

Sylwia Olimpia Rzońca, Jerzy Bal

NIEINWAZYJNA GENETYCZNA DIAGNOSTYKA PRENATALNA. ANALIZA KWASÓW NUKLEINOWYCH POCHODZENIA PŁODOWEGO OBECNYCH W KRWIOOBIEGU MATKI

NON-INVASIVE GENETIC PRENATAL DIAGNOSIS. ANALYSIS OF NUCLEIC ACIDS OF FOETAL ORIGIN PRESENT IN MATERNAL VASCULAR SYSTEM

Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka

Streszczenie

Diagnostyka prenatalna stanowi istotny element opieki zdrowotnej nad kobietami w ciąży. Dotychczas, badania prenatalne w kierunku chorób genetycznie uwarunkowanych miały charakter inwazyjny. Identyfikacja w krwiobiegu matki wolnych kwasów nukleinowych pochodzenia płodowego stworzyła nowe możliwości i dała początek genetycznej nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej. Do jej wiodących nurtów, w zależności od klinicznego zastosowania, należą analiza chorób dziedzicznych, analiza aneuploidii oraz badanie konfliktu matczyno-płodowego.

W przypadku chorób dziedzicznych nierozwiązanym skutecznym problemem, uniemożliwiającym szersze zastosowanie nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej jest brak uniwersalnych markerów, które umożliwiłyby odróżnienie wolnego DNA płodu od materiału pochodzenia matczynego. Ogranicza to obecnie możliwości wykorzystania tego typu diagnostyki do przypadków, w których mutacja dziedziczona jest od ojca.

Wprowadzenie do praktyki nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej wiąże się z opracowaniem stosownych regulacji prawnych. Ma to szczególne znaczenie w tzw. aplikacjach poza-medycznych, gdzie istnieje niebezpieczeństwo doboru zarodków np. pod względem płci. Wypracowanie skutecznych metod analizy DNA płodu obecnego w krwiobiegu matki są kwestią najbliższych lat i wpiszą się w obraz postępu, jaki dokonuje się w ostatnich latach w dziedzinach biologii molekularnej oraz medycyny. Jak się więc wydaje, możliwości nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej chorób genetycznie uwarunkowanych w szerszym zakresie, niż to ma obecnie miejsce, są jedynie kwestią czasu.

Słowa kluczowe: wolne płodowe kwasy nukleinowe, nieinwazyjna diagnostyka prenatalna, cffDNA

Abstract

Prenatal diagnosis is an important element of health care in pregnant women. Until now, prenatal testing of genetically determined diseases was invasive. Identification in maternal plasma of cell-free fetal nucleic acids (cffNA) has created new opportunities, and gave rise to genetic non-invasive prenatal diagnosis (NIPD).

They are three leading trends in NIPD, depending on the clinical application: analysis of hereditary diseases, analysis of aneuploidy and study of maternal-fetal conflict.

In case of hereditary diseases, application of NIPD is limited to autosomal dominant disorders where the mutation is carried on the paternal allele. It refers to problems with distinguish fetal derived cell-free DNA from maternal cell-free DNA.

The important issue for using NIPD techniques in practice is to develop appropriate law regulation.

This is of particular importance in the non-medical applications, when the aim of testing could be e.g. selection of fetuses.

The development of effective methods for the analysis of free fetal DNA present in the mother's bloodstream is a matter of few years and show the progress made in the fields of molecular biology and medicine. It seems that non-invasive testing for a wider range of genetic disorders is a only a question of time.

Key words: cell free fetal nucleic acid, cffNA, non-invasive prenatal diagnosis, NIPD

DEV. PERIOD MED., 2014, XVIII, 2, 247-255

Badania prenatalne płodu wykonywane są w trakcie rozwoju wewnątrzmacicznego w celu wykluczenia/stwierdzenia obecności ewentualnych wad rozwojowych i chorób genetycznie uwarunkowanych. W ostatnich czasach, ze względu na pojawienie się możliwości leczenia jeszcze na etapie życia płodowego, znaczenie diagnostyki prenatalnej w położnictwie znacznie wzrosło.

Szczególne miejsce wśród badań prenatalnych zajmuje diagnostyka chorób genetycznie uwarunkowanych. W Polsce ten typ diagnostyki prenatalnej zalecany jest kobietom wtedy, gdy ryzyko urodzenia przez nią dziecka z wadą jest większe niż ryzyko populacyjne. Ma to miejsce w przypadku rodzin obciążonych chorobami genetycznymi, jak też w przypadku kobiet, które ukończyły 35 r.ż.. Genetyczne badania prenatalne wykonywane są również w celu weryfikacji wyników badań biochemicznych i ultrasonograficznych wskazujących na wystąpienie wady u płodu. Wykonanie tego typu diagnostyki wiąże się jednak z ryzykiem uszkodzenia płodu w trakcie procedury pobrania materiału do badań. W zależności od wieku ciąży oraz kierunku badań, w czasie biopsji, pobierany jest trofoblast (10-14 tyg.), w czasie amniopunkcji płyn owodniowy (14-19 tyg.) bądź w czasie kordocentezy, pobierana jest krew z żyły pępkowej płodu (powyżej 19 tyg.). Szacowane ryzyko uszkodzenia płodu w trakcie pozyskiwania materiału do diagnostyki mieści się w zakresie 0,5-2% (1, 2).

Rozwój, nieinwazyjnych technik diagnostycznych w oparciu o analizę kwasów nukleinowych z krwi matki stwarza nowe możliwości, i w zdecydowany sposób zmienia obraz oraz podejście do badań molekularnych wykonywanych w trakcie życia płodowego.

Po raz pierwszy cyrkulujący, w krwiobiegu matki, DNA płodu (cffDNA ang. *cell free fetal DNA*) został zidentyfikowany w roku 1997 (3). Odkrycie to przyczyniło się do zmiany powszechnie obowiązującego poglądu o nieprzenikaniu przez barierę łożyskową pomiędzy matką a płodem cząsteczek kwasów nukleinowych. Szybko znalazło też zastosowanie praktyczne w tzw. nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej (NIPD ang. *non-invasive prenatal diagnosis*).

