

NEINVAZIVNO PREDPORODNO PRESEJANJE ZA ANEUPLOIDIJE NA OSNOVI PROSTE PLODOVE DNA - PREGLED RAZVOJA IN PRIPOROČILA ZA KLINIČNO PRAKSO

NON-INVASIVE PRENATAL SCREENING FOR ANEUPLOI- DIES USING CELL-FREE FETAL DNA – PROGRESS AND RECOMMENDATIONS FOR CLINICAL PRACTICE

AVTORJI / AUTHORS:

Darija Strah, dr. med, specialistka
ginekologije in porodništva¹
Janez Bernik, univ. dipl. bth²

Ustanova

¹ Diagnostični center Strah, Slamnikarska 3a, 1230 Ljubljana

² Doktorski študent Biomedicine, Univerza v Ljubljani,
Kongresni trg 12, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: darija@strah.si

POVZETEK

Odkritje in potrditev prisotnosti proste plodove DNA v krvnem obtoku nosečnice v letu 1997 predstavlja odločilen mejnik za raziskave na področju neinvazivnega predporodnega testiranja (NIPT). Delež proste plodove DNA v povprečju znaša 10-20 %, čeprav močno variira in je odvisen od različnih dejavnikov. V preteklem desetletju so razvili različne metode za ugotavljanje kromosomskih aneuploidij na osnovi proste plodove DNA. Kot najustreznejša, najbolj zanesljiva in tudi najpogosteje uporabljena se je uveljavila tako imenovana metoda masovnega paralelnega sekvenciranja. V kliničnih študijah se je pokazalo, da je metoda masovnega paralelnega sekvenciranja, vključno z njenimi variacijami, primerna za visoko zanesljivo presejanje najpogostejših kromosomskih aneuploidij v prvem trimesečju nosečnosti. Mnenja posameznih združenj so si podobna glede indikacij za NIPT, mnenja, kdo lahko svetuje pred in po testu, pa so si različna. Strokovnjaki so si edini, da NIPT trenutno predstavlja izjemno zanesljiv *presejalni* test, pri katerem mora biti vsak pozitiven izvid potrjen z eno od klasičnih oblik invazivne *diagnostične* preiskave.

KLJUČNE BESEDE:

neinvazivno predporodno presejanje, prosta plodova DNA, Downov sindrom, aneuploidije, masovno paralelno sekvenciranje

POVZETEK

The discovery of cell-free fetal DNA (cffDNA) in maternal plasma in 1997 represents a key breakthrough to the further progress that has been made in the field of non-invasive prenatal testing (NIPT). On average 10-20 % of cffDNA is present in the maternal plasma; however this proportion varies strongly and it depends on different factors. In the last decade, several methods for detecting chromosomal aneuploidies in early pregnancy have been developed and amongst them massively parallel sequencing (MPS) has been indicated as the most accurate, appropriate and the most commonly used. Clinical studies have shown that the method of massive parallel sequencing together with its variations is suitable for highly reliable screening of the most common chromosomal aneuploidies in the



first trimester of pregnancy. Several medical associations published their opinion and guidelines for the implementation of NIPT in clinical practice. Their statements are consistent in the aspect of the indications when NIPT should be advised to the pregnant women while there are some uncertainties regarding pre- and post- testing counseling to be answered. The experts agree that NIPT method represents highly accurate advanced *screening* test, therefore in case of positive results patients should undergo one of the conventional invasive *diagnostic* procedures.

KEY WORDS:

non-invasive prenatal testing, cell-free fetal DNA, Down syndrome, aneuploidies, massively parallel sequencing

1 UVOD

Presejalni testi za odkrivanje aneuploidij v prvem trimesečju nosečnosti predstavljajo uveljavljeno klinično prakso predporodne oskrbe nosečnic že skoraj 20 let (1). Testi upoštevajo različne kriterije: starost nosečnice, ultrazvočno merjenje debeline nihalne svetline (NS) ploda in drugih kromosomskih označevalcev v prvem trimesečju ter stanje hormonskih označevalcev v prvem in drugem trimesečju. Napovedano visoko tveganje za aneuploidije potrdimo ali ovržemo bodisi z biopsijo horionskih resic v prvem ali amniocentezo v drugem trimesečju. Glede na mednarodne podatke, s presejanjem nihalne svetline in dvojnega hormonskega testa odkrijemo približno 90 % plodov z Downovim sindromom (DS), ob lažno pozitivni stopnji (FPR) 5 % (2). Primerljive rezultate dosegamo tudi v Sloveniji, kjer z merjenjem debeline NS in oceno nosne kosti odkrijemo 85 % plodov z DS ob 2,8 % FPR (3). Vendar glede na prevalenco DS še vedno večina nosečnic opravi invazivno diagnostično preiskavo, pri kateri tvega neželjeno prekinitve nosečnosti, izkaže pa se, da gre za lažno pozitivni izvid presejalnega testa (3). Zato strokovna javnost spremlja razvoj novih metod neinvazivnega predporodnega testiranja (NIPT) za aneuploidije na osnovi proste plodove DNA.

