

Uus võimalus sünnieelseks loote kromosoomihaiguste sõeluuringuks – loote rakuvaba DNA määramine ema verest

Eva-Liina Ustav¹

Eesti Arst 2015;
94(6):352–357

Saabunud toimetusse:
23.03.2015
Avaldamiseks vastu võetud:
20.04.2015
Avaldatud internetis:
30.06.2015

¹ TÜ Kliinikumi naistekliinik

Kirjavahetajaautor:
Eva-Liina Ustav
eva-liina.ustav@kliinikum.ee

Võtmesõnad:
trisoomia, Downi sündroom,
sõeltest, NIPT, loote
rakuvaba DNA

Tänapäeval on rasedate kromosoomihaiguste skriiningus rutiinselt kasutusel esimese trimestri kombineeritud sõeltest. Kui sõeltesti alusel on rasedal suurenenud tõenäosus kromosoomihaigusega lapse sünniks, on vaja diagnoosi kinnitamiseks teha invasiivne protseduur. Sõeltesti negatiivseks küljeks on valepositiivsed tulemused, mille tõttu peab tegema tagantjärele mittevajaliku invasiivse protseduuri, mis võib põhjustada raseduse katkemist.

Rasedate kromosoomihaiguste sõeluuringu uueks meetodiks on loote rakuvaba DNA määramine ema verest, mis on efektiivsem kui ükski praegu kasutusel olev sõeltest. Kuna see test on väga spetsiifiline, vähendab see oluliselt invasiivsete protseduuride vajadust ning on ülimalt hea võimalus, et välja valida naised, kellele tõesti on tarvis teha diagnostiline invasiivne protseduur. Uue sõeltesti rakendamiseks rasedate skriiningus on erinevaid võimalusi, ideaalseim oleks selle tegemist võimaldada kõikidele rasedatele 10. rasedusnädalal. Selle rakenduse negatiivseks asjaoluks on testi kõrge hind: loote rakuvaba DNA test on oluliselt kallim kui kasutusel olev sõeltest ja praegu Eesti Haigekassa seda ei rahasta.

Rasedate sünnieelse jälgimise eesmärk on võimalikult varakult avastada loote tervise- ning arenguprobleeme. Loote kromosoomiarvu anomaalia on kõige sagedasem sünnieelse haiguse ja raseduse katkemise põhjus. Inimesel on 46 kromosoomi. Kui selles arvus esineb muutus, on tegemist monosoomia või trisoomiaga. Trisoomia korral on isikul üks lisakromosoom. Downi sündroom (21. kromosoomi trisoomia) on kõige sagedasem vastsündinutel esinev kromosoomiarvu anomaalia (esinemissagedus 11 juhtu 10 000 elussünni kohta) (1, 2). 2014. aastal esines Eestis Downi sündroomi 3,6 juhtu 10 000 sünni kohta. Sündis 5 last ja sünni eel diagnoositi 31 juhtu (3). Teisteks sagedamini esinevateks kromosoomiarvu muutuseks on 18. kromosoomi trisoomia ehk Edwardsi sündroom (esinemissagedus 1 juht 10 000 elussünni kohta) ja 13. kromosoomi trisoomia ehk Patau sündroom (esinemissagedus 0,5 juhtu 10 000 elussünni kohta) (1).

Viimase 25 aasta jooksul on kromosoomi arvu-anomaaliatega riskirasedate selek-

teerimiseks kasutusel sõeltestid. Eelmise sajandi viimasel kümnendil alustati teise trimestri vereseerumi sõeltestidega. Sellise testimisega leitakse 60% Downi sündroomiga loodetest ja skriiningpositiivsetel naistel tehtud invasiivsetest protseduuridest leitakse kromosoomipatoloogia 4%-l loodetest.

Tänapäeval tehakse I trimestril sõeluuring, kus määratakse raseda individuaalne risk trisoomiate suhtes, kombineerides esimese trimestri ultraheliuuringu NT (*nuchal transluceny*, kuklapiirkonna läbikumavus) mõõtmist naise seerumi biokeemiliste markerite PAPP-A (*pregnancy-associated plasma proteiin A*, rasedusega seotud plasma proteiin) ja β -hCG (*β human chorionic gonadotropin*, beetakooriongonadotropiin) kontsentratsiooniga (4). Kui sõeltesti alusel on rasedal suurenenud tõenäosus kromosoomihaigusega lapse sünniks, on vaja teha diagnostiline invasiivne protseduur (amniotsentees, koorionbiopsia või väga harva kordotsentees). Igal invasiivsel protseduuril on 0,1–1% risk, et rasedus katkeb (5, 6).