Głównym celem NIPD jest stworzenie alternatywy dla inwazyjnych badań prenatalnych. Wprowadzenie do rutynowej diagnostyki prenatalnej technik NIPD w istotny sposób zwiększy bezpieczeństwo przeprowadzanych procedur oraz komfort badania dla przyszłych matek.

W zależności od klinicznego zastosowania wyróżnia się trzy wiodące nurty badań NIPD: 1) badania w zakresie diagnostyki chorób dziedzicznych (np. chorób sprzężonych z płcią, chorób monogenowych), 2) badania o charakterze przesiewowym (analiza trisomii – np. zespół Dawna) oraz 3) badania prowadzone w zakresie opieki i monitorowania zdrowia matki oraz płodu (np. badanie konfliktu matczy-no-płodowego w układzie antygenu RhD).

1. CYRKULUJĄCE WOLNE KWASY NUKLEINOWE

W surowicy oraz w osoczu krwi kobiet z prawidłowo przebiegającą ciążą stwierdzono obecność zarówno wolnego płodowego DNA jak i RNA (4, 5). Istnieją różne hipotezy co do mechanizmu, który jest odpowiedzialny za uwalnianie do krwiobiegu kwasów nukleinowych pochodzenia płodowego. Najbardziej prawdopodobna wydaje się teoria według której, wolny płodowy DNA i RNA uwalniany jest do krwi matki z komórek trofoblastu (głównie syncytiotrofoblastu) usuwanych z łożyska na drodze apoptozy (6, 7). Świadczyć za tym może stwierdzana znaczna fragmentacja cffDNA (8). Rozważana jest też możliwość aktywnego mechanizmu wydzielania wolnych kwasów do krwiobiegu. Hipoteza ta wydaje się jednak mało prawdopodobna szczególnie w przypadku płodowego mRNA, który wykazuje znaczną stabilność we krwi pomimo obecności enzymów trawiennych o aktywności rybonukleaz.

Cyrkulujący płodowy DNA występuje w osoczu w formie fragmentów o długości mniejszej niż 300 pz, z czego aż 80% stanowi frakcja DNA o wielkości poniżej 193 pz (8). Pomimo fragmentacji, wolny płodowy DNA reprezentuje cały genom płodu. Stężenie cffDNA w osoczu we wczesnych etapach ciąży (4-5 tydzień) wynosi około 25 kopii genomu na mililitr osocza (25 gE/ml), co stanowi około 3% (w zakresie 0,4%-12%) całkowitego wolnego DNA we krwi. Na późniejszych etapach rozwoju płodu stężenie cffDNA wzrasta i maksymalnie może wynosić około 300 gE/ml (3). Czas utrzymania się DNA płodu w krwiobiegu matki po porodzie szacowany jest na około 2 h (9).

Całkowity wolny DNA odnajdywany we krwi matki jest mieszaniną materiału pochodzenia matczyngo i płodowego ze znaczną przewagą DNA matki (w zależności od źródeł stosunek ten wynosi 1:20-60). Stężenie

całkowitego cfDNA w osoczu zdrowych nieciążarnych kobiet wynosi 10^3 - 10^4 gE/ml i wzrasta w trakcie ciąży.

Dominacja wolnego DNA matki we krwi stanowi istotny problem w analizie materiału płodowego po izolacji z osocza i obecnie jest jednym z głównych ograniczeń wykorzystania cfDNA w badaniach prenatalnych.

W krwiobiegu kobiet ciężarnych stwierdzono, jak wspomniano, również obecność wolnego płodowego RNA. Odróżnienie cfRNA od materiału pochodzenia matczynego jest zdecydowanie prostsze niż w przypadku DNA. W osoczu kobiet w ciąży pojawiają się transkrypty mRNA oraz niekodujące cząsteczki miRNA¹, które są specyficzne tylko dla komórek płodu oraz łożyska (10). Dotychczas udało się oznaczyć we krwi matki szereg mRNA pochodzenia płodowego m.in. dla ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCS) oraz ludzkiej somatotropiny kosmówkowej (hCG) (11). Wolny płodowy RNA, podobnie jak cfDNA, uwalniany jest do krwiobiegu z ciałek apoptotycznych powstałych w wyniku śmierci apoptotycznej komórek łożyska i jest w nim obecny do momentu zakończenia ciąży.

Chociaż w chwili obecnej większość badań z zakresu NIPD koncentruje się na analizie wolnego płodowego DNA, coraz większe znaczenie w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej zdobywa cfRNA. Wolny płodowy RNA, w tym miRNA, jest też podstawowym materiałem do badań w przypadku komplikacji okołoprenatalnych, takich jak niedobory łożyska czy nadciśnienie tętnicze w ciąży (12, 13). Znalazł też swoje zastosowanie w diagnostyce trisomii chromosomu 21 (14).

2. MARKERY WOLNEGO PŁODOWEGO DNA

Decydujące dla rozwoju nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej z zastosowaniem wolnego DNA jest poszukiwanie uniwersalnych, specyficznych dla płodu markerów, które mogłyby być użyte w testach diagnostycznych. Markery tego typu są niezbędne do weryfikacji pochodzenia badanego DNA oraz jego oceny ilościowej i powinny być niezależne od płci płodu. Uniwersalne markery płodowe potwierdzające obecność cfDNA, umożliwiają wyeliminowanie wyników fałszywie ujemnych, które są konsekwencją: stężenia DNA poniżej progu wykrywalności w teście, problemów z ekstrakcją DNA, bądź kontaminacji materiałem matczynym.

