

# Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος από cfDNA: Τεχνικά προβλήματα και μέθοδοι μοριακής ανάλυσης

Τούντα Γεωργία<sup>1,2</sup>, Κολιαλέξη Αγγελική<sup>1,2</sup>, Μαύρου Αριάδνη<sup>1</sup>, Περγαλιώτης Βασίλειος<sup>1</sup>, Παπαντωνίου Νικόλαος<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Γ<sup>ο</sup> Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών

<sup>2</sup> Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής

Αλληλογραφία: Αγγελική Κολιαλέξη, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,  
Θηβών και Λεβαδείας, Τ.Κ 115 27, Γουδή  
E-mail: akolial@med.uoa.gr, Τηλ: 2107467462

## Περίληψη

Η διαπίστωση της παρουσίας ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cell free fetal DNA-cffDNA) στο περιφερικό αίμα της εγκύου έδωσε νέες δυνατότητες ανάπτυξης τεχνικών μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου. Μέχρι σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός μελετών που επικεντρώνεται στο σχεδιασμό και την αξιολόγηση μεθόδων συλλογής και διαχείρισης των δειγμάτων, πρωτόκολλα απομόνωσης του cffDNA που απομονώνεται από το περιφερικό αίμα της εγκύου και μοριακής ανάλυσης. Η ανίχνευση του cffDNA στη μητρική κυκλοφορία είναι εφικτή από τις πρώτες κιόλας εβδομάδες της κύησης. Προέρχεται από τα αποπίπτοντα κύτταρα του πλακούντα και αποτελεί το 3-6% του συνολικού cfDNA στο μητρικό αίμα. Αυτή η μικρή ποσοτική αναλογία σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη ύπαρξη μητρικού cfDNA αυξάνει τις τεχνικές δυσκολίες στην προσπάθεια ανίχνευσης των γενετικών προβλημάτων. Τα τελευταία χρόνια η εφαρμογή μοριακών τεχνικών υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας, όπως είναι η ψηφιακή PCR και τα συστήματα αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS), έχει επιλύσει πολλά από τα προβλήματα στη χρήση του cffDNA. Έτσι σήμερα ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος του φύλου, του συστήματος RhD, των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και ορισμένων μονογονιδιακών νοσημάτων του εμβρύου εφαρμόζεται με επιτυχία στην κλινική πράξη. Στόχος αυτής της βιβλιογραφικής ανασκόπησης είναι η παρουσίαση των μεθόδων μοριακής ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας κατά τη διενέργεια προγεννητικού ελέγχου από cffDNA.

Λέξεις κλειδιά: cffDNA, PCR, RTQ-PCR, digital PCR, NGS

## Εισαγωγή

Ο προγεννητικός έλεγχος χρωμοσωμικών και άλλων γενετικών ανωμαλιών του εμβρύου αποτελεί απαραίτητο τμήμα της καθημερινής μαιευτικής πράξης. Για την πραγματοποίηση του απαιτείται ανάλυση γενετικού υλικού του εμβρύου που λαμβάνεται με επεμβατικές μεθόδους όπως η αμνιοπαράκντηση και η βιοψία τροφοβλάστης. Παρά το ότι η ακρίβεια της προγεννητικής διάγνωσης που εξασφαλίζεται με αυτό τον τρόπο είναι μεγάλη, η χρησιμοποίηση επεμβατικών τεχνικών έχει 0.5-1.0% κίνδυνο για το έμβryo και την κύηση αν και τελευταίες μελέτες δείχνουν σαφώς μικρότερο κίνδυνο<sup>1</sup>. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια αναζητούνται εναλλακτικοί, μη επεμβατικοί τρόποι λήψης βιολογικού υλικού από το έμβryo για προγεννητικό έλεγχο.

Η διαπίστωση της παρουσίας ελεύθερων νουκλεϊνικών οξέων εμβρυϊκής προέλευσης στο περιφερικό αίμα της εγκύου έδωσε νέες δυνατότητες ανάπτυξης μη επεμβατικών τεχνικών προγεννητικού ελέγχου.

## Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στη μητρική κυκλοφορία

Ο όρος ελεύθερο νουκλεϊνικό οξύ (ελεύθερο εξωκυτταρικό DNA-cfDNA ή ελεύθερο εξωκυτταρικό RNA-cfRNA) στο περιφερικό αίμα, αναφέρεται σε εξωκυτταρικά μόρια DNA ή RNA, τα οποία ανιχνεύονται στο πλάσμα ή στον ορό δηλαδή σε μη κυτταρικό κλάσμα του περιφερικού αίματος.

Το 1997 ο Lo και συν. διαπίστωσαν την παρουσία ελεύθερου

DNA εμβρυϊκής προέλευσης (cell free fetal DNA-cffDNA) στον ορό και το πλάσμα εγκύων που κυοφορούσαν έμβryo αγόρι, με ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y<sup>2</sup>. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από άλλες επιστημονικές ομάδες<sup>3-5</sup>.

Το cffDNA ανιχνεύεται στη μητρική κυκλοφορία πολύ νωρίς κατά την κύηση (έχει ανιχνευθεί ακόμη και την 18η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά, σε περιστατικά υποβοηθούμενης αναπαραγωγής) και προέρχεται κυρίως από απόπτωση κυττάρων του πλακούντα<sup>6,7</sup>. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι αλληλουχίες mRNA, ειδικές του πλακούντα, ανευρίσκονται στο πλάσμα εγκύων ήδη από το 1ο τρίμηνο της κύησης. Επίσης υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του cffDNA και της β-χοριακής γοναδοτροπίνης στο ίδιο δείγμα<sup>4,6,8,9</sup>.

Το cffDNA αντιπροσωπεύει κατά μέσο όρο ποσοστό 3% (εύρος 0.4-12%) έως 6% (εύρος 2.3-11.5%) του συνολικού cfDNA το 1ο και το 3ο τρίμηνο της κύησης, αντιστοίχως όπως διαπιστώθηκε με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Quantitative PCR, RTQ-PCR)<sup>10</sup>. Νέότερες όμως μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν πιο ευαίσθητες τεχνικές (digital PCR), έδειξαν ότι η πραγματική συγκέντρωση cffDNA στη μητρική κυκλοφορία είναι μεγαλύτερη από αυτή που είχε αρχικά υπολογιστεί και ανέρχεται σε 10% του συνολικού cfDNA κατά το 1ο τρίμηνο

της κύησης<sup>11</sup>. Η απόλυτη ποσότητα του cffDNA αυξάνει σημαντικά με την πρόοδο της κύησης, επηρεάζεται από το σωματικό βάρος της εγκύου και ποικίλει μεταξύ των εθνοικιοτήτων<sup>12, 13</sup>. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του cffDNA στη μητρική κυκλοφορία είναι περίπου 16.3 λεπτά και η απομάκρυνσή του από το πλάσμα εγκύου πραγματοποιείται αμέσως μετά τον τοκετό<sup>3, 4, 10, 14, 15</sup>.

Στο περιφερικό αίμα της εγκύου, το cffDNA ανιχνεύεται υπό μορφή θραυσμάτων μεγέθους μικρότερο από 200bp και στην πλειοψηφία τους έχουν μέγεθος μικρότερο από το μητρικό<sup>6, 7</sup>. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε με τη χρήση συστημάτων αλληλούχησης νέας γενιάς [next-generation sequencing (NGS)]<sup>16</sup>.

