



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

*“Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση”*

### ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*“Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος χρωμοσωμικών ανωμαλιών  
του εμβρύου και επιπλοκών της κύησης”*

**Κόγια Άννα**  
Α.Μ.: 20180139

#### Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

**Τζέτη Μαρία (Επιβλέπουσα)**

*Αναπλ. Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών*

**Συνοδινού-Τraeger Ιωάννα-Ραχήλ**

*Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο  
Αθηνών*

**Φρυσίρα Ελένη**

*Ομ. Καθηγήτρια Κλινικής-Ιατρικής Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

**ΑΘΗΝΑ**  
**Φεβρουάριος, 2020**



HELLENIC REPUBLIC

**National and Kapodistrian  
University of Athens**

— EST. 1837 —

**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
DEPARTMENT OF MEDICINE**

## **MASTER PROGRAM IN**

*“Medical Genetics: Clinic & Laboratory Direction”*

## **MASTER THESIS**

*“Non-invasive prenatal testing of fetal chromosomal abnormalities and pregnancy complications”*

**Kogia Anna**

**Register Number: 20180139**

### **Examining Board Members**

**Tzeti Maria (Supervisor)**

*Associate Professor of Genetics, Medical School, National & Kapodistrian University of Athens*

**Synodinos-Traeger Joanne-Rachel**

*Professor of Genetics, Laboratory of Medical Genetics, Medical School, National & Kapodistrian University of Athens*

**Fryssira Helen**

*Emeritus Professor of Clinical-Medical Genetics, Medical School, National & Kapodistrian University of Athens*

**ATHENS  
February, 2020**

© 2020

*Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)*

*Κόγια Άννα, Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων*

*Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, η οποία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. "ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ" αποτελεί συνιδιοκτησία του ΕΚΠΑ και του/της φοιτητή/τριας, ο/η καθένας/μια από τους/τις οποίους/ες έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης και αναπαραγωγής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και τον/την συγγραφέα και το ΕΚΠΑ όπου εκπονήθηκε η Διπλωματική Εργασία καθώς και τον Επιβλέποντα και την άλλα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.*



**ΠΜΣ: «ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ & ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ»**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

.....

**Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η   Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α**

ΚΟΓΙΑ ANNA

Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος χρωμοσωμικών ανωμαλιών του  
εμβρύου και επιπλοκών της κύησης.

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

## ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι η συγκεκριμένη Διπλωματική Εργασία με τίτλο:

**Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου και επιπλοκών της κύησης**

για τη λήψη του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών του Π.Μ.Σ. **“ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ”**, της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, έχει συγγραφεί από εμένα προσωπικά και δεν έχει υποβληθεί ούτε έχει εγκριθεί στο πλαίσιο κάποιου άλλου μεταπτυχιακού ή προπτυχιακού τίτλου σπουδών, στην Ελλάδα ή στο εξωτερικό. Η εργασία αυτή αντιπροσωπεύει τις προσωπικές μου απόψεις επί του θέματος. Κατά τη συγγραφή, ακολούθησα την πρόβουσα ακαδημαϊκή δεοντολογία. Οι πηγές στις οποίες ανέτρεξα για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής αναφέρονται στο σύνολό τους, δίνοντας πλήρεις αναφορές στους συγγραφείς, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Έχω επίσης αποφύγει οποιαδήποτε ενέργεια που συνιστά παράπτωμα λογοκλοπής.

Γνωρίζω ότι η λογοκλοπή μπορεί να επισύρει ποινή ανάκλησης του πτυχίου μου. Σε κάθε περίπτωση, αναληθούς ή ανακριβούς δηλώσεως, υπόκειμαι στις συνέπειες που προβλέπονται στον Κανονισμό Σπουδών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση», και στις διατάξεις που προβλέπει η Ελληνική και Κοινοτική Νομοθεσία περί πνευματικής ιδιοκτησίας».

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Υπογραφή:

Όνοματεπώνυμο: Κόγια Άννα

Αριθμός Μητρώου: 20180139



## Περίληψη

Μετά την χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος και με την είσοδο των τεχνολογικών εφαρμογών στη διάγνωση των γενετικών νοσημάτων, η έγκαιρη ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών στην κύηση έχει βελτιωθεί σημαντικά. Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος που βασίζεται στην ανάλυση του εμβρυϊκού DNA είναι μια σχετικά νέα τεχνολογία, η οποία καθίσταται ολοένα και συχνότερα η μέθοδος επιλογής του προγεννητικού ελέγχου για την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών σε πάνω από 90 χώρες. Στο πρώτο μέρος της εργασίας αναφέρεται αναλυτικά ο έλεγχος των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που μπορεί να συμβούν στο έμβρυο, όπως η τρισωμία 21, 18 και 13 ή η μονοσωμία Turner με την χρήση βιοχημικών και υπερηχογραφικών δεικτών, με μεγαλύτερη έμφαση στην νεότερη τεχνολογία, την χρήση, δηλαδή, του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στην μητρική κυκλοφορία ενώ θα συγκριθεί η αποτελεσματικότητα των εκάστοτε μεθόδων. Στο δεύτερο μέρος αναλύονται οι σημαντικότερες επιπλοκές κατά την διάρκεια της κύησης, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο μπορούν να ελεγχθούν και να προληφθούν. Μερικές από τις επιπλοκές αυτές είναι ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης, η προεκλαμψία και ο πρόωρος τοκετός. Τέλος η συμβουλευτική παίζει κομβικό ρόλο στην απόφαση μιας εγκύου (ή του ζευγαριού) για την καταλληλότερη επιλογή προγεννητικού ελέγχου, με βάση το ιστορικό.

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

**Συμπέρασμα:** Γίνονται συνεχώς μελέτες ώστε οι μη επεμβατικές εξετάσεις προγεννητικού ελέγχου να αποτελέσουν έλεγχο ρουτίνας στις περισσότερες χώρες και να καλύπτονται από το σύστημα υγείας, ενώ η προτίμηση των γυναικών σε αυτές είναι σαφής από πληθώρα μελετών.

**Λέξεις κλειδιά:** μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος (NIPT), cell-free fetal DNA (cffDNA), χρωμοσωμικές ανωμαλίες, βιοχημικοί δείκτες, επιπλοκές κύησης.



## Abstract

Since the mapping of the human genome and the introduction of technological applications into the diagnosis of genetic diseases, the early detection of chromosomal abnormalities in a pregnancy has been greatly improved. Non-invasive prenatal screening based on fetal DNA analysis is a relatively new technology that is increasingly becoming the method of choice for prenatal screening for chromosomal aneuploidies in over 90 countries. The first part of this thesis details the monitoring of chromosomal abnormalities that may occur in the fetus, such as trisomy 21, 18 and 13 or Turner's monosomy using biochemical and ultrasound markers, with greater emphasis on the newest technology, namely the use of free fetal DNA in the mother's circulation, while comparing the efficacy of each method. The second part analyzes the most important complications during pregnancy as well as how they can be controlled and prevented. Some of these complications are gestational diabetes mellitus, preeclampsia and premature birth. Finally, counseling plays a key role in the decision of a pregnant woman (or couple) to choose the most appropriate prenatal screening, based on the history.

**Purpose:** The aim of the present thesis is to review non-invasive prenatal screening techniques that are widely used in pregnancy for the detection of high-risk pregnancies for the appearance of chromosomal abnormalities and other complications in pregnancy.

**Conclusion:** Studies are constantly being done to ensure that non-invasive prenatal screening become routine screening in most countries and is covered by the health system, while women's preference is clear from numerous studies.

**Keywords:** non-invasive prenatal testing (NIPT), cell-free fetal DNA (cffDNA), chromosomal abnormalities, biochemical markers, pregnancy complications.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ .....</b>	<b>12</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....</b>	<b>15</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....</b>	<b>16</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....</b>	<b>17</b>
<b>1<sup>ο</sup> ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>18</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>18</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ .....</b>	<b>19</b>
1.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΩΤΟΥ ΤΡΙΜΗΝΟΥ .....	19
1.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΤΡΙΜΗΝΟΥ .....	20
1.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΡΙΤΟΥ ΤΡΙΜΗΝΟΥ .....	20
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ .....</b>	<b>22</b>
2.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΩΤΟΥ ΤΡΙΜΗΝΟΥ .....	22
2.1.1. Υπερηχογραφικοί δείκτες 1 <sup>ου</sup> τριμήνου .....	22
2.1.2. Βιοχημικοί δείκτες 1 <sup>ου</sup> τριμήνου .....	23
2.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΤΡΙΜΗΝΟΥ .....	25
2.2.1. Βιοχημικοί δείκτες 2 <sup>ου</sup> τριμήνου .....	25
2.2.2. Υπερηχογραφικοί δείκτες 2 <sup>ου</sup> τριμήνου .....	26
2.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΡΙΤΟΥ ΤΡΙΜΗΝΟΥ .....	26
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΑΛΑΙΟΤΕΡΕΣ &amp; ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ .....</b>	<b>27</b>
3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΑΙΜΑ ΤΗΣ ΕΓΚΥΟΥ .....	27
3.2. ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΜΒΡΥΪΚΟ DNA ΣΤΗΝ ΜΗΤΡΙΚΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ (cffDNA) .....	28
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΕΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ cffDNA .....</b>	<b>30</b>
4.1. ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΕΣ ΤΡΙΣΩΜΙΕΣ .....	30
4.1.1. Σύνδρομο Down (τρισωμία 21) .....	30
4.1.2. Σύνδρομο Edwards (τρισωμία 18).....	30
4.1.3. Σύνδρομο Patau (τρισωμία 13) .....	31
4.2. ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΦΥΛΕΤΙΚΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ (SCAs) .....	31
4.2.1. Σύνδρομο Turner .....	31
4.2.2. Σύνδρομο Klinefelter .....	32
4.2.3. Σύνδρομο Jacobs .....	32
4.2.4. Σύνδρομο τριπλού Χ.....	33
4.3. ΠΟΣΟΣΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΙΣ SCAs.....	33
4.4. ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ (CNVs).....	34





4.4.1. Σύνδρομο Di George.....	34
4.4.2. Σύνδρομο Cri du Chat.....	35
4.4.3. Σύνδρομο Prader-Willi.....	35
4.4.4. Σύνδρομο Angelman .....	36
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ cffDNA.....</b>	<b>38</b>
5.1. WHOLE GENOME SEQUENCING/MASSIVELY PARALLEL (SHOTGUN) SEQUENCING ....	38
5.1.1. Μειονεκτήματα και προσπάθειες αντιμετώπισης.....	38
5.2. TARGETED Ή CHROMOSOME-SELECTIVE SEQUENCING (CSS) .....	39
5.2.1. Πλεονεκτήματα CSS.....	40
5.2.2. Μειονεκτήματα CSS .....	40
5.3. SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP).....	40
5.3.1. Πλεονεκτήματα SNP .....	41
5.3.2. Μειονεκτήματα SNP .....	42
5.4. DIFFERENTIALLY METHYLATED REGIONS (DMRs) .....	42
5.5. ΨΗΦΙΑΚΗ PCR (dPCR).....	43
5.6. ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ RNA (RNA-BASED TESTING) .....	43
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΤΟ CFFDNA ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ.....</b>	<b>45</b>
6.1. ΘΕΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ (PPV) .....	45
6.2. ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ (NPV) .....	45
6.3. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΩΝ “NO CALL” ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	46
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΕΜΒΡΥΪΚΟ ΚΛΑΣΜΑ (FF) .....</b>	<b>47</b>
7.1. ΗΛΙΚΙΑ ΚΥΗΣΗΣ .....	47
7.2. ΜΗΤΡΙΚΟ ΒΑΡΟΣ .....	47
7.3. ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΑ .....	48
7.4. ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ .....	50
7.5. ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΜΒΡΥΩΝ .....	50
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΑΝΑΚΡΙΒΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>53</b>
8.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΛΟΓΟΙ.....	53
8.1.1. Περιορισμένος μωσαϊκισμός του πλακούντα (CPM).....	53
8.1.2. Μωσαϊκισμός του πλακούντα.....	54
8.1.3. Δίδυμη κύηση με παλινδρόμηση ενός εμβρύου («vanishing twin») .....	54
8.1.4. Μητρικός μωσαϊκισμός.....	55
8.1.5. Μητρικά CNVs .....	55
8.1.6. Μητρική κακοήθεια .....	56
8.1.7. Μητρική μεταμόσχευση οργάνου.....	57
8.2. ΤΕΧΝΙΚΟΙ ΛΟΓΟΙ.....	57



<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΚΥΗΣΕΙΣ ΥΨΗΛΟΥ/ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ .....</b>	<b>59</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΠΟΤΕ ΤΟ cffDNA ΔΕΝ ΕΝΔΕΙΚΝΥΤΑΙ .....</b>	<b>61</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ ΤΕΣΤ NIPT .....</b>	<b>63</b>
11.1. MATERNIT21 PLUS (SEQUENOM LABORATORIES) .....	63
11.2. VERIFY (ILLUMINA LABORATORIES).....	63
11.3. HARMONY (ARIOSA).....	64
11.4. PANORAMA (NATERA).....	64
<b>2° ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>66</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12. ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ .....</b>	<b>66</b>
12.1. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ .....	66
12.2. ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΚΥΗΣΗΣ.....	67
12.2.1. Εξωμήτρια (έκτοπη) κύηση .....	67
12.2.1.1. Προγεννητικός έλεγχος έκτοπης κύησης .....	67
12.2.2 Αποβολή ή παλίνδρομη κύηση .....	68
12.2.2.1 Προγεννητικός έλεγχος παλίνδρομης κύησης .....	69
12.2.3. Ολιγοϋδράμνιο .....	70
12.2.3.1. Προγεννητικός έλεγχος για ολιγοϋδράμνιο.....	71
12.2.4. Τοξιναιμία – προεκλαμψία – εκλαμψία .....	71
12.2.4.1. Προγεννητικός έλεγχος προεκλαμψίας .....	72
12.2.5. Πρόδρομος (προδρομικός) πλακούντας .....	73
12.2.5.1. Προγεννητικός έλεγχος πρόδρομου πλακούντα .....	74
12.2.6. Αποκόλληση πλακούντα .....	74
12.2.6.1. Προγεννητικός έλεγχος απόπτωσης πλακούντα .....	75
12.2.7. Σακχαρώδης διαβήτης .....	75
12.2.7.1. Προγεννητικός έλεγχος ΣΔΚ .....	76
12.2.8. Πρόωρος τοκετός .....	78
12.2.8.1. Προγεννητικός έλεγχος πρόωρου τοκετού .....	79
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13. ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ .....</b>	<b>81</b>
13.1. ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ .....	81
13.2. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΤΥΧΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ, ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ .....	82
13.3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΤΥΧΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΑΣ .....	82
13.4. ΤΙ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΘΕΛΟΥΝ ΟΙ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΝ .....	83
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14. ΗΘΙΚΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ.....</b>	<b>84</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>85</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>90</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>91</b>



<b>ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	109
<b>ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	110
<b>POSTER</b> .....	111



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

CVS	Chorionic Villus Sampling
(q)PCR	(quantitative) Polymerase Chain Reaction
QF-PCR	Quantitative Fluorescence-PCR.
dPCR	Digital PCR
Mb/kb	Mega base/kilo base
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
aCGH	Microarray-based Comparative Genomic Hybridization
FBS	Fetal Blood Sampling
BMI	Body Mass Index
CRL	Crown-rump Length
FMF	Fetal Medicine Foundation
PAPP-A	Pregnancy-Associated Plasma Protein A
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
PLGF	Placental Growth Factor
AFP	Alpha-fetoprotein
uE3	Unconjugated Estriol
NST	Non Stress Test
NRBCs	Nucleated Red Blood Cells
cffDNA	Cell-free fetal DNA
ccfDNA	Circulating cell-free DNA
FF	Fetal Fraction
NIPT	Non Invasive Prenatal Test



SCAs	Sex Chromosome Aneuploidies
DR	Detection Rate
FPR	False Positive Results
PPV	Positive Predictive Value
NPV	Negative Predictive Value
CNVs	Copy Number Variations
PWS	Prader-Willi Syndrome
AS	Angelman Syndrome
MPS	Massively Parallel Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
CSS	Chromosome-Selective Sequencing
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
GC	Guanine-Cytosine
SD	Standard Deviation
cFTS	complete First Trimester Screening
GA	Gestational Age
STC-villi	Short-Term Cultured villi
LTC-villi	Long-Term Cultured villi
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ISPD	International Society for Peritoneal Dialysis
IVF	In Vitro Fertilization
IADPSG	International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups



ADA	American Diabetes Association
fFN	Fetal Fibronectin
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
ACTH	Adrenocorticotropic Hormone
ONTDs	Open Neural Tube Defects



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Polymerase Chain Reaction (PCR)	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
Chorionic Villus Sampling (CVS)	Λήψη χοριακών λάχνων
Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	Φθορίζων in situ υβριδισμός
Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH)	Μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (μοριακός καρυότυπος)
Crown-rump Length (CRL)	Κεφαλουραίο μήκος εμβρύου
Pregnancy-Associated Plasma Protein A (PAPP-A)	Πρωτεΐνη πλάσματος-A σχετιζόμενη με την εγκυμοσύνη
Human Chorionic Gonadotropin (hCG)	Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη
Unconjugated Estriol (uE3)	Μη συζευγμένη (ή ελεύθερη) οιστριόλη
Positive Predictive Value (PPV)	Θετική προγνωστική αξία
Negative Predictive Value (NPV)	Αρνητική προγνωστική αξία
complete First Trimester Screening (cFTS)	Ολοκληρωμένος έλεγχος πρώτου τριμήνου
Open Neural Tube Defects (ONTDs)	Ελαττώματα ανοιχτού νευρικού σωλήνα



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ποσοστά ανίχνευσης τρισωμίας 21 των διαφορετικών μεθόδων διαλογής	25
Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά του μητρικού και του εμβρυϊκού cell-free DNA	28
Πίνακας 3. Σύγκριση των τεσσάρων επιλογών ελέγχου	37
Πίνακας 4. PPV του NIPT σε διαφορετικά SCAs	45
Πίνακας 5. Κατανομή του FF και ποσοστό αποτυχίας	51
Πίνακας 6. Ποσοστά ανίχνευσης τρισωμιών στον έλεγχο 1 <sup>ου</sup> τριμήνου	52
Πίνακας 7. Σύνοψη αποτελεσμάτων σύμφωνα με την ομαδοποίηση GRADE	60
Πίνακας 8. Κριτήρια διάγνωσης ΣΔΚ σύμφωνα με τους παρακάτω οργανισμούς	78





## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Λήψη δείγματος εμβρυικού αίματος με υπερηχογραφική καθοδήγηση.....	21
Εικόνα 2. Υπέρηχος αυχενικής διαφάνειας.....	23
Εικόνα 3. Σχέση μεταξύ ηλικίας κύησης και εμβρυϊκού κλάσματος.....	48
Εικόνα 4. Σχέση μεταξύ μητρικού δείκτη μάζας σώματος (BMI) και εμβρυϊκού κλάσματος.....	49
Εικόνα 5. Σχέση μεταξύ ηλικίας κύησης, εμβρυϊκού κλάσματος και τρισωμίας.....	50
Εικόνα 6. Λόγοι μητρικής και πλακουντιακής προέλευσης για να είναι ένα αποτέλεσμα ανακριβές.....	55
Εικόνα 7. Συσχέτιση μεταξύ z-score και μεγέθους CNV.....	56
Εικόνα 8. Μελετήθηκαν 11 περιπτώσεις μεταμόσχευσης οργάνου. Παρατηρείται μεγαλύτερη συνεισφορά του εμβρυϊκού κλάσματος Υ μετά από μεταμόσχευση μευλού των οστών σε σχέση με εκείνη από μεταμόσχευση νεφρού .....	58
Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση φυσιολογικής και εξωμήτριας κύησης.....	68
Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση των ανατομικών ανωμαλιών της μήτρας.....	70
Εικόνα 11. Μορφές προδρομικού πλακούντα.....	74
Εικόνα 12. Σχέση μητρικού σακχάρου και βάρους του εμβρύου.....	77
Εικόνα 13α. Αλγόριθμος για την επιλογή της κάθε εξέτασης με βάση την κατάταξη της εγκύου.....	87
Εικόνα 13β. Αλγόριθμος για την επιλογή της κάθε εξέτασης με βάση την κατάταξη της εγκύου στο 1 <sup>ο</sup> και στο 2 <sup>ο</sup> τρίμηνο.....	88



## 1<sup>ο</sup> ΜΕΡΟΣ

### Εισαγωγή

Ο προγεννητικός έλεγχος είναι μια πτυχή της προγεννητικής φροντίδας, που εστιάζει στην ανίχνευση προβλημάτων σχετιζόμενων με την εγκυμοσύνη σε όσο το δυνατόν νωρίτερο στάδιο. Τα προβλήματα αυτά μπορεί να εμφανιστούν είτε πριν ξεκινήσει η κύηση (όπως στην προεμφυτευτική γενετική διάγνωση) ή στα πρώιμα στάδια αυτής. Ο έλεγχος μπορεί να ανιχνεύσει ελαττώματα όπως αυτά του νωτιαίου σωλήνα, ανωμαλίες χρωμοσωμάτων και γονιδιακές μεταλλάξεις που θα οδηγούσαν σε γενετικές διαταραχές και γενετικές ανωμαλίες, όπως η δισχιδής ράχη, η ουρική αρθρίτιδα, το σύνδρομο Down, η νόσος Tay-Sachs, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η θαλασσαιμία, η κυστική ίνωση, η μυϊκή δυστροφία και το σύνδρομο εύθραυστου Χ.

Ο έλεγχος αποτελείται από μια σειρά εξετάσεων, που γίνονται στην αρχή της εγκυμοσύνης με στόχο την εξασφάλιση της καλής υγείας του εμβρύου αλλά και της μητέρας. Οι περισσότερες από αυτές τις εξετάσεις είναι μη επεμβατικές και συνήθως εκτελούνται κατά τη διάρκεια του πρώτου αλλά και του δεύτερου τριμήνου, αν και κάποιες εκτελούνται και κατά τη διάρκεια του τρίτου. Μια εξέταση προγεννητικού ελέγχου μπορεί μόνο να διαγνώσει τον κίνδυνο ή την πιθανότητα ότι υπάρχει ένας συγκεκριμένος κίνδυνος. Όταν τα αποτελέσματα αυτής της εξέτασης είναι θετικά, οι διαγνωστικές εξετάσεις προγεννητικού ελέγχου είναι ικανές να δώσουν μια οριστική απάντηση.

Τρεις είναι οι κύριοι λόγοι προγεννητικής διάγνωσης: η έγκαιρη ιατρική ή χειρουργική θεραπεία μίας κατάστασης πριν ή μετά τη γέννηση, η δυνατότητα να αποφασίσουν οι γονείς αν θα διακόψουν την κύηση και η ευκαιρία να προετοιμαστούν ψυχολογικά, κοινωνικά, οικονομικά και ιατρικά για ένα έμβρυο με πρόβλημα υγείας ή αναπηρία ή ακόμα και για την πιθανότητα θνησιγένειας. Οι τρόποι με τους οποίους γίνεται ο έλεγχος είναι είτε επεμβατικοί είτε μη επεμβατικοί. Στο μέρος αυτό θα δωθεί έμφαση στους μη επεμβατικούς τρόπους προγεννητικού ελέγχου και συγκεκριμένα για τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Πρώτα όμως θα γίνει μία αναφορά στους επεμβατικούς τρόπους που λαμβάνουν χώρα στο κάθε τρίμηνο της εγκυμοσύνης.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Επεμβατικές Τεχνικές Προγεννητικού Ελέγχου

Με τον όρο «επεμβατικός έλεγχος» χαρακτηρίζονται οι εξετάσεις προγεννητικού ελέγχου που συνίστανται στη λήψη δείγματος αμνιακού υγρού, πλακούντα από τη μητέρα ή εμβρυϊκού αίματος, με χρήση πολύ λεπτής βελόνας. Συνήθως, ο επεμβατικός έλεγχος συνιστάται σε περιπτώσεις κήσεων με αυξημένο κίνδυνο για χρωμοσωμικές ανωμαλίες και γενετικά σύνδρομα ή για άλλα γονιδιακά νοσήματα όπως η μεσογειακή αναιμία και η κυστική ίνωση.

### 1.1. Έλεγχος πρώτου τριμήνου

Μεταξύ 10<sup>ης</sup> και 13<sup>ης</sup> εβδομάδας πραγματοποιείται η λήψη χοριακών λάχνων/τροφοβλαστικού ιστού (CVS), η οποία περιλαμβάνει τη δειγματοληψία του χοριακού βλεννογόνου (ιστό του πλακούντα) για βιοψία, με υπερηχογραφική καθοδήγηση, και τον έλεγχό του για χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Ο έλεγχος, σε ένα τμήμα του υλικού, πραγματοποιείται με την ανάλυση του συμβατικού G-banding καρυότυπου όπου το δείγμα καλλιεργείται κάτω από κατάλληλες στείρες συνθήκες ώστε μετά από ένα διάστημα 15-18 ημερών να μπορεί να γίνει μικροσκοπική παρατήρηση των χρωμοσωμάτων του εμβρύου. Σε άλλο τμήμα του υλικού εφαρμόζεται άμεσα μια τεχνική που ονομάζεται PCR και συγκεκριμένα Amnio PCR με σκοπό την άμεση ανίχνευση των συχνότερων τρισωμιών και ορισμένων ανωμαλιών του φύλου. Στην Amnio PCR γίνεται απομόνωση γενετικού υλικού είτε από CVS είτε από αμνιακό υγρό και ενισχύεται εκλεκτικά μια επιλεγμένη DNA περιοχή με ποσοτική φθορίζουσα PCR (QF-PCR). Το ίδιο δείγμα μπορεί να μελετηθεί με μοριακό καρυότυπο, ο οποίος ελέγχει 500 περίπου γενετικές περιοχές που σχετίζονται με διάφορα σύνδρομα, όπως η νοητική υστέρηση και ο αυτισμός. Μία ακόμη τεχνική που εφαρμόζεται είναι η FISH. Η αναλυτική ικανότητα του συμβατικού καρυότυπου κυμαίνεται μεταξύ 5-10Mb ενώ της FISH περίπου στις 100kb, συνεπώς έχει μεγαλύτερη ευαισθησία. Ακόμα μεγαλύτερη ευαισθησία έχει ο μοριακός καρυότυπος (aCGH) με αναλυτική ικανότητα 20-200kb.

Η CVS είναι ένα διαγνωστικό τεστ που ανιχνεύει τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες και τις γενετικές διαταραχές με υψηλά επίπεδα ακρίβειας (>99%) σε πρώιμο στάδιο, γεγονός που επιτρέπει πιο έγκαιρη, άρα και ασφαλέστερη παρέμβαση και παρέχει περισσότερο χρόνο για τη λήψη των κατάλληλων αποφάσεων. Αν και οι πιθανότητες ταυτοποίησης είναι υψηλές, η δοκιμασία αυτή δεν μετρά τη σοβαρότητα αυτών των διαταραχών ενώ δεν βοηθά στην αναγνώριση των ελαττωμάτων του νευρικού σωλήνα. Η διαδικασία αυτή δεν συνιστάται για γυναίκες που έχουν ενεργό λοίμωξη (π.χ. σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα), φέρουν δίδυμα ή έχουν υποστεί κολπική αιμορραγία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ένα ακόμα μειονέκτημα μπορεί να αποτελέσει η επιμόλυνση του δείγματος από ιστούς της μητέρας κατά την εισαγωγή/εξαγωγή της βελόνας το οποίο ενδέχεται να δυσχεράνει την διάγνωση αλλά ελαχιστοποιείται σαν ρίσκο όσο αυξάνει η εμπειρία του λήπτη ιατρού.

Η CVS πρόκειται για μία επεμβατική μέθοδο, η οποία εφαρμόζεται λόγω υπερηχογραφικών ευρημάτων, οικογενειακού ιστορικού ή/και προχωρημένης ηλικίας της μητέρας (άνω του 35<sup>ου</sup> έτους). Ο κίνδυνος αποβολής κατά την CVS, που



οφείλεται στην διαδικασία της βιοψίας, υπολογιζόταν περίπου στο 1-2%. Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μόνο ένας πολύ μικρός αριθμός αποβολών που συμβαίνουν μετά την λήψη είναι άμεσο αποτέλεσμα της διαδικασίας, αγγίζοντας το ποσοστό του 0,2% (Wulff et al, 2016). Η πιθανότητα ψευδώς θετικού ή ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος της γενετικής ανάλυσης, υπόκειται σε περίπτωση αστοχίας λήψης κατάλληλου υλικού ή «επιμόλυνσής» του με κύτταρα της μητέρας ή στο φαινόμενο μωσαϊκισμού του πλακούντα, το οποίο αναφέρεται στην παρουσία μιας χρωμοσωμικής ανωμαλίας σε ένα μετρήσιμο ποσοστό πλακουντιακών κυττάρων που, όμως, δεν ανιχνεύεται στο έμβρυο. Η συχνότητα εμφάνισής του κατά την εφαρμογή της μεθόδου υπολογίζεται σε 1-2% των κυήσεων στο πρώτο τρίμηνο (Robinson et al, 1997; Redaelli et al, 2005; Goodfellow et al, 2011; Nagamatsu et al, 2014).

## 1.2. Έλεγχος δεύτερου τριμήνου

Η αμνιοπαρακέντηση είναι η διαδικασία κατά την οποία μία ποσότητα του αμνιακού υγρού (15-20 ml) αφαιρείται από τη μήτρα για εξέταση. Το υγρό αυτό περιέχει εμβρυϊκά κύτταρα με την ίδια γενετική σύνθεση με το έμβρυο, καθώς και διάφορες χημικές ουσίες που παράγονται από το σώμα του. Πραγματοποιείται μεταξύ 16<sup>ης</sup> και 20<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης με υπερηχογραφική καθοδήγηση και συνιστάται συνήθως μετά από ένα μη φυσιολογικό αποτέλεσμα του «τριπλού τεστ» (μέτρηση α-φετοπρωτεΐνης, χοριακής γοναδοτροπίνης και οιστριόλης). Η ανάλυση του υλικού βιοψίας, δηλαδή των κυττάρων, γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως στην λήψη χοριακών λάχνων και η ευαισθησία της μεθόδου είναι >99%. Παρόλες τις υψηλές πιθανότητες ταυτοποίησης, δεν μπορεί να υπολογιστεί η σοβαρότητα των ανωμαλιών αυτών.

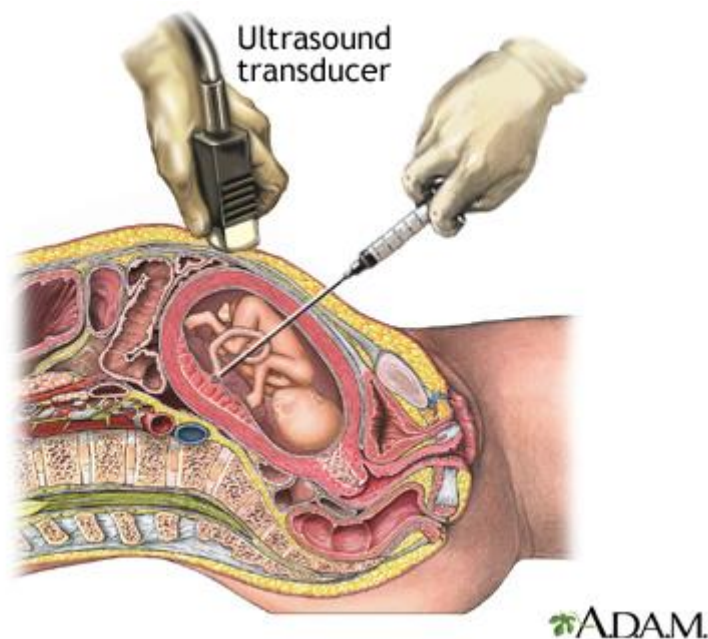
Μελέτες από τη δεκαετία του 1970 εκτιμούσαν αρχικά τον κίνδυνο αποβολής από αμνιοπαρακέντησης σε περίπου 0,5% ενώ μία πρόσφατη μετα-ανάλυση υπολόγισε ότι ο μέσος κίνδυνος για αποβολή σχετιζόμενη με την αμνιοπαρακέντηση είναι 0.11% (95% CI, -0.04 έως 0.26%) (Akolekar et al, 2015) λόγω των μηχανημάτων τελευταίας τεχνολογίας που χρησιμοποιούνται αλλά και της εμπειρίας των γυναικολόγων. Μία ανασκόπηση 147.987 αμνιοπαρακεντήσεων από τη Δανία, που δημοσιεύτηκε το 2016, ανέφερε ποσοστό αποβολής 0.56% εντός 28 ημερών και κίνδυνο ενδομήτριου θανάτου 0.09% εντός 42 ημερών μετά από αμνιοπαρακέντηση (Wulff et al, 2016).

## 1.3. Έλεγχος τρίτου τριμήνου

Μια άλλη επεμβατική εξέταση που μπορεί να πραγματοποιηθεί είναι η λήψη δείγματος εμβρυϊκού αίματος (FBS), η οποία γίνεται μετά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα με υπερηχογραφική καθοδήγηση (Εικόνα 1). Οι συχνότερες ενδείξεις για τη λήψη εμβρυϊκού αίματος είναι η διερεύνηση για χρωμοσωμικό μωσαϊκισμό μετά από αμνιοπαρακέντηση ή η αιματολογική εκτίμηση του εμβρύου (ποσοτικοποίηση της εμβρυϊκής αναιμίας ή του αριθμού αιμοπεταλίων/λεμφοκυττάρων) (Berry et al, 2013) και πραγματοποιείται όταν οι άλλες διαδικασίες δεν είναι ευφικτές ή δεν λειτουργούν. Η FBS είναι δυνατή με την ομφαλιδοκέντηση, τη διακαρδιακή και την διηπατική



παρακέντηση. Η ομφαλιδοκέντηση είναι η πλέον κύρια μέθοδος παρακέντησης της εμβρυϊκής κυκλοφορίας, η οποία πρέπει να διενεργείται κοντά στη θέση έκφυσης του ομφάλιου λώρου από τον πλακούντα (Γκατζούνης, 2008). Στο εμβρυϊκό αίμα, εκτός από την ανάλυση του καρυότυπου και του γονιδιώματος, μπορεί να γίνει αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος ενώ ο κίνδυνος απώλειας εμβρύου κυμαίνεται γύρω στο 1%, ποσοστό που μικραίνει όταν η επέμβαση πραγματοποιείται από κατάλληλα εκπαιδευμένο και πιστοποιημένο ιατρό (Maxwell et al, 1991; Antsaklis et al, 1998; Tongsong et al, 2001)



Εικόνα 1: Λήψη δείγματος εμβρυϊκού αίματος με υπερηχογραφική καθοδήγηση, Πηγή:  
<http://pennteam.adam.com/>



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μη Επεμβατικές Τεχνικές Προγεννητικού Ελέγχου

Οι τεχνικές μη επεμβατικού ελέγχου αναπτύχθηκαν με σκοπό την αποφυγή κινδύνου αποβολής μετά από μια επεμβατική μέθοδο και την μείωση της καταπόνησης των εγκύων. Λόγω του ότι σε μεγάλο ποσοστό, οι γυναίκες που αποφασίζουν να κάνουν παιδί είναι προχωρημένης ηλικίας σε σχέση με τα προηγούμενα χρόνια, δεν είναι πρόθυμες να εκτίθενται στον κίνδυνο απώλειας του εμβρύου που σχετίζεται με επεμβατικές μεθόδους, καθιστώντας τις κυήσεις αυτές πολύτιμες.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος δεν αντικαθιστά άμεσα τις επεμβατικές μεθόδους. Στην πραγματικότητα, αυτό που προσφέρει ο εν λόγω έλεγχος σε γυναίκες σε κύηση είναι η ενδεχόμενη ευκαιρία να αποκλείσουν την επεμβατική διαδικασία και η προσφορά μιας πιο ασφαλούς επιλογής, σε συγκεκριμένες όμως περιπτώσεις. Αποτελεί ένα προβλεπτικό και όχι διαγνωστικό τεστ κυρίως για το σύνδρομο Down (τρισωμία 21) και λιγότερο για άλλες χρωμοσωματικές ανωμαλίες, αλλά αποφεύγει τον όποιο (έστω και περιορισμένο) κίνδυνο των επεμβατικών λήψεων, οι οποίες όμως οδηγούν σε διάγνωση όλων των πιθανών χρωμοσωματικών ανωμαλιών και όχι μόνο του συνδρόμου Down.

Οι ενδείξεις του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου σήμερα επικεντρώνονται κυρίως στην κατηγορία γυναικών «μεσαίου» κινδύνου, η οποία προκύπτει από τον κίνδυνο που διαμορφώνεται από το υπερηχογράφημα 1<sup>ου</sup> τριμήνου (αυχενική διαφάνεια), σε συνδυασμό με τους βιοχημικούς δείκτες και την ηλικία της μητέρας. Η εφαρμογή του μη επεμβατικού ελέγχου δεν ενδείκνυται σε κυήσεις χαμηλού κινδύνου για χρωμοσωματικούς ανευπλοειδισμούς ως τεστ πρώτης διαλογής (screening) στον πληθυσμό, ενώ αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα αποκάλυψης κοινών ανευπλοειδισμών σε αντίστοιχες κυήσεις υψηλού κινδύνου.

### 2.1 Έλεγχος πρώτου τριμήνου

#### 2.1.1. Υπερηχογραφικοί δείκτες 1<sup>ου</sup> τριμήνου

Η δυνατότητα του υπερηχογραφικού ελέγχου να διαγνώσει ανωμαλίες εξαρτάται από την ανατομία του συστήματος που τη φέρει, την ικανότητα/εμπειρία του υπερηχογραφιστή, το BMI της εγκύου, την ποιότητα της συσκευής υπερήχου και τέλος την ηλικία κύησης και τη θέση του εμβρύου τη στιγμή της εξέτασης (Demianczuk et al, 2003).

Αυχενική διαφάνεια είναι η υπερηχογραφική εμφάνιση της υποδόριας συσσώρευσης υγρού πίσω από τον εμβρυϊκό αυχένα κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης. Ο υπέρηχος αυχενικής διαφάνειας (11<sup>n</sup> – 13<sup>n+6</sup> εβδομάδα) αποτελεί τη σημαντικότερη υπερηχογραφική εξέταση στην κύηση. Γίνεται έλεγχος της ανατομίας του εμβρύου και του πάχους του υποδόριου υγρού πίσω από τον αυχένα του εμβρύου (Εικόνα 2) ενώ ακόμα, η απεικονιστική αυτή διερεύνηση, επιβεβαιώνει τη βιωσιμότητά του, επιτρέπει τον καλύτερο προσδιορισμό της ηλικίας κύησης, ενώ σε περιπτώσεις πολύδυμων κυήσεων παρέχει βελτιωμένες δυνατότητες διάγνωσης. Το μέγεθος της εμβρυϊκής αυχενικής διαφάνειας αυξάνει φυσιολογικά με την ηλικία κύησης (CRL). Σύμφωνα με το FMF, ένα φυσιολογικό CRL κυμαίνεται μεταξύ 45-84





mm. Κάθε γυναίκα έχει κίνδυνο το έμβρυό της να έχει μια χρωμοσωμιακή ανωμαλία. Ο βασικός κίνδυνος (ή ο a priori κίνδυνος) εξαρτάται από την ηλικία της μητέρας και της κύησης. Σε ένα έμβρυο με δεδομένο κεφαλουραίο μήκος, κάθε μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας αντιπροσωπεύει ένα λόγο πιθανότητας, ο οποίος πολλαπλασιάζεται με τον a priori εξαρτώμενο από την ηλικία της μητέρας και την ηλικία της κύησης κίνδυνο, ώστε να υπολογιστεί ο νέος κίνδυνος. Όσο μεγαλύτερη είναι η μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος χρωμοσωμικών και δομικών ανωμαλιών στο έμβρυο (Souka et al, 2005).

Κατά την υπερηχογραφική εξέταση του τριμήνου αυτού, το ρινικό οστό δεν είναι ορατό στο 60–70% των εμβρύων με τρισωμία 21 και περίπου στο 2% των χρωμοσωμικά φυσιολογικών εμβρύων. Ανωμαλίες στην κυματομορφή της ταχύτητας ροής στο φλεβώδη πόρο παρατηρούνται στο 80% των εμβρύων με τρισωμία 21 και στο 5% των χρωμοσωμικά υγιών εμβρύων. Παρομοίως, η επίπτωση άλλων υπερηχογραφικών δεικτών, όπως ο εξόμφαλος, η μεγακύστη, και η μονήρης ομφαλική αρτηρία είναι υψηλότερη στα έμβρυα με τρισωμία 21 σε σχέση με τα φυσιολογικά έμβρυα. Καθένας από αυτούς τους δείκτες σχετίζεται με ένα λόγο πιθανότητας, ο οποίος μπορεί να πολλαπλασιαστεί με έναν a priori κίνδυνο ώστε να υπολογιστεί ο νέος κίνδυνος. Το υπερηχογράφημα του πρώτου τριμήνου μπορεί να ανιχνεύσει το 49% των μείζονων δομικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των σκελετικών και καρδιακών ανωμαλιών στο έμβρυο (Grande et al, 2012).



