

Biyokimyasal Aneoplidi Tarama Testleri

Biochemical Aneuploidy Screening Tests

Nilüfer AKGÜN, Ayla ESER, Candan DUVAN

Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D., Ankara, Türkiye

ÖZ

Tarama testleri belli bir hastalık riski veya anomali için yüksek riskli gruba saptamak amacı ile kullanılan testlerdir. Tarama testlerinin amacı sağlıklı çocuk sahibi olabilmek için en erken zamanda anomalili bebeği saptamaktır. İyi bir tarama testi kolay uygulanabilir, güvenilirliği yüksek ve maliyeti düşük olmalıdır. Bu derlemenin amacı, Trizomilerin saptanması için en uygun testin gebelik haftasına göre belirlenmesi ve testlerin anomali saptama başarıları üzerinde durulacaktır.

Anahtar Kelimeler: Gebelik, trizomiler, tarama testleri

ABSTRACT

Screening tests are used to detect high risk for a certain disease or anomalies. In order to have healthy children, screening test is applied to find out directly to determine the anomalous baby. While a good screening test is easily applicable, high reliable and cost-effective. This review emphasized that determining the most appropriate test for the detection of trisomy according to the gestational age and focus on the anomaly detection achievements of these tests.

Keywords: Pregnancy, trisomy, screening tests

Giriş

Kromozomal anormalliklerin çoğunluğundan trizomi 21 (Tr21), trizomi 18 (Tr18) ve trizomi 13 (Tr13) sorumludur. Canlı doğan bebeklerdeki insidansları için Tr21, Tr 18, Tr 13 sırasıyla 1/800, 1/6000, 1/10000'dir (1). Saptanabilen erken gebelik kayıplarının yarısından fazlası kromozomal anomalidir ve aneoplidi ölü doğum ve neonatal ölümlerin % 6-11'ini kapsar (1). Günümüzde tüm gebeliklerin Tr21'li gebelik riskinin %71 arttığı gözlenmiştir (2). Bu artışın önemli nedeni günümüzde teknolojik gelişmeler ile ileri maternal yaş gebeliklerinin artmasına bağlı olarak maternal mayoz sırasında daha sık meydana gelen ayrılmanın olduğu düşünülmektedir (2).

Tarama testlerinin başarısı sensitivite veya yakalama oranı (Detection Rate) ile belirlenebilir, DR risk değerlendirmesi sonucunda etkilenmiş gebeliği tespit edebilme yüzdesi ile açıklanır. Yalancı pozitiflik hızı (False Positive Rate) ise tüm raporların içerisinde etkilenmemiş fetuslara yüksek risk verilme yüzdesi ile tanımlanır. OAPR (Odds of being affected given a positive result) ise pozitif öngörü değeri'ne (positive predictive value) eşdeğerdir. Etkilenmiş gebelerin etkilenmemiş pozitif sonuç veren gebelere oranını yansıtır. İyi bir tarama testinin DR ve OAPR'si yüksek, FPR'si düşük olmalıdır (3). Pozitif tarama testleri sonucunda diagnostik testlerin yapılması (koryon villus örnekleme (CVS), amniyosentez) önerilir ki bu testler ile gebelik kaybı oranı yaklaşık % 0.5-1'dir (4).

ACOG 2007 yılında 20 haftanın altında tüm gebelere tarama testinin yapılmasını ve anne yaşından bağımsız olarak isteyen tüm gebelere tanısal test

uygulanmasını önermiştir. ACOG bazı gruplara ise tarama testinden çok tanısal testin yapılmasının daha uygun olacağını belirtmiştir (5).

