

Utilização de ácidos nucleicos fetais livres no plasma materno para o diagnóstico pré-natal: realidade do Brasil neste cenário

RENATA MOSCOLINI ROMÃO¹, JOSÉ EDUARDO LEVI², MÁRIO HENRIQUE BURLACCHINI DE CARVALHO³, ROSSANA PULCINELI VIEIRA FRANCISCO³, ANTÔNIO GOMES DE AMORIM FILHO⁴, MARCELO ZUGAIB⁵

¹ Mestre em Ciências pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP); Aluna de Doutorado pelo Departamento de Obstetria e Ginecologia da FMUSP, São Paulo, SP, Brasil

² Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (USP); Professor Colaborador, Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical, USP, Chefe do Departamento de Biologia Molecular da Fundação Pró-sangue/Hemocentro de São Paulo; Consultor de Pesquisa do Banco de Sangue do Hospital Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil

³ Professores Livre Docentes da Disciplina de Obstetria do Departamento de Obstetria e Ginecologia, USP, São Paulo, SP, Brasil

⁴ Mestre em Biologia, USP; Médico Assistente da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas, USP, São Paulo, SP, Brasil

⁵ Professor Titular da Disciplina de Obstetria do Departamento de Obstetria e Ginecologia, USP, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

A descoberta de ácidos nucleicos fetais livres no plasma de gestantes possibilitou o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico pré-natal não invasivo para a determinação do sexo e do Rh fetal. Esses testes foram implantados no sistema de saúde pública de diversos países da Europa há mais de cinco anos. As novas possibilidades de aplicação diagnóstica dessas tecnologias são a detecção de aneuploidias cromossômicas fetais, de doenças monogênicas fetais e de distúrbios relacionados com a placenta, temas pesquisados intensivamente por diversos grupos ao redor do mundo. O objetivo deste estudo é expor a situação brasileira no âmbito de pesquisa e utilização clínica dos testes disponíveis comercialmente que utilizam esses marcadores moleculares plasmáticos, ressaltando as vantagens, tanto econômicas quanto de segurança, que os testes não invasivos têm em relação aos atualmente utilizados em nosso sistema de saúde pública.

Unitermos: Diagnóstico não invasivo; pré-natal; ácidos nucleicos livres; DNA fetal; plasma materno; Brasil.

©2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

SUMMARY

Use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for prenatal diagnosis: the reality of this scenario in Brazil

The discovery of cell-free fetal nucleic acids in the plasma of pregnant women has allowed the development of new, noninvasive prenatal diagnostic tests for the determination of fetal gender and Rh. These tests have been implemented in the public health system in several countries of Europe for over five years. The new possibilities for diagnostic use of these technologies are the detection of fetal chromosomal aneuploidies, monogenic fetal disorders, and placental-related disorders, subjects that have been intensively studied by several groups around the world. The aim of this review was to assess the Brazilian research and clinical scenarios regarding the utilization of commercially available tests that use these plasma markers, stressing the advantages, both economic and safety-related, that non-invasive tests have when compared to those currently used in the Brazilian public health system.

Keywords: Noninvasive diagnosis; prenatal care; free nucleic acids; fetal DNA; maternal plasma; Brazil.

©2012 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Trabalho realizado no Departamento de Obstetria e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Artigo recebido: 30/01/2012
Aceito para publicação: 20/05/2012

Correspondência para:
Renata Moscolini Romão
Departamento de Obstetria e Ginecologia
Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255
Instituto Central, 10º andar
São Paulo, SP, Brasil
CEP: 05403-000
Tel: +55 (11) 2661-6206
renata.romao@usp.br

Conflito de interesses: Não há.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e aprimoramento de testes de diagnóstico não invasivo são objetivos constantemente almejados na medicina. A descoberta de DNA fetal livre no plasma de gestantes¹, associada à enorme sensibilidade das técnicas de biologia molecular que permitem detectar quantidades muito pequenas de ácidos nucleicos, possibilitou o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico pré-natal (DPN) não invasivo.

Atualmente, sabe-se que o DNA livre fetal compõe cerca de 6% do total presente na circulação sanguínea materna², sendo completamente eliminado após o parto³ (meia vida média de 16 minutos). Esses ácidos nucleicos são liberados principalmente através da apoptose das células trofoblásticas que compõem a placenta⁴⁻⁶. Seu isolamento a partir do plasma materno é relativamente simples, barato e adaptável à rotina de laboratórios clínicos.

A principal dificuldade técnica desse tipo de análise é a diferenciação entre o DNA fetal livre e o DNA materno livre, presente no plasma em quantidades superiores ao primeiro, o que só é possível quando são analisados genes ou segmentos de DNA fetal cujas sequências sejam diferentes do genótipo materno.