Εικόνα 2: Υπέρηχος αυχενικής διαφάνειας, Πηγή: <https://www.gynaikologos-manou.gr>

### 2.1.2. Βιοχημικοί δείκτες 1<sup>ου</sup> τριμήνου

Συνδυαστικά με την αυχενική διαφάνεια, εκτελούνται οι εξετάσεις αίματος για την ανίχνευση και την μέτρηση των πρωτεϊνών PAPP-A, hCG καθώς και της PLGF.



**PAPP-A:** Η PAPP-A παράγεται τόσο από το έμβρυο όσο και από τον πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος της μητέρας ενώ συνήθως αυξάνεται με την κύηση. Τα χαμηλά επίπεδά της κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου μπορεί να συσχετιστούν με εμβρυϊκές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων των τρισωμιών 13, 18 και 21. Επίσης γυναίκες με χαμηλά επίπεδα PAPP-A στο αίμα την 8<sup>η</sup> έως 14<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, έχουν αυξημένο κίνδυνο για ενδομήτρια αναστολή της ανάπτυξης, πρόωρο τοκετό, προεκλαμψία και θνησιγένεια ενώ αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης στον ορό της μητέρας υποδηλώνουν έμβρυο με βλάβη του ανοικτού νευρικού σωλήνα.

**β-hCG:** Η β-hCG είναι μια ορμόνη που συντίθεται και εκκρίνεται από τον πλακούντα. Τα επίπεδά της αυξάνονται γρήγορα στην αρχή της εγκυμοσύνης και στη συνέχεια μειώνονται μεταξύ της 10<sup>ης</sup> και 20<sup>ης</sup> εβδομάδας. Στον μητρικό ορό η β-hCG μπορεί να είναι υψηλότερη σε μια κύηση κατά την οποία το έμβρυο έχει σύνδρομο Down, ενώ είναι συχνά χαμηλότερη από το συνηθισμένο σε μια εγκυμοσύνη με ένα έμβρυο που έχει προσβληθεί από τρισωμία 18. Για μια δεδομένη κύηση, κάθε τιμή β-hCG και PAPP-A αντιπροσωπεύει ένα λόγο πιθανότητας ο οποίος πολλαπλασιάζεται με τον a priori κίνδυνο ώστε να υπολογιστεί ο νέος κίνδυνος. Όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα της β-hCG και όσο χαμηλότερα τα επίπεδα της PAPP-A, τόσο υψηλότερος είναι ο κίνδυνος για τρισωμία 21 (Provider Handbook, 2009).

Ο συνδιασμός αυχενικής διαφάνειας με παραμέτρους όπως το ιστορικό της εγκύου (ηλικία εγκύου, ηλικία κύησης), λοιπούς υπερηχογραφικούς δείκτες, όπως παρουσία ή απουσία ρινικού οστού και ανεπάρκεια τριγλώχινας και τη μέτρηση β-hCG και της PAPP-A στον ορό της εγκύου, επιτρέπει τον ασφαλέστερο υπολογισμό μιας τελικής συνδυασμένης πιθανότητας για το σύνδρομο Down και τις λοιπές τρισωμίες. Ο συνδυαστικός αυτός έλεγχος πρώτου τριμήνου (cFTS) φτάνει σε ποσοστό ανίχνευσης ανωμαλιών το 90% και ψευδώς θετικών περίπου 5% (Alfirevic et al, 2017).

**PLGF:** Η PLGF είναι μία πρωτεΐνη, η οποία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση. Η κύρια πηγή της κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι η τροφοβλάστη του πλακούντα. Τα επίπεδά της αυξάνονται όσο αυξάνεται το CRL του εμβρύου (άρα όσο αυξάνεται η ηλικία κύησης), ενώ μειώνονται όσο αυξάνεται το μητρικό βάρος. Έχει μελετηθεί ότι η μέτρησή της κατά την διάρκεια του πρώτου τριμήνου μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα ανίχνευσης ανευπολειδίας, σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες εξετάσεις. Τα ευρήματα μιας μελέτης που διεξήχθη το 2009 αποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση της PLGF στον ορό της μητέρας μειώνεται στις 11-13 εβδομάδες κύησης εμβρύου με τρισωμία 21 καθώς και σε άλλες σημαντικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (τρिसωμία 13, 18, μονοσωμία Turner). Εκτιμήθηκε ότι η εξέταση μέσω ενός συνδυασμού μητρικής ηλικίας και των τριών βιοχημικών δεικτών (PLGF, PAPP-A και β-hCG) θα αναγνώριζε περίπου το 70% και το 80% των προσβεβλημένων κύησης με ψευδώς θετικά ποσοστά 3% και 5% αντίστοιχα (Zaragoza et al, 2009), ενώ ένας διευρυμένος συνδυαστικός έλεγχος με την αυχενική διαφάνεια και την μέτρηση ρινικού οστού καθώς και με προσθήκη βιοδεικτών όπως της AFP και της Inhibin-A (οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω), μπορεί να ανιχνεύσει το 98% των εμβρύων με τρισωμία 21 και 95% αυτών με τρισωμία 18 και 13 (Carmichael et al, 2017).





### Πίνακας 1: Ποσοστά ανίχνευσης τρισωμίας 21 των διαφορετικών μεθόδων διαλογής\*

Μέθοδοι διαλογής πληθυσμού	DR(%)
Μητρική ηλικία (ΜΗ)	30
ΜΗ και βιοχημικοί δείκτες στις 15–18 εβδομάδες	50-70
ΜΗ, εμβρυϊκή ΑΔ, ελεύθερη β-hCG και PAPP-A στον ορό της μητέρας στις 11–13 <sup>+6</sup> εβδομάδες	85-90
ΜΗ, εμβρυϊκή ΑΔ και ρινικό οστό (ΡΟ) στις 11–13 <sup>+6</sup> εβδομάδες	90
ΜΗ, εμβρυϊκή ΑΔ, ΡΟ, ελεύθερη β-hCG και PAPP-A στον ορό της μητέρας στις 11–13 <sup>+6</sup> εβδομάδες	95
ΜΗ, εμβρυϊκή ΑΔ, ΡΟ, ελεύθερη β-hCG και PAPP-A στον ορό της μητέρας στις 11–13 <sup>+6</sup> εβδομάδες και AFP, PLGF, Inhibin-A	98

\*για ψευδώς θετικά αποτελέσματα της τάξεως του 5%. DR: detection rate (ποσοστό ανίχνευσης), hCG: ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη, PAPP-A: pregnancy-associated plasma protein A, AFP: α-φετοπρωτεΐνη, PLGF: Placental Growth Factor. Πηγή: Fetal Medicine Foundation, 2004; Carmichael et al, 2017.

## 2.2. Έλεγχος δεύτερου τριμήνου

### 2.2.1. Βιοχημικοί δείκτες 2<sup>ου</sup> τριμήνου

Οι εξετάσεις αίματος που γίνονται στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης είναι για τον υπολογισμό των επιπέδων τεσσάρων βασικών πρωτεϊνών: της α-φετοπρωτεΐνης, της ινχιμπίνης Α, της οιστριόλης (E3) και της β-χοριακής γοναδοτροπίνης.

**Α-φετοπρωτεΐνη:** Η α-φετοπρωτεΐνη (AFP) είναι μια πρωτεΐνη που παράγεται κυρίως στο ήπαρ του εμβρύου και απελευθερώνεται στον εμβρυϊκό ορό και στο αμνιακό υγρό. Μια μικρή ποσότητα διασχίζει τον πλακούντα και γίνεται μετρήσιμη στον μητρικό ορό προς το τέλος του πρώτου τριμήνου ενώ τα επίπεδά της αυξάνονται σταθερά μέσα στο δεύτερο τρίμηνο. Κατά κύριο λόγο, η AFP είναι αυξημένη στα ελλείμματα ανοικτού νωτιαίου σωλήνα (ONTDs) και στην ομφαλοκήλη, ενώ είναι μειωμένη στο σύνδρομο Down. Η χρησιμότητά της στον προγεννητικό έλεγχο της δισχιδούς ράχης, της ανεγκεφαλίας, της ατρησίας οισοφάγου και του συνδρόμου Down είναι αξιοσημείωτη, ενώ μαζί με την β-hCG και την ελεύθερη οιστριόλη συνθέτουν το Α-τεστ.

**Ινχιμπίνη Α:** Η ινχιμπίνη Α (Dimeric Inhibin-A) είναι μια πρωτεΐνη που παράγεται από τις ωοθήκες και τον εμβρυϊκό πλακούντα. Τα επίπεδά της αυξάνονται κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου, μειώνονται μετά την 10<sup>η</sup> εβδομάδα της εγκυμοσύνης και παραμένουν σταθερά μεταξύ της 15<sup>ης</sup> και της 20<sup>ης</sup> εβδομάδας. Από την 13<sup>η</sup> εβδομάδα και μετά αποτελεί πολύ καλό δείκτη διάγνωσης συνδρόμου Down στο έμβρυο, διότι τα επίπεδά της είναι πιο αυξημένα σε σχέση με φυσιολογικές κυήσεις. Εν αντιθέσει, τα επίπεδα της ινχιμπίνης Α που σχετίζονται με την τρισωμία 18 δεν είναι σημαντικά διαφορετικά από μια φυσιολογική κύηση.

**Ελεύθερη οιστριόλη:** Η μη συζευγμένη (ή ελεύθερη) οιστριόλη (uE3) είναι μια ορμόνη που παράγεται από τους εμβρυϊκούς αδένες, το εμβρυϊκό ήπαρ και τον πλακούντα. Τα επίπεδά της αυξάνονται καθ' όλη την κανονική εγκυμοσύνη. Ο συνδυασμός αυξημένης ινχιμπίνης Α μαζί με αυξημένη β-hCG, μειωμένη AFP και μειωμένη οιστριόλη (τετραπλό τεστ), υποδηλώνει την παρουσία εμβρύου με



σύνδρομο Down (Aitken et al, 1996). Το κύριο πλεονέκτημα από τον συνδυασμό AFP και της uE3 ως μέθοδος διαλογής για σύνδρομο Down δεν είναι η αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, αλλά η μείωση των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

### 2.2.2. Υπερηχογραφικοί δείκτες 2<sup>ου</sup> τριμήνου

Μεταξύ 20<sup>ης</sup> και 24<sup>ης</sup> εβδομάδας πραγματοποιείται το αναλυτικό υπερηχογράφημα Β' επιπέδου («μεγάλος υπέρηχος»), το οποίο μελετά λεπτομερώς την ανατομία του εμβρύου. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στον εγκέφαλο, στο πρόσωπο, στη σπονδυλική στήλη, στην καρδιά, στο στομάχι, στο έντερο, στους νεφρούς και στα άκρα, προς αποκλεισμό ανωμαλιών. Η εξέταση όμως αυτή έχει χαμηλή ευαισθησία ανίχνευσης χρωμοσωμικών ανωμαλιών, καθώς το 50% των εμβρύων με Down εμφανίζεται φυσιολογικό. Χρησιμοποιείται μαζί με την αυχενική διαφάνεια του πρώτου τριμήνου για την ανίχνευση άλλων ανωμαλιών (Papaioannou et al, 2011).

### 2.3. Έλεγχος τρίτου τριμήνου

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

Αν και γίνεται προσπάθεια να εξετασθούν με λεπτομέρεια όλα τα ανωτέρω ανατομικά στοιχεία, το υπερηχογράφημα ανάπτυξης – Doppler δεν είναι το κατάλληλο για να εξετασθεί η ανατομία του εμβρύου, γιατί το έμβρυο είναι πλέον μεγάλο και δεν είναι δυνατό να απεικονιστεί το ίδιο καθαρά, όπως στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο. Τέλος, εξετάζονται ο τράχηλος της μήτρας και η ροή του αίματος στις μητριάδες αρτηρίες. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσδιοριστεί ο κίνδυνος πρόωρου τοκετού, προεκλαμψίας και υπολειπόμενης σωματικής ανάπτυξης του εμβρύου. Στις περιπτώσεις που το έμβρυο έχει την κατάλληλη θέση, γίνεται απεικόνισή του με την μέθοδο της τρισδιάστατης (3D και 4D) υπερηχογραφίας (Σίμου, 2017; Γρυπάρης, 2019). Η συχνότητα του καρδιακού παλμού του εμβρύου, οι κινήσεις του και οι συσπάσεις της μήτρας ελέγχονται επίσης με το καρδιοτοκογράφημα (NST), το οποίο σε συνδυασμό με το Doppler αποτελούν το βιοφυσικό προφίλ του εμβρύου και προσφέρει επιπρόσθετες πληροφορίες για τον πιθανό κίνδυνο ενδομήτριου θανάτου (Whitworth et al, 2010; Abramowicz, 2013).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Παλαιότερες & σύγχρονες μέθοδοι μη επεμβατικού ελέγχου

Τα τελευταία 20 περίπου χρόνια η έρευνα στην προγεννητική διάγνωση έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη μιας ασφαλούς αλλά και ακριβούς μεθόδου σε σχέση με τις εφαρμοζόμενες επεμβατικές και μη τεχνικές, καθώς οι πρώτες ενέχουν κινδύνους απώλειας του εμβρύου, ενώ οι μη επεμβατικές (ορολογικό screening και υπερηχογραφήματα) έχουν υψηλή ψευδώς θετική διαγνωστική τιμή (Χατζησεβαστού-Λουκίδου, 2002). Οι λόγοι λοιπόν αυτοί σηματοδότησαν το μονοπάτι για την εύρεση άλλων μη επεμβατικών μεθόδων με πρακτική εφαρμογή, ικανών να διαγνώσουν ευρύ φάσμα γενετικών καταστάσεων του εμβρύου. Δύο μέθοδοι είναι ικανές να στοχεύσουν σε αυτά τα θέματα: η απομόνωση εμβρυϊκών κυττάρων στο αίμα της εγκύου και το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στην μητρική κυκλοφορία.

### 3.1. Απομόνωση εμβρυϊκών κυττάρων από το αίμα της εγκύου

Ήδη από το 1893 έγινε γνωστή η παρουσία εμβρυϊκών κυττάρων στην μητρική κυκλοφορία, όταν ο γερμανός παθολογοανατόμος Schmorl παρατήρησε κύτταρα τροφοβλάστης σε πνεύμονες γυναίκας που απεβίωσε από προεκλαμψία. Οι τύποι των κυκλοφορούντων εμβρυϊκών κυττάρων είναι λεμφοκύτταρα, τροφοβλαστικά και εμπύρηννα ερυθροκύτταρα. Τα εμβρυϊκά λεμφοκύτταρα κυκλοφορούν σχεδόν από την 15<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης στην μητρική κυκλοφορία, όμως έχουν την ικανότητα να παραμένουν για χρόνια μετά τον τοκετό και συνεπώς υπάρχει μεγάλος κίνδυνος λήψης κυττάρων από προηγούμενη εγκυμοσύνη. Τα τροφοβλαστικά, ενώ στη αρχή φάνηκαν αρκετά ελκυστικά λόγω της μορφολογίας τους και της στενής τους σχέσης με το μητρικό αίμα, διαπιστώθηκε ότι δεν είναι ιδανικοί υποψήφιοι καθώς η έλλειψη ειδικών αντισωμάτων καθιστά δύσκολο τον εμπλουτισμό τους. Επιπλέον, δεδομένου ότι πολλά είναι πολυπυρηνικά, είναι λιγότερο κατάλληλα για εμβρυϊκή χρωμοσωμική ανάλυση (Holzgreve & Hahn, 2001). Κατά συνέπεια, ο τύπος κυττάρων που αναδείχθηκε ως ο πλέον κατάλληλος ήταν οι εμβρυϊκοί ερυθροβλάστες, που ονομάζονται επίσης εμπύρηννα ερυθροκύτταρα (NRBCs). Τα NRBCs αντιπροσωπεύουν έναν καλό στόχο εμβρυϊκού κυτταρικού πληθυσμού, καθώς είναι σχεδόν πλήρως διαφοροποιημένα και έχουν διάρκεια ζωής περίπου 3 μήνες, οπότε έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να προέρχονται από την κύηση που ερευνάται την συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Επίσης αυτός ο τύπος κυττάρων είναι άφθονος στην πρώιμη εμβρυϊκή κυκλοφορία και σπάνιος στο περιφερικό αίμα των φυσιολογικών ενηλίκων. Παρόλα τα θετικά στοιχεία που συγκέντρωναν τα NRBCs, παρατηρήθηκαν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως το ότι κυκλοφορούν και μητρικά NRBCs στην μητρική κυκλοφορία ενώ σημειώθηκε ότι γυναίκες με προεκλαμψία είχαν σημαντικά αυξημένο αριθμό κυκλοφορούντων NRBCs πριν ακόμη αυτή εκδηλωθεί (Al-Mufti et al, 2000). Οι τεχνικές λοιπόν απομόνωσης και εμπλουτισμού των εμβρυϊκών κυττάρων, πέρα από πολύπλοκες, είναι χρονοβόρες και απαιτούν ακριβό εξοπλισμό. Για τους λόγους αυτούς, το ενδιαφέρον άρχισε να στρέφεται προς το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA.



### 3.2. Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στην μητρική κυκλοφορία (cffDNA)

Το 1997, ο Dennis Lo και οι συνεργάτες του, εντόπισαν την παρουσία του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο πλάσμα και στον ορό της μητέρας εφαρμόζοντας την τεχνική της PCR για αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος σε δείγματα εγκύων (Lo et al, 1997) ενώ σε επόμενη μελέτη το 1998 παρατήρησαν ότι τα επίπεδα του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA είναι πολύ χαμηλά στην αρχή της εγκυμοσύνης και αυξάνονται δραματικά καθώς αυτή εξελίσσεται (Lo et al, 1998). Αποδείχθηκε ότι ένα σημαντικό κλάσμα του cffDNA απελευθερώνεται στην μητρική κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της απόπτωσης των τροφοβλαστών στον πλακούντα, πράγμα που σημαίνει ότι, σε αντίθεση με το DNA που απομονώνεται από τα κυκλοφορούντα εμβρυϊκά κύτταρα, το cffDNA είναι στην πραγματικότητα πλακουντιακής προέλευσης (Alberry et al, 2007). Σύμφωνα με υπολογισμούς σε προηγούμενες μελέτες, η συγκέντρωση του cffDNA είναι σχεδόν 25 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA που εξάγεται από τα NRBCs σε παρόμοιο όγκο ολόκληρου μητρικού αίματος. Στο πρώτο τρίμηνο αποτελεί το 3%-6% του ολικού μητρικού cfDNA, φτάνοντας το 10% στην 11<sup>η</sup> - 13<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης (Ashoor et al, 2012). Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι το ποσοστό φτάνει και έως 13% μετά την 10<sup>η</sup> βδομάδα (Committee on Genetics, 2015), ενώ έχει αποδειχθεί ότι απομακρύνεται από το μητρικό πλάσμα μέσα σε λίγες ώρες μετά την γέννηση (2 ώρες) (Lo et al, 1999).

**Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά του μητρικού και του εμβρυϊκού cell-free DNA**

Χαρακτηριστικά	Μητρικό cfDNA	Εμβρυϊκό cfDNA
<b>Προέλευση</b>	Αιματοποιητικά κύτταρα	Πλακούντας
<b>Κινητικά</b>	Αύξηση συγκέντρωσης με την πρόοδο της εγκυμοσύνης.	Αύξηση συγκέντρωσης με την πρόοδο της εγκυμοσύνης. Άμεση απομάκρυνση από την μητρική κυκλοφορία μετά τη γέννηση.
<b>Ποσοστό κλάσματος στο μητρικό αίμα</b>	90%	10%
<b>Μέγεθος</b>	Μικρά θραύσματα DNA <200bp Μεγαλύτερα από το εμβρυϊκό DNA	Μικρά θραύσματα DNA <200bp Μικρότερα από το μητρικό DNA

*bp: ζεύγη βάσεων (base pair), μονάδα μέτρησης μήκους DNA (1bp= 340 picometers)*  
*Πηγή: Kirbas et al, 2016*



Στην κυκλοφορία, το εμβρυϊκό DNA είναι σημαντικά μικρότερο από το μητρικό, με θραύσματα μεγέθους περίπου 146 bp και οδηγείται προς τη μητρική κυκλοφορία μέσω της αποβολής των μικροσωματιδίων του πλακούντα (Yu et al, 2014). Το εμβρυϊκό κλάσμα (FF) έχει θετική συσχέτιση με την ηλικία κύησης (αυξάνεται όσο αυξάνονται οι εβδομάδες) και αρνητική με το μητρικό βάρος (όσο αυξημένος είναι ο δείκτης μάζας σώματος, τόσο μειώνεται το εμβρυϊκό κλάσμα) (Poon et al, 2013). Το FF αναφέρεται και υπολογίζεται με real-time qPCR (ποσοτικοποιημένη) (Zimmermann et al, 2005). Ένα ποσοστό περίπου στο 8% είναι ικανοποιητικό για τις περισσότερες μεθόδους NIPT με βάση το cffDNA, ενώ μεταξύ 4-8% θεωρείται οριακό και η ευαισθησία μειώνεται (Norton et al, 2012). Ποσοστό μικρότερο από 4% είναι υπεύθυνο για το 0,5%-3% των «no calls», δηλαδή των απαντήσεων χωρίς θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα (Norwitz & Levy, 2013; Livergood et al, 2017).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Έλεγχος για ανευπλοειδίες με χρήση του cffDNA

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος (NIPT) που χρησιμοποιεί cffDNA από το πλάσμα των εγκύων γυναικών προσφέρει τεράστιες δυνατότητες ως μέθοδος ανίχνευσης της εμβρυϊκής ανευπλοειδίας. Έχει γίνει ευρέως διαδεδομένο και εμπορικά διαθέσιμο από το 2011 για γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ανευπλοειδίας εμβρύου ενώ η χρήση του έχει επεκταθεί και σε πληθυσμούς γενικού κινδύνου. Ορισμένα εργαστήρια έχουν καθιερώσει διάφορες τεχνικές για τη χρήση του cffDNA ως εξέταση διαλογής για την ανευπλοειδία του εμβρύου και συγκεκριμένα για τις τρισωμίες 21 (σύνδρομο Down), 18 (σύνδρομο Edwards) και 13 (σύνδρομο Patau) καθώς και για τις ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Όλες οι δοκιμές έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για την τρισωμία 21, ανεξάρτητα από το ποιά μοριακή τεχνική χρησιμοποιείται, ενώ οι υπόλοιπες ακολουθούν με ελαφρώς χαμηλότερο ποσοστό (Gil et al, 2017).

### 4.1. Αυτοσωμικές τρισωμίες

#### 4.1.1. Σύνδρομο Down (τρισωμία 21)

Εδώ και αρκετά χρόνια είναι γνωστό ότι η προχωρημένη ηλικία της μητέρας αποτελεί αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης συνδρόμου Down (Hassold et al, 1985). Είναι η πιο συνηθισμένη αυτοσωμική τρισωμία με εμφάνιση 1/700 γεννήσεις (Parker et al, 2010) και οφείλεται στην παρουσία ενός επιπλέον χρωμοσώματος 21. Είναι μια εύκολα αναγνωρίσιμη κατάσταση, με κλασικά χαρακτηριστικά του προσώπου, διανοητική αναπηρία και σημαντική νοσηρότητα (Bull, 2011). Σχεδόν τα μισά παιδιά που γεννιούνται με το σύνδρομο εμφανίζουν συγγενείς καρδιακές βλάβες, με κυριότερες το μεσοκοιλιακό έλλειμμα και την πρόπτωση μιτροειδούς, συχνά δε και πνευμονική υπέρταση. Η συχνότητα εμφάνισης της τρισωμίας 21 είναι σημαντικά υψηλότερη κατά το πρώτο και το δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης σε σύγκριση με τις ζώντες γεννήσεις, λόγω του υψηλού ποσοστού αυτόματης αποβολής, το οποίο αγγίζει το 50%. Οι άνδρες με σύνδρομο Down είναι στείροι (εξαιρέση αποτελούν οι πάσχοντες από μωσαϊκισμό του συνδρόμου) και οι γυναίκες έχουν 50% πιθανότητα να γεννήσουν τέκνο, που επίσης θα φέρει το σύνδρομο. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης, σε συνδυασμό με την σοβαρότητα της νόσου, καθιστά την ανίχνευση του συνδρόμου Down ως πρωταρχικό στόχο του προγεννητικού (Goldwaser & Klugman, 2018). Τα περισσότερα εργαστήρια, με την χρήση του cffDNA, αναφέρουν ποσοστό ανίχνευσης του συνδρόμου περίπου στο 99% (Nicolaidis et al, 2012), με μια πρόσφατη μελέτη να υποδεικνύει το ποσοστό στο 99,3% (Taylor-Phillips et al, 2016).

#### 4.1.2. Σύνδρομο Edwards (τρισωμία 18)

Το σύνδρομο Edwards είναι μια σπάνια αλλά σοβαρή γενετική κατάσταση που προκαλεί ένα ευρύ φάσμα σοβαρών ιατρικών προβλημάτων με ανωμαλίες σε πολλά μέρη του σώματος. Τα άτομα με τρισωμία 18 έχουν συχνά ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και χαμηλό βάρος γέννησης. Τα προσβεβλημένα άτομα μπορεί να έχουν καρδιακές βλάβες και ανωμαλίες άλλων οργάνων που αναπτύσσονται πριν από τη γέννηση. Άλλα χαρακτηριστικά της τρισωμίας 18 περιλαμβάνουν μικρό, μη φυσιολογικού σχήματος κεφάλι, μικρή γνάθο και στόμα και





σφιγμένες γροθιές με επικαλυπτόμενα δάχτυλα (Chen et al, 2005). Λόγω της παρουσίας αρκετών απειλητικών για τη ζωή ιατρικών προβλημάτων, τα περισσότερα μωρά καταλήγουν πριν ή λίγο μετά τη γέννησή τους. Ορισμένα νεογνά με λιγότερο σοβαρά είδη του συνδρόμου, όπως μωσαϊκισμό ή μερική τρισωμία 18, επιβιώνουν πέρα από ένα χρόνο και πολύ σπάνια στην πρώιμη ενηλικίωση, είναι όμως πιθανό να έχουν σοβαρές σωματικές και νοητικές αναπηρίες. Η συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου είναι 1/5.000 γεννήσεις και είναι πιο διαδεδομένο στους θηλυκούς απογόνους ενώ αυξάνεται με την ηλικία της μητέρας (Cereda & Carey, 2012). Μελέτη του 2016 έδειξε ότι η ευαισθησία του NIPT με cffDNA για το σύνδρομο αυτό αγγίζει το 97,4% (Taylor-Phillips et al, 2016).

#### 4.1.3. Σύνδρομο Patau (τρисωμία 13)

Το σύνδρομο Patau είναι μια χρωμοσωμική κατάσταση που συνδέεται με σοβαρή νοητική αναπηρία και φυσικές ανωμαλίες σε πολλά μέρη του σώματος. Μερικές από τις σοβαρές ανωμαλίες που εμφανίζουν είναι καρδιακές, εγκεφαλικές ή του νωτιαίου μυελού, μικροφθαλμία και υποτονία. Όπως και στην τρισωμία 18, έτσι και εδώ, λόγω των πολλών απειλητικών για τη ζωή ιατρικών προβλημάτων, πολλά βρέφη με τρισωμία 13 καταλήγουν στις πρώτες ημέρες ή εβδομάδες της ζωής τους. Μόνο ένα 5-10% των παιδιών με αυτή την κατάσταση ζουν μετά το πρώτο έτος τους. Η συχνότητα εμφάνισής της είναι 1/16.000 γεννήσεις, καθιστώντας τη μια απ' τις ελάχιστες τρισωμίες που εμφανίζονται σε άτομα εν ζωή (Crider et al, 2008). Σε μελέτη το 2007, φάνηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης του συνδρόμου και της ηλικίας της μητέρας, με ένα σημαντικό ποσοστό της τάξεως του 37% να οφείλεται στην μητρική μείωση II (Hall et al, 2007). Η χρήση του NIPT με cffDNA έχει ποσοστό ευαισθησίας περίπου 97,4% (Taylor-Phillips et al, 2016).

#### 4.2. Ανωμαλίες φυλετικών χρωμοσωμάτων (SCAs)

Τα φυλετικά χρωμοσώματα καθορίζουν το αν ένα έμβρυο θα είναι αρσενικό (XY) ή θηλυκό (XX). Οι ανωμαλίες σε αυτά εμφανίζονται όταν ένα άτομο στερείται ενός ολόκληρου φυλετικού χρωμοσώματος (μονοσωμία), έχει περισσότερα από ένα αντίγραφα (ένα επιπλέον καλείται τρισωμία) ή όταν λείπει ένα μέρος τους (διαγραφή). Οι ανωμαλίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων (SCAs) είναι οι συνηθέστερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες στον άνθρωπο (1/400 – 1/500 γεννήσεις) (Tartaglia et al, 20012) και μπορεί να έχουν νευροαναπτυξιακές επιπτώσεις, που έχουν σαν αποτέλεσμα την στέρηση νοητικής ευελιξίας, της διαρκής προσοχής, της εργασιακής μνήμης, της λεκτικής δεξιότητας και της εκτελεστικής λειτουργίας (Van Rijn & Swaab, 2015). Παρόλα αυτά, έχουν ηπιότερους φαινότυπους από αυτούς που εκδηλώνουν οι ανωμαλίες των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων. Οι πιο συχνές ανευπλοειδίες είναι 45,X (σύνδρομο Turner), 47,XXY (σύνδρομο Klinefelter), 47,XYY και 47,XXX.

##### 4.2.1. Σύνδρομο Turner

Οι περισσότεροι ασθενείς με σύνδρομο Turner έχουν μονοσωμία για το χρωμόσωμα X με καρυότυπο 45,X, ενώ δεν είναι ασυνήθιστος ο μωσαϊκισμός των



φυλετικών χρωμοσωμάτων, συμπεριλαμβανομένης μίας φυσιολογικής κυτταρικής σειράς (π.χ. 45X/46XX). Η συχνότητά του είναι 1/2500 γεννήσεις (Stochholm et al, 2006) και εκδηλώνεται με διάφορους τρόπους. Υπάρχουν χαρακτηριστικές φυσικές ανωμαλίες, όπως το χαμηλό ανάστημα, η διόγκωση των χεριών και των ποδιών, ο ευρύς θώρακας, η χαμηλή γραμμή τριχοφυΐας και η χαμηλή πρόσφυση των αυτιών. Τα θήλεα με το σύνδρομο Turner έχουν κάποια χαρακτηριστική γεννητική δυσλειτουργία (μη ώριμες ωοθήκες), η οποία οδηγεί στην αμηνόρροια (απουσία εμμηνορροϊκού κύκλου) και σε στειρότητα. Περίπου 98% όλων των εμβρύων που εμφανίζουν σύνδρομο Turner καταλήγουν σε αυτόματη αποβολή, όμως όσα γεννιούνται επιβιώνουν. Οι παράγοντες που συνεισφέρουν στο σύνδρομο αυτό δεν είναι καλά γνωστοί. Η προχωρημένη μητρική ηλικία, όπως και στο σύνδρομο Down, ίσως να έχει κάποια επίδραση, αλλά δεν είναι σαφής. Ο συμβατικός έλεγχος για ανευπλοειδίες δεν ανιχνεύει ανωμαλίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Gregg et al, 2016). Συνήθως τα έμβρυα με σύνδρομο Turner εντοπίζονται από τα ανώμαλα υπερηχογραφικά αποτελέσματα κατά το πρώτο τρίμηνο, όπως ανωμαλίες καρδιάς ή/και νεφρών, συνεπώς συνιστάται επιβεβαίωση με επεμβατική μέθοδο αντί για ανάλυση του cfDNA (Nicolaidis et al, 2013).

#### 4.2.2. Σύνδρομο Klinefelter

Το σύνδρομο Klinefelter εμφανίζεται όταν ένα άρρεν άτομο έχει ένα επιπλέον χρωμόσωμα X (XXY αντί για XY). Πρόκειται για μια χρωμοσωμική ανωμαλία που χαρακτηρίζεται από ελάχιστα ή ανύπαρκτα σπερματοζωάρια στο σπέρμα, όμως σε πολλές περιπτώσεις, οι όρχεις εξακολουθούν να παράγουν σπέρμα. Είναι η πιο συχνή ανωμαλία φυλετικών χρωμοσωμάτων με συχνότητα εμφάνισης 1/500 - 1/1000 γεννήσεις αγοριών (Eunice Kennedy Shriver, 2012). Το σύνδρομο Klinefelter μπορεί να επηρεάσει τη φυσική και πνευματική ανάπτυξη. Συχνότερα, τα άτομα που επηρεάζονται είναι ψηλότερα από το μέσο όρο ενώ είναι στείρα. Ωστόσο, τα σημεία και τα συμπτώματα του συνδρόμου ποικίλλουν μεταξύ των αγοριών και των ανδρών με αυτή την κατάσταση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα χαρακτηριστικά της πάθησης είναι τόσο ήπια ώστε αυτή δεν διαγιγνώσκεται μέχρι την εφηβεία ή την ενηλικίωση, και οι ερευνητές πιστεύουν ότι μέχρι και το 75% των προσβεβλημένων ανδρών και αγοριών δεν διαγιγνώσκονται ποτέ (Boada et al, 2009). Ο συγκεκριμένος καρυότυπος (XXY) είναι σχεδόν πάντα αποτέλεσμα του μη διαχωρισμού των αδελφών χρωματίδων στην μείωση κατά των σχηματισμό των γονικών γαμετών, το οποίο επηρεάζεται από την αύξηση τόσο της μητρικής όσο και της πατρικής ηλικίας (De Souza & Morris, 2010).

#### 4.2.3. Σύνδρομο Jacobs

Το σύνδρομο 47, XYY ή αλλιώς σύνδρομο Jacobs χαρακτηρίζεται από ένα επιπλέον αντίγραφο του χρωμοσώματος Y σε κάθε ένα από τα κύτταρα ενός αρσενικού. Αν και πολλά αρσενικά με αυτή την κατάσταση είναι ψηλότερα από το μέσο όρο, η χρωμοσωμική αλλαγή μερικές φορές δεν προκαλεί ασυνήθιστα φυσικά χαρακτηριστικά. Τα περισσότερα αρσενικά με το σύνδρομο αυτό έχουν φυσιολογική παραγωγή της τεστοστερόνης και φυσιολογική σεξουαλική ανάπτυξη και συνήθως είναι σε θέση να τεκνοποιήσουν (Bardsley et al, 2013). Η συχνότητα εμφάνισης του





συνδρόμου Jacobs είναι 1/1000 γεννήσεις αγοριών και είναι αποτέλεσμα σφάλματος κατά τη πατρική μείωση II που οδηγεί στη παραγωγή σπερματοζωαρίων YY. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι αποτέλεσμα μιτωτικού μετα-ζυγωτικού σφάλματος. Και οι δυο όμως περιπτώσεις είναι εξαιρετικά σπάνιες (Robinson & Jacobs, 1999).

#### 4.2.4. Σύνδρομο τριπλού X

Τα θήλεα με καρυότυπο 47,XXX, ή αλλιώς σύνδρομο τριπλού X, χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός επιπρόσθετου χρωμοσώματος X σε κάθε ένα από τα κύτταρά τους. Τα προσβεβλημένα θηλυκά είναι συνήθως ψηλότερα απ'τον μέσο όρο χωρίς κάποιο επιπλέον μη φυσιολογικό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό. Οι περισσότερες γυναίκες με σύνδρομο τριπλού X έχουν φυσιολογική σεξουαλική ανάπτυξη και είναι σε θέση να συλλάβουν παιδιά. Το σύνδρομο εμφανίζεται σε 1/1000 γεννήσεις κοριτσιών, όπου το 90% αυτών δεν διαγιγνώσκονται καθώς έχουν ελάχιστα ή και καθόλου συμπτώματα (Tartaglia et al, 2010). Το σύνδρομο 47,XXX σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για μαθησιακές δυσκολίες και καθυστερημένη ανάπτυξη του λόγου και των γλωσσικών δεξιοτήτων. Η καθυστερημένη ανάπτυξη των κινητικών δεξιοτήτων, ο ασθενής μυϊκός τόνος (υποτονία) και οι συμπεριφορικές και συναισθηματικές δυσκολίες είναι επίσης δυνατές, αλλά αυτά τα χαρακτηριστικά ποικίλλουν ευρέως μεταξύ των κοριτσιών και των γυναικών που έχουν προσβληθεί. Οι επιληπτικές κρίσεις ή οι ανωμαλίες των νεφρών συμβαίνουν στο 10% περίπου των θιγόμενων θηλυκών (Haverty et al, 2004).

#### 4.3. Ποσοστά ανίχνευσης για τις SCAs

Πέρα από το σύνδρομο Turner που μπορεί να εντοπισθεί από το υπερηχογράφημα, η διάγνωση των εμβρύων με ανευπλοειδείς φυλετικών χρωμοσωμάτων ή με μωσαϊκισμό αυτών, παραμένει προβληματική, επειδή οι περισσότερες προσβεβλημένες εγκυμοσύνες δεν έχουν εμφανή κλινικά σημεία ή υπερηχογραφικά ευρήματα (Luthardt & Keitges 2001; Demaliaj et al, 2012). Η εφαρμογή του NIPT για τις SCAs δεν είναι τόσο ακριβής όσο είναι για τις τρισωμίες 21, 18 και 13 για τους παρακάτω λόγους. Εξαιρώντας τα ήπια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (εκτός του Turner), λόγω της μεγάλης πιθανότητας ύπαρξης βιολογικών παραλλαγών στο X χρωμόσωμα, όπως περιορισμένος πλακουντιακός μωσαϊκισμός, απώλεια του X χρωμοσώματος που σχετίζεται με την μητρική ηλικία ή/και μη διαγνωσμένος μητρικός μωσαϊκισμός για SCAs (Benn et al, 2013). Σε μελέτη του 2013 διαπιστώθηκε ότι η αυξημένη συχνότητα των αποτελεσμάτων που δεν συμφωνούσαν μεταξύ τους (λόγω τροποποιημένου μητρικού καρυότυπου) υποδηλώνει ότι το μη φυσιολογικό μητρικό κλάσμα του X χρωμοσώματος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην διάγνωση (Wang et al, 2013). Στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε ότι λόγω του μητρικού μωσαϊκισμού, το 8,56% των εμβρύων που διαγνώστηκαν σαν ανευπλοειδικά, ήταν ψευδώς θετικά. Ένας ακόμη λόγος είναι το χαμηλό ποσοστό ανίχνευσης (DR) και το υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (FPR). Σε μία μετα-ανάλυση το 2015 αποδείχθηκε ότι για την μονοσωμία X και 47,XXY, 47,XYY, 47,XXX, το DR είναι 90,3% και 93% και το FPR



είναι 0,23% και 0,14% αντίστοιχα (Gil et al, 2015). Επιπρόσθετα, το 2018, σε μία μεγάλης κλίμακας μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κίνα, τα αποτελέσματα έδειξαν ποσοστό αληθώς θετικών αποτελεσμάτων 32,4% για την μονοσωμία X, 55,6% για την 47,XXX, 60% για την 47,XXY και 87,5% για την 47,XYX. Το συνολικό DR των αληθώς θετικών αποτελεσμάτων για όλες τις προαναφερθείσες ανευπλοειδίες υπολογίστηκε στο 46,88% (Suo et al, 2018), ενώ μόλις ένα χρόνο μετά, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 8.594 κυήσεις, το PPV έφτασε το 54,55% (Zheng et al, 2019). Τελος, λόγω του μωσαϊκισμού του πλακούντα ή του ίδιου του εμβρύου (Bianchi et al, 2015), που εμφανίζεται σε ποσοστό έως και 50% ή λόγω πιθανής διδυμης κύησης με «εξαφάνιση» του ενός εμβρύου ή αλλιώς «vanishing twin» (Alberry et al, 2007). Η μητρική κακοήθεια με όγκο που εκκρίνει ανώμαλες κυτταρικές σειρές έχει επίσης αναφερθεί ως η αιτία ενός ασύμφωνου αποτελέσματος NIPT (Osborne et al, 2013).

Σε γενικές γραμμές ο αριθμός των εμβρύων που έχουν μελετηθεί προγεννητικά για τις SCAs είναι αρκετά περιορισμένος και συνιστάται περαιτέρω μελέτη ώστε να μπορεί το NIPT με cfDNA να χρησιμοποιείται με ακρίβεια για τον εντοπισμό των ανευπλοειδιών των φυλετικών χρωμοσωμάτων.