- 1) Önceki gebeliklerde fetal Trizomi öyküsü
- 2) Devam eden gebelikte en az bir majör veya iki minör yapısal anomali gözlenmesi
- 3) Anne ya da babada kromozomal translokasyon, inversiyon da aneoplidi bulunması

Down Sendromu (DS) Tarama Testleri

Her kadın kromozom defektli bebek doğurma riskine sahiptir. Riski belirlemede temel faktörler anne yaşı, gebelik yaşı ve kromozom defekti öyküsü oluşturur. Gebeliğin farklı dönemlerinde yapılan tarama testleri ile ortaya çıkan yeni risk faktörleri bu temel risk ile çarpılarak son risk hesaplanır. Non invaziv Tr21 tarama testlerinde anne yaşı ile ilişkili risk maternal serum markerları seviyeleriyle birlikte yorumlanır (6). Tr21 taramasında maternal biyokimyasal belirteçler dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Tarama testlerinde kullanılan belirteçlerin tümü MOM (multiple of median) değeri ile ifade edilir.

Tarama Stratejileri.

- Maternal Yaş
- 1. trimester tarama
- 2. trimester tarama

Yazışma Adresi/ Correspondence Address:
Nilüfer Akgün
Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın
Hastalıkları ve Doğum A.B.D., Ankara, Türkiye
Tel/Phone: 0505 918 02 99
E-mail: niluferakgun80@hotmail.com

Geliş Tarihi/ Received: 05/03/2015
Kabul Tarihi/ Accepted: 20/03/2015

- Kombine (1+2. trimester) tarama
- Entegre
- Tam entegre
- Serum entegre
- Sequential (Ardışık)
- Independent (Bağımsız)
- Stepwise (Basamaklı)
- Contingent (Şartlı)
- Non invaziv prenatal testler (NIPT)

Maternal Yaş

Tarama testlerinde tek başına anne yaşı Tr21 çocuklar için ilk risk faktörüdür. Yaşa bağlı Down sendromlu çocuk doğurma artışı non lineerdir. Anne yaşı 15-25'li yaşlarda neredeyse sabit iken, 25-35' lde yavaşça artma eğilimine girer, 35-40' lı yaşlarda yaklaşık 4 kat, 40-45 'li yaşlarda ise 10 kat artar 45 yaşından sonra ise DS çocuk doğurma riskinin daha fazla artmadığı çalışmalarda gözlenmiştir(7).

Birinci Trimester Biyokimyasal Tarama Testleri

Gebeliğin 11 ile 14. Haftaları arasında maternal serum plazma protein A (PAPP-A) ve β -hCG değerleri ölçülür. DS gebelikler öploid gebelikler ile karşılaştırıldığında PAPP-A seviyesinde azalma ve hCG seviyesinde artış izlenir (8) Anne yaşı ve nukal translusens (NT) ile kombine edilerek anomali riski tayini yapılır (9).Kombine birinci trimester taraması 11. Haftada %5 yanlış pozitiflik ile DS' luların %87 si tespit edilebilirken, bu oran 13. Gebelik haftasında %82 'ye düşmektedir. (sadece NT ile bu oranlar %70 ve %64 'tür.)(8).

Birinci Trimester Sonografik Tarama

Fetusun 11-14. gebelik haftaları arasında (CRL 45- 84mm) ense cildinin altında içinde sıvı olan alanın kalınlığının ölçülmesi DS taramasında kullanılır(10). Lenfatik kanalların geç gelişimine bağlı olduğu düşünülmektedir. Artan kalınlıkla birlikte DS dışındaki kromozom anomalileri ve konjenital kalp anomalileri, diafragma hernisi gibi kromozom dışı anomaliler, iskelet displazileri ve kötü gebelik sonuçlarıyla belirgin şekilde ilişkilidir. 11. Haftada NT ölçümü (maternal yaş ile birlikte)%5 yanlış pozitiflik oranı ile Tr 21 vakalarının %70 'ini tespit etmektedir, ancak 13. Haftada bu belirleyicilik %64 'lere gerilemektedir(8). NT kalınlığı gestasyonel yaş ile artar, CRL 45 mm iken 1.2 ile 2.1 mm, 84 mm iken ise 1.9 to 2.7 mm aralığındadır(11).NT ölçümü, ölçümü yapanın deneyimi ve kullanılan aletin kalitesinden etkilenir. Bu nedenle uygun eğitim ve sürekli kalite yönetimi NT ölçümüne dahil edilmelidir (12,13).Birinci trimester fetal anöploid taramasında ayrıca nazal kemik sonografisi, yüz açısı,duktus venosus Dopler analizi, trikuspid geri akım ölçümleri de vardır.