Eestis tehti 2014. aastal 848 invasiivset protseduuri, s.o 6,1%-le rasedatest (3).

I trimestri sõeluuringutega on võimalik avastada umbes 90% trisoomiaga loodetest. Sõltuvalt kasutatavast meetodikast on sõeltestide kromosoomihaiguste valepositiivsete juhtude osakaal kuni 5% (4). 2013. aastal tehti Eestis sõeluuring 13 422 rasedale, positiivne tulemus saadi 4%-l. Kromosoomianomaalia leiti 38 juhul, s.o 7%-l positiivsetest testidest (7). Praegu kasutusel olevate testide skriiningpositiivsetest rasedatest kannab üle 90% siiski tervet last ja neile tehakse tagantjärele mittevajalik invasiivne protseduur (8).

LOOTE RAKUVABA DNA TESTIMISE PÕHIMÕTE

Sünnieelne loote rakuvaba DNA (cffDNA ehk *cell-free fetal deoxyribonucleic acid*) testimine ehk NIPT (*non-invasive prenatal testing*, mitteinvasiivne sünnieelne testimine) kasvas välja vajadusest täpsema, kiire ja ohutu meetodi järele, et selekteerida patsiendid, kellele on vaja teha diagnostiline invasiivne protseduur. Põhinedes 1997. aastal avastatud ema veres ringleval suhteliselt suurel hulgal loote rakuvabal DNA-l, on välja töötatud molekulaardiagnostika meetodid, mis võimaldavad ema verest analüüsida loote geneetilist materjali (9). Kuigi ema vereringes leiduvat võõr-DNA-d nimetatakse loote DNA-ks, on need enamasti platsenta trofoblasti rakkude apoptoosil vabanenud nukleiinhapped, mida saab samastada loote geneetilise materjaliga (10). Raseda vereplasmas ringleb koos loote DNAGA ka ema enda rakuvaba DNA, mis pärineb ema hematopoeetilistest rakkudest. Ema verest DNA eraldamisel on lahuses seega nii ema kui ka loote pärilikkusaine. cffDNA on leitav ema veres juba 4. rasedusnädalal (11). Uuringutest on teada, et 10.–20. rasedusnädalal ema veres ringlevast rakuvabast DNAST on loote päritolu keskmiselt 11–20% (12, 13). On näidatud, et cffDNA lagunemise poolestusaeg on kuni tund, seega elimineeritakse rakuvaba DNA pärast sünnitust paari päeva jooksul ja eelnevate raseduste loote DNA ei saa järgmiste raseduste ajal olla segavaks teguriks (14).

Algselt kasutati cffDNA-d selliste piirkondade analüüsimiseks, mille järjestused emal puuduvad. Selle näideteks on loote soo määramine, kasutades Y-kromosoomi paiknevaid geene, või loote reesusstaatuse

määramine reesusnegatiivsetel emadel, kasutades RhD geeni järjestusi. Loote reesusgrupi määramine on leidnud kliinilist rakendust paljudes maades ning seda on võimalik alates 12. rasedusnädalast teha ka Eestis (15). Loote reesusstaatuse määramine on mitteinvasiivse testiga hea selleks, et vähendada reesusnegatiivsetele naistele ebavajaliku resonatiivi manustamist, et vältida potentsiaalselt võimalikku reesusisoimmunisatsiooni.

Viimase aastakümne jooksul on loote rakuvaba DNA analüüsil põhinevat testimist välja arendatud ka loote kromosoomihaiguste avastamiseks eesmärgiga rakendada seda rasedate sõeltestimisel (16). Välja on töötatud erinevaid meetodikaid cffDNA tuvastamiseks. Näiteks terve genoomi laussekveneerimine (*massively parallel sequencing*, MPS) põhineb verest eraldatud kogu rakuvälise DNA sekveneerimisel ning saadud järjestuste molekulaarsel loendamisel. Iga kromosoomi DNA hulka võrreldakse kvantitatiivselt referentskromosoomi DNA hulgaga. DNA lõikude üle- või alaesindus viitab aneuploidsusele. Nii ema kui ka loote DNA fragmente käsitletakse statistiliselt sarnasena, seega võib igasugune kõrvalekalle referentsist tegelikult olla nii ema kui ka loote päritolu.