#### 4.4. Παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNVs)

Τα CNVs είναι δομικές παραλλαγές που οφείλονται είτε σε διπλασιασμούς είτε σε ελλείψεις τμημάτων DNA στο χρωμόσωμα. Πολλά παθογόνα CNVs είναι τόσο μικρά ώστε να φανούν με τον συμβατικό G-banding καρυότυπο και μπορούν να ανιχνευτούν μόνο με μοριακό καρυότυπο. Τα παθογόνα CNVs είναι υπεύθυνα για ορισμένα καλά καθορισμένα γενετικά σύνδρομα όπως το σύνδρομο μικροελλείμματος 22q11.2 (σύνδρομο Di George), το σύνδρομο cri du chat, το σύνδρομο Prader-Willi και Angelman. Επιπλέον, μέχρι και 1,7% των υπερηχογραφικά φυσιολογικών εμβρύων με φυσιολογικό G-banding καρυότυπο μπορεί να έχουν κλινικά σημαντικά CNVs στην ανάλυση μικροσυστοιχιών (Warner et al, 2013).

##### 4.4.1. Σύνδρομο Di George

Το σύνδρομο μικροελλείμματος 22q11.2 (Di George) είναι μια χρωμοσωμική ανωμαλία, η οποία προκαλείται από τη διαγραφή ενός μικρού τμήματος του χρωμοσώματος 22. Τυπικά οφείλεται στη διαγραφή 30 έως 50 γονιδίων στη μέση του χρωμοσώματος αυτού, σε μια θέση γνωστή ως 22q11.2 και κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο (Maynard et al, 2008; Tang et al, 2015). Προκαλεί συγγενείς ανωμαλίες, με κοινά χαρακτηριστικά που περιλαμβάνουν καρδιακές ανωμαλίες, ανωμαλίες της υπερώας, δυσμορφίες προσώπου, αναπτυξιακή καθυστέρηση και ανοσοανεπάρκεια. Η συχνότητα εκτιμάται σε 1/2.000 - 1/4.000 γεννήσεις ζώντων νεογνών (Oskarsdóttir et al, 2004; Fung et al, 2015). Το σύνδρομο μικροελλείμματος 22q11.2 παρουσιάζει ετερογενή ή ποικίλο κλινικό φαινότυπο, που μπορεί να κυμαίνεται από ήπιος έως σοβαρός (Genetics Home Reference, 2013). Αυτό το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από ατελή διεισδυτικότητα. Ως εκ τούτου, υπάρχει



μια αξιοσημείωτη μεταβλητότητα στην κλινική έκφραση μεταξύ των διαφόρων ασθενών. Αυτό συχνά καθιστά δύσκολη την έγκαιρη διάγνωση (Swillen et al, 2000).

#### 4.4.2. Σύνδρομο Cri du Chat

Το σύνδρομο Cri du Chat, είναι μια σπάνια γενετική διαταραχή, που συμβαίνει λόγω ελλείμματος στο χρωμόσωμα 5. Η απώλεια μιας μικρής περιοχής στην ομάδα 5p15.2 (κρίσιμη περιοχή) συσχετίζεται με την κλινική εικόνα του συνδρόμου. Στα άτομα με το σύνδρομο αυτό, το εύρος και η σοβαρότητα των σχετικών συμπτωμάτων ποικίλουν, ανάλογα με την ακριβή έκταση ή τοποθεσία του αποκομμένου κομματιού του χρωμοσώματος 5p. Το σύνδρομο παίρνει το όνομά του από το χαρακτηριστικό κλάμα των προσβεβλημένων βρεφών, το οποίο είναι παρόμοιο με αυτό μιας γάτας, λόγω προβλημάτων με τον λάρυγγα και το νευρικό σύστημα, ενώ περίπου το 1/3 των βρεφών χάνουν μέχρι την ηλικία των 2 ετών το χαρακτηριστικό αυτό κλάμα. Η κατάσταση επηρεάζει περίπου 1 στις 50.000 ζωντανές γεννήσεις όλων των εθνοτήτων και είναι πιο συνηθισμένη στις γυναίκες με αναλογία 4:3. Η διάγνωση δεν γίνεται πάντα έγκαιρα, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η πραγματική συχνότητα του συνδρόμου στο γενικότερο πληθυσμό (Chen, 2015). Τα συμπτώματα που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο cri du chat ποικίλουν ανάλογα με το έλλειμμα. Από τις πρώτες κιόλας εβδομάδες μετά τη γέννηση του βρέφους με το σύνδρομο αυτό εμφανίζεται το κύριο χαρακτηριστικό του, δηλαδή το υψηλό τόνου κλάμα. Τα νεογέννητα με το σύνδρομο cri du chat συχνά παρουσιάζουν χαμηλό βάρος κατά τη γέννησή τους, υποτονία, μικροκεφαλία καθώς και επίκανθο, υπερτελορισμό, χαμηλή πρόσφυση των αυτιών και μικρογναθία (Sigafos et al, 2009). Περίπου το 90% των περιπτώσεων είναι αποτέλεσμα σποραδικής ή τυχαίας de novo διαγραφής ενώ ένα 10-15% οφείλεται σε άνισο διαχωρισμό γονεϊκής ισοζυγισμένης μετάθεσης (Seth et al, 2012).

#### 4.4.3. Σύνδρομο Prader-Willi

Το PWS είναι μια γενετική διαταραχή λόγω της απώλειας λειτουργικότητας συγκεκριμένων γονιδίων. Στα νεογνά, τα συμπτώματα περιλαμβάνουν αδυναμία των μυών, κακή διατροφή και αργή ανάπτυξη. Ξεκινώντας από την παιδική ηλικία, το άτομο είναι συνεχώς πεινασμένο, γεγονός που συχνά οδηγεί σε παχυσαρκία και διαβήτη τύπου II (Genetics Home Reference, 2014). Το PWS προκαλείται από ένα επιγενετικό φαινόμενο γνωστό ως αποτύπωση, που προκαλείται από τη διαγραφή των πατρικών αντιγράφων των γονιδίων *SNRPN* και *NDN*. Αυτά βρίσκονται στο χρωμόσωμα 15 και συγκεκριμένα στην περιοχή 15q11-13 (OMIM, 2001; De los Santos et al, 2000). Λόγω της αποτύπωσης, τα μητρικά αντίγραφα των γονιδίων αυτών είναι ουσιαστικά σιωπηλά και εκφράζονται μόνο τα πατρικά. Το PWS, στο 74% των περιπτώσεων, προκύπτει από την απώλεια πατρικών αντιγράφων αυτής της περιοχής (Buiting et al, 1995), ενώ σε ένα 25% το άτομο φέρει δύο αντίγραφα του χρωμοσώματος 15 από τη μητέρα του και κανένα από τον πατέρα. Ο βασικός άξονας της διάγνωσης είναι ο γενετικός έλεγχος με βάση τη μεθυλίωση του DNA (Methylation-specific PCR), για την ανίχνευση της απουσίας της πατρικής περιοχής PWS/AS στο χρωμόσωμα 15q11-q13. Τυπικά το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από υποτονία, κοντό ανάστημα, υπερφαγία, παχυσαρκία, προβλήματα συμπεριφοράς,



όπως διαταραχές ιδεοψυχαναγκαστικής συμπεριφοράς, κοντά χέρια και πόδια, υπογοναδισμό και ήπια πνευματική αναπηρία (Killeen, 2004).

#### 4.4.4. Σύνδρομο Angelman

Η διαγραφή της περιοχής 15q11-13 στο μητρικό χρωμόσωμα προκαλεί το σύνδρομο Angelman. Τις περισσότερες φορές, οφείλεται σε διαγραφή ή μετάλλαξη του γονιδίου *UBE3A* στο χρωμόσωμα 15 (Weeber et al, 2002). Το AS επηρεάζει κυρίως το νευρικό σύστημα. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν μικροκεφαλία, χαρακτηριστικό προσωπίο, σοβαρή διανοητική αναπηρία, αναπτυξιακή καθυστέρηση, προβλήματα ομιλίας, ισορροπίας και κίνησης, επιληπτικές κρίσεις καθώς και προβλήματα ύπνου (Wang et al, 2017). Ενώ το AS μπορεί να προκληθεί από μια μετάλλαξη στο γονίδιο *UBE3A*, το πιο συνηθισμένο γενετικό ελάττωμα που οδηγεί στο σύνδρομο αυτό είναι μια μητρική διαγραφή της τάξεως περίπου των 4Mb στην χρωμοσωμική περιοχή 15q11-13 που προκαλεί απουσία έκφρασης του *UBE3A* στις πατρικά αποτυπωμένες περιοχές του εγκεφάλου. Η συχνότητα εμφάνισής του είναι 1/12.000-1/20.000 άτομα με τα αρσενικά και τα θηλυκά να επηρεάζονται το ίδιο (Genetics Home Reference, 2015).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο έλεγχος για αυτές τις υπο-χρωμοσωμικές παραλλαγές είναι εφικτός χρησιμοποιώντας MPS NIPT με υψηλότερο βάθος αλληλούχησης (Peters et al, 2011; Srinivasan et al, 2013; Yu et al, 2013) ενώ είναι εμπορικά διαθέσιμος από το 2013 (Gross et al, 2016; Helgeson et al, 2015). Εξαιτίας της εξέλιξης στην τεχνολογία της αλληλούχησης, το 2016 έγινε διαθέσιμος ένας μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος στο ευρύτερο γονιδίωμα για CNVs σε ανάλυση παρόμοια με εκείνη του G-banding καρυότυπου (Lefkowitz et al, 2016). Ωστόσο, επειδή τα κλινικά σημαντικά CNVs είναι σπάνια (<1%), το PPV είναι πολύ χαμηλότερο από ό, τι για τις ανευπλοειδίες ενός ολόκληρου χρωμοσώματος (3,8%-17%) και το υψηλό NPV είναι περισσότερο μια αντανάκλαση της σπανιότητας του κάθε συνδρόμου από ότι του ίδιου του ελέγχου (Zhao, 2015; Hui, 2016). Ορισμένοι επαγγελματικοί φορείς δηλώνουν ότι ο έλεγχος για CNVs δεν θα πρέπει να συνιστάται αυτή τη στιγμή (Committee on Genetics, 2016), ενώ άλλοι, παρόλο που δεν συνιστούν τον έλεγχο για CNVs στο ευρύτερο γονιδίωμα, προτείνουν να ενημερώνονται όλες οι έγκυες γυναίκες σχετικά με τη διαθεσιμότητα αυτού του εκτεταμένου ελέγχου, όταν και εφόσον πληρούνται συγκεκριμένες προϋποθέσεις (Gregg et al, 2016).

Ο αριθμός των εμβρύων που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής είναι μικρός και το μέγεθος του ελλείμματος μπορεί να ποικίλει από το ένα άτομο στο άλλο, ενώ ορισμένες φορές το σύνδρομο δεν οφείλεται καν σε έλλειμμα (ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα). Για όλους τους παραπάνω λόγους, ο έλεγχος με cfDNA δεν ενδείκνυται ακόμα. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες ώστε να καθιερωθεί η επιδημιολογία της νόσου για να διασφαλιστεί ότι η εξέταση είναι κλινικά σημαντική και δεν προκαλεί βλάβη (Skrzypek & Hui, 2017).



**Πίνακας 3: Σύγκριση των τεσσάρων επιλογών ελέγχου**

Χαρακτηριστικά	CVS	Αμνιοπαρακέντηση	Ορολογικό screening	cffDNA
<b>Εβδομ. κύησης</b>	11 <sup>η</sup> – 13 <sup>η</sup>	≥16 <sup>η</sup>	10 <sup>η</sup> – 20 <sup>η</sup>	≥ 10 <sup>η</sup>
<b>Κίνδυνος αποβολής</b>	<1%	~0,2%	Κανένας	Κανένας
<b>Ευαισθησία</b>	>99% για όλες τις ανευπλοειδίες	>99% για όλες τις ανευπλοειδίες	90% για την T21	>98% για την T21
<b>Ψευδώς θετικά</b>	<2%	<1%	5% για την T21	<0.5% για την T21
<b>Αποτυχημένα</b>	<1%	<1%	<1%	1-5%

CVS: chorionic vilus sampling (λήψη χοριακών λάχνων), T21: τρισωμία 21



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Μεθοδολογίες της χρήσης του cffDNA

Η ανίχνευση της εμβρυϊκής ανευπλοειδίας με μη επεμβατικές μεθόδους είναι πολύπλοκη, καθώς το χρωμόσωμα ή η περιοχή ενδιαφέροντος εντοπίζεται τόσο στην μητέρα όσο και στο έμβρυο. Η πρώτη πολλά υποσχόμενη έκθεση μη επεμβατικού ελέγχου για την ανίχνευση ανευπλοειδίας ήταν το 2007, όπου χρησιμοποιήθηκε εμβρυϊκό mRNA στο μητρικό πλάσμα, υπολογίζοντας την αναλογία RNA:SNP, επιτρέποντας έτσι την άμεση αξιολόγηση της δοσολογίας των χρωμοσωμάτων (Lo et al, 2007). Ομοίως, χρησιμοποιήθηκαν οι αναλογίες των αλληλόμορφων των αποτυπωμένων γονιδίων στο DNA του μητρικού πλάσματος για τη διάγνωση της τρισωμίας 18 (Tong et al, 2006). Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι περιορίζονται σε συγκεκριμένους πληθυσμούς επειδή εξαρτώνται από την παρουσία γενετικών πολυμορφισμών σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους (Fan et al, 2008).

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές πλατφόρμες NIPT με cffDNA για ανίχνευση ανευπλοειδίων, με κυριότερες την τυχαία αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) ή μαζική παράλληλη αλληλούχηση (MPS), τη στοχευμένη (Targeted) ή χρωμοσωμο-επιλεκτική αλληλούχηση (CSS) και την αλληλούχηση βασισμένη στον πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (SNP). Καθώς η τεχνολογία διαδίδεται σε παγκόσμιο επίπεδο, εμφανίζονται μεταβολές στις μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας και βιοπληροφορικών αλγορίθμων. Κάθε μέθοδος έχει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα για το κάθε κριτήριο: μήκος των reads, ακρίβεια, χρόνο εκτέλεσης και απόδοση.

### 5.1. Whole Genome Sequencing ή Massively Parallel (Shotgun) Sequencing

Το NIPT που βασίζεται στο WGS είναι η πρώτη μέθοδος που εισήχθει το 2011 στην κλινική πράξη μεταξύ των άλλων τεχνικών ενώ προσφέρεται ήδη από πολλές εταιρείες (Chiu et al, 2008; Cho, 2015). Στην προσέγγιση αυτή, μικρές περιοχές (reads) τυχαία επιλεγμένων θραυσμάτων DNA στο πλάσμα αλληλουχούνται ταυτόχρονα («μαζική παράλληλη») επιτρέποντας την ταχεία αλληλούχηση εκατομμυρίων μορίων DNA σε επίπεδο ανάλυσης ενός νουκλεοτιδίου. Ουσιαστικά μόνο ένα κλάσμα από κάθε ένα θραύσμα DNA αλληλουχείται (τυπικά 36 ζεύγη βάσεων) αλλά αυτό αρκεί για να χαρτογραφηθεί ένα θραύσμα DNA σε μία μοναδική θέση στο ανθρώπινο γονιδίωμα και έτσι να αναγνωρισθεί το χρωμόσωμα απ' το οποίο προέρχεται (Lo, 2013). Εάν το έμβρυο φέρει μια στατιστικά σημαντική τρισωμία, αναμένονται περισσότερα θραύσματα του τρισωμικού χρωμοσώματος σε σύγκριση με αυτά ενός διπλοειδούς.

#### 5.1.1. Μειονεκτήματα και προσπάθειες αντιμετώπισης

Από το 2008 και μετά, η απόδοση της χρήσης της MPS για την ανίχνευση της εμβρυϊκής τρισωμίας 21 έχει επικυρωθεί από μια σειρά κλινικών μελετών μεγάλης κλίμακας (Dungan, 2011; Ehrich et al, 2011; Bianchi et al, 2012), όμως η ανίχνευση των εμβρυϊκών τρισωμιών 13 και 18 έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί πρόκληση λόγω των GC περιοχών στα εμπλεκόμενα χρωμοσώματα. Παρ' όλα αυτά, η χρήση αλγορίθμων βιοπληροφορικής έχει αποδείξει ότι επιτρέπει τη βελτιωμένη ανίχνευση





των τρισωμιών αυτών (Chen et al, 2011; Sehnert et al, 2011). Στατιστικά, οι μέθοδοι MPS υπολογίζουν την τυπική απόκλιση της αναμενόμενης μέτρησης από κάθε χρωμόσωμα και κατανέμουν το "z-score" για κάθε ένα από αυτά. Εάν ο αριθμός των θραυσμάτων DNA από το χρωμόσωμα 21 στο δείγμα δοκιμής είναι περισσότερο από 3SD (τυπικές αποκλίσεις) μακριά από την αναμενόμενη (δηλ. z-score >3), αυτό θεωρείται ένα αποτέλεσμα υψηλού κινδύνου για την τρισωμία 21 (Palomaki et al, 2011). Με τις μεθόδους αυτές επίσης δεν μπορούν να ανιχνευθούν οι ισοζυγισμένες μεταθέσεις.

Σημαντικό ζήτημα όσον αφορά το κόστος και την αποτελεσματικότητα αποτελεί ο αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα σε αλληλουχίες καθώς και ο ελάχιστος αριθμός των reads. Σαφώς, ο ανεπαρκής αριθμός των reads θα μειώσει την αξιοπιστία, καθώς η στατιστική σημαντικότητα της οποιασδήποτε διαφοράς στον αριθμό αυτό θα μειωθεί. Από την άλλη, πάρα πολλά reads θα αυξήσουν σημαντικά το κόστος, καθώς θα μπορούν να αναλύονται λιγότερα δείγματα ανά εκτέλεση. Ο Sparks και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι όταν χρησιμοποιείται MPS πλήρους γονιδιώματος, απαιτούνται περίπου 6,3 εκατομμύρια μοναδικά χαρτογραφημένα reads για να εξασφαλιστεί ο επαρκής αριθμός των χρωμοσωμάτων 21 (<sup>1</sup>Sparks et al, 2012).

## 5.2. Targeted ή Chromosome-Selective Sequencing (CSS)

Επειδή το MPSS δεν είναι εκλεκτικό στην χρωμοσωμική προέλευση των θραυσμάτων αλληλουχίας DNA και το χρωμόσωμα 21 αντιπροσωπεύει περίπου μόνο το 1,5% του ανθρώπινου γονιδιώματος, είναι απαραίτητη η αλληλούχηση πολλών εκατομμυρίων θραυσμάτων ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής αριθμός χρωμοσωμάτων 21. Επίσης μεγάλο μέρος των πληροφοριών που λαμβάνονται παραμένει αχρησιμοποίητο. Μια εναλλακτική λύση για το MPSS που μπορεί να ξεπεράσει αυτούς τους περιορισμούς είναι η επιλεκτική (στοχευμένη) αλληλούχηση των γενετικών τόπων μόνο από αυτά τα χρωμοσώματα που ερευνώνται (Ashoor et al, 2012). Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι με την επιλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών στο χρωμόσωμα 21 και 18 και την επακόλουθη ανάλυση με MPS, μια μέθοδος που αναφέρεται ως ψηφιακή ανάλυση επιλεγμένων περιοχών (Digital ANalysis of Selected Regions, DANSR), ο αριθμός των reads που απαιτείται για την αξιόπιστη ανίχνευση των εμβρυικών τρισωμιών 18 ή 21, είναι σημαντικά μικρότερος από εκείνον που απαιτείται για προσεγγίσεις με MPS ολόκληρου του γονιδιώματος, με ταυτόχρονη μείωση του κόστους αλληλούχησης καθώς και της αποθήκευσης δεδομένων (Norton et al, 2012).

Το ποσοστό ανίχνευσης της τρισωμίας 13 με στοχευμένη αλληλούχηση του cfDNA στο μητρικό πλάσμα, είναι χαμηλότερο από εκείνο για την ανίχνευση των τρισωμιών 21 και 18. Προηγούμενες μελέτες με χρήση του DANSR, τόσο σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου όσο και σε ρουτίνα που εξετάστηκαν σε τακτική βάση, ανέφεραν ότι τα ποσοστά ανίχνευσης τρισωμίας 21 και 18 ήταν 100% και 97-98% αντίστοιχα, με ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λιγότερο από 0,1% (Nicolaidis et al, 2012). Μία πιθανή εξήγηση του χαμηλότερου ποσοστού ανίχνευσης της τρισωμίας 13 με NIPT σε σύγκριση με την τρισωμία 21 είναι ότι στις εγκυμοσύνες με έμβρυα με τρισωμία 13, υπάρχει περιορισμένος μωσαϊκισμός του πλακούντα με



υψηλό ποσοστό κυττάρων που είναι δυσωμικά ενώ στην τρισωμία 21 όλα τα κύτταρα του πλακούντα είναι πάντα τρισωμικά (Kalousek et al, 1989; Ashoor et al, 2012).

### 5.2.1. Πλεονεκτήματα CSS

Στη στοχευμένη αυτή μέθοδο, τα θραύσματα DNA στο πλάσμα υφίστανται μια διαδικασία εμπλουτισμού, έτσι ώστε μόνο τα προεπιλεγμένα θραύσματα από τα χρωμοσώματα 13, 18 και 21 και των φυλετικών χρωμοσωμάτων να διαβάζονται και να αλληλουχούνται, παρά το συνολικό μίγμα πλάσματος, το οποίο περιέχει DNA από όλα τα χρωμοσώματα. Το στάδιο εμπλουτισμού περιλαμβάνει μια τεχνική που βασίζεται στην PCR, η οποία ενισχύει τμήματα DNA που είναι μοναδικά στο χρωμόσωμα στόχο. Το τελικό μίγμα DNA που υφίσταται αλληλούχηση έχει σε υψηλό βαθμό συγκέντρωσης τα χρωμοσώματα 21, 18, 13, X και Y, μειώνοντας έτσι το κόστος και το χρόνο της αλληλούχησης του DNA (<sup>2</sup>Sparks et al, 2012). Η στατιστική μέθοδος για το CSS [Fetal fraction Optimized Risk of Trisomy Evaluation (βελτιστοποιημένη αξιολόγηση κινδύνου τρισωμίας μέσω εμβρυϊκού κλάσματος), FORTE] επίσης διαφέρει από το MPS. Το CSS χρησιμοποιεί τον «προηγούμενο» κίνδυνο ανευπλοειδίας της γυναίκας (με βάση την ηλικία της μητέρας και της κύησης), τον αριθμό των χρωμοσωμάτων στόχων και το εμβρυϊκό κλάσμα για τον υπολογισμό ενός τελικού κινδύνου, μέσω μιας προσέγγισης αναλογικών πιθανοτήτων. Το αποτέλεσμα του NIPT παρέχεται ως «αποτέλεσμα κινδύνου» και όχι ως τελικό αποτέλεσμα (<sup>1</sup>Sparks et al, 2012).

Ως εκ τούτου, η στοχευμένη αλληλούχηση μπορεί να αποτελέσει μια καλή εναλλακτική λύση για την πολύ δαπανηρή προσέγγιση ολόκληρου του γονιδιώματος, καθώς περισσότερα δείγματα μπορούν να αλληλουχούνται ταυτόχρονα, μειώνοντας έτσι το κόστος δειγματοληψίας και προετοιμασίας της βιβλιοθήκης (Boon & Faas, 2013).

### 5.2.2. Μειονεκτήματα CSS

Παρόλο που για τις στοχευμένες μεθόδους, όπως η DANSR, ο αριθμός των reads που μπορούν να ληφθούν είναι επαρκής, οι δυνατότητες για υψηλή απόδοση παραμένουν περιορισμένες. Αυτό σημαίνει ότι για τη μεσαία έως υψηλή απόδοση των δειγμάτων, το κόστος εξοπλισμού, καθώς και το κόστος δειγματοληψίας και προετοιμασίας της βιβλιοθήκης, θα είναι ίσως το ίδιο για την στοχευμένη προσέγγιση όπως και για το όλο γονιδίωμα (Boon & Faas, 2013).

## 5.3. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Τα SNPs είναι φυσιολογικές γενετικές παραλλαγές που εμφανίζονται σε >1% του πληθυσμού και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση μεταξύ δύο ατόμων. Η εφαρμογή της ανάλυσης των SNP στο NIPT με βάση το cfDNA βοηθά να προσδιοριστεί η διαφορά στο DNA μεταξύ γονέα και παιδιού, καθώς και οι παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (Hall et al, 2014). Στο NIPT που βασίζεται στα SNPs, το DNA εξάγεται ξεχωριστά από το μητρικό πλάσμα (που περιέχει μικτό





μητρικό και εμβρυϊκό cfDNA) και από τα μητρικά λευκοκύτταρα (καθαρό μητρικό κυτταρικό DNA) μέσω της multiplex PCR. Στη συνέχεια αξιολογούνται περίπου 19.488 SNPs και καθορίζονται οι σχετικές ποσοτικές συνεισφορές του μητρικού και του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό πλάσμα. Έπειτα ο εμβρυϊκός γονότυπος συμπεραίνεται συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των μητρικών λευκοκυττάρων με το πλάσμα (Nicolaidis et al, 2013). Δεδομένου ότι μια μητέρα περνά ένα χρωμόσωμα από κάθε ζευγάρι χρωμοσωμάτων στα παιδιά της, η χρωμοσωμική κατάσταση μπορεί να ταξινομηθεί ως μονοσωμία (μόνο ένα αντίγραφο από τη μητέρα ή τον πατέρα), φυσιολογική/δυσωμία (ένα αντίγραφο από κάθε γονέα), τρισωμία (επιπλέον αντίγραφο απ'τον έναν ή τον άλλον), ή μονογονεϊκή δισωμία (και τα δύο αντίγραφα από τη μητέρα ή τον πατέρα). Συγκρίνοντας τις κατανομές των παρατηρούμενων SNP στο πλάσμα με αυτές που αναμένονται, μπορεί να ταυτοποιηθεί ο πιθανότερος γονότυπος του εμβρύου (Zimmermann et al, 2012). Ως εκ τούτου η μέθοδος που βασίζεται στα SNPs διαφέρει από τις μεθόδους MPS και CSS, καθώς ξεχωρίζει τις μητρικές από τις εμβρυϊκές πηγές DNA ενώ μπορεί να ενσωματώσει την πατρική πληροφορία.

### 5.3.1. Πλεονεκτήματα SNP

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι πολλά, όπως το ότι δεν εξαρτάται τόσο από το εμβρυϊκό κλάσμα. Στις μεθόδους καταμέτρησης του NIPT, η ακρίβεια της δοκιμής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το εμβρυϊκό κλάσμα. Εάν αυτό είναι μικρότερο από 8% στο μητρικό πλάσμα, ο ρυθμός ανίχνευσης της τρισωμίας 21 είναι περίπου 75% (Canick et al, 2013). Εν αντιθέσει, στις μεθόδους που βασίζονται στα SNPs, ο ρυθμός ανίχνευσης της τρισωμίας 21 δεν μειώνεται ακόμη και αν το εμβρυϊκό κλάσμα είναι 4-8%. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι το ότι δεν επηρεάζεται από τις GC περιοχές των χρωμοσωμάτων. Οι περιοχές αυτές μπορεί να δημιουργήσουν βρόγχους κατά μήκος του DNA με αποτέλεσμα όταν η DNA πολυμεράση επιχειρεί να συνδεθεί με την αλληλουχία για ενίσχυση, δεν μπορεί να προσδεθεί στις περιοχές αυτές. Αυτό αποτελεί πρόβλημα για τις μεθόδους καταμέτρησης, οι οποίες βασίζονται στη σύγκριση με τα χρωμοσώματα αναφοράς, κάτι που δεν ισχύει για την μέθοδο με τα SNPs. Επίσης προσφέρει αποτελεσματική διαφοροποίηση μεταξύ μητρικού και εμβρυϊκού cfDNA. Όπως προαναφέρθηκε, με την μέθοδο αυτή γίνεται πολύ εύκολα η διάκριση μεταξύ των πηγών DNA αναλύοντας τα λευκοκύτταρα που περιέχουν καθαρό μητρικό DNA. Αυτή η διάκριση είναι ιδιαίτερα σημαντική για καταστάσεις όπως η μονοσωμία X. Σε τέτοιες περιπτώσεις, οι μέθοδοι καταμέτρησης μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Η μέθοδος με SNP αναλύει τη συμβολή του μητρικού DNA, η οποία συμβάλλει στη μείωση του ποσοστού των ψευδών θετικών που σχετίζονται με τον μητρικό μωσαϊκισμό και τις παραλλαγές του αριθμού αντιγράφων (Wang et al, 2013; Snyder et al, 2015). Ακόμα μπορεί να ανιχνεύσει το «εξαφανισμένο δίδυμο» (Curnow et al, 2015) καθώς και την τριπλοειδία (Simon et al, 2015), επιδιώκοντας περαιτέρω διαγνωστικές οδούς με σκοπό την αποφυγή των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που μπορεί να προκύψουν από την χρήση εναλλακτικών μεθόδων (Futch et al, 2013).



Μία έρευνα, στην οποία μελετήθηκαν πάνω από 31.000 έγκυες γυναίκες (χαμηλού αλλά και υψηλού κινδύνου), υποστηρίζει τη χρήση του NIPT με βάση τα SNPs ως έλεγχο πρώτης γραμμής για ανευπλοειδισμό σε όλους τους ασθενείς, ενώ παρέχει ισχυρές πληροφορίες σχετικά με την κλινική εφαρμογή του (Dar et al, 2014). Το 2013, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι το NIPT με βάση τα SNPs μπορεί να ανιχνεύσει ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων με μεγάλη ακρίβεια μεταξύ 13<sup>ης</sup> και 15<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης (Samango-Sprouse et al, 2013).

### 5.3.2. Μειονεκτήματα SNP

Παρόλα τα θετικά στοιχεία, η μέθοδος δεν χρησιμοποιείται ακόμα για κυήσεις από δότη ωαρίων και για πολλαπλές κυήσεις (Kunwoo, 2015), καθώς φαίνεται πώς η εισαγωγή των συστοιχιών SNP δεν αυξάνει σημαντικά τη συνολική διαγνωστική απόδοση και ότι οι περιπτώσεις με δομικές ανωμαλίες στο υπερηχογράφημα παραμένουν πολλές (Srebniak et al, 2017). Παρόλα αυτά, μία μελέτη του 2019 στις ΗΠΑ, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το NIPT με βάση τα SNPs για τον προσδιορισμό της ζυγωτίας έχει αξία όταν η χοριοτικότητα είναι αβέβαιη ή όταν εντοπίζονται ανωμαλίες. Η ζυγωτία, το φύλο του εμβρύου, και η ανευπλοειδία είναι συμπληρωματικές εκτιμήσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν με το ίδιο δείγμα από την 9<sup>η</sup> κιάλας εβδομάδα κύησης (Norwitz et al, 2019).

### 5.4. Differentially Methylated Regions (DMRs)

Μία διαφορετική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση και τον εμπλουτισμό του cfDNA είναι η ταυτοποίηση των διαφορετικά μεθυλιωμένων περιοχών (DMRs) στο εμβρυϊκό και μητρικό DNA (Tong et al, 2006). Αυτή η προσέγγιση εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι θα υπάρξουν επιγενετικές διαφορές σε όλο το γονιδίωμα που θα οδηγήσουν σε διαφορετική έκφραση των γονιδίων, ανάλογα με τον τύπο ιστού (Poon et al, 2002). Η αναγνώριση των εμβρυϊκών αυτών μοριακών δεικτών έχει περιγραφεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες (Weber et al, 2005; Chim et al, 2008) και ορισμένες μελέτες έχουν περιγράψει την εφαρμογή ευαίσθητων στη μεθυλίωση περιοριστικών ενζύμων ή την επεξεργασία του DNA με διθειώδες νάτριο (Chan et al, 2006; Chiu et al, 2007; Old et al, 2007; Chim et al, 2005). Μία ομάδα δημιούργησε την μεθοδολογία γνωστή ως ανοσοκατακρίμνιση του μεθυλιωμένου DNA (Methylated DNA Immunoprecipitation, MeDIP) βασισμένη στην real-time qPCR, η οποία αρχικά συνδυάστηκε με συστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων υψηλής ανάλυσης για την ταυτοποίηση των διαφορών στο μεθυλιωμένο DNA μεταξύ μητρικού και εμβρυϊκού DNA στα χρωμοσώματα ενδιαφέροντος.

Για την βελτίωση της μεθόδου, χρειάστηκε να τροποποιηθεί η διαγνωστική φόρμουλα του NIPT για την τρισωμία 21, λαμβάνοντας υπόψη τη γονιδιωματική θέση των επιλεγμένων DMRs και εξαιρώντας εκλεκτικά εκείνα που βρέθηκαν εντοπισμένα εντός περιοχών με CNVs. Αυτό μειώνει την πιθανότητα λανθασμένης ταξινόμησης και αυξάνει την εξειδίκευση. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη το 2012, εξαιρέθηκαν οι περιοχές EP8 και EP11, που είχαν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως (Parageorgiou et al, 2011), διότι βρισκόνταν εντός των περιοχών με CNVs (Tsaliki et al, 2012). Στη συγκεκριμένη μελέτη δεν λήφθηκαν υπόψη ορισμένα κριτήρια, όπως το ποσοστό του



εμβρυϊκού DNA, το βάρος, το ύψος και η καταγωγή της μητέρας, που μπορεί να οδηγούσαν σε αποτέλεσμα εντός της «γκρίζας ζώνης». Αυτά τα χαρακτηριστικά θα χρησιμεύσουν ως βασική γραμμή για τη θέσπιση κριτηρίων αποκλεισμού στο εγγύς μέλλον και θα επιτρέψουν μια ακόμα πιο αξιόπιστη μη επεμβατική προγεννητική διαγνωστική εξέταση. Η μέθοδος αυτή δεν έχει ακόμα εφαρμογή στην κλινική πράξη, έως ότου πραγματοποιηθούν αρκετές μελέτες μεγάλης κλίμακας, ώστε να ξεπεραστούν τα εμπόδια.

### 5.5. Ψηφιακή PCR (dPCR)

Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο μπορεί να αποφευχθεί το κόστος της αλληλούχησης είναι η χρήση της ψηφιακής PCR. Αυτή η τεχνολογία βασίζεται στην αραίωση των υλικών, έτσι ώστε μεμονωμένα θραύσματα DNA που μας ενδιαφέρουν (π.χ. χρωμόσωμα 21) να μπορούν να ενισχυθούν χωριστά και να μετρηθούν (Fan & Quake, 2007; Fan et al, 2009), χωρίς ανταγωνισμό απ' τις μητρικές αλληλουχίες. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι πολύ ελκυστική στην χρήση, όταν γίνεται ο κατάλληλος εμπλουτισμός τους cffDNA, λόγω του ότι παρέχει αποτελέσματα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (έως και 6 ώρες) εξαιτίας της χρήσης μη καλλιεργημένων αμνιοκυττάρων και κυττάρων ιστού χοριακών λάχνων. Έτσι επιτυγχάνεται απόλυτη ποσοτικοποίηση και αυξημένη ευαισθησία στον εντοπισμό νουκλεοτιδικών μορίων DNA που μειοψηφούν. Η ψηφιακή PCR έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ανίχνευση της τρισωμίας 21 μέσω ανάλυσης της σχετικής δοσολογίας χρωμοσωμάτων (relative chromosome dosage), η οποία ψάχνει για υπεραντιπροσώπηση των αλληλουχιών του χρωμοσώματος 21 στο μητρικό πλάσμα σε σύγκριση με αλληλουχίες αναφοράς (<sup>2</sup>Lo et al, 2007).

### 5.6. Έλεγχος με βάση το RNA (RNA-based testing)

Η ταυτοποίηση των γονιδίων που εκφράζονται από τις τροφοβλάστες αλλά όχι από τα μητρικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία των αντίστοιχων ειδών cfRNA στο μητρικό πλάσμα, χωρίς μόλυνση από το μητρικό RNA με παρόμοια ακολουθία. Εάν το cfRNA φέρει επίσης πολυμορφισμούς που διακρίνουν τα εμβρυϊκά αλληλόμορφα, η παρουσία ανευπλοειδίας συμπεραίνεται από της αποκλίσεις μιας φυσιολογικής αναλογίας 1:1 στη σχετική ποσότητα των κληρονομικών αλληλομόρφων (<sup>1</sup>Lo et al, 2007). Με την ανακάλυψη πρόσθετων RNAs που μπορούν να αναλυθούν, αυτή η προσέγγιση μπορεί να διαδραματίσει ακόμα πιο σημαντικό ρόλο στο NIPT (Go et al, 2008).

Κάθε προσέγγιση NIPT που περιγράφηκε παραπάνω έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία μπορεί να επηρεάσουν την επιλογή του κλινικού για τον έλεγχο. Η μέθοδος τυχαίας MPS είναι σε θέση να παρέχει πληροφορίες δοσολογίας για οποιοδήποτε χρωμόσωμα, όχι μόνο για εκείνα που αναφέρονται στα πρότυπα πάνελ του NIPT. Αυτές οι «εκτός στόχου» ανωμαλίες μπορεί να είναι μητρικής ή εμβρυϊκής προέλευσης και περιλαμβάνουν ολόκληρες χρωμοσωμικές ή υποχρωμοσωμικές ανωμαλίες ανάλογα με το βάθος της αλληλούχησης και τη βιοπληροφορική που χρησιμοποιείται (Srinivasan et al, 2013; Lau et al, 2014). Ωστόσο, οι στοχευμένες προσεγγίσεις (CSS ή SNP) δεν θα ανιχνεύσουν τις «εκτός



στόχου» ανωμαλίες, περιορίζοντας έτσι το ενδεχόμενο των τυχαίων ευρημάτων. Το NIPT με βάση τα SNPs είναι η μόνη μέθοδος που είναι σε θέση να ανιχνεύσει την τριπλοειδία και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανευπλοειδία γονικής προέλευσης. Είναι, ωστόσο, ακατάλληλη για καταστάσεις όπου υπάρχουν περισσότεροι από δύο πιθανοί γονότυποι που εκπροσωπούνται στο πλάσμα, όπως διπλή εγκυμοσύνη, εγκυμοσύνη από δότη ωαρίων ή προηγούμενη μητρική μεταμόσχευση οργάνου.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Το cffDNA στην κλινική πράξη

### 6.1. Θετική προγνωστική αξία (PPV)

Η θετική προγνωστική αξία είναι η πιθανότητα μιας γυναίκας με αποτέλεσμα NIPT υψηλού κινδύνου να έχει στην πραγματικότητα ένα προσβεβλημένο έμβρυο. Παρόλο που η ευαισθησία και η εξειδίκευση συνυπάρχουν στο ίδιο το τεστ, οι θετικές και οι αρνητικές προγνωστικές τιμές εξαρτώνται από τον πληθυσμό που αναλύεται και την πιθανότητα εμφάνισης μιας ασθένειας πριν από τη δοκιμασία. Η PPV συσχετίζεται με το ιστορικό επικράτησης της νόσου και κατά συνέπεια θα είναι χαμηλότερο στις γυναίκες χαμηλού κινδύνου. Η PPV είναι χαμηλότερη για τα χρωμοσώματα 13, 18 και τα χρωμοσώματα του φύλου, καθώς όλα αυτά έχουν υψηλότερο ψευδώς θετικό ρυθμό από το χρωμόσωμα 21.

Η κλινική εγκυρότητα του NIPT με βάση το cffDNA καθορίστηκε αρχικά σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου, στους οποίους το PPV αναμένεται να είναι υψηλό (80-90% για την τρισωμία 21) (Chiu et al, 2011; Ehrich et al, 2011; Sehnert et al, 2011; <sup>2</sup>Bianchi et al, 2012; Norton et al, 2012; Lau et al, 2012). Πρόσφατα δεδομένα ακόμα δείχνουν ότι το NIPT ξεπερνάει κατά πολύ τον cFTS στο γενικό πληθυσμό (Norton et al, 2015). Σε μια έρευνα με μέσο όρο μητρικής ηλικίας 30 ετών (όπου ο κίνδυνος τρισωμίας 21 είναι 1/700), η PPV για το NIPT ήταν 45,5% για την τρισωμία 21 και 40% για την τρισωμία 18 (<sup>1</sup>Bianchi et al, 2014). Συνεπώς, όλοι οι επαγγελματικοί φορείς συνιστούν τα αποτελέσματα υψηλού κινδύνου να επιβεβαιώνονται με διαγνωστικούς ελέγχους πριν ληφθούν κρίσιμες αποφάσεις, όπως διακοπή της εγκυμοσύνης (Benn et al, 2015; Gregg et al, 2016). Σε μια μεγάλη μελέτη του 2017 ανάμεσα σε 10.275 έγκυες γυναίκες, η PPV για τις τρισωμίες 13, 18 και 21 ήταν 97,22% ενώ για τις SCAs, 54,54%, με το σύνδρομο Turner να έχει την χαμηλότερη (29,41%) (Πίνακας 4) (Yu et al, 2017).