İkinci Trimester Üçlü Tarama Testi

Bu testte kullanılan belirteçler total HCG, unkonjuge E3, MSAFP'dir. Gebeliğin 15-21. Haftaları arasında yapılmalıdır. HCG, sinsityo trofoblastlardan salgılanan bir glikoproteindir. Gebeliğin 60-70. gününe kadar artar, sonra plato çizer. DS plasenta tarafından gebelikte birlikte üretilmeye başlanan hCG' nin down sendromundaki ekstra kromozomun hCG üretim mekanizması üzerine etkisi ile anne kanında yükseldiği, down sendromu ile etkilenmiş fetusun gebelik haftası gerisinde kalarak küçük olması nedeniyle ilgili dönem için AFP, uE3 ve PAPP-A

hormonlarının düşük bulunduğu düşünülmektedir. Tüm trizomilerde bu üç hormonun kan düzeyi değişiklik gösterir (Tablo 1).

Tablo 1: Kromozom anomalileri ve biyokimyasal belirteçler (14).

	İlk trimester markerları		İkinci trimester markerları			
	PAPP-A	Beta hcg	AFP	uE3	hCG	İnh A
Tr 21 (Down send.)	↓	↑	↓	↓	↑	↑
Tr 18 (Edward's send.)	↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓	↔
Tr13 (Patau send.)	↓↓	↓	↔	↔	↔	↔
45 XO (Turner send.)	↓	↓↑	↓	↓	↓	↓
Triploidi (paternal)	↓	↑↑	↔	↓	↑	↑
Triploidi (maternal)	↓	↓↓	↔	↓	↓	↓

İkinci Trimester Dörtlü Tarama Testi

Gebeliğin 14. ve 20. haftaları arasında yapılır. Üçlü Tarama Testi'ne (AFP, hCG ve free estriol) inhibin A hormonu eklenmiştir. İnhibin-A önce korpus luteum sonra plasentadan salgılanır, ikinci trimestrede kan düzeyi değişmez. DS saptama oranı MSAFP, total HCG, uE3 ve İnhibin-A'dan oluşan dörtlü testle %5 yanlış pozitiflikle DS tespit etme oranı %81' e yükselir(8,15).DS olmayan diğer anöploidilerde ise (Tr18, Tr 13, Turner sendromu) 1.trm kombine test ile ikinci trimester dörtlü tarama testinin kıyaslamasında ise 1. trm kombine testin anöploid saptama oranının %78 (yanlış pozitif oranı %6), dörtlü tarama testinin ise %69 (yanlış pozitif oranı % 8.9) olduğu belirlenmiştir (16).

Tablo 2 : Testlerin down sendromu yakalama yüzdeleri

Test Kombinasyonları	Test kombinasyonu %(15)
Maternal Yaş	31
AFP	42
hCG (2. trimester)	53
uE3	52
İnhibin A	59
Üçlü test	74
Dörtlü test	81
PAPP-A	67
hCG (1.trimester)	32
Birinci trimester kombine	80
Birinci trimester biyokimya	60
PAPP-A, AFP, uE3, hCG, İnh-A	86
PAPP-A, NT, AFP, uE3, hCG, İnh-A	95

Kombine birinci ve ikinci trimester taraması

Günümüzde birinci trimester kombine tarama testi 11. Gebelik haftasına kadar erken yapıldığında ikinci trimester dördü taramasından üstündür (8).