2 PROSTA PLODOVA DNA

Kljub začetni nejasnosti glede natančnega celičnega izvora proste plodove DNA v krvnem obtoku nosečnice (4) je nedavna raziskava pokazala, da slednja izhaja iz citotrofoblasta, notranje plasti trofoblasta (5). Iz venske krvi nosečnice jo je moč izolirati od 7. gestacijskega tedna dalje (6). Njen delež znaša v povprečju 10-20 %, čeprav močno variira od 3-40 % (7,8,9), kar je odvisno od različnih dejavnikov, kot je gestacijski teden, telesna teža nosečnice in morebitni zapleti v nosečnosti (7,10,11). Njen razpolovni čas znaša od 4-30 minut, zato je v nekaj urah po porodu v krvnem obtoku matere ne zaznamo več (12). Fragmenti proste celične DNA ploda so zelo majhni, povprečne dolžine 150 baznih parov (bp) in le redko presegajo 300 bp (13,14). Možnosti neinvazivnega odkrivanja aneuploidij pri plodu so bile prvič nakazane leta 1969, ko so potrdili prisotnost plodovih celic v krvnem obtoku nosečnic (15). Leta 1997 so z analizo kromosoma Y ugotovili, da se v krvnem obtoku nosečnic poleg plodovih celic nahaja tudi prosta plodova DNA (6), ki je v primerjavi s plodovimi celicami prisotna v veliko večji meri in je zato primernejša za analizo.

Po letu 1997 je prišlo do opaznega porasta raziskav na področju določanja krvne skupine, spola in prisotnosti ali odsotnosti antigena D (RhD+ ali RhD-) ploda s pomočjo proste plodove DNA (16, 20). Možnost predporodnega odkrivanja aneuploidij je zaživela z razvojem sekvenciranja nove generacije.

3 PREGLED METOD PREDPORODNEGA DOLOČANJA KROMOSOMSKIH ANEUPLOIDIJ NA OSNOVI PROSTE PLODOVE DNA

Prosto DNA iz krvne plazme matere izoliramo s klasičnimi metodami izolacije DNA. Nadaljnja analiza z izoliranim dednim materialom je odvisna od posamezne metode določevanja prisotnosti kromosomskih aneuploidij. Do danes so bile na področju neinvazivnih tehnik predporodnega odkrivanja aneuploidij uporabljene različne metode, ki bodisi te-

meljijo na analizi DNA, vključno z imunoprecipitacijo metiliranih regij DNA (MeDiP) (21), profilom polimorfizmov posameznega nukleotida kromosoma 21 (22), bodisi na analizi RNA, vključno z analizo polimorfizma posameznega nukleotida (SNP) v genu *PLAC4* z masno spektrometrijo (23) oziroma analizo več SNP-jev znotraj gena *PLAC4* prek reverzne transkripcije in od ligacije odvisnega hkratnega pomnoževanja sond (RT-MLPA) (24). Prav tako so bile uporabljene metode, ki temeljijo na analizi profila serumskih proteinskih označevalcev (25). Z razvojem sekvenciranja nove generacije in posledičnim padcem cene sekvenciranja se je kot najustreznejša, najbolj zanesljiva in tudi najpogostejše uporabljena uveljavila tako imenovana metoda masovnega paralelnega sekvenciranja (angl. *massively parallel sequencing*, MPS).