Teiseks kasutusel olevaks meetodiks on suunatud kromosomaalne sekveneerimine (*chromosome-selective sequencing*, CSS), kus amplifitseeritakse ehk kordistatakse konkreetseid huvipakkuvaid kromosoomide regioone (nt 13, 18, 21, X, Y).

Kolmandaks cffDNA testimise meetodiks on suunatud sekveneerimine, kasutades ühenukleotiidseid polümorfisme (SNP, *single nucleotide polymorphisms*). SNP peegeldab isikutevahelisi üksikute nukleotiidide erinevusi piirkondades, mis on muidu identsed. Sellist tehnoloogiat kasutatakse, et eristada ema rakuvaba DNAd loote omast. Kui sekveneerida ning analüüsida ainult huvipakkuvaid genoomi piirkondi või markereid (SNP), vähendab see võrreldes MPSiga protseduuri keerukust, aega ning hinda (17, 18).

Paralleelselt NIPT meetodite väljatöötamisega on mitmed biotehnoloogia ettevõtted alates 2011. aastast turule tulnud kommertstestidega (19). Need kommertstestid põhinevad erinevatel meetodikel, seega varieeruvad erinevate pakutatavate testide tundlikkus ja spetsiifilisus vähesel määral. Kõigi praegu saada olevate testidega

saab määrata autosomaalsete kromosoomide arvu kordsust (21., 18., ja 13. kromosoomi trisoomiad) ning mõne testi puhul on võimalik teada saada ka loote sugu ja sugukromosoomide arvu muutusi. Mõned testid võimaldavad avastada ka triploidjaid ja mikrodeletsioone.

Kõige esimesena tuli turule test MaterniT21 PLUS (Sequenom, Inc), kus kasutatakse terve genoomi sekveneerimise tehnoloogiat (20). Lisaks on saadaval Harmony (Ariosa Diagnostics, Inc), kus kasutatakse suunatud sekveneerimise tehnoloogiat (21); Verifi (Illumina, Inc), mille puhul kasutatakse terve genoomi sekveneerimist (22); ning Panorama, kus (Natera, Inc) kasutatakse suunatud sekveneerimise SNP tehnoloogiat (23). Eespool mainitud testid on välja töötatud Ameerika Ühendriikides, mõned testid ka Hiinas (19). Eestis pakutakse/vahendatakse Harmony, Panorama ning ka firma Sequenom teste, mille korral raseda vereproov saadetakse vastavasse teenust pakkuvasse laborisse väljaspool Eestit ja mille eest peab patsient ise tasuma.

Viimase nelja aasta jooksul tehtud valideeritud uuringud on näidanud, et kromosoomihaiguste suure riskiga naiste vereringes leitava cffDNA-d analüüsidest avastatakse 99,5% trisoomia 21, 96–99% trisoomia 18 ja 79–92% trisoomia 13 juhudest. Valepositiivsete juhtude osakaal on vastavalt 0,1%, 0,15% ja 0,4% (24–26). Kuna NIPT puhul on spetsiifilisus ja sensitiivsus suur, vähendab see test oluliselt invasiivsete protseduuride vajadust ning on ülimalt hea võimalus, et välja valida naised, kellele on vaja teha diagnostiline invasiivne protseduur (27).

Kuna haiguse esinemissagedus populatsioonis mõjutab skriiningtesti positiivset ennustatavat väärtust, arvavad testi kriitikud, et see võiks olla madalam haiguse väiksema esinemissagedusega inimeste hulgas, nii nagu see on loote trisoomia esinemisega nooremate naiste populatsioonis (28). Samas on viimasel ajal avaldatud uuringutes leitud cffDNA-testi kõrge tundlikkus ja spetsiifilisus ka rasedate grupis, kellel ei esine trisoomia suurenenud riski. Väidetakse, et cffDNA-testi tegemisel on haiguse esinemissagedusest tähtsam testi läbiviimise täpsus ja loote DNA fraktsioon. (29) Avaldatud uuringutes, kus on võrreldud tavapopulatsioonis NIPT tulemusi erinevate konventsionaalsete sõeluuringutega, on