Entegre Tarama

İki basamaklı bir tarama protokolüdür tüm tarama basamakları sonlanana kadar sonuç verilmez. 10-13. hafta arasında NT ölçümü ile birlikte serum PAPP-A değerlendirmesini takiben 15-16. Gebelik haftaları arasında AFP, hCG, uE3 ve inhibin-A için ikinci bir serum değerlendirilmesi yapılır. Bu tam entegre testin %5 yanlış pozitiflikle (FPR) DS tespit etme oranı %95'tir (15). Serum entegre testi olarak bilinen bir varyantı mevcuttur. Bu testte PAPP-A ve ikinci trimesterde AFP, hCG, uE3 ve inhibin-A olmak üzere sadece kan testi alınır. NT ölçümü olmayan bu testin %5 yanlış pozitiflikle (FPR) DS tespit etme oranı %86' dır (15). Entegre testin kombine test ve dördü tarama testlerine göre avantajı aynı DS yakalama oranında (DR) yanlış pozitifliğinin (FPR) daha düşük olmasıdır (17).

Kademeli Tarama (Step Wise Sequential test)

Bu yöntemle entegre testin ilk trimester tarama bölümünde eğer yüksek risk ortaya çıkmışsa bu hastalara CVS önerilir. Kademeli taramanın entegre taramaya göre avantajı 16-18. Haftayı beklemeden birinci trimesterde CVS' ten yararlanma imkanındır. Ancak kademeli teste bağlı pozitif prediktif değerini azalması ve yanlış pozitiflik oranı kaçınılmazdır (18).

Olasılıklı Test (Contingent Test)

DS için çok yüksek risk taşıyan hastalara ($\geq 1/50$) direkt invaziv tanısal test önerilir, çok düşük risk taşıyan hastalara (1/2000) ek tarama önerilmez. Risk oranı 1/50 ile 1/2000 arasında olanlara ise ikinci trimester tarama testi önerilir. 2. Trimester tarama testi birinci trimester tarama testi ile birlikte ortak risk oranı hesaplanır. FASTER çalışmasında 32.249 etkilenmemiş ve 86 DS gebelik değerlendirilmiş %4.5 yanlış pozitiflik oranı ile %91 DS tespit etme oranı bulunmuştur (19).

1. ve 2. trimester tarama testlerini karşılaştıran 2 büyük çalışma FASTER (First and Second Trimester Evaluation of Risk (9) ve SURUSS (The Serum Urine and Ultrasound Screening Study) (15) çalışmalarıdır. SURUSS İngiltere'de 47.507 gebe ile 25 merkezde yapılmıştır. FASTER çalışması ise 38.167 gebe 15 merkezde değerlendirilmiş olup çalışma sonuçları, SURUSS çalışması ile çok benzerlik göstermektedir (9).

Tablo 3: Tarama testlerinin DS yakalama oranları

TEST	FASTER			SURUSS	
	Yakalama Oranı Detection rate (%)	Yanlış pozitif Oranı FPR (%)	Detection rate (%)	FPR (%)	Tarama yapılan her 100 000 kadında girişime bağlı kayıp
Entegre	85	0.8	85	0.9	6
	95	5.0	90	2.1	15
Serum Entegre	85	4.4	85	3.9	28
	95	17	90	7.4	53
Kombine	85	4.8	85	4.3	35
	95	21	90	8.4	60
Dördü	85	7.3	85	6.2	45
	95	22	90	10.6	76
Üçlü	85	14	85	9.3	67
	95	32	90	14.7	106

Non İnvaziv Prenatal Testler (NIPT)

Bu yöntemle maternal plazmadaki hücrelerden serbest fetal DNA (fDNA) elde edilip kromozomal ve genetik anormallikler belirlenebilmektedir(20). Serbest fDNA ancak 10. haftadan sonra maternal plazmada belirlenebilir (21). fDNA doğum sonrası maternal kanda hızla azalır ve postpartum iki saat sonra ise kanda gösterilemez(21). Testin sonuç verebilmesi için en az %4 serbest DNA fragmanına ihtiyaç vardır (22). Test sonuçları örnek alındıktan yaklaşık 4-10 gün içerisinde sonuçlanmaktadır. Özellikle obezitenin etkileyebildiği %2-5 hastada ise düşük fDNA seviyelerinden dolayı sonuç elde edilememektedir (21). fDNA'nın kaynağı trofoblast hücreleri olduğundan %1-1,5 oranında plasentada gözlenen plasenta ile sınırlı mozaizmin yanlış pozitif ya da yanlış negatif tanıya yol açabileceği kabul edilmektedir(23).