2.1. Markery genomowe

Pierwsze badania, których celem była selekcja i identyfikacja markerów, dzięki którym można by różnicować DNA płodu od DNA matki koncentrowały się na pojedynczych zmianach nukleotydów tzw. polimorfizmie SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*). Są to markery występujące w całym genomie, mogą różnicować genom matki i ojca, mogą, ale nie muszą, być bezpośrednio związane z diagnozowaną chorobą. Chociaż istnieje wiele badań na potwierdzenie, że tego typu markery mogłyby zostać wprowadzone do praktyki diagnostycznej, nie mają one charakteru uniwersalnego gdyż są charakterystyczne dla danej osoby, rodziny. W niektórych przypadkach analiza wybranych SNP może być ponadto nieinformacyjna ze względu na brak różnic pomiędzy genomem matki i ojca (15, 16).

Markerem genomowym, który z powodzeniem, jak się wydaje, może być wykorzystany w określeniu genetycznej tożsamości DNA są inne sekwencje polimorficzne tzw. sekwencje STR (ang. *short tandem repeats*). STR charakteryzują się dużą zmiennością powtórzeń tandemowych krótkich sekwencji DNA, a allele dziedziczone od każdego z rodziców zazwyczaj różnią się liczbą powtórzeń. Wykorzystując jedną z technik PCR (PCR w czasie rzeczywistym) opracowano metody analizy wielu STR jednocześnie (17). Czułość oraz swoistość tej metody w NIPD wymaga jednak dalszych badań.

2.2. Markery epigenetyczne

Ważną cechą odróżniającą DNA płodu od DNA matki jest odmienny wzór metylacji genomu. Wykorzystanie różnic epigenetycznych, jako markera wolnego płodowego DNA, jest jeszcze nową koncepcją w badaniach NIPD². Wzór metylacji DNA jest bowiem charakterystyczny dla typu komórki i podlega istotnym zmianom podczas prenatalnego rozwoju organizmu odgrywając istotną rolę w tym procesie.

Do zmian epigenomu dochodzi zaraz po zapłodnieniu, w wyniku demetylacji DNA i acetylacji histonów. W stadium wczesnego embrionu zachodzi globalna demetylacja, która ma na celu aktywację szeregu genów niezbędnych do prawidłowego rozwoju organizmu. W głównej mierze dotyczy to genów biorących udział we wzroście i rozwoju, które zwykle są niemetylowane (aktywne) w komórkach rozwijającego się płodu a metylowane (wyciszone) u dorosłych (13)³. Wiele z aktywnych w procesie embriogenezy genów to geny supresorowe nowotworów. Właśnie w tej grupie genów głównie poszukuje się potencjalnych markerów dla płodowego DNA.

¹miRNA – są to krótkie niekodujące (około 22 nukleotydowe) cząsteczki RNA, które poprzez bezpośrednie, komplementarne wiązanie z genami regulują ich ekspresję

²Metylacja genomowego DNA polega na kowalencyjnym przyłączeniu grupy metylowej do cytozyny w obrębie tzw. wysp CpG. Są one zlokalizowane głównie w regionach promotorowych genów o kluczowym znaczeniu dla czynności komórki (ang. housekeeping genes). Enzymatyczna modyfikacja materiału genetycznego zachodzi z udziałem metylotransferaz i powoduje zmiany w strukturze chromatyny.

³Analizę różnic w strukturze modyfikacji DNA można wykonać z zastosowaniem techniki wrażliwego na metylację PCR (MS-PCR ang. methylation specific PCR), z zastosowaniem modyfikacji DNA z wykorzystaniem kwaśnego dwusiarczynu sodowego, dzięki której niemetylowana cytozyna przekształcana jest w uracyl. Ponadto wzór metylacji można analizować amplifikując specyficzny fragment DNA, po uprzednim strawieniu matrycy metyłowrażliwymi enzymami restrykcyjnymi. Ograniczeniem wyżej wymienionych metod jest możliwość analizy metylacji tylko pojedynczych genów.

3. PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ NIPD

3.1. Identyfikacja płci płodu

W chwili obecnej podstawowym markerem genetycznym wykorzystywanym w technikach NIPD są sekwencje specyficzne dla chromosomu Y. W pierwszej kolejności znalazły one zastosowanie w określeniu płci płodu. Metoda ta ma jednak ograniczone możliwości aplikacyjne.

Mężczyźni w odróżnieniu od kobiet są hemizygotami pod względem wszystkich genów leżących na chromosomie X. Przekazanie przez matkę wadliwego allela danego genu, przy recesywnym typie dziedziczenia skutkuje ujawnieniem się choroby u wszystkich dzieci płci męskiej. Dziewczynki są bezobjawowymi nosicielkami, a w przypadku wystąpienia choroby zwykle wykazują znacznie łagodniejszy fenotyp, co związane jest głównie z losową inaktywacją jednego z chromosomów X. Szacuje się, że identyfikacja płci płodu we wczesnych etapach ciąży (7 tydzień) z zastosowaniem technik NIPD daje możliwość ograniczenia inwazyjnych diagnostyk prawie o połowę (18). Identyfikacja płci płodu w praktyce znajduje zastosowanie w diagnostyce chorób sprzężonych z chromosomem X, takich jak hemofilia, dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a, zespół łamliwego chromosomu X, zespół Retta czy krzywica hipofosfatemiczna (19).

Większość badań w kierunku określenia płci płodu z wykorzystaniem cfDNA wykonywanych jest z zastosowaniem bardzo czulej techniki molekularnej, PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) i opiera się o identyfikację genów oraz sekwencji polimorficznych zlokalizowanych na chromosomie Y, takich jak gen *SRY* (ang. *sex-determining region Y*), *TSPY1* (ang. *testis specific protein Y-linked 1*), *DAZ1* (ang. *DAZ1 deleted in azoospermia 1*), *DYS* oraz *DYZ* (ang. *human Y-chromosome specific repeated DNA family*) (20, 21).