leitud, et Downi sündroomi avastamismäär trisoomia väikse riskiga naistel on 100%, kuid valepositiivsus on võrreldes esimese trimestri kombineeritud sõeltestiga oluliselt väiksem: 0,2%–0,5% vs. 3,6%–4,5% (30, 31). Prospektiivsel uuringul, kus võrreldi 11.–21. rasedusnädalal tehtud NIPTd teise trimestri kolmiktestiga, tuvastati cffDNA-testiga 100% trisoomiaga loodetest, teise trimestri kolmiktesti avastamismäär oli samas ainult 54,5%. Valepositiivsus oli testidel vastavalt 0,06% ja 14,1% (32). 2015. aastal avaldatud uuringus 2785 rasedal võrreldi NIPTd 10.–11. rasedusnädalal esimese trimestri kombineeritud sõeltestiga. NIPTga avastati kõik 32 Downi sündroomi juhtu, 9/10 Edwardsi sündroomi juhtudest ja 2/5 Patau sündroomi juhtudest. Valepositiivsuse protsent oli 0,3. Kombineeritud testiga avastati kõik trisoomiajuhud, valepositiivseid testitulemusi oli seejuures 4,4% (33).

cffDNA TESTI VÕIMALIKUD RAKENDUSED KLIINILISE PRAKTIKASSE

Ideaalne variant oleks teha kõigile rasedatele esmane NIPT 10. rasedusnädalal. Nii avastaksime üle 99% trisoomia 21-ga loodetest ja invasiivseid protseduure oleks vaja teha ainult 1%-le rasedatest (34). Selle rakenduse negatiivseks asjaoluks on cffDNA-testi kõrge hind. Praegu teadaolevate andmete põhjal vahendatakse Eestis teste hinnavahega 400–1000 eurot ja see on oluliselt kallim kui praegu kasutusel olev sõeltest (24 eurot). Praegu Eesti Haigekassa NIPT tegemist ei rahasta.

ACOG (*American College of Obstetricians and Gynaecologists*) soovitusel on NIPT näidustatud skriiningmeetodina erinevatel kromosoomihaiguste riskirühmadel, näiteks rasedatele vanusega üle 35 aasta, loote ultraheliuuringul leitud kõrvalekalde korral, eelneval sõeluuringul tuvastatud suurema riski puhul kromosoomihaiguse suhtes jt (35).

NIPT rakendamisel sekundaarselt esimese trimestri kombineeritud sõeluuringu järel on soovitatud testi tulemused jagada kolme rühma. Väga suure riskiga patsientidel (risk suurem kui 1 : 10) oleks soovitatav kohe teha invasiivne test, kuna sellel grupil on trisoomia 21, 18 või 13 osakaal ainult 70%, ülejäänud 30%-l esineb muu patoloogia, mis võib jääda NIPTga avastamata (36). Vahepealse riskiga naistele

(risk 1 : 11 – 1 : 2500) soovitatakse NIPT tegemist ning vähese riski rühmas (väiksem kui 1 : 2500) ei ole edasine skriining vajalik. Sellise taktikaga avastatakse 98% Downi sündroomiga loodetest ja väheneks oluliselt rahalised kulutused, kuna cffDNA-testi peaks tegema ainult 25%-le populatsiooni rasedatest. Samuti kahaneks invasiivsete protseduuride vajadus 0,8 protsendini, kuna väheneks oluliselt valepositiivsete juhtude osakaal. Invasiivsete protseduuride arvu vähenemisega peaks kahanema ka raseduste iatrogeensete katkemiste arv. Juhtudel, kui NIPT ei anna vastust, saaks edasise invasiivse protseduuri tegemise vajaduse määrata esimese trimestri kombineeritud sõeltesti riskist sõltuvalt (37). Sellise taktika miinuseks on see, et võivad jääda avastamata I trimestri sõeltesti valenegatiivsete juhtude hulgas esinevad trisoomiad (18).

Praegu rutiinselt kasutusel oleva I trimestri kombineeritud sõeltestimisega avastatakse umbes 95% trisoomia 18 ja 13 juhtudest. NIPT korral on trisoomia 18 avastamismäär 96% ja trisoomia 13 puhul 91%. Seega on nende trisoomiate avastamismäär võrreldes I trimestri kombineeritud sõeltestiga väiksem (29).