3.1 MASOVNO PARALELNO SEKVENCIRANJE

S to metodo lahko danes rutinsko določimo zaporedje milijonov ali celo milijard fragmentov DNA (26). Določanje zaporedja poteka istočasno ob klonsko namnoženih fragmentih DNA v mnogih prostorsko ločenih celicah. Rezultat takega postopka so številna zaporedja krajših fragmentov DNA, pri čemer se isti fragment DNA prebere večkrat. To poimenujemo s terminom »pokritost«. Zaznavanje stopnje pokritosti je osnovni princip določanja kromosomskih nepravilnosti (27, 28). V primeru trisomije 21 gre pričakovati, da bo pokritost fragmentov, ki izhajajo iz kromosoma 21, v primerjavi s fragmenti iz ostalih kromosomov, statistično značilno večja. Povedano drugače, kadar fragment DNA iz kromosoma 21 preberemo statistično značilno večkrat kot običajno, lahko z izredno veliko zanesljivostjo določimo prisotnost trisomije 21 kromosoma. Enak princip velja tudi za ostale aneuploidije.

3.2 NAKLJUČNA IN TARČNA METODA MPS

Pri metodi MPS ločimo dva osnovna pristopa. Najpogostejše uporabljen pristop je tako imenovana naključna (angl. *shotgun*) metoda MPS (MPSS), ki je podrobneje opisana v raziskavi Ehricha s sod. (27). Fragmente DNA sekvenciramo po celotnem genomu, torej naključno, ne glede na to, kateremu kromosomu fragmenti DNA pripadajo. Sparks s sod. opiše razvoj tarčne (angl. *target*) metode MPS, ki so jo poimenovali DANSR (angl. *digital analysis of selected regions*) (29). Njena prednost je, da z njo analiziramo le frag-

mente DNA, ki pripadajo izbranim kromosomom. Posledično je moč doseči večjo pokritost posameznega fragmenta, oziroma lahko istočasno analiziramo več vzorcev. Različica tarčne metode MPS je analiza le polimorfnihih mest genoma (30), kar jim je omogočilo, da so pridobili ogromen nabor fragmentov DNA, ki so pripadali le plodu.

4 PREGLED RAZISKAV

Do danes so bile z uporabo metode sekvenciranja DNA izvedene številne raziskave, v katerih so z metodo MPS analizirali uspešnost odkrivanja različnih oblik aneuploidij, najpogostejše trisomij kromosoma 21 (T21) (9,27,31), T21 in T18 (32,33,34,35,36,37), T18 in T13 (38), T13 (39), analizo vseh treh trisomij (40), oziroma so se osredotočali tako na analizo najpogostejših treh trisomij, kot tudi na analizo aneuploidij spolnih kromosomov (30,41,42,43). Večina raziskav je bila izvedenih na vzorcu nosečnic z visokim tveganjem (9,27,30-43). Nicolaides in sod. so kot prvi potrdili primernost metode tudi na vzorcu nosečnic z nizkim tveganjem (44).

Značilnosti najpomembnejših raziskav na področju neinvazivnega odkrivanja aneuploidij so podrobneje predstavljene v Tabeli 1.

5 SEDANJE OMEJITVE NIPT PRI DOLOČEVANJU ANEUPLOIDIJ

Tehnike NIPT v sedanjem razponu lahko z visoko občutljivostjo in majhno stopnjo lažno pozitivnih izvidov določijo T21, T18 in T13, vendar ne smemo pozabiti, da je večina študij opravljena na vzorcu nosečnic z visokim tveganjem in enoplodno nosečnostjo. Prav tako je malo podatkov glede odkrivanja mozaičnih oblik trisomij, čeprav je potencial in visoka specifičnost metode NIPT tudi tu že pokazana (42).

Trenutne metode NIPT omogočajo uspešno analizo vzorcev, če je delež proste plodove DNA v krvnem obtoku matere višji od 4 %. V nedavno objavljeni študiji so pokazali, da ima pomemben vpliv na delež proste plodove DNA teža



Tabela 1: Pregled najpomembnejših raziskav na področju predporodnega odkrivanja aneuploidij na osnovi proste plodove DNA in tehnologije MPS
Table 1: List of important publications in the field of non-invasive prenatal testing, based on free-fetal DNA and MPS technology.