### Τεχνικά προβλήματα κατά τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο από cfDNA

Η δυσκολία πραγματοποίησης μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου από cffDNA που απομονώνεται από τη μητρική κυκλοφορία οφείλεται κυρίως στη μικρή του ποσότητα στο πλάσμα της εγκύου, στην ταυτόχρονη παρουσία μητρικής προέλευσης cfDNA και το μικρό ποσοστό του cffDNA σε σχέση με το μητρικό (1:10), στις ατομικές διαφορές που παρατηρούνται όσον αφορά τη συγκέντρωση του ολικού cfDNA και τις ομοιότητες του εμβρυϊκού με το μητρικό γενετικό υλικό, αφού το έμβρυο κληρονομεί το μισό γενετικό υλικό από τη μητέρα του<sup>17</sup>. Μέχρι σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός μελετών προκειμένου να επιλυθούν τα προβλήματα αυτά και να εφαρμοστεί συστηματικά μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος σε κλινικό επίπεδο. Οι μελέτες επικεντρώνονται στο σχεδιασμό και την αξιολόγηση μεθόδων συλλογής και διαχείρισης των δειγμάτων, πρωτόκολλα απομόνωσης και μοριακής ανάλυσης και τρόπους επιβεβαίωσης της παρουσίας cffDNA στο υπό μελέτη δείγμα για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων<sup>18</sup>.

Πριν από την εφαρμογή οποιασδήποτε διαδικασίας μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου είναι πολύ σημαντικός ο ενδελεχής υπερηχογραφικός έλεγχος προκειμένου να διευκρινιστεί η παρουσία ή όχι πολύδυμης κύησης, να καθοριστεί ο αριθμός των βιώσιμων εμβρύων και να αποκλειστεί η πιθανότητα κενού εμβρυϊκού σάκου (vanishing twin)<sup>19</sup>. Η παρουσία πολύδυμης κύησης περιπλέκει τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Επίσης πλακούντας ακόμη κι από κενό εμβρυϊκό σάκο εξακολουθεί να απελευθερώνει cffDNA στη μητρική κυκλοφορία, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή αποτελέσματα.

### Συλλογή και προετοιμασία δείγματος

Πολλοί παράγοντες που σχετίζονται με τη συλλογή και την προετοιμασία του δείγματος έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζουν τη σχέση μητρικού/εμβρυϊκού cfDNA στο δείγμα. Ελαττωμένη συγκέντρωση μητρικού cfDNA διευκολύνει την ανίχνευση αλληλουχιών εμβρυϊκής προέλευσης και αυξάνει την ευαισθησία της διάγνωσης.

Το cffDNA μπορεί να απομονωθεί από το πλάσμα ή τον ορό του περιφερικού αίματος της εγκύου, στις περισσότερες μελέτες όμως προτιμάται η χρησιμοποίηση πλάσματος επειδή το ποσοστό του cfDNA μητρικής προέλευσης στον ορό είναι μεγαλύτερο σε σχέση με το πλάσμα πιθανώς λόγω της απελευθέρωσής του από κύτταρα της μητέρας κατά τη δημιουργία του θρόμβου<sup>10, 20</sup>.

Η συλλογή του δείγματος γίνεται σε σωληνάκια με διάφορους τύπους αντιπηκτικών όπως αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό

οξύ (EDTA), ηπαρίνη και κιτρικά άλατα προκειμένου να διατηρηθούν μέχρι τη μεταφορά στο εργαστήριο. Τα δείγματα στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί EDTA, μετά την πάροδο 24 ωρών παρουσιάζουν τις μικρότερες αποκλίσεις όσον αφορά τη συγκέντρωση του cfDNA για αυτό και το EDTA αποτελεί το αντιπηκτικό επιλογής, καθώς έχει την ικανότητα να προστατεύει τη μεμβράνη των λευκοκυττάρων και να εμποδίζει τη λύση τους<sup>18, 21</sup>.

Σημαντική παράμετρος επίσης είναι ο χρόνος που μεσολαβεί από την αιμοληψία μέχρι την απομόνωση του πλάσματος. Πολύωρη παραμονή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του cfDNA μητρικής προέλευσης λόγω λύσης των κυττάρων του περιφερικού αίματος ενώ η απόλυτη ποσότητα cffDNA παραμένει σταθερή<sup>22</sup>. Όταν ο χρόνος που μεσολαβεί από την αιμοληψία μέχρι την επεξεργασία του δείγματος ξεπερνά τις 8 ώρες, θεωρείται απαραίτητη η συλλογή και η μεταφορά του αίματος σε σωληνάκια με σταθεροποιητικούς παράγοντες που εμποδίζουν τη λύση των κυττάρων [π.χ. cfDNA BCT tubes (StreckTM)]<sup>23, 24</sup>. Το πλάσμα απομονώνεται με 2 διαδοχικές φυγοκεντρώσεις, έτσι ώστε να απομακρυνθούν όλα τα κυτταρικά υπολείμματα. Η μέθοδος απομόνωσης του cfDNA από το πλάσμα εγκύου επηρεάζει άμεσα την ποσότητα αλλά και την ποιότητα του εμβρυϊκού γενετικού υλικού στο δείγμα. Είναι σημαντικό να γίνεται με λεπτούς χειρισμούς και να επικρατούν στείρες συνθήκες έτσι ώστε να αποφευχθεί τυχόν εξωτερική επιμόλυνση<sup>25</sup>. Σήμερα, υπάρχουν ειδικά εμπορικά διαθέσιμα συστήματα (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, Qiagen), τα οποία διευκολύνουν την απομόνωση cfDNA από περιφερικό αίμα εγκύου. Αυτά δίνουν τη δυνατότητα χρησιμοποίησης μεγάλου όγκου πλάσματος (έως 5ml) και ανάκτησης ικανοποιητικής ποσότητας και ποιότητας cffDNA παρά τη μικρή του συγκέντρωση, ειδικά κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης όταν και ο προγεννητικός έλεγχος είναι πιο επιθυμητός.