**Πίνακας 4: PPV του NIPT σε διαφορετικά SCAs**

	NIPT+	AΘ	ΨΘ	Μη διάγνωση	PPV %
<b>Σύνδρομο Turner</b>	27	5	12	10	29,41% (5/17)
<b>Σύνδρομο Klinefelter</b>	12	7	2	3	77,78% (7/9)
<b>Σύνδρομο XXX</b>	8	5	0	3	100% (5/5)
<b>Σύνδρομο XYY</b>	3	1	0	2	100% (1/1)
<b>Σύνολο</b>	50	18	14	18	54,54%

*NIPT+: Θετικό αποτέλεσμα NIPT, AΘ:Αληθώς Θετικό, ΨΘ:Ψευδώς Θετικό, PPV: Positive Predictive Value (Θετική προγνωστική αξία), SCA:Sex Chromosomal Aneuploidies (Χρωμοσωμικές ανωμαλίες του φύλου). Πηγή: Yu et al, 2017*

### 6.2. Αρνητική προγνωστική αξία (NPV)

Εάν ένα ζευγάρι λάβει αρνητικό αποτέλεσμα ("χαμηλού κινδύνου"), η πιθανότητα το έμβρυο να έχει μία από τις εν λόγω ανευπλοειδίες είναι πολύ χαμηλή (Zhang et al, 2015). Παρόλο που ένα αποτέλεσμα χαμηλού κινδύνου είναι πολύ καθησυχαστικό, δεν αποκλείει εντελώς ένα επηρεασμένο έμβρυο. Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα για την τρισωμία 21 αναμένεται να εμφανίζονται με ρυθμό περίπου 1/10.000 σε πληθυσμό υψηλού κινδύνου με επιπολασμό 1/100. Αυτό το ποσοστό ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων φαίνεται να επιβεβαιώνεται στις λίγες



κλινικές μελέτες, που όμως είναι αρκετά μεγάλες ώστε να περιέχουν αρκετές ψευδώς αρνητικές περιπτώσεις. Παρόλα αυτά καμία μεγάλη μελέτη δεν έχει επιχειρήσει ολοκληρωμένη επιβεβαίωση σε γυναίκες με χαμηλό κίνδυνο (Dar at al, 2014; Yaron, 2016).

### 6.3. Ερμηνεία και διαχείριση των “no call” αποτελεσμάτων

Ένας μικρός αριθμός γυναικών που υποβάλλονται σε NIPT με cffDNA (1-3%) δεν θα λάβει αποτέλεσμα για λόγους όπως, χαμηλό εμβρυϊκό κλάσμα, θέματα διαχείρισης του δείγματος και αποτυχία εργαστηριακής ανάλυσης (Fiorentino et al, 2016). Ο συνηθέστερος λόγος είναι το χαμηλό FF. Ένα επαρκές εμβρυϊκό κλάσμα, περίπου 2% έως 4%, είναι απαραίτητο για να είναι το αποτέλεσμα ακριβές (<sup>2</sup>Wang et al, 2013). Αρκετοί βιολογικοί παράγοντες όπως το βάρος της μητέρας, η πολλαπλή εγκυμοσύνη και η ηλικία κύησης επηρεάζουν το εμβρυϊκό κλάσμα. Ο τύπος της πλατφόρμας NIPT επηρεάζει επίσης το ποσοστό αποτυχίας της δοκιμής. Τα δημοσιευμένα ποσοστά αποτυχίας των δοκιμών είναι υψηλότερα στις στοχευμένες αναλύσεις με βάση το SNP (6,4%) και χαμηλότερες στις πλατφόρμες που χρησιμοποιούν την προσέγγιση πλήρους γονιδιώματος/MPS (1,6%). Ορισμένες ανευπλοειδίες του εμβρύου, όπως η τριπλοειδία και η τρισωμία 13, σχετίζονται επίσης με ένα μικρότερο FF και συνεπώς ένα υψηλότερο ποσοστό αποτυχίας της εξέτασης (Zhang et al, 2015). Επομένως, οι γυναίκες με “no call” αποτέλεσμα εξαιτίας ενός χαμηλού ποσοστού FF μπορεί στην πραγματικότητα να διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο ανευπλοειδίας και συνεπώς απαιτούν πρόσθετη συμβουλευτική. Η αύξηση του μητρικού βάρους μειώνει το κλάσμα του εμβρύου (<sup>2</sup>Wang et al, 2013). Οι γυναίκες με αυξημένο BMI θα πρέπει να συμβουλευτούν πριν τον έλεγχο για το υψηλότερο ποσοστό αποτυχίας τους και σε ορισμένες περιπτώσεις να τους προσφέρονται εναλλακτικοί τρόποι ελέγχου. Ο Chan και οι συνεργάτες του, παρουσίασαν σε μια πρόσφατη αναδρομική έρευνα, ότι σε σύγκριση με τον βασικό πληθυσμό, οι γυναίκες με “no call” αποτέλεσμα διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο χρωμοσωμικών ανευπλοειδών (6,5 έναντι 0,2%), προεκλαμψίας (11 έναντι 1,5%) και διαβήτη κύησης (23 έναντι 7,5%) (Chan et al, 2017).

Η διαχείριση των αποτυχημένων αποτελεσμάτων πρέπει να αντιμετωπίσει τις πιθανές αιτίες ενός χαμηλού FF και του ατομικού κινδύνου της γυναίκας για ανευπλοειδισμό. Οι επιλογές περιλαμβάνουν την διάθεση (i) μιας εναλλακτικής εξέτασης όπως το cFDS, αν βρίσκεται μέσα στο κατάλληλο παράθυρο ηλικίας κύησης, (ii) λεπτομερή εκτίμηση υπερήχων για σημάδια εμβρυϊκής ανευπλοειδίας και (iii) διαγνωστικές εξετάσεις, δεδομένης της συσχέτισης ενός χαμηλού εμβρυϊκού κλάσματος με εμβρυϊκές ανευπλοειδίες. Επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία για το NIPT μπορεί να είναι επιτυχής σε πάνω από 50% των περιπτώσεων, αλλά εάν εμφανιστεί επαναλαμβανόμενο αποτυχημένο NIPT, μπορεί να εισάγει μια επιβλαβή καθυστέρηση στη διαχείριση και έτσι δεν συνιστάται από το American College of Medical Genetics and Genomic (Gregg et al, 2016).





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. Εμβρυϊκό κλάσμα (FF)

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την εργαστηριακή απόδοση του NIPT που βασίζεται στο cfDNA είναι το εμβρυϊκό κλάσμα, το οποίο είναι το ποσοστό του ολικού cfDNA στο μητρικό πλάσμα, που προέρχεται από το έμβρυο/πλακούντα (Wang et al, 2013). Έτσι, το NIPT για την εμβρυϊκή τρισωμία μπορεί να θεωρηθεί ως μια «υγρή βιοψία» του πλακούντα. Όσο πιο χαμηλό το FF, τόσο πιο δύσκολο είναι για το NIPT να ανιχνεύσει ένα ανευπλοειδικό έμβρυο. Το μέσο εμβρυϊκό κλάσμα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σε δείγματα που ελήφθησαν μεταξύ 10<sup>ης</sup> και 14<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης είναι περίπου 10%. Υπερεκτίμηση του εμβρυϊκού κλάσματος μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, ενώ υποτίμησή του μπορεί να προκαλέσει την απόρριψη των κατάλληλων δειγμάτων. Υπάρχουν διάφοροι βιολογικοί παράγοντες που μπορεί να το επηρεάσουν, όπως η ηλικία κύησης, το μητρικό βάρος, το κάπνισμα, η εμβρυϊκή ανευπλοειδία, το μέγεθος του πλακούντα καθώς επίσης το αν πρόκειται για μονήρη ή δίδυμη κύηση (Struble et al, 2014; Palomaki et al, 2015; Revello et al, 2016).

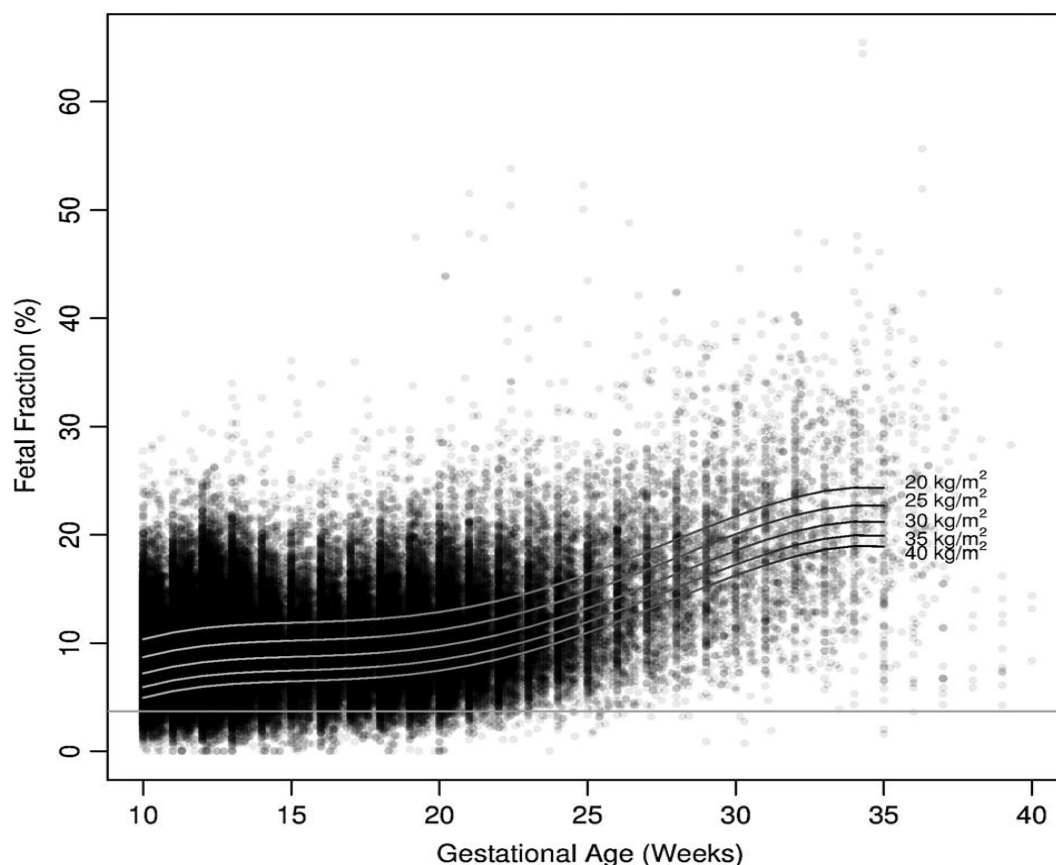
### 7.1. Ηλικία κύησης

Η ηλικία κύησης είναι θετικά συσχετισμένη με το εμβρυϊκό κλάσμα. Σε μια μελέτη ανάμεσα σε 140.377 δείγματα, περαιτέρω εξέταση χρησιμοποιώντας πολυωνυμική ποσοτική παλινδρόμηση έδειξε ότι συνολικά ο ρυθμός αύξησης του FF δεν είναι σταθερός σε διαφορετικές ηλικίες κύησης (Εικόνα 3). Από την ηλικία των 10 έως 12,5 εβδομάδων, το εμβρυϊκό κλάσμα αυξάνεται με ρυθμό 0,44% την εβδομάδα, πριν σταθεροποιηθεί σε ένα ποσοστό του 0,083% την εβδομάδα μεταξύ 12,5 και 20 εβδομάδων κύησης. Ο ρυθμός αύξησης γίνεται αισθητά υψηλότερος απ' την 20<sup>η</sup> περίπου εβδομάδα και από εκεί και έπειτα παραμένει σταθερός. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, το FF αυξάνεται στο μέγιστο ποσοστό του 0,821% ανά εβδομάδα. Κατά μέσο όρο, μετά από περίπου 30 εβδομάδες κύησης, το εμβρυϊκό κλάσμα είναι περισσότερο από το διπλάσιο (~20%) από εκείνο που παρατηρήθηκε σε κύηση έως και 20 εβδομάδες (~9%) (Kinnings et al, 2015). Η ιδανική ηλικία κύησης για την εφαρμογή του NIPT είναι από την 10<sup>η</sup> εβδομάδα και έπειτα, όπου έχουμε ένα επιθυμητό ποσοστό FF στην μητρική κυκλοφορία.

### 7.2. Μητρικό βάρος

Το BMI της μητέρας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο ποσοστό του FF, καθώς έχει αρνητική επίδραση πάνω του. Όσο αυξάνεται το BMI, τόσο το FF μειώνεται (Εικόνα 4). Αυτό συμβαίνει λόγω της πληθώρας λιποκυττάρων που βρίσκονται στην κυκλοφορία μιας γυναίκας με αυξημένο βάρος. Περίπου το 7% των γυναικών που ζυγίζουν 100 κιλά έχουν εμβρυϊκό κλάσμα <4%, το οποίο είναι το ελάχιστο όριο για την έκδοση αποτελέσματος για ορισμένα εργαστήρια. Αυτό αυξάνεται στο 50% όταν το βάρος της μητέρας φτάνει τα 160 κιλά. Ο δείκτης μάζας σώματος ταξινομείται στις εξής κατηγορίες: φυσιολογικός (<25,0), προ-παχυσαρκία (25,0-29,99), παχυσαρκία τύπου I (30,0–34,99) και τάξεις παχυσαρκίας II και III (35,0 και άνω). Έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση στο FF καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης σε γυναίκες με BMI 35 ή παραπάνω είναι ελάχιστη (Rolnik et al, 2018)

Μελέτη του 2019, όμως, έδειξε ότι αλληλουχώντας μικρότερα θραύσματα του cfDNA (107-145 bp) σε σχέση με το παραδοσιακό μήκος θραυσμάτων στο NIPT (160 bp), μπορεί να βελτιώσει το εμβρυϊκό κλάσμα. Με την αλληλούχηση μικρότερου τμήματος cfDNA, το NIPT μπορεί να μειώσει σημαντικά τις μέσες διαφορές FF μεταξύ διαφορετικών ομάδων BMI, ιδιαίτερα στις παχύσαρκες γυναίκες. Η μέθοδος αυτή είναι πιο αξιόπιστη για την βελτίωση του εμβρυϊκού κλάσματος απ' ό τι η αναμονή για μια μεγαλύτερη ηλικία κύησης (Qiao et al, 2019).



Εικόνα 3: Σχέση μεταξύ ηλικίας κύησης και κλάσματος εμβρύου. Χρησιμοποιήθηκε πολυωνυμικό μοντέλο του εμβρυϊκού κλάσματος έναντι της ηλικίας κύησης και του δείκτη μάζας σώματος της μητέρας (BMI) και οι προκύπτουσες γραμμές παλινδρόμησης εμφανίζονται για τις διάφορες τιμές BMI. Πηγή: Kinnings et al, 2015.

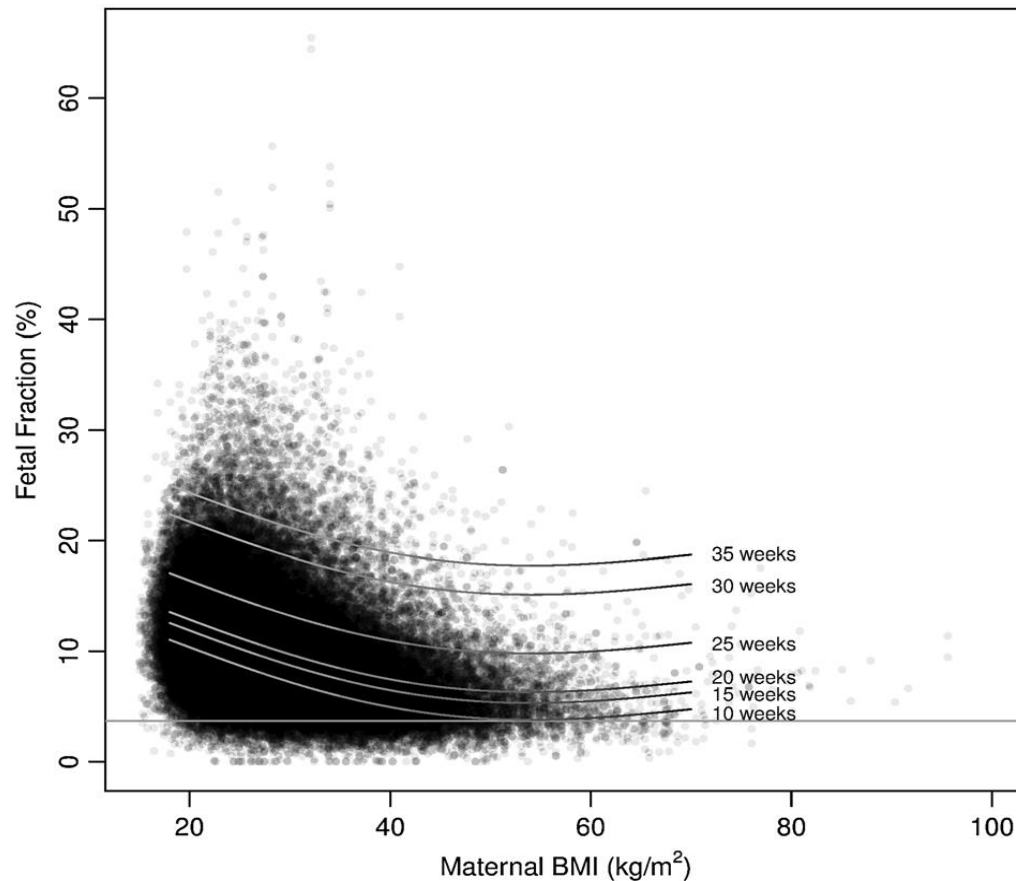
### 7.3. Εμβρυϊκή ανευπλοειδία

Η σχέση μεταξύ της ηλικίας κύησης και του εμβρυϊκού κλάσματος μπορεί να επηρεαστεί περαιτέρω από παράγοντες όπως το φύλο του εμβρύου και την κατάσταση της ανευπλοειδίας (Εικόνα 5). Ενώ σε γενικές γραμμές δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στο FF για τα αρσενικά έναντι των θηλυκών εμβρύων σε οποιαδήποτε ηλικία κύησης, η κατάσταση ανευπλοειδίας φαίνεται ότι επηρεάζει τη σχέση αυτή. Συνολικά, τα δείγματα που ταξινομούνται ως T21 (τρισωμία 21) θετικά, εμφανίζουν παρόμοια εμβρυϊκά κλάσματα με τα δείγματα που ταξινομούνται ως





ευπλοειδικά μέχρι και την 16<sup>η</sup> περίπου εβδομάδα κύησης. Από εκείνη την στιγμή και έπειτα, τα T21 θετικά δείγματα παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα FFs καθ' όλη τη διάρκεια της υπόλοιπης εγκυμοσύνης.

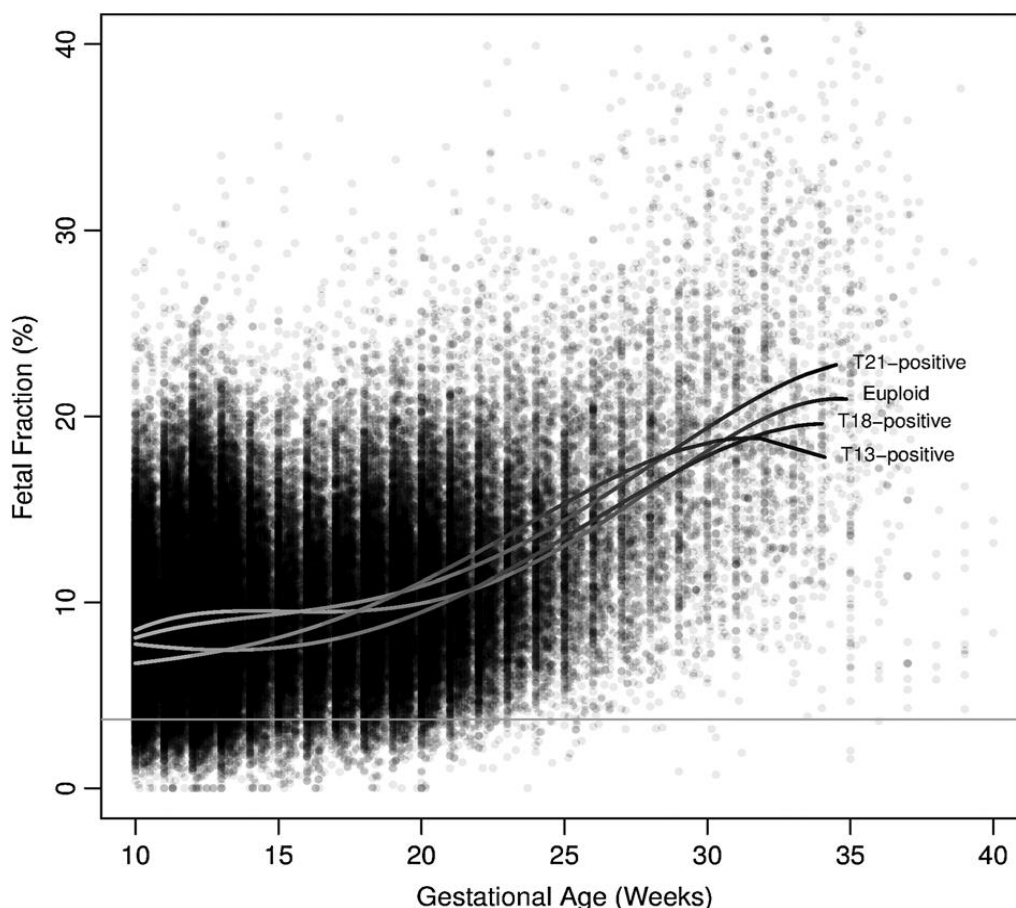


Εικόνα 4: Σχέση μεταξύ μητρικού δείκτη μάζας σώματος (BMI) και εμβρυϊκού κλάσματος. Χρησιμοποιήθηκε ένα πολυωνυμικό μοντέλο του εμβρυϊκού κλάσματος έναντι του μητρικού BMI και της ηλικίας κύησης και οι προκύπτουσες γραμμές παλινδρόμησης εμφανίζονται για ποικίλες διαφορετικές ηλικίες κύησης. Πηγή: Kinnings et al, 2015.

Τα T18 (τρισωμία 18) θετικά δείγματα έχουν πολύ χαμηλότερα ποσοστά εμβρυϊκού κλάσματος από τα ευπλοειδικά δείγματα μέχρι και την 21<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, μετά την οποία παρουσιάζουν μια πολύ όμοια τάση. Τα T13 (τρισωμία 13) θετικά δείγματα ξεκινούν με το χαμηλότερο FF σε όλους τους τύπους δειγμάτων, αλλά στην 18<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης έχουν ξεπεράσει τα ευπλοειδικά δείγματα και κατά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, έχουν ξεπεράσει ακόμη και τα δείγματα που είναι θετικά σε T21, με αποτέλεσμα να γίνουν ο τύπος δείγματος με το υψηλότερο FF από αυτό το σημείο μέχρι την 28<sup>η</sup> περίπου εβδομάδα κύησης (Rava et al, 2014; Hall et al, 2014).

#### 7.4. Μέγεθος του πλακούντα

Είναι γνωστό ότι το μικρό μέγεθος του πλακούντα συσχετίζεται συνήθως με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου. Στην T18 οι τιμές της β-hCG και της PAPP-A είναι χαμηλές ενώ η ανάπτυξη του πλακούντα και του εμβρύου καθυστερεί. Για το λόγο αυτό, αυτή η μείωση στο εμβρυϊκό κλάσμα έχει συνδεθεί με το μικρό μέγεθος του πλακούντα (Kirbas et al, 2016).



Εικόνα 5: Σχέση μεταξύ ηλικίας κύησης και εμβρυϊκού κλάσματος. Οι διάμεσες γραμμές πολυωνυμικής ποσοτικής παλινδρόμησης αναφέρονται σε δείγματα που ταξινομούνται ως ευπλοειδικά, T21-θετικά, T18-θετικά ή T13-θετικά. Πηγή: Kinnings et al, 2015.

#### 7.5. Αριθμός εμβρύων

Η ανάλυση του cfDNA είναι αρκετά πολύπλοκη σε δίδυμες κύσεις. Σε μονοχοριονικά δίδυμα, δεδομένου ότι τα έμβρυα με την ίδια γενετική δομή (σχεδόν πάντοτε αμφότερα τα έμβρυα είναι επηρεασμένα ή φυσιολογικά ταυτόχρονα) δίνουν τα ίδια αλληλόμορφα του cfDNA στη μητρική κυκλοφορία, η αξιολόγηση του κινδύνου ανευπλοειδίας είναι παρόμοια με αυτή των μονήρων εγκυμοσύνων. Η πλειοψηφία των διχοριονικών κυήσεων, από την άλλη πλευρά, είναι διζυγωτικά. Η ποσότητα cfDNA που προσφέρεται από κάθε έμβρυο στη μητρική κυκλοφορία μπορεί να διαφέρει (Gil et al, 2014). Ο Struble και οι συνεργάτες του, στην μελέτη τους,



στόχευσαν στη μέτρηση του εμβρυϊκού κλάσματος σε δίδυμες κυήσεις. Τα μονοχοριονικά δίδυμα δίνουν τα ίδια αλληλόμορφα cfDNA στην κυκλοφορία της μητέρας. Έτσι, τα κλάσματά τους είναι παρόμοια με τις μονήρεις εγκυμοσύνες (Struble et al, 2014). Ωστόσο, στα διχοριονικά δίδυμα, η συμβολή του κάθε εμβρύου στην συγκέντρωση του DNA στη μητρική κυκλοφορία είναι διαφορετική. Ως εκ τούτου, μπορεί να υπάρχει σύγχυση στις διαγνώσεις και μείωση της επιτυχίας των αποτελεσμάτων (Qu et al, 2013). Σε μια μετα-ανάλυση που έγινε από τον Gil και τους συνεργάτες του, ο ρυθμός ανίχνευσης της T21 για δίδυμες εγκυμοσύνες βρέθηκε να είναι στο 93,7% και το ποσοστό ψευδώς θετικών στο 0,23% (Gil et al, 2014). Το 2016 μελετήθηκαν 438 δίδυμες και 10.698 μονήρεις κυήσεις και συγκρίθηκαν ως προς την κατανομή του FF και του ποσοστού αποτυχίας αποτελέσματος, ενώ μελετήθηκε, για τις δίδυμες κυήσεις, η απόδοση του ελέγχου για τις τρισωμίες 21, 18 και 13 με cfDNA κατά το πρώτο τρίμηνο (10<sup>η</sup> – 13<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 και 6. Σε δίδυμες κυήσεις που υποβάλλονται σε εξέταση πρώτου τριμήνου για τρισωμίες με cfDNA, το εμβρυϊκό κλάσμα είναι χαμηλότερο και το ποσοστό αποτυχίας υψηλότερο σε σύγκριση με τις μονήρεις. Ο αριθμός των τρισωμικών δίδυμων κυήσεων που εξετάστηκαν ήταν πολύ μικρός για μια ακριβή εκτίμηση της απόδοσης της ανίχνευσης, αλλά μπορεί να είναι παρόμοιος με εκείνων των μονήρων (Sarno et al, 2016).

Όσο μεγαλύτερο είναι το FF, τόσο καλύτερη είναι η ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στις ευπλοειδείς και τις ανευπλοειδείς εγκυμοσύνες, με αποτέλεσμα τόσο καλύτερη να είναι η απόδοση της δοκιμής. Αντίθετα, αν το FF είναι πολύ χαμηλό, μια χρωμοσωμική ανωμαλία θα μπορούσε να καλυφθεί από τη συντριπτική αναλογία του ευπλοειδικού μητρικού cfDNA, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων (Palomaki et al, 2012; <sup>1</sup>Sparks et al, 2012).

**Πίνακας 5: Κατανομή του FF και ποσοστό αποτυχίας**

	Μονήρεις (10.698)	Δίδυμες (438)
<b>FF</b>	11,0%	8,0%
<b>Ποσοστό αποτυχίας</b>	2,9%	9,4%
<b>Ποσοστό αποτυχίας λόγω IVF</b>	9,5%	56,2%

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

Μια ομάδα προσδιόρισε θεωρητικά τον σημαντικό ρόλο του FF σε συνδυασμό με το βάθος αλληλούχησης για αξιόπιστα αποτελέσματα NIPT. Ένα χαμηλό FF μπορεί να αντισταθμιστεί εν μέρει από υψηλότερο βάθος αλληλούχησης και ο αριθμός των παραγόμενων reads μπορεί να υπερνικήσει τον στατιστικό «θόρυβο» (Benn & Cuckle, 2014). Η πλειονότητα των προσεγγίσεων του NIPT περιλαμβάνει τη μέτρηση του εμβρυϊκού cfDNA ως βασικό παράγοντα ποιότητας, για να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία της ερμηνείας των αποτελεσμάτων των δοκιμών (Ehrlich et al, 2011; <sup>2</sup>Sparks et al, 2012) ενώ άλλες δεν περιλαμβάνουν μέτρηση του FF, παρέχοντας ακριβή αποτελέσματα χωρίς γνώση της ποσότητας του εμβρυϊκού cfDNA σε ένα δείγμα (Sehnert et al, 2011; Dan et al, 2012). Μια πρόσφατη μελέτη αποδεικνύει ότι είναι εφικτό να αυξηθεί το κλάσμα cffDNA με επιλεκτικό εμπλουτισμό



των βραχέων θραυσμάτων cfDNA. Παρόλο που η χρήση του εμπλουτισμού cffDNA στο NIPT ελαττώνει ελαφρώς την εξειδίκευση, αυτή η νέα μέθοδος μπορεί να αποφύγει τα περισσότερα αποτυχημένα αποτελέσματα και να μειώσει σχεδόν στο ήμισυ τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που προκαλούνται από το χαμηλό FF, πράγμα που βελτιώνει τη συνολική απόδοση του NIPT στην κλινική πράξη (Hu et al, 2019). Το 4% ως όριο απόκλισης (cut-off) καθορίστηκε χρησιμοποιώντας στατιστική μοντελοποίηση βασιζόμενη στην απαίτηση για επαρκές βάθος στην αλληλούχηση των reads ως συνάρτηση του FF για την ανίχνευση εμβρυϊκών ανευπλοειδιών (Fan & Quake, 2010; Canick et al, 2013). Ωστόσο, δεν υπάρχουν διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα για το πραγματικό όριο ανίχνευσης αυτών των προσεγγίσεων NIPT (δηλαδή το χαμηλότερο FF με ανιχνεύσιμη ανευπλοειδία), υποστηρίζοντας την προαναφερθείσα υπόθεση. Κατά συνέπεια, η χρήση της παραπάνω cut-off τιμής δεν θα ήταν απαραίτητα κατάλληλη για όλες τις μεθοδολογίες ελέγχου με cfDNA. Σε μια μελέτη του 2016 απέδειξαν ότι το ελάχιστο επίπεδο FF που απαιτείται για την ακριβή αξιολόγηση της ανευπλοειδίας πρέπει να σχετίζεται με το πραγματικό όριο ανίχνευσης της εκάστοτε προσέγγισης NIPT που χρησιμοποιείται και όχι να είναι κατ' ανάγκη σταθερό στο 4% για όλες τις μεθοδολογίες ελέγχου cfDNA (Fiorentino et al, 2016).

**Πίνακας 6: Ποσοστά ανίχνευσης τρισωμιών στον έλεγχο 1<sup>ου</sup> τριμήνου**

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

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

Η αξιοπιστία των μη επεμβατικών προγεννητικών εξετάσεων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ακριβή εκτίμηση του εμβρυϊκού κλάσματος. Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι, χρησιμοποιώντας διαφορετικές ιδιότητες αναλυθέντος γονιδιωματικού υλικού, όπως για παράδειγμα το μήκος και τον γονιδιωματικό τόπο των θραυσμάτων στο DNA που αλληλουχείται. Αυτές οι δύο πηγές πληροφορίας δεν έχουν κάποια σχέση μεταξύ τους, αλλά μέχρι στιγμής δεν έχουν δημοσιευθεί προσπάθειες να συνδυαστούν για να υπάρξει βελτίωση του προγνωστικού δείκτη. Μόλις τον Ιούνιο του 2019 μια ομάδα παρουσίασε τα αποτελέσματα της έρευνάς της. Συλλέξανε 2.454 μεμονωμένα ευπλοειδικά δείγματα αρσενικών εμβρύων από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε δοκιμασία NIPT. Τα FF υπολογίστηκαν με τη χρήση πολλών προτεινόμενων προγνωστικών μεθόδων. Έδειξαν ότι η πρόβλεψη που βασίζεται στο μήκος των θραυσμάτων του DNA που αλληλουχείται μπορεί να επιτύχει σχεδόν την ίδια ακρίβεια με τις τελευταίες μεθόδους, οι οποίες βασίζονται στις γονιδιωματικές τους θέσεις και πως ο συνδυασμός διαφόρων χαρακτηριστικών των δειγμάτων οδηγεί σε έναν προγνωστικό παράγοντα που έχει ανώτερη ακρίβεια πρόβλεψης σε σχέση με την εκάστοτε μεμονωμένη προσέγγιση (Gazdarica et al, 2019).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. Ανακριβή αποτελέσματα

Όπως προαναφέρθηκε, το NIPT έχει αυξημένη ευαισθησία στην ανίχνευση των πιο συνηθισμένων τρισωμιών και λίγο μικρότερη για την μονοσωμία X. Τα στατιστικά στοιχεία απόδοσης επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για έναν έλεγχο με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να θεωρηθεί διαγνωστικός. Οι λόγοι για τους οποίους μπορεί να υπάρχουν ανακριβή αποτελέσματα είναι βιολογικοί, τεχνικοί ή/και άγνωστοι.

### 8.1. Βιολογικοί λόγοι

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η βιολογική προέλευση των ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων του NIPT, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε την κυτταρογενετική των χοριακών λάχνων. Οι χοριακές λάχνες μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία για κυτταρογενετικές μελέτες με δύο τρόπους: την άμεση ή ημι-άμεση τεχνική, που είναι η καλλιέργεια λάχνων μικρής διάρκειας (STC-villi) και την μακράς διάρκειας μέθοδο (LTC-villi) (Simoni et al, 1983; Gibas et al, 1987; Smidt-Jensen et al, 1989). Η προέλευση των κυττάρων που ερευνούνται στα κυτταρογενετικά παρασκευάσματα είναι ουσιαστικά διαφορετική και στις δύο τεχνικές. Τα κύτταρα στις STC προέρχονται από την κυτταροτροφοβλάστη, το εξωτερικό στρώμα κυττάρων των χοριακών λάχνων και εκείνα των LTC είναι κυρίως από το εσωτερικό στρώμα κυττάρων, τον μεσεγγυματικό πυρήνα. Η καταλληλότερη μέθοδος (gold standard) για την κυτταρογενετική ανάλυση των λάχνων είναι η διερεύνηση αμφότερων των STC και των LTC κυττάρων (Van den Berg et al, 2000). Με το NIPT, μόνο το DNA από τον κυτταροτροφοβλάστη διερευνάται και επομένως τα αποτελέσματα θα είναι συγκρίσιμα με εκείνα των STC. Η κυτταροτροφοβλάστη προέρχεται από την τροφοβλάστη της βλαστοκύστης, ενώ ο μεσεγγυματικός πυρήνας των χοριακών λάχνων, καθώς και το ίδιο το έμβρυο, προέρχονται από την μάζα των εσωτερικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ο μεσεγγυματικός πυρήνας προέρχεται από την υποβλάστη της μάζας των εσωτερικών κυττάρων και το ίδιο το έμβρυο από την επιβλάστη (Crane & Cheung, 1988; Bianchi et al, 1993). Λόγω της άνισης κατανομής των μη φυσιολογικών κυττάρων στα διάφορα στρώματα, οι καρυότυποι της κυτταροτροφοβλάστης, του μεσεγγυματικού πυρήνα και του εμβρύου μπορεί να είναι διαφορετικοί (Wolstenholme, 1996).

#### 8.1.1. Περιορισμένος μωσαϊκισμός του πλακούντα (CPM)

Ο περιορισμένος μωσαϊκισμός του πλακούντα συμβαίνει όταν ο πλακούντας εμφανίζει μια χρωμοσωμική ανωμαλία, αλλά το έμβρυο είναι χρωμοσωμικά φυσιολογικό. Είναι η πιο συνηθισμένη αιτία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων του NIPT και συμβαίνει συχνότερα για την T13 και την μονοσωμία X σε σχέση με την T18 ή την T21 (Grati et al, 2014). Η πιθανότητα επιβεβαίωσης μιας χρωμοσωμικής κατάστασης στο έμβρυο μειώνεται σημαντικά όταν υπάρχουν ενδείξεις μωσαϊκισμού του πλακούντα. Αυτή η γνώση μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για να βοηθήσει τους ασθενείς με την επιλογή της καταλληλότερης δοκιμής παρακολούθησης. Πολύ σπάνια, ο CPM μπορεί να προκαλέσει ένα πλήρως ασύμφωνο αποτέλεσμα NIPT, όπως για παράδειγμα ένα αξιοσημείωτο αποτέλεσμα





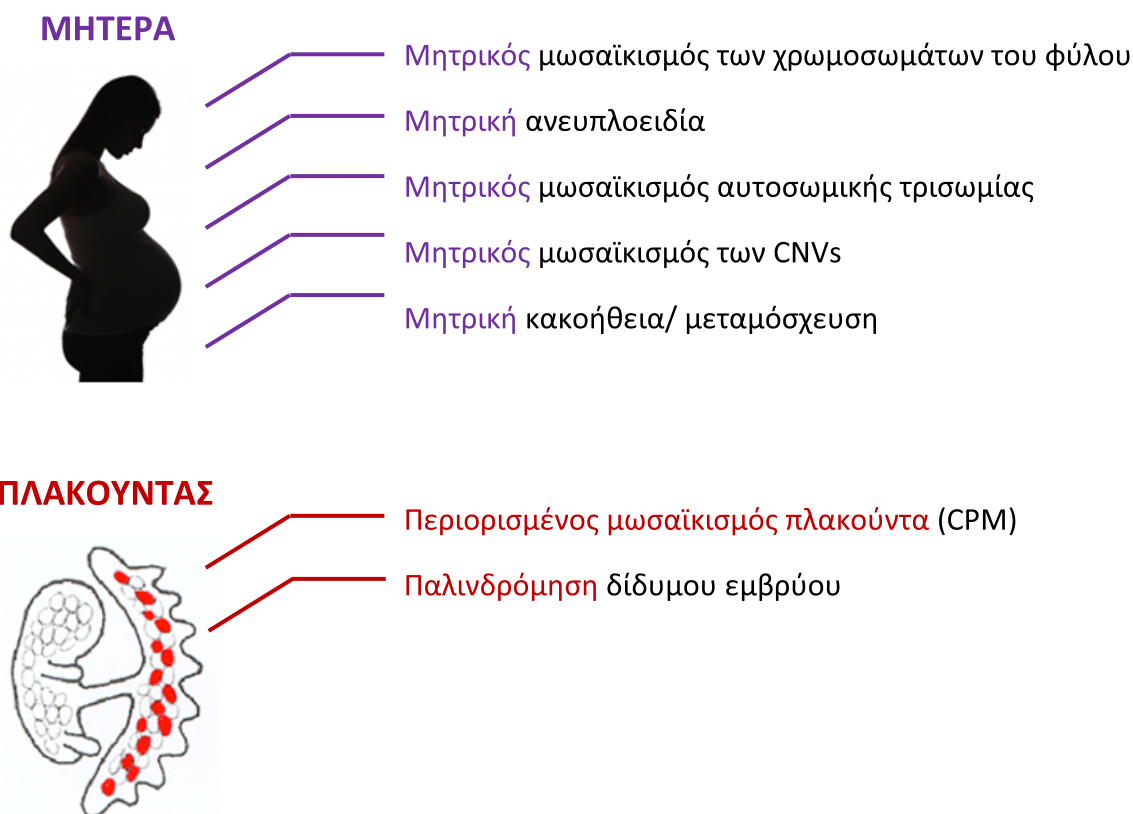
υψηλού κινδύνου μονοσωμίας Χ, όπου το έμβρυο είχε καρυότυπο 47,ΧΥΥ. Αυτό το ασυνήθιστο εύρημα μπορεί να εξηγηθεί από ένα ζυγωτό 46, ΧΥ που έχει κακή κατανομή του χρωμοσώματος Υ κατά τη διάρκεια της πρώτης κυτταρικής διαίρεσης μετά τη σύλληψη. Αυτό οδηγεί στην δημιουργία δύο κυτταρικών σειρών, 45,Χ και 47,ΧΥΥ. Τα κύτταρα 45,Χ συνεισέφουν στην πλειονότητα του τροφοβλάστη του πλακούντα, ενώ η εσωτερική κυτταρική μάζα και τα πρόδρομα κύτταρα του εμβρύου αποτελούνται από κύτταρα 47,ΧΥΥ. Αυτό το σφάλμα μπορεί να προκαλέσει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα για την μονοσωμία Χ και ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα για το 47,ΧΥΥ στο ίδιο δείγμα NIPT. Το παράδειγμα αυτό επισημαίνει με σαφήνεια την πολυπλοκότητα του μωσαϊκισμού στο πρώιμο έμβρυο (Partum Post, 2019).

