



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

**Ζιώγα Θ. Περσεφόνη**  
**Μοριακή Βιολόγος - Γενετίστρια**  
**«Cell-free Fetal DNA testing»**

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2016

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ  
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

### **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Επιβλέπων: Δαπόντε Αλέξανδρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Τομέας Μητέρας-Παιδιού, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλος: Σωτηρίου Σωτήρης, Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας, Τομέας Μορφολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλος: Γκαράς Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής – Γυναικολογίας, Τομέας Μητέρας-Παιδιού, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στους αγαπημένους μου γονείς

Στην κα. Αγλαΐα Παππά,

με σεβασμό

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Δαπόντε Αλέξανδρο Αναπλ. Καθ. Μαιευτικής – Γυναικολογίας και επιβλέπων της παρούσας εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να αναπτύξω ένα επίκαιρο και ενδιαφέρον θέμα για το Cell-free Fetal DNA testing, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, κ. Σωτηρίου Σωτήρη Επίκ. Καθ. Εμβρυολογίας και κ. Γκαρά Αντώνη Επίκ. Καθ. Μαιευτικής – Γυναικολογίας. Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την Δρ. Αγγελική Γεροβασίλη για την εμπύχωση της και την πολύτιμη βοήθειά της.

Θα ήταν λίγο ένα ευχαριστώ στους γονείς μου, Θωμά και Κωνσταντίνα για την πολύπλευρη υποστήριξή τους και τη διαρκή βοήθεια τους σε κάθε βήμα μου. Επίσης ευχαριστώ θερμά τους θείους μου Βάσω και Χρήστο Ηλία για τη συνεχή υποστήριξη τους και τον Χρήστο Μπαλάρη για την εμπύχωσή του.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	6
Summary .....	7
<b>A. Εισαγωγή .....</b>	<b>8</b>
<b>B. Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος (screening test) .....</b>	<b>9</b>
<b>Γ. Ελεύθερα νουκλεϊκά οξέα .....</b>	<b>12</b>
<b>Δ.1. Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στη μητρική κυκλοφία .....</b>	<b>13</b>
<b>Δ.2. Μέθοδοι .....</b>	<b>15</b>
<b>Δ.3. Σήμερα (ως δοκιμασία διαλογής) .....</b>	<b>16</b>
Δ.3.1. Μεθοδολογία MPS .....	18
Δ.3.2. Μεθοδολογία t-MPS .....	21
Δ.3.3. Μεθοδολογία SNPs .....	22
<b>Δ.4. Τρισωμίες .....</b>	<b>25</b>
<b>Δ.5. Πιο σπάνιες ανευπλοειδίες .....</b>	<b>26</b>
<b>Δ.6. Ανευπλοειδίες φυλετικών χρωμοσωμάτων .....</b>	<b>27</b>
<b>Δ.7. Μικροελλειπτικά σύνδρομα .....</b>	<b>28</b>
<b>Δ.8. Τριπλοειδίες .....</b>	<b>30</b>
<b>Δ.9. Κλινικές εφαρμογές .....</b>	<b>31</b>
Δ.9.1. Στη διάγνωση του συστήματος RhD του εμβρύου .....	31
Δ.9.2. Στη διάγνωση γενετικών μονογονιδιακών ασθενειών .....	33
Δ.9.3. Προσδιορισμός του φύλου του εμβρύου .....	34
<b>E. Συμπεράσματα .....</b>	<b>35</b>
<b>Στ. Βιβλιογραφία .....</b>	<b>37</b>

## Περίληψη

Η κύηση είναι μία από τις ομορφότερες φάσεις που μπορεί να διανύει μία γυναίκα, όμως υπάρχει η αγωνία για το αν το έμβρυο είναι υγιές. Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος του 1<sup>ου</sup> τριμήνου για τρισωμίες έχει καθιερωθεί στην καθημερινή κλινική πράξη από το 1970 και περιλαμβάνει την ηλικία της μητέρας, βιοχημικούς δείκτες και υπερηχογραφικά ευρήματα. Αν η κύηση ανήκει στις υψηλού κινδύνου, προτείνεται να γίνει επεμβατικός έλεγχος, αμνιοπαρακέντηση ή λήψη χοριακών λαχνών που όμως έχουν ρίσκο αποβολής. Το 1997 εντοπίστηκε για πρώτη φορά εμβρυϊκό DNA στο μητρικό πλάσμα και ορό χρησιμοποιώντας μια αλληλουχία στο Y χρωμόσωμα σαν δείκτη για τη διάγνωση εγκύων με αγόρια με PCR. Το 1998 ακολούθησε η πρώτη εφαρμογή του cffDNA για το σύστημα RhD και ακολούθησαν πολλές μελέτες για το εμβρυϊκό DNA. Σήμερα οι μέθοδοι που βασίζονται τα εμπορικά τεστ είναι η μαζική παράλληλη αλληλούχιση (MPS), στοχευμένη αλληλούχιση (t-MPS) και πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs). Κυρίως το τεστ εφαρμόζεται για τις κοινές τρισωμίες (21, 18, 13) με ποσοστό ανίχνευσης για το Down να είναι >99% με ψευδώς θετικά ποσοστά 0.4%. Υψηλά ποσοστά ανίχνευσης εμφανίζει και στις δίδυμες κυήσεις με τεχνικές MPSS και CSS. Εκτός από τις κοινές τρισωμίες έχει εφαρμογή και σε πιο σπάνιες (T18, T19) αλλά και σε φυλετικές ανευπλοειδίες με τεχνικές MPS και SNP. Επίσης ανιχνεύονται μικροελλειπτικά σύνδρομα με τεχνικές CMA και FISH καθώς και τριπλοειδίες με SNPs. Κλινική εφαρμογή παρουσιάζει για το σύστημα Rhesus, διάφορες γενετικές ασθένειες (όπως Β-θαλασσαιμία) και τον προσδιορισμό φύλου. Το τεστ συστήνεται από κολλέγια και εταιρίες της Ευρώπης, Αμερικής και Ασίας κυρίως για κυήσεις υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου. Βέβαια λόγω της υψηλής θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας αποτελεί έλεγχο διαλογής και όχι διαγνωστικό τεστ, άρα θετικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με επεμβατικό τεστ.

## Summary

Pregnancy is one of the most beautiful periods that a woman can cover, but there is the anguish about the embryos health. The non-invasive prenatal testing of the first trimester has been established to the every day clinical action since 1970, and includes mothers age, biochemical biomarkers and the ultrasound findings. If the pregnancy belongs to the high risk pregnancies, it is suggested to be done an invasive test, such as amniocentesis or chorionic villus sampling (CVS), but there is also the risk of miscarriage. For the first time in 1997 there was found embryos DNA into mothers plasma and serum, using a sequence to the Y chromosome as an marker for the diagnosis of pregnancies to buys with PCR. In 1998 for the first time was putting practice the cffDNA for the RhD system and following many studies for the embryos DNA. Nowadays, the methods that the commercial tests are based on, are the Mass Parallel Sequence (MPS), the targeting sequence (t-MPS), and the Single Nucleotide Polymorphism (SNPs). The test is mostly applicable to the common trisomies (21, 18, 13) approaching a percentage of detection the Down syndrome, to the 99% and the false positive results the percentage of 0.4%. There are also high detecting percentages to the twin pregnancies through the MPS and SNP techniques. A part from the common trisomies it is also applicable to more rate (T18, T19) but also to the sex chromosome abnormalities through MPS and SNP. There are also detected microdeletions syndromes with CMA and FISH techniques as well as triploidy with SNPs. Clinical applications bring out for the Rhesus system several genetical diseases ( $\beta$ -thalassemia) and the sex determination. The test is suggested from colleges and caupanies all through Europe, US and Japan, especially to high and intermediate risk pregnancies. Due to its high positive and negative prediction value it constitutes a selection test and not a diagnosis test, therefore the positive results must be confirmed through invasive test.

## A. Εισαγωγή

Η διάρκεια της κύησης είναι μία από τις ομορφότερες περιόδους που μπορεί να διανύει μία γυναίκα που όμως επισκιάζεται από άγχος για την υγεία του αγέννητου παιδιού. Κυρίως το σύνδρομο Down (τρισωμία 21) αποτελεί πηγή άγχους, αποτελώντας την πιο συχνή αιτία διανοητικής καθυστέρησης σε παιδιά σχολικής ηλικίας. Η προγεννητική διάγνωση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών σήμερα είναι δυνατή με λήψη εμβρυϊκών κυττάρων με επεμβατικές μεθόδους όπως η αμνιοπαρακέντηση και η λήψη χοριακών λαχνών. Λόγω όμως του κινδύνου αυτόματης αποβολής χρησιμοποιούνται μόνο σε περιπτώσεις γυναικών υψηλού κινδύνου για χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες δοκιμασίες- τεστ, ώστε να καταδεικνύεται με ασφάλεια η ομάδα 'υψηλού κινδύνου' (Tabor A. et al., 1986).

Στις μέρες μας, ο προγεννητικός έλεγχος πραγματοποιείται σε συνδυασμό με μαθηματικές σχέσεις με πληροφορίες, όπως η ηλικία της μητέρας, τα υπερηχογραφικά ευρήματα αλλά και τα επίπεδα βιοχημικών δεικτών στο μητρικό αίμα. Πρέπει όμως να επισημανθεί ότι οι παραπάνω δοκιμασίες δεν είναι διαγνωστικές, μπορούν όμως να αλλάξουν τις πιθανότητες για χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Είναι γεγονός πως ο κίνδυνος για κάθε γυναίκα ηλικίας άνω των 36 ετών είναι μικρότερος από μια γυναίκα 26 ετών.

Η πλειοψηφία των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που ανιχνεύονται στα προγεννητικά δείγματα είναι κυρίως οι τρισωμίες 21, 18, 13 που φαινοτυπικά αντιστοιχούν στο σύνδρομο Down, στο σύνδρομο Edwards και στο σύνδρομο Patau, και οι φυλετικές χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες που αντιστοιχούν στα σύνδρομα Turner (XO) Klinefelter' s (XXY).



## B. Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος (screening test)

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος στη δεκαετία του 1970 περιελάβανε την ηλικία της μητέρας και στη δεκαετία του 80s βιοχημικούς δείκτες στον μητρικό ορό και υπερηχογραφικά ευρήματα στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης. Στη δεκαετία του 1990 δίνεται έμφαση στο 1<sup>ο</sup> τρίμηνο και γίνεται γνωστό πως μεγάλο ποσοστό των εμβρύων με ανευπλοειδίες εντοπίζονται με συνεκτίμηση της μητρικής ηλικίας, της μέτρησης της αυχενικής διαφάνειας (NT), την β-hCG και την PAPP-A. Την τελευταία δεκαετία έχουν προστεθεί υπερηχογραφικοί δείκτες στο 1<sup>ο</sup> τρίμηνο που βελτιώνουν το ποσοστό ανίχνευσης ανευπλοειδιών και μειώνουν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Nikolaides KH, 2011).

Η PAPP-A είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 400KDa, στο πλάσμα έγκυων γυναικών και εκκρίνεται ως ένα ομοδιμερές δισουλφιδικού δεσμού. Παράγεται από τη συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα και αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα του παράγοντα insulin-like factor. Εκφράζεται από τα κοκκώδη κύτταρα των ωοθηκών αλλά και από μη-αναπαραγωγικούς ιστούς, όπως τους οστεοβλάστες. Η β-hCG είναι ετεροδιμερές α- και β- υπομονάδας που παράγεται από κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης.

Το πρόγραμμα προγεννητικού ελέγχου που στηρίζεται στην ανάλυση βιοχημικών δεικτών στο μητρικό ορό για τρισωμίες στο πρώτο και δεύτερο τρίμηνο της κύησης, έχει καθιερωθεί στη μαιευτική πρακτική στο σύστημα υγείας πολλών χωρών. Από τους βιοχημικούς δείκτες που έχουν μελετηθεί υψηλή προγνωστική αξία φαίνεται να έχει η ανθρώπινη β-χοριακή γοναδοτροπίνη (serum free β-human chorionic gonadotropin-β-hCG) και η συνδεμένη πρωτεΐνη του πλάσματος Α (Pregnancy-associated plasma protein-PAPP-A). Συγκεκριμένα μειωμένα επίπεδα της PAPP-A πριν την 14<sup>η</sup> εβδομάδα σχετίζεται αυξημένη κίνδυνο για εμφάνιση τρισωμίας 21 και 18, ενώ αυξημένα επίπεδα της hCG σχετίζονται με την τρισωμία 21.

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος του 1<sup>ου</sup> τριμήνου για τις τρισωμίες 21, 18 και 13 περιλαμβάνει τη μητρική ηλικία, τη μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας (NT), τον εμβρυϊκό καρδιακό ρυθμό (fetal heart rate-FHR), την χοριακή γοναδοτροπίνη, την

α- πρωτεΐνη του πλάσματος. Αυτός ο συνδυασμός μπορεί να ανιχνεύσει περίπου το 90% των περιπτώσεων με τρισωμία 21 και το 95% εκείνων με τρισωμία 18 και 13 με ποσοστό ψευδώς θετικών (false positive rate-FPR) αποτελεσμάτων περίπου 5% (Nikolaides KH, 2011; Kagan KO et al., 2008). Τα ποσοστά ανίχνευσης μπορούν να αυξηθούν με την ενσωμάτωση στον έλεγχο της αιματικής ροής στον φλεβικό πόρο (DV PIV), του παράγοντα αύξησης του πλακούντα (PLGF) και της α-εμβρυϊκής πρωτεΐνης (AFP). Ο έλεγχος των δεικτών AFP και PLGF μπορεί να πραγματοποιηθεί στο ίδιο δείγμα με την β-hCG και PAPP-A από αυτοματοποιημένα μηχανήματα με μικρό επιπλέον κόστος. Επιπλέον η μέτρηση της DI PIV μπορεί να είναι χρήσιμη για τον προσυμπτωματικό έλεγχο για σοβαρών συγγενών καρδιακών ανωμαλιών (Chelemen T, et al, 2011; Beta J, et al, 2011).

