Zhang, H., Gao, Y., Jiang, F., Fu, M., Yuan, Y., Guo, Y., Wang, W. (2015). Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 45(5), 530–538.
- Zhao C. (2015). Detection of fetal subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Clinical Chemistry*, 61(4):608-16.
- Zheng Y., Wan S., Dang Y., Song, T., Chen, B., Zhang, J. (2019). Non-invasive prenatal testing for detection of trisomy 13, 18, 21 and sex chromosome aneuploidies in 8594 cases. *Ginekologia Polska*, 90(5):270-273.
- Zhou, X., Sui, L., Xu, Y., Song, Y., Qi, Q., Zhang, J., Liu, J. (2017). Contribution of maternal copy number variations to false-positive fetal trisomies detected by noninvasive prenatal testing. *Prenatal Diagnosis*, 37(4), 318–322.
- Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S. (2005). Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry*, 51:1598–604.

Zimmermann, B., Hill, M., Gemelos, G., Demko, Z., Banjevic, M., Baner, J., Rabinowitz, M. (2012). Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenatal Diagnosis*, 32(13), 1233–1241.