### 8.1.2. Μωσαϊκισμός του πλακούντα

Σπάνια, ο μωσαϊκισμός του πλακούντα μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Huijsdens-van Amsterdam et al, 2018). Σε αυτή την περίπτωση, τα τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα είναι κατά κύριο λόγο φυσιολογικά ενώ το έμβρυο έχει χρωμοσωμική ανωμαλία. Αυτός ο τύπος μωσαϊκισμού του πλακούντα μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, παρά την παρουσία μέσου ή ακόμη και υψηλού ποσοστού εμβρυϊκών κλασμάτων σε αυτά τα δείγματα. Λόγω της προέλευσης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA και της πιθανότητας χρωμοσωμικού μωσαϊκισμού του πλακούντα, δεν μπορεί ποτέ για το NIPT να επιτευχθεί 100% ευαισθησία και ειδικότητα (Van Opstal et al, 2016).

### 8.1.3. Δίδυμη κύηση με παλινδρόμηση ενός εμβρύου («vanishing twin»)

Η παρουσία ενός «εξαφανισμένου δίδυμου» στα πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης μπορεί να προκαλέσει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα του NIPT όταν το «εξαφανισμένο» δίδυμο είναι τρισωμικό. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα του πλακούντα από το έμβρυο αυτό συνεχίζουν να απελευθερώνουν cfDNA στην μητρική κυκλοφορία έως και 6-8 εβδομάδες μετά (Pertile et al, 2017; Hochstenbach et al, 2018). Αυτό μπορεί να συμβεί για πολλές εβδομάδες μετά την αρχική παλινδρόμηση και επίσης εξαρτάται από την κύηση. Όσο μεγαλύτερο το χρονικό διάστημα της κύησης του «εξαφανισμένου» εμβρύου, τόσο περισσότερο παραμένει το cffDNA στην κυκλοφορία (Futch et al, 2013). Η πιθανότητα ψευδώς θετικού αποτελέσματος στην περίπτωση αυτή μπορεί να φτάσει το 15% (Curnow et al, 2015). Για τον λόγο αυτό πριν την αιμοληψία απαιτείται υπερηχογραφικός έλεγχος για να επιβεβαιωθεί η βιωσιμότητα του εμβρύου και να αποκλειστεί το ενδεχόμενο δίδυμης κύησης ή δίδυμης κύησης με παλινδρόμηση του ενός εμβρύου.



Εικόνα 6: Λόγοι μητρικής και πλακουντιακής προέλευσης για να είναι ένα αποτέλεσμα ανακριβές.

#### 8.1.4. Μητρικός μωσαϊκισμός

Κατά μέσο όρο, τα δείγματα NIPT που συλλέχθηκαν σε ηλικία κύησης 10-12 εβδομάδων περιλαμβάνουν 90% μητρικό cfDNA και 10% cfDNA απ' τον πλακούντα. Ένας μωσαϊκισμός χαμηλού βαθμού που μεταφέρεται από τη μητέρα μπορεί μερικές φορές να συγχύσει τα αποτελέσματα, δίνοντας ψευδώς θετική απάντηση. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα όταν η μητέρα φέρει έναν χαμηλού βαθμού μωσαϊκισμό για την μονοσωμία X. Τα θραύσματα του μητρικού cfDNA είναι, κατά μέσο όρο, ελαφρώς μεγαλύτερα από τα θραύσματα cfDNA του πλακούντα. Αυτή η διαφορά χρησιμοποιείται για να βοηθήσει στη διαφοροποίηση του μητρικού cfDNA από το εμβρυϊκό cfDNA, μειώνοντας έτσι τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που σχετίζονται με τον μητρικό μωσαϊκισμό. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι με επιπρόσθετη επιλογή μεγεθών στα *in silico* προγράμματα και ανάλυση δεδομένων, ενισχύεται το PPV (Shubina et al, 2017).

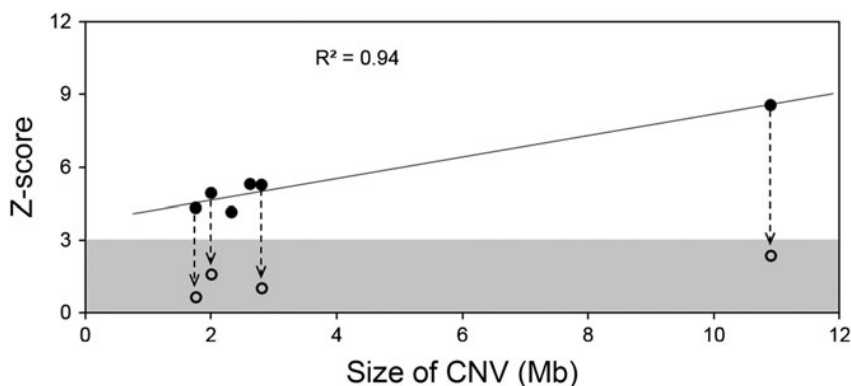
#### 8.1.5. Μητρικά CNVs

Ήδη από το 2015 αρκετές ομάδες που χρησιμοποιούν διαφορετικές μεθοδολογίες NIPT έχουν αναφέρει τα CNVs ως πρόσθετη αιτία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (<sup>1</sup>Snyder et al, 2015; Wang et al, 2015; Flowers et al, 2015; Bayindir et al, 2015; <sup>2</sup>Snyder et al, 2015; Chudova et al, 2016; Brison et al, 2017). Η παρουσία των διπλασιασμών σε μητρικά CNVs φτάνει το 10% των ψευδώς θετικών





αποτελεσμάτων ενώ υπάρχει και ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των υψηλών z-scores και του αυξημένου μεγέθους του μητρικού CNV (Εικόνα 7) (Zhou et al, 2017). Ενώ υπολογίζεται ότι τα μητρικά CNVs προκαλούν ψευδώς θετικό αποτέλεσμα σε 1 στις 860 εγκύους, με την χρήση διαφόρων αλγορίθμων οι οποίοι «φιλτράρουν» τα μητρικά CNVs, επιτυγχάνεται μείωση του ποσοστού αυτού σε 1 στις 520.000 εγκύους (Kaseniit et al, 2018).



Εικόνα 7: Συσχέτιση μεταξύ z-score και μεγέθους CNV. Πηγή: Zhou et al, 2017.

#### 8.1.6. Μητρική κακοήθεια

Η μητρική κακοήθεια αποτελεί μια σπάνια αιτία των ανακριβών αποτελεσμάτων NIPT που δεν αντικατοπτρίζουν τον εμβρυϊκό καρυότυπο (Amant et al, 2015). Το cfDNA προέρχεται κυρίως από αποπτωτικά λευκά αιμοσφαίρια και τυπικά αντανακλά την χρωμοσωμική κατάσταση του δότη του (Anker et al, 1975). Σε ορισμένες περιπτώσεις, ένας γενετικά διαφορετικός πληθυσμός κυττάρων που φιλοξενείται στο ίδιο άτομο μπορεί να συνεισφέρει στο ολικό cfDNA, όπως στην περίοδο της κύησης.

Μία άλλη περίπτωση είναι του κυκλοφορούντος DNA του όγκου (circulating tumor DNA, ctDNA), που απελευθερώνεται από τα κύτταρα του όγκου στην κυκλοφορία του αίματος (Leon et al, 1997; Bettegowda et al, 2014; Schwaederle et al, 2016; Tie et al, 2016). Ως εκ τούτου, σε μια έγκυο γυναίκα που φέρει έναν όγκο, υπάρχει η πιθανότητα τόσο το cffDNA όσο και το ctDNA να συνεισφέρουν στο συνολικό cfDNA. Αν και σπάνιες, έχουν αναφερθεί κακοήθειες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Eibye et al, 2013). Έχει παρατηρηθεί και μελετηθεί ότι σε πληθυσμό εγκύων γυναικών που υπέβαλαν δείγμα αίματος για έλεγχο cfDNA, ανιχνεύεται ένα ανώμαλο γονιδιακό προφίλ που δεν είναι σύμφωνο με εμβρυϊκές ανωμαλίες σε περίπου 10 από τις 100.000 περιπτώσεις. Ένα μέρος αυτών (18 από τις 43, 41,9%) αποδόθηκε σε νεοπλάσματα μητρικής κακοήθειας (Dharajiya et al, 2017). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την ανάγκη μιας ελεγχόμενης δοκιμής για την αξιολόγηση της δυνατότητας χρήσης cfDNA ως πρώιμου βιοδείκτη καρκίνου ενώ είναι απαραίτητη η κλινική παρακολούθηση των εγκύων με περισσότερες από μία



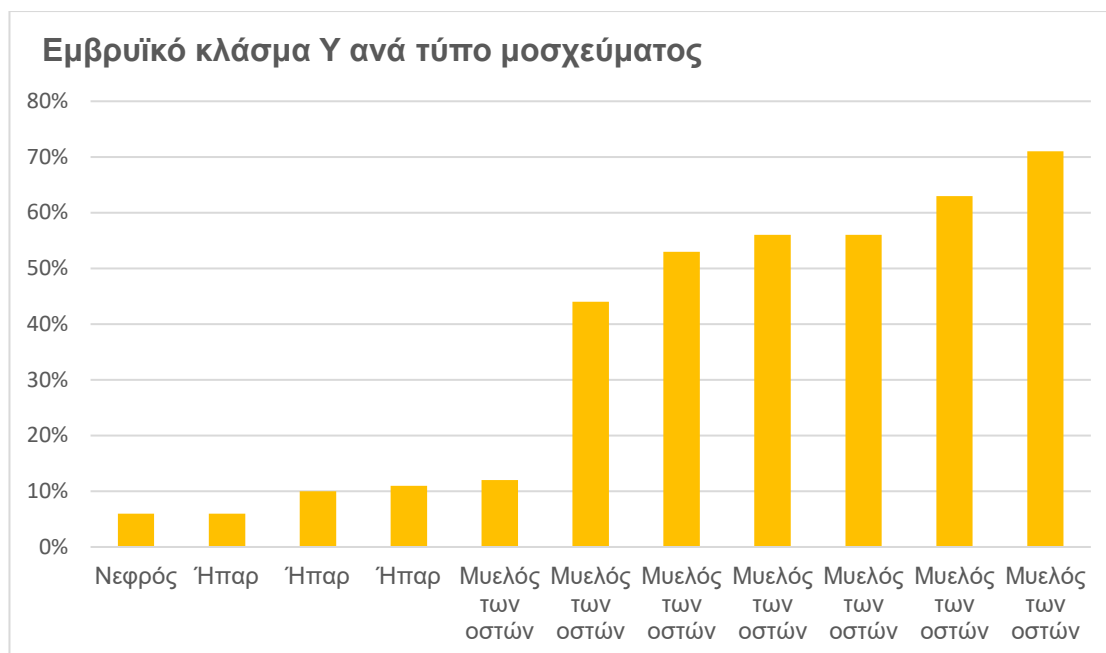
χρωμοσωμικές ανωμαλίες με ιδιαίτερη προσοχή σε εκείνες με ευρήματα λειομυωμάτων της μήτρας.

#### 8.1.7. Μητρική μεταμόσχευση οργάνου

Πέρα από τον μωσαϊκισμό, τα CNVs, τους προσυμπτωματικούς ή ακόμα και τους μη διαγνωσμένους καρκίνους της μητέρας που μπορεί να δώσουν ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα, λανθασμένη απάντηση μπορεί να παρθεί και μετά από μεταμόσχευση οργάνου. Προηγούμενες μελέτες βασισμένες σε μεταμοσχευμένους ασθενείς που έλαβαν μόσχευμα βλαστοκυττάρων και ήπατος έδειξαν ότι το πλάσμα του cfDNA (circulating cell free DNA), αν και κυρίως αιμοποιητικής προέλευσης, μπορεί να προέρχεται από μεταμοσχευμένα όργανα και συμβάλλει σημαντικά στο cfDNA. Στο αίμα των παραληπτών μοσχεύματος καρδιάς παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα cfDNA του γονιδιώματος του δότη, ενδεικτικά με αυτά της οξείας κυτταρικής απόρριψης (De Vlaminck et al, 2014). Θεωρώντας ότι οι μεταμοσχεύσεις οργάνων μπορούν να αποβάλλουν σχετικά μεγάλες ποσότητες cfDNA στη ροή του αίματος, η αναλογία θραυσμάτων DNA που προέρχονται από τη μεταμόσχευση θα είναι υψηλή και θα μειώσει το συνολικό κλάσμα DNA που προέρχεται από τον πλακούντα στο cfDNA. Κατά συνέπεια, μια εμβρυϊκή τρισωμία θα επικαλυφθεί από το μεγαλύτερο κλάσμα των «φυσιολογικών» διπλοειδών χρωμοσωμάτων, κάτι που θα μπορούσε να βλάψει την ακρίβεια της ανίχνευσης της εμβρυϊκής τρισωμίας (Neofytou et al, 2018). Μια άλλη έρευνα έδειξε ότι όλοι οι ιστοί και τα όργανα δεν συμβάλλουν εξίσου στο μητρικό cfDNA και μπορούν να μιμηθούν τη συμβολή εμβρύου και πλακούντα. Στις μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών υπάρχει μεγαλύτερη συνεισφορά του εμβρυϊκού κλάσματος Υ απ' ότι στα μοσχεύματα του ήπατος ή των νεφρών (Εικόνα 8) (Wardrop et al, 2018). Πέρα από αυτό, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις, όπως η ανεπάρκεια της βιταμίνης B12, όπου επηρεάζουν το προφίλ της αλληλούχησης του DNA (Schuring-Blom et al, 2016).

#### 8.2. Τεχνικοί λόγοι

Οι τεχνικοί λόγοι για τους οποίους ένα αποτέλεσμα μπορεί να μην συνάδει με τον υπέρηχο είναι αρκετοί. Αρχικά η πολυπλοκότητα της μεθοδολογίας και οι χειρισμοί την καθιστούν μια ευαίσθητη μέθοδο. Οι παράμετροι της αλληλούχησης, όπως τα διαστήματα αναφοράς, το βάθος της αλληλούχησης και ο αριθμός των reads, παίζουν και αυτά πολύ σημαντικό ρόλο. Ακόμα και η ίδια η βιοπληροφορική που απαιτείται για την ανάλυση και μελέτη των αποτελεσμάτων μπορεί να δυσκολέψει την κατάσταση, καθώς υπάρχουν πολλά μοντέλα ανάλυσης για τα οποία γνωρίζουμε λίγα. Προαναλυτικά, τα προβλήματα μπορεί να εντοπισθούν κατά την λήψη, την συντήρηση και την μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο. Τέλος, και ίσως το πιο βασικό απ' όλα, είναι ο ανθρώπινος παράγοντας. Το 0.5-1% των λαθών που συμβαίνουν στο εργαστήριο οφείλονται στην επέμβαση των ανθρώπων.



*Εικόνα 8: Μελετήθηκαν 11 περιπτώσεις μεταμόσχευσης οργάνου. Παρατηρείται μεγαλύτερη συνεισφορά του εμβρυϊκού κλάσματος Υ μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών σε σχέση με εκείνη από μεταμόσχευση νεφρού. Πηγή: Wardrop et al, 2018.*



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. Κυήσεις υψηλού/χαμηλού κινδύνου

Μια εγκυμοσύνη θεωρείται υψηλού κινδύνου όταν υπάρχουν πιθανές επιπλοκές που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη μητέρα, το έμβρυο ή και τους δύο. Οι υψηλού κινδύνου κυήσεις απαιτούν διαχείριση από έναν ειδικό για να εξασφαλίσει την καλύτερη έκβαση για τη μητέρα και το έμβρυο. Σαν «υψηλού κινδύνου» χαρακτηρίζονται οι γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό γενετικών διαταραχών, γυναίκες που φέρουν δίδυμα ή και περισσότερα έμβρυα, γυναίκες που είχαν προηγουμένως παιδί με χρωμοσωμική ανωμαλία ή/και αυτές που είναι άνω των 35 ετών (cut off για την "προχωρημένη μητρική ηλικία").

Αρχικά, οι περισσότερες κατευθυντήριες οδηγίες συνιστούσαν το NIPT με cfDNA για γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο εμβρυϊκής ανευπλοειδίας, κάτι που αντανakλούνταν από τις επικυρωμένες μελέτες στον πληθυσμό (Devers et al, 2013; Benn et al, 2013). Το 2013, το Αμερικανικό Κολέγιο Ιατρικής Γενετικής εξέδωσε δήλωση σχετικά με τη χρήση του NIPT στην κλινική πράξη χωρίς περιορισμό από κάποια κλινική ένδειξη ή την ηλικία της μητέρας (Gregg et al, 2013; <sup>2</sup>Bianchi et al, 2014) και ακολούθησε η μελέτη του Norton το 2015, η οποία έδειξε ανώτερη απόδοση της στοχευμένης αλληλούχησης του cfDNA σε σύγκριση με την παραδοσιακή εξέταση του πρώτου τριμήνου για την τρισωμία του εμβρύου σε κυήσεις στον γενικό πληθυσμό (Norton et al, 2015). Μεταγενέστερες κατευθυντήριες γραμμές συμπεριέλαβαν αυτά τα στοιχεία για την υποστήριξη της διάθεσης του NIPT σε όλες τις εγκύους, ανεξάρτητα από την ηλικία της μητέρας ή την κατάσταση κινδύνου (Benn et al, 2015; Committee on Genetics, 2015; Greeg et al, 2016). Αν και τα δεδομένα της μητρικής ηλικίας υποστηρίζουν την αύξηση της χρήσης του NIPT στον πληθυσμό χαμηλού κινδύνου, εξακολουθεί να υπάρχει δυσανάλογη ποσότητα δειγμάτων από γυναίκες 35 ετών και άνω (Chen et al, 2018). Μεγάλο μέρος του πληθυσμού με κύηση χαμηλού κινδύνου δεν χρησιμοποιεί επί του παρόντος το NIPT. Ωστόσο, καθώς τα εμπόδια πρόσβασης και κόστους επιλύονται, η χρήση του NIPT στον πληθυσμό χαμηλού κινδύνου πιθανόν να συνεχίσει να αλλάζει με την πάροδο του χρόνου.



**Πίνακας 7: Σύνοψη αποτελεσμάτων σύμφωνα με την ομαδοποίηση GRADE ( Balssem et al, 2011)**

Τρισωμία	Πιθανότητα κινδύνου	Αρ. Δειγμάτων (αρ. μελετών)	Ευαισθησία (συνολική)	Ειδικότητα (συνολική)	Ποιότητα δειγμάτων	ΑΘ/ΨΑ/ΨΑ/ΑΑ
<b>T21</b>	Υψηλή	10.474 (26)	0,998	0,999	Μέτρια	1833 ΑΘ 52 ΨΘ 8 ΨΑ 105.575 ΑΑ
<b>T21</b>	Μέση	62.201 (6)	0,993	0,999	Μέτρια	156 ΑΘ 37 ΨΘ 1 ΨΑ 62.107 ΑΑ
<b>T18</b>	Υψηλή	146.465 (22)	0,977	0,989	Μέτρια	566 ΑΘ 70 ΨΘ 15 ΨΑ 146.129 ΑΑ
<b>T13</b>	Υψηλή	137.078 (18)	0,975	0,999	Περιορισμένη	134 ΑΘ 56 ΨΘ 10 ΨΑ 137.499 ΑΑ

*T21:τρισωμία 21, T18:τρισωμία 18, T13:τρισωμία 13, ΑΘ:αληθώς θετικά, ΨΑ:ψευδώς θετικά, ΨΑ:ψευδώς αρνητικά, ΑΑ:αληθώς αρνητικά, Πηγή: Iwarsson et al, 2016*

Παρόλο που το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (ACOG) από το 2015 και μετά προτείνει το NIPT να προσφέρεται σε όλες τις έγκυες γυναίκες, συνιστούν να πραγματοποιείται μόνο στις γυναίκες «υψηλού κινδύνου».



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. Πότε το cfDNA δεν ενδείκνυται

Το NIPT για τις χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες είναι μια εξαιρετική δοκιμή ελέγχου για τις κοινές χρωμοσωμικές καταστάσεις, αλλά δεν παρέχει την λεπτομέρεια και το εύρος των γονιδιωματικών πληροφοριών που θα αποκτηθούν από τις επεμβατικές δοκιμές. Προτού αποφασιστεί το NIPT ως δοκιμή ελέγχου πρέπει να εκτελείται ένας πρώιμος υπερηχογραφικός έλεγχος, καθώς έως και το 16% των γυναικών υψηλού κινδύνου θα έχει υπερηχογραφικά ευρήματα μεταξύ 10<sup>ης</sup> και 14<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης, κάτι που μεταβάλλει την προγεννητική συμβουλευτική, όπως διόρθωση της ηλικίας κύησης, ανίχνευση πολλαπλής εγκυμοσύνης, παλινδρόμηση εμβρύου ή δομική ανωμαλία (Vora et al, 2007). Οι γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο μιας άτυπης ανωμαλίας (δηλαδή διαφορετικές από εκείνες που επηρεάζουν τα χρωμοσώματα 21, 18, 13, X ή Y) θα πρέπει να ενημερώνονται σχετικά με τον κίνδυνο απώλειας μιας κλινικά σημαντικής διάγνωσης, αν επιλέγεται το NIPT αντί ο έλεγχος όλου το γονιδιώματος με χρωμοσωμικές μικροσυστοιχίες. Σε αυτές συγκαταλέγονται γυναίκες που κυοφορούν έμβρυο με δομική ανωμαλία στο υπερηχογράφημα (Grande et al, 2015; Beulen et al, 2017) ή αυξημένες τιμές στις αναλύσεις του ελέγχου του πρώτου τριμήνου (εφόσον αυτός έχει πραγματοποιηθεί) (Petersen et al, 2014). Εάν μια πολιτική επεμβατικού ελέγχου υιοθετηθεί για τιμές κινδύνου στον cFDS μεγαλύτερες από 1 στις 50 ή/και μια εντοπισμένη υπερηχογραφική ανωμαλία, ένα αρνητικό NIPT θα έχανε 1 στις 302 σημαντικές ανωμαλίες (Maxwell et al, 2015).

Σύμφωνα με τις κατευθυντήρες οδηγίες της Διεθνούς Εταιρείας για την Προγεννητική Διάγνωση (ISPD), το cfDNA τεστ δεν είναι διαγνωστικό. Χρησιμοποιείται για πληθυσμιακό έλεγχο κυήσεων υψηλού κινδύνου για χρωμοσωμικές ανωμαλίες με τη προϋπόθεση να συνοδεύεται από γενετική συμβουλευτική και τα θετικά ευρήματα να επιβεβαιώνονται με επεμβατικό έλεγχο. Δεν ενδείκνυται σε εγκύους με μείζονες ανατομικές ανωμαλίες στον υπέρηχο, ιστορικό προηγούμενου παιδιού με γνωστές γενετικές ανωμαλίες που δεν μπορούν να ανιχνευτούν με το cfDNA καθώς και γονείς φορείς ισοζυγισμένων μεταθέσεων σε χρωμοσώματα εκτός των 21, 18 και 13 (Benn et al, 2011).

Στη δίδυμη κύηση, όταν τα δίδυμα είναι μονοχοριονικά, είναι γενετικά ίδια μεταξύ τους, οπότε η διαχείριση είναι όπως στις μονήρεις κυήσεις, εφόσον το ποσοστό του FF είναι >4%. Στις διχοριονικές διζυγωτικές όμως, ναι μεν το ολικό FF είναι μεγαλύτερο του 4% αλλά η συνεισφορά του παθολογικού εμβρύου είναι μικρότερη από 4%, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο ψευδώς θετικού αποτελέσματος, άρα μεγάλο ποσοστό αποτυχίας της διάγνωσης. Στις δίδυμες κυήσεις, όπως και στις μονήρεις, οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην αποτυχία της δοκιμής της στοχευμένης χρωμοσωμικής αλληλούχησης είναι το αυξημένο βάρος της μητέρας και η σύλληψη από εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) (Sarno et al, 2016). Το cfDNA για την ανίχνευση ανωμαλιών χρωμοσωμάτων του φύλου καθώς και για την ανίχνευση συνδρόμων από μικροελλείμματα, δεν ενδείκνυται. Επίσης, σε περιπτώσεις μωσαϊκισμού (συμπεριλαμβανομένου του περιορισμένου μωσαϊκισμού του πλακούντα), τα αποτελέσματα μπορεί να είναι ανακριβή.

Σε ένα ποσοστό των περιπτώσεων δεν υπάρχει επαρκές εμβρυϊκό cfDNA στο δείγμα πλάσματος της μητέρας ή υπάρχει αποτυχία δοκιμής για άλλους λόγους. Δεν



είναι γνωστό το ποσοστό των γυναικών με ανεπαρκή εμβρυϊκό cfDNA, με αποτυχημένη δοκιμασία ή ανερμηνεύσιμο αποτέλεσμα, αν θα έχει ένα ενημερωτικό επαναληπτικό αποτέλεσμα της εξέτασης. Επιπλέον, μία από τις μεθόδους διαλογής cfDNA ταξινομεί ένα ποσοστό των αποτελεσμάτων ως "μη ταξινομημένο" όταν στην πραγματικότητα έχουν έναν αυξημένο κίνδυνο ανευπλοειδίας (Benn et al, 2012). Για ορισμένες γυναίκες, ο έλεγχος με cfDNA μπορεί να μην είναι ενημερωτικός και αυτοί οι ασθενείς μπορεί στη συνέχεια να χρειαστεί να εξεταστούν με επεμβατικές μεθόδους. Συγκεκριμένα, οι γυναίκες με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος διατρέχουν υψηλό κίνδυνο αποτυχίας της δοκιμής ή «no call» αποτελέσματος. Για τις γυναίκες με μεγάλη ηλικία κύησης, μπορεί να μην υπάρχει επαρκής χρόνος για μια επαναλαμβανόμενη εξέταση ελέγχου ή/και για επεμβατικές εξετάσεις.





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11. Εμπορικά διαθέσιμα τεστ NIPT

Το NIPT που βασίζεται στο cfDNA για ανευπλοειδίες με τη χρήση προσεγγίσεων NGS είναι η πρώτη μέθοδος NIPT που εμφανίστηκε στην κλινική πρακτική και ανιχνεύει την τρισωμία με υψηλή ακρίβεια. Μέσω της συνεχούς ανάπτυξης και βελτίωσης των αλγορίθμων για την αλληλούχηση και την ανάλυση των δεδομένων, πολλά εμπορικά τεστ είναι τώρα διαθέσιμα και μερικά παρουσιάζονται παρακάτω.

### 11.1. MaterniT21 PLUS (Sequenom Laboratories)

Τον Οκτώβριο του 2011, το τεστ MaterniT21 PLUS, που αναπτύχθηκε από τα εργαστήρια της Sequenom, εμφανίστηκε στην αγορά. Πρόκειται για ένα τεστ που ανιχνεύει χρωμοσωμικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων 21, 18 και 13 σε μονήρεις και πολλαπλές κυήσεις από το μητρικό αίμα. Οι χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες του φύλου (X, XXX, XYY, XXY) αναφέρονται μόνο σε μονήρεις κυήσεις. Αργότερα, προσθέτοντας την «ενισχυμένη σειρά αλληλούχησης» στο πρόγραμμά τους, άρχισαν να ανιχνεύουν τις τρισωμίες 16 και 22 και επιλεγμένα μικροελλείμματα σαν πρόσθετα ευρήματα (22q11 DiGeorge, 5p Cri-du-Chat, 15q Angelman και Prader-Willi, 11q Jacobsen, 8q Langer-Giedion, 4p Wolf-Hirschhorn, 1p36). Η τεχνολογία που χρησιμοποιείται είναι τυχαία μαζική παράλληλη αλληλούχηση σε όλο το γονιδίωμα για ακριβέστερες δοκιμές. Με την εφαρμογή ανώτερης βιοπληροφορικής ανάλυσης σε εκατομμύρια δεδομένα σημεία αλληλουχίας από χρωμοσώματα σε όλο το γονιδίωμα, δημιουργείται μια εξαιρετικά ακριβή και ξεχωριστή κλινική εικόνα βασισμένη σε άμεσα αποτελέσματα και όχι σε μαθηματικά μοντέλα, ενώ σε αντίθεση με την περιορισμένη στοχευμένη αλληλούχηση, μπορεί να αξιολογήσει τις πολλαπλές κυήσεις, δότες ωαρίων, ασθενείς μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση και ουσιαστικά κάθε άτομο με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ανευπλοειδίας του εμβρύου.

Η εξέταση μπορεί να πραγματοποιηθεί ήδη από την 10<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης και απαιτεί δύο λήψεις αίματος σε συγκεκριμένα σωληνάρια συλλογής των 10 mL και τα αποτελέσματα είναι έτοιμα σε περίπου 7 εργάσιμες ημέρες. Η ευαισθησία της εξέτασης MaterniT21 PLUS κυμαίνεται από 99,1% για την τρισωμία 21, >99,9% για την τρισωμία 18 και 91,7% για την τρισωμία 13, διατηρώντας έναν ρυθμό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων πολύ χαμηλό. Τα αποτελέσματα από την εξέταση MaterniT21 PLUS δεν αποκλείουν την πιθανότητα να υπάρχουν άλλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε αυτή την εγκυμοσύνη και ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν εξασφαλίζει μια ανεπηρέαστη εγκυμοσύνη. Ενώ τα αποτελέσματα της εξέτασης είναι πολύ ακριβή, δεν μπορούν να ανιχνευθούν όλες οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες λόγω του μωσαϊκισμού του πλακούντα, της μητέρας ή του εμβρύου ή/και άλλων αιτιών.

### 11.2. Verify (Illumina Laboratories)

Τον Μάρτιο του 2012, η Verinata Health άρχισε να προσφέρει το προγεννητικό τεστ Verifi σε παρόχους υγειονομικής περίθαλψης στις ΗΠΑ. Απαιτείται μόνο ένα σωληνάριο (7 mL) ολικού αίματος και τα αποτελέσματα συνήθως είναι



έτοιμα εντός 3-6 εργάσιμων ημερών. Η δοκιμή Verifi ανιχνεύει τις τρισωμίες 21, 18 και 13 από ένα μόνο δείγμα αίματος της μητέρας και ενδείκνυται για έγκυες γυναίκες με μονογονεϊκή κύηση από την 10<sup>η</sup> εβδομάδα και με υψηλό κίνδυνο για ανευπλοειδισμό του εμβρύου. Οι ευαισθησίες είναι >99,9, 97,4 και 87,5% για τις τρισωμίες 21, 18 και 13, αντίστοιχα, ενώ οι ειδικότητες είναι όλες πάνω από 99,6% (Chen et al, 2011). Τον Ιούλιο του 2012, το προγεννητικό τεστ επεκτάθηκε για να συμπεριλάβει την ανίχνευση ανευπλοειδιών των χρωμοσωμάτων του φύλου, όπως η μονοσωμία X (Turner), XXX (τριπλό X), XXY (Klinefelter), XYY (Jacobs) και για την γνωστοποίηση του εμβρυϊκού φύλου. Τον Οκτώβριο του 2013, πρότειναν ένα νέο τεστ NIPT για τις έγκυες με δίδυμα μέσω φυσικών ή υποβοηθούμενων αναπαραγωγικών μεθόδων. Αυτή η δοκιμασία μπορεί να ανιχνεύσει την τρισωμία 21, την τρισωμία 18, την τρισωμία 13 και την παρουσία ενός Y. Το προγεννητικό τεστ Verifi αξιοποιεί τη δύναμη της μαζικής παράλληλης αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος με έναν ιδιαίτερα βελτιστοποιημένο αλγόριθμο για την παροχή σαφών, ενημερωτικών αποτελεσμάτων.

Πιθανά αποτελέσματα για τα χρωμοσώματα 21, 18 και 13 είναι «ανιχνεύσιμη ανευπλοειδία», «μη ανιχνεύσιμη ανευπλοειδία» και «υποψία ανευπλοειδίας» (οριακή τιμή). Αυτή η τελευταία κατηγορία ταξινόμησης εισήχθει για να επισημανθούν τα όρια των αποτελεσμάτων, εκεί όπου είναι πιθανότερο να προκύψει ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.

### 11.3. Harmony (Ariosa)

Τον Μάιο του 2012, το προγεννητικό τεστ Harmony διατέθηκε στην αγορά από την Ariosa Diagnostics (η οποία ανήκει πλέον στην Roche). Η δοκιμή στηρίχθηκε σε μια ιδιόκτητη στοχευμένη MPS δοκιμασία, που ονομάστηκε «ψηφιακή ανάλυση επιλεγμένων περιοχών» (DANSR), η οποία αναλύει μικρά θραύσματα DNA από συγκεκριμένα χρωμοσώματα της μητέρας και του εμβρύου που κυκλοφορούν στο μητρικό αίμα για να παράσχουν ακριβή αποτελέσματα. Όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό του FF, τόσο μεγαλύτερη εμπιστοσύνη υπάρχει στο αποτέλεσμα.

Ο έλεγχος Harmony έχει επικυρωθεί σε εγκυμοσύνες ηλικίας τουλάχιστον 10 εβδομάδων, μονήρεις αλλά και δίδυμες, με εξαίρεση τα δίδυμα από δότες ωαρίων. Αναφέρεται το εμβρυϊκό φύλο και αξιολογείται ο κίνδυνος μονοσωμίας X, τρισωμίας XYY, XXY και XXX (Norton et al, 2012; Nicolaidis et al, 2012). Το δείγμα που απαιτείται για την διαδικασία είναι 10 ml μητρικού αίματος. Η εμβρυϊκή τρισωμία ανιχνεύεται μετρώντας περίπου το ένα δέκατο από πολλές ειδικές περιοχές ccffDNA, όπως και στις άλλες ποσοτικές προσεγγίσεις NGS, οδηγώντας έτσι σε μια πολύ οικονομικότερη δοκιμασία.

### 11.4. Panorama (Natera)

Το 2013, η Natera άρχισε να προσφέρει αυτό το τεστ NIPT για την ανίχνευση της τρισωμίας 21, 13, 18, της εμβρυϊκής μονοσωμίας X, της τριπλοειδίας και, εάν ζητηθεί, το εμβρυϊκό φύλο στις μονήρεις εγκυμοσύνες. Η δοκιμασία αναλύει τόσο το



DNA των μητρικών κυττάρων όσο και το cffDNA από το πλάσμα της μητέρας, χρησιμοποιώντας τη μοριακή βιολογία και την βιοπληροφορική.

Το Panorama τεστ είναι το μόνο εμπορικά διαθέσιμο NIPT που αναλύει SNPs για τον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων των χρωμοσωμάτων. Επικυρωμένο σε εμβρυϊκό κλάσμα με ποσοστό τόσο χαμηλό όσο το 2,8% (McKanna et al, 2018), αυτή η προσέγγιση αλληλουχεί cffDNA από το μητρικό πλάσμα ώστε να συνταχθεί ο εμβρυϊκός γονότυπος. Το τεστ αυτό στοχεύει 13.392 SNPs που καλύπτουν τα χρωμοσώματα 21, 18, 13, X και Y ενώ επιπρόσθετα σύνολα SNPs στοχεύουν για τον εντοπισμό των μικροελλειμμάτων. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ένας αλγόριθμος (NATUS) κατοχυρωμένος με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για τον προσδιορισμό της πιθανότητας ανωμαλιών των εμβρυϊκών χρωμοσωμάτων και του εμβρυϊκού φύλου (όταν αυτό ζητηθεί) (Natera, 2013).

Η δοκιμασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί ήδη από τις 9 εβδομάδες κύησης. Το δείγμα σιέλου του πατέρα είναι χρήσιμο στο 1-2% των περιπτώσεων για να ελαχιστοποιήσει τις πιθανότητες αποτυχίας, αλλά δεν απαιτείται, καθώς δεν επηρεάζει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Η δοκιμασία Panorama είναι επικυρωποιημένη σε ομάδες υψηλού και μέσου κινδύνου και παρουσιάζει παρόμοιες θετικές προγνωστικές τιμές.

Από το 2014 έως και σήμερα έχουν κυκλοφορήσει στο εμπόριο κι άλλες δοκιμασίες NIPT, όπως το "NIFTY" από την GenePlanet, "the IONA test", "percept" από την VCGS, "Innata Prenatal Screen" απ'την Progenity και "Myriad Prequel Prenatal Screen" (Yourgene-health.com, 2013; Geneplanet.com, 2018; Vcgs.org.au, 2015; Progenity.com, 2017; Myriadwomenshealth.com, 2017). Όλα αυτά τα τεστ βασίζονται στην μέθοδο MPSS και χρειάζονται ένα μικρό δείγμα ολικού αίματος της μητέρας ενώ εκτελούνται από την 10<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης (μονήρης ή δίδυμη). Οι κίνδυνοι, τα οφέλη, οι εναλλακτικές λύσεις και οι περιορισμοί των δοκιμών καθώς και η περιγραφή του πληθυσμού που χρησιμοποιείται για την κλινική επικύρωση θα πρέπει να εξηγούνται στην έγκυο γυναίκα μετά από προσεκτική παροχή συμβουλών και το δείγμα θα πρέπει να συνοδεύει υπογεγραμμένη συνειδητή συναίνεση για τη δοκιμή NIPT. Το οικογενειακό ιστορικό πρέπει να επανεξετάζεται για να προσδιοριστεί εάν θα κριθεί απαραίτητο να προσφερθούν στον ασθενή άλλες μορφές ελέγχου ή προγεννητικής διάγνωσης για μια συγκεκριμένη διαταραχή. Η ηλικία κύησης κατά τη λήψη αίματος πρέπει να σημειώνεται μόνο σε ολόκληρες εβδομάδες, καθώς αυτό είναι το είδος των τιμών που χρησιμοποιούνται από τις βάσεις δεδομένων για αυτή την ανάλυση (Futch et al, 2013).



## 2<sup>ο</sup> ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12. Επιπλοκές της κύησης

#### 12.1. Παράγοντες κινδύνου

Η εγκυμοσύνη, παρόλο που είναι μια απόλυτα φυσιολογική κατάσταση, μπορεί να προκαλέσει ορισμένες επιπλοκές. Ο θεράπων ιατρός παρακολουθεί και ενημερώνει την γυναίκα σχετικά με τους κινδύνους που μπορεί να διατρέχει κατά την κύηση. Οι κίνδυνοι αξιολογούνται σύμφωνα με κάποιους παράγοντες, όπως η ηλικία της μητέρας, ο αριθμός των τοκετών, το ύψος της, το βάρος (την περίοδο της κύησης), ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριακή υπέρταση, η νεφρική νόσος, η αιμοσφαιρινοπάθεια, οι σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις ή άλλες λοιμώξεις, η χρήση καπνού, αλκοόλ και άλλων ουσιών.

Οι γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο σύλληψης εμβρύων με χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η πιθανότητα γέννησης ενός παιδιού με χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι περίπου 1/200 στην ηλικία των 35 ετών και φτάνει 1/20 σε ηλικία άνω των 44. Γυναίκες ηλικίας κάτω των 20 ετών κατά κανόνα γεννούν περισσότερα πρόωρα νεογνά και νεογνά με χαμηλότερο βάρος γέννησης από ότι οι γυναίκες ηλικίας 25 έως 35 ετών. Επιπλέον, ο αριθμός τοκετών παίζει σημαντικό ρόλο, διότι γυναίκες που έχουν πάνω από πέντε τέκνα παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο προδρομικού και στιφρού πλακούντα. Επιπλέον η ρήξη μήτρας μετά τον τοκετό εμφανίζεται αρκετά συχνά. Το ύψος της γυναίκας επηρεάζει την φυσιολογική γέννηση του μωρού, διότι γυναίκες με ύψος μικρότερου των 152cm συνήθως παρουσιάζουν μικρές πυέλους με αποτέλεσμα να έχουν προδιάθεση για κεφαλοπυελική δυσαναλογία, όπου και απαιτείται καισαρική τομή.

Όσον αφορά τις ασθένειες/νοσήματα (σακχαρώδης διαβήτης, αρτηριακή υπέρταση, νεφρική νόσος) που παρουσιάζουν οι γυναίκες κατά την κύηση, μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές επιπλοκές και απαιτείται ειδική παρακολούθηση από τον ιατρό τους. Η αιμοσφαιρινοπάθεια μπορεί να εμφανιστεί διότι κατά την εγκυμοσύνη υπάρχει περίπτωση να πυροδοτηθεί παρόξυνση της αναιμίας. Υπάρχουν σοβαρές περιπτώσεις όπου το έμβρυο μπορεί να παρουσιάσει βαριά αιμολυτική αναιμία πριν τον τοκετό.

Ωστόσο, σημειώνεται ότι το ιστορικό το προηγούμενων κυήσεων είναι πολύ σημαντικό. Ένα ιστορικό αποβολής λόγω τραυματισμού ή αποβολής κατά τον 2<sup>ο</sup> ή 3<sup>ο</sup> μήνα κύησης αυξάνει την πιθανότητα βλάβης του τραχήλου με συνέπεια ανεπάρκεια αυτού. Επιπλέον, ένα ιστορικό πρόωρου τοκετού ή γέννηση ελλιποβαρούς νεογνού (<1000gr), αυξάνει την πιθανότητα πρόωρου τοκετού. Στις γυναίκες που έχουν πραγματοποιήσει καισαρική τομή πρέπει να λαμβάνονται όλες οι πληροφορίες για τον λόγο που δεν πραγματοποιήθηκε φυσιολογικός τοκετός, ποιός τύπος καισαρικής τομής χρησιμοποιήθηκε, για να μπορεί να καθοριστεί αν η έγκυος μπορεί να πραγματοποιήσει κολπικό τοκετό.