Raziskava	Vzorec in število nosečnic	Aneuploidija	Občutljivost	Specifičnost
Ehrich, 2011 (27)	Nosečnice z visokim tveganjem, 490 nosečnic	T21	100 %	99,7 %
Chiu, 2011 (9)	Nosečnice z visokim tveganjem, 753 nosečnic	T21	100 %	97,9 %
Palomaki, 2011(31)	Nosečnice z visokim tveganjem, 4664 nosečnic	T21	98,5 %	99,8 %
Palomaki, 2012 (38)	Nosečnice z visokim tveganjem, 4664 nosečnic	T18 T13	100 % 91,7 %	99,7 % 99,1 %
Bianchi, 2012(42)	Nosečnice z visokim tveganjem, 2882 nosečnic	T21 T18 T13 monosomija X	100 % 97,2 % 78,6 % 93,8 %	100 % 100 % 100 % 99,8 %
Sparks, 2012 (37)	Nosečnice z visokim tveganjem, 250 nosečnic	T21 T18	100 % 100 %	99,2 % 99,2 %
Ashoor, 2012 (35)	Nosečnice z visokim tveganjem, 300 nosečnic	T21 T18	100 % 98 %	100 % 100 %
Nicolaidis, 2012 (44)	Nosečnice z nizkim tveganjem, 2049 nosečnic	T21 T18	100 % 100 %	*FPR: < 1 % *FPR: < 1 %
Dan, 2012 (36)	Nosečnice z visokim tveganjem, 11 105 nosečnic	T21 in T18	100 %	99,96 %
Jiang, 2012 (41)	Nosečnice z visokim tveganjem, 903 nosečnice	T21, T18 in T13 X, XXY, XYY	100 % 85,7 %	99,9 % 99,9 %
Ashoor, 2013 (39)	Nosečnice z visokim tveganjem, 2002 nosečnic	T13	80 %	99,95 %
Norton, 2012 (60)	Nosečnice z visokim tveganjem, 3228 nosečnic	T21 T18	100 % 97,4 %	FPR: 0,03 % FPR: 0,07 %

*FPR: lažno-pozitivni izvid (raziskava je bila izvedena na vzorcu nosečnic z nizkim tveganjem); T21: trisomija 21; T18: trisomija 18; T13: trisomija 13

nosečnice. V povprečju pri nosečnicah s težo 60 kg lahko pričakujemo manj kot 1 % primerov z deležem proste plodove DNA, manjšim od 4 %. Pri nosečnicah s težo 160 kg pa lahko pričakujemo, da bo delež proste plodove DNA prenizek v več kot 50 % primerov (11).

Do sedaj imamo nekaj podatkov o testiranju NIPT pri dvoali večplodni nosečnosti, še posebno pri diskordantnosti. Canick s sod. poroča, da so uspešno odkrili 7 nosečnosti s T21 in eno nosečnost s T13, prav tako so pravilno določili vseh 17 evplodnih dvoplodnih nosečnosti (45). Teoretično lahko prisotnost DNA evplodnega zarodka razredči aneuploidno DNA prizadetega zarodka v vzorcu in tako oteži oceno pravega stanja. Testiranje ni primerno za nepravilne oblike dvoplodne nosečnosti kot je npr. vanishing twin.

6 PRIPOROČILA ZA IZVAJANJE NIPT

V zadnjem času se v vseh strokovnih člankih, v katerih so objavljeni izsledki kliničnih študij, uporabljajo izrazi: NIPT (angl. *non-invasive prenatal testing*), NIPS (angl. *non-invasive prenatal screening*) in NIDT (angl. *non-invasive DNA testing*). NIPT je torej izjemno zanesljiv presejalni test, v strokovni literaturi imenovan »*advanced screening test*« za odkrivanje trisomije 21., 18. in 13. kromosoma (46). Zato moramo vsak pozitiven izvid NIPT potrditi z eno od klasičnih oblik invazivne diagnostične metode (44).

Združenje ACOG (*The American College of Obstetricians and Gynecologists, The Society for Maternal - Fetal Medicine Publications Committee*) je decembra 2012 sprejelo priporočila za presejanje z NIPT (47). V mnenju so navedene indikacije, ob katerih je priporočljivo testiranje NIPT:

- starost matere 35 let in več ob porodu,
- ultrazvočni izvid ploda, ki nakazuje možnost aneuploidije,
- anamneza predhodne nosečnosti z dokazano aneuploidijo,
- pozitivni presejalni test bodisi zgodnje morfologije z nuhalno svetlino in/ali dvojnega hormonskega testa, sekvenčnega, integriranega presejalnega testa ali četvernega hormonskega testa,
- uravnotežena Robertsonova translokacija pri starših s povišanim tveganjem za trisomijo 21 ali 13.