LOOTE RAKUVABA DNA TESTI KASUTAMISE PRAKTILISED ASPEKTID

Kogu rakuvaba DNA hulk veres varieerub nii raseduse vältel kui ka isikuti. Kui ema veres on loote DNA fraktsioon alla 4%, ei ole see praeguste võimalustega avastatav (38). Loote DNA fraktsioon väheneb näiteks ema kehamassiindeksi suurenedes (39). 1–5%-l juhtudest ei anna cffDNA test tulemust, selle põhjuseks võib-olla loote DNA liiga vähene fraktsioon, vere kogumise või transpordi probleemid või testi analüüsi vead. Sellisel juhul on soovitatav korrata testi või alternatiivina teha kromosoomihaiguste tavapärane sõeltestimine (34).

Kõigile rasedatele peaks võimaldama I trimestri ultraheliskriiningu sõltumata sellest, kas nad soovivad mitteinvasiivset sünnieelset testimist või mitte, kuna NIPT ei asenda esimese trimestri ultraheliuuringut (36). cffDNA skriiningtest ei ole näidustatud naistele, kellel on ultraheliuuringul leitud loote arenguanomaalia. Neil on näidustatud kohene diagnostiline invasiivne protseduur, kuna põhjus võib olla ka muus kui NIPT käigus leitavad trisoomiad.

Kaksikraseduste korral on cffDNA testimine komplitseeritum, kuna kaksikud võivad olla monosügootsed (geneetiliselt identsed) või disügootsed (kromosoomianomaalia võib esineda ainult ühel lootel). On näidatud, et disügootse kaksikraseduse korral võib mõlema loote ringleva cffDNA hulk ema veres erineda. Seega on võimalik, et disügootse kaksikraseduse korral on trisoomiaga loote DNA fraktsioon alla avastatava 4% ja seega tekib valenegatiivne vastus. Testi alusel on samuti võimatu kindlaks teha, kummal lootel esineb kromosoomipatoloogia ja see tuleb positiivse NIPT korral tuvastada invasiivse protseduuri käigus. Suurema arvuga mitmikuid (kolmikuid jne) ei ole võimalik NIPT teel skriinida (29, 40).

Monogeensetest haigustest saab NIPTga kindlaks teha isalt ülekanduvaid mutatsioone, mida ei esine ema genoomis. Sugukromosoomide arvanomaaliade rutiinne mitteinvasiivne loote DNA testimine ei ole üldjuhul näidustatud. Sugukromosoomide testimisel on võrreldes 21. kromosoomi trisoomia testimisega oluliselt väiksem avastamismäär ja suurem mitteinformatiivse testi vastuse võimalus. Sugukromosoomide arvanomaalia monosoomia X (45,X ehk Turneri sündroom) väljendub enamasti sünnieelsel ultraheliuuringul tsüstilise hügroovina. Sellise leiu korral on näidustatud cffDNA-testi asemel kohe määrata invasiivse protseduuri käigus saadud materjalist loote karüotüüp (41).

cffDNA-tase on märkimisväärselt tõusnud mõningate rasedustüsistuste, näiteks platsenta puudulikkuse, platsenta enneaegse irdumise, preeklampsia, enneaegse sünnituse, rasedusaegse hüperemeesi ja polühüdramnoni korral, samuti seerummarkerite PAPP-A ja β -hCG sisalduse suurenemise korral. Raseduse varases järgus määratud rakuvaba DNA hulga positiivne ennustatav väärtus on samas eelnevalt nimetatud tüsistuste esinemiseks hilisemas raseduse järgus väike (41).

NIPTga on võimalik saada vastuseid vaid nendele kromosoomihaigust põhjustavatele muutustele, mida me otseselt küsime. Kõik ülejäänud kromosoomi muutused (nt kromosomaalsed häired, anomaaliad, mis ei ole seotud trisoomia 21, 18 või 13-ga; mittebalansseeritud translokatsioonid; deletsioonid teistes kromosoomides) jäävad leidmata.

Platsenta genoomis esineb suurel hulgal somaatilisi koopiarvu muutusi, iseäranis duplikatsioonide. Äsja avaldatud uuringus on leitud, et see fenomen on iseloomulik normaalsele rasedusele. Kuna aga loote rakuvaba DNA on platsentaarset päritolu, tuleks olla ettevaatlik mikrodeletsioonide ja/või duplikatsioonide diagnostikaga lootel NIPT abil, kuna sel võib olla valepositiivne tulemus (42).