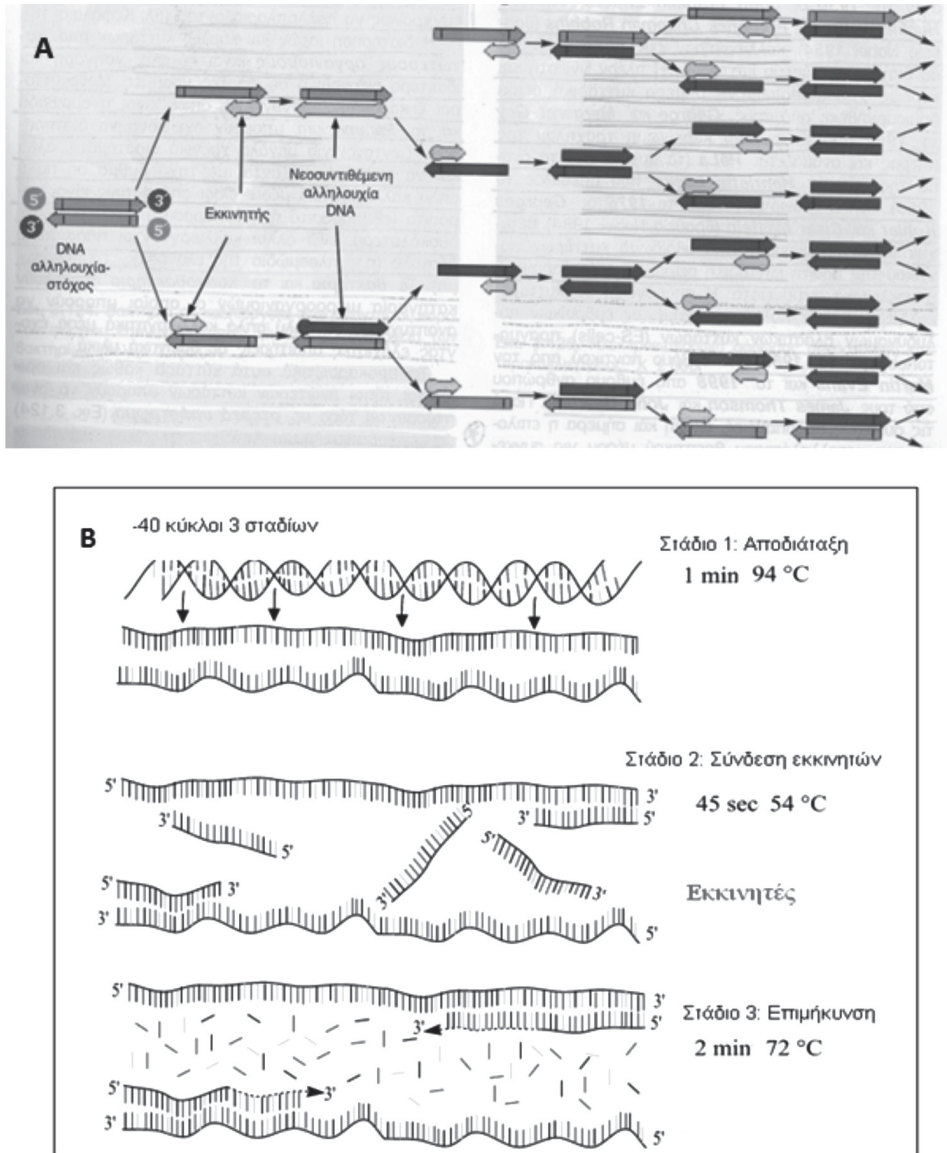
### Τεχνικές μοριακής ανάλυσης cfDNA

Έχει διερευνηθεί η καταλληλότητα μεγάλου αριθμού μεθόδων για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο γενετικών διαταραχών του εμβρύου. Η μικρή συγκέντρωση cffDNA στο περιφερικό αίμα εγκύου και η ταυτόχρονη παρουσία μητρικών αλληλουχιών, απαιτεί τη χρησιμοποίηση τεχνικών υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας, με το μικρότερο δυνατό κίνδυνο εξωτερικής επιμόλυνσης του δείγματος.

#### • Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική PCR έχει χρησιμοποιηθεί στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο για την ανίχνευση πατρικής προέλευσης αλληλουχιών, σημειακών μεταλλάξεων, διπλασιασμών ή ελλειμμάτων που απουσιάζουν από το γονιδίωμα της μητέρας<sup>26, 27</sup>.

Η μέθοδος επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση (amplification) ενός μικρού τμήματος DNA μέχρι και 106 φορές σε λίγες μόνο ώρες. Στηρίζεται στη δυνατότητα του ενζύμου Taq (από τον μικροοργανισμό *Thermus Aquaticus* από τον οποίο απομονώθηκε) DNA πολυμεράση, να συνθέτει, παρουσία κατάλληλων συνθηκών, την συμπληρωματική αλυσίδα ενός τμήματος DNA με κατεύθυνση 5α προς 3α, έχοντας ως οδηγό την αλυσίδα μήτρα. Ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA με την τεχνική του PCR πραγματοποιείται μόνο παρουσία συνθετικών τμημάτων DNA μήκους περίπου 15-30 βάσεων που δρουν ως εκκινητές. Οι εκκινητές είναι απόλυτα εξειδικευμένοι και



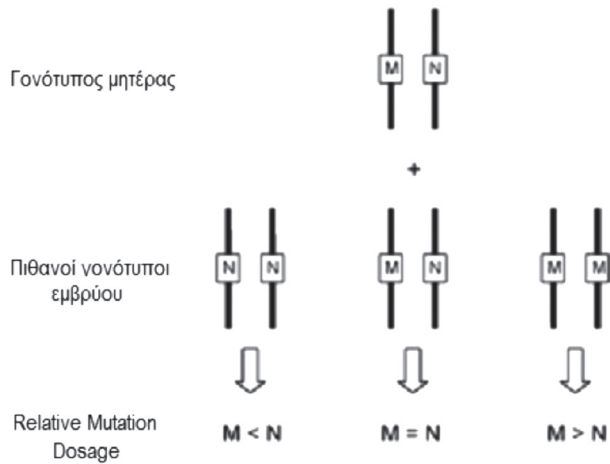
**Εικόνα 1.** Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR): A. Επιλεκτική σύνθεση αλληλουχιών DNA σε πολλαπλά αντίγραφα και B. Στάδια της αντίδρασης: 1. Στάδιο αποδιάταξης 2. Στάδιο σύνδεσης των εκκινητών 3. Στάδιο της επιμήκυνσης.

σχεδιάζονται έτσι ώστε να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα με τα 3α άκρα των δύο αλυσίδων της ορισμένης αλληλουχίας DNA μήτρας (Εικόνα 1A). Η τεχνική PCR περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA και καταστροφής των πιθανώς υπαρχόντων ενδονουκλεασών, το στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο και τέλος το στάδιο της επιμήκυνσης (Εικόνα 1B). Τα στάδια αυτά αποτελούν ένα κύκλο της αντίδρασης και συνήθως επαναλαμβάνονται 25-40 φορές (25-40 κύκλοι). Στο τέλος κάθε κύκλου, το προϊόν της επιμήκυνσης κάθε εκκινητή αποτελεί, μετά από αποδιάταξη, το υπόστρωμα για τους εκκινητές στον επόμενο κύκλο της αντίδρασης. Η αλληλουχία στόχος που πολλαπλασιάζεται διαχωρίζεται είτε βάσει μεγέθους, είτε με την ανίχνευση φθορισμού, είτε με απευθείας αλληλούχηση. Η εφαρμογή αυτών των μεθόδων στην κλινική πράξη όμως δεν είναι πάντα εύκολη. Όταν η ανάλυση των προϊόντων της PCR πραγματοποιείται σε gel αγαρόζης, η ευαισθησία της τεχνικής είναι χαμηλή, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι σε μεγάλο βαθμό υποκειμενική και ο κίνδυνος εξωτερικής επιμόλυνσης μεγάλος.

- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Quantitative PCR, RTQ-PCR)

Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της διάγνωσης, πολλά εργαστήρια που ασχολούνται με τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο έχουν υιοθετήσει ως μέθοδο επιλογής την RTQ-PCR<sup>30</sup>. Η RTQ-PCR βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του φθορισμού που εκπέμπεται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης και ο οποίος είναι ανάλογος των παραγόμενων προϊόντων. Τα προϊόντα πολλαπλασιασμού αναλύονται σε πραγματικό χρόνο, όπως συντίθενται σε κάθε κύκλο, και δεν απαιτείται καμία περαιτέρω πειραματική διαδικασία. Η τεχνική επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των αλληλουχιών που πολλαπλασιάζονται σε σύγκριση με προϊόντα αναφοράς γνωστής συγκέντρωσης, παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια και συνδυάζει ταχύτητα και ευαισθησία στην ανάλυση ακόμη και σε περιπτώσεις όπου ο αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου είναι πολύ μικρός. Επιπλέον, το γεγονός ότι το σύστημα είναι κλειστό βοηθάει στην αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων<sup>31</sup>.





**Εικόνα 2.** Υπολογισμός RMD για τον καθορισμό του εμβρυϊκού γονότυπου. M: παθολογικό αλληλόμορφο. N: φυσιολογικό αλληλόμορφο.

Σημαντικό πρόβλημα κατά τον σχεδιασμό μεθόδων επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου προκύπτει από το μικρό μέγεθος των θραυσμάτων του cfDNA στο περιφερικό αίμα της εγκύου. Οι μέθοδοι πρέπει να σχεδιάζονται με τρόπο ώστε τα τμήματα DNA που πολλαπλασιάζονται να έχουν μέγεθος μικρότερο από τα 150bp. Αυτό μπορεί είναι εφικτό να επιτευχθεί μόνο σε περιπτώσεις ανίχνευσης στο περιφερικό αίμα της εγκύου αλληλουχιών πατρικής προέλευσης όπως κατά τον ΠΕ του RhD, του φύλου και σημειακών μεταλλάξεων του εμβρύου. Αντίθετα, σε νοσήματα που οφείλονται σε επέκταση τρινουκλεοτιδίων όπως το σύνδρομο εύθραυστου X και η νόσος Huntington οι αλληλουχίες των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων που μελετώνται μπορεί να έχουν μέγεθος έως και >1kb και δεν είναι εύκολο να ανιχνευτούν. Στις περιπτώσεις αυτές το πρόβλημα μπορεί ίσως να ξεπεραστεί με έμμεσο έλεγχο της κληρονομής του χρωμοσώματος που φέρει τη μετάλλαξη, με εκτεταμένη ανάλυση απλοτύπων μικρού μεγέθους<sup>28, 29</sup>.

Οι τεχνικές PCR και RTQ PCR χρησιμοποιούνται σε κλινικό επίπεδο για την ανίχνευση στο περιφερικό αίμα της εγκύου πατρικής προέλευσης αλληλουχιών, κατά τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο του φύλου και του συστήματος RhD του εμβρύου καθώς και μονογονιδιακών νοσημάτων. Στα νοσήματα που κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατητικό τρόπο, η προσέγγιση αυτή μπορεί να εφαρμοστεί όταν η παθολογική μετάλλαξη είναι πατρικής προέλευσης. Στην κλινική πράξη, μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση έχει πραγματοποιηθεί για τη νόσο Huntington, την αχονδροπλασία και τη μυοτονική δυστροφία<sup>30-34</sup>.

Στην μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων που κληρονομούνται με υπολειπόμενο αυτοσωμικό τρόπο, το cfDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προγεννητικό έλεγχο όταν οι γονείς είναι φορείς διαφορετικών μεταλλάξεων και το έμβρυο πιθανός διπλός ετεροζυγώτης. Στην περίπτωση αυτή η πληροφορία μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου όταν η πατρική μετάλλαξη δεν ανιχνευθεί και έτσι να ελαττωθεί ο αριθμός των κηρύσεων που υποβάλλονται σε επεμβατικές δοκιμασίες προγεννητικού ελέγχου. Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων που κληρο-

νομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο έχει πραγματοποιηθεί για την κυστική ίνωση, την συγγενή υπερχλωμία των επινεφριδίων και διάφορους τύπους αιμοσφαιρινοπαθειών<sup>35-37</sup>. Σε ότι αφορά στις αιμοσφαιρινοπάθειες, με τη χρήση του cfDNA έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις πατρικής προέλευσης που προκαλούν β-θαλασσαιμία, αναιμία Hb Lepore και δρεπανοκυτταρική αναιμία<sup>37-39</sup>.

**Επιβεβαίωση παρουσίας εμβρυϊκού υλικού στο δείγμα και ποσοτικοποίηση του cfDNA**

Σημαντικό πρόβλημα στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο από cfDNA αποτελεί η έλλειψη ενός πολύ ειδικού δείκτη που να επιβεβαιώνει την παρουσία εμβρυϊκού υλικού στο δείγμα. Σε περιπτώσεις όπως είναι ο έλεγχος του RhD, του φύλου και μονογονιδιακών νοσημάτων του εμβρύου, απαιτείται η ανίχνευση πατρικής προέλευσης (ή de novo) αλληλομόρφων που απουσιάζουν από το γονιδίωμα της μητέρας. Όταν η πατρικής προέλευσης αλληλουχία δεν ανιχνεύεται, η παρουσία εμβρυϊκών δεικτών, δηλαδή διαφορών μεταξύ μητρικού και εμβρυϊκού γενετικού υλικού, συμβάλλουν στην αποφυγή αμφίβολων ή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που οφείλονται είτε σε επίπεδα cfDNA μικρότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, ή σε πλήρη έλλειψη εμβρυϊκού υλικού. Αμφίβολα αποτελέσματα μπορούν να επηρεάσουν την απόφαση των γονέων και των μαιευτήρων για τη παρακολούθηση και συνέχιση της κύησης και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να αυξηθεί κατά το δυνατόν η ευαισθησία και η ειδικότητα της διάγνωσης<sup>40</sup>.

Οι εμβρυϊκοί δείκτες πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να ενσωματωθούν στη διαγνωστική διαδικασία και να χρησιμοποιηθούν, παράλληλα με τις υπό μελέτη αλληλουχίες ως θετικοί μάρτυρες (controls) για να ελεγχθεί η παρουσία του cfDNA. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν αλληλουχίες του χρωμοσώματος Y, οι οποίες είναι προφανές ότι απουσιάζουν από το γονιδίωμα της μητέρας, έχουν όμως πρακτική εφαρμογή μόνο σε κηρύσεις με έμβρυο αγόρι. Αλληλουχίες των γονιδίων SRY και DYS14, έχουν χρησιμοποιηθεί για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο του φύλου του εμβρύου, για την ποσοτικοποίηση και την επιβεβαίωση της παρουσίας του cfDNA στο δείγμα. Το γεγονός ότι το DYS14 υπάρχει σε πολλαπλά αντίγραφα καθιστά την ανίχνευσή του ευαίσθητη ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις cfDNA, ταυτόχρονα όμως κάνει τη χρήση του ακατάλληλη για ποσοτικοποίηση του εμβρυϊκού DNA<sup>41</sup>. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι το DYS14 μπορεί να ανιχνευτεί σε μικρές ποσότητες ακόμη και σε δείγματα με έμβρυο κορίτσι, συνεπώς προτιμάται η ταυτόχρονη χρήση και άλλων αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y στον μη επεμβατικό προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου<sup>42</sup>.