V okviru predtestnega svetovanja je treba poudariti, da gre za izredno zanesljiv presejalni test in da je namenjen le odkrivanju najpogostejših treh kromosomskih trisomij. Pozitivnemu testu NIPT sledi priporočilo za genetski posvet in invazivna diagnostična preiskava. Negativni izvid ne izključi nosečnosti s kasnejšimi možnimi zapleti. Test ni zamenjava za še vedno najbolj zanesljivi metodi kot sta amniocenteza in biopsija horionskih resic. Strokovnjaki so si enotni, da ostane sprejeto presejanje za DS v obsegu, kot ga izvajamo do sedaj (47). V primeru ultrazvočno vidnih sumljivih znakov za aneuploidije naj se kot prva ponudi klasična invazivna diagnostika.

Podobno mnenje je sprejelo tudi združenje ISPD (*International Society of Prenatal Diagnosis*). Testiranje NIPT je ob ustreznem genetskem svetovanju primeren presejalni test za nosečnice s povišanim tveganjem za trisomijo 21. Pozitiven rezultat testiranja NIPT je potrebno potrditi z invazivno diagnostično preiskavo (48).

Združenje NSGC (*National Society of Genetic Counselors*) prav tako ugotavlja, da je NIPT testiranje primerno za nosečnice s povišanim tveganjem za kromosomske nepravilnosti. Testiranje NIPT naj bo nosečnicam ponujeno v sklopu privolitve po pojasnilu in z ustreznim genetskim svetovanjem. V primeru pozitivnega testa mora biti pacientka napotena na potrditev z invazivno diagnostično metodo (49).

V Sloveniji priporočil za izvajanje NIPT kot uradno sprejetih smernic še nimamo.

Mnenja posameznih združenj so si podobna glede indikacij za NIPT, mnenja, kdo lahko svetuje pred testom in po njem, so si različna. ACOG priporoča predtestno svetovanje, ki ne sme potekati kot del rutinskega vodenja nosečnosti, temveč kot posvet s podpisano privolitvijo po pojasnilu, opravi ga ginekolog porodničar (47). V primeru pozitivnega NIPT se nosečnico napoti na genetsko svetovanje. NSGC priporoča posvet genetskega svetovalca (49) pred in po testu. EuroGentest Network of Excellence definira pojem strokovnjaka s primernimi znanji, ki sme opraviti genetski posvet. Običajno je to specialist genetski svetovalec (klinični genetik, genetski svetovalec ali medicinska sestra z znanji genetskega svetovanja). Svetovanje lahko opravlja tudi strokovnjak druge stroke z osvojenim znanjem svetovanja, kot je npr. specialist ginekologije in porodništva v primerih predtestnega svetovanja pri tveganju za aneuploidije zaradi povečane starosti nosečnice (50). Do NIPT so se opredelili tudi v Ameriškem združenju za medicinsko genetiko in genomiko (ACMG – *American College of Medical Genetics and Genomics*). Njihovo stališče je, da naj predtestno in potestno svetovanje opravlja ginekolog porodničar (*prenatal/obstetric care provider*), usposobljen strokovnjak (*prenatal designee*) oziroma genetski svetovalec. Predtestno svetovanje naj bo sestavni del NIPT, medtem ko naj se potestno svetovanje opravi v primeru pozitivnega NIPT (51).

7 POMEN NIPT ZA SEDANJE KLINIČNO DELO

V vsem času od uvedbe presejanja za kromosomske nepravilnosti je bilo odkrivanje DS največjega pomena. Presejanje na sprejeti način se je izkazalo uspešno tudi za odkrivanje drugih klinično pomembnih aneuploidij pri nosečnicah z visokim tveganjem; z invazivnimi preiskavami je bilo odkritih tudi veliko klinično pomembnih mikroduplicacij ali delecij in z njimi povezanih genetskih sindromov (2). Pomemben pomislek, kadar razmišljamo o uvedbi NIPT kot primarnem presejanju za DS, je, da ne bomo odkrili vrste drugih klinično pomembnih nepravilnosti, kot je npr. Turnerjev sindrom ali triploidija. Veliko kromosomskih nepravilnosti se pri uveljavljenem presejanju ultrazvočne zgodnje morfologije z merjenjem nuhalne svetline in dvojnimi hormonskimi testom v 11. do 14. tednu nosečnosti kaže podobno, bodisi s povečano nuhalno svetlino ali podobnimi biokemičnimi lastnostmi (2). Zato je priporočeno, da ostane