%100 duyarlılık ve özgüllüğe ulaşamadığından testin pozitifliği durumunda sonucun amniyosentez (AS) ve koryon villus biyopsisi (KVB) gibi geleneksel yöntemlerle elde edilen dokularda kromozom analizleri ile doğrulanması gerekir. Bu yöntem *tarama testi* olarak kabul edilmektedir ve genel olarak "*non-invasive prenatal test*" (NIPT) olarak adlandırılmaktadır (24,25).

Bugüne kadar yapılan dolaşımdaki (fDNA'yı) maternal DNA'dan ayırma çalışmalarında serbest fDNA tek nükleer polimorfizm (single nucleer polimorfisms SNPs) kullanılmıştır (15), ayrıca fetal belirleyici olarak Y-kromozomuna özgü diziler de kullanılabilir. Klinikte fDNA tayiniyle fetal cinsiyet tayini özellikle X'e bağlı geçiş gösteren (konjenital adrenal hiperplazi, Dushene musküler distrofi ve hemofili gibi hastalıkların analizinde (26) fetal RhD genotiplendirmesi (27) özellikle paternal kaynaklı tek gen bozukluklarının saptanmasında (Akondroplazi, hemoglobinopatiler, kistik fibroz, Huntington hastalığı, Miyotonik distrofi gibi giderek genişleyen bir çeşitlilikte kalıtsal hastalıkların test edilmesine kullanılabilir (28,29). Rh uygunsuzluğunda da cffDNA ile fetal RhD tayini yapmak mümkündür. Fetal Rh tayini için tarama programlarının maliyet-etkinlik sorunu olduğundan henüz rutin fetal Rh taraması yapılmamaktadır. Bu aşamada, NIPT'in ancak immünize Rh durumunda fetal RhD tayini için kullanılması önerilmektedir (30).

fDNA testleri öncelikle PCR(polimeras chain reaction) yöntemi ile taranmaya başlanılmış, çalışmalar ilerledikçe Tr21 genindeki küçük değişikliklerinde saptanması için fetal spesifik marker fetal mRNA' nın PLCA4 plasentaya özgül gen (*PLAC4* lokusuna) ile taranabileceği gösterilmiştir. Kromozom 21 düzeylerini belirtmek için *PLAC4* geni üzerindeki SNP bölgeleri kullanılmıştır. Fetüsün SNP için heterozigot olduğu olgularda *PLAC4* mRNA kopyaları her bir alelden eşit oranda gelmekte (1:1 oranı) ve normal ploidiyi göstermektedirler. Anöploidi varlığında ise bu oran 2:1 olmaktadır (31). Alternatif bir yaklaşımda Tr21'li fetüs veya plasenta ile annenin DNA metilasyonu farklılıklarını tanımlayarak, maternal plazmada hem maternal hem de paternal fetal aleller tespit edilebilmektedir. Bu teknikle kalıtılan farklı paternal ve maternal metilasyona sahip lokuslara bakılmaktadır (30).

NIPT testi ile otozomal anöploidiler, trizomiler, sex kromozomal hastalıkları, fetal cinsiyet belirlenmesi, Rh izoimmünizasyonunda ve tek gen bozukluklarının tanısında kullanılabilir. Ayrıca çalışmalarda preeklampsi(32) plasenta dekolmanı (33), hiperemesis gravidarum(34) preterm eylem(35) ve polihidramnios(36) gibi gebelik komplikasyonlarında da serbest fDNA seviyelerinin yükseldiği belirlenmiştir.