Πολυμορφισμοί πατρικής προέλευσης που απουσιάζουν από τη μητέρα μπορούν να αποτελέσουν εμβρυϊκούς δείκτες ανεξάρτητους από το φύλο του εμβρύου και νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί μιας βάσης (SNPs), σημειακές μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί τμημάτων του DNA όπως οι STR αλληλουχίες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την επιβεβαίωση της παρουσίας εμβρυϊκού υλικού στο υπό μελέτη δείγμα<sup>43-48</sup>. Οι δείκτες αυτοί όμως δεν είναι πάντα πληροφοριακοί και η διαδικασία ανίχνευσής τους είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση, ακετυλίωση, κτλ.) προκαλούν αλλαγές στο φαινότυπο χωρίς όμως να μεταβάλλουν την αλληλουχία του DNA. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπο-

ρούν να ανιχνευθούν είτε μετά από χημική τροποποίηση κατά την οποία οι μη μεθυλωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες, ενώ οι μεθυλωμένες παραμένουν άθικτες, είτε με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων ευαίσθητων στη μεθυλίωση τα οποία κόβουν και απομακρύνουν αποκλειστικά τις μη μεθυλωμένες αλληλουχίες. Ένας τέτοιος επιγενετικός εμβρυϊκός δείκτης είναι ο υποκινητής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου RASSF1A, στη χρωμοσωμική θέση 3p21.31 που είναι μεθυλωμένος στον πλακούντα και μη μεθυλωμένος στα κύτταρα της μητέρας<sup>26, 27, 49-52</sup>. Το RASSF1A χρησιμοποιείται επιτυχώς για την ποσοτικοποίηση του cfDNA, την επιβεβαίωση της παρουσίας εμβρυϊκού υλικού στο υπο μελέτη δείγμα και την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που συνήθως οφείλονται στη χαμηλή συγκέντρωση εμβρυϊκού υλικού στο πλάσμα της εγκύου.

• Ψηφιακό (Digital PCR)

Τα τελευταία χρόνια έχει χρησιμοποιηθεί στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο το Ψηφιακό (Digital PCR). Πρόκειται για μια πολύ ευαίσθητη τεχνική ποσοτικού PCR που επιτρέπει την ανίχνευση αλληλομόρφων πολύ μικρής συγκέντρωσης στο δείγμα και την απόλυτη ποσοτικοποίηση τους χωρίς την ανάγκη χρησιμοποίησης προϊόντων αναφοράς. Το αρχικό δείγμα αραιώνεται και χωρίζεται σε μεγάλο αριθμό αντιδράσεων ποσοτικού PCR από τις οποίες κάποιες περιέχουν την αλληλουχία στόχο, σε ένα κατά μέσο όρο αντίγραφο, και κάποιες όχι. Η αναλογία θετικών και αρνητικών για την αλληλουχία στόχο αντιδράσεων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής της στο αρχικό δείγμα. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το υψηλό κόστος του εξοπλισμού και των αντιδραστηρίων, το οποίο όμως μπορεί να ελαττωθεί με την ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

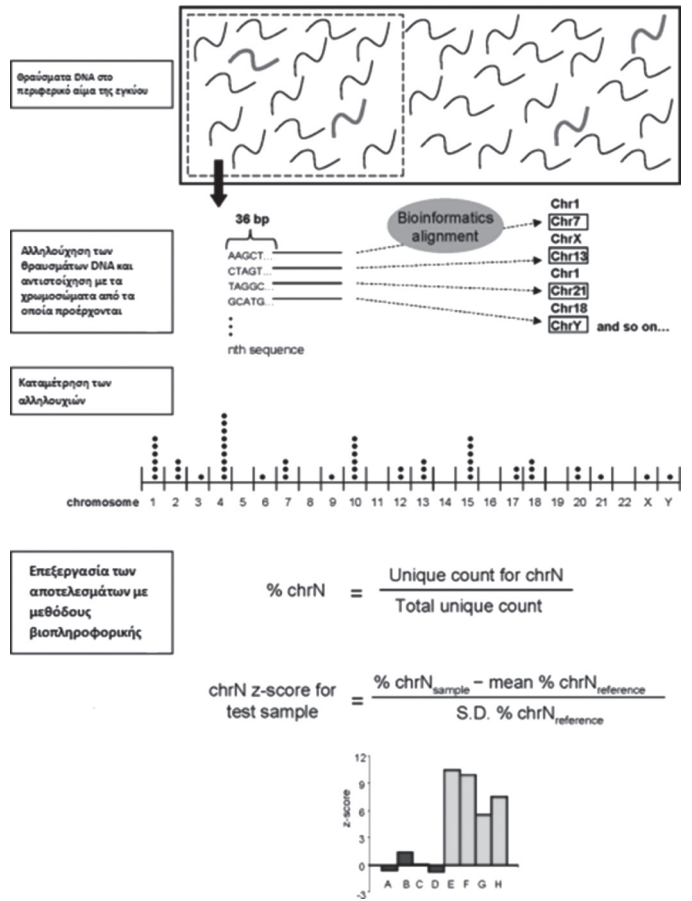
Εξέλιξη του Digital PCR αποτελεί το Droplet Digital PCR (ddPCR). Με τη χρήση των συστημάτων ddPCR το αρχικό δείγμα χωρίζεται σε εκατομμύρια σταγονίδια (droplets). Κάθε σταγονίδιο περιέχει τους ειδικούς για την αλληλουχία στόχο φθορίζοντες ανιχνευτές για την αντίδραση ποσοτικού PCR και το δείγμα σε συγκέντρωση μικρότερη από ένα γενετικό ισοδύναμο ανά σταγονίδιο (< 1genome equivalent / droplet). Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση αλληλομόρφων που βρίσκονται ακόμη και σε 1 αντίγραφο / 250.0000 συνολικά αντίγραφα αρχικού δείγματος.

Μετά την εφαρμογή του Digital PCR ακολουθεί στατιστική ανάλυση της σχετικής αναλογίας της υπό μελέτη αλληλουχίας [relative mutation dosage (RMD) analysis] στο δείγμα. Η ανάλυση RMD δίνει τη δυνατότητα μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου μονογονιδιακών νοσημάτων ακόμη και όταν ο πατέρας και η μητέρα φέρουν την ίδια μετάλλαξη με υπολογισμό της αναλογίας των αλληλομόρφων (Εικόνα 2).

Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο και μονογονιδιακών νοσημάτων του εμβρύου όπως η β-μεσογειακή αναιμία, η δρεπανοκυτταρική αναιμία και η αιμορροφιλία<sup>53-57</sup>. Το Digital PCR υπερτερεί του RTQ-PCR σε ευαισθησία και ειδικότητα.

• Συστήματα αλληλούχισης νέας γενιάς (Next-Generation Sequencing)

Τα συστήματα αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) επιτρέπουν την ταυτόχρονη αλληλούχιση ενός πολύ μεγάλου αριθμού μορίων DNA. Η αλληλούχιση μπορεί να αφορά είτε ολόκληρο το



Εικόνα 3. Χρήση των συστημάτων NGS στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο.