Czułość oraz specyficzność wykonywanych testów zależy od wybranego markera oraz wieku ciąży w momencie wykonywania badania. Wyniki przeprowadzonej meta-analizy, która objęła 90 niezależnych badań (10 587 testów), nie wykazały różnic dla najczęściej analizowanych markerów *SRY* oraz *DYS14*. Czułość oraz specyficzność testów prenatalnych z zastosowaniem obu markerów wynosi odpowiednio 96% i 98,9%. Optymalne wydaje się być zastosowanie obu markerów jednocześnie. Próba przeprowadzona na grupie 404 ciężarnych wykazała, że takie podejście umożliwia zwiększenie specyficzności badania do 100%, a czułość do wartości 99,5% (22).

Identyfikacja płci z zastosowaniem markerów dla chromosomu Y znajduje również zastosowanie w przypadkach, gdy rozwój zewnętrznych narządów płciowych jest niejednoznaczny lub w niektórych zaburzeniach hormonalnych np. przy wrodzonym przeroście kory nadnerczy, w którym dochodzi do maskulinizacji żeńskiego płodu (23). Weryfikacja płci na wczesnych etapach rozwoju umożliwia wdrożenie odpowiedniej terapii jeszcze w trakcie życia płodowego.

Głównym ograniczeniem nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej w badaniach płci płodu jest brak metody, która umożliwiłaby bezpośrednią identyfikację w szcze-

gólności płci żeńskiej. Dotychczas wprowadzone testy dają możliwość jedynie na potwierdzenie bądź wykluczenie obecności płodu męskiego w oparciu o analizę markerów chromosomu Y. Płeć żeńską u płodu wnioskuje się na podstawie negatywnych wyników badania. Taki sposób postępowania obarczony jest błędem i wynikami fałszywie ujemnymi (potwierdzenie płci żeńskiej), które mogą mieć poważne konsekwencje kliniczne.

3.2. Diagnostyka chorób autosomalnych

Diagnostyka prenatalna chorób monogenowych, dziedziczonych jako cecha autosomalna, z wykorzystaniem technik inwazyjnych jest stosowana w praktyce klinicznej w przypadkach rodzinnego obciążenia chorobami genetycznymi. W tym obszarze badań podejmowane próby wykorzystania wolnego płodowego DNA napotyka szereg ograniczeń. Wykrycie mutacji punktowej u płodu w cfDNA jest skomplikowane pod względem technicznym, głównie ze względu na znaczną przewagę ilościową materiału pochodzenia matczynego, a także duże podobieństwo genetyczne pomiędzy matką a płodem. Stosowanie technik wzbogacających frakcję płodowego DNA nie rozwiązuje całkowicie problemu, dodatkowo uniemożliwiając ilościową ocenę mutacji w układzie homozygotycznym. W związku z tym diagnostyka chorób autosomalnych uwarunkowanych mutacją w jednym genie ogranicza się do wykrywania alleli dziedziczonych od ojca w sposób dominujący, bądź zmian powstałych *de novo*.

Wprowadzenie uniwersalnych markerów, które umożliwią odróżnienie wolnego płodowego DNA od materiału genetycznego matki bez względu na płęć płodu poszerzyłyby zakres badań NIPD. Satisfakcjonujące wyniki diagnostyki prenatalnej z wykorzystaniem cfDNA dla tej grupy chorób, do tej pory, udało się uzyskać w przypadku achondroplazji. W 98% przypadków za wystąpienie choroby odpowiada mutacja punktowa c.1138G > A w genie *FGFR3*. Pierwsza próba wykorzystania NIPD została wykonana w grupie ciężarnych, u których stwierdzono wady u płodu w badaniu ultrasonograficznym. W rezultacie mutację w genie *FGFR3* udało się zidentyfikować we wszystkich przypadkach achondroplazji u płodu, zarówno dziedziconą od ojca, jak również zmianę powstałą *de novo* (24).

Wykonanie badań z wykorzystaniem wolnego płodowego DNA w kierunku chorób dziedziczonych w sposób autosomalny recesywny stwarza znacznie większe problemy, niż w przypadku dziedziczenia dominującego. W chwili obecnej zastosowanie technik NIPD ogranicza się do określenia statusu nosicielstwa, w przypadkach gdy płód jest heterozygotą w zakresie danej mutacji. Opisana strategia posłużyła do wykrycia mutacji punktowych dziedziczonych od ojca w mukowiscydozie (mutacja Q890X w genie *CFTR*), hemoglobinopatiach, a przede wszystkim w β talasemii (del 11p15.5 w genie *HBB*), oraz identyfikacji charakterystycznych dla genu *CYP21* polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w obrębie sekwencji mikrosatelitarnych (HLA DRB1, D6S299, D6S273, IVS2564, IVS2588) we wrodzonym przeroście kory nadnerczy (tab. I).

Problemem w diagnostyce NIPD jest wykrywanie mutacji dynamicznych (ekspansja trójkę nukleotydowych)

Tabela I. Zastosowanie technik NIPD w diagnostyce chorób genetycznie uwarunkowanych.

Table I. Implementation of NIPD techniques in the diagnosis of genetically determined diseases.