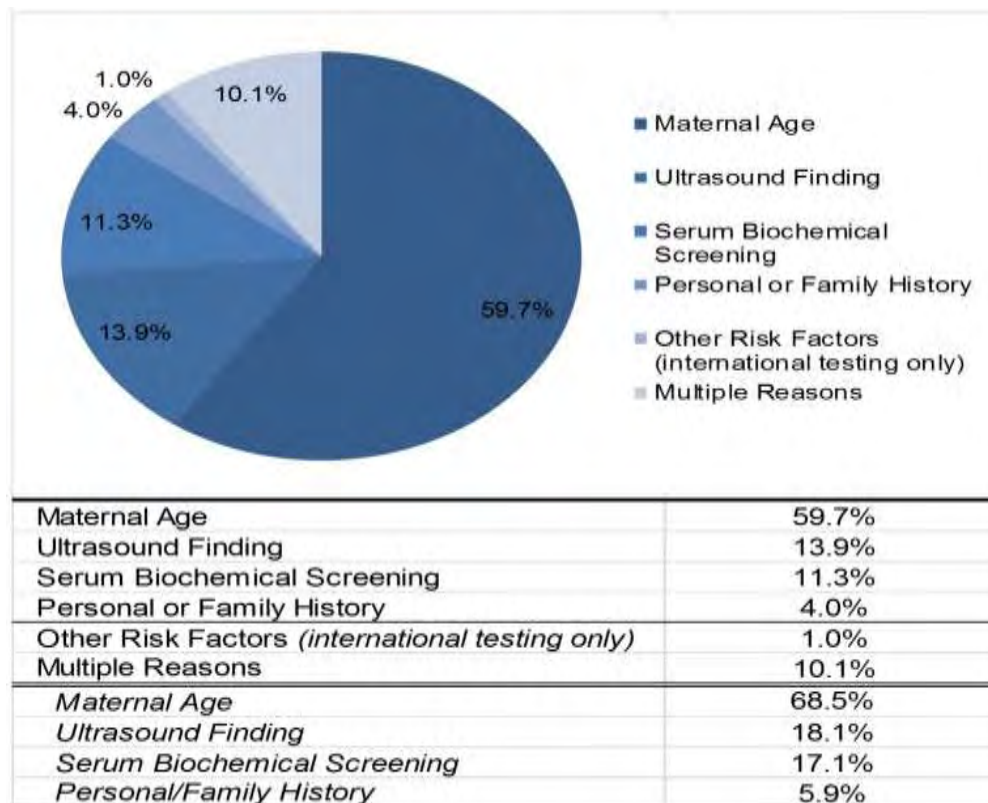
Ένας άλλος δείκτης είναι η μέτρηση με τη βοήθεια υπερήχων της εμβρυϊκής αυχενικής διαφάνειας (NT), όπου το 1992 το screening test αναπτύχθηκε από τον Κ. Νικολαΐδη. Είναι μέθοδος όπου ανιχνεύονται ανατομικές ανωμαλίες (όπως απουσία νεφρών, δυσχερής ράχη), αλλά δεν παρέχει πληροφορίες για τη γενετική σύσταση του εμβρύου. Στηρίζεται στην εμφάνιση μιας ποσότητας υγρού κάτω από το δέρμα πίσω από τον εμβρυϊκό αυχένα κατά το πρώτο τρίμηνο μεταξύ 11 και 13<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης (Nikolaides KH, et al., 1992). Η πλειοψηφία των εμβρύων με τρισωμία 21 έχουν αυξημένη μέτρηση της NT, όταν συγκρίνονται με φυσιολογικά έμβρυα της ίδιας ηλικίας κύησης.

Ο στόχος αυτών των προγραμμάτων ανίχνευσης (screening) είναι ο εντοπισμός των γυναικών που έχουν αυξημένο κίνδυνο για την απόκτηση παιδιών που φέρουν τρισωμία 21 (syndrome Down), τρισωμία 13 (Patau syndrome) και τρισωμία 18 (Edward syndrome). Σημαντικός παράγοντας είναι η ηλικία της μητέρας, που όσο προχωράει αυξάνεται ο κίνδυνος για το σύνδρομο Down (Snijders RJM et al., 1999), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1. Σε γυναίκες άνω των 35 ετών συστήνεται επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος με πιο συχνή τη μέθοδο της αμνιοπαρακέντησης με κίνδυνο αυτόματης έκτρωσης του εμβρύου με μέσο όρο 1/200 περιπτώσεις (Wilson RD, 2005), ενώ πιο πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν κίνδυνο 1/1000

(Akolekar R et al, 2015). Σημειώνεται πως η αμνιοπαρακέντηση 2<sup>ου</sup> τριμήνου είναι πιο ασφαλής απ' ό τι σε πιο αρχικά στάδια και τη βιοψία τροφοβλάστης.

Λόγω του χρόνου που απαιτείται για πλήρη χρωμοσωμική ανάλυση, ορισμένα εργαστήρια εκτελούν ταχεία δοκιμή ανευπλοειδίας (rapid aneuploid test- RAT) με τεχνικές της μοριακής γενετικής, επιπρόσθετα με τον καρυότυπο. Στις τεχνικές αυτές περιλαμβάνονται οι: in situ υβριδισμός (FISH) (Evans MI et al., 1999; Vialard F et al., 2011), ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης φθορισμού (QF-PCR) (Mann K et al., 2012) και η (Multiplex ligation-dependent amplification, MLPA) (Gerdes T et al., 2008). Αν και οι παραπάνω μέθοδοι έχουν αποδειχθεί αξιόπιστες, συστήνονται οι μέθοδοι κλασσικής κυτταρογενετικής για επιβεβαίωση (Test and Technology Transfer Committee, 2000). Εκτός από την κλασσική κυτταρογενετική, σε κινήσεις υψηλού κινδύνου χρησιμοποιούνται και άλλες μοριακές τεχνικές, όπως οι aCGH (ανίχνευση μη-ισορροπημένων δομικών και αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών), οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί SNP και Copy Number Variations- CNVs.

Λόγω αυτού του κινδύνου το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό του κινδύνου απόκτησης παιδιού με συγγενείς ανωμαλίες, γίνεται με τον μη- επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Σε κάθε περίπτωση οι γονείς θα πρέπει να ενημερώνονται πλήρως για τους κινδύνους και τα οφέλη όλων των μεθόδων.



**Εικόνα 1.** Κλινική έρευνα για τον μη-επεμβατικό έλεγχο. Προχωρημένη ηλικία μητέρας σε μονήρεις κυήσεις ορίζονται τα 35 έτη, σε δίδυμες τα 32 έτη και σε τρίδυμες τα 27 (McCullough et al, 2014).

## Γ. Ελεύθερα νουκλεϊκά οξέα

Ο όρος ελεύθερο νουκλεϊκό οξύ (ελεύθερο εξωκυτταρικό DNA-cfDNA ή ελεύθερο εξωκυτταρικό RNA-cfRNA) αναφέρεται σε μόρια DNA ή RNA εκτός κυτταρικού πυρήνα, χωρίς φυσιολογική δομή, τα οποία ανιχνεύονται στο πλάσμα ή στον ορό δηλαδή σε μη-κυτταρικό κλάσμα του περιφερικού αίματος. Τα ελεύθερα νουκλεϊκά οξέα παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στο περιφερικό αίμα υγιών αλλά και ασθενών το 1948 από τους Mandel και Metais πριν ακόμη και από την ανακάλυψη της δομής της διπλής έλικας του DNA (Mandel P. and P. Metais, 1948).

## Δ1. Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στη μητρική κυκλοφορία

### I. Ιστορικά στοιχεία

Το 1997 ο Lo et al., διαπίστωσε την παρουσία εξωκυττάριου ελεύθερου DNA εμβρυϊκής προέλευσης (cell free fetal DNA- cffDNA) στον ορό και το πλάσμα εγκύων με ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών του Y σε ποσοστό 80% των εγκύων που κυοφορούσαν έμβρυο αγόρι (Lo Y.M. et al., 1997). Το 1998 πραγματοποιήθηκε η πρώτη κλινική εφαρμογή μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης του συστήματος RhD στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης από cffDNA που απομονώθηκε από το πλάσμα εγκύων (Lo Y.M. et al., 1998(a)). Στη συνέχεια η ύπαρξή του στο περιφερικό αίμα εγκύων επιβεβαιώθηκε από διάφορες επιστημονικές ομάδες και έδωσε νέες δυνατότητες ανάπτυξης μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου (Honda H. et al., 2002). Το cffDNA ανιχνεύεται πολύ νωρίς στη μητρική κυκλοφορία κατά την κύησης (έχει ανιχνευθεί ακόμα και την 18<sup>η</sup> ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά σε περιστατικά υποβοηθούμενης αναπαραγωγής) και αποτελείται κυρίως από μικρά θραύσματα DNA, 80% των οποίων έχουν μέγεθος <200bp (Guibert J. et al., 2003; Chan K.C. et al., 2004). Ο Lo et al. με τη χρήση RTQ-PCR για την ανίχνευση αλληλουχιών του γονιδίου SRY στο χρωμόσωμα Y στο πλάσμα εγκύων που κυοφορούσαν έμβρυο αγόρι, έδειξε ότι το cffDNA αντιπροσωπεύει κατά μέσο όρο ποσοστό 3% (εύρος 0.4-12%) έως 6% (εύρος 2.3-11.5%) του συνολικού cfDNA στο πλάσμα της εγκύου στο 1<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης αντιστοίχως (Lo Y.M. et al., 1998(b)).

Σε μεταγενέστερες μελέτες με νεότερες και πιο ευαίσθητες τεχνικές υποστηρίζεται ότι η πραγματική συγκέντρωσή του στη μητρική κυκλοφορία είναι μεγαλύτερη από αυτή που αρχικά υπολογίστηκε και ανέρχεται περίπου σε ποσοστό 10% του συνολικού cfDNA (Lun F.M. et al., 2008). Η απόλυτη συγκέντρωσή του επηρεάζεται από το σωματικό βάρος και την εθνικότητα. Λιγότερο cffDNA στις γυναίκες με μεγαλύτερο σωματικό βάρος (>77Kg) κατά 26.5% αλλά και ακόμη καλύτερα με το BMI αλλά δεν βρέθηκε συσχέτιση με άλλες παραμέτρους, όπως μητρική ηλικία και κάπνισμα (Gerovassili A et al, 2007). Αυξάνει σημαντικά με την πρόοδο της κύησης και κυμαίνεται από 16 γενετικά ισοδύναμα/ml περιφερικού αίματος το 1<sup>ο</sup> τρίμηνο

έως 80 γενετικά ισοδύναμα/ml το 3<sup>ο</sup> τρίμηνο με εντυπωσιακή αύξηση μετά την 8<sup>η</sup> εβδομάδα (Birch L et al., 2005; Hahs S et al., 2001; Lo Y.M et al, 1999(a)).

Μεταβολές στη συγκέντρωσή του στο περιφερικό αίμα έχουν παρατηρηθεί σε κύησεις εμβρύων με αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και σε επιπλοκές της κύησης που σχετίζονται με ανώμαλη πλακουντοποίηση, όπως η προεκλαμψία (Lo Y.M et al., 1999(a); Leung T.N et al., 2001; Lo Y.M et al., 1999(b)). Εκτός από την προεκλαμψία αλλαγές των επιπέδων του cffDNA έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες επιπλοκές, όπως ο πρόωρος τοκετός, επεκτατικός σχεδιασμός του πλακούντα, εμβρυομητρική αιμορραγία και πολυυδράμνιο. Για το λόγο αυτό έχει προταθεί το cffDNA ως δείκτη για την παρακολούθηση κύησεων υψηλού κινδύνου και για την εμφάνιση επιπλοκών της κύησης σε χαμηλού κινδύνου ασυμπτωματικές εγκύους (Farina A et al, 2004; Leung T.N et al, 1998). Το γεγονός όμως ότι η συγκέντρωση του cffDNA στο πλάσμα της εγκύου ποικίλει και σχετίζεται με την ηλικία της κύησης, την εθνικότητα και το σωματικό βάρος της εγκύου θέτει υπό αμφισβήτηση τη χρησιμοποίηση του ποσοτικού προσδιορισμού του cffDNA ως δείκτη για την παρακολούθηση της κύησης (Wataganara T et al., 2004; Gerovassili A et al., 2006; Hahs S et al, 2001).

## II. Προέλευση του cffDNA

Οι αποδείξεις για την προέλευση του cffDNA από τον πλακούντα προέρχονται από κλινικές μελέτες σε παθολογικές κύησεις. Συγκεκριμένα οι αποδείξεις προήρθαν από κύησεις, στις οποίες ο πλακούντας είχε διαφορετικό γονότυπο από το έμβρυο, γνωστό ως φαινόμενο μωσαϊκισμού (Confined Placental Mosaicism- CPM). Σε μελέτη των Faas et al, αναφέρεται κύηση όπου τα κύτταρα της τροφοβλάστης είχε γονότυπο 45,X, ενώ ο μεσεγγυματικός ιστός είχε 46,XX. Το cffDNA στο μητρικό πλάσμα είχε γονότυπο 45, X, άρα έχει προέλευση από την τροφοβλάστη (Faas BH et al, 2012). Επιπλέον αποδείξεις για την προέλευση του, προήρθαν μετά από τη θεραπεία με laser, του συνδρόμου μετάγγισης από δίδυμο σε δίδυμο, σχετίζεται με αύξηση των επιπέδων του cffDNA (Wataganara T et al, 2005).

Ο πλακούντας είναι ένα 'δυναμικό όργανο' όπου, ο φυσιολογικός κύκλος απόπτωσης ξεκινά με πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων της τροφοβλάστης και συγχωνεύονται με τη συγκυτιοτροφοβλάστη. Ακολουθεί διαφοροποίηση και απελευθέρωση των αποπτωτικών κυττάρων στο μητρικό πλάσμα, χωρίς να προκαλούν φλεγμονή σε φυσιολογικές κυήσεις (Huppertz and Kingdom, 2004).

## **Δ2. Μέθοδοι**

Το DNA που απομονώνεται είναι ένα μείγμα μητρικού και εμβρυϊκού DNA σε αναλογίες που αλλάζουν όσο προχωράει η κύηση. Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA και RNA ανευρίσκεται σε χαμηλά ποσοστά σε σύγκριση με τα ελεύθερα νουκλεϊκά οξέα της μητέρας στη μητρική κυκλοφορία. Γι' αυτό έχουν προταθεί τεχνικές για την ενίσχυση των εμβρυϊκών τμημάτων. Σήμερα στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται τρεις τεχνικές για την αλληλούχηση, δηλαδή η μαζική παράλληλη αλληλούχηση σε ολόκληρο το γονιδίωμα (MPS) ή στοχευμένα σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα (CSS) και οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) (Zimmermann et al, 2012). Η αναγκαιότητα για την ανάπτυξη ενός τεστ που να στηρίζεται στους πολυμορφισμούς του DNA αποδείχθηκε πρώτη φορά από τους Dhallan et al. Με αποτελέσματα κλινικών μελετών αποδεικνύεται υψηλή ακρίβεια των εμβρυϊκών ανευπλοειδιών με το πρόγραμμα μαζικής παράλληλης αλληλούχησης (massively parallel sequencing-MPS) του cfDNA στο μητρικό πλάσμα (Blanchi DW et al., 2012; Palomaki GE et al., 2011; Norton ME et al., 2012). Με αποτέλεσμα ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος να εισαχθεί στα κλινικά εργαστήρια στις Ηνωμένες Πολιτείες στα τέλη του 2011.

Η Parageorgiou et al, χρησιμοποίησε την τεχνική της ανοκατακρήμνισης του μεθυλιωμένου DNA (MeDiP) σε συνδυασμό με μικροσυστοιχίες και ταυτοποίησαν περισσότερους από 2000 γενετικούς τόπους με διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης στο περιφερικό αίμα από τον πλακούντα (Parageorgiou EA et al, 2009). Στη συνέχεια ανέπτυξαν τεχνική μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης του συνδρόμου Down,

η οποία βασίζεται στο ποσοτικό προσδιορισμό στο περιφερικό αίμα εγκύων της αναλογίας εμβρυϊκών αλληλουχιών σε θέσεις του χρωμοσώματος 21 που παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης μεταξύ μητέρας εμβρύου, με RTQ-PCR. Η μέθοδος MeDiP χρησιμοποιεί ειδικό αντίσωμα για το 5- methycytidine για να δεσμεύσει μεθυλιωμένες περιοχές και να εμπλουτίσει το εμβρυϊκό μεθυλιωμένο DNA. Μελέτη δειγμάτων περιφερικού αίματος από 80 εγκύους στο 1<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης, απ' τις οποίες 34 είχαν έμβρυο με τρισωμία 21 και 46 έμβρυα χωρίς χρωμοσωμική ανωμαλία, έδειξε ότι η μέθοδος είχε 100% ακρίβεια και 100% ευαισθησία στη διάγνωση του συνδρόμου Down. Αναμένονται με ενδιαφέρον τα αποτελέσματα της μεθόδου σε κλινικό επίπεδο (Parageorgiou EA et al, 2011).

### **Δ.3. Σήμερα (ως δοκιμασία διαλογής)**

Το Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA test θεωρείται δοκιμασία διαλογής (screening test) και όχι διαγνωστική εξέταση. Αυτό σημαίνει πως ένα θετικό αποτέλεσμα θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με επεμβατική εξέταση, όπως αμνιοπαρακέντηση ή βιοψία χοριακών λαχνών (Dondorp W et al., 2015). Γι' αυτό θα πρέπει οι γενετιστές να πληροφορούν σχετικά με τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς του τεστ. Αυτή τη στιγμή είναι μία πολλά υποσχόμενη εξέταση σε εγκυμοσύνες που χαρακτηρίζονται υψηλού κινδύνου (high risk) μόνο για τις τρισωμίες 21 και 18. Η χρήση του συστήνεται από το Αμερικάνικο Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (ACOG), Αμερικάνικο Κολλέγιο Ιατρικής Γενετικής (ACMG) και Διεθνούς Εταιρείας για την Προγεννητική Διάγνωση (Benn et al, 2013). Σε μονήρεις κυήσεις στο αίμα της μητέρας παρέχει ποσοστά ανίχνευσης (DR) για τις τρισωμίες 21, 18, 13 περίπου 99%, 97% και 92% αντίστοιχα με ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (FPR) 0,4% (Gill MM et al., 2014). Για τις συγκεκριμένες ανευπλοειδίες το τεστ είναι εμπορικά διαθέσιμο από το 2011.

Απευθύνεται σε γυναίκες που επιθυμούν να αποφύγουν επεμβατικές διαγνωστικές εξετάσεις και όταν το υπερηχογράφημα είναι φυσιολογικό (Manegold-Brauer G, et al., 2015). Η ανάλυση χρωμοσωμάτων από αμνιακό υγρό (αμνιοπαρακέντηση), που



γίνεται την 16<sup>η</sup> εβδομάδα, θεωρείται ως ο «χρυσός κανόνας» στον προγεννητικό έλεγχο, διότι τα ποσοστά σφάλματος κυμαίνονται μεταξύ 0,01-0,02% και φαίνεται να οφείλεται στην επιμόλυνση από μητρικά κύτταρα ή εργαστηριακό σφάλμα (Benn PA, 2010). Τα ποσοστά σφάλματος με το CVS (11<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης) είναι υψηλότερα από εκείνα που παρατηρούνται στην αμνιοπαρακέντηση είτε λόγω του φαινομένου του μωσαϊκισμού (Confined Placental Mosaicism- CPM), είτε λόγω μητρικής επιμόλυνσης, είτε χαμηλής ανάλυσης ζωνών των χρωμοσωμάτων (Ledbetter DH et al., 1992). Σε ένα μικρό ποσοστό περιπτώσεων όπου πραγματοποιήθηκε CVS, χρειάστηκε είτε επανάληψη της εξέτασης είτε αμνιοπαρακέντηση, λόγω διφορούμενων αποτελεσμάτων.

Σε μελέτη που έγινε από τους Gil et al, ομάδα γυναικών που ανήκουν στις υψηλού κινδύνου (> 1/100) κύσεις το 40% επέλεξε CVS, το 57.3% το cffDNA test και το 3% δεν έκανε περαιτέρω διερεύνηση. Η επιλογή μεταξύ της CVS και του cffDNA βασίζεται επηρεάζεται από τη γονική άποψη σχετικά με τεχνικές που μπορούν να επηρεάσουν την κύηση και 15 στις 16 γυναίκες με έμβρυο με τρισωμία 21 επέλεξαν διακοπή της κύησης. Επιπλέον λόγω των πολιτιστικών αντιλήψεων, οι Άφρο-Καραϊβικής φυλής είναι πιο αντίθετες από όσες ήταν Καυκάσιας φυλής. Από την ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου (1/101-1/2500) το 92% επέλεξε το cffDNA τεστ, ενώ το 8% δεν επέλεξε επιπλέον διερεύνηση (Gil et al, 2014).

Αρκετές μοριακές τεχνικές έχουν προταθεί για την ανίχνευση διάφορων ανευπλοειδιών. Οι πρώτες μελέτες που αφορούν τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο επικεντρώθηκε στην ποσοτικοποίηση αρσενικών cffDNA αλληλουχιών σε δείγμα μητρικού πλάσματος με Real-time PCR (q-PCR) (πραγματικού χρόνου) (Lo YM et al, 1999a; Ohashi et al, 2001; Lee et a, 2002)

Αυξημένα επίπεδα της χοριακής γοναδοτροπίνης στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης μετά από τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης (In Vitro Fertilization-IVF) μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένα ψευδώς θετικά αποτελέσματα στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Σε μελέτη των Pan et al, μετρήθηκαν τα επίπεδα του cffDNA με RT-PCR αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y σε σύγκριση με άλλους δείκτες, όπως α-φετοπρωτεΐνη, οιστρόλη, HCG, και ανασταλίνη A. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση

μεταξύ cffDNA και δεικτών του ορού, οπότε οι τεχνικές εξωσωματικές γονιμοποίησης δεν επηρεάζουν τα επίπεδα του cffDNA, που είναι ανεξάρτητο των παραδοσιακών δεικτών screening, όπως HCG, γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς κάποια τροποποίηση (Pan et al, 2005).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2015 με τεχνική που βασίζεται σε κύκλους PCR (καλείται BEAMing), εντοπίστηκε εμβρυϊκό DNA στο αίμα ασθενών που κατέφυγαν στην εξωσωματική γονιμοποίηση σε 2 έως 6 εβδομάδες (κύηση 4-8 εβδομάδων) μετά την εμβρυομεταφορά (Karakas et al, 2015).

### Δ.3.1. Μεθοδολογία MPS

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην καταμέτρηση μεγάλων τμημάτων DNA απ' το πλάσμα του δείγματος. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα μαζικής παράλληλης αλληλούχισης εκατομμύρια τμήματα τόσο εμβρυϊκών, όσο και μητρικών αλληλουχιών, αλληλουχείται ταυτόχρονα και δεδομένου ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα είναι γνωστό, κάθε κομμάτι χαρτογραφείται σε διακριτή θέση και τοποθετείται στο χρωμόσωμα απ' το οποίο προήρθε, οπότε δείχνει κάθε τμήμα εμβρυϊκού DNA από που προέρχεται. (Fan et al, 2008; Chiu RW et al, 2008).

Πρέπει να αναφερθεί πως αν υπάρχει τρισωμία 21 η ποσοτική διαφορά θα είναι μικρή. Για παράδειγμα στην τρισωμία 21 το ποσοστό του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα είναι 20%, η σχετικά περίσσεια σε θραύσματα του χρωμοσώματος 21 DNA θα είναι  $(0.8 \times 2) + (0.2 \times 3) = 2.2$  σε σχέση με την κατάσταση για ένα έμβρυο που είναι φυσιολογικό  $(0.8 \times 2) + (0.2 \times 2) = 2$ , δηλαδή μια σχετική αύξηση στον αριθμό του χρωμοσώματος 21, 10%. Σε ένα υψηλής ακρίβειας σύστημα βιοπληροφορικής το λογισμικό λαμβάνει υπόψη το γεγονός ότι διαφορετικά χρωμοσώματα έχουν διαφορετικές αναλογίες G-C ζεύγη βάσεων (σε αντίθεση με τα ζεύγη βάσεων AT). Το χρωμόσωμα 21 περιέχει GC και AT πλούσια τμήματα ίση αναλογία, γι' αυτό αυτή η διαδικασία δεν είναι απαραίτητη. Ενώ η ανάλυση των χρωμοσωμάτων 13 και 18 έχει σημαντικά υψηλότερες αναλογίες GC και είναι ζωτικής σημασίας.

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφράζονται ως z-score που αντιπροσωπεύει πόσο διαφέρει το ποσοστό των αλληλουχιών του χρωμοσώματος 21 στο εξεταζόμενο δείγμα από τα μέσα επίπεδα σε ένα δείγμα αναφοράς και εκφράζεται σε διάμεση απόλυτη απόκλιση (MAD).

$$Z(\text{chr } n)_{\text{sample}} = \frac{(\text{Chr } n)_{\text{sample}} - \text{Median}(\text{Chr } n)_{\text{reference}}}{\text{MAD}(\text{Chr } n)_{\text{reference}}}$$

Ένα z-score κάτω από 3 συνήθως παρατηρείται σε κυήσεις κάτω χωρίς εμβρυϊκή τρισωμία 21, σε αυτή την περίπτωση η κατανομή z-score αντιστοιχεί στην κανονική κατανομή Gauss. Ενώ ένα z-score > ή = 3 σημαίνει πως η τιμή στο δείγμα υπερβαίνει τη μέση απόλυτη τιμή που σημαίνει ότι το χρωμόσωμα 21 εκπροσωπείται σε στατιστικά μη φυσιολογικές ποσότητες που συνήθως δηλώνει την παρουσία της τρισωμίας 21. Αλλά τα αποτελέσματα μπορεί να εκφράζονται και ως θετικά ή αρνητικά. Μια παραλλαγή της στατιστικής ανάλυσης υπολογίζει δύο Student t-test, με βάση την υπόθεση ότι το αποτέλεσμα είναι από ένα ευπλοειδικό έμβρυο και το άλλο ότι είναι από ένα ανευπλοειδικό έμβρυο και στη συνέχεια υπολογίζεται ένα επιπλέον test statistics, L, το οποίο είναι λογαριθμική πιθανότητα (Dan S et al, 2012). Αυτή η μέθοδος δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα για τις τρισωμίες 21, 18, 13 και φυλετικές ανευπλοειδίες με χαμηλό ποσοστό αποτυχίας (<2%). Επιπλέον ορισμένες εταιρίες έχουν αναλάβει δοκιμές που περιλαμβάνουν μικροελλειπτικά σύνδρομα, όπως το σύνδρομο DiGeorge. Υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο τεστ από τέσσερις εταιρίες. Από την Sequenom (MaterniT Genome, MaterniT21Plus και VisibiliT), την Illumina (Verifi) τη Roche (Harmony) και την BGI (NIFTY).

- **MaterniT Genome**

Αναλύει όλα τα χρωμοσώματα παρέχοντας τις περισσότερες πληροφορίες που είναι διαθέσιμες μέχρι σήμερα από ένα μη επεμβατικό προγεννητικό τεστ, με ανάλυση στο επίπεδο καρυοτύπου. Μπορεί να ανιχνεύσει τις τρισωμίες 21, 18, 13, φυλετικές ανευπλοειδίες και το φύλο του εμβρύου. Επίσης ελλείψεις ή διπλασιασμούς μεγαλύτερους από 7Mb που δεν ανιχνεύονται από τον προγεννητικό έλεγχο ρουτίνας (Di Gregorio et al, 2014). Αλλά δεν ανιχνεύει ισοζυγισμένες

μετατοπίσεις ή αναστροφές και τριπλοειδίες. Απευθύνεται σε γυναίκες με μη ομαλό προγεννητικό έλεγχο ή αν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό με χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

- **MaterniT21 Plus**

Είναι το πιο πλήρες μη επμβατικό προγεννητικό τεστ που μπορεί να ανιχνεύσει συνολικά 17 σύνδρομα (τρισωμίες 21, 18, 13, 16, 22, μικροελλειπτικά σύνδρομα και φυλετικά). Απευθύνεται σε γυναίκες που θεωρούνται υψηλού κινδύνου (λόγω ηλικίας, μη ομαλό προγεννητικό έλεγχο, οικογενειακό ιστορικό). Ως μη επμβατικό είναι 100% ασφαλής, εμφανίζει 99.1% ακρίβεια για την τρισωμία 21 και σπάνια παρουσιάζει ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα. Έχει το χαμηλότερο μη ανακοινώσιμο ποσοστό αποτελεσμάτων 0.9%, ενώ σε άλλα τεστ κυμαίνεται από 4.6-12.6% (Palomaki et al, 2012; Bianchi et al, 2012). Ενδείκνυται για χρήση από την 10<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης (Palomaki et al, 2011). Ενδείκνυται και για την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε πολύδυμες κύσεις. Τα αποτελέσματα είναι έτοιμα επτά ημέρες μετά την παραλαβή του δείγματος, αναφέροντας θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα για τις κοινές τρισωμίες και επιπρόσθετα ευρήματα.

- **Visibliti**

Ανιχνεύει τις τρισωμίες 21 και 18 με ακρίβεια >99% και το φύλο του παιδιού με 99.3%. Προορίζεται μόνο για μονήρεις κύσεις με ποσοστό 1.5% να μην δώσει αποτέλεσμα και πολύ χαμηλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Αποτελεί μία οικονομική μέθοδο που δίνει αποτελέσματα συνήθως σε επτά ημερολογιακές ημέρες.

- Verifi

Ανιχνεύει τις τρισωμίες 21, 18, 13, χρωμοσωμικές ανωμαλίες και μικροελλειπτικά σύνδρομα σε μονήρεις κυήσεις. Ενώ σε δίδυμες μπορεί να εντοπίσει τις κοινές τρισωμίες και το φύλο του εμβρύου από τη 10<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Παρότι, η PPV είναι χαμηλότερη στις νεότερες κυήσεις, η PPV του NIPT είναι υψηλότερη από εκείνη του παραδοσιακού screening σε όλες τις ηλικίες της μητέρας, επειδή έχει υψηλότερη ειδικότητα (χαμηλά ψευδώς θετικά ποσοστά) (Benn et al, 2015).

- Harmony Test

Το τεστ ανιχνεύει με επιτυχία >99% τις τρισωμίες 21, 13, 18 σε μονήρεις και δίδυμες κυήσεις. Μπορεί επίσης να ανιχνεύσει φυλετικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες μόνο σε μονήρεις κυήσεις. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να ποσοστό του εμβρυϊκού DNA να είναι 4% και πάνω.

- NIFTY Test

Το τεστ μπορεί να ανιχνεύσει από τη εβδομάδα και νωρίτερα τις τρισωμίες 21, 18 και 13 με ευαισθησία >99% με ψευδώς θετικά αποτελέσματα στο 0.1% και 100% ασφάλεια.

### Δ.3.2. Μεθοδολογία t-MPS

Βασίζεται στην ενίσχυση επιλεκτικών χρωμοσωμικών περιοχών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον (π.χ. στα χρωμοσώματα 21, 18, 13, X, Y) στη συνέχεια εξετάζεται αν υπάρχει απόκλιση από την ευπλοειδία βάση τον αριθμό των DNA τμημάτων για το υποσύνολο των χρωμοσωμάτων. Έχει το πλεονέκτημα ότι απαιτούνται λιγότερες αλληλουχίες, οπότε το κόστος μειώνεται. Τελικά συνδυάζοντας τα αποτελέσματα με την μητρική ηλικία και τις εργαστηριακές εξετάσεις, υπολογίζεται ο κίνδυνος για τα

σύνδρομα Down, Edwards και Patau (Sparks AB et al, 2012). Τα αποτελέσματα μπορούν επίσης να συνδυαστούν με άλλα screening test ή το ιστορικό προηγούμενης κύησης με ανευπλοειδία. Επίσης το αποτέλεσμα από αλγόριθμο που προκύπτει από τη μητρική ηλικία, το ποσοστό του εμβρυϊκού DNA στην κυκλοφορία και αναφέρεται ως πιθανότητα.

### Δ.3.3. Μεθοδολογία SNPs

Η χρήση μεθόδων που στηρίζεται σε DNA πολυμορφισμούς αποδεικνύεται από τους Dhallan et al. Σε αυτή τη μέθοδο τα πατρικά, μητρικά και εμβρυϊκά SNPs υπάρχουν στο αίμα (πατρικό), στοιβάδα με λευκοκύτταρα (μητρικό), μητρικό πλάσμα (μητρικό και εμβρυϊκό) αξιολογήθηκαν σε πήκτωμα (Dhallan et al, 2007). Υπάρχουν πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων που βασίζονται στην αλληλούχηση είναι ότι δίνουν πληροφορίες σχετικά με γονεϊκής προέλευσης ανευπλοειδίες, ανασυνδυασμό και κληρονομηση μεταλλάξεων. Όμως τα SNPs αντιπροσωπεύουν μόνο το 1.6% του ανθρώπινου γονιδιώματος (Liao GJ et al, 2012).

- The Panorama test

Το Panorama test από Natera είναι μέθοδος που ενισχύει ειδικά μονο-νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (SNPs) και έτσι γίνεται διάκριση μητρικού και εμβρυϊκού γονοτύπου. Χρησιμοποιείται ένας αλγόριθμος που καλείται Next Generation Aneuploidy Test Using SNPs (NATUS). Είναι το μόνο τεστ που απομονώνει τα λευκά κύτταρα της μητέρας, ώστε να είναι γνωστός ο γονότυπος της, με αποτέλεσμα να ανιχνευθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια ακόμα και με λιγότερο εμβρυϊκό DNA (<4%) (Yaron Y et al, 2004). Δείγμα από τον πατέρα είναι χρήσιμο στο 1-2% των περιπτώσεων, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα αποτυχίας, αλλά δεν επηρεάζει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Γι' αυτό και το τεστ μπορεί να δώσει αποτέλεσμα από την 9<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Έχει ευαισθησία >99% και ειδικότητα

>99% για τις κοινές τρισωμίες και 91.7% ευαισθησία με >99% ειδικότητα για τη μονοσωμία X (Levy B et al, 2013) και σημειώνονται χαμηλά ποσοστά ψευδών θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων.

Πρέπει να αναφερθεί πως υπάρχει 1-5% πιθανότητα σε μονήρη κύηση και 5.6% σε δίδυμη το cffDNA τεστ να μην δώσει αποτέλεσμα είτε λόγω προβλημάτων στη συλλογή και μεταφορά δειγμάτων , είτε λόγω χαμηλού ποσοστού εμβρυϊκού κλάσματος, είτε η τεχνική απέτυχε και με ποσοστό 100%, 50% και 75% αντίστοιχα (Gil et al, 2013; 2014). Πιο συχνά δεν λαμβάνεται αποτέλεσμα από άτομα που είναι υπέρβαρα ή παχύσαρκα (Roop LC et al, 2013). Σε προοπτικές πολυκεντρικές μελέτες σε κυήσεις υψηλού κινδύνου με cffDNA τεστ δε δόθηκε αποτέλεσμα σε 4.6% με μέθοδο CSS (Norton et al, 2012), σε 3.8% με MPSS (Song et al, 2013) και σε 5.4% με SNP (Nikolaides et al, 2013).

Δεδομένου ότι υπάρχουν λιγότερες αποδείξεις για την αποτελεσματικότητα του cffDNA τεστ εκτός της τρισωμίας 21 και 18, το cffDNA δεν ανιχνεύει όλες τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που εντοπίζουν ο εμβρυϊκός καρυότυπος ή microassay. Η αμνιοπαρακέντηση πρέπει να συστήνεται σε γυναίκες που εμφανίζουν υψηλό κίνδυνου για ανευπλοειδίες μετά από υπερηχογραφικά ευρήματα (Warner RJ et al, 2012; Simpson and Samango-Sprouse, 2013 ).

### Δίδυμες κυήσεις

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος στις δίδυμες κυήσεις για χρωμοσωμικές ανωμαλίες πραγματοποιείται με συνδυασμό της μητρικής ηλικίας και της μέτρησης της αυχενικής διαφάνειας (Pandya et al., 1995; Sebire et al., 1996a, 1996b; Maymon et al., 2001). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη βιοχημικών δεικτών με κατάλληλες προσαρμογές όσων αφορά τη χοριονικότητα. Στις κυήσεις με διχοριονικά δίδυμα απ' την 11-13<sup>η</sup> εβδομάδα τα επίπεδα της ελεύθερης β-hCG και PAPP-A στον μητρικό πλάσμα είναι διπλάσια απ' ότι στις μονήρεις κυήσεις, αλλά στα μονοχοριονικά δίδυμα τα επίπεδα είναι

χαμηλότερα απ' ότι στα διχοριονικά (Spencer and Nicolaidis, 2000, 2003; Spencer et al., 2008; Linskens et al., 2009).

Το screening test του 1<sup>ου</sup> τριμήνου για χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρέχουν τη διάγνωση σε αρχικά στάδια της κύησης, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα ασφαλούς εκλεκτικής μείωσης σε περίπτωση που το ένα έμβρυο έχει τρισωμία. Σε αυτή την περίπτωση σημαντικό ρόλο κατέχει ένας υπερηχογραφικός δείκτης, όπως η αυχενική διαφάνεια, για να αναγνωρισθεί το φυσιολογικό έμβρυο. Στα διχοριονικά δίδυμα ο κίνδυνος για τρισωμία 21, υπολογίζεται για κάθε έμβρυο ξεχωριστά, βάση της μητρικής ηλικίας και της αυχενικής διαφάνειας με ποσοστό ανίχνευσης 75-80% και ψευδώς θετικά αποτελέσματα όμοια με μονήρεις κυήσεις (5% ανά έμβρυο και 10% ανά κύηση). Στις μονοχοριακές κυήσεις, τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα είναι υψηλότερα απ' ότι στις διχοριονικές, επειδή η αυξημένη αυχενική διαφάνεια μπορεί να οφείλεται στο σύνδρομο μετάγγισης μεταξύ διδύμων (Sebire et al, 1997, 2000; Kagan et al, 2007).

Στις δίδυμες κυήσεις το cffDNA τεστ παρουσιάζει πολυπλοκότητα, καθώς τα δύο έμβρυα θα μπορούσαν να είναι μονοζυγωτικά (γενετικά πανομοιότυπα), είτε διζυγωτικά, όπου το ένα έμβρυο μπορεί να έχει ανευπλοειδία. Υπάρχουν ενδείξεις πως τα διζυγωτικά δίδυμα συνεισφέρουν με διαφορετικά ποσοστά στο συνολικό cffDNA. Το γεγονός αυτό δυνητικά θα μπορούσε να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα χαμηλού κινδύνου για ανευπλοειδία, για να αποφεύγεται αυτό λάθος στις δίδυμες κυήσεις προτείνεται, το χαμηλότερο δυνατό ποσοστό (lower fetal fraction) cffDNA που αντιπροσωπεύει τα δύο έμβρυα (αντί του συνόλου) να εκτιμηθεί στην αξιολόγηση για των κίνδυνο ανευπλοειδιών (Struble CA et al, 2013).

Στις δίδυμες κυήσεις το ποσοστό αυτόματης έκτρωσης είναι για τη βιοψία τροφοβλάστης 3.2% και για την αμνιοπαρακέντηση 2.9%. Αν συστήνεται σε όσους έχουν θετικό αποτέλεσμα στον μη επεμβατικό τεστ, υπάρχει δυνητικά σημαντικά μείωση των ασθενών που είναι υποψήφιοι για επεμβατικό έλεγχο και συνεπώς μειωμένο κίνδυνο αποβολής του εμβρύου (Tabor A et al, 2009).

Έχουν δημοσιευτεί τρεις μελέτες που αναφέρονται στο screening test με cffDNA για τρισωμίες σε δίδυμες κυήσεις. Σε δύο από αυτές χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MPSS



και στην άλλη (Chromosome Selective Sequence-CSS). Σε ένα σύνολο 18 τρισωμικών 21 και 209 ευπλοειδικών κυήσεων το ποσοστό ανίχνευσης ήταν 94.4% με FPR 0% και είχαν εντοπιστεί ακόμα 2 τρισωμίες 13 (Canick JA et al, 2012; Gil MM et al, 2013; Lau TK et al, 2013).

## **Δ.4. Τρισωμίες**

### **Τρισωμίες 21, 18 και 13**

Το σύνδρομο Down είναι η πιο κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία στα ζώντα έμβρυα. Η συχνότητά του είναι περίπου 1/800 γεννήσεις στο γενικό πληθυσμό, αλλά το ρίσκο αυξάνεται σε 1/35 γεννήσεις σε γυναίκες 45 ετών. Η συχνότητα νεογέννητων με τρισωμία 13 είναι 1 στα 10000 και με τρισωμία 18, 1 στις 6000 (Driscoll and Gross, 2009). Ενώ οι τρεις πιο κοινές τρισωμίες εμφανίζονται σε 1/450 νεογνά (Simpson and Elias, 2002). Η ηλικία της μητέρας είναι ένας παράγοντας που συμβάλει στην αύξηση του κινδύνου. Όταν οι άλλοι παράγοντες, όπως θετικό αποτέλεσμα στο screening test του ορού, εύρεση ανωμαλιών με υπερήχους ή οικογενειακό ιστορικό συμπεριλαμβάνονται οι πιθανότητες να επηρεαστεί ένα θετικό αποτέλεσμα συνδρόμου Down μπορεί να είναι τόσο ψηλά όσο 1/9 χρησιμοποιώντας integrating test.

Ο μη επεμβατικός έλεγχος για τρισωμία 21 που περιλαμβάνει τη μητρική ηλικία, την ελεύθερη β-hCG και PAPP-A ανιχνεύει περίπου το 65% των περιπτώσεων με 5% ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα είναι πιο αξιόπιστα στην 9-10<sup>η</sup> εβδομάδα απ' ότι στην 13<sup>η</sup>, επειδή η διαφορά των τιμών της PAPP-A σε κυήσεις με τριπλοειδία και ευπλοειδία είναι μεγαλύτερη σε αρχικά στάδια της κύησης (Cuckle and van Lith, 1999; Spencer et al., 2003a; Kagan et al., 2008a; Wright et al., 2010).

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος με το cfDNA τεστ ιδανικά πραγματοποιείται την 10<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, καθώς τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα την 12<sup>η</sup> εβδομάδα, όπου τότε γίνεται και το υπερηχογράφημα (Gil MM et al, 2013). Το επίπεδο του ποσοστού του εμβρυϊκού DNA που απαιτείται για την

ανίχνευση τρισωμιών είναι γύρω στο 4%. Το γεγονός ότι ο έλεγχος γίνεται νωρίς στην κύηση, είναι πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου, και υπάρχει η δυνατότητα ασφαλούς διακοπής της κύησης, σε περίπτωση ανευπλοειδίας. Σε κυήσεις υψηλού κινδύνου για τις τρισωμίες πρέπει να επιβεβαιώνονται με επεμβατικό έλεγχο, άλλα σε κυήσεις χαμηλού κινδύνου για την 21 και 18 το έμβρυο είναι εξαιρετικά απίθανο να πάσχει από κάποια τρισωμία (Nikolaides, 2011). Στην περίπτωση της τρισωμίας 13, αν και δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία τα ποσοστά ανίχνευσης είναι 92.1% με ψευδώς θετικά αποτελέσματα 0.20%.

Στη βιβλιογραφία υπάρχει μόνο ένα άρθρο που δημοσιεύτηκε το 2014 και αναφέρει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα για το σύνδρομο Down (Smith M et al, 2014). Υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις που αναφέρουν πως δείγμα για το cffDNA τεστ λήφθηκε στο 2<sup>ο</sup> ή 3<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης, για να υπάρχει επαρκής ποσότητα. Η χαμηλή ποσότητα cffDNA στον μητρικό ορό αυξάνει τα ποσοστά ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (Bischoff ZF et al, 2002).

## **Δ.5. Πιο σπάνιες ανευπλοειδίες ...**

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθούμε στη σκοπιμότητα ανίχνευσης σπάνιων χρωμοσωμικών διαταραχών, όπως το σύνδρομο μωσαϊκισμού T9 και T8 που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή ασθένεια (Berry AC et al, 1978). Τα πρώτα παιδιά που γεννήθηκαν με τα σύνδρομα T8 και T9 που αναφέρθηκαν ήταν το 1973 και στις επόμενες δεκαετίες με διάφορα επίπεδα σωματικού μωσαϊκισμού που κυμαίνεται μεταξύ 3-99%. Παιδιά που γεννιούνται με T9 πεθαίνουν μετά τη γέννηση ή εντός του 1<sup>ου</sup> έτους, ενώ όσα γεννιούνται με μωσαϊκισμό T9 μπορούν να επιβιώσουν στην ενήλικη ζωή. Μετά τη γέννηση το νεογέννητο με υπέρηχο και εξέταση MRI η κλινική διάγνωση ήταν συγγενής εγκεφαλική δυσπλασία, ενδοκρανιακή αιμορραγία, θρομβοκυτταροπενία και συγγενή καρδιοπάθεια.

Παραδοσιακά στην προγεννητική διάγνωση χρησιμοποιείται ο καρυότυπος και ανάλυση FISH από κύτταρα του αμνιακού υγρού, σε συνδυασμό με υπερήχους και ήταν σχετικά επιτυχής στην ανίχνευση με μωσαϊκισμό T9 (Pfeiffer et al, 1984). Με Q-PCR STR ανάλυση δειγμάτων DNA της οικογένειας προτείνεται ότι ο μωσαϊκισμός T9 προέρχεται από ματά-ζυγωτική τρισωμία που οφείλεται σε σφάλμα στη πατρική μείωση II (Ma et al, 2015). Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος μπορεί να έχει κλινική χρησιμότητα που ενδέχεται όμως να αυξήσει τα ψευδώς θετικά ποσοστά των συνδρόμων, καθώς συνδέονται συχνά με μωσαϊκισμό του πλακούντα (Wolstenholme, 1996).

## **Δ.6. Ανευπλοειδίες φυλετικών χρωμοσωμάτων**

Οι χρωμοσωμικές φυλετικές ανευπλοειδίες (SCA) έχουν αντίκτυπο στη γενική υγεία του ατόμου, στην ψυχοκοινωνική του ανάπτυξη και στη γονιμότητά του. Το σύνδρομο Klinefelter είναι η πιο συνήθης αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας, υπογοναδισμού και γυναικομαστίας με συχνότητα εμφάνισης 1/650. Το Turner εμφανίζεται στο 1/2500 των νεογνών με καρδιακές ανωμαλίες ή δυσμορφίες και μπορεί να μένει αδιάγνωστο μέχρι την ενηλικίωση που θα αξιολογηθεί το χαμηλό ανάστημα, η εφηβική καθυστέρηση, αμηνόρροια και η στειρότητα. Όμως η έγκαιρη διάγνωση είναι σημαντική για την κατάλληλη θεραπεία του συνδρόμου (Nielsen and Wohler, 1991; Rosenfeld, 2000).

Πρόσφατα σε μελέτη του Mazloom et al, ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος δίνει ποσοστά ανίχνευσης για το σύνδρομο Turner 83% (25/30), για το σύνδρομο Klinefelter 85% (11/13), για το 47,XXX 83% (5/6) και για το 47,XY 47% (3/4). Για το Turner το FPR ήταν 0.2% (4/1945) και ένα άλλο ψευδώς θετικό (47,XXX) (Mazloom AR et al, 2013). Το σύνδρομο Turner δεν συνδέεται με την ηλικία της μητέρας με επιπολασμό 1 στις 1500 (12 εβδομάδες) και 1 στις 4000 (40 εβδομάδες). Για άλλες φυλετικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (47,XXY, 47,XXX, 47,XY) δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση με την ηλικία της μητέρας και επειδή το ποσοστό εμβρυϊκού

θανάτου δεν είναι υψηλότερο απ' ό τι σε ευπλοειδικές κυήσεις, και ο επιπολασμός είναι 1 στα 500.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί πως είναι δύσκολο να αναπτυχθεί αξιόπιστο τεστ για τις φυλετικές ανευπλοειδίες, γιατί πολλές εμβρυϊκές χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρουσιάζουν μωσαϊκισμό. Για παράδειγμα έμβρυο με μωσαϊκισμό 45,X/46,XXX έχει σχεδόν φυσιολογικές ποσότητες X χρωμοσωμάτων (Devaney SA et al, 2011). Επίσης μπορεί η ειδική ανίχνευση του Y χρωμοσώματος να είναι δύσκολη, γιατί η ευχρωματίνη του Y χρωμοσώματος περιέχει πολλές πολυμορφικές αλληλουχίες CNVs και άλλες παρουσιάζουν ομολογία με αλληλουχίες του X χρωμοσώματος (Tilford CA et al, 2001).

Τεχνικές που βασίζονται στην ποσοτικοποίηση των SNPs στο DNA του πλάσματος μπορούν να εντοπίσουν μερικές φυλετικές ανευπλοειδίες. Όπως το 47,XY, τις περισσότερες περιπτώσεις Turner, περίπου τις μισές περιπτώσεις Klinefelter, καθώς και ανισορροπίες που οφείλονται σε λανθασμένο διαχωρισμό της πατρικής σειράς φυλετικών χρωμοσωμάτων (Uematsu A et al, 2002; Thomas and Hassold, 2003). Ενώ τεχνικές που βασίζονται στα SNPs στις περιπτώσεις 47,XXX, τα υπόλοιπα Turner και Klinefelter που οφείλεται σε μη διαχωρισμό φυλετικών χρωμοσωμάτων της μητέρας, είναι πιο δύσκολες (Hassold and Hunt, 2001).

Με τη μέθοδο MPSS η χαμηλή απόδοση του cfDNA τεστ για την τρισωμία 13 και μονοσωμία X, σε σχέση με τις τρισωμίες 21 και 18, θα μπορούσε να οφείλεται στην 'μεταβλητή' ενισχύσει των χρωμοσωμάτων 13 και X λόγω του χαμηλού περιεχομένου σε GC (Chen et al, 2011; Fan et al, 2008).

## **Δ.7. Μικροελλειπτικά σύνδρομα**

Για αρκετά χρόνια γονείς με παιδιά που πάσχουν από μικροελλειπτικά σύνδρομα δεν μπορούσαν να λάβουν ειδική διάγνωση. Επιπροσθέτως, σε προγράμματα έγκαιρης παρέμβασης, με βελτιωμένες ιατρικές τεχνικές και συνθήκες, συνδέονται με βελτίωση της υγείας και της ποιότητας ζωής των πασχόντων (Cheung ENM et al,

2014). Είναι γνωστό πως δύσκολα ανιχνεύονται με υπέρηχο και η εμφάνισή τους δεν αυξάνεται με την ηλικία. Για να ανιχνευθούν χρειάζεται μοριακός καρυότυπος, όχι ο κλασσικός.

Σε μελέτη του 2015 χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο του cffDNA, όπως Chromosomal microarray-CMA ή FISH για την ανίχνευση μικροελλειπτικών συνδρόμων (1p36, 5p- (Cri-du-chat syndrome), 15q- (Prader-Willi/Angelman syndrome), and 22q11.2 (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome), 4p- (Wolf- Hirschhorn), 8q- (Langer- Giedion), 11q (Jacobsen). Η θετική προγνωστική αξία του τεστ κυμαίνεται μεταξύ 60-100% με ψευδώς θετικά αποτελέσματα 0.0017%, ενώ το ποσοστό ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων και η ευαισθησία του δεν έχει διασαφηνιστεί (Helgeson et al, 2015).

Το πιο κοινό μικροελλειπτικό σύνδρομο, οφείλεται σε έλλειψη στο 22q11.2 με συχνότητα εμφάνισης 1/4000 (Devriendt K. et al., 1998; McDonald-McGinn DM and Sullivan KE. ,2011) που οφείλεται σε ποσοστό περίπου 93% σε καινούριες μεταλλάξεις. Η έλλειψη στο 22q11.2 συνήθως ονομάζεται DiGeorge και εμφανίζει ποικίλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως αναπτυξιακά προβλήματα, υποτονία στη βρεφική ηλικία, δυσκολίες σίτισης, διαταραγμένη λειτουργία ανοσοποιητικού, δυσλειτουργία παραθυρεοειδή αδένου. Σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2007 έμβρυα που πάσχουν από 22q11.2 εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για τρισωμία 18. Οι ερευνητές προτείνουν τον προγεννητικό διάγνωση, καθώς αυξάνεται ο κίνδυνος για τρισωμία 18 και πραγματοποιείται FISH για 22q11.2 (Begleiter ML et al, 2007).

Σε μεταγενέστερη μελέτη του 2013, έμβρυα χωρίς οικογενειακό ιστορικό διαγνώστηκαν με το σύνδρομο, μέσω υπερηχογραφήματος που έδειχνε καρδιακή δυσλειτουργία ή άλλες ανωμαλίες. Επίσης διάγνωση έγινε μέσω αμνιοπαρακέντησης και FISH και τονίζεται πως με την έγκαιρη διάγνωση του συνδρόμου μέσω υπερηχογραφικών ευρημάτων, επιτρέπει τη βελτιστοποίηση της διαχείρισης της κύησης και της φροντίδας μετά τον τοκετό μειώνοντας τη νεογνική νοσηρότητα και θνητότητα (Asiia et al, 2013). Μια αλλά μέθοδος που προτείνεται το 2015 ήταν η αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος που μπορεί να δώσει αποτέλεσμα κι όταν δεν

είναι γνωστή η θέση της έλλειψης (Chen Zhao et al, 2015). Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε έδωσε στη μέθοδο 94.4% ευαισθησία και 99.4% ειδικότητα.

Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ένα ζεύγος αρσενικών μονοζυγωτικών διδύμων με το σύνδρομο DiGeorge και διαφορετικό φαινότυπο. Το πρώτο δίδυμο είχε ηπιότερο φαινότυπο, χωρίς καρδιακή δυσπλασία ενώ το δεύτερο σπασμούς, κυάνωση, και καρδιακή ανεπάρκεια. Ο υβριδισμός *in situ* (FISH) επίσης δείχνει έλλειψη στο 22q11.2 και στα δύο δίδυμα αλλά κανένα στοιχείο για μωσαϊκισμό (Ashutosh Halder et al, 2012). Ο διαφορετικός φαινότυπος θα μπορούσε να οφείλεται σε γενετικές αλλαγές, όπως στη DNA μεθυλίωση (Singh SM et al, 2002). Επίσης φαίνεται πως το ενδομήτριο περιβάλλον και η διαδικασία ανάπτυξης των διδύμων και άλλοι μη γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν φαινοτυπικά το έμβρυο (Fryer A, 1996; Ryan AK et al, 1997).

## **Δ.8. Τριπλοειδίες**

Η κύηση με τριπλοειδία μπορεί να προκύψει από μία επιπλέον σειρά ολόκληρης σειράς χρωμοσωμάτων είτε μητρικής, είτε πατρικής προέλευσης. Πιο συχνά ανιχνεύονται οι καρυότυποι 69,XXX και 69,XXY ή 69,XYX (που αποβάλλεται νωρίς στο 1<sup>ο</sup> τρίμηνο) (Jacobs PA et al, 1982) με ποσοστό εμφάνισης 1/1500 κυήσεις στην 10<sup>η</sup>-14<sup>η</sup> εβδομάδα. Οι περισσότερες περιπτώσεις τριπλοειδίας μπορούν να εντοπίζονται μέσω υπερήχων και χαρακτηριστικών δεικτών πρώτου ή δευτέρου τριμήνου στον ορό της μητέρας. Είναι εξαιρετικό για αυτές τις κυήσεις να επιβιώσουν στο 3<sup>ο</sup> τρίμηνο (Jauniaux and Campbell, 1990; Spencer K et al, 2000; Benn PA et al, 2001).

Στις κυήσεις με καρυότυπο 69,XXX ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος στηρίζεται στην καταμέτρηση των X χρωμοσωμάτων. Τριπλοειδία που προέρχεται από επιπλέον σειρά μητρικών χρωμοσωμάτων μπορεί με μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο να ανιχνευτεί επειδή ο πλακούντας είναι πολύ μικρός και το εμβρυϊκό κλάσμα μειωμένο (McFadden and Kalousek, 1991). Το cfDNA τεστ μπορεί να ανιχνεύσει την επιπλέον σειρά χρωμοσωμάτων χρησιμοποιώντας τα SNPs. Ανιχνεύοντας δύο διαφορετικά SNPs που κληρονομήθηκαν από τον πατέρα, η

τρισωμία είναι πατρικής προέλευσης, ενώ είναι μητρικής προέλευσης αν ανιχνευθούν περισσότερα τμήματα DNA από τη μητέρα σχετικά με τον πατέρα. Η μέθοδος που μπορεί να ανιχνεύσει πατρική τριπλοειδία το Panorama test που δεν απαιτείται χρωμόσωμα αναφοράς.

## **Μωσαϊκισμός**

Ο πιο κοινός τύπος έμβryo-πλακουντιακού μωσαϊκισμού ανφέρεται σε φυσιολογικό έμβryo και πλακούντας με χρωμοσωμική ανευπλοειδία (Kalousek and Dill, 1983). Ωστόσο ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα cffDNA δεν εξηγούνται με το CPM. Μπορεί να οφείλεται σε άλλο τύπο μωσαϊκισμού με μη-φυσιολογικό έμβryo και μωσαϊκό ή φυσιολογικό πλακούντα (Hochstenbach et al, 2015).

Σε μελέτη των Grati FR et al. που δημοσιεύτηκε το 2015 φαίνεται πως σε περιπτώσεις με αποτελέσματα των τεστ ελεύθερου εμβρυϊκού DNA και λήψης χοριακών λαχνών για τρισωμίες 21 και 18 σε υψηλού κινδύνου κυήσεις ενδείκνυται αλλά με ποσοστό 2-4% ρίσκου αμφιβόλων αποτελεσμάτων, λόγω μωσαϊκισμού όπου χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Ενώ σε κυήσεις υψηλού κινδύνου που έγινε αμνιοπαρακέντηση για μονοσωμία X (MX) και τρισωμία 13 είναι κατάλληλη διαγνωστική εξέταση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις έλλειψης υπερηχογραφικών ευρημάτων ( Grati FR et al., 2015).

## **Δ.5. Κλινικές εφαρμογές**

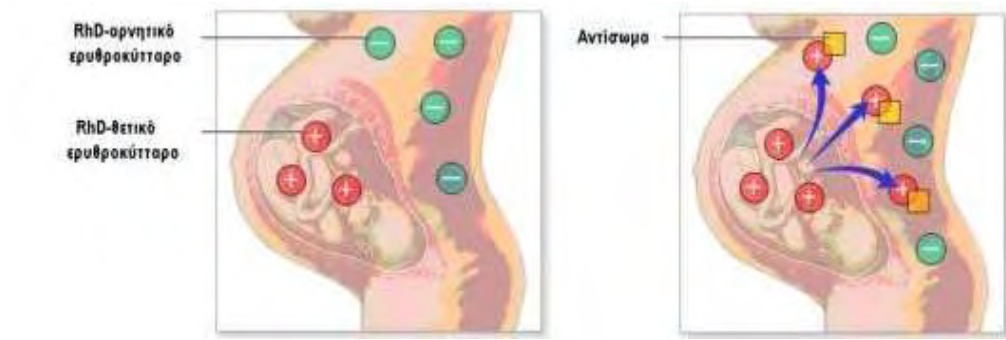
### **Δ.5.1. Στη διάγνωση του συστήματος RhD του εμβρύου**

Το σύστημα Rhesus (Rh) ανακαλύφθηκε πριν από 70 περίπου χρόνια και θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα και πιο πολύπλοκα συστήματα ομάδων αίματος, κυρίως λόγω του μεγάλου αριθμού που περιλαμβάνει (περισσότερα από 50 ορολογικά αναγνωρισμένα αντιγόνα) και των σοβαρών επιπλοκών που δημιουργεί στην κλινική πράξη (Westhoff CM, 2007). Η κατάταξη ενός ατόμου σε Rh- θετικό ή αρνητικό

καθορίζεται από την παρουσία ή απουσία του RhD πρωτεΐνης στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων. Όταν ένα Rh- αρνητικό άτομο εκτεθεί σε Rh- θετικά ερυθροκύτταρα προκαλείται ανοσοποίηση Rh με παραγωγή αντισωμάτων έναντι ποικιλίας επιτόπων της RhD πρωτεΐνης. Η συχνότητα του Rh- αρνητικού φαινοτύπου στην Καυκάσια φυλή είναι 15-17%, στον Αφρικανικό πληθυσμό 3-5% και στους Ασιάτες 0.1% (Race R and Sanger R, 1975). Ανοσοποίηση λόγω του συστήματος Rh σε κυήσεις RhD- αρνητικών γυναικών που κυοφορούν RhD- θετικό έμβρυο θεωρείται η συχνότερη αιτία αιμολυτικής νόσου του εμβρύου ή του νεογνού (συγκόλληση και λύση των RhD- θετικών ερυθρών αιμοσφαιρίων) και είναι δυνατή η παραγωγή αντι-D αντισωμάτων με αποτέλεσμα την ευαισθητοποίησης της (Εικόνα 2). Σε ήδη ευαισθητοποιημένες γυναίκες σημαντικά μικρότερες δόσεις αντιγόνου διεγείρουν αύξηση του τίτλου αντισωμάτων.

Η δυνατότητα της μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης έγινε γνωστή από το 1998, σχεδόν ταυτόχρονα από 2 διαφορετικές ερευνητικές ομάδες στο Χονγκ-Κονγκ και στην Ολλανδία (Lo YM et al, 1998a; Faas BH et al, 1998). Από τότε πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός μελετών εκτίμησης της αξιοπιστίας και ειδικότητας που ξεπερνά το 95%. Στις περισσότερες μελέτες η ανίχνευση του συστήματος RhD του εμβρύου γίνεται με Real Time-PCR και λόγω της ποικιλομορφίας αυτού του συστήματος, στα περισσότερα εργαστήρια ελέγχονται περισσότερα του ενός εξόνια (Finning et al, 2008; Lo et al, 1998a). Στη μελέτη των Lyn S Chitty et al, για το RHD genotyping του cffDNA τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα πριν την 11<sup>η</sup> εβδομάδα ήταν 16/865, στις 11-13 εβδομάδες αυτά τα περιστατικά ήταν 1/956 και δεν μειώθηκαν μεταξύ 11-24 εβδομάδων (Chitty et al, 2014). Μπορεί να αλλάξει τον τρόπο αντιμετώπισης των RhD-αρνητικών εγκύων, ελαττώνοντας τη χορήγηση αντι-D μόνο στις εγκύους που κυοφορούν RhD-έμβρυο.





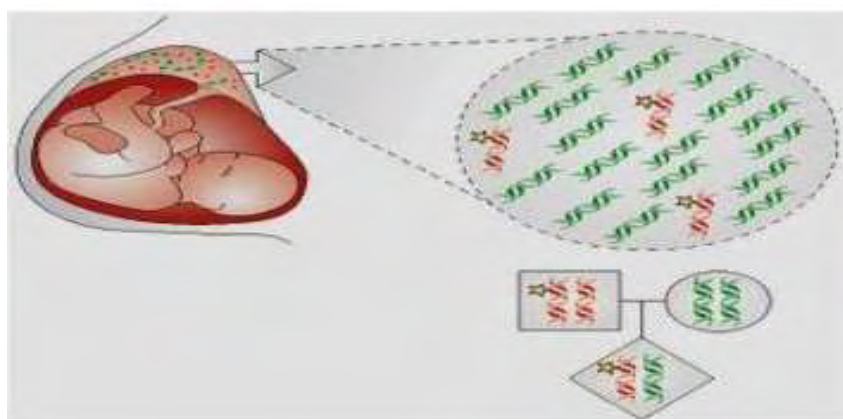
**Εικόνα 2.** Ευαισθητοποίηση RhD-αρνητικής εγκύου

#### **Δ.5.2. Στη διάγνωση γενετικών μονογονιδιακών ασθενειών**

Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων που κληρονομούνται με επικρατικό τρόπο, είναι εφικτή μόνο αν η παθολογική μετάλλαξη είναι πατρικής προέλευσης και πραγματοποιείται με ανίχνευση της μετάλλαξης στο πλάσμα της εγκύου (Εικόνα 3). Στην κλινική πράξη, έχει πραγματοποιηθεί για τη νόσο του Huntington, την αχονδροπλασία και τη μυική δυστροφία (Gonzalez Gonzalez et al, 2003; Amicucci et al, 2000; Li Y et al, 2004). Η μη επεμβατική διάγνωση νοσημάτων που κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, όταν και οι δύο γονείς είναι φορείς της ίδιας μετάλλαξης, αφού δεν μπορεί να διαχωριστεί το μητρικό αλληλόμορφο από το εμβρυϊκό. Το cfDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το προγεννητικό έλεγχο αν οι γονείς είναι φορείς διαφορετικών μεταλλάξεων και το έμβρυο πιθανός διπλός ετεροζυγώτης, έτσι μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου όταν η πατρική μετάλλαξη δεν ανιχνευθεί.

Συγκεκριμένα νοσήματα, για τα οποία έχει πραγματοποιηθεί είναι η κυστική ίνωση, η συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων και διάφοροι τύποι αιμοσφαιρινοπαθειών (Gonzalez-Gonzalez MC et al, 2002; Nasis O et al, 2004; Lazaros L et al, 2006)). Σχετικά με τις αιμοσφαιρινοπάθειες με τη χρήση του cfDNA έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις πατρικής προέλευσης που προκαλούν β-θαλασσαιμία, αναιμία Hb Lepore και

δρεπανοκυτταρική αναιμία (Lazaros L et al, 2006; Chiu RW et al, 2002; Fucharoen G et al, 2003). Η δρεπανοκυτταρική αναιμία προκαλείται κυρίως από ομοζυγωτία της ίδιας μετάλλαξης και συνεπώς δεν μπορεί να διαγνωστεί προγεννητικά με cffDNA. Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος μεταλλάξεων δρεπανοκυτταρικής αναιμίας είναι εφικτή όταν ο ένας γονέας είναι φορέας μιας μετάλλαξης άλλης αιμοσφαιρινοπάθειας (όπως β-θαλασσαιμία). Διαφορετικά, αν πρόκειται για άλλο τύπο δρεπανοκυτταρικής αναιμίας τότε το cffDNA τεστ μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν οι γονείς είναι φορείς διαφορετικών μεταλλάξεων.



**Εικόνα 3.** Μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων που κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο με ανίχνευση της μετάλλαξης πατρικής προέλευσης σε πλάσμα εγκύου (Lo Y.M and R.W. Chiu, 2007)

#### **Δ.5.3. Προσδιορισμός του φύλου του εμβρύου**

Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση του φύλου του εμβρύου ήταν η πρώτη κλινική εφαρμογή του cffDNA και γίνεται με την ανίχνευση στο πλάσμα της εγκύου των αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y (Lo Y.M et al, 1997). Στις περισσότερες μελέτες πραγματοποιείται ανίχνευση του γονιδίου SRY και/ή του γονιδίου TSPY, στο οποίο βρίσκεται η αλληλουχία DYS14 με χρήση RTQ-PCR (Dechend F et al, 2000). Η ανίχνευση εμβρύων κοριτσιών γίνεται έμμεσα, όταν δεν ανιχνεύονται αλληλουχίες του χρωμοσώματος Y στο υπό εξέταση δείγμα. Στις περισσότερες αναφορές στη

διεθνή βιβλιογραφία η διάγνωση είναι ήδη εφικτή από την 7<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης με ακρίβεια και ειδικότητα που πλησιάζει το 100% (Bustamante-Aragones et al, 2008).

Οι ενδείξεις μη επεμβατικού προσδιορισμού του φύλου συμπίπτουν με τις ενδείξεις που έχουν καθοριστεί διεθνώς με την προγεννητική διάγνωση του φύλου. Σημαντικότερη ένδειξη αποτελεί το οικογενειακό ιστορικό φυλοσύνδετων νοσημάτων. Είναι γνωστό πως από γυναίκες φορείς φυλοσύνδετων υπολειπόμενων νοσημάτων γεννιούνται αγόρια που έχουν πιθανότητα 50% να εμφανίσουν τη νόσο ή κορίτσια που έχουν 50% πιθανότητα να είναι φορείς. Επειδή ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος γίνεται νωρίς στην κύηση, υπάρχει η δυνατότητα ελάττωσης του αριθμού των επεμβατικών προγεννητικών ελέγχων μόνο στις εγκύους που κυοφορούν έμβρυο αγόρι (Hyett JA et al, 2005).

## **Ε. Συμπεράσματα**

Στο Ηνωμένο Βασίλειο στο NHS, ο έλεγχος της τρισωμίας 21 στο 1<sup>ο</sup> τρίμηνο αποτελεί ρουτίνα που ανιχνεύει το 90% των περιπτώσεων με FPR 5% (Nikolaides, 2011). Είχε προταθεί το cffDNA να παρέχεται σε κυήσεις με ρίσκο > 1:2500 στο 1<sup>ο</sup> τρίμηνο, όπου το ποσοστό ανίχνευσης βελτιώνεται σε 97% με FPR >0.5 και χωρίς το οικονομικό κόστος αν γινόταν σε όλες τις ασθενείς (Nikolaides et al, 2013;2014).

Από την Ιταλική Ένωση Γενετικής Ανθρώπου προτάθηκε αλλαγή της ονομασίας του NIPT σε NIPS (Non Invasive Prenatal Screening) που θα περιορίζεται στη ανίχνευση της τρισωμίας 21 και 18 και με περιορισμούς για την 13. Υπάρχουν ακόμα δυσκολίες στην ανίχνευση φυλετικών χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών, λόγω αυξημένων ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Lau TK et al, 2014; Wang Y et al, 2013). Παρόλα αυτά σε μετά-ανάλυση του 2014 αναφέρονται FPR 0.12% για τις φυλετικές ανευπλοειδίες (Gil MM et al, 2014). Επίσης συστήνεται και από την American College

of Medical Genetics-ACMG η μετονομασία σε screening, όπου θα πρέπει θετικά αποτελέσματα να επιβεβαιώνονται με διαγνωστικές μεθόδους (Gregg AR et al, 2013).

Στο Ηνωμένο Βασίλειο, η Εθνική Επιτροπή Προγραμμάτων Ανίχνευσης (National Screening Committee-NSC) που θέτει πρότυπα για τον προγεννητικό έλεγχο, συνιστά όλες οι έγκυες γυναίκες να ελέγχονται με screening τεστ για σύνδρομο Down. Συγκεκριμένα συνιστάται ο έλεγχος να γίνεται μεταξύ 11<sup>ης</sup> – 14<sup>ης</sup> εβδομάδας. Οι γυναίκες με κίνδυνο 1/150 ή και μεγαλύτερο συστήνεται επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος, όπου παρέχεται πληροφορία για το αν το έμβρυο έχει τρισωμία 21. Μπορούν να διαγνωστούν και άλλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες αν γίνει πλήρης καρυότυπος ή ανάλυση μικροσυστοιχιών.

Σε μελέτη που έγινε στην Ιαπωνία το 2014, με το cffDNA test το 98% των εγκύων με υψηλό ρίσκο για τρισωμία απέφυγαν τον επεμβατικό έλεγχο με ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα 0.06% (Sago et al, 2014). Ενώ ο αριθμός των γεννήσεων μειώνεται, αυξάνεται ο αριθμός των εγκύων 35 ετών και άνω και φαίνεται να έχει πλεονεκτήματα στις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας που έχουν και ιστορικό προηγούμενης κύησης με τρισωμία (Sasaki et al, 2011). Με τα παρόντα αποτελέσματα φαίνεται η συνεισφορά του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου για τις γυναίκες που θέλουν να προβούν σε προγεννητικό τεστ αλλά αποφεύγοντας τον επεμβατικό έλεγχο (Larion et al, 2014).

Έγινε μελέτη από τον Chitty et al, το 2014 φαίνεται να προσφέρει με ένα κόστος £500 ανά μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο και προσφέρεται σήμερα στον ιδιωτικό τομέα στο Ηνωμένο Βασίλειο και θα έπρεπε να είναι διαθέσιμο και μέσω της Εθνικής Υπηρεσίας Υγείας (National Health Service-NHS).

Επί του παρόντος, το cffDNA τεστ δεν συνιστάται για χρήση σε πληθυσμό χαμηλό κινδύνου, καθώς δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την αξιολόγησή του, βέβαια οι υπάρχοντες μελέτες είναι πολλά υποσχόμενες, αλλά απαιτούνται περισσότερες. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, χωρίς να επιβεβαιωθούν μπορεί να έχουν σοβαρές συνέπειες. Αντίθετα είναι κατάλληλο για screening test σε γυναίκες κάτω των 35 ετών (Benn et al, 2013; Malone et al, 2005).

Σε υψηλού κινδύνου κυήσεις η Θετική Προγνωστική Αξία (PPV), που ορίζεται ως το ποσοστό των αληθώς θετικών αποτελεσμάτων/ τον αριθμό όλων των θετικών αποτελεσμάτων, του cffDNA τεστ είναι 90.9- 100%, ενώ Αρνητική Προγνωστική Αξία (NPV) παραμένει 99.9- 100%. Σε χαμηλού κινδύνου κυήσεις η PPV είναι 85.3% με NPV 99.9% σε 146,958 κυήσεις (Zhang et al, 2015; Willems et al, 2014; Porreco et al, 2014).

Τέλος οι θετικές και αρνητικές προγνωστικές αξίες του cffDNA είναι πολύ καλύτερες από οποιοδήποτε άλλο screening για όλα τα σύνδρομα που αναλύουν. Αλλά δεν είναι τόσο καλές ακόμα όσο τα επεμβατικά προγεννητικά τεστ.

## Στ. Βιβλιογραφία

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 Obstet Gynecol.* 45(1):16–26

Amicucci P, M Gennarelli, G Novelli, B Dallapiccola (2000). Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem*, 46(2):301-302

Ashutosh Halder, Manish Jain, Isha Chaudhary, Binuja Varma (2012). Chromosome 22q11.2 microdeletion in monozygotic twins with discordant phenotype and deletion size. *Mol Cytogenet*; 5:13

Atena Asiaii, MD, MPH (candidate); Jodi Hoffman, MD; Sarah Harris, MS; Laurie Demmer, M; and Neeta Vora, MD. (2013). Prenatal findings in cases of familial and sporadic 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/ Velocardiofacial syndrome). *Journal of Rare Disorders Vol 1, Issue 1*

Bedri Karakas, Wafa Qubbaj, Saad Al-Hassan, Serdar Coskun (2015). Noninvasive digital detection of fetal DNA in plasma of 4-week pregnant woman following In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. *PLoS One* 10(5): e0126501

Benn PA. (2010) Prenatal diagnosis of chromosome abnormalities through amniocentesis. In *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment* (6th edn), Milunsky A, Milunsky JM (eds). Wiley-Blackwell: Chichester, UK, 771–818

Benn P, Curnow KJ, Chapman S, Michalopoulos SN, Hornberger J, Rabinowitz M (2015). An Economic Analysis of Cell-Free DNA Non-Invasive Prenatal Testing in the US General Pregnancy Population. *PLoS One.* 10(7):e0132313

Benn PA, Gainey A, Ingardia CJ, Rodis JF, Egan JF (2001). Second trimester maternal serum analytes in triploid pregnancies: Correlation with phenotype and sex chromosome complement. *Prenat Diagn* 21: 680–686

Berry AC, Mutton DE, Lewis DG (1978). Mosaicism and the trisomy 8 syndrome. *Clin Genet.* 14:105–14

Beta J, Bredaki FE, Calvo JR, Akolekar R, Nicolaides KH (2011): Maternal serum  $\alpha$ -fetoprotein at 11–13 weeks' gestation in spontaneous early preterm delivery. *Fetal Diagn Ther*,30: 88–93

Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP; Maternal Blood IS Source to Accurately diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group (2012). Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol*, May;119(5):890-901

Birch L, C.A. English, K. O'Donoghue, O. Barigye, N.M. Fisk and J.K. Keer. (2005) Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem*, 51(2):312-20

Bischoff FZ, Sinacori MK, Dang DD, Marquez-Do D, Horne C, Lewis DE, Simpson JL (2002). Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update*. NovDec; 8(6):493-500

Bustamante-Aragones A, M Rodriguez de Alba, Gonzalez-Gonzalez MC, MJ Trujillo-Tiabas, Diago-Arvarez, E. Vallespin, J Plaza, C Ayoso, C Ramos (2008). Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the foetuses of female carriers. *Haemophilia*, 14(3):593-8

Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Palomaki GE (2012): DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn* 32: 730– 734

Chan K.C., J. Zhang, A.B. Hui, N. Wong, T.K. Lau, T.N. Leung, K.W. Lo, D.W. Huang and Y.M. Lo. (2004) Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 50(1):88-92

Chen EZ, Chiu RW, Sun H, Akolekar R, Chan KC, Leung TY, Jiang P, Zheng YW, Lun FM, Chan LY, Jin Y, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, van Vugt JM, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM (2011): Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One* 6:e21791

Chelemen T, Syngelaki A, Maiz N, Allan L, Nicolaides KH (2011): Contribution of ductus venosus Doppler in first-trimester screening for major cardiac defects. *Fetal Diagn Ther* 29: 127–134

Cheung ENM, George SR, Andrade DM, et al. (2014) Neonatal hypocalcemia, neonatal seizures, and intellectual disability in 22q11.2 deletion syndrome. *Genet Med*, 16:40–4

Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, Foo CH, Xie B, Tsui NB, Lun FM, Zee BC, Lau TK, Cantor CR, Lo YM. (2008) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20458–2046

Chiu R.W., T.K. Lau, T.N. Leung, K.C. Chow, D.H. Chiu and Y.M. Lo (2002) Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet*, 360(9338):998-1000

Cuckle HS, van Lith JMM. (1999). Appropriate biochemical parameters in firsttrimester screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* 19: 505–512

D. K. Kalousek and F. J. Dill (1983), “Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions,” *Science*, vol. 221, no.4611, pp.665–667

Dennis Lo Y.M. and R.W. Chiu (2007) Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet.* 8(1): 71-7

Devriendt K, Fryns JP, Morer G, et al (1998) The annual incidence of DiGeorge / velocardiofacial syndrome. *J Med Genet.* 35:789-790

Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M, Barry J, Betz J, Franz K, Gold K, Vallecillo B, Varney J (2007). A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 369: 474–481

Di Gregorio E et al, (2014). Large cryptic genomic rearrangements with apparently normal karyotypes detected by array- CGH; 7(82)

Faas BH, EA Beuling, GC Christiaens, AE von dem Borne and CE van der Schoot. (1998) Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet*, 352(9135):1196

Faas BH, de Ligt J, Janssen I, Eggink AJ, Wijnberger LD, van Vugt JM, et al.(2012) Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opin Biol Ther.* 12(Suppl 1):S19–26



Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. (2008) Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U SA* 105: 16266–16271

Farina A., A. Sekizawa, Y. Sugito, M. Iwasaki, M. Jimbo, H. Saito and T. Okai (2004) Fetal DNA in maternal plasma as a screening variable preeclampsia. A preliminary nonparametric analysis of detection rate in low-risk nonsymptomatic patients. *Prenat Diagn*, 24(2):83-6

Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G (2008). Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 336:816–8

Fryer A (1996). Monozygotic twins with 22q11 deletion and discordant phenotypes. *J Med Genet.* 33(2):173

Fucharoen G., W. Tungwiwat, T. Ratanasiri, K. Sanchaisuriya and S. Fucharoen (2003) Prenatal detection of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma. *Prenat Diagn*, 23(5): 393-6

Gerovassili A, Nicolaides KH, Thein SL, Rees DC. (2006) Cell-free DNA levels in pregnancies at risk of sickle-cell disease and significant ethnic variation. *Br J Haematol.* 135(5):738–41

Gerovassili A, Garner C., Nikolaides KH, Thein SL, Rees DC. (2007) Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities? *Prent Diagn*, 27(2):104-10

Gil MM, Akolekar R, Quezada MS, Bregant B, Nicolaides KH (2014). Analysis of Cell-Free DNA in Maternal Blood in Screening for Aneuploidies: Meta-Analysis. *Fetal Diagn Ther.* Feb 8

Gil MM, Quezada MS, Bregant B, Syngelaki A, Nicolaides KH (2013): Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first trimester twin pregnancies. *Fetal Diagn Ther* DOI: 10.1159/000356495

Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, et al. (2002) Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn*, 22(10):946–8

Gonzalez-Gonzalez MC, MJ Trujillo, M Rodriguez de Alba, M Garcia-Hoyos, I Lorda-Sanchez, J. Diaz-Recasens, C. Ayuso and C. Ramos (2003). Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn*, 23(3):232-4

Grati FR, Bajaj K, Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Malvestiti B, Pompili E, Maggi F, Gross S, Simoli G, Ferreira JC (2015) The type of feto-placental aneuploidy detected by cfDNA testing may influence the choice of confirmatory diagnostic procedure. *Prenat Diagn*, 35(10):994-8

Guibert J., A. Benachi, A.G. Grebille P. Emault, J.R. Zorn and J.M Costa (2003) Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod*, 18(8):1733-6

H. Zhang, Y. Gao, F. Jiang, et al, (2015) Noninvasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13—clinical experience from 146,958 pregnancies, "Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, vol.45,no. 5,pp.530–538,2015

Hahs S., X.Y. Zhong, M.R. Burk, C. Troeger, A. Kang, W. Holzgreve. (2001) Both maternal and fetal cell-free DNA in plasma fluctuate. *Ann N Y Acad Sci*, 945:141-4

Hassold T, Hunt P (2001). To err (meiotically) is human; the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2: 280–291

Honda H, N. Miharuru, Y. Ohashi, O. Samara, M. Kinutani, T. Hara and K. Ohama. (2002) Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma. *Hum Genet*, 110(1):75-9

Huppertz B, Kingdom JC (2004). Apoptosis in the trophoblast-role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig*. 11:353–62

Hyett JA, Gardener G, Stojilkovic-Mikic T, Finning KM, Martin PG, Rodeck CH, et al. (2005) Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat Diagn*. 25(12):1111–6

Jacobs PA, Szulman AE, Funkhouser J, Matsuura JS, Wilson CC (1982). Human triploidy: relationship between parental origin of the additional haploid complement and development of partial hydatidiform mole. *Ann Hum Genet* 46: 223–231

Jauniaux E, Campbell S (1990). Ultrasound assessment of placental abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 163: 1650–1658

Kagan KO, Gazzoni A, Sepulveda-Gonzalez G, Sotiriadis A, Nicolaides KH. (2007). Discordance in nuchal translucency thickness in the prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 29: 527–532

Kagan KO, Wright D, Spencer K, Molina FS, Nicolaides KH. (2008). First trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 31: 493–502

Kagan KO, Wright D, Valencia C, Maiz N, Nicolaides KH (2008): Screening for trisomies 21, 18 and 13 by maternal age, fetal nuchal translucency, fetal heart rate, free  $\beta$ -hCG and pregnancy-associated plasma protein-A. *Hum Reprod*, 23:1968-1975

Larion S, Warsof SL, Romary L, et al (2014). Uptake of noninvasive prenatal testing at a large academic referral center. *Am J Obstet Gynecol*. Jun 19

Lau TK, Cheung SW, Lo PS, Pursley AN, Chan MK, Jiang F, Zhang H, Wang W, Jong LF, Yuen OK, Chan HY, Chan WS, Choy KW (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 Obstet Gynecol*. Mar; 43(3):254-264. doi: 10.1002/uog.13277. Epub 2014 Feb 10.

Lau TK, Jiang F, Chan MK, Zhang H, Lo PS, Wang W (2013): Non-invasive prenatal screening of fetal Down syndrome by maternal plasma DNA sequencing in twin pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 26:434-437

Lazaros L, Hatzi E, Bouba I, Paraskevaidis E, Georgiou I. (2006) Non-invasive prenatal detection of paternal origin hb leporine in a male fetus at the 7th week of gestation. *Fetal Diagn Ther*. 21(6):506–9

Ledbetter DH, Zachary JM, Simpson JL, Golbus MS, Pergament E, Jackson L, Mahoney MJ, Desnick RJ, Schulman J, Copeland KL, Verlinsky Y, Yang-Feng T, Schonberg SA, Babu A, Tharapel A, Dorfmann A, Lubs HA, Rhoads GG, Fowler SE, De La Cruz F. (1992) Cytogenetic results from the U.S. Collaborative Study on CVS. *Prenat Diagn* 12: 317–345

Lee T, LeShane ES, Messerlian GM, Canick JA, Farina A, Heber WW, Bianchi DW (2002). Down syndrome and cell-free fetal DNA in archived maternal serum. *Am J Obstet Gynecol* 187:1217–1221

Leung T.N., J. Zhang, T.K. Lau, L.Y. Chan and Lo Y.M. (2001) Increased maternal plasma fetal DNA concentration in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem*, 47(1):137-9

Leung T.N., J. Zhang, T.K. Lau, N.M. Hjerm and Lo Y.M. (1998) Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet*, 352(9144):1904-5

Levy B et al (2013). Massively multiplexed targeted amplification and sequencing of SNPs as a method for identifying fetal chromosome disorders from cell-free DNA in maternal plasma. Annual Clinical Medical Genetics Meeting, March 19-23, in Phoenix, A

Li Y, W. Holzgreve, GC Page-Christiaens, JJ Gille and S. Hahn (2004). Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma-case report. *Prenat Diagn*, 24(11):896-8

Liao GJ, Chan KC, Jiang P, Sun H, Leung TY, Chiu RW, Lo YM (2012). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *PLoS One* 7: e38154

Linskens IH, Spreeuwenberg MD, Blankenstein MA, van Vugt JM. (2009). Early first-trimester free beta-hCG and PAPP-A serum distributions in monochorionic and dichorionic twins. *Prenat Diagn* 29: 74–78

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 350 (9076)485–7

Lo YM, N.M. Hjelm, C. Fidler, I.L. Sargent, M.F. Murphy, P.F. Chamberlain, P.M. Poon, C.W. Redman and J.S. Wainscoat (1998a). Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N. Engl J Med*, 339(24): 1734-8

Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. (1998b) Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 62(4):768–75

Lo Y.M., T.N. Leung, M.S. Tein, I.L. Sargent, J. Zhang, T.K. Lau, C.J. Haines and C.W. Redman. (1999b) Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem*, 45(20):184-8

Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. (1999a) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 64(1):218–24

Lun F.M., R.W. Chiu, K.C. Allen Chan, T. Yeung Leung, T. Kin Lau and Y.M. Dennis Lo. (2008) Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 54(10):1664-72

Ma Legmai, David S. Cram, Jianguang Zhang, Ling Shang, Huixia Yang, Hong Pan. (2015) Birth of a child with trisomy 9 mosaicism syndrome associated with paternal isodisomy 9: case of a positive noninvasive prenatal test result unconfirmed by invasive prenatal diagnosis. *Molecular Cytogenetics*, 8:44

McDonald-McGinn DM, Sullivan KE (2011). Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/ Velocardiofacial syndrome). *Medicine (Baltimore)*. 90:1-18

McFadden DE, Kalousek DK (1991). Two different phenotypes of fetuses with chromosomal triploidy: correlation with parental origin of the extra haploid set. *Am J Med Genet* 38: 535–538

Maymon R, Jauniaux E, Holmes A, et al. (2001). Nuchal translucency measurement and pregnancy outcome after assisted conception versus spontaneously conceived twins. *Hum Reprod* 16: 1999–2000

Mazloom AR, Džakula Z, Wang H, Oeth P, Jensen T, Tynan J, McCullough R, Saldivar J-S, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Maeder M, McLennan G, Meschino W, Palomaki GE, A. Canick JA, Deciu C. (2013) Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *PrenatDiagn* 33: 591–597

Nasis O, Thompson S, Hong T, Sherwood M, Radcliffe S, Jackson L, et al. (2004) Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable noninvasive prenatal detection of cystic fibrosis. *Clin Chem*. 50(4):694–701

Mendel P. and P. Metais. (1948) Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'Homme. *CR Acad. Sci. Paris*, 142: 241-243

Nielsen J, Wohler M (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet*. 87(1):81–3

Nicolaides KH (2011): Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn*, 31: 7–1

Nicolaides KH, Syngelaki A, Gil M, Atanasova V, Markova D (2013): Validation study of maternal blood cell-free DNA testing by targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms at chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn* 33:575-579

Nicolaides KH, Syngelaki A, Poon LC, Gil MM, Wright D (2014). First-trimester contingent screening for trisomies 21, 18 and 13 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Fetal Diagn Ther* 35: 185–19

Nicolaides KH, Wright D, Poon LC, Syngelaki A, Gil MM (2013). First-trimester contingent screening for trisomy 21 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Ultrasound Obstet Gynecol* 42: 41–50. 8

Norton ME, Brar H, Weiss J, Karimi A, Laurent LC, Caughey AB, Rodriguez MH, Williams J 3rd, Mitchell ME, Adair CD, Lee H, Jacobsson B, Tomlinson MW, Oepkes D, Holleman D, Sparks AB, Oliphant A, 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. *Am J Obstet Gynecol* 207:137.e1-e8

Ohashi Y, Miharuru N, Honda H, Samura O, Ohama K (2001). Quantitation of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies. *Hum Genet* 108:123–127

P.J.Willems, H.Dierickx, E.Vandenakker et al. (2014), "The first 3,000 Non-Invasive Prenatal Tests (NIPT) with the harmony test in Belgium and the Netherlands, "Facts, Views & Vision in ObGyn, vol.6,no.1,pp.7–12

Pan PD, Peter I, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Bianchi DW, Johnson KL. (2005) Cell free fetal DNA levels in pregnancies conceived by IVF. *Hum Reprod*, Nov;20(11):3152-6

Pandya PP, Hilbert F, Snijders RJ, Nicolaides KH. (1995). Nuchal translucency thickness and crown-rump length in twin pregnancies with chromosomally abnormal fetuses. *J Ultrasound Med* 14: 565–568

Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Grody WW, Nelson SF, Canick JA (2012). DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med*, Mar;14(3):296-305

Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, Nelson SF, Canick JA (2011). DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med*. Nov;13(11):913-20

Papageorgiou EA, Fiegler H, Rakyan V, Beck S, Hulten M, Lamnissou K, Carter NP, Patsalis PC (2009). Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Pathol* 174: 1609–1618

Papageorgiou EA, A karagrigoriou, E Tsaliki, V Velissariou, NP Carter PC Patsalis (2011). Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med*, 17:510-513

Pfeiffer RA, Ulmer R, Kniewald A, Wagner-Thiessen E. (1984) Prenatal diagnosis of trisomy 9 mosaicism possibly limited to fetal membranes. *Prenat Diagn.* 4:387–9

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 Diagn Ther*, 33:215-223

R. Hochstenbach, G. C. Page-Christiaens, A. C. van Oppen et al. (2015), "Unexplained false negative results in noninvasive prenatal testing: two cases involving trisomies 13 and 18," *Case Reports in Genetics*, vol., ArticleID926545, 7 pages, 201

R.P.Porreco ,T.J.Garite, K.Maureletal. (2014), "Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massive parallel genomic sequencing of DNA," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol.211,no.4,pp.365.e1–365.e12

Race R.R and R. Sanger. (1975) *Blood groups in man* ed Sixth. Blackwell, Oxford, England

Rosenfeld, R.G. (2000), Turner's syndrome: a growing concern. *J Pediatr*, 137(4): p. 443-4

Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green JA, Winter RM, Brueton L, Brøndum-Nielsen L, Stewart F, Van Essen T, Patton M, Paterson J, Scambler PJ (1997). Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet.* ;34:798–804

Sago H, Sekizawa A, Japan NIPT consortium (2014). Nationwide demonstration project of next-generation sequencing of cell-free DNA in maternal plasma in Japan: 1-year experience. *Apr*;35(4):331-6

Sasaki A, Sawai H, Masuzaki H, et al (2011). Low prevalence of genetic prenatal diagnosis in Japan. *Prenat Diagn. [Letter]*. Oct;31(10):1007-9

Sebire NJ, Hughes K, D'Ercole C, Souka A, Nicolaides KH. (1997). Increased fetal nuchal translucency at 10–14 weeks as a predictor of severe twin-totwin transfusion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 10: 86–89

Sebire NJ, Noble PL, Psarra A, Papapanagiotou G, Nicolaides KH. (1996b). Fetal karyotyping in twin pregnancies: selection of technique by measurement of fetal nuchal translucency. *BJOG* 103: 887–890

Sebire NJ, Snijders RJM, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. (1996a). Screening for trisomy 21 in twin pregnancies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *BJOG* 103: 999–1003

Sebire NJ, Souka A, Skentou H, Geerts L, Nicolaides KH. (2000). Early prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Hum Reprod* 15: 2008–2010

Singh SM, Murphy B, O'Reilly R (2002). Monozygotic twins with chromosome 22q11 deletion and discordant phenotypes: updates with an epigenetic hypothesis. *J Med Genet.* 39:e71

Smith M, Lewis KM, Holmes A, Visootsak J (2014). A Case of False Negative NIPT for Down Syndrome-Lessons Learned. *Case Reports in Genetics* Volume Article ID 823504, 3 pages

Simpson JL, Samango-Sprouse C. (2013) Prenatal diagnosis and 47,XXY. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 163C(1):64–70

Song Y, Liu C, Qi H, Zhang Y, Bian X, Liu J (2013): Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat Diagn* 33:700-706

Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, McBride C, Zahn J, Lee K, Shen N, Doshi J, Sun M, Garrison J, Sandler J, Hollemon D, Pattee P, Tomita-Mitchell A, Mitchell M, Stuelpnagel J, Song K, Oliphant A (2012). Selective analysis of cell free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 32: 3–9

Spencer K, Crossley JA, Aitken DA, et al. (2003). The effect of temporal variation in biochemical markers of trisomy 21 across the first and second trimesters of pregnancy on the estimation of individual patient specific risks and detection rates for Down's syndrome. *Ann Clin Biochem* 40: 219–231



Spencer K, Kagan KO, Nicolaides KH. (2008). Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: an update of the impact of chorionicity on maternal serum markers. *Prenat Diagn* 28: 49–5

Spencer K, Liao AW, Skentou H, Cicero S, Nicolaides KH (2000). Screening for triploidy by fetal nuchal translucency and maternal serum free beta-hCG and PAPP-A at 10–14weeks of gestation. *Prenat Diagn* 20: 495–49

Spencer K, Nicolaides KH. (2000). First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in discordant twins using fetal nuchal translucency thickness and maternal serum free beta-hCG and PAPP-A. *Prenat Diagn* 20: 683–684.

Spencer K, Nicolaides KH. (2003). Screening for trisomy 21 in twins using first trimester ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years experience. *BJOG* 110: 276–28

Thomas NS, Hassold TJ (2003). Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update* 9: 309–317. 110

Uematsu A, Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Mamada M, Kaji M, Yamanaka C, Momoi T, Nakahata T (2002). Parental origin of normal X chromosomes in Turner syndrome patients with various karyotypes: implications for the mechanism leading to generation of a 45,X karyotype. *Am J Med Genet* 111: 134–13

Yaron Y et al (2004). First-trimester nuchal translucency and maternal serum free b-hCG and PAPP-A can detect triploidy and determine the parental origin. *Prenat Diagn* 24:445-450

Wang Y, Chen Y, Tian F, Zhang J, Song Z, Wu Y, Han X, Hu W, Ma D, Cram D, Cheng W (2013). Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clin Chem*. 2014 Jan; 60(1):251-259. doi: 10.1373/clinchem.2013.215145. Epub Nov

Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. (2012) Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med*. 367(23):2175–2184

Wataganara T, Gratacos E, Jani J, Becker J, Lewi L, Sullivan LM, et al (2005). Persistent elevation of cellfree fetal DNA levels in maternal plasma after selective laser coagulation of chorionic plate anastomoses in severe midgestational twin-twin transfusion syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 192(2):604–9

Wataganara T, Peter I, Messerlian GM, Borgatta L, Bianchi DW. (2004) Inverse correlation between maternal weight and second trimester circulating cell-free fetal DNA levels. *Obstet Gynecol.* 104(3):545–50

Westhoff C.M. (2007) The structure and function of the Rh antigen complex. *Semin Hematol*, 44(1):42-50

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. *Prenat Diagn.* 16:511–2

Wright D, Spencer K, Kagan KO, et al. (2010) First-trimester combined screening for trisomy 21 at 7–14 weeks gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 36: 404–411

Zhao C, Tynan J, Ehrich M, Hannum G, McCullough R, Saldivar JS, Oeth P, van den Boom D, Deciu C (2015). Detection of fetal subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Clin Chem Apr*;61(4):608-16

Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, Ryan A, Sigurjonsson S, Chopra N, Dodd M, Levy B, Rabinowitz M (2012): Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diag*, 32:1233-1241