γονιδίωμα (genome-wide) ή να είναι στοχευμένη (targeted). Σε κάθε εφαρμογή, παράγονται εκατομμύρια έως δισεκατομμύρια μικρά τμήματα γενομικού υλικού και κάθε τμήμα πολλαπλασιάζεται, αναλύεται η αλληλουχία του και ποσοτικοποιείται (Εικόνα 3). Ο μεγάλος όγκος δεδομένων που προκύπτει αξιολογείται στη συνέχεια με χρήση βιοπληροφορικών συστημάτων.

Η μέθοδος παρουσιάζει πολύ μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Κάθε αλληλουχία αναλύεται πολλαπλά και σε αντίθεση με το Digital PCR δεν απαιτούνται διαφορετικοί εκκινητές και ανιχνευτές για κάθε αλληλουχία στόχο. Η μεγάλη ευαισθησία, η αξιοπιστία και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων των συστημάτων NGS, τα καθιστά κατάλληλα για αξιοποίηση στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο, δίνοντας τη δυνατότητα σε πολλές πειραματικές διαδικασίες να εφαρμοστούν στην κλινική πράξη<sup>29</sup>.

Το 2008, δύο ανεξάρτητες μελέτες έδειξαν ότι η ανευπλοειδία του εμβρύου μπορεί να αναγνωριστεί με την αλληλούχιση και αντιστοίχιση μικρών θραυσμάτων DNA μεγέθους 36bp σε σχέση με DNA αναφοράς ολόκληρου του γονιδιώματος. Η πρόοδος που ακολούθησε ήταν ραγδαία. Από τον Ιανουάριο του 2011 τουλάχιστον δέκα ανεξάρτητες μεγάλες μελέτες έχουν δημοσιευτεί και αφορούν την ανίχνευση των τρισωμιών 21, 18, 13 και χρωμοσωμάτων του φύλου.

Με τη χρήση των NGS έγινε πραγματικότητα ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος των χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου με ποσοτικοποίηση, στο περιφερικό αίμα της εγκύου, των αλληλουχιών των χρωμοσωμάτων που ευθύνονται για τις πιο συχνές ανευπλοειδίες<sup>58-68</sup>.

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι η τρισωμία 21 μπορεί να διαγνωστεί με ευαισθησία που ξεπερνά το 95% και ακρίβεια που αγγίζει το 97-99%<sup>61, 64, 66, 69-71</sup>. Αντίθετα, για τον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο των τρισωμιών 13, 18 και των πιο κοινών ανωμαλιών των φυλετικών χρωμοσωμάτων (XO, XXX, XXY), η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου είναι λίγο μικρότερη<sup>72</sup>. Με τη χρήση όμως των αλγορίθμων στην ανάλυση των αποτελεσμάτων, είναι εφικτός ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος και για αυτές τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες<sup>58-60, 63, 73</sup>.

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου που βασίζεται στη χρήση των συστημάτων NGS, εφαρμόζεται στην κλινική πράξη από το 2011 σε αρκετές χώρες της Βόρειας Αμερικής, της Ασίας και της Ευρώπης.

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος από ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στη μητρική κυκλοφορία με συστήματα αλληλούχησης νέας γενιάς έχει αρχίσει να ενσωματώνεται στον προγεννητικό έλεγχο αρχικά ως μέθοδος πληθυσμιακού ελέγχου. Ως αποτέλεσμα προέκυψε η ανάγκη εκτίμησης των κλινικών, τεχνολογικών ηθικών και οικονομικών παραμέτρων από αρμόδιες επιστημονικές εταιρείες και φορείς. Μεγάλες επιστημονικές οργανώσεις όπως η International Society for Prenatal Diagnosis, National Society of Genetic Counselors, American College of Obstetrics and Gynecology ενέκριναν τη χρησιμοποίηση της μεθόδου σε μονήρεις κυήσεις για πληθυσμιακό προγεννητικό έλεγχο χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου. Απαραίτητη προϋπόθεση θεωρούν την κατάλληλη γενετική καθοδήγηση, πριν και μετά την αιμοληψία, με έμφαση στο υψηλό ποσοστό αποκλεισμού παθολογικού εμβρύου (>99%) και την ανάγκη επιβεβαίωσης των θετικών ευρημάτων με επεμβατικό ΠΕ. Οι επιστημονικές όμως και τεχνολογικές εξελίξεις, σε συνδυασμό με τον έντονο ανταγωνισμό μεταξύ των εταιρειών που δραστηριοποιούνται στο πεδίο αυτό φαίνεται ότι οδηγούν σε συνεχείς προσθήκες και βελτιώσεις του μη επεμβατικού ελέγχου χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου.

Τα συστήματα NGS, έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης και στη διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων. Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί σήμερα με επιτυχία στη διάγνωση της β-μεσογειακής αναιμίας και της αιμορροφιλίας<sup>74</sup>. Τέλος, η μέθοδος δίνει τη δυνατότητα αλληλούχησης ακόμη και ολόκληρου του γονιδιώματος του εμβρύου. Μετά από ανάλυση του cfDNA που απομονώνεται από το πλάσμα της εγκύου, τον καθορισμό των απλοτύπων της μητέρας και του πατέρα και τη χρήση βιοπληροφορικών συστημάτων είναι δυνατή η αποκάλυψη ολόκληρης της αλληλουχίας του εμβρυϊκού γονιδιώματος<sup>29, 75</sup>. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η ανίχνευση και των de-novo μεταλλάξεων του εμβρύου, αλλά μέχρι σήμερα το ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν είναι εξαιρετικά υψηλό.

### Συμπέρασμα

Η διαπίστωση της παρουσίας cffDNA στο περιφερικό αίμα της εγκύου άνοιξε νέους ορίζοντες στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο γενετικών διαταραχών του εμβρύου. Με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας, όπως το Digital PCR και τα συστήματα NGS, έχουν επιλυθεί πολλά από τα προβλήματα στη χρήση του cffDNA και έτσι σήμερα ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος του φύλου, του συστήματος RhD, των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και ορισμένων μονογονιδιακών νοσημάτων του εμβρύου εφαρμόζεται με επιτυχία στην κλινική πράξη.

Παραμένουν όμως ακόμη πολλά πρακτικά, ηθικά και κοινωνικά ζητήματα που πρέπει να επιλυθούν προκειμένου ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος να εφαρμοστεί σε ευρύτερη κλίμακα και πιθανώς να αντικαταστήσει πλήρως τις επεμβατικές τεχνικές λήψης εμβρυϊκού γενετικού υλικού.

### Ευχαριστίες

Οι κ. ....χρηματοδοτούνται από το ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ» μέσω του προγράμματος «Αριστεία» με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

### Non-invasive prenatal screening from cfDNA: Technical problems and methods of molecular analysis

Tounta G., Kolialexi A., Mavrou A., Pergialiotis V., Papantoniou N.