Choroba Condition	Metoda badawcza Method	Pismienictwo Reference
CHOROBY AUTOSOMALNE		
Achondroplazja <i>Achondroplasia</i>	PCR-RFLP (analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych) <i>PCR-RFLP (restriction fragments length polymorphism)</i>	(37, 24)
	PCR-RFLP i qRT-PCR (analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych i PCR w czasie rzeczywistym) <i>PCR-RFLP and QF-PCR (restriction fragments length polymorphism and quantitative fluorescence PCR)</i>	(38)
	MALDI_TOF (spektromeria mas) <i>MALDI-TOF MS (mass spectrometry)</i>	(39)
β -talasemia <i>β-thalassaemia</i>	digital PCR <i>digital PCR</i>	(27)
	qRT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym) <i>qRT-PCR (real-time PCR)</i>	(40)
	sekwencjonowanie następnej generacji <i>next generation sequencing (NGS)</i>	(41)
Hemofilia <i>Haemophilia</i>	digital PCR <i>digital PCR</i>	(42)
Wrodzony przerost kory nadnerczy <i>Congenital adrenal hyperplasia</i>		(43)
Dystrofia miotoniczna <i>Myotonic dystrophy</i>	PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy) <i>PCR (polymerase chain reaction)</i>	(44)
Dystonia torsyjna <i>Tortion dystonia</i>		(45)
Choroba Huntingtona <i>Huntington disease</i>	qRT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym) <i>qRT-PCR (real-time PCR)</i>	(46, 47, 48)
Mukowiscydoza <i>Cystic Fibrosis</i>	PCR-RFLP (analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych) <i>PCR-RFLP(restriction fragments length polymorphism)</i>	(49)
Zespół Aperta <i>Apert syndrome</i>		(50)
ANEUPLOIDIE		
zespół Downa <i>Down syndrome</i>	RT-MLPA	(51)
	PCR w czasie rzeczywistym <i>real-time quantitative PCR</i>	(52)
	sekwencjonowanie następnej generacji <i>next generation sequencing (NGS)</i>	(27)
zespół Downa, zespół Edwardsa, zespół Patau <i>Down syndrome, Edwards syndrome, Patau syndrome</i>	sekwencjonowanie następnej generacji <i>next generation sequencing (NGS)</i>	(34)

w diagnostyce m.in. takich chorób jak dystrofia miotoniczna czy choroba Huntingtona oraz przeprowadzenie innych analiz, które wymagają powielenia sekwencji DNA dłuższej niż 300 pz. W dystrofii miotonicznej za patogenne przyjmuje się ekspansję genu *DMPK* w obszarze 3'UTR sekwencji CTG powyżej 50 powtórzeń. W wykonanych testach z krwi matek udało się oznaczyć

do 70 powtórzeń CTG, zakres patogeny to jednak do 5000 kopii. W przypadku choroby Huntingtona podłożem molekularnym choroby związane jest z mutacją dynamiczną w genie *HTT* (ekspansja trójnukleotydowych sekwencji CAG). Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadkach gdzie wydłużenia sekwencji przekracza 300 pz wynik analizy był często fałszywie negatywny.

Precyzyjne określenie liczby powtórzeń w przypadku mutacji dynamicznej jest kluczowe dla udzielenia pełnej porady genetycznej. Brak możliwości oszacowania pełnego zakresu praktycznie wyklucza techniki NIPD z diagnostyki prenatalnej chorób powodowanych mutacjami dynamicznymi (tab. I).

3.3 Identyfikacja aneuploidii

Jedną z aplikacji nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej, która wydaje się być bliska wprowadzenia do rutynowej diagnostyki prenatalnej, jest badanie nieprawidłowości chromosomowych płodu związanych ze zmianą liczby chromosomów, zwłaszcza trisomii chromosomu 21 (zespołem Downa), chromosomu 18 (zespół Edwardsa), 13 (zespół Patau) oraz monosomii chromosomu X (zespół Turnera). W większości krajów Europy badanie płodu w kierunku aneuploidii obejmuje testy przesiewowe (np. test PAPP-A) i w przypadku gdy są wskazania, badanie kariotypu. W Polsce test PAPP-A zalecany jest kobietom po 35 r.ż. Badanie to wykonywane jest pomiędzy 10 a 14 tygodniem ciąży. Składa się z oceny biochemicznego parametru we krwi matki, którym jest ciążowe białko osocza (PAPP-A ang. *pregnancy-associated plasma protein A*) i parametrów ultrasonograficznych płodu. W przypadku uzyskania wyników wskazujących na wysokie ryzyko choroby, wykonywane jest badanie kariotypu, które ma już charakter inwazyjny.

W chwili obecnej prowadzone są badania walidacyjne nieinwazyjnych technik diagnostycznych aneuploidii (NIFTY ang. *non-invasive fetal trisomy test*). Testy te początkowo ukierunkowano na diagnostykę trisomii, aktualnie opracowywane protokoły, dają także możliwość wykrycia zmiany liczby chromosomów płci. Zgodnie z wytycznymi *The American Collage of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics* każda kobieta w ciąży powinna być informowana o możliwości wykonania nieinwazyjnego badania NIFTY. Testy te powinny być jednak poprzedzone wykonaniem badania przesiewowego (np. PAPP-A), co ma związek z brakiem danych na temat czułości i swoistości NIFTY dla pacjentek z poza grupy ryzyka (25).

Pierwsze badania NIFTY, których celem była identyfikacja najczęściej występujących trisomii polegały na analizie ilościowej poszczególnych chromosomów. Ze względu na znacznie podwyższone stężenie wolnego DNA w krwiobiegu matki badania w oparciu tylko o ocenę ilościową nie przyniosły pozytywnych wyników. W kolejnych badaniach wykorzystywano markery SNP. Metoda ta jest jednak obarczona dużym błędem, ze względu na zmienny poziom całkowitego wolnego DNA w krwiobiegu matki (26, 27).

Strategia w oparciu o epigenetyczne różnice pomiędzy DNA płodu i matki jako pierwsza dała wymierne rezultaty. W metodzie tej badane są tzw. regiony odmiennie metylowane (DMR ang. *differentially methylated region*) w materiale genetycznym pochodzenia matczynego i płodowego. W badaniu tym, wykorzystuje się technikę MeDIP (ang. *methylation-specific immunoprecipitation*) oraz PCR w czasie rzeczywistym. Pierwszym etapem analizy jest wzbogacanie materiału cfDNA o specyficzne sekwencje metylowane, a następnie ilościowa ocena wybranych regionów o odmiennej metylacji. W oparciu o wyniki analizy statystycznej autorzy pracy wnioskowali, że badanie

ośmiu z dwunastu wybranych DMR byłoby wystarczające do tego, aby prawidłowo zdiagnozować wszystkie badane przypadki (28). Metoda ta jest szczególnie atrakcyjna ze względu na prostotę wykonania oraz małe wymagania sprzętowe. Późniejsze jej modyfikacje znalazły zastosowanie pierwotnie w diagnostyce zespołu Downa a następnie innych trisomii (29). Przedstawiona strategia diagnostyczna w oparciu o różnice epigenetyczne pomiędzy DNA matki i płodu była pierwszą, która realnie stworzyła możliwość zastosowania technik NIPD w praktyce klinicznej.