Στην περίπτωση των σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων απαιτείται έλεγχος που με το πέρασμα των χρόνων αποτελεί έλεγχο ρουτίνας. Κάθε ιατρός θα πρέπει να είναι πολύ προσεκτικός και σε περίπτωση που θεωρηθεί ότι η



σεξουαλικά μεταδιδόμενη λοίμωξη μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το έμβρυο, πραγματοποιείται καισαρική τομή. Σε άλλες λοιμώξεις πραγματοποιείται προληπτικός έλεγχος σύμφωνα με την εβδομάδα κύησης. Αν οι γυναίκες σε κύηση κάνουν χρήση εθιστικών ουσιών, εκτίθενται σε τοξικές ουσίες στον χώρο εργασίας καθώς και σε άλλους τετράγωνους παράγοντες, θα πρέπει να διερευνάται πλήρως η κατάσταση τους, διότι τίθεται σε κίνδυνο το έμβρυο.

Οποιοσδήποτε από τους προαναφερθέντες παράγοντες μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο μητρικής και εμβρυϊκής νοσηρότητας και θνησιμότητας και θα πρέπει να αξιολογείται (Swartz, 2014).

## 12.2. Επιπλοκές κύησης

Οι επιπλοκές που εμφανίζονται συχνότερα στην κύηση είναι η εξωμήτρια (έκτοπη) κύηση, η αποβολή ή παλίνδρομη κύηση, το ολιγοϋδράμνιο (λίγη ποσότητα αμνιακού υγρού), η τοξιναιμία-προεκλαψία-εκλαμψία, ο πρόδρομος πλακούντας, η αποκόλληση πλακούντα, ο σακχαρώδης διαβήτης και ο πρόωρος τοκετός, οι οποίες θα αναληθούν παρακάτω.

### 12.2.1. Εξωμήτρια (έκτοπη) κύηση

Εξωμήτρια (έκτοπη) κύηση ορίζεται ως η εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου σε θέση εκτός της κοιλότητας της μήτρας (Εικόνα 9). Επειδή η συντριπτική πλειοψηφία των έκτοπων εγκυμοσύνων συμβαίνουν στη σάλπιγγα, συχνά ονομάζεται εγκυμοσύνη «σάλπιγγας». Η έκτοπη κύηση μπορεί να συμβεί μετά από αυτόματη σύλληψη σε ποσοστό 1-1,5%. Σημειώνεται ότι στα προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής το ποσοστό παρουσιάζει κάποια αύξηση. Η εξωμήτριος (έκτοπη) κύηση θεωρείται από τις πιο σοβαρές επιπλοκές και θεωρείται συχνά απειλητική για τη ζωή της μητέρας ενώ καλείται να αναγνωριστεί και να αντιμετωπισθεί άμεσα (Λούβρου, 2009). Το ποσοστό που επικρατεί η σαλπιγγική κύηση φτάνει το 98%, ενώ το υπόλοιπο 2% μπορεί να πραγματοποιηθεί στις ωοθήκες, στην περιτοναϊκή κοιλότητα, στον τράχηλο της μήτρας και στο σημείο που ενώνεται η μήτρα με τη σάλπιγγα (διάμεση κύηση). Ωστόσο, σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να υπάρχει ταυτόχρονη ύπαρξη ενδομήτριας και εξωμήτριας κύησης, η οποία ονομάζεται ετερότοπη κύηση.

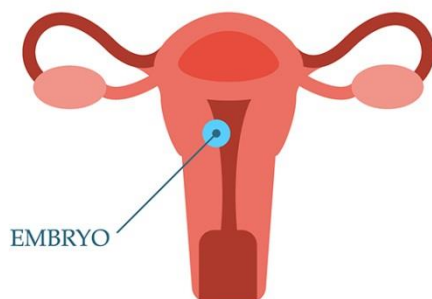
#### 12.2.1.1. Προγεννητικός έλεγχος έκτοπης κύησης

Η διάγνωση την εξωμήτριας κύησης πραγματοποιείται με έναν συνδυασμό εξετάσεων, οι οποίες είναι η β-hCG, το διακολλητικό υπερηχογράφημα και η κλινική εξέταση. Στα αρχικά στάδια της κύησης, όπου η ενδομήτρια κύηση δεν μπορεί να αποδειχθεί υπερηχογραφικά, η β-hCG πρέπει να αυξάνεται  $\geq 66\%$  σε μια φυσιολογική κύηση σε χρονικό διάστημα 48 ωρών (2 ημερών), ενώ αντίθετα μια μικρότερη αύξηση ή σταθεροποίηση των τιμών σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο είναι ενδεικτικά έκτοπης κύησης (Bottomley & Bourne, 2009). Η ερμηνεία των υπερηχογραφικών ευρημάτων απαιτεί τον συνδυασμό με τις τιμές της β-hCG. Με τιμές μεγαλύτερες από

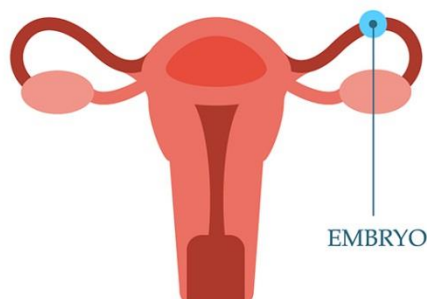


2.000 mIU/ml, ο διακολλητικός υπέρηχος μπορεί να αναδείξει ενδομήτριο σάκο και η συνοδός παρουσία άλλων εμβρυϊκών στοιχείων, όπως ο λεκιθικός ασκός εντός αυτού, μπορούν να αποκλείσουν την περίπτωση του ψευδοεμβρυϊκού σάκου ή της ενδομήτριας συλλογής υγρού, καταστάσεις που μιμούνται τη φυσιολογική ενδομήτρια κύηση. Η αναγνώριση εξαρτηματικών μαζών συσχετίζεται συχνά με την εξωμήτρια κύηση και, στην περίπτωση που συνυπάρχει και καρδιακή λειτουργία εντός αυτών, η διάγνωση της εξωμήτριας κύησης θεωρείται βέβαιη (Shaw et al, 2012).

## NORMAL PREGNANCY



## ECTOPIC PREGNANCY



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση φυσιολογικής και εξωμήτριας κύησης. Πηγή: <https://www.edimitriou.gr>

### 12.2.2 Αποβολή ή παλίνδρομη κύηση

Μια κύηση μπορεί να καταλήξει σε αποβολή ή παλινδρόμηση τις πρώτες 13 εβδομάδες. Το ποσοστό των κυήσεων που καταλήγουν σε αποβολή ή παλινδρόμηση είναι περίπου το 15-20%, δηλαδή 1/5-6 γυναίκες θα αποβάλλουν τους πρώτους τρεις μήνες της κύησης. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι τα ποσοστά μπορεί στην πραγματικότητα να είναι λίγο μεγαλύτερα, διότι πολλές πρώιμες αυτόματες αποβολές συμβαίνουν ασυμπτωματικά και είναι δύσκολο να διαγνωσθούν. Οι περισσότερες από αυτές είναι «τυχαίες» και δεν έχουν την τάση να επαναλαμβάνονται, κατά συνέπεια η γυναίκα να έχει πολύ μεγάλη πιθανότητα για μια επόμενη επιτυχημένη κύηση. Οι κυριότερες αιτίες αποβολής ή παλίνδρομης κύησης είναι είτε απ'το έμβρυο είτε απ'την μητέρα.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των αυτόματων αποβολών σχετίζονται με την μη ομαλή ανάπτυξη του γονιμοποιημένου ωαρίου, του εμβρύου και του πλακούντα. Το 65-70% θεωρείται αποτέλεσμα χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου. Οι ανωμαλίες αυτές πολύ σπάνια κληρονομούνται και αυτός είναι ο λόγος που δεν χρειάζεται το αποβληθέν κύημα να υποβληθεί σε έλεγχο DNA.





Η οργανισμός της μητέρας μπορεί να προκαλέσει πολλές αιτίες αποβολών. Αρχικά η μητρική ηλικία παίζει σημαντικό ρόλο αφού οι πιθανότητες αποβολής για μητέρες άνω των 40 ετών φτάνουν το 50%, ενώ για μητέρες 30 ετών, το ποσοστό είναι 20%. Επιπλέον, μια βασική αιτία αποβολής είναι τα συστηματικά νοσήματα της μητέρας, όπως είναι η υπέρταση, νοσήματα κολλαγόνου κ.ά. Βασικός παράγοντας που προκαλεί αυτόματες αποβολές είναι οι λοιμώξεις. Οι συνηθέστεροι μικροβιακοί παράγοντες είναι το *Mycoplasma hominis*, το *Ureaplasma urealyticum*, το *Toxoplasma gondii*, τα *Clamidia trachomatis* και ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV). Ακόμα μπορεί να επηρεάσουν και ενδοκρινολογικές παθήσεις, όπως είναι ο υποθυρεοειδισμός, ο σακχαρώδης διαβήτης και η ανεπάρκεια έκκρισης προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο. Ωστόσο, η μητέρα μπορεί να επηρεάσει αρνητικά μια κύηση από τον τρόπο διαβίωσης και τις συνήθειές της. Για παράδειγμα το κάπνισμα, η υπερβολική χρήση αλκοόλ, η λήψη φαρμάκων ή ναρκωτικών ουσιών, η κακή διατροφή και το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο προδιαθέτουν την πρόκληση αυτομάτων αποβολών (Γόνη, 2016).

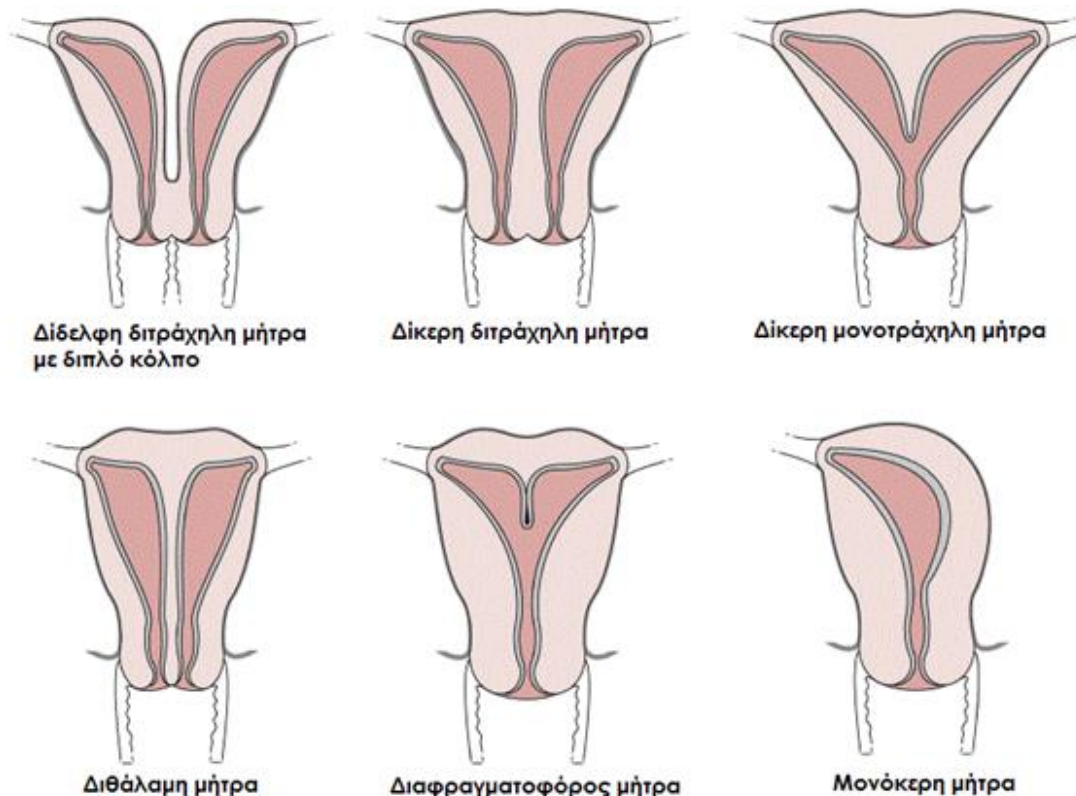
Οι ανοσολογικοί παράγοντες είναι οι διάφοροι αυτοάνοσοι ή αλλοάνοσοι μηχανισμοί που μπορεί να ευθύνονται για τις αυτόματες αποβολές. Στους αυτοάνοσους μηχανισμούς συμπεριλαμβάνεται και το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, στο οποίο ανιχνεύονται αντικαρδιολιπινικά αντισώματα και τα αντιπηκτικά του λύκου. Τα αντισώματα αυτά στρέφονται εναντίον των αιμοπεταλίων και του ενδοθηλίου των αγγείων με αποτέλεσμα την θρόμβωση των αγγείων του πλακούντα και τελικά την αυτόματη αποβολή. Οι αλλοάνοσοι μηχανισμοί προκαλούνται από παράγοντες που διαταράσσουν την φυσιολογική ισορροπία συνύπαρξης του εμβρύου και της μητέρας. Στους παράγοντες αυτούς συμμετέχουν τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (HLA), οι ανασταλτικοί παράγοντες και τα αντιπατρικά αντιγόνα (Τσιγκρής, 2014).

Επιπλέον, οι ανατομικές παθήσεις της μητέρας (όπως δίκερη, δίδελφους και μονόκερη μήτρα) (Εικόνα 9) είναι από τις βασικές αιτίες αυτόματων αποβολών. Οι συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας ευθύνονται για το 15% περίπου των αυτόματων αποβολών. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες παθήσεις που επηρεάζουν μια κύηση και την ωθούν σε αποβολή. Οι παθήσεις αυτές είναι τα υποβλεννογόνια ινομυώματα, η αδеноμύωση, οι ενδομητρικοί πολύποδες και οι ενδομήτριες συμφύσεις (σύνδρομο Ashermann).

#### 12.2.2.1 Προγεννητικός έλεγχος παλίνδρομης κύησης

Ο έλεγχος της παλίνδρομης κύησης μπορεί να γίνει με την βοήθεια αιματολογικών εξετάσεων και του υπερήχου. Η πρώτη εξέταση που πραγματοποιείται είναι ένα υπερηχογράφημα για να ελεγχθεί η ανάπτυξη του εμβρύου και η καρδιακή του λειτουργία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτό γίνεται με κολπικό υπερηχογράφημα ώστε η εικόνα να είναι όσο το δυνατόν ευκρινέστερη. Αν αυτό δεν είναι επιθυμητό, πραγματοποιείται το υπερηχογράφημα από την κοιλιά. Επίσης μετράται η  $\beta$ -hCG, η οποία ενώ θα πρέπει να αυξάνεται, αρχίζει να ελαττώνεται ή να παραμένει σταθερή. Συχνά χρησιμοποιείται και η μέτρηση της ορμόνης προγεστερόνης. Πολύ χαμηλές τιμές έχουν δείξει πως αντιστοιχούν σε μη βιώσιμες κύσεις (<sup>2</sup>Paparioannou et al, 2011).





Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των ανατομικών ανωμαλιών της μήτρας. Πηγή: <http://gynaikologoslarisa.gr/>

### 12.2.3. Ολιγοϋδράμνιο

Το αμνιακό υγρό, είναι ένα άσηπτο, σχεδόν άχρωμο υγρό, εμβρυϊκής και μητρικής προέλευσης. Η ανακύκλωσή του πραγματοποιείται σε γρήγορους ρυθμούς με χρόνο ημιζωής μόνο δύο έως τριών ωρών. Η ρύθμιση της ποσότητας και της ποιότητας του αμνιακού υγρού εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι ο όγκος που αποβάλλεται μέσω των ουρών καθώς και η ποσότητα που καταπίνει το έμβρυο. Ο κύριος παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή του αμνιακού υγρού μετά την 18<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης είναι η εμβρυϊκή απέκκριση ούρων. Στην περίπτωση που υπάρχουν διαταραχές σε αυτό το μηχανισμό πραγματοποιείται μείωση της ποσότητας του αμνιακού υγρού και καλείται ολιγοϋδράμνιο, είτε αύξηση της ποσότητάς του οπότε καλείται πολυϋδράμνιο.

Ως ολιγοϋδράμνιο ορίζεται η παθολογική μείωση της ποσότητας του αμνιακού υγρού κάτω των 400 ml ή του δείκτη αμνιακού υγρού κάτω των 5 cm. Η συνήθης συχνότητα είναι 1 περίπτωση στις 500 γεννήσεις (Petrozella et al, 2011). Οι λόγοι για τους οποίους μπορεί να προκληθεί το χαμηλό αμνιακό υγρό είναι πρόωρη ρήξη των εμβρυϊκών μεμβρανών, συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος στο 1<sup>ο</sup> τρίμηνο (αμφίπλευρη νεφρική агенεσία, νεφρική ανεπάρκεια ή απόφραξη της ουρήθρας, πολυκυστικοί νεφροί, δυσπλαστικοί νεφροί, αποφρακτικές ουροπάθειες),



ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη, μητροπλακουντιακή ανεπάρκεια, εμβρυϊκή δυσφορία, εμβρυϊκές ανωμαλίες ή/και ανευπλοειδίες, προεκλαμψία, ιατρογενή αίτια (κατά την αμνιοπαρακέντηση).

#### 12.2.3.1. Προγεννητικός έλεγχος για ολιγοϋδράμνιο

Ο έλεγχος για χαμηλό αμνιακό υγρό πραγματοποιείται με τη βοήθεια του υπερηχογραφήματος, όπου υπολογίζεται ο δείκτης του αμνιακού υγρού, ως άθροισμα της κάθετης διαμέτρου της μεγαλύτερης λίμνης αμνιακού υγρού σε κάθε τεταρτημόριο της μήτρας ενώ εντοπίζεται απουσία ηχογένειας γύρω από το έμβρυο (Johnson et al, 2007)

#### 12.2.4. Τοξιναιμία – προεκλαμψία – εκλαμψία

Η τοξιναιμία της κύησης ή σύνδρομο προεκλαμψίας-εκλαμψίας προσβάλλει κυρίως γυναίκες που πρόκειται να γεννήσουν για πρώτη φορά και εμφανίζεται πιο συχνά μετά το δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Είναι μια από τις πιο σοβαρές επιπλοκές που μπορεί να παρουσιάσει μια γυναίκα που κυοφορεί. Αυτός ο τύπος της επιπλοκής εγκυμονεί κινδύνους και για το έμβρυο αλλά και για την ίδια την μητέρα. Η προεκλαμψία παρουσιάζεται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 3-8% σε γυναίκες που βρίσκονται σε κύηση. Πρόκειται για ιδιοπαθή διαταραχή της κύησης κατά την οποία μπορεί να παρουσιαστούν κάποια συμπτώματα, όπως υπέρταση, λεύκωμα στα ούρα και οίδημα, συνήθως μετά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης

Η προεκλαμψία εμφανίζεται συνήθως μετά την 37<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Ωστόσο, μπορεί να συμβεί οποιαδήποτε στιγμή κατά το δεύτερο ήμισυ της κύησης ή στον τοκετό (εντός 48 ωρών). Μπορεί να είναι ήπια ή και πιο σοβαρή και η εξέλιξή της αργή ή γρήγορη. Όποια και αν είναι η περίπτωση θα πρέπει η έγκυος να απευθυνθεί στον ιατρό, ιδιαίτερα στην περίπτωση που παρατηρηθεί πρήξιμο στο πρόσωπο ή οίδημα γύρω από τα μάτια σας, ελαφρύ πρήξιμο στα χέρια ή υπερβολικό και απότομο πρήξιμο των ποδιών ή των αστραγάλων. Το απότομο πρήξιμο προκαλείται από κατακράτηση υγρών που μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ταχεία αύξηση του βάρους. Τα συμπτώματα μπορεί να ποικίλουν από γυναίκα σε γυναίκα όπως επίσης μπορεί να προκύψει προεκλαμψία χωρίς εμφανή συμπτώματα, ιδιαίτερα στα πρώτα στάδια.

Οι επιπλοκές της προεκλαμψίας μπορεί να περιλαμβάνουν: μειωμένη ροή αίματος προς τον πλακούντα, αποκόλληση του πλακούντα, σύνδρομο HELLP, το οποίο σημαίνει αιμόλυση (καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων), αυξημένα ηπατικά ένζυμα και χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων. Το σύνδρομο αυτό μπορεί γρήγορα να γίνει απειλητικό για τη ζωή και της μητέρας και του εμβρύου. Στις επιπλοκές συμπεριλαμβάνονται ακόμα η εκλαμψία (όταν δεν ελέγχεται η προεκλαμψία) και η καρδιαγγειακή νόσος, της οποίας ο κίνδυνος μπορεί να αυξηθεί. (Beloosesky & Ross, 2019).



#### 12.2.4.1. Προγεννητικός έλεγχος προεκλαμψίας

Πέρα από τα συμπτώματα που αναφέρθηκαν, η ανεύρεση υψηλής πίεσης (άνω των 140/90 mmHg) σε εξέταση ρουτίνας, θέτει την υπόνοια ύπαρξης προεκλαμψίας μετά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα. Για την επιβεβαίωση, απαιτείται δεύτερη μέτρηση μετά από 6 ώρες με την έγκυο σε ηρεμία ενώ η ανεύρεση υψηλών επιπέδων πρωτεΐνης στα ούρα επιβεβαιώνει τη διάγνωση. Αν γίνει η διάγνωση της προεκλαμψίας, ο θεράπων γιατρός συστήνει πρόσθετες αιματολογικές εξετάσεις, όπως γενική αίματος (με έμφαση στον αριθμό των αιμοπεταλίων), έλεγχο της ηπατικής λειτουργίας (τρανσαμινάσες, LDH, αλκαλική φωσφατάση, γ-GT), της νεφρικής λειτουργίας (ουρία, κρεατινίνη), των ηλεκτρολυτών και του ουρικού οξέος, της πηκτικότητας του αίματος καθώς και γενική ούρων και συλλογή ούρων 24ώρου για ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεΐνης (Χιντιπάς, 2012).

Ένας ακόμη τρόπος ελέγχου της προεκλαμψίας σε πρώιμο στάδιο είναι η χρήση cfDNA και η μελέτη των επιπέδων του. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις του είναι υψηλότερες στις γυναίκες με πρώιμη προεκλαμψία απ' ότι σε έγκυες με φυσιολογική κύηση (Seval, 2015).

Σε μια έρευνα του 2017 μελετήθηκαν 12 πρωτεΐνες στο αίμα εγκύων γυναικών μεταξύ 11<sup>ης</sup> και 13<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης. Οι διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών αυτών μπορεί να αποτελέσουν δυνητικούς βιοδείκτες για τον έλεγχο της πρώιμης προεκλαμψίας. Ωστόσο χρειάζονται ακόμα αρκετά πειράματα και μελέτες για την καλύτερη αξιολόγηση (Kolialexi et al, 2017).

Το 2019, η Chappell και οι συνεργάτες της, δημοσίευσαν μια έρευνα κατά την οποία μελέτησαν τα επίπεδα μιας ορμόνης ανάπτυξης του πλακούντα (PLGF) στο αίμα της εγκύου. Η έρευνα διεξήχθη σε 1.035 έγκυες γυναίκες με πιθανή προεκλαμψία, οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, εκ των οποίων η μία έκανε το τεστ PLGF και η άλλη όχι. Διαπιστώθηκε ότι σε όσες γυναίκες είχε γίνει το νέο τεστ, ο μέσος χρόνος διάγνωσης της προεκλαμψίας μειώθηκε από περίπου τέσσερις σε σχεδόν δύο μέρες, ενώ και το ποσοστό γυναικών με σοβαρές επιπλοκές πριν τον τοκετό (εκλαμψία, εγκεφαλικό, θάνατος μητέρας κ.α.) μειώθηκε από το 5% στο 4%. Η συγκέντρωση της PLGF στο περιφερικό αίμα της εγκύου κατά το 1<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης παρουσιάζει σημαντική μείωση σε εκείνες που θα εμφανίσουν αργότερα προεκλαμψία σε σχέση με αυτές που δεν θα εμφανίσουν επιπλοκές, λόγω του ότι η ορμόνη αυτή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την αύξηση του πλακούντα. Η ποσοτικοποίησή της λοιπόν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη πρώιμης ανίχνευσης κυήσεων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση προεκλαμψίας (Μπρόζου, 2017). Παρόλα αυτά, το τεστ δεν επέφερε αλλαγές στην πιθανότητα επιπλοκών για το έμβρυο, ούτε την πιθανότητα να γεννηθεί πρόωρα ή να εισαχθεί αμέσως σε μονάδα εντατικής νοσηλείας νεογνών (Duhig et al, 2019).

Η συνδυασμένη εξέταση για την ανίχνευση της προεκλαμψίας (δηλαδή μέτρηση PLGF και PAPP-A, προσδιορισμό της μέσης αρτηριακής πίεσης και μέτρηση του δείκτη παλμικότητας της μητριαίας αρτηρίας) μεταξύ των εβδομάδων κύησης 11-13<sup>+6</sup> παράλληλα με την προγεννητική εξέταση 1<sup>ου</sup> τριμήνου, μπορεί να προσδιορίσει με αξιοπιστία τις γυναίκες που βρίσκονται σε κίνδυνο να αναπτύξουν προεκλαμψία, έχοντας ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό ανίχνευσης >90% και 5% ψευδώς θετικό (Akolekar et al, 2011). Η έγκαιρη ταυτοποίηση των γυναικών υψηλού

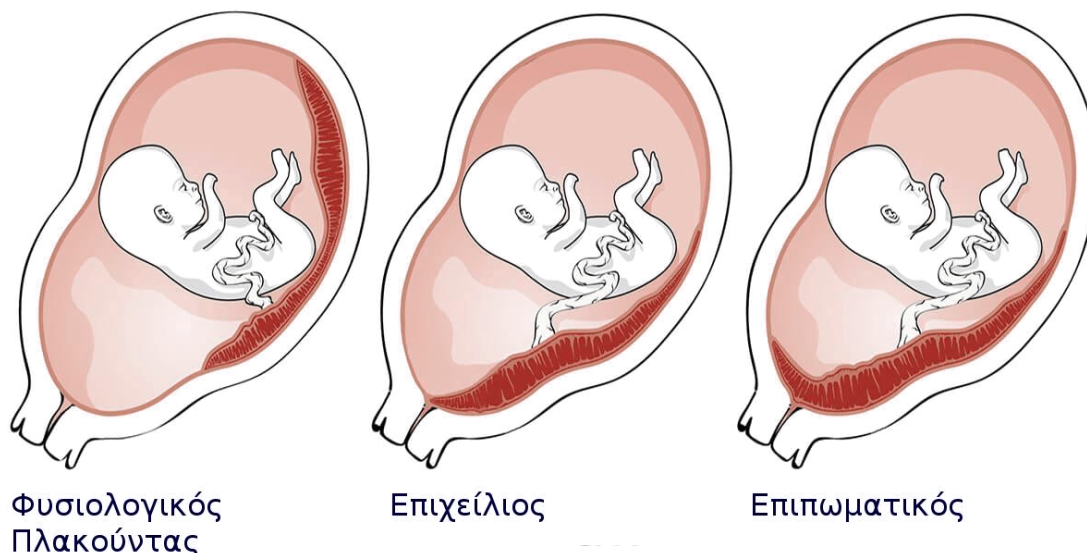


κινδύνου επιτρέπει να παρθούν προληπτικά μέτρα και να γίνει ενισχυμένη παρακολούθηση. Η χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης (<150 mg / ημέρα) στις γυναίκες υψηλού κινδύνου πριν από τη 16<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης μπορεί να μειώσει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης της προεκλαμψίας κατά 50% -90% (Park et al, 2015).

#### 12.2.5. Πρόδρομος (προδρομικός) πλακούντας

Ο πρόδρομος πλακούντας αναπτύσσεται στο χαμηλότερο τμήμα της μήτρας και καλύπτει μέρος ή και ολόκληρο το τραχηλικό στόμιο εμποδίζοντας έτσι τη κάθοδο και έξοδο (τοκετό) του εμβρύου από τη μήτρα. Είναι πιο συχνός σε γυναίκες που έχουν κάνει πολλά παιδιά ενώ στις πρωτότοκους εμφανίζεται με συχνότητα 1/1500 κύσεις. Ο πρόδρομος πλακούντας δεν είναι συνήθως πρόβλημα στην αρχή της εγκυμοσύνης. Αλλά αν παραμένει σε επικίνδυνα χαμηλά επίπεδα καθώς προχωράει η εγκυμοσύνη, μπορεί να προκαλέσει αιμορραγία και αυτό να οδηγήσει σε άλλες επιπλοκές και μπορεί να χρειαστεί να επισπεύσει ο ιατρός τον τοκετό. Η θέση του πλακούντα πρέπει να ελέγχεται με υπέρηχους, αλλά μόνο ένα μικρό ποσοστό γυναικών που έχουν προδρομικό πλακούντα στο μέσο της εγκυμοσύνης τους, εξακολουθούν να έχουν προδρομικό πλακούντα όταν φτάσει η ώρα του τοκετού. Το βασικό σύμπτωμα που παρουσιάζεται σε αυτή την επιπλοκή είναι η αιμορραγία από τον κόλπο που δεν συνοδεύεται όμως από πόνο (ανώδυνη αιμορραγία). Συνήθως το σύμπτωμα παρουσιάζεται μεταξύ του 7<sup>ου</sup> και του 8<sup>ου</sup> μήνα κύησης και είναι αποτέλεσμα αποκόλλησης ενός τμήματος του πλακούντα.

Οι αιτίες που μπορούν να προκαλέσουν προδρομικό πλακούντα εξαρτώνται άμεσα από την υγεία της μητέρας καθώς και το ιατρικό ιστορικό της (Μεταξάς, 2012). Οι γυναίκες που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για προδρομικό πλακούντα, είναι αυτές είχαν προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις στη μήτρα, όπως η καισαρική τομή, η χειρουργική επέμβαση για αφαίρεση ινομυωμάτων, η διαστολή και η απόξεση.



Εικόνα 11: Μορφές προδρομικού πλακούντα. Πηγή: <https://obstetric.gr/>

#### 12.2.5.1. Προγεννητικός έλεγχος πρόδρομου πλακούντα

Μία τέτοια κατάσταση μπορεί να εντοπισθεί με υπερηχογραφικό έλεγχο, είτε κατά την διάρκεια ενός υπερηχογραφήματος ρουτίνας, είτε μετά από κάποιο επεισόδιο κολπικής αιμορραγίας. Το διακολλητικό υπερηχογράφημα είναι ασφαλές παρουσία προδρομικού πλακούντα, και πιο ακριβές από ό,τι το διακοιλιακό στον εντοπισμό του. Η μαγνητική τομογραφία συντελεί στη διάγνωση του όταν η διακοιλιακή υπερηχογραφία δεν είναι απολύτως διαγνωστική, ενώ είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην απεικόνιση του οπίσθιου πλακούντα (Bhide & Thilaganathan, 2004).

#### 12.2.6. Αποκόλληση πλακούντα

Η αποκόλληση πλακούντα αποτελεί ένα φυσιολογικό γεγονός που συμβαίνει στο τρίτο στάδιο του τοκετού (υστεροτοκία). Μετά την έξοδο του εμβρύου και του αμνιακού υγρού, ελαττώνεται ο όγκος στο εσωτερικό της μήτρας και ο σχετικά ανελαστικός πλακούντας, υπό την συνεχή επίδραση των συσπάσεων της μήτρας, αποκολλάται στην αρχή μερικώς και στη συνέχεια ολόκληρος από τη μήτρα.

Υπάρχουν δύο ειδών αποκολλήσεις πλακούντα που συμβαίνουν στο στάδιο της υστεροτοκίας: η περιφερική, όπου ξεκολλάει η περιφέρεια του πλακούντα και συνοδεύεται από αιμορραγία και η κεντρική, στην οποία δημιουργείται ένα οπισθοπλακουντιακό αιμάτωμα, ο πλακούντας ξεκολλάει στο κέντρο του και δεν υπάρχει αιμορραγία μέχρι το αιμάτωμα να φτάσει στην περιφέρεια του. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως, μπορεί να συμβεί αποκόλληση πλακούντα στη διάρκεια της κύησης. Η εμφάνιση αποκόλλησης πλακούντα είναι 1/120 γεννήσεις και ο κίνδυνος επανεμφάνισης στις επόμενες εγκυμοσύνες είναι πολύ υψηλότερος. Εκδηλώνεται συνήθως με κολπική αιμορραγία που ποικίλλει σε ένταση ενώ μπορεί να συνυπάρχει πόνος είτε συνεχής είτε με τη μορφή περιοδικών ωδινών. Στην περίπτωση της κεντρικής αποκόλλησης που είναι και η σοβαρότερη, απουσιάζει η αιμόρροια ενώ





συνήθως συνυπάρχει σοβαρό κοιλιακό άλγος. Ανάλογα με τη συμπτωματολογία διακρίνονται διαφορετικού βαθμού αποκολλήσεις που ξεκινούν από ασυμπτωματικές, οι οποίες διαπιστώνονται σε τυχαίο υπερηχογραφικό έλεγχο και είναι αυτοπεριοριζόμενες, φτάνοντας σε σοβαρότερου βαθμού όπου μπορεί να συνυπάρχει αιμοδυναμική αστάθεια της εγκύου, διαταραχές πήξης και σημεία εμβρυικής δυσπραγίας (Γόνη, 2016).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποκόλληση πλακούντα είναι η πολύδυμη κύηση και το πολυϋδράμνιο λόγω της μεγάλης διάτασης της μήτρας, η χρήση κοκαΐνης και άλλων ναρκωτικών ουσιών, διαταραχές της πήξης του αίματος (θρομβοφιλίες, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο), ο εξαιρετικά βραχύς ομφάλιος λώρος, η αυξημένη ηλικία της μητέρας και η πολυτοκία.

#### 12.2.6.1. Προγεννητικός έλεγχος απόπτωσης πλακούντα

Ο έλεγχος για την αποκόλληση του πλακούντα συνήθως πραγματοποιείται μέσω των συμπτωμάτων που παρουσιάζει η έγκυος. Η παρουσία κοιλιακής αιμορραγίας σε συνδυασμό με πόνο μπορεί να οδηγήσει στο ενδεχόμενο αποκόλλησης. Με την χρησιμοποίηση των υπέρηχων μπορεί να καθοριστεί η θέση της αιμορραγίας και να ελεγχθεί το έμβρυο, όμως μόνο ένα 15-20% των εγκύων με αποκόλληση μπορούν να διαγνωσθούν (Sholl, 1987).

#### 12.2.7. Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια ενδοκρινολογική πάθηση κατά την οποία είτε υπάρχει μειωμένη έκκριση της ορμόνης ινσουλίνης, είτε υπάρχει μειωμένη δραστηριότητα αυτής. Η ινσουλίνη παράγεται από τα β-κύτταρα της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Η μειωμένη έκκρισή της ή η μειωμένη δραστηριότητά της οδηγεί σε ανωμαλίες στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών στον οργανισμό. Η μεταβολική αυτή διαταραχή είναι η πιο συχνή ενδοκρिनοπάθεια που μπορεί να εμπλακεί με την εγκυμοσύνη ή να εμφανιστεί κατά τη διάρκεια αυτής.

Σε μια διαβητική γυναίκα όπου το σάκχαρο του αίματος δεν είναι ρυθμισμένο, η γονιμότητα είναι πολύ περιορισμένη και η γυναίκα είναι δύσκολο να μείνει έγκυος. Αν όμως συμβεί εγκυμοσύνη τότε υπάρχει μεγάλο ποσοστό αυτόματης αποβολής ή μητρικής και νεογνικής θνησιμότητας. Με τη σωστή θεραπευτική αντιμετώπιση της πάθησης με τη βοήθεια της ινσουλίνης, οι κίνδυνοι αυτοί μειώθηκαν πάρα πολύ και έτσι σήμερα μία γυναίκα με καλά ρυθμιζόμενο διαβήτη μπορεί εύκολα να μείνει έγκυος με πιθανότητα αυτόματης αποβολής σχεδόν στο ίδιο ποσοστό όπως και στο γενικό πληθυσμό των φυσιολογικών εγκύων. Όσο καλύτερα ρυθμίζεται ο διαβήτης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε συνδυασμό με τη σωστή απόφαση για το χρόνο του τοκετού και τη σωστή φροντίδα του νεογνού, τόσο μικρότερος είναι ο κίνδυνος της περιγεννητικής θνησιμότητας (Μεταξάς, 2012).



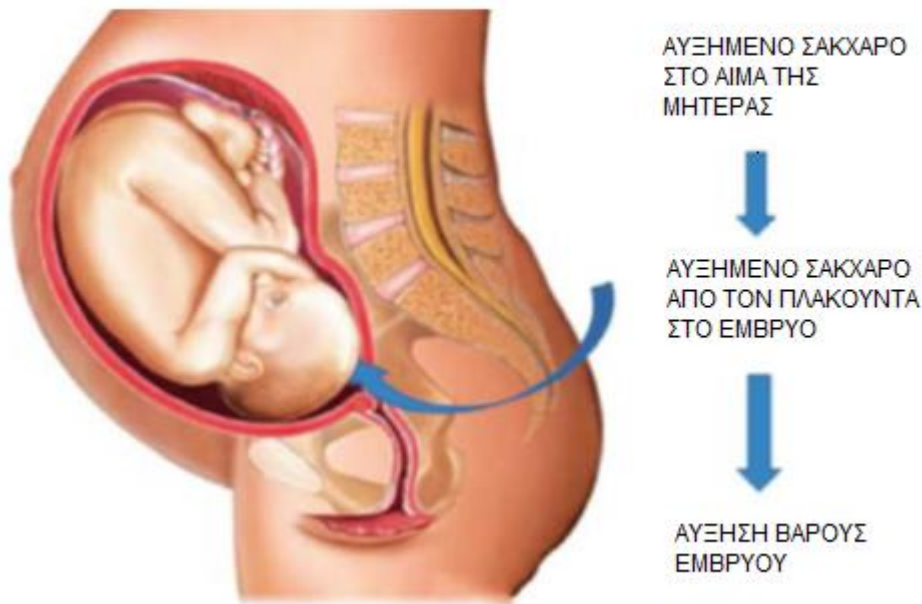
Ως σακχαρώδης διαβήτης κύησης (ΣΔΚ) χαρακτηρίζεται κάθε δυσανοχή στη γλυκόζη, η οποία αρχίζει ή πρωτοδιαγιγνώσκεται κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η διαβητική κετοξέωση αποτελεί άμεσο κίνδυνο για τη ζωή του εμβρύου, ενώ η υπεργλυκαιμία στην περίοδο της σύλληψης ενέχεται για εξαπλάσια εμφάνιση συγγενών ανωμαλιών της μέσης γραμμής και ευθύνεται για το 40% της περιγεννητικής θνησιμότητας. Η περιγεννητική θνησιμότητα πριν την ανακάλυψη της ινσουλίνης μπορούσε να ξεπεράσει το 60% και η μητρική θνησιμότητα έφτανε το 30%, ενώ πλέον τα ποσοστά αυτά έχουν μειωθεί σημαντικά. Για τους λόγους αυτούς, μία διαβητική έγκυος πρέπει να παρακολουθείται συχνότερα όχι μόνο από τον γυναικολόγο της αλλά και από τον διαβητολόγο για τη σωστή ρύθμιση της υπογλυκαιμίας και τη σωστή και έγκαιρη αντιμετώπιση της οποιασδήποτε επιπλοκής που είναι πιθανό να εμφανιστεί κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

Υπάρχει μια κατηγορία γυναικών οι οποίες έχουν αυξημένη πιθανότητα να αναπτύξουν διαβήτη κύησης. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται γυναίκες που έχουν οικογενειακό ιστορικό με ΣΔ, γέννηση προηγούμενου παιδιού με βάρος >4 κιλά, ενδομήτριο θάνατο κατά τους τελευταίους μήνες ενός προηγούμενου εμβρύου, αυξημένο μητρικό βάρος, προηγούμενο τέκνο με συγγενείς ανωμαλίες και πολυϋδράμνιο. Στην κατηγορία αυτή των εγκύων γυναικών πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή και να ελέγχονται έγκαιρα και συχνά ώστε σε περίπτωση που εμφανιστεί ο ΣΔΚ να ξεκινήσει σύντομα η θεραπεία και να μην επηρεασθεί έτσι και η υγεία της εγκύου και η φυσιολογική πορεία της εγκυμοσύνης (Μεντζελοπούλου, 2011).