<sup>1</sup>3rd Dept. of Obstetrics & Gynecology

<sup>2</sup>Genetics Laboratory

Correspondence: Kolialexi A., Genetics Laboratory

Thivon & Levadias, 115 27, Goudi, Athens, Greece

E-mail: akolial@med.uoa.gr

Tel.: 2107467462

### Summary

The detection of the presence of cell free fetal DNA (cffDNA) in the maternal circulation during the last years has opened a new pathway in non-invasive prenatal screening tests. To date, several studies have investigated and evaluated the methodological design of cffDNA collection from maternal blood. Their main objective is to evaluate the sensitivity and specificity of current molecular techniques. The detection of cffDNA in maternal circulation is feasible from the first weeks of gestation. Its origin are the exfoliated placental cells and it represents 3-6% of total cfDNA in the maternal blood. Its small quantity, combined with the presence of maternal cfDNA, increases the technical difficulty of detecting genetic anomalies. During the last years the implementation of novel highly sensitive and specific molecular techniques, such as digitized PCR and next generation sequencing (NGS) has solved many technical problems during the evaluation of cffDNA. Thus, to date, non-invasive prenatal screening of fetal sex, Rhesus group, chromosomal anomalies and of certain single monogenic fetal pathologic entities is successfully introduced in current clinical practice. The purpose of the present review is to present the current molecular techniques used during prenatal cffDNA screening.

Key words: cffDNA, PCR, RTQ-PCR, digital PCR, NGS

### Βιβλιογραφία

1. Akolekar R1, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
2. Lo, Y.M., N. Corbetta, P.F. Chamberlain, V. Rai, I.L. Sargent, C.W. Red-



- man, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
3. Honda, H., N. Mihar, Y. Ohashi, O. Samura, M. Kinutani, T. Hara, et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002;110:75-9.
  4. Sekizawa, A., T. Kondo, M. Iwasaki, A. Watanabe, M. Jimbo, H. Saito, et al. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2001;47:1856-8.
  5. Rijnders, R.J., C.E. van der Schoot, B. Bossers, M.A. de Vroede, and G.C. Christiaens. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001;98:374-8.
  6. Guibert, J., A. Benachi, A.G. Grebille, P. Ernault, J.R. Zorn, and J.M. Costa. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1733-6.
  7. Chan, K.C., J. Zhang, A.B. Hui, N. Wong, T.K. Lau, T.N. Leung, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004;50:88-92.
  8. Ohashi, Y., N. Mihar, H. Honda, O. Samura, and K. Ohama. Correlation of fetal DNA and human chorionic gonadotropin concentrations in second-trimester maternal serum. *Clin Chem* 2002;48:386-8.
  9. Ng, E.K., N.B. Tsui, T.K. Lau, T.N. Leung, R.W. Chiu, N.S. Panesar, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4748-53.
  10. Lo, Y.M., M.S. Tein, T.K. Lau, C.J. Haines, T.N. Leung, P.M. Poon, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-75.
  11. Lun, F.M., R.W. Chiu, K.C. Allen Chan, T. Yeung Leung, T. Kin Lau, and Y.M. Dennis Lo. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2008;54:1664-72.
  12. Wataganara, T., I. Peter, G.M. Messerlian, L. Borgatta, and D.W. Bianchi. Inverse correlation between maternal weight and second trimester circulating cell-free fetal DNA levels. *Obstet Gynecol* 2004;104:545-50.
  13. Gerovassili, A., K.H. Nicolaidis, S.L. Thein, and D.C. Rees. Cell-free DNA levels in pregnancies at risk of sickle-cell disease and significant ethnic variation. *Br J Haematol* 2006;135:738-41.
  14. Costa, J.M., A. Benachi, E. Gautier, J.M. Jouannic, P. Ernault, and Y. Dumez. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn* 2001;21:1070-4.
  15. Zhong, X.Y., M.R. Burk, C. Troeger, L.R. Jackson, W. Holzgreve, and S. Hahn. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn* 2000;20:795-8.
  16. Fan, H.C., Y.J. Blumenfeld, U. Chitkara, L. Hudgins, and S.R. Quake. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem* 2010;56:1279-86.
  17. Wright, C.F. and H. Burton. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009;15:139-51.
  18. Maron, J.L. and D.W. Bianchi. Prenatal diagnosis using cell-free nucleic acids in maternal body fluids: a decade of progress. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145C:5-17.
  19. Finning, K.M. and L.S. Chitty. Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:69-75.
  20. Lee, T.H., L. Montalvo, V. Chrebtow, and M.P. Busch. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 2001;41:276-82.
  21. Lam, N.Y., T.H. Rainer, R.W. Chiu, and Y.M. Lo. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clin Chem* 2004;50:256-7.
  22. Angert, R.M., E.S. LeShane, Y.M. Lo, L.Y. Chan, L.C. Delli-Bovi, and D.W. Bianchi. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem* 2003;49:195-8.
  23. Barrett, A.N., B.G. Zimmermann, D. Wang, A. Holloway, and L.S. Chitty. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS One* 2011;6:e25202.
  24. Fernando, M.R., K. Chen, S. Norton, G. Krzyzanowski, D. Bourne, B. Hunsley, et al. A new methodology to preserve the original proportion and integrity of cell-free fetal DNA in maternal plasma during sample processing and storage. *Prenat Diagn* 2010;30:418-24.
  25. Legler, T.J., Z. Liu, A. Mavrou, K. Finning, I. Hromadnikova, S. Galbiati, et al. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2007;27:824-9.
  26. Tounta, G., C. Vrettou, A. Kolialexi, N. Papantoniou, A. Destouni, G.T. Tsangaris, et al. A multiplex PCR for non-invasive fetal RHD genotyping using cell-free fetal DNA. *In Vivo* 2011;25:411-7.
  27. Kolialexi, A., G. Tounta, P. Apostolou, C. Vrettou, N. Papantoniou, E. Kanavakis, et al. Early non-invasive detection of fetal Y chromosome sequences in maternal plasma using multiplex PCR. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;161:34-7.
  28. Bustamante-Aragones, A., M.J. Trujillo-Tiebas, J. Gallego-Merlo, M. Rodriguez de Alba, C. Gonzalez-Gonzalez, D. Cantalapiedra, et al. Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study. *Eur J Neurol* 2008;15:1338-44.
  29. Lo, Y.M., K.C. Chan, H. Sun, E.Z. Chen, P. Jiang, F.M. Lun, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2010;2:61ra91.
  30. Gonzalez-Gonzalez, M.C., M.J. Trujillo, M. Rodriguez de Alba, M. Garcia-Hoyos, I. Lorda-Sanchez, J. Diaz-Recasens, et al. Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003;23:232-4.
  31. Saito, H., A. Sekizawa, T. Morimoto, M. Suzuki, and T. Yanaihara. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000;356:1170.
  32. Li, Y., W. Holzgreve, G.C. Page-Christiaens, J.J. Gille, and S. Hahn. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma—case report. *Prenat Diagn* 2004;24:896-8.
  33. Li, Y., G.C. Page-Christiaens, J.J. Gille, W. Holzgreve, and S. Hahn. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. *Prenat Diagn* 2007;27:11-7.
  34. Amicucci, P., M. Gennarelli, G. Novelli, and B. Dallapiccola. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46:301-2.
  35. Gonzalez-Gonzalez, M.C., M. Garcia-Hoyos, M.J. Trujillo, M. Rodriguez de Alba, I. Lorda-Sanchez, J. Diaz-Recasens, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002;22:946-8.
  36. Nasis, O., S. Thompson, T. Hong, M. Sherwood, S. Radcliffe, L. Jackson, et al. Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable noninvasive prenatal detection of cystic fibrosis. *Clin Chem* 2004;50:694-701.
  37. Lazaros, L., E. Hatz, I. Bouba, E. Paraskevaidis, and I. Georgiou. Non-invasive prenatal detection of paternal origin hb leprore in a male fetus at the 7th week of gestation. *Fetal Diagn Ther* 2006;21:506-9.
  38. Chiu, R.W., T.K. Lau, T.N. Leung, K.C. Chow, D.H. Chui, and Y.M. Lo. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002;360:998-1000.
  39. Fucharoen, G., W. Tungwivat, T. Ratanasiri, K. Sanchaisuriya, and S. Fucharoen. Prenatal detection of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2003;23:393-6.
  40. Leung, T.N., J. Zhang, T.K. Lau, N.M. Hjelm, and Y.M. Lo. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998;352:1904-5.
  41. Hromadnikova, I., M. Benesova, L. Zejskova, J. Stehnova, J. Doucha, P. Sedlacek, et al. The effect of DYS-14 copy number variations on extracellular fetal DNA quantification in maternal circulation. *DNA Cell Biol* 2009;28:351-8.
  42. Scheffer, P.G., C.E. van der Schoot, G.C. Page-Christiaens, B. Bossers, F. van Erp, and M. de Haas. Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. *Obstet Gynecol* 2010;115:117-26.
  43. Chow, K.C., R.W. Chiu, N.B. Tsui, C. Ding, T.K. Lau, T.N. Leung, et al. Mass spectrometric detection of an SNP panel as an internal positive control for fetal DNA analysis in maternal plasma. *Clin Chem* 2007;53:141-2.
  44. Li, Y., F. Wenzel, W. Holzgreve, and S. Hahn. Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: influence of size fractionation. *Electrophoresis* 2006;27:3889-96.
  45. Page-Christiaens, G.C., B. Bossers, V.D.S. CE, and D.E.H. M. Use of bi-allelic insertion/deletion polymorphisms as a positive control for fetal genotyping in maternal blood: first clinical experience. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:123-9.
  46. Liu, F.M., X.Y. Wang, X. Feng, W. Wang, Y.X. Ye, and H. Chen. Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007;86:535-41.
  47. Dhallan, R., X. Guo, S. Emche, M. Damewood, P. Bayliss, M. Cronin, et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 2007;369:474-81.
  48. Pertl, B., A. Sekizawa, O. Samura, I. Orescovic, P.T. Rahaim, and D.W. Bianchi. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* 2000;106:45-9.