Coraz to więcej nowoczesnych metod analizy kwasów nukleinowych angażowanych jest do badań NIPD. „Digital PCR” jest przykładem modyfikacji klasycznej techniki PCR o znacznie wyższej czułości niż PCR w czasie rzeczywistym. Matrycę do powielania wybranej sekwencji w dPCR stanowi jedna cząsteczka kwasu nukleinowego, co sprawia, że metoda ta łatwo została zaadoptowana do badań wolnych kwasów nukleinowych. Przykładem praktycznego zastosowania dPCR w technikach NIPD jest ilościowa ocena ekspresji wybranych genów zlokalizowanych na chromosomie 21 oraz genu referencyjnego *GAPDH* leżącego na chromosomie 12. Przedstawiona strategia diagnostyczna umożliwia dokładne oszacowanie liczby chromosomów, jaka występuje w komórce płodu (23).

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS ang. *next generation sequencing*) jest nową techniką molekularną, za pomocą której można przeprowadzić analizę całego genomu (sekwencjonowanie genomowe) bądź regionów kodujących (sekwencjonowanie eksomowe). Pierwsze próby wykorzystania NGS w diagnostyce prenatalnej aneuploidii wykonane zostały tzw. metodą „shot gun”. Sekwencjonowany był cały materiał genetyczny płodu izolowany z krwi matki, natomiast analizie poddane zostały tylko sekwencje pochodzące z chromosomu 21. Zastosowana metodyka była skuteczna jednak zbyt kosztowna, aby wprowadzić ją do rutynowej diagnostyki. Ponadto wymagała skomplikowanej analizy statystycznej (30). Technika NGS w niedalekiej przyszłości znajdzie jednak szersze zastosowanie w NIPD chociażby ze względu na możliwość równoczesnej analizy wielu próbek (31).

Na dzień dzisiejszy wiadomo, że metoda NGS z powodzeniem może być wykorzystana w diagnostyce prenatalnej trisomii chromosomu 21 oraz 18. Badania walidacyjne przeprowadzono na grupach o liczebności 657 (32), 449 (33) 1683 (34) umożliwiły wyznaczenie czułości oraz wrażliwości testu diagnostycznego w oparciu o metodę NGS. Czułość techniki dla zespołu Downa wyznaczono w zakresie 98,6-100%, wrażliwość 97,9-99,8% natomiast dla zespołu Edwardsa parametry te wynoszą odpowiednio 98% i 100%.

Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna z wykorzystaniem wolnych płodowych kwasów nukleinowych znajduje się już w ofercie niektórych laboratoriów diagnostycznych.

4. ZASTOSOWANIE NIPD W BADANIACH KONFLIKTÓW MATCZYNO-PŁODOWYCH

Prawdopodobieństwo wystąpienia konfliktu serologicznego matka – płód jest jednym ze wskazań do wy-

konania inwazyjnej diagnostyki prenatalnej. Już obecnie analiza wolnego płodowego DNA może posłużyć do ustalenia statusu antygenów krwinkowych w zakresie układu grupowego *Rhesus D* (RhD) u płodu. W związku z tym, że w przypadku wystąpienia niezgodności, matki nie posiadają krwinkowych antygenów, które są poszukiwane w materiale genetycznym płodu, badanie nie wymaga odróżnienia płodowego cfDNA od matczyne go cfDNA (35). Badania kliniczne wykazały, że wrażliwość testu z zastosowaniem techniki ilościowej amplifikacji DNA w czasie rzeczywistym na obecność antygenów Rh z zastosowaniem cfDNA wynosi 95-100% natomiast specyficzność 99% (36).

PODSUMOWANIE

Genetyczne badania prenatalne stanowią bardzo ważny element opieki zdrowotnej nad kobietami w ciąży. Ich inwazyjny charakter sprawia, że wywołują one lęk oraz niechęć zarówno u pacjentek, jak i ich rodzin. Możliwość przeprowadzenia badania molekularnego bez konieczności wykonania inwazyjnej procedury pobrania materiału genetycznego w dużym stopniu może zwiększyć zaufanie pacjentek do diagnostyki o tym profilu.

Niezwykle obiecująca jest perspektywa wykorzystania technik NIPD jako badania przesiewowego w kierunku aneuploidii. Aktualnie stosowane metody umożliwiają jedynie na oszacowanie prawdopodobieństwa wystąpienia trisomii. Wykluczenie aneuploidii w badaniu nieinwazyjnym w znacznym stopniu może wpłynąć na komfort psychiczny kobiet, które nie zdecydowałyby się na diagnostykę inwazyjną, natomiast wykrycie nieprawidłowości u płodu pozwala na przygotowanie się do opieki nad chorym dzieckiem.

Niezwykle ważnym elementem wprowadzenia NIPD do praktyki laboratoryjnej są regulacje prawne, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania technik nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej w tzw. aplikacjach poza-medycznych, gdzie istnieje niebezpieczeństwo doboru zarodków np. względem płci.

Techniki NIPD są przykładem niezwykle go postępu, jaki poczynił się w ostatnich latach w dziedzinach biologii molekularnej oraz medycyny i niesie w sobie bardzo duży potencjał, który powinien być dobrze wykorzystany.