NIPT ei ole diagnostiline test, kõik sõeltesti positiivsed tulemused peab kinnitama invasiivse kromosoomiuuringu käigus. Väga harvad, kuid siiski võimalikud cffDNA-testi valepositiivsed juhud võivad esineda ka NIPT bioinformaatiliste vigade tõttu, ema kromosoomi arvanomaaliade esinemise korral, ema vähirakkude esinemise korral veres, kaksikraseduse korral teise kaksiku varasel hukkumisel või platsenta mosaiiksuse esinemisel, kuna enamik loote DNAST on platsenta päritolu (41).

cffDNA-TESTI EETILISED ASPEKTID JA NÕUSTAMINE

Selleks, et loote DNA testi ei kasutataks valedel eesmärkidel, peaks selle kasutamine olema reguleeritud. Eetilised küsimused võivad tekkida, kui kommertsiaalset geneetilist testimist loote soo määramiseks või isaduse tuvastamiseks pakutaks näiteks internetipõhiselt ilma meditsiinilise personali vaheetapita otse rasedatele (43).

Naine vajab mittesuunavat testieelset nõustamist, et täielikult aru saada testi olemusest ja võimalikest tekkivatest probleemidest. cffDNA-testi positiivse tulemuse korral soovitatakse geneetiku konsultatsiooni.

Kuna haigekassa ei rahasta praegu cffDNA-testi, ei ole NIPT majanduslikult vähem kindlustatud patsientidele kättesaadav.

On võimalik, et kuna NIPT tagajärjel kromosoomihaigusega laste sünd väheneb, pannakse rahaliselt suuremat rõhku preventatsioonile ja juba sündinud kromosoomihaigustega isikute hool ja ravi jääb tagaplaanile (19, 27, 28).

KOKKUVÕTE

Loote rakuvaba DNA testimine kromosoomihaiguste sõeluuringuna on tõhusam kui ükski praegu kasutusel olev sõeltest. Kõige

suuremaks testi eeliseks on väga väike valepositiivsuse määr, mis vähendab sünnieelseks diagnostikaks vajalike invasiivsete protseduuride hulka ja raseduse iatogeense katkemise võimalust. Negatiivseks asjaoluks on testi kallis hind, mille tõttu jääb test Eestis lähitulevikus tõenäoliselt patsiendi rahastada.

VÕIMALIKU HUVIKONFLIKTI DEKLARATSIOON

Autoril puudub huvide konflikt.

SUMMARY

New method of prenatal chromosomal abnormality screening – cell-free fetal DNA testing in maternal blood

Eva-Liina Ustav¹

Currently, prenatal chromosomal abnormality screening is routinely based on first-trimester combined screening. When the result of the screening test indicates high risk for child's birth with chromosomal pathology, definite diagnosis has to be confirmed by an invasive procedure. A negative aspect of screening is the false-positive test result, which accounts for about 5% for the first-trimester combined test. This is the consequence of unnecessary invasive procedures with a potential procedure-related loss of normal fetuses. A new method of prenatal chromosomal abnormality screening is cell-free fetal DNA testing in maternal blood, which detects over 99% of Down syndrome cases and test's false-positive rate is less than 0.1%. Since this test has high specificity and sensitivity it will potentially reduce the need for invasive procedures and proves highly suitable for selecting women who would benefit from diagnostic invasive procedures. There are different possibilities for implementing the new screening method for pregnancy screening. An ideal option would be to test all pregnant women at 10 weeks of pregnancy. A negative aspect of this testing is the high cost of cell-free fetal DNA tests (400-1000 euro). It is considerably higher than the cost of the current screening test and is not covered at present by the Estonian healthcare system.

¹ Women's Clinic, Tartu University Hospital, Tartu, Estonia

Correspondence to: Eva-Liina Ustav
eva-liina.ustav@kliinikum.ee

Keywords: trisomy, Down syndrome, screening, non-invasive prenatal testing, cell-free fetal DNA