NIPT testi ayrıca Trizomi 18 (Tr 18), Trizomi 13 (T13) 45X0 gibi daha sık gö-

rülen kromozom anomalileri için de tarama testi olarak kullanılmaktadır(37). NİPT, Tr21 dışındaki trizomiler için daha düşük yakalama oranlarına sahiptir. Bunun nedeni diğer kromozomların boyutunun daha büyük olmasıdır. Guanin Sitozin oranındaki artış (38, 39) NİPT ile diğer trizomilerin saptanma oranı Tr 18 için %97.4, Tr 13 için %83.3 sensivite ile belirlenmiştir(30), Turner send için ise %90.5 olarak bildirilmiştir (21).

Testi sınırlayan etmenler ise, testin bütün kromozomal anormallikleri saptayamaması, f DNA testlerinin uygulandığı merkezlerin yalnızca büyük merkezlerde yapılabilmesine bağlı teste ulaşım açısından kırsal alanlarda bir eşitsizliğe yol açmasıdır (40). Ayrıca bugün NİPT maliyeti rutin tarama için yüksektir ancak önümüzdeki yıllarda maliyetin hızla düşmesi beklenmektedir. Bu aşamada henüz cfDNA ile NİPT rutin tarama programı yoktur. İleri tarama testi olarak kabul edilmeli, yüksek risk grubuna önerilmeli, düşük risk grubuna ve çoğul gebeliklere ise önerilmemelidir, bu gruplarda rutin tarama testleri kullanılmalıdır (21,30).

Gelecekte non invaziv prenatal DNA testi tüm gen yapısını yüksek rezolusyonla tarayabilecektir(41). Ancak unutmamak gerekir prenatal tarama testleri olasılık testleridir. Kesin sonuç sadece amniyosentez ve koryon villus biyopsisi ile karyotip analizi yapılarak elde edilebilir. Testin pozitif olması halinde hasta mutlaka amniyosenteze yönlendirilmeli, negatif sonuçta ise çok az bir olasılıkla fetüs etkilenmiş olabilir şeklinde yorumlanmalıdır.

Sonuç

Tr21 tarama testlerinden entegre test en başarılı sonucu vermekte, sonrasında sırasıyla , birinci trimester kombine test ile 2. trimester dörtlü test birbirine yakın sonuçlar belirtir. İlk trimesterde tarama testinin yapılamadığı koşullarda en iyi sonucu dörtlü test verir (15).

NİPT testi antenatal bakım için heyecan verici bir şekilde gelişmektedir. Fetal DNA dizilerinin tespit edilebilirliği yakın gelecekte bazı fetal hastalıklar için invaziv yöntemlerin riskini azaltabilir.