PIŚMIENNICTWO

1. Tabor A., Alfirevic Z.: Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal. Diagn. Ther.* 2010, 27(1), 1-7.
2. Caughey A.B., Hopkins L.M., Norton M.E.: Chorionic villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss. *Obstet. Gynecol.* 2006, 108, 612-616.
3. Lo Y.M., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., Redman C.W., Wainscoat J.S.: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997, 16, 485-487.
4. Lo Y.M., Tein M.S., Lau T.K., Haines C.J., Leung T.N., Poon P.M., Wainscoat J.S., Johnson P.J., Chang A.M., Hjelm N.M.: Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* 1998, 62, 768-775.
5. Poon L.L., Leung T.N., Lau T.K., Lo Y.M.: Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 2000, 46, 1832-1834.
6. Tjoo M.L., Cindrova-Davies T., Spasic-Boskovic O., Bianchi D.W., Burton G.J.: Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetal-placental DNA. *Am. J. Pathol.* 2006, 169, 400-404.
7. Alberry M., Maddocks D., Jones M., AbdelHadi M., Abdel-Fattah S., Avent N., Soothill P.W.: Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat. Diagn.* 2007, 27(5), 415-418.
8. Chan K.C., Zhang J., Hui A.B., Wong N., Lau T.K., Leung T.N., Lo K.W., Huang D.W., Lo Y.M.: Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 2004, 50(1), 88-92.
9. Lo Y.M., Zhang J., Leung T.N., Lau T.K., Chang A.M., Hjelm N.M.: Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 1999, 64(1), 218-224.
10. Ng E.K., Leung T.N., Tsui N.B., Lau T.K., Panesar N.S., Chiu R.W., Lo Y.M.: The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin. Chem.* 2003, 49(5), 727-731.
11. Ng E.K., Tsui N.B., Lau T.K., Leung T.N., Chiu R.W., Panesar N.S., Lit L.C., Chan K.W., Lo Y.M.: mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, 100(8), 4748-4753.
12. Hromadnikova I.: Extracellular nucleic acids in maternal circulation as potential biomarkers for placental insufficiency. *DNA Cell. Biol.* 2012, 31(7), 1221-1232.
13. Guo L., Tsai S.Q., Hardison N.E., James A.H., Motsinger-Reif A.A., Thames B., Stone E.A., Deng C., Piedrahita J.A.: Differentially expressed microRNAs and affected biological pathways revealed by modulated modularity clustering (MMC) analysis of human preeclamptic and IUGR placentas. *Placenta.* 2013, 34(7), 599-605.
14. Tsui N.B., Akolekar R., Chiu R.W., Chow K.C., Leung T.Y., Lau T.K., Nicolaides K.H., Lo Y.M.: Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21. *Clin. Chem.* 2010, 56(1), 73-81.
15. Li Y., Wenzel F., Holzgreve W., Hahn S.: Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: influence of size fractionation. *Electrophoresis.* 2006, 27, 3889-3896.
16. Dhallan R., Au W.C., Mattagajasingh S., Emche S., Bayliss P., Damewood M., Cronin M., Chou V., Mohr M.: Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA* 2004, 291, 1114-1119.
17. Pertl B., Sekizawa A., Samura O., Orescovic I., Rahaim P.T., Bianchi D.W.: Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum. Genet.* 2000, 106, 45-49.
18. Hyett J.A., Gardener G., Stojilkovic-Mikic T., Finning K.M., Martin P.G., Rodeck C.H., Chitty L.S.: Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat. Diagn.* 2005, 25(12), 1111-1116.
19. Costa J.M., Benachi A., Gautier E.: New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N. Engl. J. Med.* 2002, 9, 346(19), 1502.