KIRJANDUS/REFERENCES

1. Loane M, Morris JK, Addor MC, et al. Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. *Eur J Hum Genet* 2013;21:27–33.
2. Reimand T, Üunap K, Žordania R, et al. Descriptive epidemiology of Down's syndrome in Estonia. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006;20:512–9.
3. Sitska M. Pärilike haiguste sünnieelne diagnoosimine Eestis 2014 aastal. <http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/component/content/article/11-synnieelnediagnostika>.
4. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* 2011;31:7–15.
5. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther* 2010;27:1–7.
6. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:16–26.
7. Sitska M. Vereseerumi soelttest 2013. http://www.kliinikum.ee/medgen/images/stories/Vereseerumi_soelttest_2013.pdf.
8. Norwitz ER, Levy B. Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Rev Obstet Gynecol* 2013;6:48–62.
9. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–7.
10. Alberry M, Maddocks D, Jones M, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in an embryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007;27:415–8.
11. Illanes S, Denbow M, Kailasam C, et al. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev* 2007;83:563–6.
12. Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2008;54:1664–72.
13. Wang E, Batey A, Struble C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2013;33:662–6.
14. Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218–24.
15. Altmäe S, Runina A, Kuningas M, et al. Loote reesusstaatuse mitteinvasiivne diagnostika – prenataalse diagnostika uus võimalus Eestis. *Eesti Arst* 2005;84:847–52.
16. Wright CF, Chitty LS. Cell-free fetal DNA and RNA in maternal blood: implications for safer antenatal testing. *BMJ* 2009;339:b2451.
17. Ferrer MA, Hui L, Bianchi DW. Antenatal noninvasive DNA testing: clinical experience and impact. *Am J Perinatol* 2014;31:577–82.
18. Bianchi DW, Wilkins-Haug L. Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: what has happened since the rubber met the road? *Clin Chem* 2014;60:78–87.
19. Allyle M, Minear MA, Berson E, et al. Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *Int J Womens Health* 2015;7:113–26.
20. Sequenom Laboratories. The Science of Revolutionizing Prenatal Care. <https://laboratories.sequenom.com/providers/maternit21-plus/>.
21. Ariosa Diagnostics. Harmony prenatal test clinical data. <http://www.ariosadx.com/healthcare-professionals/performance/>.
22. Illumina. Clinical data; <http://www.illumina.com/clinical/reproductive-genetic-health/healthcare-professionals/non-invasive-prenatal-testing.html>.
23. Panorama Prenatal Screen. <http://www.panoramatest.com/en/healthcare-provider/clinical-data>.
24. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011;13:913–20.
25. Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012;14:296–305.
26. Non-invasive prenatal testing for chromosomal abnormality using maternal plasma DNA. RCOG Guidelines (Scientific Impact Paper No. 15) March 2014. http://www.rcog.org.uk/files/rcog-corp/SIP_15_04032014.pdf.
27. Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;42:15–33.
28. Lutgendorf MA, Stoll KA, Knutzen DM, Foglia LM. Noninvasive prenatal testing: limitations and unanswered questions. *Genet Med* 2014;16:281–5.
29. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:249–66.
30. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:374.e1–6.
31. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014;370:799–808.
32. Song Y, Liu C, Qi H, Zhang Y, Bian X, Liu J. Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat Diagn* 2013;33:700–6.
33. Quezada MS, Gil MM, Francisco C, Orosz G, Nicolaides KH. Screening for trisomies 21, 18 and 13 by cell-free DNA analysis of maternal blood at 10–11 weeks' gestation and the combined test at 11–13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:36–41.
34. Gratacos E, Nicolaides K. Clinical perspective of cell-free DNA testing for fetal aneuploidies. *Fetal Diagn Ther* 2014;35:151–5.
35. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Committee Opinion No 545. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2012;120:1532–4.
36. Salomon LJ, Alfirevic Z, Audibert F, et al. ISUOG consensus statement on impact of non-invasive prenatal testing (NIPT) on prenatal ultrasound practice. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;44:122–3.
37. Gil MM, Akolekar R, Quezada MS, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: meta-analysis. *Fetal Diagn Ther* 2014;35:156–73.
38. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 2013;33:667–74.
39. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11–13 weeks gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:26–32.
40. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:61–6.
41. Wolfberg A, Caughey A. Noninvasive prenatal testing using cell-free nucleic acids in maternal blood. http://www.uptodate.com/contents/noninvasive-prenatal-testing-using-cell-free-nucleic-acids-in-maternal-blood?source=search_result&search=noninvasive-prenatal-testing&selectedTitle=1%7E10.
42. Kasak L, Rull, K, Vaas P, Teesalu P, Laan M. Extensive load of somatic CNVs in the human placenta. *Sci Rep* 2015;5:8342.
43. Press N. Genetic testing and screening. The Hastings Center. <http://www.thehastingscenter.org/Publications/Briefing-Book/Detail.aspx?id=2176>.