#### 12.2.7.1. Προγεννητικός έλεγχος ΣΔΚ

Ο έλεγχος του σακχάρου είναι απαραίτητος από την πρώτη κιόλας επίσκεψη στον γυναικολόγο, αμέσως μόλις επιβεβαιωθεί η κύηση, ιδίως για τις γυναίκες με αυξημένους παράγοντες κινδύνου. Σύμφωνα με τα νεότερα κριτήρια που έχουν προταθεί από τον Διεθνή Οργανισμό Μελετών του Σακχαρώδη Διαβήτη στην Κύηση (IADPSG) και που υιοθετήθηκαν από τον Αμερικανικό Διαβητολογικό Οργανισμό (ADA), ο αλγόριθμος της διάγνωσης έχει δύο διακριτές φάσεις:





Εικόνα 12: Σχέση μητρικού σακχάρου και βάρους του εμβρύου. Πηγή: Μεντζελοπούλου, 2011.

1. Έλεγχος στην πρώτη μαιευτική επίσκεψη (μετά την επιβεβαίωση της εγκυμοσύνης). Στόχος είναι η ανεύρεση γυναικών με προϋπάρχοντα διαβήτη που δεν έχουν διαγνωσθεί και αυτών με αυξημένο κίνδυνο για σακχαρώδη διαβήτη κύησης. Κάθε γυναίκα πρέπει να ελέγχεται στο πρώτο τρίμηνο της κύησης με έλεγχο σακχάρου νηστείας (ή γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης). Εξαιρεση αποτελούν οι γυναίκες που είναι παχύσαρκες, είχαν διαβήτη της κύησης σε προηγούμενη εγκυμοσύνη ή έχουν αυξημένο κίνδυνο για σακχαρώδη διαβήτη κύησης, στις οποίες μπορεί να ζητηθεί καμπύλη σακχάρου στην 12<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Η «καμπύλη σακχάρου» αφορά τη μέτρηση του σακχάρου πριν και μετά την πόση ενός υγρού με μεγάλη περιεκτικότητα σε γλυκόζη, συνήθως 75 γρ. (σύμφωνα με τα νεότερα κριτήρια διάγνωσης). Πριν από την διενέργεια της καμπύλης η έγκυος πρέπει να καταναλώνει ελεύθερα υδατάνθρακες τουλάχιστον για τις τρεις προηγούμενες ημέρες. Εάν το σάκχαρο νηστείας είναι >92 mg/dl, η έγκυος θεωρείται ότι πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη (κύησης ή προϋπάρχοντα, ανάλογα με τα επίπεδα του σακχάρου) και πρέπει να συμβουλευτεί άμεσα ενδοκρινολόγο για την έναρξη κατάλληλης αγωγής.
2. Έλεγχος μεταξύ 24<sup>ης</sup> και 28<sup>ης</sup> εβδομάδας κύησης (συνήθης εκδήλωση σακχαρώδη διαβήτη κύησης). Εάν το σάκχαρο είναι φυσιολογικό στην πρώτη φάση, γίνεται επανέλεγχος μεταξύ της 24<sup>ης</sup> και 28<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης (τότε που εμφανίζεται ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης) με καμπύλη σακχάρου σε όλες τις εγκύους. Σύμφωνα με τα νέα κριτήρια, προτείνεται η καμπύλη μετά από πρόσληψη 75 γραμμαρίων γλυκόζης και έλεγχος



σακχάρου νηστείας, μιας και δύο ωρών μετά (0', 60' και 120'). Εάν έστω και μια τιμή σακχάρου είναι ίση ή μεγαλύτερη με τα θεσπισμένα όρια (σάκχαρο νηστείας >92 mg/dl ή 1<sup>η</sup> ώρα>180 ή 2<sup>η</sup> ώρα>153), τότε μπαίνει η διάγνωση ΣΔ κύησης (Στελλάτος, 2018).

Στον Πίνακα 8 παρατίθενται συγκεντρωτικά τα κριτήρια διάγνωσης του Σακχαρώδους Διαβήτη Κύησης σύμφωνα με τις πιο κοινά χρησιμοποιούμενες οδηγίες.

**Πίνακας 8: Κριτήρια διάγνωσης ΣΔΚ σύμφωνα με τους παρακάτω οργανισμούς**

Οργανισμός	Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (g)	1 <sup>η</sup> ώρα (mg/dl)	2 <sup>η</sup> ώρα (mg/dl)	3 <sup>η</sup> ώρα (mg/dl)
<b>WHO 2013*</b>	92-126	75	≥ 180	153-199	-
<b>ACOG**</b>	≥96	100	≥ 180	≥155	≥140
<b>NICE</b>	≥100	75	-	≥140	-
<b>CDA***</b>	≥96	75	≥ 191	≥160	-
<b>IADPSG****</b>	≥92	75	≥ 180	≥154	-

*\*WHO: World Health Organization (απαιτείται μια τιμή για τη διάγνωση), \*\*ACOG: American College of Obstetricians and Gynecologists (απαιτούνται 2 ή > τιμές για τη διάγνωση), NICE: National Institute for Health and Care Excellence, \*\*\*CDA: Canadian Diabetes Association (απαιτούνται 2 ή > τιμές για τη διάγνωση), \*\*\*\*IADPSG: International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (απαιτείται μια τιμή για τη διάγνωση), Πηγή: Στελλάτος Π., 2018*

#### 12.2.8. Πρόωρος τοκετός

Πρόωρος χαρακτηρίζεται ο τοκετός πριν τη συμπλήρωση των 37 εβδομάδων. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) η προωρότητα κατατάσσεται σε τρεις βασικές κατηγορίες: μετρίου βαθμού ή οριακή προωρότητα (τοκετός μεταξύ 32 εβδομάδων και <37 εβδομάδων), υψηλού βαθμού προωρότητα (τοκετός μεταξύ των 28 εβδομάδων και <32 εβδομάδων) και ακραία προωρότητα (τοκετός πριν τη συμπλήρωση 28 εβδομάδων κύησης). Σχετικά με το κατώτερο χρονικό όριο στο οποίο καθορίζεται ο πρόωρος τοκετός δεν υπάρχει ομοφωνία. Έτσι σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. ως κατώτερο όριο θεωρείται η 23<sup>η</sup> εβδομάδα, ενώ στις ΗΠΑ το όριο αυτό είναι η 20<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Στην Ελλάδα, ως κατώτερο όριο θεωρείται η 24<sup>η</sup> εβδομάδα. Ένα νεογέννητο που γεννιέται στις 23 εβδομάδες έχει πιθανότητες επιβίωσης 7%.

Η συχνότητα του πρόωρου τοκετού ανέρχεται περίπου στο 10% των συνολικών κυήσεων, ένα ποσοστό που παραμένει αναλλοίωτο τα τελευταία είκοσι περίπου χρόνια. Ο πρόωρος τοκετός αποτελεί σημαντικό πρόβλημα επειδή, το έμβρυο που γεννιέται πολύ νωρίς μπορεί να μην έχει αναπτυχθεί πλήρως. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε νεογνικό θάνατο (70%-90% των νεογνικών θανάτων που δεν οφείλονται σε συγγενείς ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες) ή σε σοβαρά προβλήματα υγείας, όπως η εγκεφαλική παράλυση, μαθησιακές ή κινητικές διαταραχές. Η πλειονότητα της περιγεννητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας παρατηρείται σε νεογνά μικρότερα των 32 εβδομάδων, καθώς και σε εκείνα με βάρος γέννησης μικρότερο των 800 γραμμαρίων. Επίσης αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τον τρόπο ζωής λόγω των πιθανών απώτερων επιπλοκών του νεογνού με συνέπεια να απαιτούνται μακροχρόνιες νοσηλείες και θεραπείες αποκατάστασης.



Τις περισσότερες φορές η αιτία του πρόωρου τοκετού είναι άγνωστη, ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν ή να παΐξουν σημαντικό ρόλο στον πρόωρο τοκετό. Οι σημαντικότεροι παράγοντες είναι η ηλικία (εφηβεία είτε προχωρημένη ηλικία της μητέρας), τραυματισμός, κάπνισμα, υποθρεψία και χαμηλό BMI. Επίσης ορισμένες λοιμώξεις των γεννητικών οργάνων, όπως σύφιλη, γονόρροια, χλαμύδια, λοίμωξη από στρεπτόκοκκο ομάδας B εξ' αιτίας πρόωρης ρήξης των υμένων, βακτηριδιακή κολπίτιδα (*Gardnerella vaginalis*), *Trichomonas vaginalis*, *Ureoplasma urealiticum*, *Mycoplasma hominis*. Άλλοι παράγοντες είναι οι ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας, όπως ανεπάρκεια τραχήλου (να είναι μικρότερος από τον κανονικό ή να διαστέλλεται χωρίς συστολές), υπερβολικά μεγάλη μήτρα και ινομυώματα αυτής. Τέλος, προηγούμενο χειρουργείο τραχήλου (π.χ. κωνοειδής εκτομή), προηγούμενος πρόωρος τοκετός, προηγηθείσα αποβολή 2<sup>ου</sup> τριμήνου και ιστορικό επαναλαμβανόμενων διακοπών κύησης είναι παράγοντες που μπορεί να επιφέρουν πρόωρο τοκετό (Σαλαμαλέκης, 2013).

#### 12.2.8.1. Προγεννητικός έλεγχος πρόωρου τοκετού

Η πρόβλεψη του πρόωρου τοκετού στον γενικό πληθυσμό μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους. Με την εκτίμηση του μήκους του τραχήλου με διακολπικό υπερηχογράφημα, όπου το μήκος τραχήλου στις 24 εβδομάδες είναι 35,2 χιλ. ± 8,3 χιλ. Μήκος τραχήλου <15 χιλ. σχετίζεται με το 100% των πρόωρων τοκετών πριν τις 26 εβδομάδες και με το 80% και το 60% των πρόωρων τοκετών πριν τις 30 και 32 εβδομάδες, αντίστοιχα. Το κύριο όφελος από την μέτρηση του μήκους του τραχήλου στις 24 εβδομάδες είναι η αρνητική προγνωστική αξία της μεθόδου η οποία προσδιορίζεται στο 90% για μήκος τραχήλου >3 εκ. Ένας άλλος τρόπος είναι η ανίχνευση εμβρυϊκής φιμπρονεκτίνης (fFN). Η fFN μπορεί να ανιχνευθεί στις τραχηλικές και κολπικές εκκρίσεις γυναικών καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μέσω ανοσοπροσδιορισμού βασισμένου σε μονοκλωνικό αντίσωμα. Η εμβρυϊκή φιμπρονεκτίνη είναι αυξημένη στις τραχηλικές και κολπικές εκκρίσεις κατά τα πρώιμα στάδια της κύησης αλλά μειώνεται από τις 22 έως 35 εβδομάδες στις φυσιολογικές κυήσεις. Η σημασία της παρουσίας της στον κόλπο κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων της κύησης δεν έχει γίνει κατανοητή. Ωστόσο, μπορεί απλά να αντικατοπτρίζει τη φυσιολογική ανάπτυξη πληθυσμού εξωλαχνώδους τροφοβλάστης και του πλακούντα. Μέτρηση τιμών  $\geq 50\text{ng/ml}$  στις 22 εβδομάδες συσχετίζεται με 40% αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πρόωρου τοκετού. Η λήψη του δείγματος πρέπει να γίνεται από τον πρόσθιο κολπικό θόλο ή τον εξωτράχηλο (Lockwood et al, 1991; (Σαλαμαλέκης, 2013).

Η αιτιολογία του πρόωρου τοκετού είναι πολυπαραγοντική και το τελικό αποτέλεσμα, που σηματοδοτεί την πρόκλησή του, είναι η αύξηση της αναλογίας οιστρογόνων/προγεστερόνης, η οποία διεγείρει την ανάπτυξη των υποδοχέων της ωκυτοκίνης αλλά και την υπόφυση για την παραγωγή ωκυτοκίνης. Η αύξηση των οιστρογόνων οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα οιστριόλης στη μητέρα. Η οιστριόλη αποτελεί ένα σημαντικό βιοχημικό δείκτη για τη διάγνωση του πρόωρου τοκετού. Ο προσδιορισμός της οιστριόλης στο σάλιο είναι εύκολη διαδικασία, αφού απαιτείται δείγμα 1cm<sup>3</sup> για τον προσδιορισμό της. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση των επιπέδων της σε περιπτώσεις επικείμενων πρόωρων τοκετών.



Ένας άλλος βιοχημικός δείκτης είναι ο εκλυτικός παράγοντας της ACTH, η ορμόνη κορτικοεκλυτίνη (CRH). Η CRH παράγεται στον υποθάλαμο και στον πλακούντα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση τόσο του τελειόμηνου όσο και του πρόωρου τοκετού. Τα επίπεδά της στον ορό της μητέρας παρουσιάζουν ανοδική πορεία με την πρόοδο της εγκυμοσύνης και εκατονταπλασιάζονται με την έναρξη του πρόωρου τοκετού. Η ανεύρεση υψηλών επιπέδων CRH αποτελεί πρώιμο δείκτη κινδύνου για πρόωρο τοκετό (Warren et al, 1992).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13. Συμβουλευτική

Η διεθνώς αποδεκτή προσέγγιση για την αντιμετώπιση των διαφόρων ηθικών, θρησκευτικών και πολιτιστικών αξιών των ασθενών είναι η παροχή μεμονωμένων μη καθοδηγητικών συμβουλών, δοκιμών και άλλων κλινικών πληροφοριών σε κάθε στάδιο της διαδικασίας του ελέγχου και της διάγνωσης. Αυτό το μοντέλο, το οποίο μεγιστοποιεί την αυτονομία των ασθενών στην αναπαραγωγική λήψη αποφάσεων, έχει υιοθετηθεί από διάφορους πληθυσμούς σε ολόκληρο τον κόσμο.

Η παροχή συμβουλών σε γυναίκες που σκέφτονται το NIPT σαν δοκιμασία ελέγχου, είναι πρόκληση. Το εύρος των κυτταρογενετικών ανωμαλιών που ανιχνεύονται επί του παρόντος μέσω της δοκιμής με cfDNA είναι μικρότερο από εκείνο που ανιχνεύεται με τον συμβατικό καρυότυπο και ακόμα μικρότερο από αυτό που επιτυγχάνεται με τον έλεγχο μικροσυστοιχιών. Εφόσον δεν υπάρχουν πολιτικές στη δημόσια υγεία που να ορίζουν στρατηγικές ελέγχου, κάθε γυναίκα υψηλού κινδύνου που θα είχε προηγουμένως λάβει απόφαση να κάνει αμνιοπαρακέντηση ή CVS και καρυότυπο, θα πρέπει τώρα να επιλέξει μεταξύ του NIPT, επεμβατικών δοκιμών με συμβατική κυτταρογενετική, επεμβατικών δοκιμών με μικροσυστοιχία ή και καθόλου έλεγχο. Αυτές οι γυναίκες θα πρέπει να συμβουλευούνται προσεκτικά σχετικά με τα πολύπλοκα οφέλη, τους κινδύνους και τα εμπόδια που σχετίζονται με την εκάστοτε επιλογή. Εδώ και χρόνια, η χρήση και μόνο της ηλικίας της μητέρας για την επιλογή γυναικών που θα υποβληθούν σε επεμβατικές δοκιμές έχει αντικατασταθεί από διάφορες μορφές μέτρησης παραγόντων στον μητρικό ορό με ή χωρίς μέτρηση αυχενικής διαφάνειας. Σε χώρες όπου αυτό εφαρμόστηκε καλά, οι περιπτώσεις επεμβατικές δοκιμές (και οι σχετικές αποβολές) μειώθηκαν σημαντικά, με ταυτόχρονη βελτίωση της ανίχνευσης, βελτιώνοντας έτσι τις αναπαραγωγικές επιλογές των γυναικών (Ferres et al, 2014). Ακόμα, η συντριπτική πλειοψηφία των επεμβατικών εξετάσεων μετά από εξέταση για τρισωμία αποκαλύπτει ένα φυσιολογικό αποτέλεσμα, ενώ η δοκιμασία ελέγχου είναι «ψευδώς καθησυχαστική» σε τουλάχιστον μία στις 10 εγκυμοσύνες με τρισωμικό έμβρυο 21. Η χρήση του NIPT μας επιτρέπει να βελτιώσουμε περαιτέρω την ποιότητα των προγεννητικών εξετάσεων για ανωμαλίες του εμβρύου.

Ο σκοπός της παροχής συμβουλών σε μια έγκυο γυναίκα πριν επιλέξει να υποβληθεί σε οποιαδήποτε δοκιμασία, που μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες, είναι να της παρέχει επαρκή κατανόηση των χαρακτηριστικών της δοκιμασίας, των περιορισμών και των κινδύνων, ώστε να κάνει αυτό που ονομάζεται «συνειδητή επιλογή» σχετικά με το αν θέλει να υποβληθεί σε αυτή, κάποια άλλη ή σε καμία δοκιμή.

### 13.1. Ερωτήματα πριν την συμβουλευτική

Αρχικά, πριν δωθούν στην έγκυο (και ιδανικά και στον σύντροφό της) λεπτομέρειες σχετικά με τις επιλογές που έχει, αξίζει τον κόπο να ελεγχθεί αν έχει ήδη ενημερωθεί για το θέμα (από προηγούμενες εγκυμοσύνες, ιστότοπους, φυλλάδια) και αν ενδιαφέρεται καθόλου να λάβει πληροφορίες σχετικά με την υγεία και πιθανές ανωμαλίες του εμβρύου της. Ορισμένες γυναίκες δηλώνουν σταθερά ότι



δεν θέλουν να γνωρίζουν τέτοια πράγματα μέχρι τη γέννηση και μπορεί ακόμη και να αισθάνονται προσβεβλημένες όταν υποβληθεί η πρόταση για έλεγχο και πιθανό τερματισμό της κύησης. Σε ορισμένες κοινωνίες, ειδικοί σε θέματα ηθικής τονίζουν αυτό το «δικαίωμα στο να μην γνωρίζουν».

### 13.2. Γενικές πτυχές για τον έλεγχο, τη διάγνωση και την παρέμβαση

Το όφελος πρέπει να ζυγίζεται έναντι του κινδύνου απώλειας μιας φυσιολογικής εγκυμοσύνης μετά από μια επεμβατική διαδικασία ή λόγω της αυξημένης ανησυχίας που προκαλείται από την ύπαρξη ενός CNV άγνωστης σημασίας, κακώς καθορισμένης διεισδυτικότητας ή/και ποικίλης εκφραστικότητας. Επιπλέον, οι δοκιμές θα μπορούσαν να αποκαλύψουν συγγένεια ή μη πατρότητα (Devers et al, 2013). Η διαθεσιμότητα επαγγελματικών οδηγιών μπορεί να διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό τη διαδικασία διευκρινίζοντας ποιές διαδικασίες είναι επιστημονικά έγκυρες και κλινικά αποδεκτές για τις προδιαγραφές της φροντίδας (Committee Opinion, 2012; Langlois & Brock, 2013; Wilson et al, 2013).

### 13.3. Γενικές πτυχές για τον έλεγχο της ανευπλοειδίας

Προτού υποβληθεί οποιοδήποτε άτομο σε ιατρική εξέταση, ο γιατρός οφείλει να συζητήσει το στόχο της εξέτασης, τα οφέλη από την πληροφόρηση που παρέχει η δοκιμασία, τους περιορισμούς, τους κινδύνους και το κόστος. Κατά τον έλεγχο ασθενειών, εν απουσία γνωστών παραγόντων κινδύνου, το άτομο που πρόκειται να υποβληθεί σε δοκιμή μπορεί να θέλει να γνωρίζει κάτι σχετικά με την ασθένεια που ερευνάται, όπως τις πιθανότητες να έχει στην πραγματικότητα την συγκεκριμένη ασθένεια, καθώς και τη σοβαρότητα, τις επιλογές θεραπείας και τους κινδύνους που συνεπάγονται όταν ο έλεγχος απορρίπτεται.

Μια κοινή παρανόηση, ιδιαίτερα σημαντική όταν οι γυναίκες πρέπει να επιλέξουν μεταξύ διαφορετικών επιλογών ελέγχου, είναι ότι το σύνδρομο Down περιλαμβάνει τις περισσότερες πιθανές αιτίες νοητικής αναπηρίας στα παιδιά. Αν και είναι μακράν η πιο κοινή χρωμοσωμική ανωμαλία στα ζωντανά γεννημένα παιδιά στον δυτικό κόσμο, η συνδυασμένη επίπτωση όλων των σπάνιων ασθενειών που σχετίζονται με την νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση είναι αρκετές φορές υψηλότερη από το 1 στα 500-700 του συνδρόμου Down. Μια δεύτερη κοινή παρανόηση σχετικά με το σύνδρομο Down είναι η περιορισμένη αντίληψη της σοβαρότητας της ασθένειας. Πολλοί γονείς λένε στον σύμβουλο ότι γνωρίζουν τί σημαίνει το σύνδρομο Down, συχνά βασισμένοι σε άτομα που έχουν δει στην τηλεόραση, πολλά από τα οποία συμβαίνει να είναι μωσαϊκά. Όσοι πρόκειται να γίνουν γονείς μπορούν να επωφεληθούν από μια ρεαλιστική εικόνα, συμπεριλαμβανομένης της γνώσης της απρόβλεπτης διακύμανσης της σωματικής και ψυχικής αναπηρίας, της εξειδικευμένης φροντίδας που απαιτείται και της μακροπρόθεσμης πρόγνωσης των ενηλίκων με σύνδρομο Down.





#### 13.4. Τι μπορεί να θέλουν οι γυναίκες να γνωρίζουν

Δεν επιθυμούν όλες οι έγκυες γυναίκες να γνωρίζουν εκ των προτέρων όλες τις πιθανές λεπτομέρειες σχετικά με την ποικιλία των εξετάσεων που υπάρχουν και παρέχονται. Πολλές, ωστόσο, κάνουν ερωτήσεις. Οι γιατροί τους θα πρέπει να έχουν επαρκείς γνώσεις για να απαντήσουν στα περισσότερα από αυτά και θα πρέπει να είναι σε θέση να βρουν τις πληροφορίες ή να απευθυνθούν σε συναδέλφους τους εάν δεν μπορούν. Πολλά προγράμματα έχουν αναπτύξει γραπτές και διαδικτυακές πλατφόρμες λήψης αποφάσεων. Με την εισαγωγή του NIPT, τόσο η γνώση των γιατρών όσο και οι πληροφορίες σε φυλλάδια και ιστότοπους πρέπει να ενημερωθούν. Ορισμένες από τις πιο συχνές ερωτήσεις είναι οι παρακάτω (Oerkes et al, 2014):

1. Τι είναι οι τρισωμίες 21, 18 και 13;
2. Ποιοί είναι οι κίνδυνοι των ανωμαλιών αυτών στον γενικό πληθυσμό;
3. Σε περίπτωση τρισωμικού εμβρύου, ποιες είναι οι πιθανότητες αυτόματης αποβολής / περιγεννητικού θανάτου από την στιγμή του ελέγχου και μετά;
4. Ποιες είναι οι πιθανότητες ανίχνευσης άλλων εμβρυϊκών ανωμαλιών χρησιμοποιώντας υπερήχους στο πρώτο και στο δεύτερο τρίμηνο (κατά τον έλεγχο ρουτίνας);
5. Τι σημαίνει όταν το αποτέλεσμα είναι θετικό;
6. Ποιες είναι οι επιλογές όταν το αποτέλεσμα είναι θετικό;
7. Πόσο αξιόπιστο είναι το NIPT με cffDNA;
8. Ποιος είναι ο κίνδυνος για τρισωμία όταν το NIPT είναι αρνητικό;
9. Μπορούν άλλες ανωμαλίες εκτός από τις τρισωμίες 21, 18 και 13 να βρεθούν με το NIPT και αν ναι, θα ανακοινωθούν;
10. Ελέγχεται το φύλο του εμβρύου; Και αν ναι, ανακοινώνεται; Κατά πόσο είναι αξιόπιστο;



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14. Ηθικά ζητήματα

Η υπόσχεση του NIPT είναι ότι θα μειώσει τον αριθμό των γυναικών με ένδειξη διενέργειας επεμβατικών εξετάσεων και μόνο οι γυναίκες που διατρέχουν πολύ υψηλό κίνδυνο για καθορισμένες διαταραχές, όπως το σύνδρομο Down, θα πρέπει στη συνέχεια να αντιμετωπίσουν τις δεοντολογικές προκλήσεις που συνδέονται με τις διαδικασίες απώλεια και πιθανό τερματισμό εγκυμοσύνης. Ωστόσο, η ευκολία παροχής του NIPT θα οδηγήσει πιθανώς σε ουσιαστικά περισσότερες προγεννητικές διαγνώσεις και τερματισμούς προσβεβλημένων κυήσεων (Norton et al, 2013). Το πρόβλημα συγχέεται με την αδυναμία παροχής επαρκούς συμβουλευτικής για όλες τις γυναίκες που ενδεχομένως να σκέπτονται το NIPT ως δοκιμασία ελέγχου (Benn & Charman, 2010). Μπορεί επίσης να υπάρξει μετατόπιση των απόψεων των ασθενών ή/και των παρόχων υγειονομικής περίθαλψης σχετικά με την προγεννητική διάγνωση, με μεγαλύτερη προσδοκία για τερματισμό της εγκυμοσύνης ως συνήθη απάντηση σε μια ανώμαλη διάγνωση. Αυτό αναφέρεται ως «κανονικοποίηση» (normalization) δοκιμών και τερματισμού (De Jong et al, 2009). Οι πιθανές συνέπειες θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν μια έντονα μειωμένη συχνότητα εμφάνισης νεογνών με σύνδρομο Down, μεγαλύτερη έμφαση στην πρόληψη και μικρότερη στις ίδιες τις αναπηρίες τους, αλλά και αλλαγή της στάσης απέναντι στα άτομα με σύνδρομο Down και των γονέων τους που επέλεξαν να μην εξετάσουν ή να μην τερματίσουν μια προσβεβλημένη κύηση.

Οι τρέχουσες διαθέσιμες δοκιμασίες NIPT για ανευπλοειδισμό είναι το αποτέλεσμα μιας μαζικής επένδυσης ιδιωτικών εταιρειών και επιχειρηματικών κεφαλαίων και μέχρι στιγμής παρέχεται μόνο από ιδιωτικές εταιρείες με κερδοσκοπικό σκοπό. Οι ισχυρισμοί περί αποκλειστικής πνευματικής ιδιοκτησίας μπορούν να αυξήσουν το κόστος, να περιορίσουν την πρόσβαση σε πρωτόκολλα δοκιμών καθώς και την περαιτέρω εξέλιξη αυτών. Για τον λόγο αυτό πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή του εργαστηρίου που θα διεξάγει τον έλεγχο, καθώς θα πρέπει να λειτουργεί σύμφωνα με τα αντίστοιχα πρότυπα και πρωτόκολλα.



## Συμπεράσματα

Το βασικό ερώτημα που απασχολεί μια μέλλουσα μητέρα κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι ποιό είδος προγεννητικού ελέγχου θα επιλέξει ώστε να διασφαλίσει ότι το έμβρυο που κυοφορεί είναι φυσιολογικό. Η διάγνωση των πιο συνηθισμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών στο έμβρυο είναι μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις της σύγχρονης περιγεννητολογίας. Η προγεννητική διάγνωση χρησιμοποιεί μια ποικιλία τεχνικών για τον προσδιορισμό της υγείας και της κατάστασης ενός εμβρύου, οι οποίες χωρίζονται σε επεμβατικές και μη επεμβατικές. Οι μη επεμβατικές μέθοδοι περιλαμβάνουν υπερηχογραφήματα και ανάλυση βιοχημικών δεικτών στο μητρικό αίμα. Ο σύνηθης πληθυσμιακός έλεγχος πρώτου τριμήνου σε κύηση, μέχρι και το 2013, ήταν ο συνδυασμός της αυχενικής διαφάνειας και της ανίχνευσης της PAPP-A και της β-hCG στο αίμα της εγκύου. Ο συνδυαστικός αυτός έλεγχος, αφενός προσέφερε στις γυναίκες τη δυνατότητα της έγκαιρης εξέτασης για εμβρυϊκή ανευπλοειδία καθώς και της έγκαιρης διάγνωσης, και αφετέρου το υπερηχογράφημα ανίχνευε εμβρυϊκές κατασκευαστικές ανωμαλίες.

Η καθοριστική έρευνα από τον Dennis Lo το 1997 για το cfDNA άνοιξε ένα νέο κεφάλαιο στον προγεννητικό έλεγχο. Η χρήση του cfDNA άλλαξε δραματικά τις ικανότητες των επαγγελματιών στο να ανιχνεύουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για την έγκυο ή για το έμβρυο. Το NIPT που βασίζεται στο cffDNA προσφέρει, εκτός από απλότητα της διαδικασίας (μια απλή αιμοληψία της εγκύου), υψηλής ποιότητας αποτέλεσμα κατά τον έλεγχο για τρισωμία 21, 18 και 13 (DR~99%). Ανεξαρτήτως αυτών των αποτελεσμάτων, ο έλεγχος για SCAs είναι αμφιλεγόμενος (Kagan et al, 2016). Σε ένα 2% περίπου των περιπτώσεων, η ανάλυση του cfDNA παραμένει ασαφής. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι το εμβρυϊκό κλάσμα στο μητρικό αίμα είναι μικρότερο του 4%, ενώ υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του χαμηλού FF και του μητρικού βάρους.

Υπάρχουν δύο μοντέλα στα οποία μπορεί να εφαρμοστεί το cfDNA. Μια πολιτική «καθολικού ελέγχου» με cfDNA για τρισωμίες 21, 18 και 13, θα οδηγούσε σε περίπου 1% ποσοστό επεμβατικής εξέτασης και στην ανίχνευση περισσότερο από 98% των περιπτώσεων τρισωμίας 21 και περίπου 96% των τρισωμιών 18 και 13, αλλά δεν θα ανίχνευε ανωμαλίες χρωμοσωμάτων του φύλου, τριπλοειδίες ή άλλες ανωμαλίες με υψηλό κίνδυνο ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων. Αντίθετα, μια πολιτική «ελέγχου πρώτης γραμμής» με τον συνδυασμένο έλεγχο, ακολουθούμενο από επεμβατικές δοκιμές σε άτομα με κίνδυνο  $\geq 1:10$  και δοκιμασία cfDNA σε άτομα με κίνδυνο 1:11 - 1:1000, θα οδηγούσε επίσης σε ποσοστό επεμβατικής εξέτασης περίπου 1% και ενδεχομένως να ανιχνεύσει το 96% των περιπτώσεων τρισωμίας 21 και 97,5% των τρισωμιών 18 και 13. Μια τέτοια πολιτική θα μπορούσε επίσης να ανιχνεύσει περίπου το 86% των περιπτώσεων μονοσωμίας X, ανευπλοειδίες χρωμοσωμάτων του φύλου και το ένα τρίτο των τριπλοειδών, τα οποία, επί του παρόντος, ανιχνεύονται με τον συνδυασμένο έλεγχο και καρυότυπο μετά από επεμβατική δοκιμασία, για όσες διατρέχουν κίνδυνο  $\geq 1:100$  (Syngelaki et al, 2014).

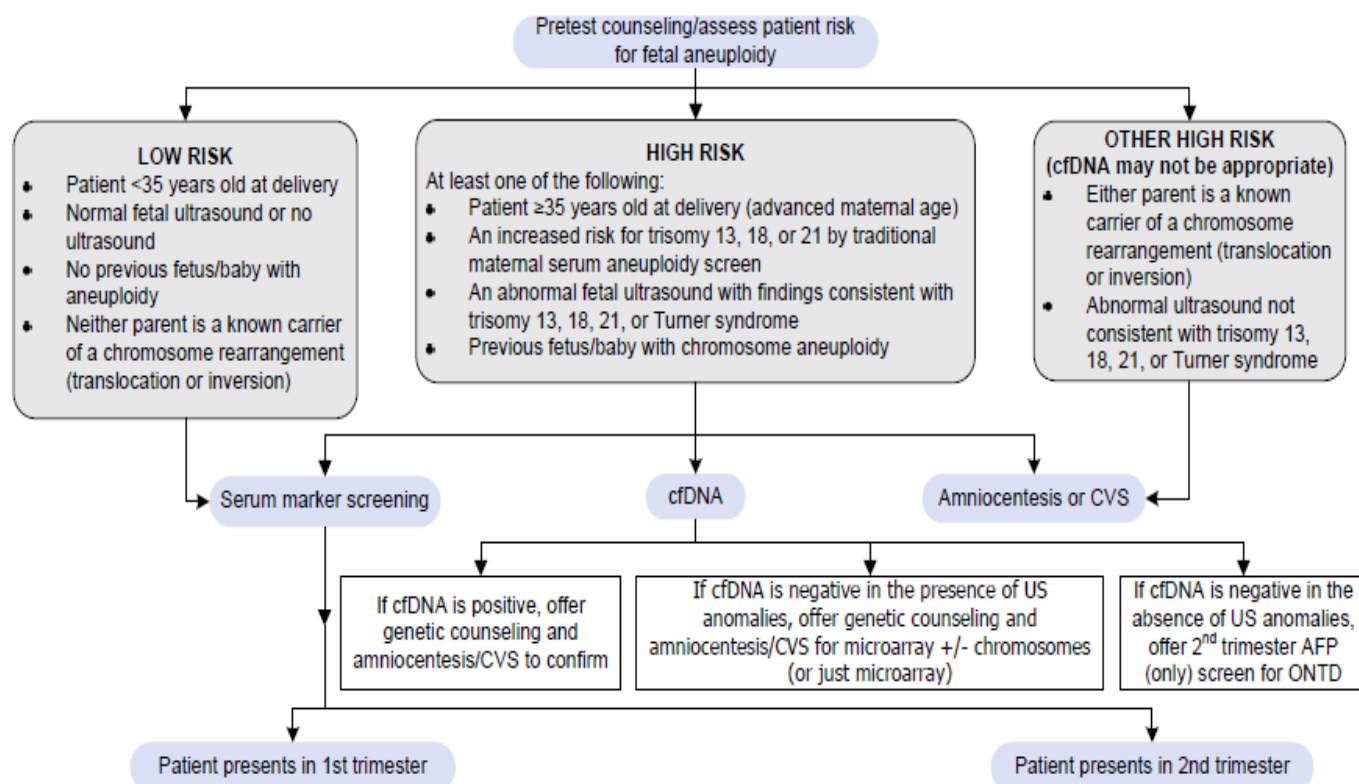
Το NIPT που βασίζεται στο cffDNA, σύμφωνα με τις τελευταίες οδηγίες του Αμερικάνικου Κολεγίου Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (ACOG) του 2016, δεν είναι κατάλληλο για χρήση στον γενικό πληθυσμό επειδή το PPV είναι αρκετά χαμηλότερο απ'ό,τι στις ομάδες υψηλού κινδύνου (χαμηλός επιπολασμός), με αποτέλεσμα να



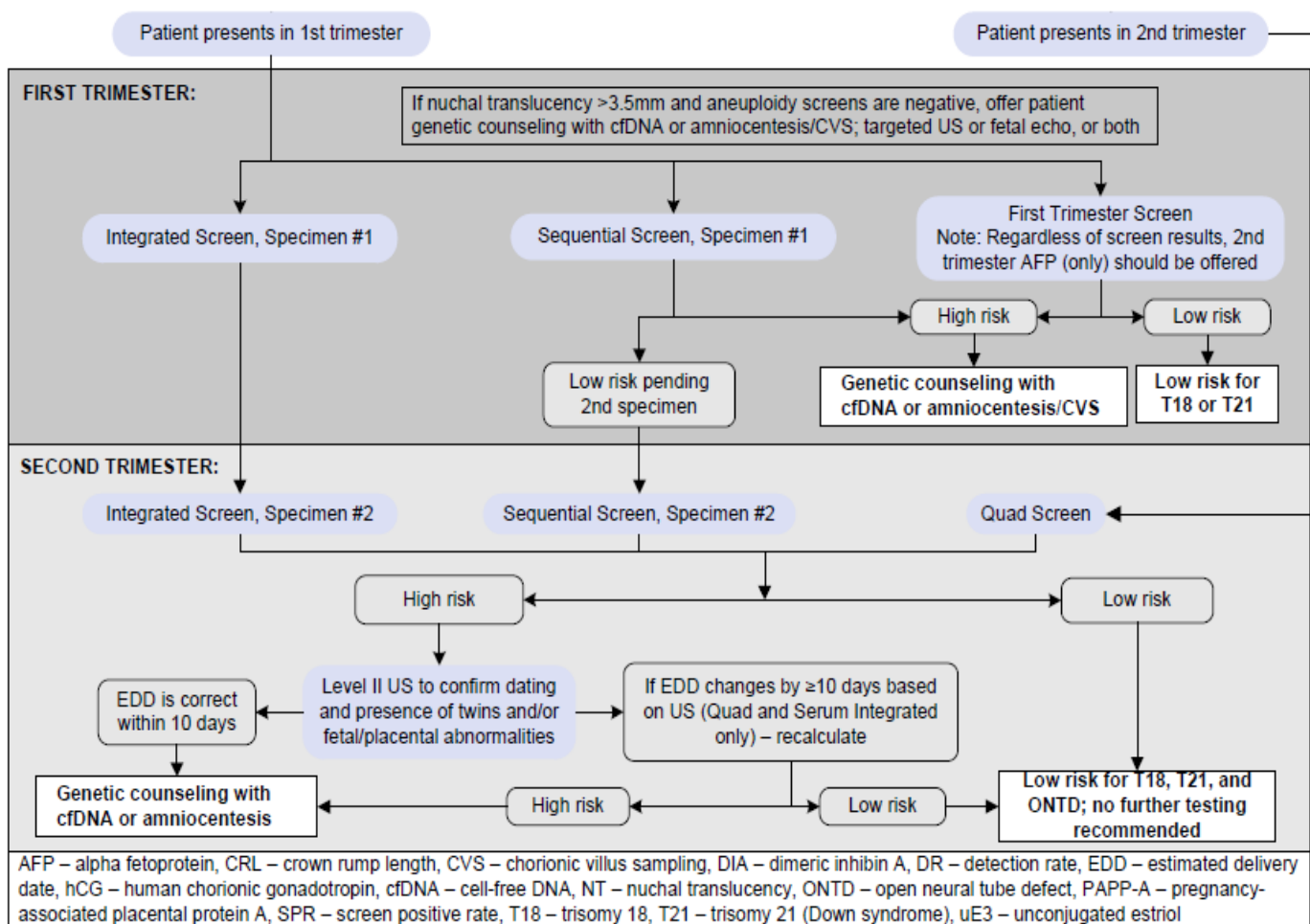
προκύπτουν πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ένας άλλος περιορισμός στην χρήση του είναι ότι οι τρισωμίες 21, 18 και 13 καταλαμβάνουν μικρότερο ποσοστό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που βρίσκονται στον γενικό πληθυσμό, οπότε ο παραδοσιακός βιοχημικός έλεγχος 1<sup>ου</sup> τριμήνου προσφέρει υψηλότερο DR για χρωμοσωμικές ανωμαλίες πέραν των τρισωμιών 21,18 και 13 (Committee, 2016). Σε υψηλού κινδύνου ομάδες, η χρήση του cffDNA μπορεί να αποτρέψει μία επεμβατική μέθοδο μειώνοντας το ποσοστό από 54% στο 18,6%, μειώνοντας έτσι και τις πιθανές σχετιζόμενες αποβολές από 29 σε 10 (Sacco et al, 2019).

Παρουσία επιπλέον ανωμαλιών, οι γυναίκες ενημερώνονται ότι οι επεμβατικές δοκιμές θα δώσουν περισσότερες πληροφορίες και θα αποφευχθούν καθυστερήσεις, καθώς ένα θετικό αποτέλεσμα NIPT θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με επεμβατικές δοκιμές ενώ ένα αρνητικό αποτέλεσμα NIPT, σε περίπτωση εμβρυικών ανωμαλιών, δεν παρέχει πληροφορίες για οποιαδήποτε άλλη πιθανή γενετική αιτία. Εάν επιλεγεί επεμβατική δοκιμή, τότε εκτελείται λήψη χοριακών λάχνων. Εάν επιλεγεί το NIPT και είναι θετικό («high chance»), προσφέρεται αμνιοπαρακέντηση από τις 15 εβδομάδες λόγω του ότι σε αυτή την κατάσταση υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ενός αδιαμφισβήτητου αποτελέσματος με CVS (Grati et al, 2015). Αν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό («low chance»), εκτελείται λεπτομερές υπερηχογράφημα στις 20 εβδομάδες. Απουσία εμβρυικών ανωμαλιών, το NIPT παρέχει διαβεβαίωση και μειώνει τον αριθμό των επεμβατικών διαδικασιών, ενώ πραγματοποιείται στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο μόνο η μέτρηση της AFP για ανίχνευση ελαττωμάτων ανοιχτού νευρικού σωλήνα (ONTDs).