20. Galbiati S., Smid M., Gambini D., Ferrari A., Restagno G., Viora E., Campogrande M., Calza S., Ferrari M., Cremonesi L.: Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum. Genet.* 2005, 117, 243-248.
21. Sekizawa A., Kondo T., Iwasaki M., Watanabe A., Jimbo M., Saito H., Okai T.: Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 2001, 47, 1856-1858.
22. Wright C.F., Wei Y., Higgins J.P., Sagoo G.S.: Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res. Notes.* 2012, 5, 476.
23. Tjoa M.L., Cindrova-Davies T., Spasic-Boskovic O., Bianchi D.W., Burton G.J.: Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetoplacental DNA. *Am. J. Pathol.* 2006, 169, 400-404.
24. Chitty L.S., Griffin D.R., Meaney C., Barrett A., Khalil A., Pajkrt E., Cole T.J.: New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2011, 37, 283-289.
25. Committee Opinion No. 545: Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet. Gynecol.* 2012 Dec;120(6), 1532-1534. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics.
26. Lo Y.M., Tsui N.B., Chiu R.W., Lau T.K., Leung T.N., Heung M.M., Gerovassili A., Jin Y., Nicolaidis K.H., Cantor C.R., Ding C.: Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat. Med.* 2007, 13(2), 218-223.
27. Lo Y.M., Lun F.M., Chan K.C., Tsui N.B., Chong K.C., Lau T.K., Leung T.Y., Zee B.C., Cantor C.R., Chiu R.W.: Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007, 104, 13116-13121.
28. Papageorgiou E.A., Karagrigoriou A., Tsaliki E., Velissariou V., Carter N.P., Patsalis P.C.: Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat. Med.* 2011, 17(4), 510-513.
29. Della Ragione F., Mastrovito P., Campanile C., Conti A., Papageorgiou E.A., Hultén M.A., Patsalis P.C., Carter N.P., D'Esposito M.: Differential DNA methylation as a tool for noninvasive prenatal diagnosis (NIPD) of X chromosome aneuploidies. *J. Mol. Diagn.* 2010, 12(6), 797-807.
30. Fan H.C., Quake S.R.: Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. *PLoS One.* 2010, 5(5), e10439.
31. Chiu R.W., Sun H., Akolekar R., Clouser C., Lee C., McKernan K., Zhou D., Nicolaidis K.H., Lo Y.M.: Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Clin. Chem.* 2010, 56, 459-463.
32. Chiu R.W., Akolekar R., Zheng Y.W., Leung T.Y., Sun H., Chan K.C., Lun F.M., Go A.T., Lau E.T., To W.W., Leung W.C., Tang R.Y., Au-Yeung S.K., Lam H., Kung Y.Y., Zhang X., van Vugt J.M., Minekawa R., Tang M.H., Wang J., Oudejans C.B., Lau T.K., Nicolaidis K.H., Lo Y.M.: Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ.* 2011, 11, 342:c7401.
33. Ehrich M., Deciu C., Zwiefelhofer T., Tynan J.A., Cagasan L., Tim R., Lu V., McCullough R., McCarthy E., Nygren A.O., Dean J., Tang L., Hutchison D., Lu T., Wang H., Angkachatchai V., Oeth P., Cantor C.R., Bombard A., van den Boom D.: Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011, 205, 1-11.
34. Palomaki G.E., Deciu C., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Neveux L.M., Ehrich M., van den Boom D., Bombard A.T., Grody W.W., Nelson S.F., Canick J.A.: DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet. Med.* 2012, 4, 296-305.
35. Guz K., Orzińska A., Kopeć I., Krzemienowska M., Smolarczyk-Wodzyńska J., Brojer E.: Aktualny stan i perspektywy nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej w konfliktach maczyno- płodowych *Journal of Transfusion Medicine.* 2010, 4, 144-154.
36. Geifman-Holzman O., Grotegut C.A., Gaughan J.P.: Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood – a meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2006, 195, 1163-1173.
37. Saito H., Sekizawa A., Morimoto T., Suzuki M., Yanaihara T.: Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet.* 2000, 356, 1170.
38. Li Y., Holzgreve W., Page-Christiaens G.C., Gille J.J., Hahn S.: Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma – case report. *Prenat. Diagn.* 2004, 24, 896-898.
39. Li Y., Page-Christiaens G.C., Gille J.J., Holzgreve W., Hahn S.: Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. *Prenat. Diagn.* 2007, 27, 11-17.
40. Sirichotiyakul S., Charoenkwan P., Sanguanserm Sri T.: Prenatal diagnosis of homozygous alpha-thalassemia-1 by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Prenat. Diagn.* 2011, 26, 45-49.
41. Lo Y.M., Chan K.C., Sun H., Chen E.Z., Jiang P., Lun F.M., Zheng Y.W., Leung T.Y., Lau T.K., Cantor C.R., Chiu R.W.: Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci. Transl. Med.* 2010, 8, 61-91.
42. Tsui N.B., Kadir R.A., Chan K.C., Chi C., Mellars G., Tuddenham E.G., Leung T.Y., Lau T.K., Chiu R.W., Lo Y.M.: Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood.* 2011, 117, 3684-3691.
43. Au P.K., Kwok Y.K., Leung K.Y., Tang L.Y., Tang M.H., Lau E.T.: Detection of the S252W mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in fetal DNA from maternal plasma in a pregnancy affected by Apert syndrome. *Prenat. Diagn.* 2011, 31, 218-220.
44. Amicucci P., Gennarelli M., Novelli G., Dallapiccola B.: Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin. Chem.* 2000, 46, 301-302.
45. Meaney C., Norbury G.: Noninvasive prenatal diagnosis of early onset primary dystonia I in maternal plasma. *Prenat. Diagn.* 2009, 29, 1218-1221.

46. González-González M.C., Trujillo M.J., Rodríguez de Alba M., García-Hoyos M., Lorda-Sánchez I., Díaz-Recasens J., Ayuso C., Ramos C.: Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat. Diagn.* 2003, 23, 232-234.
47. González-González M.C., García-Hoyos M., Trujillo-Tiebas M.J., Bustamante Aragonés A., Rodríguez de Alba M., Diego Alvarez D., Díaz-Recasens J., Ayuso C., Ramos C.: Improvement in strategies for the non-invasive prenatal diagnosis of Huntington disease. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2008, 25, 477-481.
48. Bustamante-Aragones A., Trujillo-Tiebas M.J., Gallego-Merlo J., Rodríguez de Alba M., Gonzalez-Gonzalez C., Cantalapiedra D., Ayuso C., Ramos C.: Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study. *Eur. J. Neurol.* 2008, 15, 1338-1344.
49. González-González M.C., García-Hoyos M., Trujillo M.J., Rodríguez de Alba M., Lorda-Sánchez I., Díaz-Recasens J., Gallardo E., Ayuso C., Ramos C.: Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat. Diagn.* 2002, 22, 946-948.
50. Chiu R.W., Lau T.K., Cheung P.T., Gong Z.Q., Leung T.N., Lo Y.M.: Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin. Chem.* 2002, 48, 778-780.
51. Deng Y.H., Yin A.H., He Q., Chen J.C., He Y.S., Wang H.Q., Li M., Chen H.Y.: Non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011, 49, 641-646.
52. Tsaliki E., Papageorgiou E.A., Spyrou C., Koumbaris G., Kypri E., Kyriakou S., Sotiriou C., Touvana E., Keravnou A., Karagrorgiou A., Lamnissou K., Velissariou V., Patsalis P.C.: MeDIP real-time qPCR of maternal peripheral blood reliably identifies trisomy 21. *Prenat. Diagn.* 2012, 32, 996-1001.

Wkład Autorów/Authors' contributions

Według kolejności/According to the order of the Authorship

Konflikt interesu/Conflicts of interest

Autorzy pracy nie zgłaszają konfliktu interesów.
The Authors declare no conflict of interest.

Nadesłano/Received: 10.09.2013 r.

Zaakceptowano/Accepted: 01.10.2013 r.

Published online/Dostępne online

Adres do korespondencji:
Sylwia Olimpia Rzońca
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka
ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa
e-mail: sylwia.rzonca@imid.med.pl