ultrazvočno presejanje v 1. trimesečju z dvojnimi hormonskim testom v obsegu, kot ga izvajamo sedaj. NIPT pravzaprav predstavlja komplementarno metodo dosedanjemu presejanju in nikakor ne zamenjave. Ne smemo pozabiti, da je ultrazvočno presejanje tudi diagnostično za nekatere večje strukturne nepravilnosti ploda in nekatere od njih, kot je npr. holoprosencefalija, moramo dodatno ovrednotiti z invazivno preiskavo (39). Invazivna diagnostična preiskava se priporoči tudi, kadar je NIPT za trisomijo 21 in 18 negativen, ultrazvočno pa zasledimo povišano NS ploda in strukturne defekte, omfalokelo, holoprosencefalijo, razširjen sečni mehur ali diafragmalno hernijo (2, 52, 53, 54, 55, 56, 57).

Uveljavljeno presejanje za DS v 1. trimesečju poleg ocene zgodnje morfologije in stanja ploda napoveduje tudi možnost nastanka preeklampsije in oceno prezgodnjega poroda (58). Vsekakor je cena NIPT v primerjavi z ustaljenim presejanjem zelo omejujoč dejavnik, vendar pričakujejo, da se bodo stroški za preiskavo v nekaj letih znatno znižali (46). Drugi omejujoči dejavnik je čas, ki ga potrebujemo, da dobimo izvid. Rezultati NIPT so trenutno znani v 10 dneh. Zaradi tehničnih omejitev pri približno 5 % analiz izvida ni mogoče zagotoviti in lahko se zgodi, da nosečnica ultrazvočnega presejanja v 1. trimesečju ne uspe več opraviti (59). Pogoja za vključitev NIPT v ustaljene presejalne predporodne programe sta zmanjšanje stroškov preiskave z izpopolnjevanjem tarčnih metod MPS in skrajšanje časa, potrebnega za pridobitev izvida (59).

8 ZAKLJUČEK

Rezultati do sedaj izvedenih raziskav s področja NIPT na osnovi proste plodove DNA so izjemno obetavni. Največ dokazov o primernosti metode imamo za določevanje trisomije 21, vedno več podatkov je na voljo tudi za trisomiji kromosomov 13 in 18, kjer zaradi majhne prevalence slednjih obstaja nekoliko več omejitev. Novejše raziskave vključujejo vedno večje skupine preiskovank, kjer opisane vrednosti glede občutljivosti in specifičnosti predstavljajo nov mejnik presejanja za tri najpogostejše aneuploidije z visoko stopnjo odkrivanja.

Zaenkrat se ne smemo prenahtati, saj NIPT ne izkazuje diagnostičnih vrednosti. Ne moremo ga enačiti z diagnosti-

čnim testom in kot tak NIPT ne predstavlja zamenjave za ustaljeni diagnostični preiskavi kot sta amniocenteza in biopsija horionskih resic. Predstavljal naj bi novo komplementarno metodo presejanja ob ustaljenem načinu odkrivanja aneuploidij v 1. trimesečju nosečnosti na osnovi ultrazvočne in hormonske preiskave. Gre za izjemno zanesljiv presejalni test, katerega pozitivne rezultate je potrebno potrditi z eno od invazivnih preiskav.

9 LITERATURA

1. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, et al. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in the first trimester of pregnancy. *BMJ*. 1992; 304: 867-869.
2. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn*. 2011; 1: 7-15.
3. Strah DM, Pohar Perme M, Geršak K. Ultrazvočno presejanje za kromosomopatije v prvem trimesečju nosečnosti pri 13049 naključno izbranih nosečnicah. *Med Razgl*. 2011; 50: S 2: 87-92.
4. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update*. 2005; 11 (1): 59-67.
5. Faas BH, de Ligt J, Janssen I, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2012; 12 Suppl 1: S19-26.
6. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997; 350: 485-487.
7. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 768-775.
8. Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008; 54: 1664-1672.
9. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*. 2011; 11, 342: c7401.
10. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem*. 2002; 48 (2): 353-354.
11. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-3 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013; 41 (1): 26-32.
12. Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 1999; 64 (1): 218-224.
13. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem*. 2004; 50: 1002-1011.

14. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem.* 2010; 56: 1279–1286.
15. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet.* 1969; 1: 1119–1122.
16. Honda H, Miharū N, Ohashi Y, et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum. Genet.* 2002; 110: 75–79.
17. Lo, YM, Hjelm NM, Fidler C, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl JMed.* 1998; 339: 1734–1738.
18. Finning, K, Martin P, Summers J, et al. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ.* 2008; 336: 816–818.
19. Daniels G, Finning K, Martin P, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn.* 2009; 29: 101–107.
20. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, et al. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol.* 2006; 13: 53–57.
21. Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsalki E, et al. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med.* 2011; 17 (4): 510–513.
22. Ghanta S, Mitchell ME, Ames M, et al. Non-invasive prenatal detection of trisomy 21 using tandem single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* 2010; 5 (10): e13184.
23. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* 2007; 13 (2): 218–223.
24. Deng YH, Yin AH, He Q, et al Non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49 (4): 641–646.
25. Narasimhan K, Lin SL, Tong T, et al. Maternal serum protein profile and immune response protein subunits as markers for non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21, 18, and 13. *Prenat Diagn.* 2013; 33 (3): 223–231.
26. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods.* 2008; 5 (1): 16–18.
27. Ehrich M, Deciu C, Zwielfhofer T, Tynan JA, 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 (3): 205.e1–11.
28. Strah D, Prosta plodova DNK in klinična uporabnost pri določevanju kromosomskih aneuploidij pri plodu. *ISIS.* 2013; 22 (1): 61–64.
29. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn.* 2012; 32 (1): 3–9.
30. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn.* 2012; 32 (13): 1233–41.
31. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med.* 2011; 13 (11): 913–920.
32. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ.* 2011 11; 342: c7401.
33. Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, de Feo E, 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 (7): 1042–1049.
34. Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 207 (2): 137.e1–8.
35. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, et al. 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 (4): 322.e1–5.
36. Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, 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 (13): 1225–1232.
37. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, et al. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206 (4): 319.e1–9.
38. Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med.* 2012; 14 (3): 296–305.
39. Ashoor G, Syngelaki A, Wang E, Struble C, Oliphant A, Song K, Nicolaides KH. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41 (1):21–5.
40. Lau TK, Chen F, Pan X, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25 (8): 1370–374.
41. Jiang F, Ren J, Chen F, et al. Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies. *BMC Med Genomics.* 2012; 5: 57.
42. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012; 119 (5): 890–901.
43. Liang D, Lv W, Wang H, et al. Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing. *Prenat Diagn.* 2013. doi: 10.1002/pd.4033.
44. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 207 (5): 374.e1–6.
45. Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn.* 2012; 32 (8): 730–734.
46. Chitty LS, Hill M, White H, Wright D, Morris S. Noninvasive prenatal testing for aneuploidy— ready for prime time? *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206: 269–275.
47. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Committee Opinion No. 545. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol.* 2012; 120: 1532–1534.
48. Benn P, Borrell A, Cuckle H, et al. Prenatal Detection of Down Syndrome using Massively Parallel Sequencing (MPS): a rapid response statement from a committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, 24 October 2011. *Prenat Diagn.* 2012; 32 (1): 1–2.
49. Devers PL, Cronister A, Ormond KE, et al. Noninvasive Prenatal Testing/Noninvasive Prenatal Diagnosis:the Position of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2013.



50. EuroGentest Network of Excellence. Recommendations for genetic counselling related to genetic testing. <http://www.eurogentest.org/>. dostopano: 21-3-2013
51. The Noninvasive Prenatal Screening Work Group of the American College of Medical Genetics and Genomics, et al. ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genet Med.* 2013. doi: 10.1038/gim.2013.29.
52. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 191: 45-67.
53. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, et al. UK multicenter project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation: Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. *Lancet.* 1998; 352: 343-346.
54. Kagan KO, Avgidou K, Molina FS, et al. Relation between increased fetal nuchal translucency thickness and chromosomal defects. *Obstet Gynecol.* 2006; 107: 6-10.
55. Chitty LS, Kagan KO, Molina FS, et al. Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study. *BMJ.* 2006; 332 :452-455.
56. Pergament E, Alamillo C, Sak K, et al. Genetic assessment following increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenat Diagn.* 2011; 31: 307-310.
57. Leung TY, Vogel I, Lau TK, et al. Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011; 38: 314-319.
58. Nicolaides KH. A model for a new pyramid of prenatal care based on the 11 to 13 weeks' assessment. *Prenat Diagn.* 2011; 31: 3-6.
59. Hui L. Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidy: charting the course from clinical validity to clinical utility. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41: 2–6.
60. Norton ME, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 207(2): 137.e1-137.e8