49. Papantoniou, N., V. Bagiokos, K. Agiannitopoulos, A. Kolialexi, A. Destouni, G. Tounta, et al. RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia. *Prenat Diagn* 2013;33:682-7.
50. White, H.E., C.L. Dent, V.J. Hall, J.A. Crolla, and L.S. Chitty. Evaluation of a novel assay for detection of the fetal marker RASSF1A: facilitating improved diagnostic reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *PLoS One* 2012;7:e45073.
51. Zejskova, L., T. Jancuskova, K. Kotlabova, J. Doucha, and I. Hromadnikova. Feasibility of fetal-derived hypermethylated RASSF1A sequence quantification in maternal plasma—next step toward reliable non-invasive prenatal diagnostics. *Exp Mol Pathol* 2010;89:241-7.
52. Chan, K.C., C. Ding, A. Gerovassili, S.W. Yeung, R.W. Chiu, T.N. Leung, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 2006;52:2211-8.
53. Chiu, R.W., C.R. Cantor, and Y.M. Lo. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends Genet* 2009;25:324-31.
54. Yi, P., Z. Chen, Y. Zhao, J. Guo, H. Fu, Y. Zhou, et al. PCR/LDR/capillary electrophoresis for detection of single-nucleotide differences between fetal and maternal DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2009;29:217-22.
55. Barrett, A.N., T.C. McDonnell, K.C. Chan, and L.S. Chitty. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. *Clin Chem* 2012;58:1026-32.
56. Lun, F.M., N.B. Tsui, K.C. Chan, T.Y. Leung, T.K. Lau, P. Charoenkwan, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19920-5.
57. Lo, Y.M., F.M. Lun, K.C. Chan, N.B. Tsui, K.C. Chong, T.K. Lau, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13116-21.
58. Bianchi, D.W., L.D. Platt, J.D. Goldberg, A.Z. Abuhamad, A.J. Sehntert, R.P. Rava, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012;119:890-901.
59. Chen, E.Z., R.W. Chiu, H. Sun, R. Akolekar, K.C. Chan, T.Y. Leung, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One* 2011;6:e21791.
60. Dan, S., W. Wang, J. Ren, Y. Li, H. Hu, Z. Xu, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn* 2012;32:1225-32.
61. Ehrlich, M., C. Deciu, T. Zwiefelhofer, J.A. Tynan, L. Cagasan, R. Tim, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:205 e1-11.
62. Jensen, T.J., Z. Dzakula, C. Deciu, D. van den Boom, and M. Ehrlich. Detection of microdeletion 22q11.2 in a fetus by next-generation sequencing of maternal plasma. *Clin Chem* 2012;58:1148-51.
63. Lau, T.K., F. Chen, X. Pan, R.K. Pooh, F. Jiang, Y. Li, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25:1370-4.
64. Palomaki, G.E., E.M. Kloza, G.M. Lambert-Messerlian, J.E. Haddow, L.M. Neveux, M. Ehrlich, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011;13:913-20.
65. Peters, D., T. Chu, S.A. Yatsenko, N. Hendrix, W.A. Hogge, U. Surti, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of a fetal microdeletion syndrome. *N Engl J Med* 2011;365:1847-8.
66. Sehntert, A.J., B. Rhees, D. Comstock, E. de Feo, G. Heilek, J. Burke, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem* 2011;57:1042-9.
67. Srinivasan, A., D.W. Bianchi, H. Huang, A.J. Sehntert, and R.P. Rava. Non-invasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma. *Am J Hum Genet* 2013;92:167-76.
68. Yu, S.C., P. Jiang, K.W. Choy, K.C. Chan, H.S. Won, W.C. Leung, et al. Noninvasive prenatal molecular karyotyping from maternal plasma. *PLoS One* 2013;8:e60968.
69. Ashoor, G., A. Syngelaki, M. Wagner, C. Birdir, and K.H. Nicolaides. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:322 e1-5.
70. Chiu, R.W. and Y.M. Lo. Noninvasive prenatal diagnosis empowered by high-throughput sequencing. *Prenat Diagn* 2012;32:401-6.
71. Nicolaides, K.H., A. Syngelaki, G. Ashoor, C. Birdir, and G. Touzet. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:374 e1-6.
72. Chiu, R.W., K.C. Chan, Y. Gao, V.Y. Lau, W. Zheng, T.Y. Leung, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20458-63.
73. Zimmermann, B., M. Hill, G. Gemelos, Z. Demko, M. Banjevic, J. Baner, et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn* 2012;32:1233-41.
74. Lam, K.W., P. Jiang, G.J. Liao, K.C. Chan, T.Y. Leung, R.W. Chiu, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to beta-thalassemia. *Clin Chem* 2012;58:1467-75.
75. Kitzman, J.O., M.W. Snyder, M. Ventura, A.P. Lewis, R. Qiu, L.E. Simmons, et al. Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus. *Sci Transl Med* 2012;4:137ra76.