Kaynaklar

1. Driscoll DA1, Gross S. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy. N Engl J Med. 2009; 11;360:2556-62.
2. Collins VR, Muggli EE, Riley M, et al. Is Down syndrome a disappearing birth defect? J Pediatr 2008; 152:20
3. Weisz B1, Rodeck CH. An update on antenatal screening for Down's syndrome and specific implications for assisted reproduction pregnancies. Hum Reprod Update. 2006;12:513-8.
4. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. Fetal Diagn Ther 2010;27:17.
5. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 88, December 2007. Invasive prenatal testing for aneuploidy. Obstet Gynecol. 2007;110:1459-67.
6. Resta RG. Changing demographics of advanced maternal age (AMA) and the impact on the predicted incidence of Down syndrome in the United States: Implications for prenatal screening and genetic counseling. Am J Med Genet A 2005; 133:31.
7. Ekelund CK, Jørgensen FS, Petersen OB, et al. Impact of a new national screening policy for Down's syndrome in Denmark: population based cohort study. BMJ 2008; 337:2547.
8. Malone FD1, Canick JA, Ball RH, First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. N Engl J Med. 2005 Nov 10;353:2001-11.
9. Wald NJ, George L, Smith D, et al. Serum screening for Down's syndrome between 8 and 14 weeks of pregnancy. International Prenatal Screening Research Group. Br J Obstet Gynaecol 1996; 103:407.
10. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. Am J Obstet Gynecol 2004; 191:45.
11. Kagan KO, Etcheagaray A, Zhou Y, Wright D, Nicolaides KH. Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. Ultrasound Obstet Gynecol 2009;34:14-18.
12. Schielen PC, van Leeuwen-Spruijt M, Belmouden I, et al. Multi-centre first-trimester screening for Down syndrome in the Netherlands in routine clinical practice. Prenat Diagn 2006; 26:711.
13. Hermann M, Fries N, Mangione R, et al. Nuchal translucency measurement: are qualitative and quantitative quality control processes related? Prenat Diagn 2013; 33:770.
14. UptoDate 2014 Down syndrome: Prenatal screening overview
15. Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty L, Mackinson First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). AM.J Med Screen. 2003;10:56-104
16. Breathnach FM, Malone FD, Lambert-Messierian G, Cuckle HS, Porter TF, Nyberg DA et al. First- and second-trimester screening: detection of aneuploidies other than Down syndrome. Obstet Gynecol. 2007;110:651-7.
17. Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. N Engl J Med 1999; 341:461.
18. Platt LD1, Greene N, Johnson A Obstet Gynecol. 2004;104:661-6. Sequential pathways of testing after first-trimester screening for trisomy 21.
19. Cuckle HS, Malone FD, Wright D et al. Contingent screening for Down syndrome results from the FaSTER trial. Prenat Diagn. 2008;28:89-94
20. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997 16;350:485-7
21. Hyett J, Non-invasive prenatal testing for Down syndrome Aust Prescr 2014;37:51-5
22. Fan HC, Quake SR Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. PLoS One. 2010 3;5:10439
23. Benn P, Cuckle H, and Pergament E. Non-invasive prenatal diagnosis for Down syndrome: the paradigm will shift, but slowly. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012; 39: 127-130
24. 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;207:374.1-6.
25. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy. Committee Opinion No.545. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2012;120:1532-4.
 26. Hill M, Finning K, Martin P, Hogg J, Meaney C, Norbury G, et al. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Genet* 2011;80:68e75.
 27. Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn* 2009;29:1017
 28. Norbury G, Norbury CJ. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: how close are we? *Semin Fetal Neonat Med.* 2008; 13:76-83
 29. Lench N, Barrett A, Fielding S, McKay F, Hill M, Jenkins L, et al. The clinical implementation of non-invasive prenatal diagnosis for single-gene disorders: challenges and progress made. *Prenat Diagn* 2013;33:555-62.
 30. Twiss P, Hill M, Daley R, Chitty LS. Non-invasive prenatal testing for Down syndrome. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014;19:9-14.
 31. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007;13:218-23
 32. Lo YM, Leung TN, Tein MS, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999; 45:184.
 33. Lau TK, Lo KW, Chan LY, et al. Cell-free fetal deoxyribonucleic acid in maternal circulation as a marker of fetal-maternal hemorrhage in patients undergoing external cephalic version near term. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:712
 34. Sugito Y, Sekizawa A, Farina A, et al. Relationship between severity of hyperemesis gravidarum and fetal DNA concentration in maternal plasma. *Clin Chem* 2003; 49:1667.
 35. Leung TN, Zhang J, Lau TK, et al. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998; 352:1904
 36. Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, et al. High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report. *Prenat Diagn* 2000; 20:838
 37. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, Nicolaides KH. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:322.1-5.
 38. Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012;14:296-305.
 39. Ashoor G, Syngelaki A, Wang E, et al. Trisomy 13 detection in the first-trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:21-5.
 40. Coory MD, Roselli T, Carroll HJ. Antenatal care implications of population-based trends in Down syndrome birth rates by rurality and antenatal care provider, Queensland, 1990-2004. *Med J Aust* 2007;186:230-4
 41. Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H, Sehnert AJ, Rava RP Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 2013 Feb 7;92:167-76