Além de DNA, circulam no plasma materno também RNAs mensageiros (mRNAs)⁷ e microRNAs (sequências curtas de RNAs com função de regulação pós-transcricional)⁸ de origem fetal. A análise destes tipos de ácidos nucleicos apresenta uma vantagem em relação à do DNA, pois permite a avaliação da expressão gênica fetal, podendo refletir não somente características genéticas do mesmo (DNA), mas situações fisiológicas momentâneas^{9,10}.

O objetivo deste trabalho é situar o Brasil no cenário de testes de diagnóstico pré-natal não invasivo, ressaltando os testes que já estão disponíveis na prática clínica em diversos países, e o que ainda é possível desenvolver a partir da análise dos ácidos nucleicos fetais livres (ANFL) no plasma de gestantes.

TESTES DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS NA ROTINA PRÉ-NATAL

SEXO FETAL

A detecção de sequências do cromossomo Y no plasma materno indica que o sexo do feto é masculino, pois mulheres normais não possuem cromossomo Y em seus genomas. Nas gestantes em que não se detecta tais sequências, presume-se que o feto seja do sexo feminino. A determinação do sexo fetal foi o primeiro teste a usar a análise de ácidos nucleicos fetais no sangue materno disponível clinicamente¹¹.

A maioria dos testes disponíveis detecta a região determinante do sexo (SRY) do cromossomo Y¹², embora outras sequências específicas do cromossomo Y tenham sido descritas, como DYS¹³⁻¹⁵, DYZ¹⁶ e DAZ¹⁷.

Ao longo dos anos o teste foi aprimorado. Atualmente apresenta mais de 99% de sensibilidade e especificidade a

partir da sexta semana de gestação, chegando a mais de 99,9% a partir da oitava semana. Existem algumas ferramentas que garantem a segurança do teste, como a utilização de controles internos para evitar resultados falso-negativos (falsa avaliação do sexo fetal feminino)¹⁸.

Fora a curiosidade em saber o sexo fetal, a principal aplicação clínica da determinação do sexo fetal é o auxílio na investigação de doenças genéticas ligadas ao cromossomo X^{19,20}, como Distrofia Muscular de Duchene e Hemofilia, em que a confirmação do sexo feminino exclui a possibilidade de o feto ser portador de tais doenças, ou até mesmo indica o tratamento de doenças metabólicas associadas à ambiguidade da genitália, como Hiperplasia Congênita da Adrenal (HCA)¹².

Em países como a China, o teste é proibido por razões éticas²¹, a não ser quando o conhecimento do sexo fetal ofereça possibilidade de tratamento intraútero. Alguns países europeus oferecem o teste gratuitamente no sistema de saúde pública para investigação de doenças ligadas ao sexo²². No Brasil, esse teste foi primeiramente descrito por Levi e colaboradores em 2003²³. Atualmente o teste é oferecido comercialmente àquelas famílias que desejam saber o sexo fetal, a partir da sétima semana de gestação, por diversos laboratórios particulares do Brasil.

Com o avanço tecnológico, os custos da determinação do sexo fetal têm diminuído²⁴, tornando o teste mais acessível e abrindo novas perspectivas de manejo de doenças genéticas ligadas ao cromossomo X, como já descrito anteriormente, inclusive no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

RH FETAL

A determinação genética não invasiva do genótipo RhD fetal em mães RhD negativas através da detecção do DNA fetal livre no plasma materno foi primeiramente demonstrada em 1998 por Lo *et al.*²⁵. Desde então, métodos mais robustos foram desenvolvidos e hoje o teste é oferecido no sistema de saúde pública de diversos centros da Europa (Bélgica, Reino Unido, França, Holanda, Alemanha, Espanha) com alta precisão (sensibilidade de 100% e especificidade de 98,6%)²⁶. O teste vem sendo estudado no Brasil por alguns grupos^{27,28} e um deles conseguiu demonstrar sua aplicabilidade em populações miscigenadas como a nossa, com 100% de precisão²⁹.

Entre as gestantes RhD negativas, há 16% de chance de sensibilização ao antígeno RhD quando carregam um feto RhD positivo e consequente desenvolvimento da doença hemolítica do recém-nascido³⁰.

Existe profilaxia contra a resposta imune materna, feita por meio da administração da imunoglobulina anti-D, que se liga e neutraliza os antígenos RhD fetais. No Brasil, esse tratamento é realizado em todas as gestantes RhD negativas durante a gestação, independente do genótipo fetal. