

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΣΕ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΈΛΕΓΧΟ»

ΠΑΥΛΙΔΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

(Επιβλέπουσα)

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

(Συνεπιβλέπουσα-Μέλος)

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

(Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ

2023

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS LABORATORY

**POSTGRADUATE MASTER PROGRAMME
«HUMAN GENETICS-GENETIC COUNSELLING»**

**MASTER'S THESIS
«NEXT GENERATION SEQUENCING FOR NON INVASIVE PRENATAL TESTING»**

**PAVLIDOU VASILIKI
BIOLOGIST**

LARISSA

2023

2

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία με τίτλο «Αλληλούχιση Νέας Γενιάς σε Μη Επεμβατικό Προγεννητικό Έλεγχο» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Γενετική του Ανθρώπου-Γενετική Συμβουλευτική», το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022.

Για την συμβολή τους στην εκπόνηση και την ολοκλήρωση της διατριβής, ευχαριστώ θερμά:

Την επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας κ. Ιωάννα Παπαθανασίου, για την έμπνευση και την ανάθεση του θέματος. Την ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, την επιστημονική καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή της σε όλα τα στάδια της διπλωματικής εργασίας.

Την καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κ. Ασπασία Τσέζου, η οποία ως διευθύντρια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Γενετική του Ανθρώπου-Γενετική Συμβουλευτική» και ως συνεπιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας, προσέφερε κάθε δυνατή στήριξη για την εκπόνησή της. Η πολυετής πείρα και οι σημαντικές γνώσεις της προσέφεραν εποικοδομητικές υποδείξεις για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας κ. Βαρβάρα Τραχανά, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για το ενδιαφέρον και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τη ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, το σύζυγο και τη μητέρα μου, για όλη τη στήριξη, την αμέριστη συμπαράσταση και την κατανόησή τους. Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τη μικρή μου κορούλα για το χαμόγελό της και την αγάπη της στο πρόσωπό μου, που μου έδωσε το κουράγιο να ολοκληρώσω αυτόν τον κύκλο σπουδών.

| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ | Σελίδα |
|---|---------------|
| Περίληψη | 6 |
| Abstract | 7 |
| A. Εισαγωγή | 8 |
| A.1. Προγεννητική Διάγνωση (Προγεννητικός Έλεγχος) | 9 |
| A.1.1. Προγεννητικός Έλεγχος 1 ^{ου} τριμήνου | 11 |
| A.1.2. Προγεννητικός Έλεγχος 2 ^{ου} τριμήνου | 11 |
| A.2. Επεμβατικός Προγεννητικός Έλεγχος | 12 |
| A.2.1. Κλασικός Καρυότυπος | 13 |
| A.2.2. Μέθοδοι Μοριακής Γενετικής | 13 |
| B. Μη Επεμβατικός Προγεννητικός Έλεγχος-NIPT | 15 |
| B.1. Αλληλούχιση Νέας Γενιάς-Next Generation Sequencing | 18 |
| B.2. Ο Μη Επεμβατικός Προγεννητικός Έλεγχος με Αλληλούχιση Νέας Γενιάς στην Κλινική Πράξη | 20 |
| B.3. Τεχνικές Αλληλούχισης Νέας Γενιάς για τον Μη Επεμβατικό Προγεννητικό Έλεγχο -NIPT | 22 |
| B.3.1. Ποσοτική Μαζική Παράλληλη Shotgun Αλληλούχιση για Έλεγχο NIPT | 26 |
| B.3.2. Ποσοτική Μαζική Παράλληλη Στοχευμένη Αλληλούχιση για Έλεγχο NIPT | 31 |
| B.3.3. Ποιοτική Μέθοδος Προσδιορισμού Μονονουκλεοτιδικών Πολυμορφισμών με Αλληλούχιση Νέας Γενιάς για Έλεγχο NIPT | 34 |
| B.3.4. Επιγενετική Ανάλυση με Αλληλούχιση Νέας Γενιάς για Έλεγχο NIPT | 36 |
| B.3.5. Ανάλυση Του Μεταγραφώματος με Αλληλούχιση Νέας Γενιάς για Έλεγχο NIPT | 38 |
| B.4. Πλεονεκτήματα της εφαρμογής της Αλληλούχισης Νέας Γενιάς στον Μη Επεμβατικό Προγεννητικό Έλεγχο -NIPT | 39 |
| B.5. Περιορισμοί της εφαρμογής της Αλληλούχισης Νέας Γενιάς στον Μη Επεμβατικό Προγεννητικό Έλεγχο -NIPT | 50 |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

B.6. Προβληματισμοί για την εφαρμογή του Μη Επεμβατικού Προγεννητικού Ελέγχου-NIPT με NGS52

Γ. Συζήτηση-Συμπεράσματα 55

Βιβλιογραφία 58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος (Non Invasive Prenatal Testing-NIPT) βασίζεται στην ανίχνευση και την ανάλυση του κυκλοφορούντος ελεύθερου εμβρυικού DNA (circulating cell-free fetal DNA-ccffDNA), που απομονώνεται από το περιφερικό αίμα της εγκύου. Σήμερα, η αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing-NGS) έχει δώσει στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην ανίχνευση χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών στην κλινική πράξη. Η εξέλιξη των τεχνικών της αλληλούχισης νέας γενιάς για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο επιτρέπει την ανίχνευση, εκτός από τις χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες, χρωμοσωμικών μικροελλείψεων και μικροδιπλασιασμών καθώς και μονογονιδιακών νοσημάτων στο έμβryo. Οι εφαρμογές του ελέγχου NIPT μέσω της αλληλούχισης νέας γενιάς διαρκώς αυξάνονται και εξελίσσονται, γιατί εκτός των παραπάνω, ελέγχεται πλέον όλο το γονιδίωμα του εμβρύου, το μεταγράφομα και οι επιγενετικές του τροποποιήσεις, δίνοντας σημαντικές κλινικές πληροφορίες για την υγεία του εμβρύου και της μητέρας. Η βελτιστοποίηση των τεχνικών της αλληλούχισης νέας γενιάς, εκτός από την αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας των διαφόρων τεστ μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου-NIPT που διατίθενται προς επιλογή, έχει συμβάλει στη σημαντική μείωση του κόστους και της ψυχολογικής επιβάρυνσης των γονέων, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην επιτυχή προγεννητική διάγνωση και στην παρακολούθηση της εξέλιξης μίας κύησης.

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της σύγχρονης βιβλιογραφίας στη βιβλιογραφική βάση PUBMED για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο με αλληλούχιση νέας γενιάς.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: Non-invasive prenatal testing, next generation sequencing, massive-parallel DNA sequencing, cell-free fetal DNA, aneuploidy screening, NIPT

ABSTRACT

Non Invasive Prenatal Testing-NIPT involves the detection and sequence analysis of the circulating cell-free fetal DNA-ccffDNA, isolated from the maternal blood circulation.

NIPT using Next Generation Sequencing (NGS) allows the detection of chromosomal aneuploidies, chromosomal microdeletions, microduplications and monogenic disorders of the fetus. In addition, NGS in NIPT can be used to screen the whole fetal and maternal genome, as well as the transcriptome and the epigenetic modifications of the fetal and maternal genome.

Although the improvement of the NGS techniques has increased the sensitivity and specificity of NIPT, NIPT is still considered a screening test and not a diagnostic tool.

Aim of this master's thesis is a systematic review of the recent bibliography related to next generation sequencing-based NIPT.

KEYWORDS: Non-invasive prenatal testing, next generation sequencing, massive-parallel DNA sequencing, cell-free fetal DNA, aneuploidy screening, NIPT

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος (Non Invasive Prenatal Testing-NIPT) βασίζεται στη χρήση του εμβρυικού γενετικού υλικού (circulating cell-free fetal DNA-ccffDNA) που απομονώνεται από το αίμα της εγκύου, για την ανίχνευση συγκεκριμένων γενετικών ανωμαλιών κατά την κύηση. Ο έλεγχος NIPT συχνά αναφέρεται και ως cell-free DNA testing, prenatal cell-free DNA screening (Pös *et al.*, 2019) ή και Non Invasive Prenatal Screening-NIPS (Harraway, 2017). Επίσης, αναφέρεται και ως μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση (Non Invasive Prenatal Diagnosis-NIPD). Ο τελευταίος όρος όμως μπορεί να είναι και λίγο παραπλανητικός, γιατί παρά την τάχιστα εξέλιξη στην εφαρμογή του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου, παραμένει ακόμη ένα screening test και όχι διαγνωστική μέθοδος (Kotsopoulou *et al.*, 2015). Διαγνωστική αξία έχει στην περίπτωση διάγνωσης μονογονιδιακών νοσημάτων και στον καθορισμό του γονοτύπου Rhesus D, γιατί δεν έχουν αναφερθεί ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα και δεν απαιτείται η επιβεβαίωση με κάποιο τεστ επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου (Filoche *et al.*, 2017), (Shaw *et al.*, 2020).

Τα τελευταία χρόνια η αλληλούχιση νέας γενιάς έχει φέρει επανάσταση στον τομέα της προγεννητικής διάγνωσης, καθώς με την εφαρμογή του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου είναι δυνατό να ελεγχθεί η γενική κατάσταση και η υγεία ενός εμβρύου, χωρίς να τίθεται σε κίνδυνο το ίδιο και η κυοφορούσα (Renga, 2018). Με την ασφάλεια μίας απλής αιμοληψίας και την αποφυγή του επεμβατικού ελέγχου που περιλαμβάνει τη λήψη τροφοβλαστικού ιστού ή αμνιοπαρακέντηση, μειώνεται κατά πολύ το άγχος και η ψυχολογική καταπόνηση μίας εγκύου που είναι υποχρεωμένη να προβεί σε προγεννητικό έλεγχο, λόγω προχωρημένης ηλικίας, οικογενειακού κλινικού ιστορικού ή προηγούμενης παθολογικής κύησης (Kotsopoulou *et al.*, 2015), (Wang *et al.*, 2020). Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος με αλληλούχιση νέας γενιάς αν και αρχικά ήταν αρκετά δαπανηρή μέθοδος προγεννητικού ελέγχου, γεγονός που τον καθιστούσε απαγορευτικό, κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος στον τομέα της προγεννητικής διάγνωσης (Breveglieri *et al.*, 2019), (Labonté *et al.*, 2019).

A.1. ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ (ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ)

Η προγεννητική διάγνωση (προγεννητικός έλεγχος) έχει ως στόχο να ελεγχθεί η γενική κατάσταση και η υγεία ενός εμβρύου, καθώς οι γενετικές ανωμαλίες ευθύνονται για επιπλοκές της κύησης σε ποσοστό 3-5% (Renga, 2018). Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες εμφανίζονται σε συχνότητα 1/150 γεννήσεις και οι συγγενείς ανωμαλίες παραμένουν η κύρια αιτία θανάτου νεογνών και παιδιών (Kochanek *et al.*, 2012). Οι πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι οι ανευπλοειδίες, οι μεταθέσεις, οι διπλασιασμοί και οι ελλείψεις, με την τρισωμία 21 (σύνδρομο Down) να εμφανίζεται σε συχνότητα 1/800 γεννήσεις. Η τρισωμία 13 (σύνδρομο Patau) και η τρισωμία 18 (σύνδρομο Edwards) εμφανίζονται σε εμφανώς μικρότερο ποσοστό γεννήσεων, 1/7500 και 1/15000, αντίστοιχα. Οι ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων είναι πιο σπάνιες συγκριτικά με τις ανευπλοειδίες των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων. Η πιο συχνή βιώσιμη μονοσωμία είναι αυτή του χρωμοσώματος X (σύνδρομο Turner) (Renga, 2018).

Σκοπός της προγεννητικής διάγνωσης είναι η παρακολούθηση της εξέλιξης μίας κύησης, η πρόγνωση πιθανών επιπλοκών που θα προκύψουν κατά τη γέννηση, καθώς και η ψυχολογική, κοινωνική και οικονομική προετοιμασία των γονέων για την απόκτηση ενός παιδιού με σοβαρά προβλήματα υγείας. Έτσι, τους παρέχεται η δυνατότητα της επιλογής διακοπής ή μη της κύησης και η γνώση για τις επιπτώσεις σε μελλοντικές κυήσεις (Kotsopoulou *et al.*, 2015).

Στις δεκαετίες του 1970 και 1980 ο κυριότερος παράγοντας που παρέπεμπε σε προγεννητικό έλεγχο ήταν η προχωρημένη ηλικία της μητέρας, ειδικά όταν αυτή ήταν μεγαλύτερη των 35 ετών και περιλάμβανε την εφαρμογή του κλασικού καρυότυπου, όπου ανιχνεύονταν μόνο το 2% των χρωμοσωμικών ανωμαλιών (κυρίως τρισωμία 21) (Ferguson-Smith and Yates, 1984), (Savva *et al.*, 2006). Στη δεκαετία του 1990 προστέθηκαν οι βιοχημικές εξετάσεις στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης, οι οποίες σε συνδυασμό με τον κλασικό καρυότυπο ανίχνευαν χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε ποσοστό 4% (Benn *et al.*, 2004). Στις αρχές του 2000, στον προγεννητικό έλεγχο κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, προστέθηκε η μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας σε συνδυασμό με τα επίπεδα των δεικτών PAPP-A και hCG στο αίμα της εγκύου. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε ποσοστό 6% και ειδικά για την τρισωμία 21 αυτή να ανιχνεύεται στις εννέα από τις δέκα περιπτώσεις (Syngelaki *et al.*, 2011).

Η εξέλιξη όμως στον προγεννητικό έλεγχο ήταν αναπόφευκτη, καθώς μετά την ανακάλυψη του κυκλοφορούντος ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (circulating cell-free fetal DNA-cffDNA) στο

περιφερικό αίμα της μητέρας, προέκυψε η δυνατότητα εφαρμογής τεχνικών μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου για την ανίχνευση των πιο κοινών ανευπλοειδιών με μεγάλα ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας.

Σήμερα, η προγεννητική διάγνωση βασίζεται στην εφαρμογή διαφόρων τεχνικών, κάθε μία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από διαφορετικό βαθμό επεμβατικότητας και χρόνου εφαρμογής κατά την κύηση, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 (Kotsopoulou *et al.*, 2015).

Πίνακας 1. Μέθοδοι προγεννητικής διάγνωσης, βαθμός επεμβατικότητας και χρόνος εφαρμογής τους κατά την κύηση (Kotsopoulou *et al.*, 2015)

| Invasiveness | Test | Comments | Time |
|---------------|--|---|---------------------------|
| Non-invasive | Preimplantation genetic diagnosis (PGD) | During in vitro fertilization procedures, it is possible to sample cells from human embryos prior the implantation. | Prior to implantation |
| Less-invasive | Fetal cells in maternal blood | Based on the enrichment for fetal cells that circulate in maternal blood. | First trimester |
| Less-invasive | Cell free DNA in maternal plasma | Based on DNA of fetal origin circulating in the maternal blood. Testing could potentially identify fetal aneuploidy, rhesus status and gender of a fetus. Fetal DNA ranges from about 2–10% of the total DNA in maternal blood. | First trimester |
| Non-invasive | Ultrasound detection | Commonly <i>dating scans</i> starting from 7 weeks to confirm pregnancy dates and search for twins. The specialized nuchal scan at 11–13 weeks may be used to identify a higher risk for Down syndrome. Later <i>morphology scans</i> from 18 weeks may check for any abnormal development. | First or second trimester |
| Non-invasive | Fetal heartbeat | Evaluating the fetal heartbeat. | First or second trimester |
| Less invasive | Maternal serum screening | Including free β -hCG and PAPP-A (most often), α -fetoprotein, unconjugated E3, intact or β -hCG, inhibin-A [14]. | First or second trimester |
| More invasive | Chronionic villus sampling (CVS) | Retrieving a sample of chorionic villus tissue and testing it by karyotyping or rapid molecular aneuploidy test. The procedure poses a significant risk of miscarriage, estimated at least 1%. | After 10 weeks |
| More invasive | Amniocentesis | Cells from the fetus floating in amniotic fluid can be separated and tested by karyotyping or rapid molecular aneuploidy test. Miscarriage risk of amniocentesis is commonly quoted as 0.06% (1:1600). | After 15 weeks |
| Less invasive | Embryoscopy and fetoscopy | Though rarely done, these involve putting a probe into a women's uterus to observe (with a video camera). | After 20 weeks |
| More invasive | Percutaneous umbilical cord blood sampling | Examines blood from the fetal umbilical cord to detect fetal abnormalities, provides a means of rapid chromosome analysis. | After 20 weeks |

A.1.1. ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ 1^{ου} ΤΡΙΜΗΝΟΥ

Κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης πραγματοποιείται προγεννητικός έλεγχος με σκοπό την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου, κυρίως για τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα 13, 18 και 21, καθώς και ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Πραγματοποιείται υπερηχογράφημα για τη μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας, το αποτέλεσμα του οποίου σε συνδυασμό με την ηλικία και τα επίπεδα των δεικτών PAPP-A και hCG στο αίμα της εγκύου εκτιμούν την πιθανότητα ανίχνευσης εμβρύων με ανευπλοειδία σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% (Samura, 2020).

A.1.2. ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ 2^{ου} ΤΡΙΜΗΝΟΥ

Κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης ο έλεγχος περιλαμβάνει το triple test ή το quadruple test και τον υπερηχογραφικό έλεγχο του εμβρύου. Το triple test βασίζεται στη μέτρηση στον ορό της εγκύου της ελεύθερης β-hCG, της άλφα φετοπρωτεΐνης AFP και της μη συνδεδεμένης οιστραδιόλης. Το quadruple test περιλαμβάνει τη μέτρηση των προαναφερθέντων δεικτών και της ορμόνης ινχιπίνη Α. Με το υπερηχογράφημα β' επιπέδου, ελέγχεται η ανάπτυξη του εμβρύου, η κατάσταση του πλακούντα, του ομφάλιου λώρου και η γενική εικόνα της μήτρας. Ο έλεγχος του 2^{ου} τριμήνου συμπληρώνει αυτόν του 1^{ου}, γιατί ανιχνεύει ανωμαλίες που τυχόν δεν παρατηρήθηκαν κατά τον έλεγχο του 1^{ου} τριμήνου (Samura, 2020). Συγκεντρωτικά, στον Πίνακα 2 αναφέρεται ο προγεννητικός έλεγχος του 1^{ου} και 2^{ου} τριμήνου και το ποσοστό ανίχνευσης (detection rate) της τρισωμίας 21 (σύνδρομο Down) (Wagner *et al.*, 2014).

Πίνακας 2. Προγεννητικός έλεγχος του 1^{ου} και 2^{ου} τριμήνου κύησης και ποσοστό ανίχνευσης (detection rate) της τρισωμίας 21 (σύνδρομο Down) (Wagner *et al.*, 2014)

| Down syndrome screening tests and detection rates | |
|---|--------------------|
| Screening Test | Detection Rate (%) |
| First trimester | |
| NT measurement | 64–70 |
| NT measurement, PAPP-A, free or total beta-hCG | 82–87 |
| Second trimester | |
| Triple screen (maternal serum alpha-fetoprotein, hCG, unconjugated estriol) | 69 |
| Quadruple screen (maternal serum alpha-fetoprotein, hCG, unconjugated estriol, inhibin A) | 81 |
| First and second trimesters | |
| Integrated (NT, PAPP-A, quadruple screen) | 94–96 |
| Serum integrated (PAPP-A, quadruple screen) | 85–88 |
| Stepwise sequential | 95 |
| First-trimester test result | |
| Positive: Diagnostic test offered | |
| Negative: Second-trimester test offered | |
| Final: Risk assessment incorporates first- and second-trimester results | |
| Contingent sequential | |
| 88–94 | |
| First-trimester test result | |
| Positive: Diagnostic test offered | |
| Negative: No further testing | |
| Intermediate: Second-trimester test offered | |
| Final: Risk assessment incorporates first- and second-trimester results | |

A.2. ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ

Ο επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος περιλαμβάνει τη λήψη τροφοβλαστικού ιστού που πραγματοποιείται κατά την 11^η-14^η εβδομάδα κύησης, πλεονεκτώντας έναντι της δεύτερης επεμβατικής μεθόδου της αμνιοπαρακέντησης που γίνεται κατά τη 16^η -20^η, σε περίπτωση που απαιτείται διακοπή της κύησης (Hultén *et al.*, 2003). Σε οποιαδήποτε επιπλοκή, η αμνιοπαρακέντηση μπορεί να πραγματοποιηθεί και μετά την 20^η εβδομάδα, γνωρίζοντας όμως ότι μετά την 24^η εβδομάδα υπάρχει νομικό κώλυμα στη χώρα μας για διακοπή της κύησης για οποιοδήποτε λόγο. Κατά την πρώτη επεμβατική μέθοδο η πιθανότητα αποβολής με τη λήψη χοριακών λαχνών υπολογίζεται σε 0,5-1% (Mujezinovic and Alfirevic, 2007). Κατά την αμνιοπαρακέντηση η πιθανότητα αποβολής υπολογίζεται σε ποσοστό μικρότερο του 0,5% (Tabor

and Alfirevic, 2010), (Samura, 2020). Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα ποσοστά αποβολής κατά την εφαρμογή του επεμβατικού ελέγχου, ενδέχεται να είναι κατά πολύ μικρότερα (Akolekar *et al.*, 2015).

Ο επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος πραγματοποιείται με τον κλασικό καρυότυπο τροφοβλαστικού ιστού ή αμνιακού υγρού, την τεχνική FISH (Fluorescent In Situ Hybridization ή Φθορίζων in situ Υβριδισμός), την ταχεία ανίχνευση ανευπλοειδιών των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21, X και Y (Quantitative Fluorescent PCR-QF PCR) και την τεχνική του Συγκριτικού Γονιδιωματικού Υβριδισμού σε Μικροσυστοιχίες (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) ή μοριακός καρυότυπος σε δείγματα αμνιακού υγρού ή τροφοβλαστικού ιστού.

A.2.1. ΚΛΑΣΙΚΟΣ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ

Η κύρια μέθοδος για τη διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου είναι ο κλασικός καρυότυπος σε καλλιέργεια εμβρυικών κυττάρων που λαμβάνονται με αμνιοπαρακέντηση ή λήψη χοριακής λάχνης (τροφοβλαστικός ιστός). Ωστόσο, απαιτούνται περίπου 2 εβδομάδες για την ολοκλήρωση της εξέτασης (Kotsopoulou *et al.*, 2015). Χαρακτηρίζεται ως gold standard μέθοδος, λόγω των εξαιρετικά χαμηλών ποσοστών ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων (0,01-0,02%), τα οποία συνήθως οφείλονται σε μητρική επιμειξία, σε μωσαϊκισμό τροφοβλάστης και λανθασμένες εργαστηριακές πρακτικές (Ledbetter *et al.*, 1992). Με τον κλασικό καρυότυπο ανιχνεύονται ανευπλοειδίες αυτοσωμικών και φυλετικών χρωμοσωμάτων, χρωμοσωμικές μεταθέσεις (ισοζυγισμένες και μη) και σύνθετες ανωμαλίες. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι με την εφαρμογή της είναι δυνατή η ανίχνευση μόνο μεγάλων δομικών ανωμαλιών μεγέθους 5-10Mb (Soler *et al.*, 2017).

A.2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Με την εξέλιξη της τεχνολογίας στη μοριακή γενετική, δόθηκε η δυνατότητα εφαρμογής τεχνικών προγεννητικού ελέγχου μεγαλύτερης ακρίβειας και αξιοπιστίας. Οι συγκεκριμένες τεχνικές ξεπερνούν την ανάγκη του κλασικού καρυότυπου για καλλιέργεια των εμβρυικών κυττάρων, με

παράδοση του αποτελέσματος σε σχετικά σύντομο χρόνο και μείωση του άγχους των γονέων σε σημαντικό βαθμό (Cirigliano *et al.*, 2004).

Συγκεκριμένα, ο Φθορίζων *in situ* Υβριδισμός (Fluorescent *In Situ* Hybridization-FISH) βασίζεται στη χρήση ανιχνευτών (DNA probes) σημασμένων με φθοριοχρώματα, οι οποίοι υβριδίζονται με τη συμπληρωματική προς αυτούς αλληλουχία-στόχο DNA στα κύτταρα (Evans *et al.*, 1999). Για τον προγεννητικό έλεγχο χρησιμοποιούνται ειδικοί ανιχνευτές για ολόκληρα χρωμοσώματα, κυρίως για τα 21, 18, 13, X και Y. Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου είναι μεγαλύτερη αυτής του καρυοτύπου (<5-10Mb), με τον περιορισμό ότι οι ανιχνευτές που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι ειδικοί για συγκεκριμένο χρωμόσωμα ή γενετικό τόπο (Vialard *et al.*, 2011). Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος απαιτείται επιβεβαίωση με κλασικό καρυότυπο (Evans *et al.*, 1999), (Caine *et al.*, 2005).

Η Quantitative Fluorescent PCR-QF PCR είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ταχεία ανίχνευση των πιο κοινών ανευπλοειδιών των χρωμοσωμάτων 21, 18, 13, X και Y. Ο αριθμός των ανευπλοειδιών που ανιχνεύονται είναι μικρός, αποτελούν όμως το 80% των κλινικά σημαντικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών που διαγιγνώσκονται στην προγεννητική περίοδο σε βιολογικά δείγματα αμνιακού υγρού, τροφοβλαστικού ιστού, εμβρυικού αίματος ή προϊόντος αποβολής. Στόχος της τεχνικής είναι η ενίσχυση ειδικών για κάθε χρωμόσωμα πολυμορφικών DNA αλληλουχιών-STRs δείκτες (Short Tandem Repeats), οι οποίοι ενισχύονται με τη χρήση φθορίζοντων εκκινητών. Οι ενισχυμένοι STRs δείκτες οπτικοποιούνται και ποσοτικοποιούνται σαν κορυφές (peak areas) κατά την ηλεκτροφόρηση σε αυτόματους DNA αναλυτές. Η QF PCR πλεονεκτεί έναντι του κλασικού καρυοτύπου, λόγω ότι απαιτείται μικρότερη αρχική ποσότητα εμβρυικού βιολογικού υλικού και μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα που λαμβάνονται από τη 12^η-34^η εβδομάδα, χωρίς να επηρεάζεται η αξιοπιστία της. Σαφώς πρόκειται για μία πιο οικονομική και αυτοματοποιημένη μέθοδο καθώς στους DNA αναλυτές μπορεί να αναλυθεί ταυτόχρονα μεγάλος αριθμός δειγμάτων, συγκριτικά με τη μέθοδο FISH και τον καρυότυπο (Hultén *et al.*, 2003). Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα ελέγχου ξεχωριστά των μονοζυγωτικών και διζυγωτικών εμβρύων. Επίσης, στο ίδιο βιολογικό δείγμα μπορεί να πραγματοποιηθεί έλεγχος φορέας για συχνά μονογονιδιακά νοσήματα, όπως πχ η μετάλλαξη ΔF508 στο γονίδιο CFTR υπεύθυνο για την κυστική ίνωση. Μειονέκτημα της QF PCR είναι η μειωμένη ικανότητα ανίχνευσης μωσαϊκισμού και δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών (αναστροφές, μεταθέσεις,

μικροδιπλασιασμοί, μικροελλείμματα, μικροενθέσεις) και ότι το αποτέλεσμα απαιτείται να επιβεβαιωθεί με κλασικό καρυότυπο (Shaffer and Bui, 2007).

Ο Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός σε Μικροσυστοιχίες (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) χαρακτηρίζεται από υψηλή διακριτική ικανότητα για τον εντοπισμό εκτός από χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες, ελλειμμάτων ή διπλασιασμών χρωμοσωμικού υλικού (Copy Number Variations-CNVs) σε ένα βιολογικό δείγμα (Benn *et al.*, 2013). Η μέθοδος στηρίζεται στην αρχή του ανταγωνιστικού υβριδισμού των νουκλεϊκών οξέων και εκμεταλλεύεται την τεχνολογία μικροεκτύπωσης ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών σε slides γυαλιού (μικροσυστοιχίες DNA), αλλά και τις δυνατότητες ανάλυσης των δεδομένων με προγράμματα βιοπληροφορικής. Ονομάζεται και μοριακός καρυότυπος, καθώς όπως και ο κλασικός καρυότυπος ανιχνεύει ελλείμματα και διπλασιασμούς χρωμοσωμικών τμημάτων αλλά με μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα, γεφυρώνοντας το διαγνωστικό χάσμα μεταξύ της κλασικής και μοριακής γενετικής (Dugoff *et al.*, 2016). Πιο συγκεκριμένα, ο μοριακός καρυότυπος ανιχνεύει χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες, CNVs (ακόμη και μεγέθους 8-10Kb), μεταθέσεις και αναστροφές (όταν συνυπάρχει ποσοτική αλλαγή) και χρωμοσωμικά θραύσματα. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δε μπορεί να ανιχνεύσει σημειακές αλλαγές στην αλληλουχία ενός γονιδίου, μικρές ενθέσεις και ελλείψεις νουκλεοτιδίων, νουκλεοτιδικές επεκτάσεις, ισοζυγισμένες μεταθέσεις και μικρό ποσοστό μωσαϊκισμού (Dugoff *et al.*, 2016).

Οι εξελιγμένες μέθοδοι επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου έχουν το πλεονέκτημα του υψηλού βαθμού ανάλυσης των χρωμοσωμάτων, πολλές φορές όμως δίνουν κάποια αποτελέσματα άγνωστης κλινικής σημασίας, αυξάνοντας έτσι το άγχος των γονέων για την απόκτηση ενός υγιούς παιδιού (Kotsopoulou *et al.*, 2015).

B. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ-NIPT

Το 1948 στο άρθρο των Mandel and Metais, αναφέρθηκαν οι πρώτες ενδείξεις για τα κυκλοφορούντα νουκλεϊνικά οξέα στο περιφερικό αίμα (cell free-cfDNA) (Mandel and Metais, 1948). Πολύ αργότερα προέκυψαν διάφορες μελέτες επιστημονικών ομάδων σχετικά με την ταυτοποίηση και την απομόνωση εμβρυικών κυττάρων από το μητρικό περιφερικό αίμα (Bianchi *et al.*, 1997), (Μαντρου *et al.*, 1998) με κυριότερη αυτή της ερευνητικής ομάδας του Lo το 1997, όπου για πρώτη φορά ανακοινώθηκε, η παρουσία και η απομόνωση κυκλοφορούντος ελεύθερου

εμβρυικού DNA (circulating cell-free fetal DNA-ccffDNA). Το απομονωθέν ccffDNA ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR για την ταυτοποίηση μίας περιοχής στο χρωμόσωμα Y, σε γυναίκες που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα (Dennis Lo *et al.*, 1997).

Έτσι, ξεκίνησε και η ιδέα της εφαρμογής του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου (Non Invasive Prenatal Testing-NIPT). Το ccffDNA απελευθερώνεται από τον τροφοβλαστικό ιστό που δομεί τον πλακούντα και ο λόγος της συγκέντρωσής του προς τη συγκέντρωση του ολικού cell free-cfDNA στο περιφερικό αίμα της μητέρας αναφέρεται ως εμβρυικό κλάσμα «fetal fraction». Στην Εικόνα 1 απεικονίζεται η προέλευση του ccffDNA στη μητρική κυκλοφορία (Pöös *et al.*, 2019).

Αρχικές μελέτες υπολόγιζαν με τη μέθοδο της Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (Quantitative Real Time PCR-qPCR) το ccffDNA στο αίμα της μητέρας σε ποσοστό 3-6% και μάλιστα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πλάσμα συγκριτικά με τον ορό (Y. M. Dennis Lo *et al.*, 1998). Στην κυκλοφορία της εγκύου βρίσκονται κύτταρα προερχόμενα από το έμβρυο, όπως λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια, από τα οποία επίσης μπορεί να απομονωθεί το DNA του εμβρύου. Ωστόσο, το ccffDNA ανιχνεύεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στη μητρική κυκλοφορία (Lo, 2000). Αργότερα, βρέθηκε ότι μπορεί να φθάνει και το 10-16% του συνολικού cell free-cfDNA που ανιχνεύεται στο αίμα της εγκύου (Lun *et al.*, 2008), (Levy and Norwitz, 2013), (Suzumori *et al.*, 2016).

Η κυκλοφορία του ccffDNA στο αίμα της μητέρας ξεκινά από την 4^η εβδομάδα κύησης και τα επίπεδά του αυξάνονται κατά την εξέλιξη της (Illanes *et al.*, 2007), (Kinnings *et al.*, 2015). Σε σύντομο χρονικό διάστημα, ακόμη και 2 ώρες μετά τη γέννηση, τα επίπεδα ανίχνευσης του ccffDNA πρακτικά μηδενίζονται, οπότε δεν υπάρχει κίνδυνος ανίχνευσης του σε επόμενες κυήσεις και η πιθανότητα σύγχυσης των αποτελεσμάτων (Y. M. Dennis Lo *et al.*, 1998), (Dennis Lo *et al.*, 1999), (Smid *et al.*, 2003).

Τα θραύσματα του ccffDNA είναι μικρότερα των 200bp (περίπου 143-150bp) (Chan *et al.*, 2004), κατά πολύ μικρότερα από το cfDNA της μητέρας (400-500bp) (Li *et al.*, 2004), γεγονός που λαμβάνεται υπόψη για τη μεταξύ τους διάκριση κατά την απομόνωση και ανάλυση τους (Chan *et al.*, 2006), (Chim *et al.*, 2008).

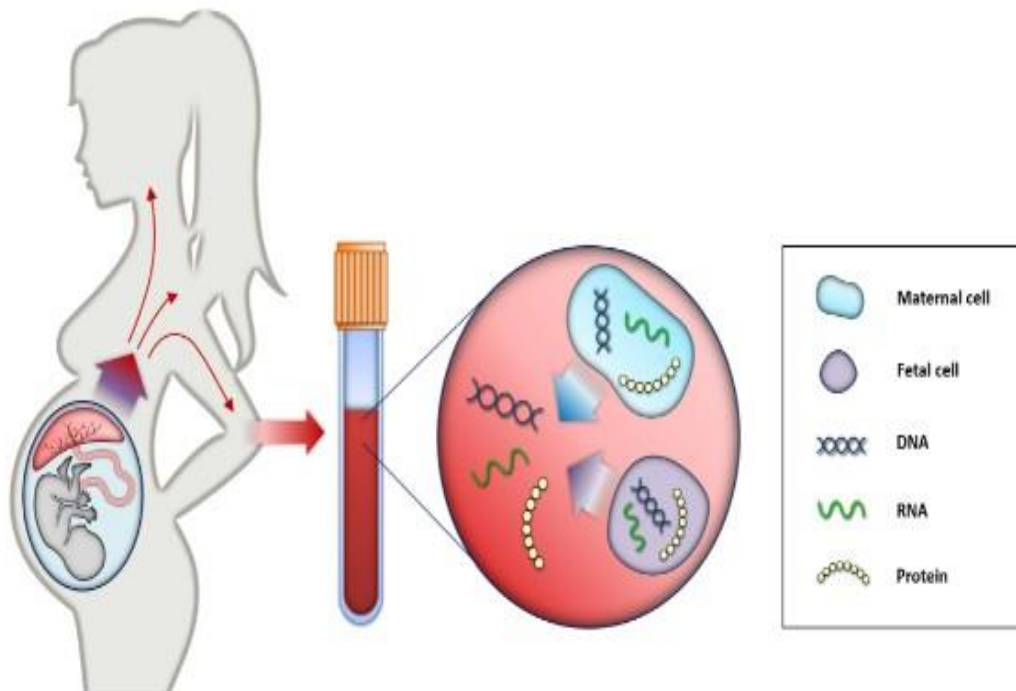


Figure 1. Principle of non-invasive prenatal testing. Maternal blood consists of maternal and placental cells, which release their DNA content directly into maternal circulation. Therefore, cell-free fetal elements (for example, DNA, RNA, and proteins) are present in the blood of pregnant woman and can be used as biomarkers for prenatal testing and diagnosis^{21,22}.

Εικόνα 1. Προέλευση του cfDNA στη μητρική κυκλοφορία (Pös *et al.*, 2019)

Σήμερα, η κύρια μέθοδος που εφαρμόζεται για την ενίσχυση και ταυτοποίηση των cfDNA θραυσμάτων είναι η αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing-NGS), κατά την οποία ανιχνεύονται και προσδιορίζονται μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs), συγκεκριμένες αλληλουχίες και επιγενετικοί δείκτες κατά μήκος του γονιδιώματος (Yu *et al.*, 2014), (Samura, 2020).

Η συγκέντρωση του cfDNA στο αίμα της μητέρας επηρεάζεται από την χρονική εξέλιξη της κύησης αλλά και από διάφορους παράγοντες, όπως το βάρος της εγκύου (Vora *et al.*, 2012), η λήψη αντιπηκτικής αγωγής (Palomaki *et al.*, 2011), η ύπαρξη ανευπλοειδιών στη μητέρα ή το έμβρυο (Fan *et al.*, 2008), (Poon *et al.*, 2013), (Zhou *et al.*, 2015), η δίδυμη κύηση (Bischoff *et al.*, 2005) και αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τον επιτυχή έλεγχο NIPT με αλληλούχιση νέας

γενιάς (Attilakos *et al.*, 2011). Ακόμη και το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της αιμοληψίας και της απομόνωσης του ccffDNA είναι κρίσιμης σημασίας. Για το λόγο αυτό το μητρικό αίμα αναμειγνύεται με φορμαλδεΰδη, ώστε να αποφευχθεί η λύση των κυττάρων και ο κατακερματισμός του ccffDNA από τη δράση των DNA νουκλεασών (Zhang *et al.*, 2008).

B.1. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ-NEXT GENERATION SEQUENCING

Η αλληλούχιση του DNA έχει παίξει σημαντικό ρόλο στην κατανόηση της βιολογίας του ανθρώπου και μετέπειτα στην κλινική διάγνωση (Koboldt *et al.*, 2013). Η αλληλούχιση πρώτης γενιάς (Sanger sequencing) αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Fred Sanger το 1977 και εφαρμόστηκε για δεκαετίες στην έρευνα και την κλινική γενετική (Sanger *et al.*, 1973), (Sanger and Coulson, 1975). Τρεις δεκαετίες αργότερα, η ανάπτυξη της τεχνολογίας έδωσε γέννηση στην αλληλούχιση δεύτερης και τρίτης γενιάς (Grumbt *et al.*, 2013). Από το 2001, ο χρόνος και το κόστος αλληλούχισης έχουν μειωθεί δραματικά λόγω των εξελιγμένων δυνατοτήτων των νέων πλατφορμών Next Generation Sequencing-NGS (Mardis, 2014), (Fernandez-Cuesta *et al.*, 2015).

Η αλληλούχιση νέας γενιάς είναι γνωστή ως Next Generation Sequencing-NGS ή μαζική παράλληλη αλληλούχιση (Massive Parallel Sequencing-MPS) ή Deep Sequencing και δίνει σήμερα τη δυνατότητα παράλληλου χειρισμού μεγάλου αριθμού δειγμάτων (high-throughput DNA sequencing). Με την εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής αναλύονται εκατομμύρια ή ακόμη και δισεκατομμύρια αλληλουχίες DNA ταυτόχρονα. Έτσι, είναι δυνατό να αλληλουχηθεί ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα (Talkowski *et al.*, 2012), συγκεκριμένες περιοχές αυτού, όπως εξόνια (de Ligt *et al.*, 2012) ή συγκεκριμένα γονίδια και ομάδες γονιδίων, το μεταγράφομα κα. (Ong *et al.*, 2013). Είναι προφανές ότι με την αλληλούχιση νέας γενιάς προκύπτει ένας τεράστιος όγκος δεδομένων διαθέσιμος προς επεξεργασία, ώστε να είναι εφικτή πλέον η εφαρμογή της Εξατομικευμένης Ιατρικής (Behjati and Tarpey, 2013), (Hoadley *et al.*, 2018).

Στη μοριακή διαγνωστική χρησιμοποιούνται διάφορες Next Generation Sequencing-NGS πλατφόρμες ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε εργαστηρίου, οι οποίες διαθέτουν συγκεκριμένα τεχνικά χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά καθορίζονται από τη μέθοδο αλληλούχισης που εφαρμόζεται. Οι μέθοδοι αλληλούχισης νέας γενιάς είναι η αλληλούχιση με σύνθεση (sequencing by synthesis), η πυροαλληλούχιση (pyrosequencing), η αλληλούχιση με αντίδραση λιγάσης

(sequencing by ligation) και η αλληλούχιση μέσω ανίχνευσης ιόντων υδρογόνου (ion semiconductor sequencing) (Mardis, 2008), (Breveglieri *et al.*, 2019).

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο στην οποία βασίζεται η αλληλούχιση, όλες οι NGS πλατφόρμες έχουν κοινές εργαστηριακές διαδικασίες. Αρχικά γίνεται η δημιουργία βιβλιοθήκης των θραυσμάτων DNA που προκύπτουν με χημικές ή ενζυμικές κατεργασίες (library preparation). Στα άκρα των θραυσμάτων συνδέονται με αντίδραση λιγάσης ειδικές αλληλουχίες (adaptors) που χρησιμεύουν για την ενίσχυση του γονιδιώματος (genome enrichment), την αναγνώριση του κάθε δείγματος και την αλληλούχιση (Breveglieri *et al.*, 2019). Κατά την ενίσχυση προκύπτουν συστάδες (clusters) των πολλαπλασιασμένων θραυσμάτων, η κάθε μία προερχόμενη από τη βιβλιοθήκη ενός θραύσματος. Οι προαναφερθείσες μέθοδοι NGS έχουν ως αποτέλεσμα να δημιουργούν και να αναλύουν «short read» αλληλουχίες, συνήθως μεγέθους 600bp. Για το λόγο αυτό κατά το NGS παράγονται εκατομμύρια ή ακόμη και δισεκατομμύρια αλληλουχίες DNA ταυτόχρονα, οι οποίες στη συνέχεια θα ενωθούν για να αναλυθούν από το κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα. Επειδή κάθε θραύσμα DNA αλληλουχείται πολλές φορές προκύπτει όλο και περισσότερο αξιόπιστο αποτέλεσμα και έτσι δικαιολογείται και η ονομασία του Next Generation Sequencing-NGS ως «deep sequencing». Στο τέλος της αλληλούχισης γίνεται ταυτοποίηση και ανάλυση όλων των reads που παράχθηκαν, στοιχίζοντας τα (alignment) με την αλληλουχία του γονιδιώματος αναφοράς (ανθρώπινο DNA) (Oliver *et al.*, 2015). Η ανάλυση γίνεται με την εφαρμογή πολύπλοκων βιοστατιστικών εργαλείων, όπου γίνεται αξιολόγηση παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την απόδοση και την αξιοπιστία της πειραματικής διαδικασίας (Behjati and Tarpey, 2013), (Breveglieri *et al.*, 2019).

Το κύριο πλεονέκτημα της αλληλούχισης νέας γενιάς συγκριτικά με την τεχνολογία της αλληλούχισης πρώτης γενιάς (Sanger sequencing) είναι η παράλληλη αλληλούχιση πολλαπλών δειγμάτων (το κάθε ένα διακρίνεται με συγκεκριμένη barcode αλληλουχία που συνδέεται με το DNA) με εξαιρετικά μεγάλη ακρίβεια. Η ταχύτητα με την οποία πραγματοποιείται η συγκεκριμένη διαδικασία είναι μεγάλη και το κόστος αλληλούχισης αρκετά χαμηλό εάν συγκριθεί με το Sanger sequencing (Goodwin *et al.*, 2016). Είναι γνωστό ότι η πρώτη αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος διήρκεσε περίπου 10 χρόνια και κόστισε σχεδόν 3 δις δολάρια σε αντίθεση με τα σημερινά δεδομένα όπου με το NGS το ανθρώπινο γονιδίωμα αλληλουχείται σε 1-2 ημέρες με κόστος μικρότερο των 1000 δολαρίων (Schwarze *et al.*, 2020).

Η τεχνολογία της μαζικής παράλληλης αλληλούχισης εξελίσσεται διαρκώς για την κάλυψη των αναγκών και των κενών που προκύπτουν από την εφαρμογή της. Νέες πλατφόρμες NGS έχουν κατασκευασθεί κατά τις οποίες πραγματοποιείται πλέον η αλληλούχιση τρίτης γενιάς (3rd generation sequencing). Αποκαλείται και Single-Molecule Real-Time Sequencing (SMRT) κατά την οποία γίνεται αλληλούχιση μορίων DNA σε πραγματικό χρόνο, χωρίς να απαιτείται η ενίσχυσή τους. Πρόκειται για την εξέλιξη προς την αλληλούχιση «long read» αλληλουχιών. Έτσι, μειώνεται η πιθανότητα δημιουργίας μεταλλάξεων κατά την ενίσχυση, γεγονός που δίνει συχνά λανθασμένα αποτελέσματα με την τρέχουσα τεχνολογία (Mccarthy, 2010), (Ferrarini *et al.*, 2013), (Berlin *et al.*, 2015).

Σήμερα η τεχνολογία του NGS εφαρμόζεται ευρέως στη διάγνωση και την πρόγνωση μίας πληθώρας γενετικά καθορισμένων και μη ασθενειών όπως οι ανοσολογικές διαταραχές, η ογκολογία και η επιλογή εξατομικευμένης θεραπείας, οι μολυσματικές λοιμώξεις, για επιδημιολογικές μελέτες και στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο (Gwinn *et al.*, 2019), (Gutowska-Ding *et al.*, 2020).

B.2. Ο ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

Για πρώτη φορά το 2008, πραγματοποιήθηκε μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος με αλληλούχιση νέας γενιάς για την ανίχνευση της τρισωμίας 21 (σύνδρομο Down), βασιζόμενος στην ανίχνευση και τη γενετική ανάλυση του cfDNA στο μητρικό αίμα και έχοντας ως πρόκληση το γεγονός της νουκλεοτιδικής ομολογίας κατά 50% μεταξύ του cfDNA και του cfDNA της μητέρας (Fan *et al.*, 2008). Η εφαρμογή κρίθηκε επιτυχής (Chiu *et al.*, 2008).

Επόμενη μελέτη των Palomaki *et al.* επιβεβαίωσε ότι η μέθοδος της αλληλούχισης νέας γενιάς για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο ανιχνεύει με σχεδόν 100% ειδικότητα και ευαισθησία την τρισωμία 21 σε κύσεις υψηλού κινδύνου, με οικογενειακό κλινικό ιστορικό, με προχωρημένη ηλικία της μητέρας και υπερηχογραφικά ευρήματα (Palomaki *et al.*, 2011). Στη συνέχεια η ίδια ερευνητική ομάδα υποστήριξε ότι ταυτόχρονα με την τρισωμία 21, ανιχνεύεται και η τρισωμία 18 (σύνδρομο Edwards) με 99% ευαισθησία και ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε ποσοστό 0,28%, καθώς και η τρισωμία 13 (σύνδρομο Patau) με 91,7% ευαισθησία και ψευδώς θετικά

αποτελέσματα σε ποσοστό 0,97%. Η εκτίμηση της συνολικής απόδοσης της μεθόδου ήταν για τα τρία σύνδρομα που αναφέρθηκαν 98,9% και με ποσοστό ψευδώς θετικού αποτελέσματος 1,4% (Palomaki *et al.*, 2012).

Παρόμοιες μελέτες πραγματοποιήθηκαν από αρκετές ερευνητικές ομάδες καταλήγοντας όλες σε παρόμοια ποσοστά εκτίμησης της απόδοσης του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου με αλληλούχιση νέας γενιάς. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η μελέτη της ερευνητικής ομάδας του Κύπρου Νικολαΐδη το 2013. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι η ανίχνευση και ταυτοποίηση του ccffDNA στο μητρικό αίμα, στοχεύοντας σε συγκεκριμένους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) στα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y με αλληλούχιση νέας γενιάς σε συνδυασμό με ειδικά αλγοριθμικά εργαλεία, είναι μία αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση αυτοσωμικών και φυλετικών χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών και τριπλοειδίας κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης (Nicolaidis *et al.*, 2013).

Σύμφωνα με το Αμερικανικό Κολλέγιο Ιατρικής Γενετικής και Γενομικής (American College of Medical Genetics and Genomics), τη Διεθνή Ένωση για τη Προγεννητική Διάγνωση (International Society for Prenatal Diagnosis) και το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων-Γυναικολόγων (American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics) ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος-NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς θα πρέπει να προσφέρεται ως ένα screening test σε γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο κύησης εμβρύου με χρωμοσωμική ανευπλοειδία, από τη 10^η εβδομάδα κύησης. Τα κριτήρια που πρέπει να ισχύουν είναι τα ακόλουθα:

Ηλικία της μητέρας μεγαλύτερη των 35 ετών. Αναθεωρημένη οδηγία προτείνει ο έλεγχος να γίνεται ανεξαρτήτως ηλικίας της μητέρας (Rose *et al.* 2020),

Υπερηχογραφικά ευρήματα στο έμβρυο που παραπέμπουν στην ύπαρξη χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών,

Ιστορικό προηγούμενης κύησης με τρισωμία,

Παθολογικός βιοχημικός έλεγχος στο πρώτο και δεύτερο τρίμηνο της κύησης,

Γονείς-φορείς ισοζυγισμένης μετάθεσης τύπου Robertson που προδιαθέτουν για κύηση αυξημένου κινδύνου για τρισωμία 13 ή 21 (Gregg *et al.*, 2013), (Benn *et al.*, 2013), (Skotko *et al.*, 2019).

Λόγω του γεγονότος ότι πρόκειται για ένα screening test, θα πρέπει πριν την επιλογή πραγματοποίησής του να δίνεται πλήρης ενημέρωση με γενετική συμβουλευτική στους γονείς για τις δυνατότητες και τους περιορισμούς που το χαρακτηρίζουν (ανίχνευση συγκεκριμένων ανευπλοειδιών και κάποιων συνδρόμων μικροελλείψεων και μικροδιπλασιασμών) (Hill *et al.*, 2012), (Renga, 2018), (van der Meij *et al.*, 2019). Ο έλεγχος NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς ως μέθοδος μπορεί να δώσει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα (στο χαμηλό ποσοστό του 0,5% ή και μικρότερο) και σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να γίνει επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος με λήψη τροφοβλαστικού ιστού ή αμνιοπαρακέντηση για επιβεβαίωση του αποτελέσματος (Kotsopoulou *et al.*, 2015). Επίσης, οι ενδιαφερόμενοι θα πρέπει να γνωρίζουν ότι κατά τον έλεγχο NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποτελεί απόδειξη για κύηση εμβρύου χωρίς χρωμοσωμικές ανωμαλίες, γιατί υπάρχει και η πιθανότητα ενός ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος (Chitty, 2021). Επομένως, το αποτέλεσμα του ελέγχου NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς θα πρέπει να συνεκτιμάται με το οικογενειακό ιατρικό ιστορικό, τον υπερηχογραφικό έλεγχο του εμβρύου, την επιβεβαίωση μονήρους ή δίδυμης κύησης, την εβδομάδα κύησης και την απουσία παθολογικών ευρημάτων (van den Berg *et al.*, 2006), (de Jong and de Wert, 2015), (Yaron, 2016). Συμπερασματικά, ο έλεγχος NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς παραμένει ένα screening test και δεν αντικαθιστά τον επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο του οποίου η διαγνωστική ακρίβεια είναι αναμφισβήτητη (Benn and Chapman, 2010), (Suciu *et al.*, 2019), (Bawazeer *et al.*, 2021).

Οι προαναφερθείσες επιστημονικές ενώσεις έχουν επίσης εκδώσει οδηγίες για τη διαδικασία γενετικής συμβουλευτικής που θα πρέπει να ακολουθείται από τους γενετικούς συμβούλους και γενικότερα τους επιστήμονες υγείας κατά τη συνεργασία τους με γονείς που επιλέγουν τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο με αλληλούχιση νέας γενιάς (Benn *et al.*, 2013), (Gregg *et al.*, 2013), (Benn *et al.*, 2015).

B.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ-NIPT

Από το 2011 και έπειτα, η συνεχής εξέλιξη της τεχνολογίας της αλληλούχισης νέας γενιάς έχει ως αποτέλεσμα να θεωρείται το NGS η κύρια μέθοδος κατά την οποία πραγματοποιείται ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος-NIPT. Η αλληλούχιση νέας γενιάς επιλέγεται για τον έλεγχο

NIPT τόσο σε υψηλού, όσο και χαμηλού κινδύνου κυήσεις. Το ποσοστό ανίχνευσης των τρισωμιών είναι τόσο υψηλό, ώστε μηνιαίως σε αρκετά κέντρα προγεννητικού ελέγχου ανά τον κόσμο να έχουν μειωθεί τα ποσοστά επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου με λήψη τροφοβλάστης κατά 77,2% και με αμνιοπαρακέντηση κατά 52,5% (Maddocks *et al.*, 2009), (Larion *et al.*, 2014), (Alberry *et al.*, 2021).

Αρχικά, ανιχνεύονταν μόνο οι κοινές αυτοσωμικές (τρисωμία 21, 13 και 18) χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες (Nicolaidis *et al.*, 2012), (Palomaki *et al.*, 2012). Στη συνέχεια, ο έλεγχος NIPT με NGS ενισχύθηκε με τη δυνατότητα ανίχνευσης του φύλου και φυλετικών χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών (Samango-Sprouse *et al.*, 2013). Τα πρόσφατα χρόνια, η εξέλιξη της τεχνολογίας του NGS έδωσε τη δυνατότητα εκτός των παραπάνω να ανιχνεύονται κατά τον έλεγχο NIPT μικροελλείψεις (Warner *et al.*, 2015), σπάνιες αυτοσωμικές ανευπλοειδίες, ελλείμματα και διπλασιασμοί (Manegold-Brauer *et al.*, 2014), (Breviglieri *et al.*, 2019). Σήμερα, δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης ολόκληρου του εμβρυϊκού γονιδιώματος κατά τον έλεγχο NIPT με NGS, οπότε εκτός των παραπάνω ενισχύεται και η πιθανότητα ανεύρεσης κάποιας γενετικής ανωμαλίας που σχετίζεται με σοβαρές επιπλοκές για το έμβρυο (Pertile *et al.*, 2017).

Οι διευρυμένες δυνατότητες που χαρακτηρίζουν σήμερα τον έλεγχο NIPT οφείλονται στην εξελιγμένη τεχνολογία NGS που υλοποιεί τη μαζική παράλληλη αλληλούχιση όλου του γονιδιώματος (whole genome Next Generation Sequencing-NGS) (Taneja *et al.*, 2016) και τον προσδιορισμό μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών κατά μήκος αυτού (SNP-based targeted Next Generation Sequencing-NGS) (Pergament *et al.*, 2014). Πιο συγκεκριμένα, η κυριότερη τεχνική παράμετρος που δίνει στην αλληλούχιση νέας γενιάς εξαιρετικές δυνατότητες ανάλυσης είναι το λεγόμενο sequencing depth, το οποίο αναφέρεται στις φορές που ένα νουκλεοτίδιο θα διαβαστεί κατά την ανάλυση. Όσο πιο πολλές φορές διαβαστεί ένα νουκλεοτίδιο (deep depth), τόσο περισσότερη αξιοπιστία υπάρχει στο αποτέλεσμα που προκύπτει. Η πραγματοποίηση του ελέγχου NIPT σε βαθμό όπου πλέον αναλύονται διαφορές στο γονιδίωμα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, είναι αποτέλεσμα του αυξημένου sequencing depth, που προέκυψε λόγω της εξέλιξης της τεχνολογίας της αλληλούχισης νέας γενιάς (Wong and Lo, 2016).

Η συνεχής αναβάθμιση της τεχνολογίας της αλληλούχισης νέας γενιάς δίνει διαγνωστική δυναμική στον έλεγχο NIPT. Η συμβολή της στη μαζική εφαρμογή του τελευταίου έχει επισημανθεί από αρκετές κλινικές μελέτες αξιολόγησης που επιβεβαιώνουν την υψηλή απόδοση

του NGS, ώστε δικαίως να θεωρείται η κύρια και πλέον αξιόπιστη μέθοδος πραγματοποίησης του ελέγχου NIPT από πολλούς επιστημονικούς οργανισμούς (Benn *et al.*, 2015), (Gregg *et al.*, 2016), (Koumbaris *et al.*, 2019).

Για την πραγματοποίηση του ελέγχου NIPT μέσω NGS, βασική προϋπόθεση είναι η επιτυχής απομόνωση του cfDNA, του οποίου η συγκέντρωση είναι πολύ μικρή (<1 µg/20ml μητρικού περιφερικού αίματος) (Jiang *et al.*, 2012), (Boon and Faas, 2013). Για το λόγο αυτό ορίζεται ένα επίπεδο cut-off κατά τη μέτρηση του fetal fraction κατά το οποίο τιμές μικρότερες του 4% θεωρητικά δε δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα (Norton *et al.*, 2012), (Yu *et al.*, 2014), (Wataganara *et al.*, 2016). Η συνήθης πρακτική περιλαμβάνει αρχικά την απομόνωση και ενίσχυση ταυτόχρονα του cfDNA και του μητρικού cfDNA, τη μαζική παράλληλη αλληλούχιση τους σε πλατφόρμες NGS και τη σύγκριση αυτών στη συνέχεια με το ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς (Fan *et al.*, 2008), (Chiu *et al.*, 2008). Η αλληλούχιση νέας γενιάς και η εφαρμογή της στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο-NIPT απεικονίζεται στην Εικόνα 2 (Wong and Lo, 2016).

Γενικά, όλες οι τεχνικές NGS για τον έλεγχο NIPT ανιχνεύουν και καταγράφουν σε ποσοστά αλληλουχίες συγκεκριμένων χρωμοσωμικών θέσεων στο cfDNA και το μητρικό cfDNA (Fan *et al.*, 2008). Σε περίπτωση ανευπλοειδίας τα ποσοστά αυτά διαφέρουν σημαντικά από τα αναμενόμενα μίας φυσιολογικής κύησης (Chiu *et al.*, 2008). Με την εφαρμογή συγκεκριμένων βιοστατιστικών αλγορίθμων γίνεται ο υπολογισμός και ο χαρακτηρισμός ως στατιστικά σημαντικός ή όχι των αποκλίσεων στις μετρήσεις των ποσοστών αυτών. Το πλεονέκτημα της εφαρμογής του NGS είναι ότι προκύπτει πολύ περισσότερος όγκος δεδομένων (συγκριτικά με το Sanger sequencing) διαθέσιμος προς ανάλυση και έτσι το αποτέλεσμα του ελέγχου NIPT χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη αξιοπιστία (Cuckle, 2016), (Hui and Bianchi, 2017).

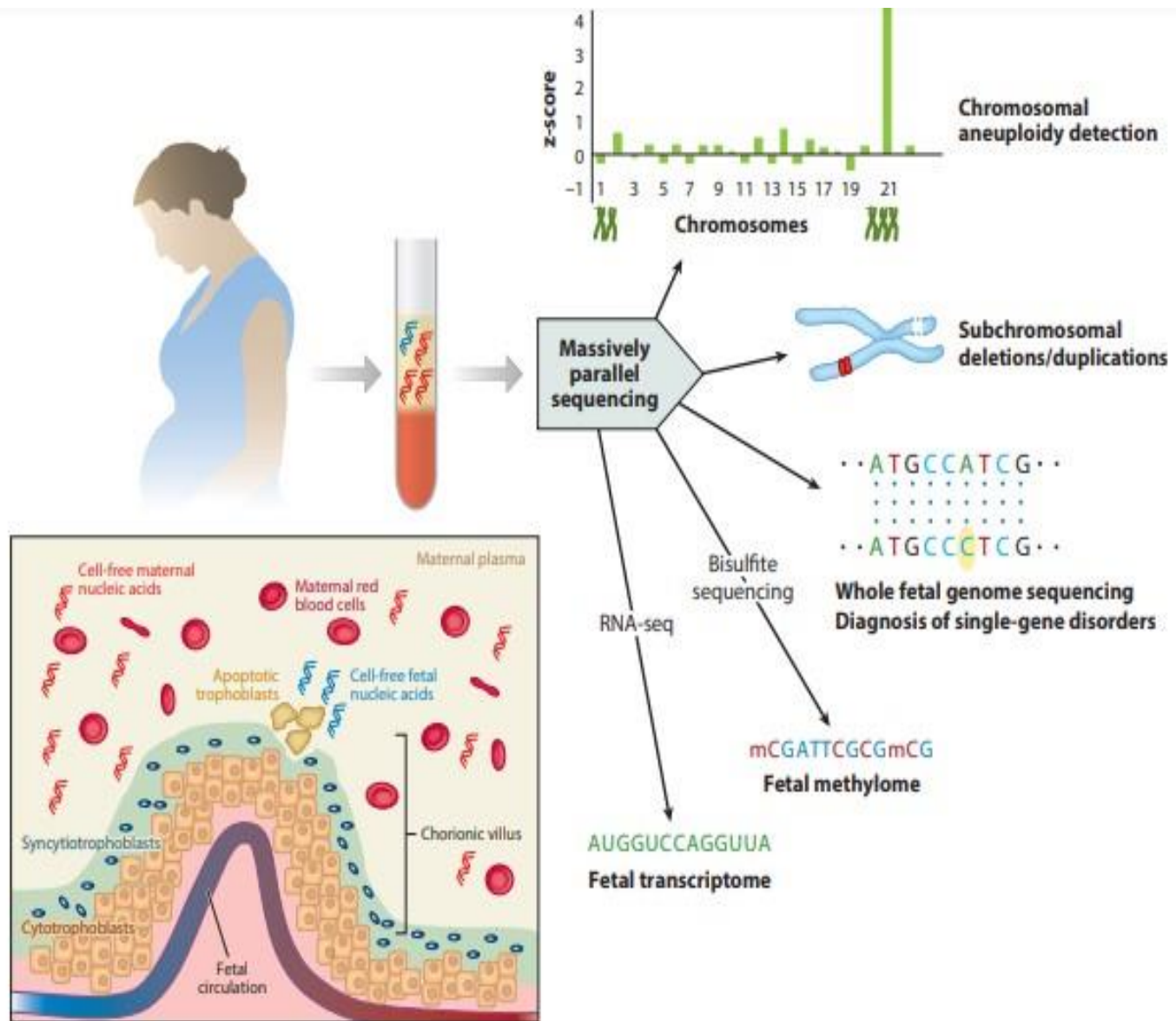


Figure 1

An overview of the currently available applications of MPS-based NIPT. By MPS of cell-free fetal nucleic acids (DNA and RNA) in maternal plasma which likely originate from apoptotic trophoblasts, the fetal genome (from chromosomal to subchromosomal to single-gene levels), methylome and transcriptome may be decoded. Abbreviations: RNA-seq, RNA sequencing; mC, methylated cytosine; MPS, massively parallel sequencing; NIPT, noninvasive prenatal testing; U, uridine; A, adenine; C, cytosine; G, guanosine; T, thymine.

Εικόνα 2. Η μαζική παράλληλη αλληλούχιση (Next Generation Sequencing-NGS) και η εφαρμογή της στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο-NIPT (Wong and Lo, 2016)

Η αλληλούχιση νέας γενιάς εξελισσόμενη δίνει λύση στις νέες προκλήσεις που προκύπτουν διαρκώς στον τομέα του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου, όχι μόνο στη δυνατότητα που προσφέρει στην κατανόηση των γενετικών ανωμαλιών προγεννητικά, αλλά και στο σχεδιασμό νέων τεστ NIPT με NGS (Lo *et al.*, 2010). Μία κύρια πρόκληση στην ταυτοποίηση χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι η ανάπτυξη αλγορίθμων που εφαρμόζονται για την ταυτοποίηση και ανάλυση εξαιρετικά μεγάλου αριθμού «short read» αλληλουχιών. Οι αλγόριθμοι αυτοί θα πρέπει να είναι ταυτόχρονα ακριβείς και αξιόπιστοι προς χρήση στην ανάλυση ενός αποτελέσματος NGS (Nepomnyashchaya *et al.*, 2013). Η ανάπτυξη ενός τεστ NIPT με NGS καθορίζεται με βάση την ακρίβεια του αποτελέσματος που θα είναι ικανό να δώσει, το κόστος και την αποτελεσματική κάλυψη όλο και περισσότερων χρωμοσωμικών αλληλουχιών. Το κόστος εξαρτάται από τη μέθοδο NGS, τον διαγνωστικό αλγόριθμο και τον αριθμό των δειγμάτων που αναλύονται ανά run. Για οικονομικούς λόγους προτιμώνται οι targeted και οι SNP-based τεχνικές (Nepomnyashchaya *et al.*, 2013).

Οι τεχνικές NGS για τον έλεγχο NIPT βασίζονται σε δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: την ποσοτική μαζική παράλληλη αλληλούχιση (shotgun ή targeted) για τον προσδιορισμό αλληλουχιών DNA και την ποιοτική μαζική παράλληλη αλληλούχιση για τον προσδιορισμό SNPs κατά μήκος του γονιδιώματος (Nepomnyashchaya *et al.*, 2013).

B.3.1. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΑΖΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΗΛΗ SHOTGUN ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (QUANTITATIVE MASSIVELY PARALLEL SHOTGUN SEQUENCING-MPSS) ΓΙΑ ΈΛΕΓΧΟ NIPT

Κατά την τεχνική Massively Parallel Shotgun Sequencing-MPSS αναλύονται σε μαζικό όγκο (δεκάδες εκατομμύρια) τυχαίες αλληλουχίες DNA μήκους 25-36bp από όλα τα χρωμοσώματα (shotgun), σε ένα και μόνο NGS run, δίνοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης ανευπλοειδιών στο έμβρυο με μία απλή αιμοληψία στη μητέρα (Fan *et al.*, 2008), (Chiu *et al.*, 2008). Δεν απαιτείται κατακερματισμός του cfDNA καθώς τα θραύσματα αυτού υπολογίζονται σε μικρότερα των 200bp (Boon and Faas, 2013). Αφού γίνει η ενίσχυση και η αλληλούχιση ταυτόχρονα των cfDNA και του μητρικού cfDNA, η νουκλεοτιδική αλληλουχία κάθε θραύσματος συγκρίνεται με το ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς για ταυτοποίηση (Chan and Jiang, 2015). Από τη σύγκριση υπολογίζεται μία αναλογία (z-score) της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε θραύσματος προς τις

αντίστοιχες αλληλουχίες των χρωμοσωμάτων αναφοράς (Palomaki *et al.*, 2011), (Sehnert *et al.*, 2011), (Swanson *et al.*, 2013).

Η τεχνική Massively Parallel Shotgun Sequencing- MPSS εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 2008 σε δύο διαφορετικές πιλοτικές μελέτες των ομάδων των Fan *et al.* και Chiu *et al.*, όπου και καταγράφηκε η ανίχνευση της τρισωμίας 21 με 100% ειδικότητα και ευαισθησία. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής MPSS αλληλουχήθηκαν εκατομμύρια reads κάθε θραύσματος των cffDNA και του μητρικού cfDNA, τα οποία στη συνέχεια συγκρίθηκαν με το ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς και υπολογίστηκε η εκπροσώπηση κάθε χρωμοσώματος (Fan *et al.*, 2008), (Chiu *et al.*, 2008), (Bianchi *et al.*, 2014).

Η τεχνική Massively Parallel Shotgun Sequencing- MPSS δίνει γενετική πληροφορία σε τεράστιο όγκο κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος καθορίζοντας ταυτόχρονα ποια χρωμοσώματα βρίσκονται σε πλεονασμό στο έμβρυο (Nepomnyashchaya *et al.*, 2013), (Liao *et al.*, 2014). Στις μη εγκυμονούσες γυναίκες με φυσιολογικό καρυότυπο, το 1,3% περίπου των θραυσμάτων ccfDNA προέρχονται από το χρωμόσωμα 21, γιατί το χρωμόσωμα 21 αποτελεί περίπου το 1,3% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Κατά την κύηση, εάν το έμβρυο και η μητέρα έχουν φυσιολογικό καρυότυπο, το αναμενόμενο ποσοστό του ccfDNA που προέρχεται από το χρωμόσωμα 21 είναι πάλι περίπου 1,3%. Εάν το έμβρυο έχει τρία αντίγραφα του χρωμοσώματος 21, τότε το cffDNA που προέρχεται από το χρωμόσωμα 21, θα βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στη μητρική κυκλοφορία (Samura, 2020). Σε γενικές γραμμές, εάν ο λόγος των αλληλουχιών του κάθε χρωμοσώματος που διαβάστηκαν προς τις αλληλουχίες των χρωμοσωμάτων αναφοράς υπερβαίνει ένα συγκεκριμένο κατώφλι (threshold), τότε ανιχνεύεται τρισωμία και το αποτέλεσμα καταγράφεται ως θετικό ή υψηλού κινδύνου για τρισωμία (Samura, 2020). Αυτού του τύπου οι υπολογισμοί αναφέρονται ως «counting» (Kotsopoulou *et al.*, 2015). Στην Εικόνα 3 αποδίδεται σχηματικά η εφαρμογή της τεχνικής Massively Parallel Shotgun Sequencing-MPSS για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο-NIPT και την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών (Nepomnyashchaya *et al.*, 2013).

Η τεχνική MPSS για τον έλεγχο NIPT δε δίνει τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ μητρικού και εμβρυικού DNA. Επιπλέον, επειδή οι «counting» τεχνικές ανιχνεύουν ποσοτικές διαφοροποιήσεις για την ταυτοποίηση ανευπλοειδιών, η αξιοπιστία του αποτελέσματος κρίνεται από το ποσοστό του cffDNA στη μητρική κυκλοφορία (Levy and Norwitz, 2013). Αυτό το γεγονός αποτελεί

αντικειμενικό πρόβλημα για το screening στις πρώτες εβδομάδες της κύησης (Palomaki *et al.*, 2012), καθώς και στις γυναίκες με υψηλές τιμές BMI, όπου τα εμβρυικά cfDNA θραύσματα είναι αντιστρόφως ανάλογα του βάρους της μητέρας (Fan *et al.*, 2008), (Poon *et al.*, 2013). Για να θεωρηθεί η συγκεκριμένη τεχνική αξιόπιστη πρέπει ο αριθμός των reads των αλληλουχιών που διαβάζονται κατά το NGS να είναι εξαιρετικά μεγάλος, περίπου 6,3 εκατομμύρια για το χρωμόσωμα 21 (Chiu *et al.*, 2008). Παρόμοιες απαιτήσεις υπάρχουν και για τα χρωμοσώματα 13, 18, X και Y, γεγονός που καθιστά την εξέλιξη της συγκεκριμένης τεχνικής επιτακτική, όχι μόνο για την κάλυψη αυτών των χρωμοσωμάτων, αλλά και ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος (Lau *et al.*, 2012). Πράγματι, η εξέλιξη της τεχνικής MPSS είναι πλέον υπαρκτή και συνίσταται στην ανάπτυξη και εφαρμογή πιο εξειδικευμένων βιοστατιστικών αλγορίθμων που διακρίνουν αποτελεσματικά κάθε τύπου εμβρυική ανευπλοειδία (αυτοσωμική ή φυλετική) (Fan and Quake, 2010), (Nepomnyashchaya *et al.*, 2013).

Μία καινοτομία που προσφέρει το Massively Parallel Shotgun Sequencing-MPSS στον έλεγχο NIPT είναι πλέον οι τεχνικές που βασίζονται σε single-end ή paired-end sequencing. Ειδικά η χρήση του paired-end sequencing δίνει πληροφορίες και για το μέγεθος και για τη θέση κάθε θραύσματος που ανιχνεύεται και αναλύεται. Αρκετές μελέτες μας πληροφορούν για την επιτυχή εφαρμογή της τεχνικής αυτής στα περισσότερα τεστ NIPT με NGS που είναι εμπορικά διαθέσιμα σήμερα (Yu *et al.*, 2014) με την πρώτη εξ αυτών να δημοσιεύεται το 2017 (Cirigliano *et al.*, 2017). Πρόσφατη μελέτη από τους Borth *et al.* επιβεβαιώνει την εφαρμογή paired-end NGS sequencing για την ανίχνευση των κοινών αυτοσωμικών και φυλετικών ανευπλοειδιών, καθώς και σπάνιων αυτοσωμικών ανευπλοειδιών, μικροελλείψεων και μικροδιπλασιασμών. Έτσι, σε έλεγχο NIPT με Massively Parallel Shotgun Sequencing-MPSS 13.607 εγκύων στη Γερμανία, 188 περιπτώσεις ανευρέθησαν ως υψηλού κινδύνου και επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια, δίνοντας έτσι στη συγκεκριμένη τεχνική υψηλά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας που αγγίζουν το 99%. Επιπλέον, η τεχνική αυτή είχε πολύ χαμηλό ποσοστό αποτυχίας εξαγωγής αποτελέσματος όταν το fetal fraction ήταν μικρότερο του 4% (Borth *et al.*, 2021).

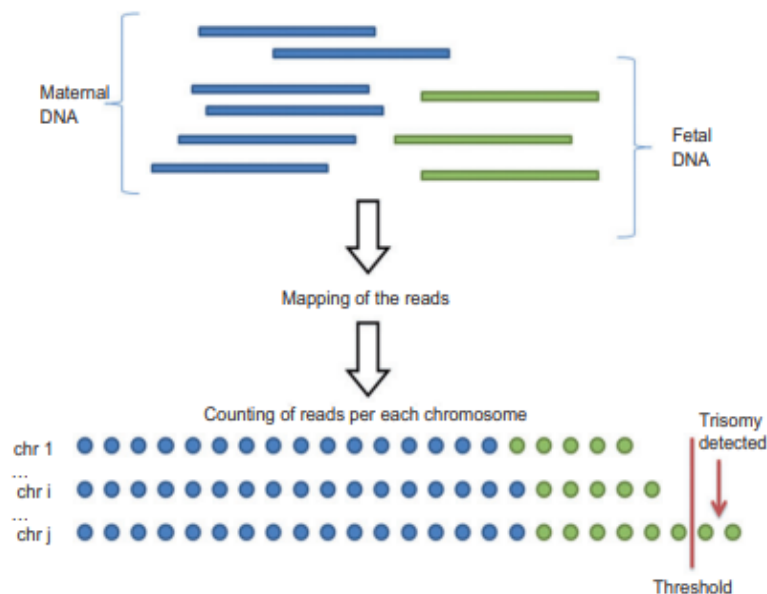


Figure 1 Schematic illustration of the procedural framework for using massively parallel genomic sequencing for the non-invasive prenatal detection of fetal chromosomal aneuploidy.

(A) Fetal DNA (green fragments) circulates in maternal plasma as a minor population among a high background of maternal DNA (blue fragments). A sample containing a representative profile of DNA molecules in maternal plasma is obtained. Short fragments of cell-free DNA are then sequenced by some NGS technique. (B) The chromosomal origin of each sequence is identified by mapping the obtained reads to the human reference genome. (C) The number of unique sequences mapped to each chromosome are counted and genome representation of the chromosomes of interest is determined in subsequent analysis. Aneuploidy can be detected by various statistical techniques based on the number of reads representing the chromosome of interest compared to the other chromosomes. Notice that blue and green circles schematically representing the reads mapped to each chromosome, originating from maternal and fetal DNA fractions, respectively, are indistinguishable and only a difference in the total amount of reads can be detected (as shown for 'chr j' in the example).

Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής Massively Parallel Shotgun Sequencing-MPSS για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο-NIPT για την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών (Nepomnyashchaya *et al.*, 2013)

Η απόδοση της τεχνικής MPSS έχει αξιολογηθεί από πολλές ακαδημαϊκές ερευνητικές ομάδες ελέγχοντας τα τεστ ελέγχου NIPT που έχουν αναπτυχθεί από διάφορες βιοτεχνολογικές εταιρείες και εφαρμόζουν την τεχνική αυτή. Όλες οι μελέτες έδειξαν ότι η τεχνική MPSS ξεκάθαρα αναγνωρίζει χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε ανευπλοειδικά έμβρυα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3. Ενδεικτικά αναφέρονται οι μελέτες των Fan *et al.*, 2008 και Chiu *et al.*, 2008, οι οποίες έδειξαν τη συμβολή της τεχνικής MPSS στην ανίχνευση ακόμη και μικρών ποσοτικών αλλαγών στις αλληλουχίες που αναλύονται κατά μήκος του εμβρυικού και μητρικού γονιδιώματος, με πιο απλοποιημένες διαδικασίες, χωρίς να χρειάζεται η δημιουργία βιβλιοθήκης για το cfDNA (Fan

et al., 2008), (Chiu *et al.*, 2008).

Πίνακας 3. Κλινικές μελέτες αξιολόγησης της απόδοσης της εφαρμογής της τεχνικής Massively Parallel Shotgun Sequencing-MPSS στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο-NIPT από διάφορες ακαδημαϊκές ερευνητικές ομάδες (Neromnyashchaya *et al.*, 2013)

| Full sample, n ^a | Trisomy 21 sample, n | False-positive rate (95% CI), % | Sensitivity (95% CI), % | Specificity (95% CI), % | Gestational age, range (mean) weeks ^b | Method | References |
|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|--|---|---|
| 18 | 9 | 0 (0–37) | 100 (63–100) | 100 (63–100) | 10–35 (18.3) | Massively parallel sequencing | Fan <i>et al.</i> , 2008 ^c [14] |
| 28 | 14 | 0 (0–27) | 100 (73–100) | 100 (73–100) | 11.2–20.3 (14.9) | Massively parallel sequencing | Chiu <i>et al.</i> , 2008 ^d [15] |
| 47 | 13 | 0 (0–13) | 100 (72–100) | 100 (87–100) | 10.4–28.3 (15.3) | Massively parallel sequencing | Sehnert <i>et al.</i> , 2011 ^c [28] |
| 449 | 39 | 0.3 (0.1–1.5) | 100 (89–100) | 99.7 (98.5–99.9) | 8.0–36.0 (16.0) | 4-Plexed massively parallel sequencing | Ehrich <i>et al.</i> , 2011 ^d [31] |
| 146 | 86 | 2.1 (0.6–6.4) | 100 (95–1) | 97.9 (93.6–99.4) | 12.3–13.5 (13.0) | 2-Plexed massively parallel sequencing | Chiu <i>et al.</i> , 2011 ^d [32] |
| 571 | 86 | 1.1 (0.5–2.4) | 79.1 (69–87) | 98.9 (97.6–99.5) | | 8-Plexed massively parallel sequencing | |
| 1696 | 212 | 0.2 (0.1–0.7) | 98.6 (95.9–99.7) | 99.8 (99.3–99.9) | 9.2–21.3 (15.3) | 4-Plexed massively parallel sequencing | Palomaki <i>et al.</i> , 2011 ^d [33] |
| 298 | 39 | 0 (0–1.8) | 100 (88.8–1) | 100 (98.2–100) | 13.4–35.4 (20.5) | Targeted massively parallel sequencing ^e | Sparks <i>et al.</i> , 2012a ^f [19] |
| 167 | 36 | 0 (0–3.6) | 100 (88.0–100) | 100 (96.4–100) | 11.0–36.1 (18.6) | Targeted massively parallel sequencing | Sparks <i>et al.</i> , 2012b ^f [20] |
| 532 | 89 | 0 (0–1.1) | 100 (94.8–100) | 100 (98.9–100) | 10.0–23.0 (15.1) | Massively parallel sequencing | Bianchi <i>et al.</i> , 2012 ^c [16] |

Table 1 Diagnostic performance of maternal plasma DNA sequencing for detecting fetal trisomy 21.

^aOnly the validation set is considered. ^bGestational age of the trisomy 21 cases. From ^cVerinata Health, Inc (Redwood City, CA, USA), ^dSequenom Inc (San Diego, CA, USA), ^eTarget enrichment of 384 loci per chromosome 21. ^fAriosa Diagnostics, Inc (San Jose, CA, USA).

Σε διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιολόγηση της τεχνικής MPSS είτε στο γενικό πληθυσμό, είτε σε συνδυασμό κήσεων υψηλού και χαμηλού κινδύνου, προέκυψε ότι η συγκεκριμένη τεχνική έχει εξαιρετικά μεγάλη απόδοση στην ανίχνευση της τρισωμίας 21 και σε κήσεις χαμηλού κινδύνου. Έτσι, διαφάνηκε ότι η αλληλούχιση νέας γενιάς για τον έλεγχο NIPT μπορεί να αντικαταστήσει κάποια στιγμή τον παραδοσιακό βιοχημικό προγεννητικό έλεγχο (Lau *et al.*, 2012), (Fairbrother *et al.*, 2013). Ενδεικτικά, σε μελέτη των Nicolaides *et al.* ελέγχθηκαν με μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο με την τεχνική MPSS, 1.949 κήσεις χαμηλού κινδύνου. Κατά τη μελέτη αυτή προέκυψε το συμπέρασμα ότι η τεχνική MPSS έχει 100% ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση τρισωμιών και στο γενικό πληθυσμό (Nicolaides *et al.*, 2012).

B.3.2. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΑΖΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΗΛΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (QUANTITATIVE MASSIVELY PARALLEL TARGETED SEQUENCING-MPTS) ΓΙΑ ΈΛΕΓΧΟ NIPT

Η διαφορά της τεχνικής Quantitative Massively Parallel Targeted Sequencing-MPTS από την προαναφερθείσα Massively Parallel Shotgun Sequencing-MPSS έγκειται στο γεγονός ότι σε αυτή γίνεται αρχικά ενίσχυση (enrichment) και στη συνέχεια μαζική παράλληλη αλληλούχιση (NGS) συγκεκριμένων περιοχών των χρωμοσωμάτων 21, 13, 18, X και Y και όχι τυχαίων από όλα τα χρωμοσώματα.

Με τον τρόπο αυτό μειώνεται ο αριθμός των απαιτούμενων reads που πρέπει να αλληλουχηθούν μαζικά, περίπου στο 1 εκατομμύριο από τα 6-10 εκατομμύρια reads που απαιτεί η τεχνική MPSS, ώστε ο έλεγχος NIPT με αυτή την τεχνική να θεωρείται αξιόπιστος. Μάλιστα, έχει δημοσιευθεί μελέτη κατά την οποία διαπιστώθηκε ότι εφαρμόζοντας την τεχνική Quantitative Massively Parallel Targeted Sequencing και τη βιοπληροφορική ανάλυση Digital Analysis of Selected Regions (DANSR), απαιτήθηκαν μόλις 420.000 reads για κάθε δείγμα για να προκύψει αξιόπιστο αποτέλεσμα για τον έλεγχο NIPT (Stokowski *et al.*, 2015).

Επίσης, το κόστος της τεχνικής αυτής είναι κατά πολύ μειωμένο, καθώς μπορούν να αλληλουχηθούν παράλληλα πολλά δείγματα με πολύ μεγαλύτερο sequencing depth συγκριτικά με την τεχνική MPSS (Sparks *et al.*, 2013), (Liao *et al.*, 2014). Επιπλέον, η αναβάθμιση της τεχνολογίας του NGS δίνει τη δυνατότητα της προσεκτικής επιλογής των αλληλουχιών προς ανάλυση κατά το σχεδιασμό των τεστ που χρησιμοποιούν την τεχνική αυτή. Έτσι, μειώνονται σημαντικά τα προβλήματα που προκύπτουν κατά την ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος, όπως το %GC και οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Sparks *et al.*, 2012), (Nepomnyashchaya *et al.*, 2013). Ωστόσο, στην περίπτωση ύπαρξης ανευπλοειδιών διαφορετικών από αυτές των χρωμοσωμάτων 21, 13, 18, X και Y, δεν υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσής τους με την Quantitative Massively Parallel Targeted Sequencing τεχνική (Renga, 2018).

Ενδεικτικά, από μελέτη που διεξήχθη για τον υπολογισμό της ευαισθησίας της τεχνικής Quantitative Massively Parallel Targeted Sequencing κατά την εφαρμογή της στον έλεγχο NIPT, υπολογίστηκε ότι η ανίχνευση της τρισωμίας 21 ανέρχεται σε ποσοστό 100% και της τρισωμίας 18 και τρισωμίας 13 στα 98% και 80%, αντίστοιχα (Ashoor *et al.*, 2013).

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι δύο προηγούμενες «counting» τεχνικές απαιτούν για την εξαγωγή του αποτελέσματος τη χρήση εξειδικευμένων εργαλείων βιοπληροφορικής με μεγάλη υπολογιστική ισχύ (Mackie *et al.*, 2017). Για την εξαγωγή του αποτελέσματος λαμβάνεται υπόψη στη βιοστατιστική ανάλυση η ηλικία της μητέρας και η εβδομάδα κύησης όπου έγινε η αιμοληψία για την απομόνωση του cffDNA (Sparks *et al.*, 2012). Επιπλέον, απαιτείται οι χειριστές των προγραμμάτων αυτών να έχουν μεγάλη εμπειρία για την αξιολόγηση όλων των παραμέτρων που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την εξαγωγή του αποτελέσματος π.χ. αξιολόγηση του αριθμού των reads για κάθε δείκτη, τη συνολική απόδοση του NGS run από τεχνική άποψη και τη διακύμανση στην απόδοση ενίσχυσης δεικτών σε κάθε χρωμόσωμα ξεχωριστά (εξαρτάται από τη σύσταση GC%) (Fan *et al.*, 2008), (Chiu *et al.*, 2008), (Sparks, Struble, *et al.*, 2012). Σε γενικές γραμμές απαιτείται αυστηρός διορθωτικός έλεγχος κατά την ανάλυση ενός αποτελέσματος ελέγχου NIPT, καθώς τα ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας που χαρακτηρίζουν κάθε τεχνική NGS που εφαρμόζεται, βασίζονται σε μεγάλο ποσοστό από την εφαρμογή βιοστατιστικών αναλύσεων, οι οποίες ανάλογα με το στατιστικό πακέτο που χρησιμοποιείται παρουσιάζουν διάφορες διακυμάνσεις (Gil *et al.*, 2015), (Christiaens *et al.*, 2021).

Στον Πίνακα 4 αναφέρονται μελέτες, όπου στην κάθε μία συμμετείχαν παραπάνω από 100 γυναίκες με υψηλού κινδύνου κυήσεις, κατά τις οποίες αξιολογήθηκε η απόδοση τεχνικών MPSS και MPTS στον έλεγχο NIPT. Από τη στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι συνδυαστικά για τις τρισωμίες 21, 18 και 13 οι τεχνικές αυτές ανιχνεύουν αυτή την ανευπλοειδία με ευαισθησία 99,64% και ειδικότητα 99,96%, με μόλις τρεις περιπτώσεις ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος και εννέα περιπτώσεις ψευδώς θετικού αποτελέσματος (Liao *et al.*, 2014).

Πίνακας 4. Μεγάλης κλίμακας μελέτες για την αξιολόγηση των τεχνικών αλληλούχησης νέας γενιάς MPSS και MPTS για την ανίχνευση της τρισωμίας 21, 18 και 13 κατά τον έλεγχο NIPT (Liao *et al.*, 2014)

Large-scale studies of NIPT of trisomies 21, 18, and 13.

| Authors | Study design | Study population ^a | Technique | Case numbers | | GA ^b (weeks) | Sensitivity (%) | Specificity (%) | Reference |
|--------------------------|---|-------------------------------|--------------|-------------------------------|--------|-------------------------|---|---|-----------|
| | | | | Aneuploidy | Total | | | | |
| Chen <i>et al.</i> | Prospective and retrospective study Multi-center | High risk | MPS | T18: 37 T13: 25 | 289 | 13 | 91.9 (34/37) 100 (25/25) | 98 (247/252) 98.9 (261/264) | [45] |
| Chui <i>et al.</i> | Prospective and retrospective study Multi-center | High risk | MPS | T21: 86 | 232 | 13 | 100 (86/86) | 97.9 (143/146) | [13] |
| Enrich <i>et al.</i> | Prospective study Multi-center | High risk | MPS | T21: 39 | 449 | 16 | 100 (39/39) | 99.7 (409/410) | [68] |
| Palomaki <i>et al.</i> | Prospective nested case-control study Multi-center | High risk | MPS | T21: 212 | 1683 | 15 | 98.6 (209/212) | 99.8 (1468/1471) | [46] |
| Bianchi <i>et al.</i> | Prospective observational nested case-control study Multi-center | High risk | MPS | T21: 89 T18: 36 T13: 14 | 532 | 15 | 100 (89/89) 97.2 (35/36) 78.6 (11/14) | 100 (443/443) 100 (496/496) 100 (518/518) | [69] |
| Ashoor <i>et al.</i> | Retrospective nested case-control study | High risk | Targeted MPS | T21: 50 T18: 50 | 397 | 11-13 | 100 (50/50) 98 (49/50) | 100 (347/347) 100 (347/347) | [70] |
| Dan <i>et al.</i> | Prospective study Multicenter clinical experiences | High risk and screening | MPS | T21: 142 T18: 46 | 11,105 | 20 | 100(142/142) 100 (46/46) | 99.99 (10,962/10,963) 99.99(11,058/11,059) | [50] |
| Jiang <i>et al.</i> | Prospective study Multicenter | NA | MPS | T21: 16 T18: 12 T13: 2 | 903 | 10-34 | 100 (16/16) 100 (12/12) 100 (2/2) | 100 (887/887) 99.9 (890/891) 100 (901/901) | [71] |
| Lau <i>et al.</i> | Prospective study | High risk | MPS | T21: 11 T18:10 T13: 2 | 108 | 12 | 100 (11/11) 100 (10/10) 100 (2/2) | 100 (97/97) 100 (98/98) 100 (106/106) | [72] |
| Nicolaides <i>et al.</i> | Prospective cohort study | Screening | MPS | T21: 8 T18: 2 | 1949 | 11-13 | 100 (8/8) 100 (2/2) | 100 (1941/1941) 99.9 (1945/1947) | [48] |
| Norton <i>et al.</i> | Prospective cohort study Multi-center | High risk | MPS | T21: 81 T18: 38 | 3006 | 17 | 100 (81/81) 97.4 (37/38) | 99.97 (2924/2925) 99.93 (2966/2968) | [73] |
| Palomaki <i>et al.</i> | Prospective nested case-control study | High risk | MPS | T18: 59 T13: 12 | 1971 | 15 | 100 (59/59) 91.7 (11/12) | 99.7(1907/1912) 99.2(1943/1959) | [74] |
| Sparks <i>et al.</i> | Prospective study | High risk | Targeted MPS | T21: 36 T18: 8 | 167 | 18 | 100 (36/36) 100 (8/8) | 100 (131/131) 100 (159/159) | [75] |
| Liang <i>et al.</i> | Prospective Multi-center | High risk | MPS | T21: 40 T18: 14 T13:4 | 412 | 15-39 | 100 (40/40) 100 (14/14) 100 (4/4) | 100 (372/372) 100 (398/398) 99.75 (407/408) | [76] |
| Nicolaides <i>et al.</i> | Prospective | High risk | Targeted MPS | T21: 25 T18: 3 T13: 1 | 229 | 11-13 | 100 (25/25) 100 (3/3) 100 (1/1) | 100 (204/204) 100 (226/226) 100 (228/228) | [77] |

Abbreviations: GA: gestational age; MPS: massively parallel sequencing; NA: not available; T21: trisomy 21; T18: trisomy 18; T13: trisomy 13; XO: Monosomy X.

^a High risk for aneuploidy is determined on the basis of one or more of the following: advanced maternal age, previous positive prenatal screen, fetal ultrasound abnormality, or prior pregnancy with fetal aneuploidy.

^b Mean/median gestational age is shown except when range values are provided.

B.3.3. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ (QUALITATIVE SNP-BASED TARGETED NEXT GENERATION SEQUENCING) ΓΙΑ ΈΛΕΓΧΟ NIPT

Η ιδέα ενός τεστ μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου που βασίζεται στην αλληλούχιση του γονιδιώματος μέσω NGS για τον ποιοτικό προσδιορισμό μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) στο cffDNA του εμβρύου και στο cfDNA της μητέρας, προέκυψε από την ερευνητική ομάδα του Dhallan (Dhallan *et al.*, 2007). Στη συνέχεια, η συγκεκριμένη τεχνική αναπτύχθηκε και από άλλες ερευνητικές ομάδες, όπου θεωρήθηκε εξαιρετικά αποδοτική όσον αφορά την αξιοπιστία του αποτελέσματος NIPT, αλλά και το μειωμένο κόστος συγκριτικά με τις «counting» NGS τεχνικές (Sparks *et al.*, 2012), (Hall *et al.*, 2014). Επειδή τα SNPs αποτελούν μόνο το 1,6% του ανθρώπινου γονιδιώματος από την αρχή εφαρμογής αυτής της μεθόδου ελέγχου NIPT μέσω NGS γίνονταν προσπάθειες αύξησης της απόδοσης της με βελτίωση της πολλαπλής ενίσχυσης και της αλληλούχισης με NGS (Liao *et al.*, 2012).

Δημοσιευμένες μελέτες επιβεβαιώνουν την εξαιρετικά μεγάλη απόδοση της συγκεκριμένης τεχνικής όπως αυτή των Nicolaidis *et al.* το 2013, κατά την οποία 242 γυναίκες ελέγχθηκαν για τις κοινές αυτοσωμικές και φυλετικές ανευλοειδίες. Μεταξύ αυτών βρέθηκαν 25 περιπτώσεις εμβρύων με τρισωμία 21 με 100% ευαισθησία και 100% ειδικότητα και μηδενικά ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα (Nicolaidis *et al.*, 2013). Σε άλλη μελέτη των Zimmerman *et al.* το 2012 ελέγχθηκαν 166 έγκυοι με την τεχνική αυτή και επιτυχώς ανιχνεύθηκαν 11 έμβρυα με τρισωμία 21, 3 έμβρυα με τρισωμία 18, 2 έμβρυα με τρισωμία 13, δύο με μονοσωμία X και άλλα δύο 47, XXY έμβρυα (Zimmerman *et al.*, 2012). Από την έρευνα προκύπτει ότι ο έλεγχος NIPT με NGS βασισμένος στον ποιοτικό προσδιορισμό μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών κατά μήκος του γονιδιώματος του εμβρύου είναι αξιόπιστος για την ανίχνευση κοινών ανευλοειδιών σε ποσοστό μεγαλύτερο του 99% και ψευδώς θετικό αποτέλεσμα της τάξης του 0,1% (Fauzdar, 2014).

Η ανίχνευση SNPs στοχευμένα σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα δίνει πολύ περισσότερη γενετική πληροφορία για το cffDNA και το cfDNA της μητέρας σε σύγκριση με τις «counting» NGS τεχνικές, καθώς επιτυγχάνεται η απόλυτη διάκρισή τους. Κατά τον τρόπο αυτό μπορεί να καθοριστεί και η κληρονομία ενός SNP από τον πατέρα (Liao *et al.*, 2012), (Skrzypek and Hui, 2017). Στην περίπτωση όμως της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με δωρεά ωαρίου ή της

μεταμόσχευσης οργάνων πριν την κύηση στη μητέρα, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι ιδιαίτερα αποδοτική (Benn *et al.*, 2013). Η ποιοτική μέθοδος προσδιορισμού SNPs με αλληλούχιση νέας γενιάς έχει το πλεονέκτημα της ανίχνευσης τριπλοειδίας και μονογονεϊκής δισωμίας, και γενικά της διάκρισης μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών εμβρύων βασιζόμενη σε εξελιγμένες προσεγγίσεις μελέτης του γονιδιώματος (Levy and Norwitz, 2013), (Nicolaidis *et al.*, 2013), (Kotsopoulou *et al.*, 2015), (Albergy *et al.*, 2021).

Αρχικά, κατά την εφαρμογή αυτής της τεχνικής γινόταν η ενίσχυση, αλληλούχιση, ταυτοποίηση συγκεκριμένων SNPs με NGS και υπολογισμός alleles ratios για το έμβρυο και τη μητέρα για το χρωμόσωμα υπό διερεύνηση. Ωστόσο, δε δύναται με την τεχνική αυτή να ανιχνευθούν πιθανή τριπλοειδία και μεταθέσεις (Liao *et al.*, 2010). Η συγκεκριμένη τεχνική δεν αξιοποιήθηκε για εμπορικούς σκοπούς, ούτε αξιολογήθηκε ποτέ από κλινικές μελέτες (Renga, 2018).

Στη συνέχεια, η εξέλιξη της τεχνολογίας νέας γενιάς έδωσε στη συγκεκριμένη τεχνική τη δυνατότητα να πραγματοποιεί την ενίσχυση, αλληλούχιση, ταυτοποίηση συγκεκριμένων SNPs με NGS και την εφαρμογή πολύπλοκων βιοστατιστικών πακέτων ανάλυσης (Bayesian statistics- Maximum Likelihood estimation) για να δοθεί το αποτέλεσμα σε copy number (αριθμός αντιγράφων). Συγκεκριμένα, κατά την τεχνική αυτή γίνεται πολλαπλή ενίσχυση και αλληλούχιση περίπου 20.000 SNPs (Kotsopoulou *et al.*, 2015). Η αξιολόγηση του αποτελέσματος γίνεται βιοστατιστικά με βάση την υπόθεση ότι το έμβρυο μπορεί να είναι μονοσωμικό, δισωμικό ή τρισωμικό (Zimmermann *et al.*, 2012). Ο συγκεκριμένος έλεγχος NIPT μέσω της αλληλούχισης νέας γενιάς πλεονεκτεί έναντι όλων των προηγούμενων τεχνικών, γιατί δύναται να ανιχνεύσει μονοσωμίες, δισωμίες, τρισωμίες, καθώς και τριπλοειδία με εφαρμογή quality control που απορρίπτει πληροφορίες μη στατιστικά σημαντικές από πολλαπλές πολυμορφικές θέσεις (Nicolaidis *et al.*, 2013). Η ευαισθησία της τεχνικής ξεπερνά το 99% για την ανίχνευση ανευπλοειδίας στα χρωμοσώματα 21, 18, 13, X και Y (Fan *et al.*, 2008), (Gregg *et al.*, 2013).

Στον Πίνακα 5 συγκρίνονται τα ειδικά τεχνικά χαρακτηριστικά και η απόδοση των κυριότερων τεστ που είναι εμπορικά διαθέσιμα από βιοτεχνολογικές εταιρείες για τον έλεγχο NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς (Kotsopoulou *et al.*, 2015).

Πίνακας 5. Σύγκριση των κυριότερων τεστ ελέγχου NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς από πολυεθνικές βιοτεχνολογικές εταιρείες (Kotsopoulou *et al.*, 2015)

| | Sequenom Laboratories | Verinata Health (now Illumina) | Ariosa Diagnostics (now Roche) | Natera Inc. |
|-----------------------------|---|---|---|---|
| Test name | Materni T21 PLUS | Verifi prenatal | Harmony prenatal | Panorama |
| Platform | Massively parallel shotgun sequencing with enhanced sequencing series | Massively parallel shotgun sequencing and SAFeR algorithm | DANSR technology (targeted sequencing) and FORTE algorithm | Next-generation targeted SNP-based aneuploidy testing and NATUS software |
| Conditions | Trisomies 13, 18, 21, sex chromosome aneuploidies and microdeletions | Trisomies 13, 18, 21, sex chromosome aneuploidies and fetal sex | Trisomies 13, 18, 21, option of testing for sex chromosome aneuploidies and fetal sex | Trisomies 13, 18, 21, monosomy X, triploidy, monosomy X and sex chromosome aneuploidies, fetal sex (optional), 22q11.2 Deletion syndrome and other microdeletions |
| Maternal blood requirements | Two 10 mL tubes | One 7 mL tube | One 10 mL tube | One 20 mL tube (+paternal saliva sample, optional) |
| Earliest sampling | 10 weeks | 10 weeks | 10 weeks | 9 weeks |
| Accuracy | >99% | 100% | >99% | 100% |
| Sensitivity | 92–99% | 87–99% | 80–99% | 92–99% |
| Cost (about) | \$2700 | \$1500 | \$800 | \$1500 |
| Turnaround time | 7 days | 3–6 days | 8–10 days | 7–10 days |

B.3.4. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΓΙΑ ΈΛΕΓΧΟ NIPT

Η επιγενετική ανάλυση του γονιδιώματος είναι μία ακόμη τεχνική αλληλούχισης νέας γενιάς για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας επιγενετικός μηχανισμός, κατά τον οποίο στο δινουκλεοτίδιο CpG η κυτοσίνη μεθυλιώνεται στον 5' άνθρακα. Η μεθυλίωση του DNA σχετίζεται με τη μεταγραφική αποσιώπηση του γονιδιώματος, ειδικά όταν συμβαίνει στην περιοχή του υποκινητή ενός γονιδίου (Suzuki and Bird, 2008). Με την εφαρμογή του Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) σε πλατφόρμες NGS ανιχνεύεται η μεθυλίωση ή όχι της κυτοσίνης στο γονιδίωμα. Βασίζεται στη χρήση του sodium bisulfite, το οποίο μετατρέπει κάθε μη μεθυλωμένη κυτοσίνη σε ουρακίλη, ενώ παραμένει άθικτη κάθε μεθυλωμένη κυτοσίνη (Tong *et al.*, 2006). Κατά την αλληλούχιση οι ουρακίλες διαβάζονται ως θυμίνες, ενώ οι μεθυλωμένες κυτοσίνες διαβάζονται ως κυτοσίνες. Στο τέλος της αλληλούχισης εξάγεται το συμπέρασμα ποιες κυτοσίνες αρχικά ήταν μεθυλωμένες ή όχι σε σύγκριση με το γονιδίωμα αναφοράς (Wong and Lo, 2016).

Οι επιγενετικές διαφορές κατά μήκος του γονιδιώματος καθορίζουν τη διαφορετική γονιδιακή

έκφραση σε κάθε ιστό, λόγω υπομεθυλίωσης ή υπερμεθυλίωσης και αυτό το γεγονός επιδιώκει να διαλευκάνει το Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) μέσω NGS (Poon *et al.*, 2002).

Με το Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) μέσω NGS είναι δυνατό να ανιχνευθούν διαφορές σε μεθυλιωμένες περιοχές στο cffDNA και στο DNA της μητέρας σε επίπεδο ανάλυσης 1Mb, κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος (Lun *et al.*, 2013), (Wong and Lo, 2016). Το πρότυπο μεθυλίωσης του cffDNA είναι όμοιο με αυτό του DNA προερχόμενο από κύτταρα του πλακούντα, ενώ το πρότυπο μεθυλίωσης του cfDNA της μητέρας είναι ίδιο με αυτό που δίνουν κύτταρα της μητρικής κυκλοφορίας (Chan *et al.*, 2006). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την προέλευση του cffDNA και ενισχύει την άποψη γιατί μπορεί να χρησιμοποιείται ως βιολογικό υλικό μελέτης στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο-NIPT με NGS (Kotsoroulou *et al.*, 2015), (Breveglieri *et al.*, 2019).

Με την εφαρμογή του WGBS κατά τον έλεγχο NIPT έχει παρατηρηθεί ότι αρκετοί επιγενετικοί δείκτες διαφέρουν στο cffDNA και στο DNA της μητέρας (Chim *et al.*, 2005), (Chan *et al.*, 2006), όπως και η ύπαρξη συγκεκριμένων μεθυλίωσεων σε ανευλοειδικά χρωμοσώματα στο έμβρυο (Tong, Chiu *et al.*, 2010), (Tong, Jin, *et al.*, 2010). Για παράδειγμα, ο υποκινητής του γονιδίου SERPINB5 δεν είναι μεθυλιωμένος σε κύτταρα του πλακούντα, αλλά υπερμεθυλιωμένος στα ερυθροκύτταρα της μητέρας (Bellido *et al.*, 2010). Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο RASSF1A δεν είναι μεθυλιωμένο σε κύτταρα του πλάσματος της μητέρας, αλλά υπερμεθυλιωμένο στον πλακούντα (Chan *et al.*, 2006), (Breveglieri *et al.*, 2019).

Πρόσφατη μελέτη των Gordevicius *et al.* ενισχύει την εφαρμογή ελέγχου NIPT με επιγενετική ανάλυση μέσω NGS, καθώς μπορεί επιτυχώς να διακρίνει τα θραύσματα cffDNA από το μητρικό cfDNA λόγω της διαφορετικής μεθυλίωσης τους και να ανιχνεύσει με ακρίβεια 100% την τρισωμία 21, καθώς τα τρισωμικά έμβρυα έχουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης από τα φυσιολογικά (Gordevicius *et al.*, 2020).

Η κύρια εφαρμογή της επιγενετικής ανάλυσης με NGS κατά τον έλεγχο NIPT είναι ο προσδιορισμός του φύλου και η ανίχνευση πιθανών φυλοσύνδετων χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου (Kotsoroulou *et al.*, 2015). Η πρώτη ιδέα για την εφαρμογή του ελέγχου NIPT ήταν ο προσδιορισμός του φύλου και ειδικά η ανίχνευση των αρρένων εμβρύων σε περίπτωση φορείας από τη μητέρα ενός X-φυλοσύνδετου νοσήματος π.χ. μυική δυστροφία Duchenne ή αιμορροφιλία (Lo *et al.*, 1990), (Stanghellini *et al.*, 2006), (Breveglieri *et al.*, 2019). Η γνώση του φύλου είναι

εξαιρετικής σημασίας σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η περίπτωση συγγενούς υπερπλασίας των επινεφριδίων, λόγω έλλειψης της 21-υδροξυλάσης (Hill *et al.*, 2011). Γνωρίζοντας από τις πρώτες εβδομάδες της κύησης το φύλο του εμβρύου, εάν αυτό είναι θήλυ, αποφεύγεται η αρρενοποίηση του εμβρύου με τη χορήγηση στη μητέρα δεξαμεθαζόνης (Shah and Smart, 1996), (Hyett *et al.*, 2005), (Nimkarn and New, 2010).

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος δεν είναι τόσο αποδοτικός στον έλεγχο των φυλετικών χρωμοσωμάτων, λόγω ότι συχνά προκύπτουν αμφίβολα αποτελέσματα (Ronzoni *et al.*, 2021). Ειδικά, η επιγενετική ανάλυση με NGS κατά τον έλεγχο NIPT χαρακτηρίζεται από χαμηλή θετική προγνωστική αξία (Positive Predictive Value-PPV) στον έλεγχο των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Lüthgens *et al.*, 2021). Σε μελέτη των Wang *et al.* υπολογίσθηκε η συνολική θετική προγνωστική αξία στον έλεγχο των φυλετικών χρωμοσωμάτων σε ποσοστό 57,6% στον έλεγχο NIPT με NGS. Συγκεκριμένα, υπολογίσθηκε PPV 21,4% για το σύνδρομο Turner (45,X), 75% για το σύνδρομο Triplo X (47,XXX), 90,9% για το σύνδρομο Klinefelter (47,XXY) και 75% για το σύνδρομο XYY (47,XYY) (Wang *et al.*, 2020). Για το λόγο αυτό, ο έλεγχος NIPT για ανευπλοειδία φυλετικών χρωμοσωμάτων με NGS δε θεωρείται μέχρι στιγμής διαγνωστικός, καθώς απαιτείται η επιβεβαίωση ενός θετικού ή υψηλού κινδύνου αποτελέσματος με επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο (Wang *et al.*, 2020), (Zheng *et al.*, 2020), (Chitty, 2021).

Πρέπει να τονιστεί ότι το κόστος εφαρμογής του ελέγχου NIPT με επιγενετική ανάλυση μέσω NGS είναι σαφώς μικρότερο από αυτό της shotgun ή targeted ποσοτικής μαζικής παράλληλης αλληλούχισης, γιατί η συγκεκριμένη τεχνική απαιτεί πολύ φθηνότερο εξοπλισμό και είναι και λιγότερο απαιτητική για ακριβά αντιδραστήρια αλληλούχισης (Benn *et al.*, 2013), (Pös *et al.*, 2019).

B.3.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΓΙΑ ΈΛΕΓΧΟ NIPT

Εκτός από το ccffDNA, υπάρχει και το cell-free fetal RNA στη μητρική κυκλοφορία. Η ανάλυση του cell-free fetal RNA (prenatal plasma transcriptomic analysis) με αλληλούχιση νέας γενιάς προκειμένου να γίνει μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος-NIPT είναι μία πολύπλοκη διαδικασία. Είναι γνωστό ότι το cell-free fetal mRNA που απομονώνεται αντικατοπτρίζει τη

μεταγραφική δραστηριότητα, η οποία παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με τον ιστό όπου μεταγράφεται ή το χρονικό διάστημα ανάπτυξης του εμβρύου. Αντίθετα, η έκφραση και η αλληλουχία του ccffDNA στη μητρική κυκλοφορία είναι σταθερή σε όλη τη διάρκεια της κύησης (Poop *et al.*, 2000). Επιπλέον, το RNA δεν είναι τόσο σταθερό στη διαχείρισή του ως βιολογικό υλικό και όπως απομονώνεται ως ολικό στη συντριπτική του πλειοψηφία αποτελείται από rRNA. Το τελευταίο έχει μικρή διαγνωστική αξία στην περίπτωση του προγεννητικού ελέγχου.

Ωστόσο, το 2014 από τους Tsui *et al.* με αλληλούχιση νέας γενιάς (RNA-seq) αναλύθηκε το μεταγράφομα σε cell-free fetal RNA στη μητρική κυκλοφορία. Παρατηρήθηκε ότι με την πρόοδο της κύησης αυξάνονται τα αντίγραφα του cell-free fetal RNA (Tsui *et al.*, 2014). Τα μεταγραφώματα του cell-free fetal RNA μπορούν να αναλυθούν και να δώσουν πληροφορίες για την κατάσταση του εμβρύου (Koh *et al.*, 2014). Για παράδειγμα, μπορεί η συγκεκριμένη τεχνική να εφαρμοστεί για την εκτίμηση της πιθανότητας εμφάνισης προεκλαμψίας (Hahn *et al.*, 2011), (Oudejans, 2015).

Η πρόκληση για την εφαρμογή της αλληλούχισης νέας γενιάς για τον έλεγχο NIPT κατά την οποία γίνεται ανάλυση του μεταγραφώματος παραμένει ανοιχτή, καθώς πρέπει να ξεπεραστούν περιορισμοί, όπως η μειωμένη επαναληψιμότητα, η απαίτηση ελέγχου πολλαπλών δεικτών, τα κενά στη βιοστατιστική ανάλυση του μεταγραφώματος, ο μικρός αριθμός περιπτώσεων που έχουν ελεγχθεί μέχρι σήμερα και η μικρή ευαισθησία και ειδικότητα της τεχνικής (Liao *et al.*, 2014).

B.4. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΣΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΈΛΕΓΧΟ-NIPT

Η μεγάλη υπόσχεση του ελέγχου NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς είναι η μείωση σε σημαντικό βαθμό του αριθμού των γυναικών που θα προβούν σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο, ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος αποβολής του εμβρύου. Ήδη από τα πρώτα χρόνια εφαρμογής του ελέγχου NIPT με NGS, μελέτες επιβεβαίωσαν ότι αν ο προγεννητικός έλεγχος βασιζόταν μόνο στον έλεγχο NIPT περίπου 98% των εξετάσεων με επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο θα είχαν αποφευχθεί (Chiu *et al.*, 2011), (Wong and Lo, 2016). Από τους Warsof *et al.* πραγματοποιήθηκε μία ανασκόπηση διαφόρων μελετών για την επίπτωση της εφαρμογής του ελέγχου NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς στις διάφορες μεθόδους επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου. Από την

ανασκόπηση αυτή προέκυψε ότι η αλληλούχιση NGS έδωσε τη δυνατότητα ευρείας εφαρμογής του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου, με επακόλουθη τη μείωση της αμνιοπαρακέντησης και της λήψης τροφοβλαστικού ιστού κατά 76% και 54%, αντίστοιχα (Warsof *et al.*, 2015).

Η υψηλή διαγνωστική ακρίβεια στην ανάλυση του γενετικού υλικού που προσφέρεται από τις διάφορες τεχνικές αλληλούχισης νέας γενιάς, σε συνδυασμό με την πρόωμη ανίχνευση του cfDNA στη μητρική κυκλοφορία από τις αρχές της κύησης (ήδη στις 4,5 εβδομάδες) δίνουν το πλεονέκτημα επιλογής αυτού του τύπου προγεννητικού ελέγχου νωρίτερα από οποιοδήποτε άλλο (D'Aversa *et al.*, 2018). Έτσι εγκαίρως, συνήθως τη 10^η εβδομάδα της κύησης, ώστε το fetal fraction να έχει ικανοποιητική συγκέντρωση, πραγματοποιείται ο έλεγχος NIPT με αξιόπιστα αποτελέσματα. Κατά αυτόν τον τρόπο μειώνεται σίγουρα ο αριθμός των γεννήσεων ατόμων με χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Norton *et al.*, 2013), (Wagner *et al.*, 2014), (Filoche *et al.*, 2017).

Η αλληλούχιση NGS εξασφαλίζει στον έλεγχο NIPT τόσο υψηλή ευαισθησία (Θετική Προγνωστική Αξία, Positive Predictive Value-PPV), όσο και υψηλή ειδικότητα (Αρνητική Προγνωστική Αξία, Negative Predictive Value-NPV), ώστε να τον καθιστούν ένα σημαντικό εργαλείο στον προγεννητικό έλεγχο και μία ελκυστική εναλλακτική των μεθόδων επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου (Benn *et al.*, 2013), (Bianchi and Wilkins-Haug, 2014), (Filoche *et al.*, 2017). Η κλινική απόδοση του ελέγχου NIPT με NGS υπολογίζεται στο 99% για την τρισωμία 21. Όσον αφορά τα άλλα σύνδρομα τρισωμίας που ελέγχονται κατά τον έλεγχο NIPT με NGS, η ευαισθησία των τεστ κυμαίνεται μεταξύ 91% και 93% για την τρισωμία 18 (Gil *et al.*, 2015). Για την τρισωμία 13 η ευαισθησία των τεστ κυμαίνεται μεταξύ 90% και 95% (Taylor-Phillips *et al.*, 2016), (Filoche *et al.*, 2017). Η θετική προγνωστική αξία για το σύνολο του ελέγχου NIPT με NGS κυμαίνεται μεταξύ 45% και 99%, ανάλογα με την τεχνική και την πλατφόρμα NGS (Bianchi and Wilkins-Haug, 2014), (Dar *et al.*, 2014), (Taylor-Phillips *et al.*, 2016).

Από αρκετές μελέτες προκύπτει μία ανωτερότητα στην αξιοπιστία του αποτελέσματος των τεστ μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου-NIPT με NGS συγκριτικά με τα παραδοσιακά καθιερωμένα τεστ προγεννητικού ελέγχου (Norton *et al.*, 2016). Ενδεικτικά, σε μελέτη των Farrell *et al.* αναφέρεται ότι ακόμη και το χαμηλότερο ποσοστό θετικής προγνωστικής αξίας των τεστ μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου-NIPT με NGS θεωρείται 10 φορές καλύτερο από αυτό των διαφόρων μεθόδων επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου (Farrell *et al.*, 2016). Επίσης, σε μελέτη μετα-ανάλυσης αναφέρεται ότι οι κοινές εμβρυικές ανευπλοειδίες σε μονήρεις κήσεις

ανιχνεύονται σε ποσοστό 98% με συνδυαστικό ψευδές θετικό αποτέλεσμα της τάξης του 1,3% (Gil *et al.*, 2017). Νεότερη μετα-ανάλυση των Pös *et al.* για τη διαγνωστική ακρίβεια του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου-NIPT με NGS, βάσει ειδικότητας και ευαισθησίας, δίνει παραπλήσια ποσοστά όπως φαίνεται στον Πίνακα 6 (Pös *et al.*, 2019). Υπογραμμίζοντας για άλλη μία φορά τη σημαντική συμβολή της αλληλούχισης νέας γενιάς στον επιτυχή μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο NIPT (Pös *et al.*, 2019).

Πίνακας 6. Διαγνωστική ακρίβεια του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου-NIPT με NGS, βάσει ειδικότητας και ευαισθησίας σε μετα-ανάλυση από Pös *et al.*, 2019

| Test | Sensitivity | Specificity |
|------------|----------------------------|----------------------------|
| Fetal sex | 0.989 (95% CI 0.980–0.994) | 0.996 (95% CI 0.989–0.998) |
| Rhesus D | 0.993 (95% CI 0.982–0.997) | 0.984 (95% CI 0.964–0.993) |
| Trisomy 21 | 0.994 (95% CI 0.983–0.998) | 0.999 (95% CI 0.999–1.000) |
| Trisomy 18 | 0.977 (95% CI 0.952–0.989) | 0.999 (95% CI 0.998–1.000) |
| Trisomy 13 | 0.906 (95% CI 0.823–0.958) | 1.00 (95% CI 0.999–1.000) |
| Monosomy X | 0.929 (95% CI 0.741–0.984) | 0.999 (95% CI 0.995–0.999) |

CI, confidence interval.

Η αλληλούχιση νέας γενιάς είναι η πλέον εξελιγμένη μέθοδος ανάλυσης και ταυτοποίησης του γονιδιώματος. Κατά τον τρόπο αυτό προσφέρει στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο-NIPT το κυριότερο πλεονέκτημα του που είναι το χαμηλό ποσοστό ψευδώς θετικού αποτελέσματος. Ειδικά για τις τρισωμίες 21, 18 και 13 αυτό κυμαίνεται μεταξύ 0,1-0,3% (Lutgendorf *et al.*, 2014), (Santorum *et al.*, 2017), (Di Renzo *et al.*, 2019), (Albergy *et al.*, 2021). Ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα δεν οφείλεται σε αδυναμίες των διαφόρων τεχνικών NGS που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο NIPT. Αντιθέτως, οφείλεται στην εξαιρετικά μεγάλη ικανότητα της αλληλούχισης νέας γενιάς να ανιχνεύει οποιαδήποτε απόκλιση από το γονιδίωμα αναφοράς κατά την ανάλυση του fetal fraction (Filoche *et al.*, 2017). Οι κυριότερες αιτίες ενός ψευδούς θετικού αποτελέσματος οφείλονται σε όχι συχνά γεγονότα, όπως η ύπαρξη μη διαγνωσμένου όγκου (Amant *et al.*, 2015),

μωσαϊκισμού και CNVs στη μητέρα (Wang *et al.*, 2014) και μωσαϊκισμός του πλακούντα (Wang *et al.*, 2014), (Renga, 2018), (Koc *et al.*, 2019).

Στην άτυχη περίπτωση νεοπλασίας (καλοήθης ή κακοήθης) της μητέρας είναι πιθανό να προκύψει ένα αμφίβολο ή ψευδώς θετικό αποτέλεσμα, γιατί οι διάφορες τεχνικές NGS για τον έλεγχο NIPT, εκτός από το cfDNA αναλύουν και το cfDNA της μητέρας που μεταξύ άλλων περιλαμβάνει αλληλουχίες καρκινικών κυττάρων (Osborne *et al.*, 2013), (Bianchi *et al.*, 2015). Σε μελέτη του Hui βρέθηκε ότι μεταξύ 125.426 εγκύων που επέλεξαν το τεστ NIPT με NGS για προγεννητικό έλεγχο, για 10 από αυτές προέκυψαν αμφίβολα αποτελέσματα, λόγω της ανίχνευσης σε αυτές νεοπλασίας (λέμφωμα, λευχαιμία και ορθοκολικό καρκίνο) (Hui, 2016). Γενικότερα, προτείνεται στις γυναίκες που επιλέγουν τον έλεγχο NIPT με NGS, σε περίπτωση που θα βρεθούν θετικές για νεοπλασία (όπως καρκίνος του μαστού, καρκίνος των ωοθηκών, μελάνωμα, σάρκωμα, λέμφωμα, λευχαιμία, ορθοκολικός καρκίνος) να προχωρούν σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο προκειμένου να είναι αξιόπιστο το αποτέλεσμα για το έμβryo (Lenaerts *et al.*, 2019). Ενδεχομένως στο άμεσο μέλλον, η βελτίωση των μεθόδων υπολογισμού του ακριβούς fetal fraction που λαμβάνεται υπόψη στους διάφορους βιοστατιστικούς αλγορίθμους εξαγωγής του αποτελέσματος, να μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ αυτού και του cfDNA της μητέρας και των καρκινικών κυττάρων της. Έτσι, θα είναι αξιόπιστος και ο χρωμοσωμικός έλεγχος του εμβρύου κατά τον έλεγχο NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς (Lenaerts *et al.*, 2019).

Στο σημείο όμως αυτό πρέπει να τονιστεί ότι το NGS μπορεί να συμβάλλει πάλι σημαντικά στην αποφυγή του επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου, ακόμη και στην περίπτωση ενός ψευδώς θετικού αποτελέσματος. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Zhou *et al.* το 2017 αναλύοντας 74 ψευδώς θετικές τρισωμίες που προέκυψαν μετά από έλεγχο NIPT με NGS 112.021 εγκύων, έδειξε ότι υπεύθυνη για τα συγκεκριμένα αποτελέσματα ήταν η παρουσία μητρικών CNVs. Κατά τη βιοστατιστική ανάλυση όταν αφαιρέθηκαν τα μητρικά CNVs, το γονιδίωμα των εμβρύων βρέθηκε απόλυτα φυσιολογικό. Έτσι, εάν πριν η μητέρα προχωρήσει σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο, ελεγχθεί το δικό της γονιδίωμα με NGS, τότε είναι πολύ πιθανό να ανευρεθούν τα δικά της CNVs τα οποία δημιουργούν το πρόβλημα κατά την ανάλυση του αποτελέσματος του NIPT και να αποφευχθεί η πιθανότητα αποβολής (Zhou *et al.*, 2017).

Η εξέλιξη της τεχνολογίας του NGS έδωσε στην πορεία των χρόνων πλατφόρμες που λειτουργούν με εξαιρετικά μεγάλη ακρίβεια και αναλυτική ικανότητα, χάρη σε αναβαθμισμένα πρωτόκολλα

λειτουργίας και χρήσης αναλωσίμων εξαιρετικής ποιότητας, αλλά και την ανάπτυξη εξελιγμένων αλγορίθμων για την ανάλυση της αλληλούχησης. Όπως αναφέρθηκε, στα πρώτα τεστ ελέγχου NIPT με NGS ανιχνεύονταν μόνο οι κοινές αυτοσωμικές (τρισωμία 21, 13 και 18) χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες (Nicolaidis *et al.*, 2012), (Palomaki *et al.*, 2012). Σήμερα, η αλληλούχηση νέας γενιάς δίνει στον έλεγχο NIPT εκτός από τις κοινές αυτοσωμικές και φυλετικές ανευπλοειδίες, τη δυνατότητα μελέτης είτε ολόκληρου του γονιδιώματος, είτε στοχευμένων αλληλουχιών στο έμβρυο κάνοντας έτσι εφικτή την ανίχνευση μικροελλείψεων, μικροδιπλασιασμών, παθογονικών CNVs, σπάνιων αυτοσωμικών τρισωμιών και μονογονιδιακών νοσημάτων. Αυτά τα τεστ μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου-NIPT αναφέρονται στην παγκόσμια αγορά ως «διευρυμένος έλεγχος NIPT» και σίγουρα είναι αποτέλεσμα της αλματώδους προόδου στην αύξηση της ειδικότητας, ευαισθησίας και των δυνατοτήτων των διαφόρων τεχνικών NGS (Samura, 2020).

Η επιλογή ενός διευρυμένου ελέγχου NIPT προτείνεται στην περίπτωση όπου ο βασικός έλεγχος NIPT με NGS και τα υπερηχογραφικά αποτελέσματα είναι φυσιολογικά, ενώ η ύπαρξη μιας μικροέλλειψης ή μικροδιπλασιασμού μπορεί να ευθύνεται για παθολογικό φαινότυπο. Αρκετά κληρονομούμενα σύνδρομα που ευθύνονται για νοητική υστέρηση ή μορφολογικές δυσπλασίες, οφείλονται στην ύπαρξη μικροελλείψεων ή μικροδιπλασιασμών κατά μήκος του γονιδιώματος (Shi *et al.*, 2021).

Σήμερα, η συντριπτική πλειοψηφία των εταιρειών βιοτεχνολογίας που παράγουν και εφαρμόζουν τεστ μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου-NIPT με NGS συμπεριλαμβάνουν στον έλεγχο για τις τρισωμίες 21, 13, 18 και τις ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων και κάποια σύνδρομα μικροελλείψεων, όπως DiGeorge (22q11.2 deletion), Cri-du-chat (5p deletion), Prader-Willi/Angelman (15q11.2-q13), Wolf-Hirschhorn (terminal 4p deletion), Langer-Giedion (8q24 deletion), Jacobsen's (terminal 11q deletion) και 1p36 deletion (Wong and Lo, 2016). Στον Πίνακα 7 παρατίθενται τα σύνδρομα μικροελλείψεων που ελέγχονται κατά τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο-NIPT με NGS, στα διευρυμένα τεστ που προσφέρονται από διάφορες βιοτεχνολογικές εταιρείες (Ravitsky *et al.*, 2021).

Η εφαρμογή βασίζεται στην ιδέα ότι τα χρωμοσώματα κατά την ανάλυσή τους μετά από το NGS run μπορεί να χωριστούν σε μικρότερες γονιδιακές υπομονάδες ανάλυσης, τις λεγόμενες «bins», όπου η διακριτική ικανότητα ανάλυσης της αλληλουχίας φθάνει το 1 Mb ανά bin και η ανάλυση γίνεται όπως και για τα ολόκληρα χρωμοσώματα (Peters *et al.*, 2011), (Jensen *et al.*, 2012), (Yu

et al., 2013). Έχει αναφερθεί περίπτωση ελέγχου NIPT με NGS κατά την οποία ανιχνεύθηκε μικροελλείψη στο γονιδίωμα με διακριτική ικανότητα 300kb (Srinivasan *et al.*, 2013).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι είναι καίριας σημασίας να καθοριστεί ποια σύνδρομα μικροελλείψεων θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στα διευρυμένα τεστ μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου με NGS, γιατί κάποια από αυτά δεν είναι ιδιαίτερα παθολογικά (Srinivasan *et al.*, 2013), (Wong and Lo, 2016), (Skrzypek and Hui, 2017). Προς το παρόν, αξιολογούνται από πλήθος ερευνών, η ειδικότητα και η ευαισθησία των διαφόρων τεστ διευρυμένου ελέγχου NIPT μέσω NGS μέχρι να προταθεί ποια είναι κατάλληλα προς διάθεση στο ευρύ καταναλωτικό κοινό (Harraway, 2017), (Familiari *et al.*, 2021).

Σε μελέτη των Warner *et al.* αξιολογήθηκε η ανίχνευση του συνδρόμου DiGeorge (22q11.2 deletion) σε ποσοστό 97,8%. Σε ποσοστό 100% ανιχνεύθηκαν τα σύνδρομα Cri-du-chat (5p deletion), Prader-Willi/Angelman (15q11.2-q13) και 1p36 deletion (Warner *et al.*, 2015). Επειδή η συχνότητα εμφάνισης των συνδρόμων αυτών είναι κατά πολύ μικρότερη από τις αντίστοιχες των αυτοσωμικών και φυλετικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών που περιλαμβάνονται στα τεστ NIPT με NGS, ένα πιθανό θετικό για μικροελλείψεις αποτέλεσμα (ίσως και ψευδώς θετικό) θα παραπέμψει την έγκυο σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Στην περίπτωση αυτή ο έλεγχος NIPT με NGS χάνει το πλεονέκτημα που έχει ως μη επεμβατική μέθοδος προγεννητικού ελέγχου (Harraway, 2017).

Πίνακας 7. Σύνδρομα μικροελλείψεων που ελέγχονται κατά τον έλεγχο NIPT με NGS, στα διευρυμένα τεστ που προσφέρονται από βιοτεχνολογικές εταιρείες (Ravitsky *et al.*, 2021)

| Company | Product | Trisomies | | | | | Sex chromosome aneuploidies | | | | | Microdeletions | | | | | | | Others | Sex | |
|---------------------|-------------------------|-----------|----|----|------------------|------------------|-----------------------------|-------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|---------------------------------|------------------|---------------------|----------------------|------------------|----------------|---|----------------|
| | | 21 | 18 | 13 | 16 | 22 | X (Turner) | XXY (Klinefelter) | XXX (triple X) | XYY (Jacob's) | XXYY | 22q (DiGeorge) | 5p (cri-du-chat) | 15q (Prader-Willi and Angelman) | 11q (Jacobsen) | 8q (Langer-Giedion) | 4p (Wolf-Hirschhorn) | 1p36 | | | |
| Integrated Genetics | MaterniT 21 PLUS | Y | Y | Y | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | N | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | Y ^{a,b} | N | Y ^b | |
| | MaterniT GENOME | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | N | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | All autosomal aneuploidies; gains or losses of chromosome material ≥ 7 Mb across the genome | Y |
| Roche | Harmony | Y | Y | Y | N | N | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Y ^b | N | N | N | N | N | N | N | Y ^b | |
| Illumina | Verifi | Y | Y | Y | N | N | Y | Y | Y | Y | N | N | N | N | N | N | N | N | N | Y ^b | |
| | Verifi Plus | Y | Y | Y | Y | Y | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Y ^b | N | Y ^b | Y ^b | Y ^b | N | N | Y ^b | Y ^b | Y ^b | All chromosomal aneuploidies | Y |
| Natera | Panorama | Y | Y | Y | N | N | Y | Y ^b | Y ^b | Y ^b | N | Y ^b | Y ^b | Y ^b | N | N | N | Y ^b | Y ^b | Triploidy | Y ^b |
| LifeCodexx | PrenaTest option 1 | Y | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | Y ^b |
| | PrenaTest option 2 | Y | Y | Y | N | N | N | N | N | N | N | Y ^b | N | N | N | N | N | N | N | N | Y ^b |
| | PrenaTest option 2 Plus | Y | Y | Y | Y | Y | N | N | N | N | N | Y ^b | N | N | N | N | N | N | N | Autosomal aneuploidies | Y ^b |
| | PrenaTest option 3 | Y | Y | Y | N | N | Y | Y | Y | Y | N | Y ^b | N | N | N | N | N | N | N | N | Y ^b |
| | PrenaTest option 3 Plus | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | N | Y ^b | N | N | N | N | N | N | N | Autosomal aneuploidies | Y ^b |

| Company | Product | Trisomies | | | | | Sex chromosome aneuploidies | | | | | Microdeletions | | | | | | | Others | Sex | |
|-----------------|-----------------|-----------|----|----|----------------|----------------|-----------------------------|-------------------|----------------|----------------|------|-----------------------------------|------------------|---------------------------------|----------------|---------------------|----------------------|----------------|----------------|---|----------------|
| | | 21 | 18 | 13 | 16 | 22 | X (Turner) | XXY (Klinefelter) | XXX (triple X) | XYY (Jacob's) | XXYY | 22q (DiGeorge) | 5p (cri-du-chat) | 15q (Prader-Willi and Angelman) | 11q (Jacobsen) | 8q (Langer-Giedion) | 4p (Wolf-Hirschhorn) | 1p36 | | | |
| BGI | NIFTY | Y | Y | Y | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Y ^b | N | N | Y ^b | Y ^b | Y ^b | N | N | N | Y ^b | Trisomy 9, 2q33.1 deletion, DiGeorge II (10p14-p13 deletion), 16p12 deletion, 1q32.2 deletion (van der Woude syndrome) (all optional) | Y ^b |
| | NIFTY Pro | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | N | Y | NM | Y | NM | NM | Y | Y | Y | Trisomy 9; more than 80 types of microdeletions and microduplications, including 7q11.23, 17p13.3, and 17p11.2 | Y ^b |
| Igenomix | NACE | Y | Y | Y | N | N | Y | Y | Y | Y | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | Y |
| | NACE 24 | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | N | Y (and velocardiofacial syndrome) | Y | Y | N | N | Y | Y | Y | All chromosome trisomies | Y |
| Xcelom | SafeT21-Express | Y | Y | Y | N | N | Y | Y | Y | Y | N | Y | Y | Y | N | Y | N | Y | Y | 2q33.1 | NM |
| Yourgene Health | IONA | Y | Y | Y | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | Y ^b |
| | Sage | Y | Y | Y | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Y ^b | N | Y ^b | Y ^b | Y ^b | N | N | Y ^b | Y ^b | Y ^b | Autosomal aneuploidies | Y ^b |

Table adapted and updated from Reference 104; the information was obtained from noninvasive prenatal testing providers' websites (including their brochures) on March 15, 2021, and is subject to change. Abbreviations: Y, yes; N, no; NM, not mentioned.

^aReported as an additional finding.

^bOptional.

Οι προσπάθειες αλληλούχισης ολόκληρου του εμβρυικού γονιδιώματος (Fetal Whole Genome Sequencing) κατά τον έλεγχο NIPT με NGS ξεκίνησαν το 2015 στις Ηνωμένες Πολιτείες και σήμερα το 10-20% όλων των ελέγχων NIPT με NGS γίνονται κατά την προσέγγιση αυτή. Οι λόγοι αλληλούχισης ολόκληρου του εμβρυικού γονιδιώματος μέσω του διευρυμένου ελέγχου NIPT με NGS προέκυψαν λόγω της επιτακτικής ανάγκης διάγνωσης γενετικών νοσημάτων που επηρεάζουν σοβαρά την υγεία του εμβρύου (Allyse *et al.*, 2015), (Norton, 2016). Αρκετές τεχνικές διευρυμένου ελέγχου NIPT με NGS έχουν βελτιωθεί, ώστε να είναι δυνατή η διάγνωση και η διευκρίνιση εάν το νόσημα είναι πατρικής ή μητρικής κληρονομής. Αυτό βασίζεται στην αρχή της αλληλούχισης με Whole Genome Sequencing του γονιδιώματος των γονέων, ταυτόχρονα με την ανάλυση του cfDNA κατά τον έλεγχο NIPT (trio analysis). Ανίχνευση και ταυτοποίηση με NGS συγκεκριμένων αλληλουχιών του πατέρα στο μητρικό πλάσμα επιβεβαιώνουν πατρικής κληρονομής νόσημα (Wong and Lo, 2016).

Σε μελέτη εφαρμογής Whole Genome Sequencing κατά τον έλεγχο NIPT με NGS όπου ελέγχθηκαν τα έμβρυα 10.272 εγκύων σε υψηλού κινδύνου κύηση (αυξημένη μητρική ηλικία, οικογενειακό ιστορικό γενετικών ανωμαλιών, παθολογικά υπερηχογραφικά και βιοχημικά ευρήματα), βρέθηκαν 554 έμβρυα (5,4%) με θετικό αποτέλεσμα για ανευπλοειδία. Προκύπτει έτσι το συμπέρασμα ότι η εφαρμογή του Whole Genome Sequencing κατά τον έλεγχο NIPT με NGS σε συνδυασμό με παραμέτρους όπως η ηλικία της μητέρας και ο υπερηχογραφικός έλεγχος μπορεί να αυξήσει ακόμη περισσότερο την αξιοπιστία του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου με αλληλούχιση νέας γενιάς (Ehrich *et al.*, 2017), (Samura, 2020).

Το Whole Genome Sequencing κατά τον έλεγχο NIPT με NGS, έχει υψηλή απόδοση στην ανίχνευση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων και CNVs, όπως προκύπτει από διάφορες μελέτες (Brewer *et al.*, 2016), (Scocchia *et al.*, 2019), (Chitty, 2021). Ενδεικτικά, αναφέρεται η μελέτη των Ye *et al.* το 2020 κατά την οποία εφαρμόστηκε το Whole Genome Sequencing κατά τον έλεγχο NIPT για την ανίχνευση CNVs σε έμβρυα, τα οποία είχαν ήδη ελεγχθεί με επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Τα αποτελέσματα του NGS έδειξαν ότι CNVs μεγέθους μικρότερα των 2Mb ανιχνεύθηκαν επιτυχώς με ευαισθησία και ειδικότητα 66,67% και 97,45%, αντίστοιχα. Όταν όμως το μέγεθος των CNVs ήταν μεγαλύτερο των 2Mb, τότε η ευαισθησία και ειδικότητα αυξάνονταν στα 85,29% και 98,18%, αντίστοιχα, δείχνοντας τη συμβολή της αλληλούχισης νέας γενιάς στην ανίχνευση και εμβρυικών CNVs, εκτός από τις κοινές αυτοσωμικές και φυλετικές ανευπλοειδίες

(Ye *et al.*, 2021). Επίσης, από την έρευνα των Chen *et al.* παρατηρήθηκε ότι όταν υπήρχαν υποψίες ύπαρξης εμβυικών CNVs έπειτα από έλεγχο NIPT με NGS, το θετικό αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε όταν επαναλήφθηκε το τεστ με NGS μεγαλύτερου read depth. Κατά τον τρόπο αυτό αποδεικνύεται πως η αλληλούχιση νέας γενιάς μπορεί να συμβάλλει, λόγω της υψηλής διακριτικής ικανότητάς της στην ανάλυση του γονιδιώματος, στην αποτροπή γέννησης παιδιών με γενετικές ανωμαλίες (Chen *et al.*, 2021).

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος με αλληλούχιση νέας γενιάς έχει διαγνωστική αξία μόνο στον καθορισμό του γονοτύπου Rhesus D και στην περίπτωση διάγνωσης μονογονιδιακών νοσημάτων, γιατί δεν έχουν αναφερθεί ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Έτσι, δεν απαιτείται η επιβεβαίωση με κάποιο τεστ επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου (Filoche *et al.*, 2017), (Shaw *et al.*, 2020).

Η αλληλούχιση νέας γενιάς δίνει τη δυνατότητα του προσδιορισμού του γονοτύπου Rhesus D στο cffDNA του εμβρύου που ελέγχεται κατά τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο, όταν αυτό κυοφορείται από Rh-αρνητική μητέρα και έχει ιδιαίτερη αξία για την προφύλαξη ενός Rhesus D θετικού εμβρύου με τη χορήγηση στη μητέρα ανοσοσφαιρινών anti-D (Sedrak *et al.*, 2011), (Chitty *et al.*, 2014), (Liao *et al.*, 2014). Έτσι, μειώνεται ο κίνδυνος της αποβολής, αιμορραγίας και ευαισθητοποίησης που πιθανόν να προέκυπτε από την εφαρμογή κάποιας μεθόδου επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου (Lo *et al.*, 1998), (Clausen *et al.*, 2014), (Kotsopoulou *et al.*, 2015). Ο επιτυχής προσδιορισμός του γονοτύπου Rhesus D στο cffDNA του εμβρύου με αλληλούχιση νέας γενιάς έχει αξιολογηθεί από μεγάλης κλίμακας κλινικές δοκιμές και από μία συστηματική ανάλυση αυτών από το 2006 έως το 2008, έχει υπολογισθεί η ευαισθησία της μεθόδου να κυμαίνεται μεταξύ 99,5-99,8% και η ειδικότητα μεταξύ 94-99,5% (Legler *et al.*, 2009).

Επίσης, μέσω της ανάλυσης του cffDNA κατά τον έλεγχο NIPT χάρη στις εξελιγμένες αναλυτικές ικανότητες της αλληλούχισης νέας γενιάς είναι εφικτή τεχνικά η ταυτόχρονη διάγνωση πολλών μονογονιδιακών νοσημάτων μετά τη 10^η εβδομάδα κύησης (Ferrari *et al.*, 2015), (Breviglieri *et al.*, 2019), (Shaw *et al.*, 2020). Βέβαια, τα αποτελέσματα που προκύπτουν θα πρέπει να αξιολογούνται με ιδιαίτερη προσοχή, γιατί οι ιδιαιτερότητες της κάθε εξεταζόμενης κύησης είναι συγκεκριμένες. Επομένως, η όλη αξιολόγηση στην περίπτωση των μονογονιδιακών νοσημάτων θα πρέπει να γίνεται εξατομικευμένα (Wong and Lo, 2016). Για τους παραπάνω

λόγους, είναι επιτακτικός ο σωστός σχεδιασμός στρατηγικών ανίχνευσης και διάκρισης μεταξύ του φυσιολογικού και παθολογικού αλληλομόρφου κατά την ανάλυση των δεδομένων που προκύπτουν από το NGS run για όλα τα τεστ ελέγχου NIPT (Traeger-Synodinos, 2006), (Wong and Lo, 2016), (Camunas-Soler *et al.*, 2018).

Ο επιπλέον έλεγχος για μονογονιδιακά νοσήματα ενδείκνυται όταν υπάρχει κάποια υποψία έπειτα από υπερηχογραφικά ευρήματα ή όταν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό κάποιου μονογονιδιακού νοσήματος ή προηγούμενη κύηση παιδιού με κάποιο μονογονιδιακό νόσημα (Samura, 2020). Με βάση την προσέγγιση αυτή ο έλεγχος NIPT με NGS έχει εφαρμοστεί για τη διάγνωση σε έμβρυα της νόσου του Huntington, της μυοτονικής δυστροφίας (Amicucci *et al.*, 2000), (Meaney and Norbury, 2009) και της δυστονίας πρώιμης έναρξης (González-González *et al.*, 2003). Σε εγκυμονούσες που έχουν παρατηρηθεί υπερηχογραφικά σκελετικές δυσπλασίες του εμβρύου, εφαρμόζεται ο έλεγχος NIPT με NGS για την ανίχνευση των FGFR3 μεταλλάξεων, ώστε να γίνει διάγνωση της αχονδροπλασίας (Chitty *et al.*, 2011) και της θανατογόνου δυσπλασίας (Chitty *et al.*, 2013).

Κάποια από τα μονογονιδιακά νοσήματα που ανιχνεύονται μέσω του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου-NIPT με NGS είναι τα Alagille syndrome, Rett syndrome, Schinzel-Giedion syndrome, Noonan spectrum disorders, FGFR3 chondrodysplasia group, GHARGE syndrome, Sotos syndrome 1, Holoprosencephaly, Type 1 collagenopathy, Cornelia de Lange syndrome, Bohring-Opitz syndrome, Craniosynostosis syndromes, Type 2 collagenopathy, ενώ ο κατάλογος αυτών συνεχώς ενημερώνεται χάρη στη συνεχή αναβάθμιση και την αυξημένη απόδοση των διαφόρων τεχνικών αλληλούχισης νέας γενιάς για το σκοπό αυτό (Shaw *et al.*, 2020), (Samura, 2020).

Μέχρι πρόσφατα υπήρχαν αρκετοί περιορισμοί για την εφαρμογή του ελέγχου NIPT με NGS σε δίδυμες κύσεις, λόγω των αμφίβολων αποτελεσμάτων που προέκυπταν. Η κυριότερη παράμετρος που μειώνει την απόδοση του τεστ NIPT στη δίδυμη κύηση είναι το χαμηλό fetal fraction στο ένα ή και στα δύο έμβρυα, γεγονός που μπορεί να ευθύνεται και για πιθανά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Το παραπάνω πρόβλημα εντείνεται στα διζυγωτικά έμβρυα, όταν το ένα από αυτά είναι φορέας χρωμοσωμικής ανωμαλίας (Canick *et al.*, 2012), (Leung *et al.*, 2013), (Harraway, 2017). Σήμερα, η αύξηση της αναλυτικής ικανότητας των διαφόρων τεχνικών αλληλούχισης νέας γενιάς αυξάνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της προέλευσης του fetal fraction του κάθε εμβρύου

και του καθορισμού τους ως μονοζυγωτικά ή διζυγωτικά (Leung *et al.*, 2013), (Qu *et al.*, 2013), (Albergy *et al.*, 2021). Έτσι, είναι δυνατή η σαφής εξαγωγή αποτελέσματος για το κάθε έμβρυο (Wong and Lo, 2016). Σε μελέτη μετα-ανάλυσης υπολογίστηκε το ποσοστό ανίχνευσης της τρισωμίας 21 με έλεγχο NIPT μέσω NGS στο 93,7% σε δίδυμη κύηση (Gil *et al.*, 2015). Νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο έλεγχος NIPT με NGS είναι αξιόπιστος και σε περίπτωση αποβολής του ενός εμβρύου, αρκεί η εξέταση να γίνεται από τη 14^η εβδομάδα κύησης και έπειτα (Benn and Rebarber, 2021), (Suciu *et al.*, 2019), (Balaguer *et al.*, 2021). Επίσης, από τη Διεθνή Ένωση για τη Προγεννητική Διάγνωση (International Society for Prenatal Diagnosis) συστήνεται η εφαρμογή του ελέγχου NIPT με NGS πλέον και σε δίδυμες, αλλά όχι σε πολλαπλές κυήσεις (Palomaki *et al.*, 2021).

Σε διάφορες μελέτες έχει βρεθεί το χαμηλό fetal fraction να σχετίζεται με εμφάνιση υπέρτασης και διαβήτη στην έγκυο, προεκλαμψίας (Zhong *et al.*, 2002), χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης και πρόωρη γέννηση του εμβρύου (Scott *et al.*, 2018), (Suciu *et al.*, 2019). Επομένως, το εύρημα χαμηλού ποσοστού του fetal fraction κατά την πραγματοποίηση ελέγχου NIPT με NGS μπορεί να δώσει το πλεονέκτημα της εντατικής παρακολούθησης μίας υψηλού κινδύνου κύησης που δε σχετίζεται αποκλειστικά με χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Chitty, 2021), (Scheffer *et al.*, 2021).

Η τεχνολογία του NGS αποτελεί σήμερα αναπόσπαστο κομμάτι της διαγνωστικής ρουτίνας, προσφέροντας το πλεονέκτημα της αξιόπιστης διαχείρισης και ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων ταυτόχρονα, σε εξαιρετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Σήμερα, οι διάφορες βιοτεχνολογικές εταιρείες που πραγματοποιούν τεστ NIPT μέσω NGS, παραδίνουν την έκθεση ελέγχου συνήθως μέσα σε 7-10 ημέρες από την ημέρα της αιμοληψίας, μειώνοντας σημαντικά το άγχος της εγκύου κατά την αναμονή του αποτελέσματος (Warsof *et al.*, 2015).

Επιπλέον, η εξέλιξη της τεχνολογίας της αλληλούχισης νέας γενιάς δίνει τη δυνατότητα ενεργοποίησης πολλαπλών δικλίδων ασφαλείας κατά την εφαρμογή της. Έτσι, το NGS δίνει το πλεονέκτημα στον έλεγχο NIPT της γενετικής ανάλυσης σε πολλαπλά επίπεδα, της ακριβούς διάκρισης μητρικού και εμβρυικού γενετικού υλικού και της αποθήκευσης του μεγάλου όγκου της πληροφορίας που προκύπτει για χρήση και πιθανή σύγκριση με το αποτέλεσμα μίας επόμενης κύησης (Bianchi and Wilkins-Haug, 2014), (McLennan *et al.*, 2016), (Hui and Bianchi, 2017).

B.5. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΣΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΈΛΕΓΧΟ-NIPT

Για την πραγματοποίηση του ελέγχου NIPT μέσω NGS απαραίτητη προϋπόθεση είναι η επιτυχής απομόνωση του cfDNA, του οποίου η συγκέντρωση είναι πολύ μικρή (Pareek *et al.*, 2011), (Jiang *et al.*, 2012), (Boon and Faas, 2013). Τιμές μικρότερες του 4% θεωρητικά δε δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα (Norton *et al.*, 2012), (Yu *et al.*, 2014), (Wataganara *et al.*, 2016), (Hui and Bianchi, 2019).

Οι λόγοι ύπαρξης του fetal fraction σε χαμηλό ποσοστό ποικίλλουν. Χαμηλό ποσοστό του cfDNA πριν τις 20 εβδομάδες κύησης παρατηρείται όταν οι έγκυοι κάνουν χρήση αντιπηκτικής αγωγής με ηπαρίνη (Burns *et al.*, 2017), (Grömminger *et al.*, 2015). Το fetal fraction είναι χαμηλότερο σε γυναίκες Αφρο-Καραϊβικής προέλευσης συγκριτικά με τις Καυκάσιες, στις κυήσεις από εξωσωματική γονιμοποίηση και στις καπνίζουσες (Ashoor *et al.*, 2013). Επίσης, ο υψηλός δείκτης BMI της μητέρας ευθύνεται για το χαμηλό ποσοστό του cfDNA στη μητρική κυκλοφορία. Το χαμηλό fetal fraction οφείλεται στη αυξημένη απόπτωση και νέκρωση των κυττάρων του λιπώδους ιστού της υπέρβαρης εγκύου (Hui, 2016) και στην αύξηση του cfDNA της μητέρας έναντι αυτού του εμβρύου (Wang *et al.*, 2013), (Serapinas *et al.*, 2020).

Από διάφορες μελέτες προκύπτει ότι το απομονωθέν fetal fraction είναι μικρότερο στις τρισωμίες 13, 18, τη μονοσωμία X και την τριπλοειδία αυξάνοντας το ρίσκο εξαγωγής ενός αναξιόπιστου αποτελέσματος κατά τον έλεγχο NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς (Benn *et al.*, 2015), (Cuckle, 2017). Το απομονωθέν fetal fraction στις προηγούμενες περιπτώσεις είναι μικρότερο από αυτό που υπολογίζεται στην τρισωμία 21, περίπου κατά 15% (Taylor-Phillips *et al.*, 2016). Έτσι εξηγείται γιατί η απόδοση των διαφόρων τεχνικών NGS για έλεγχο NIPT είναι μεγαλύτερη στην ανίχνευση της τρισωμίας 21 (Samura, 2020). Ωστόσο, η βελτίωση της εργαστηριακής τεχνολογίας της αλληλούχισης νέας γενιάς οδηγεί σήμερα πολλές βιοτεχνολογικές εταιρείες παροχής υπηρεσιών NIPT, να ανακοινώνουν ότι οι παραπάνω περιπτώσεις ανευπλοειδιών ανιχνεύονται πλέον σε παρόμοια ποσοστά με την τρισωμία 21 (Alberry *et al.*, 2021).

Μελέτες υποστηρίζουν ότι ανεπαρκές ποσοστό fetal fraction συνεπάγεται την αποτυχία εξαγωγής αποτελέσματος κατά τον έλεγχο NIPT με NGS, λόγω χαμηλής απόδοσης της τεχνικής NGS (Yaron, 2016) ή σε μη επαρκή δεδομένα ανάλυσης (Cuckle, 2016), (Gil *et al.*, 2015). Έτσι, κατά τον έλεγχο της απόδοσης των πρωτόκολλων των διαφόρων τεχνικών NGS που εφαρμόζονται για

τον έλεγχο NIPT και την επεξεργασία των δεδομένων για την εξαγωγή του αποτελέσματος πρέπει να λαμβάνονται πάντα υπόψη το βάρος της εγκύου και η εβδομάδα κύησης (ειδικά όταν είναι μικρότερη των 10 εβδομάδων) (Lutgendorf *et al.*, 2014), (Kinnings *et al.*, 2015), (Shree *et al.*, 2021). Διαφορετικά, το αποτέλεσμα από τον έλεγχο NIPT με NGS μπορεί να είναι αναξιόπιστο (Gregg *et al.*, 2013), (Chiu and Lo, 2013), (Shree *et al.*, 2021).

Σκοπός της εφαρμογής του NGS για τον έλεγχο NIPT είναι η ενίσχυση του γονιδιώματος και η αλληλούχιση δισεκατομμυρίων θραυσμάτων cfDNA, ώστε να ξεπεραστεί ο περιορισμός του χαμηλού fetal fraction που δυσχεραίνει γενικά τον έλεγχο NIPT. Παρά ταύτα αναφέρονται ποσοστά αποτυχίας εξαγωγής αποτελέσματος που κυμαίνονται μεταξύ 1,6% και 6,4% και σχετίζονται με την τεχνική και την πλατφόρμα NGS που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο NIPT (Cuckle, 2017), (Benn *et al.*, 2015). Ειδικότερα, οι Massively Parallel Shotgun Sequencing-MPSS τεχνικές δίνουν το μικρότερο ποσοστό αποτυχίας εξαγωγής αποτελέσματος (1,58%) και οι Quantitative Massively Parallel Targeted Sequencing-MPTS τεχνικές έχουν ποσοστό αποτυχίας 3,56%. Το υψηλότερο δε ποσοστό αποτυχίας παράδοσης αποτελέσματος χαρακτηρίζει τις SNP-based τεχνικές που φθάνει το 6,39% (Yaron, 2016).

Όπως προαναφέρθηκε, η προέλευση του cfDNA στη μητρική κυκλοφορία είναι ο πλακούντας (Flori *et al.*, 2004). Θα μπορούσε έτσι να ειπωθεί ότι ο όρος «cell-free fetal DNA» θα ήταν πιο ακριβής εάν αντικαθίσταντο από τον όρο «cell-free placental DNA» (Neofytou, 2020). Σε περίπου 2% των κύσεων, η κυτταρογενετική σύνθεση του πλακούντα δεν ταιριάζει απόλυτα με αυτή του εμβρύου λόγω του φαινομένου του μωσαϊκισμού στον πλακούντα (Confined Placental Mosaicism-CPM) (Malvestiti *et al.*, 2015). Ο μωσαϊκισμός που παρατηρείται στο γονιδίωμα του εμβρύου αναφέρεται ως αληθής εμβρυϊκός μωσαϊκισμός (True Fetal Mosaicism-TFM) και εμφανίζεται πιο σπάνια από τον CPM.

Στα πρώτα χρόνια εφαρμογής της αλληλούχισης νέας γενιάς στον έλεγχο NIPT όπου οι διάφορες τεχνικές NGS για τον έλεγχο NIPT δεν χαρακτηρίζονταν από υψηλά ποσοστά ειδικότητας και ευαισθησίας, η ύπαρξη μωσαϊκισμού στο έμβρυο ή στον πλακούντα ευθύνονταν σε πολλές περιπτώσεις για ψευδώς αρνητικά ή ψευδώς θετικά ή αμφίβολα αποτελέσματα (Grati *et al.*, 2014). Σήμερα, οι διάφορες εξελιγμένες τεχνικές NGS για τον έλεγχο NIPT ανιχνεύουν τον μωσαϊκισμό κατά την ανάλυση των δεδομένων, δεν έχουν όμως τη δυνατότητα καθορισμού της προέλευσής του. Στην περίπτωση αυτή το αποτέλεσμα πρέπει να επιβεβαιωθεί με κάποια μέθοδο επεμβατικού

προγεννητικού ελέγχου, λαμβάνοντας όμως υπόψη ότι η λήψη τροφοβλαστικού ιστού πιθανόν να δώσει το ίδιο αμφίβολο αποτέλεσμα (Grati *et al.*, 2014). Για το λόγο αυτό δίνονται κατευθυντήριες οδηγίες διαχείρισης τέτοιων περιστατικών, ώστε η επιλογή της επεμβατικής μεθόδου με λήψη τροφοβλαστικού ιστού ή αμνιοπαρακέντηση να γίνει σε συνδυασμό με τα υπερηχογραφικά και βιοχημικά αποτελέσματα (Mardy and Norton, 2021).

Επίσης, όλες οι τεχνικές NGS για τον έλεγχο NIPT ανιχνεύουν μία ανευλοειδία αλλά δεν είναι δυνατό από τον έλεγχο αυτό να προσδιοριστεί εάν πρόκειται για ένα επιπλέον χρωμόσωμα π.χ. του 21 ή μία μετάθεση τύπου Robertson που περιλαμβάνει το χρωμόσωμα 21 ή εάν πρόκειται για μωσαϊκισμό (Chitty and Bianchi, 2013). Και στην περίπτωση αυτή επιβάλλεται επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος, συνήθως κυτταρογενετική ανάλυση, για επιβεβαίωση του αποτελέσματος πρώτα και έπειτα για γνώση της προέλευσης του προβλήματος, ώστε να είναι δυνατή η αντιμετώπιση επόμενων κυήσεων (Kotsopoulou *et al.*, 2015), (Neofytou, 2020).

B.6. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΥ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ-NIPT ΜΕ NGS

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος-NIPT με NGS ανέδειξε αρκετούς προβληματισμούς από τα αρχικά στάδια ανακάλυψης και εφαρμογής του (Norton *et al.*, 2013). Λόγω της σχετικά χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας του ελέγχου NIPT με NGS κατά τα πρώτα χρόνια εφαρμογής του, δεν ήταν δυνατό να διευκρινιστεί εάν θα εφαρμόζονταν ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες μεθόδους επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου. Για το λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητος ο καθορισμός κατευθυντήριων οδηγιών και συστάσεων από τις διεθνείς επιστημονικές ενώσεις σχετικά με τις νέες τεχνικές προγεννητικού ελέγχου που σχετίζονται με την αλληλούχιση νέας γενιάς (Sayres *et al.*, 2011), (Skotko *et al.*, 2019), (Chitty, 2021).

Πολλές χώρες με προηγμένα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης αναγνωρίζουν ότι το κόστος για την ιατροφαρμακευτική κάλυψη των ατόμων με γενετικά σύνδρομα είναι εξαιρετικά μεγάλο. Ήδη, οι οικονομολόγοι της υγείας προτείνουν την ενσωμάτωση του ελέγχου NIPT με NGS στην κλινική πράξη (διεξαγωγή της εξέτασης και γενετική συμβουλευτική) και την κάλυψη του οικονομικού κόστους από το κράτος. Ελοχέυει όμως ο κίνδυνος της αύξησης των θεραπευτικών αποβολών και η απώλεια της ατομικής ελευθερίας για επιλογή γέννησης ενός παιδιού με όποιο

γενετικό σύνδρομο το χαρακτηρίζει (De Groot-Van Der Mooren *et al.*, 2021).

Όλα τα διαθέσιμα τεστ NIPT με NGS που διατίθενται σήμερα είναι αποτέλεσμα πολυετούς έρευνας στην αλληλούχιση νέας γενιάς, στην οποία έχουν δαπανηθεί υπέρογκα ποσά ανά τον κόσμο. Πολυεθνικές βιοτεχνολογικές εταιρείες κατέχουν πατέντες τεστ ελέγχου NIPT με NGS, με αποτέλεσμα το κόστος διεξαγωγής μίας τέτοιας εξέτασης να είναι ακόμη υψηλό και για κάποιους ίσως απαγορευτικό (Filoche *et al.*, 2017), (Hodgson and McClaren, 2018), (Labonté *et al.*, 2019). Οι υπηρεσίες marketing των κατασκευαστικών εταιρειών προωθούν το προϊόν στους επαγγελματίες υγείας και ενημερώνουν το καταναλωτικό κοινό μέσω των μέσων μαζικής ενημέρωσης, στην ουσία όμως μικρή είναι η κατανόηση από όλους των δυνατοτήτων, των περιορισμών και της διαγνωστικής απόδοσης των διαφόρων τεχνικών ελέγχου NIPT με NGS (Benn *et al.*, 2013), (Löwy, 2022). Επομένως, καθίσταται αναγκαίος ο καθορισμός ενός νομικού πλαισίου ελέγχου της λειτουργίας, των κριτηρίων παραγωγής αντιδραστηρίων και της προσφοράς υπηρεσιών ελέγχου NIPT με NGS (Bianchi, 2006), (Benn *et al.*, 2013), (Labonté *et al.*, 2019).

Το Αμερικανικό Κολλέγιο Ιατρικής Γενετικής και Γενομικής (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) προτείνει τη συμμόρφωση των εταιρειών που προσφέρουν υπηρεσίες ελέγχου NIPT με NGS με τις διεθνείς οδηγίες και συστάσεις για τη λειτουργία των εργαστηρίων Γενετικής. Όπως και για όλες τις μεθόδους και τεχνικές Μοριακής Διαγνωστικής θα πρέπει να πληρούνται οι προϋποθέσεις εσωτερικού και εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου και διαπίστευσης των εργαστηρίων. Έλεγχοι quality control πρέπει να εφαρμόζονται σε όλες τις φάσεις διεξαγωγής της εξέτασης, όπως για παράδειγμα ο έλεγχος της απόδοσης της κάθε τεχνικής σε διαφορετικές συγκεντρώσεις cfDNA και σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες των μητέρων (Kotsopoulou *et al.*, 2015).

Επίσης, από τον παραπάνω φορέα προτείνεται στην έκθεση του αποτελέσματος από τον έλεγχο NIPT με NGS να αναγράφεται το ποσοστό του fetal fraction, τους λόγους για τους οποίους προκύπτει ένα αμφίβολο ή αδύνατο αποτέλεσμα και το είδος της στατιστικής ανάλυσης του NGS run που χρησιμοποιείται για τον σκοπό αυτό (Skotko *et al.*, 2019). Σε έλεγχο που πραγματοποιήθηκε σε βιοτεχνολογικές εταιρείες που προσφέρουν υπηρεσίες ελέγχου NIPT με NGS, προέκυψε ότι δεν υφίσταται απόλυτη συμμόρφωση με τις οδηγίες του ACMG και το γεγονός αυτό μόνο ανησυχία προκαλεί, ειδικά όταν δεν διευκρινίζονται πχ η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία αυτών των τεστ (Skotko *et al.*, 2019). Ωστόσο, οι εν λόγω εταιρείες απαντούν

ότι δεν είναι υποχρεωμένες να ακολουθούν τις οδηγίες του ACMG, καθώς θεωρούν ότι ο ρυθμός της εξέλιξης της τεχνολογίας της αλληλούχισης νέας γενιάς είναι τόσο γρήγορος, ώστε δεν είναι δυνατό να συμβαδίζουν με τις οδηγίες αυτές (Skotko *et al.*, 2019).

Με τις τεχνικές ελέγχου NIPT με NGS εκτός από το cfDNA αναλύεται και το ccfDNA που προέρχεται από πιθανή νεοπλασία (καλοήθης ή κακοήθης) στη μητέρα (Bianchi *et al.*, 2015). Πλήθος επιστημονικών συζητήσεων σχετικά με τον τρόπο διαχείρισης τέτοιων καταστάσεων έχει προκύψει την τελευταία δεκαετία, με αρκετά συγκρουόμενα επιχειρήματα υπέρ και κατά της ανακοίνωσης στη μητέρα ενός παθολογικού για την ίδια αποτέλεσμα (Benn *et al.*, 2019). Οι υπέρμαχοι της αξιοποίησης των πλεονεκτημάτων του ελέγχου NIPT με NGS, ακόμη και στην ανίχνευση νεοπλασίας, υποστηρίζουν τη διαχείριση του θέματος από ομάδα ειδικών που θα βοηθήσουν στη γνωστοποίηση, κατανόηση και αξιοποίηση του αποτελέσματος από τη μητέρα, βάσει διεθνώς αναγνωρισμένων κατευθυντήριων οδηγιών και συστάσεων από επιστημονικές ομάδες (Chitty, 2021), (Scott *et al.*, 2021).

Ένας ακόμη προβληματισμός για την εφαρμογή του ελέγχου NIPT με NGS είναι η χρήση του για την επιλογή του φύλου του παιδιού, ειδικά σε χώρες όπου υπάρχει ανισορροπία στα ποσοστά γέννησης θηλέων και αρρένων νεογνών (Bowman-Smart *et al.*, 2020). Παρά το γεγονός ότι η επιλογή του φύλου απαγορεύεται από το νόμο σε πολλές χώρες, δεν είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί μία αιμοληψία, να σταλεί το δείγμα σε κάποια εταιρεία που προσφέρει υπηρεσίες μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου με NGS και να παραληφθεί το αποτέλεσμα ιδιωτικά. Επομένως, για έναν ακόμη λόγο επιβάλλεται να θεσπιστούν κριτήρια εφαρμογής των τεστ NIPT με NGS από τις διάφορες εταιρείες, ώστε να μη συμβάλλουν στην προώθηση της παράνομης συμπεριφοράς, ειδικά σε χώρες που απαγορεύεται η επιλογή του φύλου (Kotsopoulou *et al.*, 2015). Για το λόγο αυτό, επιστημονικές εταιρείες όπως οι European Society of Human Genetics και American Society of Human Genetics προτείνουν ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος με NGS να μην περιλαμβάνει τον έλεγχο των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Dondorp *et al.*, 2015), (Suciu *et al.*, 2019), (Kozlowski *et al.*, 2019).

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Την τελευταία δεκαπενταετία οι διάφορες τεχνικές αλληλούχισης νέας γενιάς για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο έχουν κερδίσει ένα μεγάλο ενδιαφέρον στο πεδίο της Μοριακής Διαγνωστικής και ειδικά στη Μοριακή Ιατρική. Η αλληλούχιση νέας γενιάς δίνει τη δυνατότητα της ανάλυσης του εμβρυικού cfDNA με υψηλή διακριτική ικανότητα, χάρη στις εξελιγμένες πλατφόρμες NGS με δυνατότητες αυξημένου sequencing depth και την εφαρμογή σύγχρονων βιοστατιστικών αλγορίθμων δίνοντας πλέον πολλές και χρήσιμες πληροφορίες για το γονιδίωμα που ελέγχεται (Ravitsky *et al.*, 2021).

Εκτός από τις ανευπλοειδίες των χρωμοσωμάτων 21, 13 και 18 που ελέγχονταν αρχικά κατά τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο με αλληλούχιση νέας γενιάς, σήμερα οι προσφερόμενες δυνατότητες στον τομέα του προγεννητικού ελέγχου έχουν αναβαθμιστεί. Πλέον είναι διαθέσιμα από τις διάφορες βιοτεχνολογικές εταιρείες σχεδιασμού και προσφοράς υπηρεσιών μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου με αλληλούχιση νέας γενιάς νέα διευρυμένα τεστ ελέγχου NIPT με NGS. Αυτά προσφέρουν εκτός από την ανίχνευση και ταυτοποίηση των κοινών τρισωμιών 21, 18 και 13, τον καθορισμό του φύλου και τον έλεγχο για ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων και κάποια σύνδρομα μικροελλείψεων. Σήμερα, είναι δυνατή η αλληλούχιση ολόκληρου του εμβρυικού γονιδιώματος, βάσει της οποίας είναι εφικτή η ταυτοποίηση ακόμη και σπάνιων γενετικών ανωμαλιών του εμβρύου (Scocchia *et al.*, 2019), (Chitty, 2021). Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα εξαγωγής ακόμη πιο σύνθετων αποτελεσμάτων, όπως πχ για επιγενετικά χαρακτηριστικά και το μεταγράφομα του εμβρύου (Breveglieri *et al.*, 2019).

Πρέπει ωστόσο να λαμβάνεται πάντα υπόψη ότι η θετική προγνωστική αξία του ελέγχου NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς είναι υψηλή μόνο για τον έλεγχο των χρωμοσωμάτων 21, 13 και 18 (Wang *et al.*, 2020). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η τεχνολογία της αλληλούχισης νέας γενιάς είναι εξαιρετικά πολύπλοκη, αλλά και ότι η απόδοση του συγκεκριμένου ελέγχου επηρεάζεται όχι μόνο από τεχνικά χαρακτηριστικά αλλά και από πληθώρα βιολογικών παραγόντων που αφορούν το έμβρυο και τη μητέρα (Breveglieri *et al.*, 2019), (Familiari *et al.*, 2021). Οι βιολογικοί αυτοί παράγοντες μπορεί να αφορούν το ποσοστό του fetal fraction, ύπαρξη CNVs στο έμβρυο, καθώς και το υψηλό BMI, αυτοάνοσα νοσήματα, νεοπλασία και μωσαϊκισμός στη μητέρα (Filoche *et al.*, 2017), (Renga, 2018), (Koc *et al.*, 2019), (Chen *et al.*, 2021).

Τα αποτελέσματα του ελέγχου NIPT με NGS βασίζονται στον έλεγχο του ccffDNA που προέρχεται από τον τροφοβλαστικό ιστό του πλακούντα και η προέλευση του ccffDNA πολλές φορές δεν αντικατοπτρίζει την ακριβή σύσταση του εμβρυικού DNA. Την τελευταία δεκαετία πολλές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η ύπαρξη μωσαϊκισμού στον πλακούντα ευθύνεται για ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά ή αμφίβολα αποτελέσματα κατά τον έλεγχο NIPT με NGS, τα οποία παραπέμπουν στην ολοκλήρωση του προγεννητικού ελέγχου με κάποια επεμβατική μέθοδο προγεννητικής διάγνωσης (Grati *et al.*, 2014). Για τους παραπάνω λόγους γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων του ελέγχου NIPT με NGS αποτελεί μία πρόκληση, γιατί απαιτεί μεγάλη εμπειρία του εξειδικευμένου σε βιοστατιστικές αναλύσεις προσωπικού που εμπλέκεται στη διαδικασία (Samura, 2020), (Mardy and Norton, 2021).

Προς όφελος των ενδιαφερόμενων, εντατικές είναι οι προσπάθειες για την αύξηση της απόδοσης και της αξιοπιστίας (υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία) των τεχνικών NGS συμβάλλοντας στη μείωση του ποσοστού των αμφίβολων αποτελεσμάτων και γενικότερα των περιορισμών που χαρακτηρίζουν τον έλεγχο NIPT (Strom *et al.*, 2017), (Pös *et al.*, 2019). Έτσι, θα είναι σημαντικά μειωμένος ο αριθμός των ελέγχων επιβεβαίωσης με μεθόδους επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου, εξασφαλίζοντας την ολοκλήρωση της κύησης χωρίς επιπλοκές (Breveglieri *et al.*, 2019), (Pös *et al.*, 2019). Ήδη, μελέτες αξιολόγησης διαφόρων τεστ ελέγχου NIPT με NGS εκτιμούν την απόδοση του συγκεκριμένου ελέγχου για τις τρισωμίες 21, 18 και 13 να είναι εξαιρετικά υψηλή (σχεδόν 100% ευαισθησία και ειδικότητα) και με πολύ χαμηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων της τάξης του 0,1-0,3% (Santorum *et al.*, 2017), (Di Renzo *et al.*, 2019), (Alberry *et al.*, 2021).

Επίσης, στην περίπτωση της επιλογής του διευρυμένου ελέγχου NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς, αυτή θα πρέπει να γίνεται κατόπιν προσεκτικής έρευνας από τους γονείς, γιατί ο κίνδυνος ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών ή αμφίβολων αποτελεσμάτων αυξάνεται με τον όγκο της πληροφορίας που θα προκύπτει. Αν και η εποχή της ενημέρωσης είναι πραγματικότητα, διαπιστώνεται στην καθημερινή πράξη ότι οι μέλλοντες γονείς δεν είναι εξοικειωμένοι με τις επιλογές που προσφέρονται για τον προγεννητικό έλεγχο. Πολύ δε περισσότερο όταν καλούνται να επιλέξουν κάποια συγκεκριμένη εξέταση προγεννητικής διάγνωσης και έρχονται αντιμέτωποι με όρους όπως το γονιδίωμα, χρωμοσωμικές ανευλοειδίες, μικροελλείψεις και αλληλούχιση νέας γενιάς (Labonté *et al.*, 2019), (Suciu *et al.*, 2019). Τα πλεονεκτήματα του μη επεμβατικού

προγεννητικού ελέγχου με αλληλούχιση νέας γενιάς διαφαίνονται μόνο σε συνδυασμό με την παροχή γενετικής συμβουλευτικής, πριν και μετά την επιλογή του συγκεκριμένου τεστ, κατά την οποία οι ενδιαφερόμενοι ενημερώνονται διεξοδικά για τις δυνατότητες και τους περιορισμούς του ελέγχου NIPT (Gregg *et al.*, 2013), (Samura, 2020).

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος με αλληλούχιση νέας γενιάς θεωρείται μέχρι στιγμής ένα screening test. Δίνεται ως επιλογή και έχει μειώσει σε σημαντικό βαθμό τις περιπτώσεις επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου και τις αποβολές εμβρύων που μπορεί να προκύψουν από αυτόν (Neofytou, 2020). Ο έλεγχος NIPT με NGS έχει διαγνωστική ισχύ και δεν απαιτεί την επιβεβαίωση του αποτελέσματος μόνο στην περίπτωση ταυτοποίησης μονογονιδιακών νοσημάτων και του ελέγχου του γονοτύπου Rhesus D, καθώς τα παραπάνω βασίζονται στον προσδιορισμό συγκεκριμένων απλοτύπων και δεν έχουν καταγραφεί ποτέ ψευδώς θετικά ή αρνητικά ή αμφίβολα αποτελέσματα (Chitty *et al.*, 2014), (Pös *et al.*, 2019), (Shaw *et al.*, 2020).

Στο εγγύς μέλλον αναμένεται, εκτός από τις προαναφερθείσες δυνατότητες του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου με αλληλούχιση νέας γενιάς, να προκύψει η δυνατότητα δημιουργίας panel εξετάσεων, ακόμη και για σπάνια γενετικά σύνδρομα, που θα ελέγχουν το έμβρυο, καθώς και στην εφαρμογή ελάχιστα επεμβατικών θεραπευτικών μεθόδων του εμβρύου (πχ με εφαρμογή gene editing μεθόδων) (Kotsopoulou *et al.*, 2015), (Ravitsky *et al.*, 2021).

Με την εξέλιξη της τεχνολογίας της αλληλούχισης νέας γενιάς, η παροχή των σημερινών τεστ ελέγχου NIPT γίνεται όλο και φθηνότερη και ενδεχομένως να γίνει συγκρίσιμη με τα διάφορα τεστ επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου. Αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και άλλες είναι σε εξέλιξη για την ανάπτυξη ενός ευρύτερου σχήματος προγεννητικού ελέγχου που θα περιλαμβάνει τον βασικό προγεννητικό έλεγχο του πρώτου τριμήνου και τον έλεγχο NIPT με αλληλούχιση νέας γενιάς από τις αρχές της κύησης. Προβλέπεται το συγκεκριμένο σχήμα να είναι ικανοποιητικό για τη διάγνωση οποιουδήποτε προβλήματος του εμβρύου, παρακάμπτοντας έτσι την εφαρμογή του επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου. Κατά τον τρόπο αυτό ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος με αλληλούχιση νέας γενιάς μπορεί να εξελιχθεί σε ένα διαγνωστικό τεστ παθολογικών κυήσεων (Kotsopoulou *et al.*, 2015), (Wong and Lo, 2016), (Ravitsky *et al.*, 2021).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akolekar, R. *et al.* (2015) 'Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis', *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 45(1), pp. 16–26. doi: 10.1002/UOG.14636.
- Alberry, M. S. *et al.* (2021) 'Non invasive prenatal testing (NIPT) for common aneuploidies and beyond', *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 258, pp. 424–429. doi: 10.1016/J.EJOGRB.2021.01.008.
- Allyse, M. *et al.* (2015) 'Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges', *International journal of women's health*, 7, pp. 113–126. doi: 10.2147/IJWH.S67124.
- Amant, F. *et al.* (2015) 'Presymptomatic Identification of Cancers in Pregnant Women During Noninvasive Prenatal Testing', *JAMA oncology*, 1(6), pp. 814–819. doi: 10.1001/JAMAONCOL.2015.1883.
- Amicucci, P. *et al.* (2000) 'Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma', *Clinical chemistry*, 46(2), pp. 301–302. doi: 10.1093/clinchem/46.2.301.
- Ashoor, G., Syngelaki, A., Poon, L. C. Y., *et al.* (2013) 'Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics', *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 41(1), pp. 26–32. doi: 10.1002/UOG.12331.
- Ashoor, G., Syngelaki, A., Wang, E., *et al.* (2013) 'Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method', *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 41(1), pp. 21–25. doi: 10.1002/UOG.12299.
- Attilakos, G. *et al.* (2011) 'Quantification of free fetal DNA in multiple pregnancies and relationship with chorionicity', *Prenatal diagnosis*, 31(10), pp. 967–972. doi: 10.1002/PD.2814.
- Balaguer, N. *et al.* (2021) 'Should vanishing twin pregnancies be systematically excluded from cell-free fetal DNA testing?', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1241–1248. doi: 10.1002/PD.5817.

- Bawazeer, S. *et al.* (2021) 'Knowledge and attitudes regarding non-invasive prenatal testing among women in Saudi Arabia', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1343–1350. doi: 10.1002/PD.5991.
- Behjati, S. and Tarpey, P. S. (2013) 'What is next generation sequencing?', *Archives of disease in childhood. Education and practice edition*, 98(6), pp. 236–238. doi: 10.1136/ARCHDISCHILD-2013-304340.
- Bellido, M. L. *et al.* (2010) 'MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma', *Biology of Reproduction*, 82(4), pp. 745–750. doi: 10.1095/biolreprod.109.082271.
- Benn, P. *et al.* (2013a) 'Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis', *Prenatal diagnosis*, 33(7), pp. 622–629. doi: 10.1002/PD.4139.
- Benn, P. *et al.* (2013b) 'Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis', *Prenatal diagnosis*, 33(7), pp. 622–629. doi: 10.1002/PD.4139.
- Benn, P. *et al.* (2015a) 'Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis', *Prenatal diagnosis*, 35(8), pp. 725–734. doi: 10.1002/PD.4608.
- Benn, P. *et al.* (2015b) 'Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis', *Prenatal diagnosis*, 35(8), pp. 725–734. doi: 10.1002/PD.4608.
- Benn, P. A. *et al.* (2004) 'Changes in the utilization of prenatal diagnosis', *Obstetrics and gynecology*, 103(6), pp. 1255–1260. doi: 10.1097/01.AOG.0000127008.14792.14.
- Benn, P. A. and Chapman, A. R. (2010) 'Ethical challenges in providing noninvasive prenatal diagnosis', *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 22(2), pp. 128–134. doi: 10.1097/GCO.0B013E3283372352.
- Benn, P., Cuckle, H. and Pergament, E. (2013) 'Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects', *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal*

of the *International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 42(1), pp. 15–33. doi: 10.1002/UOG.12513.

Benn, P., Plon, S. E. and Bianchi, D. W. (2019) ‘Current Controversies in Prenatal Diagnosis 2: NIPT results suggesting maternal cancer should always be disclosed’, *Prenatal diagnosis*, 39(5), pp. 339–343. doi: 10.1002/PD.5379.

Benn, P. and Rebarber, A. (2021) ‘Non-invasive prenatal testing in the management of twin pregnancies’, *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1233–1240. doi: 10.1002/PD.5989.

van den Berg, M. *et al.* (2006) ‘Informed decision making in the context of prenatal screening’, *Patient education and counseling*, 63(1–2), pp. 110–117. doi: 10.1016/J.PEC.2005.09.007.

Berlin, K. *et al.* (2015) ‘Assembling large genomes with single-molecule sequencing and locality-sensitive hashing’, *Nature biotechnology*, 33(6), pp. 623–630. doi: 10.1038/NBT.3238.

Bianchi, D. W. *et al.* (1997) ‘PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies’, *American Journal of Human Genetics*, 61(4), pp. 822–829. doi: 10.1086/514885.

Bianchi, D. W. (2006) ‘At-home fetal DNA gender testing: caveat emptor’, *Obstetrics and gynecology*, 107(2 Pt 1), pp. 216–218. doi: 10.1097/01.AOG.0000199427.83503.D0.

Bianchi, D. W. *et al.* (2015) ‘Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies’, *JAMA*, 314(2), pp. 162–169. doi: 10.1001/JAMA.2015.7120.

Bianchi, D. W. and Wilkins-Haug, L. (2014) ‘Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: what has happened since the rubber met the road?’, *Clinical chemistry*, 60(1), pp. 78–87. doi: 10.1373/CLINCHEM.2013.202663.

Bischoff, F. Z., Lewis, D. E. and Simpson, J. L. (2005) ‘Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure’, *Human reproduction update*, 11(1), pp. 59–67. doi: 10.1093/HUMUPD/DMH053.

Boon, E. M. J. and Faas, B. H. W. (2013) ‘Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies’, *Prenatal diagnosis*, 33(6), pp. 563–568. doi: 10.1002/PD.4111.

- Borth, H. *et al.* (2021) ‘Analysis of cell-free DNA in a consecutive series of 13,607 routine cases for the detection of fetal chromosomal aneuploidies in a single center in Germany’, *Archives of gynecology and obstetrics*, 303(6), pp. 1407–1414. doi: 10.1007/S00404-020-05856-0.
- Bowman-Smart, H. *et al.* (2020) ‘Sex selection and non-invasive prenatal testing: A review of current practices, evidence, and ethical issues’, *Prenatal diagnosis*, 40(4), pp. 398–407. doi: 10.1002/PD.5555.
- Breviglieri, G. *et al.* (2019) ‘Non-invasive Prenatal Testing Using Fetal DNA’, *Molecular Diagnosis and Therapy*, 23(2), pp. 291–299. doi: 10.1007/S40291-019-00385-2.
- Brewer, M. H. *et al.* (2016) ‘Whole Genome Sequencing Identifies a 78 kb Insertion from Chromosome 8 as the Cause of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy CMTX3’, *PLoS genetics*, 12(7). doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1006177.
- Burns, W. *et al.* (2017) ‘The association between anticoagulation therapy, maternal characteristics, and a failed cfDNA test due to a low fetal fraction’, *Prenatal diagnosis*, 37(11), pp. 1125–1129. doi: 10.1002/PD.5152.
- Camunas-Soler, J. *et al.* (2018) ‘Noninvasive Prenatal Diagnosis of Single-Gene Disorders by Use of Droplet Digital PCR’, *Clinical chemistry*, 64(2), pp. 336–345. doi: 10.1373/CLINCHEM.2017.278101.
- Canick, J. A. *et al.* (2012) ‘DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations’, *Prenatal diagnosis*, 32(8), pp. 730–734. doi: 10.1002/PD.3892.
- Chan, K. C. A. *et al.* (2004) ‘Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma’, *Clinical chemistry*, 50(1), pp. 88–92. doi: 10.1373/CLINCHEM.2003.024893.
- Chan, K. C. A. *et al.* (2006) ‘Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis’, *Clinical chemistry*, 52(12), pp. 2211–2218. doi: 10.1373/CLINCHEM.2006.074997.
- Chan, L. L. and Jiang, P. (2015) ‘Bioinformatics analysis of circulating cell-free DNA sequencing data’, *Clinical biochemistry*, 48(15), pp. 962–975. doi: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2015.04.022.

Chen, S. *et al.* (2021) 'Expanding the Scope of Non-invasive Prenatal Testing to Detect Fetal Chromosomal Copy Number Variations', *Frontiers in molecular biosciences*, 8. doi: 10.3389/FMOLB.2021.649169.

Chim, S. S. C. *et al.* (2005) 'Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), pp. 14753–14758. doi: 10.1073/PNAS.0503335102.

Chim, S. S. C. *et al.* (2008) 'Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21', *Clinical chemistry*, 54(3), pp. 500–511. doi: 10.1373/CLINCHEM.2007.098731.

Chitty, L. S. *et al.* (2011) 'New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma', *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 37(3), pp. 283–289. doi: 10.1002/UOG.8893.

Chitty, L. S. *et al.* (2013) 'Safe, accurate, prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia using ultrasound and free fetal DNA', *Prenatal diagnosis*, 33(5), pp. 416–423. doi: 10.1002/PD.4066.

Chitty, L. S. *et al.* (2014) 'Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study', *BMJ (Clinical research ed.)*, 349. doi: 10.1136/BMJ.G5243.

Chitty, L. S. (2021) 'Non-invasive prenatal testing 10 years on', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1187–1189. doi: 10.1002/PD.6032.

Chitty, L. S. and Bianchi, D. W. (2013) 'Noninvasive prenatal testing: the paradigm is shifting rapidly', *Prenatal diagnosis*, 33(6), pp. 511–513. doi: 10.1002/PD.4136.

Chiu, R. W. K. *et al.* (2008a) 'Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), pp. 20458–20463. doi: 10.1073/PNAS.0810641105.

Chiu, R. W. K. *et al.* (2008b) 'Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy

by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), pp. 20458–20463. doi: 10.1073/PNAS.0810641105.

Chiu, R. W. K. *et al.* (2011) ‘Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study’, *BMJ (Clinical research ed.)*, 342(7790), p. 217. doi: 10.1136/BMJ.C7401.

Chiu, R. W. K. and Lo, Y. M. D. (2013) ‘Clinical applications of maternal plasma fetal DNA analysis: translating the fruits of 15 years of research’, *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 51(1), pp. 197–204. doi: 10.1515/CCLM-2012-0601.

Christiaens, L., Chitty, L. S. and Langlois, S. (2021) ‘Current controversies in prenatal diagnosis: Expanded NIPT that includes conditions other than trisomies 13, 18, and 21 should be offered’, *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1316–1323. doi: 10.1002/PD.5943.

Cirigliano, V. *et al.* (2004) ‘Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples’, *Molecular human reproduction*, 10(11), pp. 839–846. doi: 10.1093/MOLEHR/GAH108.

Cirigliano, V. *et al.* (2017) ‘Performance of the neoBona test: a new paired-end massively parallel shotgun sequencing approach for cell-free DNA-based aneuploidy screening’, *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 49(4), pp. 460–464. doi: 10.1002/UOG.17386.

Clausen, F. B., Damkjær, M. B. and Dziegiel, M. H. (2014) ‘Noninvasive fetal RhD genotyping’, *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, 50(2), pp. 154–162. doi: 10.1016/J.TRANSCL.2014.02.008.

Cuckle, H. (2016) ‘Strategies for Implementing Cell-Free DNA Testing’, *Clinics in laboratory medicine*, 36(2), pp. 213–226. doi: 10.1016/J.CLL.2016.01.010.

Cuckle, H. (2017) ‘cfDNA screening performance: accounting for and reducing test failures’, *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 49(6), pp. 689–692. doi: 10.1002/UOG.17492.

D'Aversa, E. *et al.* (2018) 'Non-invasive fetal sex diagnosis in plasma of early weeks pregnant using droplet digital PCR', *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 24(1). doi: 10.1186/S10020-018-0016-7.

Dar, P. *et al.* (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), pp. 527.e1-527.e17. doi: 10.1016/J.AJOG.2014.08.006.

Dennis Lo, Y. M. *et al.* (1997) 'Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum', *Lancet (London, England)*, 350(9076), pp. 485–487. doi: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0.

Dennis Lo, Y. M. *et al.* (1999) 'Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma', *American journal of human genetics*, 64(1), pp. 218–224. doi: 10.1086/302205.

Dhallan, R. *et al.* (2007) 'A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study', *Lancet (London, England)*, 369(9560), pp. 474–481. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60115-9.

Dondorp, W. *et al.* (2015) 'Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening', *European journal of human genetics : EJHG*, 23(11), pp. 1438–1450. doi: 10.1038/EJHG.2015.57.

Dugoff, L., Norton, M. E. and Kuller, J. A. (2016) 'The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(4), pp. B2–B9. doi: 10.1016/j.ajog.2016.07.016.

Ehrich, M. *et al.* (2017) 'Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 19(12), pp. 1332–1337. doi: 10.1038/GIM.2017.56.

Evans, M. I. *et al.* (1999) 'International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used', *Human reproduction (Oxford, England)*, 14(5), pp. 1213–1216. doi: 10.1093/HUMREP/14.5.1213.

Familiari, A. *et al.* (2021) 'Cell-free DNA analysis of maternal blood in prenatal screening for chromosomal microdeletions and microduplications: a systematic review', *Prenatal diagnosis*,

41(10), pp. 1324–1331. doi: 10.1002/PD.5928.

Fan, H. C. *et al.* (2008a) ‘Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42), pp. 16266–16271. doi: 10.1073/PNAS.0808319105.

Fan, H. C. *et al.* (2008b) ‘Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42), pp. 16266–16271. doi: 10.1073/PNAS.0808319105.

Fan, H. C. and Quake, S. R. (2010) ‘Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics’, *PloS one*, 5(5). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0010439.

Farrell, R. M. *et al.* (2016) ‘The use of noninvasive prenatal testing in obstetric care: educational resources, practice patterns, and barriers reported by a national sample of clinicians’, *Prenatal diagnosis*, 36(6), pp. 499–506. doi: 10.1002/PD.4812.

Fauzdar, A. (2014) ‘Non-invasive prenatal testing (NIPT): a better option for patients’, *Molecular cytogenetics*, 7(Suppl 1 Proceedings of the International Conference on Human), p. I17. doi: 10.1186/1755-8166-7-S1-I17.

Ferguson-Smith, M. A. and Yates, J. R. W. (1984) ‘Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses’, *Prenatal diagnosis*, 4 Spec No(7), pp. 5–44. doi: 10.1002/PD.1970040704.

Fernandez-Cuesta, L. *et al.* (2015) ‘Identification of novel fusion genes in lung cancer using breakpoint assembly of transcriptome sequencing data’, *Genome biology*, 16(1). doi: 10.1186/S13059-014-0558-0.

Ferrari, M. *et al.* (2015) ‘New trend in non-invasive prenatal diagnosis’, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 451(Pt A), pp. 9–13. doi: 10.1016/J.CCA.2014.12.026.

Ferrarini, M. *et al.* (2013) ‘An evaluation of the PacBio RS platform for sequencing and de novo assembly of a chloroplast genome’, *BMC genomics*, 14(1). doi: 10.1186/1471-2164-14-670.

- Filoche, S. *et al.* (2017a) ‘New screen on the block: non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities’, *Journal of primary health care*, 9(4), pp. 248–253. doi: 10.1071/HC16055.
- Filoche, S. *et al.* (2017b) ‘New screen on the block: non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities’, *Journal of primary health care*, 9(4), pp. 248–253. doi: 10.1071/HC16055.
- Flori, E. *et al.* (2004) ‘Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report’, *Human reproduction (Oxford, England)*, 19(3), pp. 723–724. doi: 10.1093/HUMREP/DEH117.
- Gil, M. M. *et al.* (2015) ‘Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis’, *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 45(3), pp. 249–266. doi: 10.1002/UOG.14791.
- González-González, M. C. *et al.* (2003) ‘Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR’, *Prenatal diagnosis*, 23(3), pp. 232–234. doi: 10.1002/PD.570.
- Goodwin, S., McPherson, J. D. and McCombie, W. R. (2016) ‘Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies’, *Nature reviews. Genetics*, 17(6), pp. 333–351. doi: 10.1038/NRG.2016.49.
- Grati, F. R. *et al.* (2014) ‘Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results’, *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 16(8), pp. 620–624. doi: 10.1038/GIM.2014.3.
- Gregg, A. R. *et al.* (2013) ‘ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy’, *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 15(5), pp. 395–398. doi: 10.1038/GIM.2013.29.
- Gregg, A. R. *et al.* (2016) ‘Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics’, *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 18(10), pp. 1056–1065. doi: 10.1038/GIM.2016.97.

- Grömminger, S. *et al.* (2015) 'The influence of low molecular weight heparin medication on plasma DNA in pregnant women', *Prenatal diagnosis*, 35(11), pp. 1155–1157. doi: 10.1002/PD.4668.
- De Groot-Van Der Mooren, M. *et al.* (2021) 'Does non-invasive prenatal testing affect the livebirth prevalence of Down syndrome in the Netherlands? A population-based register study'. doi: 10.1002/pd.6003.
- Grumbt, B. *et al.* (2013) 'Diagnostic applications of next generation sequencing in immunogenetics and molecular oncology', *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 40(3), pp. 196–206. doi: 10.1159/000351267.
- Gutowska-Ding, M. W. *et al.* (2020) 'One byte at a time: evidencing the quality of clinical service next-generation sequencing for germline and somatic variants', *European journal of human genetics : EJHG*, 28(2), pp. 202–212. doi: 10.1038/S41431-019-0515-1.
- Gwinn, M., Maccannell, D. and Armstrong, G. L. (2019) 'Next-Generation Sequencing of Infectious Pathogens', *JAMA*, 321(9), pp. 893–894. doi: 10.1001/JAMA.2018.21669.
- Hahn, S. *et al.* (2011) 'Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia', *Placenta*, 32 Suppl(SUPPL. 1). doi: 10.1016/J.PLACENTA.2010.06.018.
- Hall, M. P. *et al.* (2014) 'Non-invasive prenatal detection of trisomy 13 using a single nucleotide polymorphism- and informatics-based approach', *PloS one*, 9(5). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0096677.
- Harraway, J. (2017) 'Non-invasive prenatal testing', *Australian family physician*, 46(10), pp. 735–739. doi: 10.1097/01.aog.0000447169.52898.80.
- Hill, M. *et al.* (2011) 'Incremental cost of non-invasive prenatal diagnosis versus invasive prenatal diagnosis of fetal sex in England', *Prenatal diagnosis*, 31(3), pp. 267–273. doi: 10.1002/PD.2680.
- Hill, M. *et al.* (2012) 'Women's and health professionals' preferences for prenatal tests for Down syndrome: a discrete choice experiment to contrast noninvasive prenatal diagnosis with current invasive tests', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical*

Genetics, 14(11), pp. 905–913. doi: 10.1038/GIM.2012.68.

Hoadley, K. A. *et al.* (2018) ‘Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer’, *Cell*, 173(2), pp. 291–304.e6. doi: 10.1016/J.CELL.2018.03.022.

Hodgson, J. and McClaren, B. J. (2018) ‘Parental experiences after prenatal diagnosis of fetal abnormality’, *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 23(2), pp. 150–154. doi: 10.1016/J.SINY.2017.11.009.

Hui, L. (2016) ‘Noninvasive prenatal testing for aneuploidy using cell-free DNA - New implications for maternal health’, *Obstetric medicine*, 9(4), pp. 148–152. doi: 10.1177/1753495X16652007.

Hui, L. and Bianchi, D. W. (2017) ‘Noninvasive Prenatal DNA Testing: The Vanguard of Genomic Medicine’, *Annual review of medicine*, 68, pp. 459–472. doi: 10.1146/ANNUREV-MED-072115-033220.

Hultén, M. A., Dhanjal, S. and Pertl, B. (2003) *Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR, Reproduction.*

Hyett, J. A. *et al.* (2005) ‘Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy’, *Prenatal diagnosis*, 25(12), pp. 1111–1116. doi: 10.1002/PD.1284.

Illanes, S. *et al.* (2007) ‘Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma’, *Early human development*, 83(9), pp. 563–566. doi: 10.1016/J.EARLHUMDEV.2006.11.001.

Jensen, T. J. *et al.* (2012) ‘Detection of microdeletion 22q11.2 in a fetus by next-generation sequencing of maternal plasma’, *Clinical chemistry*, 58(7), pp. 1148–1151. doi: 10.1373/CLINCHEM.2011.180794.

Jiang, P. *et al.* (2012) ‘FetalQuant: deducing fractional fetal DNA concentration from massively parallel sequencing of DNA in maternal plasma’, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(22), pp. 2883–2890. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTS549.

- de Jong, A. and de Wert, G. M. W. R. (2015) 'Prenatal screening: an ethical agenda for the near future', *Bioethics*, 29(1), pp. 46–55. doi: 10.1111/BIOE.12122.
- Kinnings, S. L. *et al.* (2015) 'Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing', *Prenatal diagnosis*, 35(8), pp. 816–822. doi: 10.1002/PD.4625.
- Koboldt, D. C. *et al.* (2013) 'The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics', *Cell*, 155(1), p. 27. doi: 10.1016/J.CELL.2013.09.006.
- Kochanek, K. D. *et al.* (2012) 'Annual summary of vital statistics: 2009', *Pediatrics*, 129(2), pp. 338–348. doi: 10.1542/PEDS.2011-3435.
- Koh, W. *et al.* (2014) 'Noninvasive in vivo monitoring of tissue-specific global gene expression in humans', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(20), pp. 7361–7366. doi: 10.1073/PNAS.1405528111.
- Kotsopoulou, I. *et al.* (2015) 'Non-invasive prenatal testing (NIPT): limitations on the way to become diagnosis', *Diagnosis (Berlin, Germany)*, 2(3), pp. 141–158. doi: 10.1515/DX-2015-0002.
- Koumbaris, G. *et al.* (2019) 'Targeted capture enrichment followed by NGS: development and validation of a single comprehensive NIPT for chromosomal aneuploidies, microdeletion syndromes and monogenic diseases', *Molecular cytogenetics*, 12(1). doi: 10.1186/S13039-019-0459-8.
- Kozłowski, P. *et al.* (2019) 'DEGUM, ÖGUM, SGUM and FMF Germany Recommendations for the Implementation of First-Trimester Screening, Detailed Ultrasound, Cell-Free DNA Screening and Diagnostic Procedures', *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)*, 40(2), pp. 176–192. doi: 10.1055/A-0631-8898.
- Labonté, V. *et al.* (2019) 'Psychological and social consequences of non-invasive prenatal testing (NIPT): a scoping review', *BMC pregnancy and childbirth*, 19(1). doi: 10.1186/S12884-019-2518-X.
- Larion, S. *et al.* (2014) 'Uptake of noninvasive prenatal testing at a large academic referral center', *American journal of obstetrics and gynecology*, 211(6), pp. 651.e1-651.e7. doi:

10.1016/J.AJOG.2014.06.038.

Lau, T. K., Chan, M. K., *et al.* (2012) 'Clinical utility of noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test-early experience', *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 25(10), pp. 1856–1859. doi: 10.3109/14767058.2012.678442.

Lau, T. K., Chen, F., *et al.* (2012) 'Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing', *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 25(8), pp. 1370–1374. doi: 10.3109/14767058.2011.635730.

Ledbetter, D. H. *et al.* (1992) 'Cytogenetic results from the U.S. Collaborative Study on CVS', *Prenatal diagnosis*, 12(5), pp. 317–345. doi: 10.1002/PD.1970120503.

Legler, T. J. *et al.* (2009) 'Prenatal RhD Testing: A Review of Studies Published from 2006 to 2008', *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 36(3), pp. 189–198. doi: 10.1159/000216580.

Lenaerts, L. *et al.* (2019) 'Pregnant women with confirmed neoplasms should not have noninvasive prenatal testing', *Prenatal diagnosis*, 39(12), pp. 1162–1165. doi: 10.1002/PD.5544.

Leung, T. Y. *et al.* (2013) 'Noninvasive twin zygoty assessment and aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing', *Prenatal Diagnosis*, 33(7), pp. 675–681. doi: 10.1002/pd.4132.

Levy, B. and Norwitz, E. (2013) 'Non-invasive prenatal aneuploidy testing: technologies and clinical implication', *MLO: medical laboratory observer*, 45(6). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23875437/> (Accessed: 29 June 2022).

Li, Y. *et al.* (2004) 'Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms', *Clinical chemistry*, 50(6), pp. 1002–1011. doi: 10.1373/CLINCHEM.2003.029835.

Liao, G. J. W. *et al.* (2012) 'Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio

analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA', *PloS one*, 7(5). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0038154.

Liao, G. J. W., Gronowski, A. M. and Zhao, Z. (2014) 'Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation', *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 428, pp. 44–50. doi: 10.1016/j.cca.2013.10.007.

Liao, G. J. W. W. *et al.* (2010) 'Targeted Massively Parallel Sequencing of Maternal Plasma DNA Permits Efficient and Unbiased Detection of Fetal Alleles', *Clinical chemistry*, 57(1), pp. 92–101. doi: 10.1373/clinchem.2010.154336.

de Ligt, J. *et al.* (2012) 'Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability', *The New England journal of medicine*, 367(20), pp. 1921–1929. doi: 10.1056/NEJMOA1206524.

Lo, Y. M. D. *et al.* (1990) 'Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood', *Lancet (London, England)*, 335(8703), pp. 1463–1464. doi: 10.1016/0140-6736(90)91491-R.

Lo, Y.M. Dennis *et al.* (1998) 'Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma', *The New England journal of medicine*, 339(24), pp. 1734–1738. doi: 10.1056/NEJM199812103392402.

Lo, Y. M.Dennis *et al.* (1998) 'Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis', *American Journal of Human Genetics*, 62(4), pp. 768–775. doi: 10.1086/301800.

Lo, Y. M. D. (2000) 'Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications', *Clinical chemistry*, 46(12), pp. 1903–1906. doi: 10.1093/clinchem/46.12.1903.

Lo, Y. M. D. *et al.* (2010) 'Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus', *Science translational medicine*, 2(61). doi: 10.1126/SCITRANSLMED.3001720.

Löwy, I. (2022) 'Non-invasive prenatal testing: A diagnostic innovation shaped by commercial interests and the regulation conundrum', *Social science & medicine (1982)*, 304. doi: 10.1016/J.SOCSCIMED.2020.113064.

- Lun, F. M. F. *et al.* (2008) 'Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma', *Clinical chemistry*, 54(10), pp. 1664–1672. doi: 10.1373/CLINCHEM.2008.111385.
- Lun, F. M. F. *et al.* (2013) 'Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA', *Clinical chemistry*, 59(11), pp. 1583–1594. doi: 10.1373/CLINCHEM.2013.212274.
- Lutgendorf, M. A. *et al.* (2014a) 'Noninvasive prenatal testing: limitations and unanswered questions', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 16(4), pp. 281–285. doi: 10.1038/GIM.2013.126.
- Lutgendorf, M. A. *et al.* (2014b) 'Noninvasive prenatal testing: limitations and unanswered questions', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 16(4), pp. 281–285. doi: 10.1038/GIM.2013.126.
- Lüthgens, K. *et al.* (2021) 'Confirmation rate of cell free DNA screening for sex chromosomal abnormalities according to the method of confirmatory testing', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1258–1263. doi: 10.1002/PD.5814.
- Mackie, F. L. *et al.* (2017a) 'The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis', *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 124(1), pp. 32–46. doi: 10.1111/1471-0528.14050.
- Mackie, F. L. *et al.* (2017b) 'The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis', *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 124(1), pp. 32–46. doi: 10.1111/1471-0528.14050.
- Maddocks, D. G. *et al.* (2009) 'The SAFE project: towards non-invasive prenatal diagnosis', *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 2), pp. 460–465. doi: 10.1042/BST0370460.
- Malvestiti, F. *et al.* (2015) 'Interpreting mosaicism in chorionic villi: results of a monocentric series of 1001 mosaics in chorionic villi with follow-up amniocentesis', *Prenatal diagnosis*, 35(11), pp. 1117–1127. doi: 10.1002/PD.4656.

MANDEL, P. and METAIS, P. (1948) '[Nuclear Acids In Human Blood Plasma]', *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, 142(3–4), pp. 241–243. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18875018/> (Accessed: 29 June 2022).

Manegold-Brauer, G., Hahn, S. and Lapaire, O. (2014) 'What does next-generation sequencing mean for prenatal diagnosis?', *Biomarkers in medicine*, 8(4), pp. 499–508. doi: 10.2217/BMM.14.18.

Mardis, E. R. (2008) 'Next-generation DNA sequencing methods', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, pp. 387–402. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.

Mardis, E. R. (2014) 'Sequencing the AML genome, transcriptome, and epigenome', *Seminars in hematology*, 51(4), pp. 250–258. doi: 10.1053/J.SEMINHEMATOL.2014.08.003.

Mardy, A. H. and Norton, M. E. (2021) 'Diagnostic testing after positive results on cell free DNA screening: CVS or Amnio?', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1249–1254. doi: 10.1002/PD.6021.

Mavrou, A. *et al.* (1998) 'Fetal cells in maternal blood: isolation by magnetic cell sorting and confirmation by immunophenotyping and FISH', *In vivo (Athens, Greece)*, 12(2), pp. 195–200. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9627802/> (Accessed: 29 June 2022).

Mccarthy, A. (2010) 'Third generation DNA sequencing: pacific biosciences' single molecule real time technology', *Chemistry & biology*, 17(7), pp. 675–676. doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2010.07.004.

McLennan, A. *et al.* (2016) 'Noninvasive prenatal testing in routine clinical practice--an audit of NIPT and combined first-trimester screening in an unselected Australian population', *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*, 56(1), pp. 22–28. doi: 10.1111/AJO.12432.

Meaney, C. and Norbury, G. (2009) 'Noninvasive prenatal diagnosis of early onset primary dystonia I in maternal plasma', *Prenatal diagnosis*, 29(13), pp. 1218–1221. doi: 10.1002/PD.2385.

van der Meij, K. R. M. *et al.* (2019) 'TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands', *American*

journal of human genetics, 105(6), pp. 1091–1101. doi: 10.1016/J.AJHG.2019.10.005.

Mujezinovic, F. and Alfirevic, Z. (2007) ‘Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review’, *Obstetrics and gynecology*, 110(3), pp. 687–694. doi: 10.1097/01.AOG.0000278820.54029.E3.

Neofytou, M. (2020) ‘Predicting fetoplacental mosaicism during cfDNA-based NIPT’, *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 32(2), pp. 152–158. doi: 10.1097/GCO.0000000000000610.

Nepomnyashchaya, Y. N. *et al.* (2013a) ‘Non-invasive prenatal diagnostics of aneuploidy using next-generation DNA sequencing technologies, and clinical considerations’, *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 51(6), pp. 1141–1154. doi: 10.1515/CCLM-2012-0281.

Nepomnyashchaya, Y. N. *et al.* (2013b) ‘Non-invasive prenatal diagnostics of aneuploidy using next-generation DNA sequencing technologies, and clinical considerations’, *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 51(6), pp. 1141–1154. doi: 10.1515/CCLM-2012-0281.

Nicolaides, K. H. *et al.* (2012) ‘Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population’, *American journal of obstetrics and gynecology*, 207(5), pp. 374.e1-374.e6. doi: 10.1016/J.AJOG.2012.08.033.

Nicolaides, K. H. *et al.* (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(6), pp. 575–579. doi: 10.1002/PD.4103.

Nimkarn, S. and New, M. I. (2010) ‘Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: A paradigm for prenatal diagnosis and treatment’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192, pp. 5–11. doi: 10.1111/J.1749-6632.2009.05225.X.

Norton, M. E. *et al.* (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), pp. 137.e1-137.e8. doi: 10.1016/J.AJOG.2012.05.021.

Norton, M. E. *et al.* (2016) ‘Cell-free DNA vs sequential screening for the detection of fetal chromosomal abnormalities’, *American journal of obstetrics and gynecology*, 214(6), pp. 727.e1-727.e6. doi: 10.1016/J.AJOG.2015.12.018.

Norton, M. E. (2016) 'Noninvasive prenatal testing to analyze the fetal genome', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(50), pp. 14173–14175. doi: 10.1073/PNAS.1617112113.

Norton, M. E., Rose, N. C. and Benn, P. (2013) 'Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy: clinical assessment and a plea for restraint', *Obstetrics and gynecology*, 121(4), pp. 847–850. doi: 10.1097/AOG.0B013E31828642C6.

Oliver, G. R., Hart, S. N. and Klee, E. W. (2015) 'Bioinformatics for clinical next generation sequencing', *Clinical chemistry*, 61(1), pp. 124–135. doi: 10.1373/CLINCHEM.2014.224360.

Ong, F. S. *et al.* (2013) 'Translational utility of next-generation sequencing', *Genomics*, 102(3), pp. 137–139. doi: 10.1016/J.YGENO.2013.04.012.

Osborne, C. M. *et al.* (2013) 'Discordant noninvasive prenatal testing results in a patient subsequently diagnosed with metastatic disease', *Prenatal diagnosis*, 33(6), pp. 609–611. doi: 10.1002/PD.4100.

Oudejans, C. B. M. (2015) 'Maternal plasma RNA sequencing', *Clinical biochemistry*, 48(15), pp. 942–947. doi: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2015.03.004.

Palomaki, G. E. *et al.* (2011a) 'DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 13(11), pp. 913–920. doi: 10.1097/GIM.0B013E3182368A0E.

Palomaki, G. E. *et al.* (2011b) 'DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 13(11), pp. 913–920. doi: 10.1097/GIM.0B013E3182368A0E.

Palomaki, G. E. *et al.* (2012a) 'DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 14(3), pp. 296–305. doi: 10.1038/GIM.2011.73.

Palomaki, G. E. *et al.* (2012b) 'DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 14(3), pp. 296–305. doi:

10.1038/GIM.2011.73.

Palomaki, G. E. *et al.* (2021) 'International Society for Prenatal Diagnosis Position Statement: cell free (cf)DNA screening for Down syndrome in multiple pregnancies', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1222–1232. doi: 10.1002/PD.5832.

Pareek, C. S., Smoczynski, R. and Tretyn, A. (2011) 'Sequencing technologies and genome sequencing', *Journal of applied genetics*, 52(4), pp. 413–435. doi: 10.1007/S13353-011-0057-X.

Pergament, E. *et al.* (2014) 'Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort', *Obstetrics and gynecology*, 124(2 Pt 1), pp. 210–218. doi: 10.1097/AOG.0000000000000363.

Pertile, M. D. *et al.* (2017) 'Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of feto-placental disease', *Science translational medicine*, 9(405). doi: 10.1126/SCITRANSLMED.AAN1240.

Peters, D. *et al.* (2011) 'Noninvasive prenatal diagnosis of a fetal microdeletion syndrome', *The New England journal of medicine*, 365(19), pp. 1847–1848. doi: 10.1056/NEJMC1106975.

Poon, L. C. Y. *et al.* (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(4), pp. 215–223. doi: 10.1159/000346806.

Poon, L. L. M. *et al.* (2000) 'Presence of fetal RNA in maternal plasma', *Clinical chemistry*, 46(11), pp. 1832–1834. doi: 10.1093/clinchem/46.11.1832.

Poon, L. L. M. *et al.* (2002) 'Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma', *Clinical Chemistry*, 48(1), pp. 35–41. doi: 10.1093/clinchem/48.1.35.

Pös, O., Budiš, J. and Szemes, T. (2019) 'Recent trends in prenatal genetic screening and testing [version 1; peer review: 2 approved]', *F1000Research*, 8. doi: 10.12688/F1000RESEARCH.16837.1/DOI.

Qu, J. Z. Z. *et al.* (2013) 'Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis', *Clinical Chemistry*, 59(2), pp. 427–435. doi:

10.1373/clinchem.2012.194068.

Ravitsky, V. *et al.* (2021a) 'The Emergence and Global Spread of Noninvasive Prenatal Testing', *Annual review of genomics and human genetics*, 22, pp. 309–338. doi: 10.1146/ANNUREV-GENOM-083118-015053.

Ravitsky, V. *et al.* (2021b) 'The Emergence and Global Spread of Noninvasive Prenatal Testing', *Annual review of genomics and human genetics*, 22, pp. 309–338. doi: 10.1146/ANNUREV-GENOM-083118-015053.

Renga, B. (2018) 'Non invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidy using cell free fetal DNA', *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 225, pp. 5–8. doi: 10.1016/J.EJOGRB.2018.03.033.

Di Renzo, G. C., Bartha, J. L. and Bilardo, C. M. (2019) 'Expanding the indications for cell-free DNA in the maternal circulation: clinical considerations and implications', *American journal of obstetrics and gynecology*, 220(6), pp. 537–542. doi: 10.1016/J.AJOG.2019.01.009.

Ronzoni, L. *et al.* (2021) 'Increased RISK for 47,XXY on cell-free DNA screen: Not always Klinefelter syndrome', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1255–1257. doi: 10.1002/PD.5890.

Samango-Sprouse, C. *et al.* (2013) 'SNP-based non-invasive prenatal testing detects sex chromosome aneuploidies with high accuracy', *Prenatal diagnosis*, 33(7), pp. 643–649. doi: 10.1002/PD.4159.

Samura, O. (2020) 'Update on noninvasive prenatal testing: A review based on current worldwide research', *The journal of obstetrics and gynaecology research*, 46(8), pp. 1246–1254. doi: 10.1111/JOG.14268.

Sanger, F. *et al.* (1973) 'Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage fl DNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(4), pp. 1209–1213. doi: 10.1073/PNAS.70.4.1209.

Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975) 'A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase', *Journal of molecular biology*, 94(3). doi: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.

Santorum, M. *et al.* (2017) 'Accuracy of first-trimester combined test in screening for trisomies 21, 18 and 13', *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 49(6), pp. 714–720. doi: 10.1002/UOG.17283.

Savva, G. M. *et al.* (2006) 'Maternal age-specific fetal loss rates in Down syndrome pregnancies', *Prenatal diagnosis*, 26(6), pp. 499–504. doi: 10.1002/PD.1443.

Sayres, L. C. *et al.* (2011) 'Cell-free fetal DNA testing: a pilot study of obstetric healthcare provider attitudes toward clinical implementation', *Prenatal diagnosis*, 31(11), pp. 1070–1076. doi: 10.1002/PD.2835.

Scheffer, P. G. *et al.* (2021) 'Association between low fetal fraction in cell-free DNA testing and adverse pregnancy outcome: A systematic review', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1287–1295. doi: 10.1002/PD.6028.

Schwarze, K. *et al.* (2020) 'The complete costs of genome sequencing: a microcosting study in cancer and rare diseases from a single center in the United Kingdom', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 22(1), pp. 85–94. doi: 10.1038/S41436-019-0618-7.

Scocchia, A. *et al.* (2019) 'Clinical whole genome sequencing as a first-tier test at a resource-limited dysmorphology clinic in Mexico', *NPJ genomic medicine*, 4(1). doi: 10.1038/S41525-018-0076-1.

Scott, F. *et al.* (2021) 'Concurrent maternal malignancy and fetal trisomy detected using genome-wide noninvasive prenatal screening', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1273–1276. doi: 10.1002/PD.6020.

Scott, F. P. *et al.* (2018) 'Factors affecting cell-free DNA fetal fraction and the consequences for test accuracy', *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 31(14), pp. 1865–1872. doi: 10.1080/14767058.2017.1330881.

Sedrak, M. *et al.* (2011) 'Use of free fetal DNA in prenatal noninvasive detection of fetal RhD

status and fetal gender by molecular analysis of maternal plasma', *Genetic testing and molecular biomarkers*, 15(9), pp. 627–631. doi: 10.1089/GTMB.2010.0263.

Sehnert, A. J. *et al.* (2011) 'Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood', *Clinical chemistry*, 57(7), pp. 1042–1049. doi: 10.1373/CLINCHEM.2011.165910.

Serapinas, D. *et al.* (2020) 'The Level of Free Fetal DNA as Precise Noninvasive Marker for Chromosomal Aneuploidies: First Results from BALTIC Region', *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(11), pp. 1–8. doi: 10.3390/MEDICINA56110579.

Shaffer, L. G. and Bui, T.-H. (2007) 'Molecular Cytogenetic and Rapid Aneuploidy Detection Methods in Prenatal Diagnosis', *American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)*, 145, pp. 87–98. doi: 10.1002/ajmg.c.30114.

Shah, V. C. and Smart, V. (1996) 'Human chromosome Y and SRY', *Cell biology international*, 20(1), pp. 3–6. doi: 10.1006/CBIR.1996.0002.

Shaw, J. *et al.* (2020) 'PREIMPLANTATION GENETIC TESTING: Non-invasive prenatal testing for aneuploidy, copy-number variants and single-gene disorders', *Reproduction (Cambridge, England)*, 160(5), pp. A1–A11. doi: 10.1530/REP-19-0591.

Shi, P. *et al.* (2021) 'The potential of expanded noninvasive prenatal screening for detection of microdeletion and microduplication syndromes', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1332–1342. doi: 10.1002/PD.6002.

Shree, R. *et al.* (2021) 'Low fetal fraction in obese women at first trimester cell-free DNA based prenatal screening is not accompanied by differences in total cell-free DNA', *Prenatal diagnosis*, 41(10), pp. 1277–1286. doi: 10.1002/PD.6023.

Skotko, B. G. *et al.* (2019) 'Adherence of cell-free DNA noninvasive prenatal screens to ACMG recommendations', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 21(10), pp. 2285–2292. doi: 10.1038/S41436-019-0485-2.

Skrzypek, H. and Hui, L. (2017a) 'Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy and single gene disorders', *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 42, pp. 26–38. doi: 10.1016/J.BPOBGYN.2017.02.007.

- Skrzypek, H. and Hui, L. (2017b) 'Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy and single gene disorders', *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 42, pp. 26–38. doi: 10.1016/J.BPOBGYN.2017.02.007.
- Smid, M. *et al.* (2003) 'No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy', *Human genetics*, 112(5–6), pp. 617–618. doi: 10.1007/S00439-003-0919-3.
- Soler, A. *et al.* (2017) 'E-Mail Overview of Chromosome Abnormalities in First Trimester Miscarriages: A Series of 1,011 Consecutive Chorionic Villi Sample Karyotypes'. doi: 10.1159/000477707.
- Sparks, A. B., Struble, C. A., *et al.* (2012a) '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), pp. 319.e1-319.e9. doi: 10.1016/J.AJOG.2012.01.030.
- Sparks, A. B., Struble, C. A., *et al.* (2012b) '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), pp. 319.e1-319.e9. doi: 10.1016/J.AJOG.2012.01.030.
- Sparks, A. B., Wang, E. T., *et al.* (2012) 'Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy', *Prenatal diagnosis*, 32(1), pp. 3–9. doi: 10.1002/PD.2922.
- Srinivasan, A. *et al.* (2013) 'Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma', *American journal of human genetics*, 92(2), pp. 167–176. doi: 10.1016/J.AJHG.2012.12.006.
- Stanghellini, I. *et al.* (2006) 'Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe', *Molecular human reproduction*, 12(9), pp. 587–591. doi: 10.1093/MOLEHR/GAL052.
- Strom, C. M. *et al.* (2017) 'Improving the Positive Predictive Value of Non-Invasive Prenatal Screening (NIPS)', *PloS one*, 12(3). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0167130.
- Suciu, I. D. *et al.* (2019) 'Non-Invasive Prenatal Testing beyond Trisomies', *Journal of medicine and life*, 12(3), pp. 221–224. doi: 10.25122/JML-2019-0053.

- Suzuki, M. M. and Bird, A. (2008) 'DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics', *Nature reviews. Genetics*, 9(6), pp. 465–476. doi: 10.1038/NRG2341.
- Suzumori, N. *et al.* (2016) 'Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy', *Journal of human genetics*, 61(7), pp. 647–652. doi: 10.1038/JHG.2016.25.
- Swanson, A., Sehnert, A. J. and Bhatt, S. (2013) 'Non-invasive Prenatal Testing: Technologies, Clinical Assays and Implementation Strategies for Women's Healthcare Practitioners', *Current genetic medicine reports*, 1(2), pp. 113–121. doi: 10.1007/S40142-013-0010-X.
- Syngelaki, A. *et al.* (2011) 'Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11-13 weeks', *Prenatal diagnosis*, 31(1), pp. 90–102. doi: 10.1002/PD.2642.
- Tabor, A. and Alfirevic, Z. (2010) 'Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques', *Fetal diagnosis and therapy*, 27(1), pp. 1–7. doi: 10.1159/000271995.
- Talkowski, M. E. *et al.* (2012) 'Clinical diagnosis by whole-genome sequencing of a prenatal sample', *The New England journal of medicine*, 367(23), pp. 2226–2232. doi: 10.1056/NEJMOA1208594.
- Taneja, P. A. *et al.* (2016) 'Noninvasive prenatal testing in the general obstetric population: clinical performance and counseling considerations in over 85 000 cases', *Prenatal diagnosis*, 36(3), pp. 237–243. doi: 10.1002/PD.4766.
- Taylor-Phillips, S., Freeman, K., Geppert, J., Agbebiyi, A., Uthman, Olalekan A, *et al.* (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, p. 10002. doi: 10.1136/bmjopen-2015.
- Taylor-Phillips, S., Freeman, K., Geppert, J., Agbebiyi, A., Uthman, Olalekan A., *et al.* (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). doi: 10.1136/BMJOPEN-2015-010002.
- Tong, Y. K. *et al.* (2006) 'Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations', *Clinical chemistry*, 52(12), pp. 2194–2202. doi: 10.1373/CLINCHEM.2006.076851.

- Tong, Y. K., Chiu, R. W. K., *et al.* (2010) 'Epigenetic-genetic chromosome dosage approach for fetal trisomy 21 detection using an autosomal genetic reference marker', *PloS one*, 5(12). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0015244.
- Tong, Y. K., Jin, S., *et al.* (2010) 'Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach', *Clinical chemistry*, 56(1), pp. 90–98. doi: 10.1373/CLINCHEM.2009.134114.
- Traeger-Synodinos, J. (2006) 'Real-time PCR for prenatal and preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases', *Molecular aspects of medicine*, 27(2–3), pp. 176–191. doi: 10.1016/J.MAM.2005.12.004.
- Tsui, N. B. Y. *et al.* (2014) 'Maternal plasma RNA sequencing for genome-wide transcriptomic profiling and identification of pregnancy-associated transcripts', *Clinical chemistry*, 60(7), pp. 954–962. doi: 10.1373/CLINCHEM.2014.221648.
- Vialard, F. *et al.* (2011) 'Prenatal BACs-on-BeadsTM: a new technology for rapid detection of aneuploidies and microdeletions in prenatal diagnosis', *Prenatal diagnosis*, 31(5), pp. 500–508. doi: 10.1002/PD.2727.
- Vora, N. L. *et al.* (2012) 'A multifactorial relationship exists between total circulating cell-free DNA levels and maternal BMI', *Prenatal diagnosis*, 32(9), pp. 912–914. doi: 10.1002/PD.3919.
- Wagner, A. J., Mitchell, M. E. and Tomita-Mitchell, A. (2014) 'Use of cell-free fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal screening', *Clinics in perinatology*, 41(4), pp. 957–966. doi: 10.1016/J.CLP.2014.08.013.
- Wang, E. *et al.* (2013) 'Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma', *Prenatal diagnosis*, 33(7), pp. 662–666. doi: 10.1002/PD.4119.
- Wang, Y. *et al.* (2014) 'Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing', *Clinical chemistry*, 60(1), pp. 251–259. doi: 10.1373/CLINCHEM.2013.215145.
- Wang, Y. *et al.* (2020) 'Cell-free DNA screening for sex chromosome aneuploidies by non-invasive prenatal testing in maternal plasma', *Molecular cytogenetics*, 13(1). doi: 10.1186/S13039-020-0478-5.

- Wapner, R. J. *et al.* (2015a) 'Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes', *American journal of obstetrics and gynecology*, 212(3), pp. 332.e1-332.e9. doi: 10.1016/J.AJOG.2014.11.041.
- Wapner, R. J. *et al.* (2015b) 'Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes', *American journal of obstetrics and gynecology*, 212(3), pp. 332.e1-332.e9. doi: 10.1016/J.AJOG.2014.11.041.
- Warsof, S. L., Larion, S. and Abuhamad, A. Z. (2015a) 'Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures', *Prenatal diagnosis*, 35(10), pp. 972–979. doi: 10.1002/PD.4601.
- Warsof, S. L., Larion, S. and Abuhamad, A. Z. (2015b) 'Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures', *Prenatal diagnosis*, 35(10), pp. 972–979. doi: 10.1002/PD.4601.
- Wataganara, T. *et al.* (2016) 'Debates on fetal fraction measurement and DNA-based noninvasive prenatal screening: time for standardisation?', *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 123 Suppl, pp. 31–35. doi: 10.1111/1471-0528.14197.
- Wong, F. C. K. and Lo, Y. M. D. (2016a) 'Prenatal Diagnosis Innovation: Genome Sequencing of Maternal Plasma', *Annual review of medicine*, 67, pp. 419–432. doi: 10.1146/ANNUREV-MED-091014-115715.
- Wong, F. C. K. and Lo, Y. M. D. (2016b) 'Prenatal Diagnosis Innovation: Genome Sequencing of Maternal Plasma', *Annual review of medicine*, 67, pp. 419–432. doi: 10.1146/ANNUREV-MED-091014-115715.
- Yaron, Y. (2016) 'The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon', *Prenatal diagnosis*, 36(5), pp. 391–396. doi: 10.1002/PD.4804.
- Ye, X. *et al.* (2021) 'Identification of copy number variants by NGS-based NIPT at low sequencing depth', *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 256, pp. 297–301. doi: 10.1016/J.EJOGRB.2020.11.026.
- Yu, S. C. Y. *et al.* (2013) 'Noninvasive prenatal molecular karyotyping from maternal plasma', *PloS one*, 8(4). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0060968.

Yu, S. C. Y. *et al.* (2014a) 'Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), pp. 8583–8588. doi: 10.1073/PNAS.1406103111.

Yu, S. C. Y. *et al.* (2014b) 'Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), pp. 8583–8588. doi: 10.1073/PNAS.1406103111.

Zhang, Y. *et al.* (2008) 'Effect of formaldehyde treatment on the recovery of cell-free fetal DNA from maternal plasma at different processing times', *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 397(1–2), pp. 60–64. doi: 10.1016/J.CCA.2008.07.017.

Zheng, Y. *et al.* (2020) 'Clinical experience regarding the accuracy of NIPT in the detection of sex chromosome abnormality', *The journal of gene medicine*, 22(8). doi: 10.1002/JGM.3199.

Zhong, X. Y., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2002) 'The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia', *Hypertension in pregnancy*, 21(1), pp. 77–83. doi: 10.1081/PRG-120002911.

Zhou, X. *et al.* (2017) 'Contribution of maternal copy number variations to false-positive fetal trisomies detected by noninvasive prenatal testing', *Prenatal diagnosis*, 37(4), pp. 318–322. doi: 10.1002/PD.5014.

Zhou, Y. *et al.* (2015) 'Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma', *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 22(11), pp. 1429–1435. doi: 10.1177/1933719115584445.

Zimmermann, B. *et al.* (2012) 'Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci', *Prenatal diagnosis*, 32(13), pp. 1233–1241. doi: 10.1002/PD.3993.