Τον Νοέμβριο του 2019 δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα μιας έρευνας σχεδιασμού ενός μοντέλου ενδεχόμενου ελέγχου (contingent screening model) που προτάθηκε από το FMF. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, οι γυναίκες πραγματοποιούν τον cFTS ως έλεγχο πρώτης γραμμής και εάν το αποτέλεσμα τις κατατάξει σε «ενδιάμεσο κίνδυνο» (intermediate risk), ακολουθεί το cffDNA ως έλεγχος δεύτερης γραμμής. Το μοντέλο αυτό αποδείχτηκε οικονομικά αποδοτικό και προσφέρει υψηλό ποσοστό ανίχνευσης (Suciu et al, 2019) ενώ μια άλλη μελέτη απέδειξε ότι με την χρήση του ο αριθμός των περιπτώσεων επεμβατικών διαδικασιών θα μειωνόταν κατά 71% και οι αποβολές θα μειώνονταν περισσότερο από 3 φορές με έως και 3% αύξηση του DR (Prefumo et al, 2019).



Εικόνα 13α: Αλγόριθμος για την επιλογή της κάθε εξέτασης με βάση την κατάταξη της εγκύου. Πηγή: <https://arupconsult.com/algorithm/prenatal-screening-and-diagnosis-algorithm>.



Εικόνα 14β: Αλγόριθμος για την επιλογή της κάθε εξέτασης με βάση την κατάταξη της εγκύου στο 1<sup>ο</sup> και στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο. Πηγή: <https://arupconsult.com/algorithm/prenatal-screening-and-diagnosis-algorithm>.





Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στόχος του προγεννητικού ελέγχου είναι να εντοπίσει τους παράγοντες εκείνους που δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν επιπλοκές στην κύηση και στον τοκετό. Πέραν των ορμονολογικών εξετάσεων και των υπερηχογραφημάτων, πραγματοποιούνται και γενικές εξετάσεις ούρων, μέτρηση της αρτηριακής πίεσης και του βάρους της εγκύου, καμπύλη σακχάρου με χορήγηση γλυκόζης και γυναικολογικές εξετάσεις (επισκόπηση του κόλπου, ψηλάφηση των μαστών, τεστ Παπανικολάου (ΠΑΠ) και καλλιέργεια κολπικοτραχηλικού υγρού). Η επισκόπηση του κόλπου γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή λόγω της κύησης, για να διαπιστωθούν τυχόν ανατομικές ανωμαλίες του κόλπου ή του τραχήλου ενώ η ψηλάφηση των μαστών για την υπέρξη όγκων. Το τεστ ΠΑΠ είναι ιδιαίτερα χρήσιμο διότι κάνει γνωστή την κατάσταση του τραχήλου της μήτρας στην αρχή της εγκυμοσύνης, αφού κατά τη διάρκεια αυτής η μεγάλη αύξηση των ορμονών μπορεί να διαφοροποιήσει την κατάσταση του τραχήλου γρηγορότερα από το συνηθισμένο. Στις πρώτες εβδομάδες της κύησης γίνεται πάντα μια καλλιέργεια κολπικού υγρού για να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια μόλυνση που θα μπορούσε να δημιουργήσει προβλήματα στην εγκυμοσύνη. Γίνεται καλλιέργεια για κοινά μικρόβια, όπως στρεπτόκοκκος ομάδας Β, *Gardnerella vaginalis* κ.α., σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, βλεννόρροια, τριχομονάδες κ.α. καθώς επίσης για χλαμύδια, μυκόπλασμα, ουρεόπλασμα. Τα μικρόβια μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στην εγκυμοσύνη, όπως ρήξη υμένων, πρόωρο τοκετό και μόλυνση εμβρύου. Σε περίπτωση μόλυνσης δίνεται η ανάλογη θεραπεία και επαναλαμβάνεται η καλλιέργεια μετά το τέλος της. Η καλλιέργεια κολπικού υγρού επαναλαμβάνεται κατά τον όγδοο μήνα για να γίνει διερεύνηση τυχόν μικροβίων που θα μπορούσαν να μολύνουν το έμβρυο κατά τον τοκετό (Αρμενιάκος, 2008).

Τα τελευταία χρόνια, το cfDNA, εκτός από την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών, χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση προεκλαμψίας σε πρώιμο στάδιο της εγκυμοσύνης ενώ στο προσκήνιο έχει έρθει και η μέτρηση της PLGF για τον ίδιο σκοπό. Ακόμα, για τον έλεγχο της προεκλαμψίας μελετάται η χρήση ορισμένων πρωτεϊνών στο μητρικό αίμα, οι οποίες μπορεί να αποτελέσουν δυνητικούς βιοδείκτες.



## Συζήτηση

Μια συζήτηση σχετικά με τους κινδύνους, τα οφέλη και τις εναλλακτικές λύσεις των διαφόρων μεθόδων προγεννητικού ελέγχου και των διαγνωστικών εξετάσεων, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής για καμία εξέταση, θα πρέπει να γίνεται σε όλες τις εγκύους. Μια τέτοια συζήτηση θα πρέπει να περιλαμβάνει τη σκοπιμότητα και την εφαρμογή του cffDNA και άλλων δοκιμών διαλογής καθώς και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, με βάση την κατηγοριοποίηση του κινδύνου της εκάστοτε εγκύου. Παρόλο που οποιαδήποτε γυναίκα μπορεί να επιλέξει την ανάλυση του cffDNA ως δοκιμασία διαλογής για κοινές ανευπλοειδίες ανεξάρτητα από την κατάσταση κινδύνου, θα πρέπει να κατανοήσει τους περιορισμούς και τα οφέλη αυτού του προτύπου ελέγχου στο πλαίσιο εναλλακτικών επιλογών διαλογής και διαγνωστικής. Με βάση τις επιδόσεις των συμβατικών μεθόδων διαλογής, οι περιορισμοί του cffDNA όπως και τα περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας στον μαιευτικό πληθυσμό χαμηλού κινδύνου, οι πρώτες παραμένουν μέχρι στιγμής η καταλληλότερη επιλογή για τον έλεγχο πρώτης γραμμής για τις περισσότερες γυναίκες στο γενικό πληθυσμό.

Η τεχνολογία της ανίχνευσης του cffDNA και η εφαρμογή της στον προγεννητικό έλεγχο της ανευπλοειδίας είναι ένα ταχέως μεταβαλλόμενο πεδίο. Επομένως, τυχόν συστάσεις σχετικά με τη χρήση του στην εξέταση θα εξελιχθούν πιθανότατα γρήγορα. Είναι ζωτικής σημασίας να παραμείνουν οι επαγγελματίες ενήμεροι αυτής της εξελισσόμενης τεχνολογίας ώστε να παρέχουν στους ασθενείς τις πιο αποτελεσματικές, ακριβείς και οικονομικές μεθόδους ανίχνευσης ανευπλοειδίας (Committee on Genetics, 2015).



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



- Beulen, L., Faas, B. H. W., Feenstra, I., van Vugt, J. M. G., & Bekker, M. N. (2017). *Clinical utility of non-invasive prenatal testing in pregnancies with ultrasound anomalies*. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 49(6), 721–728.
- Bhide, A. & Thilaganathan, B. (2004). *Recent advances in the management of placenta previa*. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 16(6): 447–51.
- Bianchi DW, Wilkins-Haug LE, Enders AC, Hay ED. (1993). *Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans*. *Am J Med Genet*, 46(5):542–50.
- <sup>1</sup>Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP. (2012). *Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing*. *Obstet Gynecol*, 119, 890–901.
- <sup>2</sup>Bianchi, D. W., Sehnert, A. J., & Rava, R. P. (2012). *Genome-Wide Fetal Aneuploidy Detection by Maternal Plasma DNA Sequencing*. *Obstetrics & Gynecology*, 119(6), 1270–1271.
- <sup>1</sup>Bianchi, D. W., Lamar Parker, R., Wentworth, J., Madankumar, R., Saffer, C., Das, A. F., Sehnert, A. J. (2014). *DNA Sequencing Versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening*. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 69(6), 319–321.
- <sup>2</sup>Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, (2014). *DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening*. *New England Journal of Medicine*, 371(6), 577–578.
- Bianchi, D. W., Parsa, S., Bhatt, S., Halks-Miller, M., Kurtzman, K., Sehnert, A. J., & Swanson, A. (2015). *Fetal Sex Chromosome Testing by Maternal Plasma DNA Sequencing*. *Obstetrics & Gynecology*, 125(2), 375–382.
- Boada R, Janusz J, Hutaff-Lee C, Tartaglia N. (2009). *The cognitive phenotype in Klinefelter syndrome: a review of the literature including genetic and hormonal factors*. *Dev Disabil Res Rev*, 15(4):284-94.
- Boon E.M.J.& Faas B.H.W. (2013). *Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies*. *Prenatal Diagnosis*, 33:563–568.
- Bottomley, C., & Bourne, T. (2009). *Diagnosing miscarriage*. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 23(4), 463–477.
- Brison, N., van den Bogaert, K., Dehaspe, L., van den Oever, J. M. E., Janssens, K., Blaumeiser, B., Vermeesch, J. R. (2017). *Accuracy and Clinical Value of Maternal Incidental Findings During Noninvasive Prenatal Testing for Fetal Aneuploidies*. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 72(8), 469–470.
- Buiting K., Saitoh S., Gross S., Dittrich B., Schwartz, S; Nicholls, RD; Horsthemke, B. (1995). *Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 1*. *Nature Genetics*, 9 (4): 395–400.
- Bull MJ. (2011). *Health supervision for children with Down syndrome*. *Pediatrics*, 128:393–406.
- Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. (2013). *The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies*. *Prenatal Diagnosis*, 33:667-74.
- Cereda A., & Carey J. (2012). *The trisomy 18 syndrome*. *Orphanet J Rare Dis*. 7:81.





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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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





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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Flowers, N., Kelley, J., Sigurjonsson, S., Bruno, D. L., & Pertile, M. D. (2015). *Maternal mosaicism for a large segmental duplication of 18q as a secondary finding following non-invasive prenatal testing and implications for test accuracy*. Prenatal Diagnosis, 35(10), 986–989.



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

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

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

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

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

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

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

Gil, M. M., Quezada, M. S., Revello, R., Akolekar, R., & Nicolaides, K. H. (2015). *Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45(3), 249–266.

Go AT, Visser A, van Dijk M, Mulders MA, Eijk P, Ylstra B, Blankenstein MA, van Vugt JM, Oudejans CB. (2008). *A novel method to identify syncytiotrophoblast-derived RNA products representative of trisomy 21 placental RNA in maternal plasma*. *Methods Mol Biol*, 444:291–302.

Goldwaser T., & Klugman S. (2018). *Cell-free DNA for the detection of fetal aneuploidy*. *Fertility and Sterility*, 109(2):195-200.

Goodfellow LR, Batra G, Hall V, McHale E, Heazell AE. (2011). *A case of confined placental mosaicism with double trisomy associated with stillbirth*. *Placenta*, 32:699–703.

Grande, M., Arigita, M., Borobio, V., Jimenez, J. M., Fernandez, S., Borrell, A. (2012). *First-trimester detection of structural abnormalities and the role of aneuploidy markers*. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 39(2), 157–63.

Grande, M., Jansen, F. A. R., Blumenfeld, Y. J., Fisher, A., Odibo, A. O., Haak, M. C., & Borrell, A. (2015). *Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: a systematic review and meta-analysis*. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 46(6), 650–658.

Grati, F. R., Bajaj, K., Malvestiti, F., Agrati, C., Grimi, B., Malvestiti, B., Ferreira, J. C. P. (2015). *The type of fetoplacental aneuploidy detected by cfDNA testing may*



*influence the choice of confirmatory diagnostic procedure.* Prenatal Diagnosis, 35(10), 994–998.

Grati, F. R., Malvestiti, F., Ferreira, J. C. P. B., Bajaj, K., Gaetani, E., Agrati, C., Simoni, G. (2014). *Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results.* Genetics in Medicine, 16(8), 620–624.

Gregg AR, Gross SJ, Best RG, et al. (2013). *ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy.* Genetics in Medicine, 15(5):395–398.

Gregg, A. R., Skotko, B. G., Benkendorf, J. L., Monaghan, K. G., Bajaj, K., Watson, M. S. (2016). *Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics.* Genetics in Medicine, 18(10), 1056–1065.

Gross, S. J., Stosic, M., McDonald-McGinn, D. M., Bassett, A. S., Norvez, A., Dhamankar, R., Benn, P. (2016). *Clinical experience with single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal screening for 22q11.2 deletion syndrome.* Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 47(2), 177–183.

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

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

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

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

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

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

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

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

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





- Huijsdens-van Amsterdam, K., Page-Christiaens, L., Flowers, N., Bonifacio, M. D., Ellis, K. M. B., Vogel, I., Pertile, M. D. (2018). *Isochromosome 21q is overrepresented among false-negative cell-free DNA prenatal screening results involving Down syndrome*. European Journal of Human Genetics.
- Johnson, J. M., Chauhan, S. P., Ennen, C. S., Niederhauser, A., & Magann, E. F. (2007). *A comparison of 3 criteria of oligohydramnios in identifying peripartum complications: a secondary analysis*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 197(2), 207.e1–207.e8.
- Kagan, K. O., Hoopmann, M., Singer, S., Schaeferhoff, K., Dufke, A., & Mau-Holzmann, U. A. (2016). *Discordance between ultrasound and cell free DNA screening for monosomy X*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 294(2), 219–224.
- Kalousek DK, Barrett IJ, McGillivray BC. (1989). *Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18*. Am J Hum Genet, 44: 338–343.
- Kaseniit KE, Hogan GJ, D'Auria KM, Haverty C, Muzzey D. (2018). *Strategies to minimize false positives and interpret novel microdeletions based on maternal copy-number variants in 87,000 noninvasive prenatal screens*. BMC Med Genomics, 19;11(1):90.
- Killeen, A. (2004). *Genetic Inheritance. Principles of Molecular Pathology*. Humana Press. p. 41.
- Kinnings, S. L., Geis, J. A., Almasri, E., Wang, H., Guan, X., McCullough, R. M., Deciu, C. (2015). *Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing*. Prenatal Diagnosis, 35(8), 816–822.
- Kirbas A., Daglar K., Danisman N. (2016). *Non-Invasive Prenatal Testing for Aneuploidy: A Review of the Literature*. Medicine Science, 5:195-209.
- Kolialexi, A., Tsangaris, G. T., Sifakis, S., Gourgiotis, D., Katsafadou, A., Lykoudi, A., Papantoniou, N. (2017). *Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early-onset preeclampsia*. Expert Review of Proteomics, 14(3), 269–276.
- Kunwoo, K. (2015). *Advantages of the single nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test*. J Genet Med, 12(2):66-71.
- Langlois, S., & Brock, J-A. (2013). *Current status in non-invasive prenatal detection of Down syndrome, trisomy 18, and trisomy 13 using cell-free DNA in maternal plasma*. J Obstet Gynaecol Can, 35: 177–181.
- Lau, T. K., Chan, M. K., Salome Lo, P. S., Connie Chan, H. Y., Kim Chan, W. S., Koo, T. Y., Pooh, R. K. (2012). *Clinical utility of noninvasive fetal trisomy (NIFTY) test – early experience*. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 25(10), 1856–1859.
- Lau, T. K., Cheung, S. W., Lo, P. S. S., Pursley, A. N., Chan, M. K., Jiang, F., Choy, K. W. (2014). *Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA: review of 1982 consecutive cases in a single center*. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 43(3), 254–264.



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

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

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

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

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

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

<sup>1</sup>Lo, Y. M. D., Tsui, N. B. Y., Chiu, R. W. K., Lau, T. K., Leung, T. N., Heung, M. M. S., Ding, C. (2007). *Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection*. Nature Medicine, 13(2), 218–223.

<sup>2</sup>Lo, Y. M. D., Lun, F. M. F., Chan, K. C. A., Tsui, N. B. Y., Chong, K. C., Lau, T. K., Chiu, R. W. K. (2007). *Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(32), 13116–13121.

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

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

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

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

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

Maynard TM, Meechan DW, Dudevoir ML, Gopalakrishna D, Peters AZ, Heindel CC, Sugimoto TJ, Wu Y, Lieberman JA, Lamantia AS. (2008). *Mitochondrial localization*





*and function of a subset of 22q11 deletion syndrome candidate genes.* Mol. Cell. Neurosci, 39(3):439–51.

McKanna, T., Ryan, A., Krinshpun, S., Kareht, S., Marchand, K., Grabarits, C., Benn, P. (2018). *Fetal fraction-based risk algorithm for non-invasive prenatal testing: screening for trisomy 13, 18, and triploidy in women with low cell-free fetal DNA.* Ultrasound in Obstetrics & Gynecology.

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

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

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

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

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

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

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

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

Norton, M. E., Jacobsson, B., Swamy, G. K., Laurent, L. C., Ranzini, A. C., Brar, H., Wapner, R. J. (2015). *Cell-Free DNA Analysis for Noninvasive Examination of Trisomy.* Obstetrical & Gynecological Survey, 70(8), 483–484.

Norwitz ER, & Levy B. (2013). *Noninvasive prenatal testing: the future is now.* Reviews in Obstetrics and Gynecology, 6(2):48–62.

Norwitz, E. R., McNeill, G., Kalyan, A., Rivers, E., Ahmed, E., Meng, L., Hedriana, H. L. (2019). *Validation of a Single-Nucleotide Polymorphism-Based Non-Invasive Prenatal Test in Twin Gestations: Determination of Zygosity, Individual Fetal Sex, and Fetal Aneuploidy.* Journal of Clinical Medicine, 8(7), 937.

Oepkes, D., Yaron, Y., Kozlowski, P., Rego de Sousa, M. J., Bartha, J. L., van den Akker, E. S., Tabor, A. (2014). *Counseling for non-invasive prenatal testing (NIPT):*



*what pregnant women may want to know.* Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 44(1), 1–5.

Old, R. W., Crea, F., Puszyk, W., & Hultén, M. A. (2007). *Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome.* Reproductive BioMedicine Online, 15(2), 227–23..

Osborne M, Hardisty E, Devers P, Kaiser-Rogers K, Hayden MA, Goodnight W, Vora NL. (2013). *Discordant non-invasive testing results in a patient subsequently diagnosed with metastatic disease.* Prenatal Diagnosis, 33: 609–611.

Oskarsdóttir S, Vujic M, Fasth A. (2004). *Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden.* Arch. Dis. Child, 89(2):148–51.

Palomaki G. E., Kloza E. M., Lambert-Messerlian G. M., van den Boom D., Ehrich M., Deciu C., Bombard A. T., Haddow J. E., (2015). *Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative?* Prenatal Diagnosis, 35:289-293.

Palomaki, G. E., Deciu, C., Kloza, E. M., Lambert-Messerlian, G. M., Haddow, J. E., Neveux, L. M., Canick, J. A. (2012). *DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study.* Genetics in Medicine, 14(3), 296–305.

Palomaki, G. E., Kloza, E. M., Lambert-Messerlian, G. M., Haddow, J. E., Neveux, L. M., Ehrich, M., Canick, J. A. (2011). *DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study.* Genetics in Medicine, 13(11), 913–920.

Papageorgiou, E. A., Karagrigoriou, A., Tsaliki, E., Velissariou, V., Carter, N. P., & Patsalis, P. C. (2011). *Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21.* Nature Medicine, 17(4), 510–513.

<sup>1</sup>Papaioannou GKI, Syngelaki A, Maiz N, Ross JA, Nicolaidis KH. (2011). *Sonographic markers of aneuploidies at 6-10 weeks of gestation.* Early Human Development. 87(7):453-6.

<sup>2</sup>Papaioannou, G.I., Syngelaki, A., Maiz, N., Ross, J.A., & Nicolaidis, K.H. (2011). *Ultrasonographic prediction of early miscarriage.* Human Reproduction, 26(7):1685–1692.

Park, F., Russo, K., Williams, P., Pelosi, M., Puddephatt, R., Walter, M., Leung, C., Saaid, R., Rawashdeh, H., Ogle, R. and Hyett, J. (2015), *Prediction and prevention of early-onset pre-eclampsia: impact of aspirin after first-trimester screening.* Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 46: 419–423.

Parker, S. E., Mai, C. T., Canfield, M. A., Rickard, R., Wang, Y., Meyer, R. E. (2010). *Updated national birth prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004-2006.* Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology, 88(12), 1008–1016.

Peters, D., Chu, T., Yatsenko, S. A., Hendrix, N., Hogge, W. A., Surti, U., Rajkovic, A. (2011). *Noninvasive Prenatal Diagnosis of a Fetal Microdeletion Syndrome.* New England Journal of Medicine, 365(19), 1847–1848.

Petersen, O. B., Vogel, I., Ekelund, C., Hyett, J., & Tabor, A. (2014). *Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: population-based*



*study from a country with existing first-trimester screening.* Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 43(3), 265–271.

Petrozella, L. N., Dashe, J. S., McIntire, D. D., & Leveno, K. J. (2011). *Clinical Significance of Borderline Amniotic Fluid Index and Oligohydramnios in Preterm Pregnancy.* Obstetrics & Gynecology, 117(2, Part 1), 338–342.

Poon LC, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH. (2013). *Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes.* Fetal Diagnosis and Therapy, 33:215–23.

Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Chow KC, Lo YMD. (2002). *Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma.* Clinical Chemistry, 48: 35–41.

Prefumo, F., Paolini, D., Speranza, G., Palmisano, M., Dionisi, M., & Camurri, L. (2019). *The contingent use of cell-free fetal DNA for prenatal screening of trisomies 21, 18, 13 in pregnant women within a national health service: A budget impact analysis.* PLOS ONE, 14(6), e0218166.

Provider Handbook, (2009). *The California Prenatal Screening Program.*

Qiao, L., Zhang, Q., Liang, Y., Gao, A., Ding, Y., Zhao, N., Zhang, W., Li, H., Wang, T. (2019). *Sequencing of short cfDNA fragments in NIPT improves fetal fraction with higher maternal BMI and early gestational age.* American Journal of Translational Research, 11(7):4450-4459.

Qu JZ, Leung TY, Jiang P, Liao GJ, Cheng YK, Sun H, Chiu RW, Chan KC, Lo YM. (2013). *Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis.* Clinical Chemistry, 59(2):427-35.

Rava R.P., Srinivasan A., Sehnert A.J., Bianchi D.W. (2014). *Circulating Fetal Cell-Free DNA Fractions Differ in Autosomal Aneuploidies and Monosomy X.* Clinical Chemistry, 60(1):43–250.

Redaelli S, Sala E, Roncaglia N, Colombo C, Crosti F, Villa N, et al. (2005). *Severe intrauterine growth restriction and trisomy 15 confined placental mosaicism: a case report and review of literature.* Prenatal Diagnosis, 25:140–7.

Revello R., Sarno L., Ispas A., Akolekar R., Nicolaides K.H., (2016). *Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result.* Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 47, 698-704.

Robinson DO, & Jacobs PA. (1999). *The origin of the extra Y chromosome in males with a 47,XYY karyotype.* Hum Mol Genet. 8(12):2205-9.

Robinson WP, Barrett IJ, Bernard L, Telenius A, Bernasconi F, Wilson RD, Best, R. (1997). *Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction.* American Journal of Human Genetics, 60:917–27.

Rolnik DL, Yong Y, Lee TJ, Tse C, McLennan AC, da Silva Costa F. (2018). *Influence of Body Mass Index on Fetal Fraction Increase With Gestation and Cell-Free DNA Test Failure.* Obstet Gynecol, 132(2):436-443.



- Sacco, A., Hewitt, H., & Pandya, P. (2019). *Women's choices in non-invasive prenatal testing for aneuploidy screening: results from a single centre prior to introduction in England*. Archives of Disease in Childhood, archdischild-2019-317031.
- Samango-Sprouse, C., Banjevic, M., Ryan, A., Sigurjonsson, S., Zimmermann, B., Hill, M., Rabinowitz, M. (2013). *SNP-based non-invasive prenatal testing detects sex chromosome aneuploidies with high accuracy*. Prenatal Diagnosis, 33(7), 643–649.
- Sarno, L., Revello, R., Hanson, E., Akolekar, R., & Nicolaides, K. H. (2016). *Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy*. Ultrasound Obstet Gynecol, 47(6):705–711.
- Schuring-Blom, H., Lichtenbelt, K., van Galen, K., Elferink, M., Weiss, M., Vermeesch, J. R., & Page-Christiaens, L. (2016). *Maternal vitamin B12 deficiency and abnormal cell-free DNA results in pregnancy*. Prenatal Diagnosis, 36(8), 790–793.
- Schwaederle, M., Husain, H., Fanta, P. T., Piccioni, D. E., Kesari, S., Schwab, R. B., Kurzrock, R. (2016). *Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor cell DNA assay*. Oncotarget, 7(9):9707–17.
- Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J, Rava R. (2011). *Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood*. Clinical Chemistry, 57,1042–1049.
- Seval M., Karabulut H., Tükün A, Koç A. (2015). *Cell free fetal DNA in the plasma of pregnant women with preeclampsia*. Clin Exp Obstet Gynecol, 42(6):787-91.
- Shaw, J. L. V., Diamandis, E. P., Horne, A. W., Barnhart, K., Bourne, T., & Messinis, I. E. (2012). *Ectopic Pregnancy*. Clinical Chemistry, 58(9), 1278–1285.
- Sheth, F., Gohel, N., Liehr, T., Akinde, O., Desai, M., Adeteye, O., & Sheth, J. (2012). *Gain of Chromosome 4qter and Loss of 5pter: An Unusual Case with Features of Cri du Chat Syndrome*. Case Reports in Genetics, 2012, 1–4.
- Sholl, JS: (1987). *Abruptio placentae: Clinical management in non-acute cases*. Am J Obstet Gynecol, 156:40.
- Shubina, J., Trofimov, D. Y., Barkov, I. Y., Stupko, O. K., Goltsov, A. Y., Mukosey, I. S., Sukhikh, G. T. (2017). *In silico size selection is effective in reducing false positive NIPS cases of monosomy X that are due to maternal mosaic monosomy X*. Prenatal Diagnosis, 37(13), 1305–1310.
- Sigafoos J., O'Reilly M. & Lancioni G. (2009), *Cri-du-chat, Developmental Neurorehabilitation*.
- Simon AL, Su B, Demko Z, Rabinowitz M, Harmon ER, Gross SJ. (2015). *Detection of complete molar pregnancy by single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal testing*. Ultrasound Obstet Gynecol, 46:506-7.
- Simoni, G., Brambati, B., Danesino, C., Rossella, F., Terzoli, G. L., Ferrari, M., & Fraccaro, M. (1983). *Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy*. Human Genetics, 63(4), 349–357.





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

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

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

<sup>1</sup>Snyder, M. W., Simmons, L. E., Kitzman, J. O., Coe, B. P., Henson, J. M., Daza, R. M., Gammill, H. S. (2015). *Copy-Number Variation and False Positive Prenatal Aneuploidy Screening Results*. New England Journal of Medicine, 372(17), 1639–1645.

<sup>2</sup>Snyder MW, Gammill HS, Shendure J. (2015). *Copy-number variation and false positive results of prenatal screening*. N Engl J Med, 373(26):2585.

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

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

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

<sup>1</sup>Sparks, A. B., Struble, C. A., Wang, E. T., Song, K., & Oliphant, A. (2012). *Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 206(4), 319.e1–319.e9.

<sup>2</sup>Sparks, A. B., Wang, E. T., Struble, C. A., Barrett, W., Stokowski, R., McBride, C., Oliphant, A. (2012). *Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy*. Prenatal Diagnosis, 32(1), 3–9.

Stochholm, K., Juul, S., Juel, K., Naeraa, R. W., & Højbjerg Gravholt, C. (2006). *Prevalence, Incidence, Diagnostic Delay, and Mortality in Turner Syndrome*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 91(10), 3897–3902.

Struble C. A., Syngelaki A., Oliphant A., Song K., Nicolaidis K.H., (2014). *Fetal fraction estimate in twin pregnancies using directed cell-free DNA analysis*. Fetal Diagnosis and Therapy, 35, 199-203.

Suciu, I., Galeva, S., Abdel Azim, S., Pop, L., & Toader. (2019). *First-trimester screening-biomarkers and cell-free DNA*. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 1–171.

Suo, F., Wang, C., Liu, T., Fang, Y., Wu, Q., Gu, M., & Gou, L. (2018). *Non-invasive prenatal testing in detecting sex chromosome aneuploidy: A large-scale study in Xuzhou area of China*. Clinica Chimica Acta, 481, 139–141.



Swillen A, Vogels A, Devriendt K, Fryns JP. (2000). *Chromosome 22q11 deletion syndrome: update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications*. Am. J. Med. Genet, 97 (2): 128–35.

Syngelaki, A., Pergament, E., Homfray, T., Akolekar, R., & Nicolaides, K. H. (2014). *Replacing the Combined Test by Cell-Free DNA Testing in Screening for Trisomies 21, 18 and 13: Impact on the Diagnosis of Other Chromosomal Abnormalities*. Fetal Diagnosis and Therapy, 35(3), 174–184.

Tang KL, Antshel KM, Fremont WP, Kates WR. (2015). *Behavioral and Psychiatric Phenotypes in 22q11.2 Deletion Syndrome*. J Dev Behav Pediatr, 36 (8):639–50.

Tartaglia NR, Ayari N, Hutaff-Lee C, Boada R. (2012). *Attention- deficit hyperactivity disorder symptoms in children and adolescents with sex chromosome aneuploidy: XXY, XXX, XYY, and XYY*. J Dev Behav Pediatr. (33):309–318.

Tartaglia, NR; Howell, S; Sutherland, A; Wilson, R; Wilson, L (2010). *A review of trisomy X (47,XXX)*. Orphanet Journal of Rare Diseases. 5:8.

Taylor-Phillips, S., Freeman, K., Geppert, J., Agbebiyi, A., Uthman, O. A., Madan, J., Clarke, A. (2016). *Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis*. BMJ Open, 6(1), e010002.

Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I. Gibbs, P. (2016). *Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer*. Science Translational Medicine, 8(346), 346ra92–346ra92.

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

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

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

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

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

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

Van Opstal, D., Srebniak, M. I., Polak, J., de Vries, F., Govaerts, L. C. P., Joosten, M., Galjaard, R.-J. H. (2016). *False Negative NIPT Results: Risk Figures for*





*Chromosomes 13, 18 and 21 Based on Chorionic Villi Results in 5967 Cases and Literature Review.* PLOS ONE, 11(1), e0146794.

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

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

<sup>1</sup>Wang, Y., Chen, Y., Tian, F., Zhang, J., Song, Z., Wu, Y., Cheng, W. (2013). *Maternal Mosaicism Is a Significant Contributor to Discordant Sex Chromosomal Aneuploidies Associated with Noninvasive Prenatal Testing.* Clinical Chemistry, 60(1), 251–259.

<sup>2</sup>Wang, E., Batey, A., Struble, C., Musci, T., Song, K., & Oliphant, A. (2013). *Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma.* Prenatal Diagnosis, 33(7), 662–666.

Wang, S., Huang, S., Ma, L., Liang, L., Zhang, J., & Cram, D. S. (2015). *Maternal X chromosome copy number variations are associated with discordant fetal sex chromosome aneuploidies detected by noninvasive prenatal testing.* Clinica Chimica Acta, 444, 113–116.

Wang, Y., Liu, X., Zhou, L., Duong, D., Bhuripanyo, K., Zhao, B., Yin, J. (2017). *Identifying the ubiquitination targets of E6AP by orthogonal ubiquitin transfer.* Nature Communications, 8(1).

Wapner, R. J., Martin, C. L., Levy, B., Ballif, B. C., Eng, C. M., Zachary, J. M., Jackson, L. (2013). *Chromosomal Microarray Versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis.* Obstetrical & Gynecological Survey, 68(4), 276–278.

Warren, W. B., Patrick, S. L., & Goland, R. S. (1992). *Elevated maternal plasma corticotropin-releasing hormone levels in pregnancies complicated by preterm labor.* Am J Obstet Gynecol, 166(4):1198–1207.

Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., & Schübeler, D. (2005). *Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells.* Nature Genetics, 37(8), 853–862.

Weeber E, Levenson J, Sweatt J (2002). *Molecular genetics of human cognition.* Mol Interv. 2 (6):376–91, 339.

Whitworth, M., Bricker, L., Neilson, J. P., & Dowswell, T. (2010). *Ultrasound for fetal assessment in early pregnancy.* Cochrane Database of Systematic Reviews. (4): CD007058.

Wilson KL, Czerwinski JL, Hoskovec JM, Noblin SJ, Sullivan CM, Harbison A, Champion MW, Devary K, Devers P, Singletary CN. (2013). *NSGC practice guideline: prenatal screening and diagnostic testing options for chromosome aneuploidy.* J Genet Couns, 22: 4–15.

Wolstenholme, J. (1996). *Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization.* Prenatal Diagnosis, 16(6):511–24.



Wulff, C. B., Gerds, T. A., Rode, L., Ekelund, C. K., Petersen, O. B., & Tabor, A. (2016). *Risk of fetal loss associated with invasive testing following combined first-trimester screening for Down syndrome: a national cohort of 147 987 singleton pregnancies*. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 47(1), 38–44.

Yaron Y. (2016). *The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon*. *Prenatal Diagnosis*, 36(5):391-6.

Yu, B., Lu, B.-Y., Zhang, B., Zhang, X.-Q., Chen, Y.-P., Zhou, Q., Wang, H.-Y. (2017). *Overall evaluation of the clinical value of prenatal screening for fetal-free DNA in maternal blood*. *Medicine*, 96(27), e7114.

Yu, S. C. Y., Chan, K. C. A., Zheng, Y. W. L., Jiang, P., Liao, G. J. W., Sun, H., Lo, Y. M. D. (2014). *Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23), 8583–8588.

Yu, S. C. Y., Jiang, P., Choy, K. W., Chan, K. C. A., Won, H.-S., Leung, W. C., Chiu, R. W. K. (2013). *Noninvasive Prenatal Molecular Karyotyping from Maternal Plasma*. *PLoS ONE*, 8(4), e60968.

Zaragoza, E., Akolekar, R., Poon, L. C. Y., Pepes, S., & Nicolaides, K.H. *Maternal serum placental growth factor at 11-13 weeks in chromosomally abnormal pregnancies*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2009;33:382 – 386.

Zhang, H., Gao, Y., Jiang, F., Fu, M., Yuan, Y., Guo, Y., Wang, W. (2015). *Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146 958 pregnancies*. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 45(5), 530–538.

Zhao C. (2015). *Detection of fetal subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma*. *Clinical Chemistry*, 61(4):608-16.

Zheng Y., Wan S., Dang Y., Song, T., Chen, B., Zhang, J. (2019). *Non-invasive prenatal testing for detection of trisomy 13, 18, 21 and sex chromosome aneuploidies in 8594 cases*. *Ginekologia Polska*, 90(5):270-273.

Zhou, X., Sui, L., Xu, Y., Song, Y., Qi, Q., Zhang, J., Liu, J. (2017). *Contribution of maternal copy number variations to false-positive fetal trisomies detected by noninvasive prenatal testing*. *Prenatal Diagnosis*, 37(4), 318–322.

Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S. (2005). *Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma*. *Clinical Chemistry*, 51:1598–604.

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



## Διαδικτυακή βιβλιογραφία

- Beloosesky, R. & Ross, MG. (2019). *Oligohydramnios*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://www.uptodate.com/contents/oligohydramnios/> [Πρόσβαση: 23 Δεκ. 2019].
- Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development. (2012). *How many people are affected by or at risk for Klinefelter syndrome (KS)?* [online] Διαθέσιμο στο: <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/klinefelter/conditioninfo/risk/> [Πρόσβαση: 1 Οκτ. 2019].
- Geneplanet.com, (2018). *NIPT*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://geneplanet.com/nipt/> [Πρόσβαση: 28 Δεκ. 2019].
- Genetics Home Reference. (2013). *22q11.2 deletion syndrome*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/22q112-deletion-syndrome> [Πρόσβαση: 19 Αυγ. 2019].
- Genetics Home Reference. (2014). *Prader-Willi syndrome*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/prader-willi-syndrome> [Πρόσβαση: 20 Αυγ. 2019].
- Genetics Home Reference. (2015). *Angelman syndrome*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/angelman-syndrome> [Πρόσβαση: 20 Αυγ. 2019].
- Myriadwomenshealth.com, (2017). *Myriad Prequel™ Prenatal Screen*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://myriadwomenshealth.com/provider/prequel-prenatal-screen/> [Πρόσβαση: 29 Δεκ. 2019].
- Natera.com, (2013). *Panorama Test*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://www.natera.com/panorama-test/clinical-information> [Πρόσβαση: 28 Δεκ. 2019].
- OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man. (2001). *Prader-Willi Syndrome; PWS - 17627*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://www.omim.org/clinicalSynopsis/176270> [Πρόσβαση: 20 Αυγ. 2019].
- Progenity.com, (2017). *Innata® Prenatal Screen*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://www.progenity.com/tests/innata/> [Πρόσβαση: 29 Δεκ. 2019].
- Swartz, M. (2014). *Textbook of physical diagnosis, history and examination*. 7th ed. [ebook] 3(20):660-662. Διαθέσιμο στο: <https://books.google.gr/> [Πρόσβαση: 20 Δεκ. 2019].
- UK National Screening Committee, (2015). *Frequently asked questions – cell free fetal DNA (cffDNA) testing for Down’s syndrome and other trisomies*. Διαθέσιμο στο: [www.screening.nhs.uk/criteria](http://www.screening.nhs.uk/criteria) [Πρόσβαση: 4 Ιαν. 2020].
- Vcgs.org.au, (2015). *Percept™- Prenatal Test*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://www.vcgs.org.au/tests/perceptnipt> [Πρόσβαση: 29 Δεκ. 2019].



Yourgene-health.com, (2013). *The IONA® test: The advanced NIPT solution for clinical laboratories*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://www.yourgene-health.com/for-clinical-laboratories/clinical-labs-overview> [Πρόσβαση: 28 Δεκ. 2019].

Αρμενιάκος, Α. (2008). *Εγκυμοσύνη: Εξετάσεις α' τριμήνου*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://www.iatronet.gr/ygeia/maieftiki-egkymosyni/article/3971/egkymosyni-exetaseis-a-triminoy.html> [Πρόσβαση: 30 Ιαν. 2020].

Γκατζούνης, Θ. (2008). *Προγεννητικός έλεγχος*. [online] Διαθέσιμο στο: [https://efzein.blogspot.com/2008/11/blog-post\\_15.html](https://efzein.blogspot.com/2008/11/blog-post_15.html) [Πρόσβαση: 21 Ιαν. 2020].

Γρυπάρης, Ι. (2019). *Υπερηχογράφημα Γ' Τριμήνου – Doppler*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://maternacare.gr/klinikes-plhrofories/progennhtikos-elegchos/doppler/> [Πρόσβαση: 20 Σεπτ. 2019].

Μεταξάς, Η. (2012). *Σακχαρώδης διαβήτης εγκυμοσύνης*. [online] Διαθέσιμο στο: <http://www.drmetaxas.gr/> [Πρόσβαση: 22 Δεκ. 2019].

Σίμου, Μ. (2017). *Υπερηχογράφημα Ανάπτυξης / Doppler*. [online] Διαθέσιμο στο: <https://embryoplus.gr/> [Πρόσβαση: 20 Σεπτ. 2019].

Στελλάτος Π. (2018). *Ενδοκρινολογικά Νοσήματα- Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης*. [pdf] Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής. Διαθέσιμο στο: <http://ir.lib.uth.gr/> [Πρόσβαση: 18 Δεκ. 2019].

Τσιγκρής Α. (2014). *Γιατί παθαίνω συχνές αποβολές; Τι φταίει;* [online] Διαθέσιμο στο: <https://www.iatropedia.gr/ygeia/giati-patheno-sichnes-apovoles-ti-ftei/35911/> [Πρόσβαση: 19 Δεκ. 2019].

## Ελληνική Βιβλιογραφία

Γόννη Χ. (2016). *Επιπλοκές κύησης και νοσηλευτικές παρεμβάσεις*. Πάτρα, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Δυτικής Ελλάδας, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Νοσηλευτικής.

Λούβρου Φ. (2009). *Φυσικοθεραπεία στη μαιευτική, επιπλοκές και προβλήματα κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης και μετά. Θεραπεία και Αντιμετώπιση*. Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης.

Μπρόζου Μ. (2017). *Χρησιμοποίηση της PLGF και u/s δεικτών για την ανίχνευση κυήσεων υψηλού κινδύνου για Προεκλαμψία / IUGR το 1<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης*. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή.

Χατζησεβαστού-Λουκίδου Χ. (2002). *Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος από εμβρυϊκά κύτταρα και ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στο αίμα της μητέρας*. Παιδιατρική Βορείου Ελλάδος. 14:372-381.



## Poster

Partum Post (2019). *Why NIPT is not a diagnostic test*. Victorian Clinical Genetics Services, 3(2).

Pertile, M., Charles, T., Burgess, T. (2017). NIPT: twins, triplets & co-demise. Victorian Clinical Genetics Services, 1(2)

Wardrop J., Caldwell S., Boomer T., Almasri E., McCullough R. (2018). Whose Y is it anyway? Transplants and NIPT II.

Σαλαμαλέκης Ε. (2013). Πρόωρος τοκετός: Έλεγχος και παρακολούθηση. Β' Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Αρεταίειο Νοσοκομείο.

Χιντιπάς, Η. (2012). *Προεκλαμψία στην εγκυμοσύνη*. Ιατρικός Κόσμος.

Μεντζελοπούλου Π. (2011). *Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης: Τα νέα δεδομένα*. Ιατρικός Κόσμος.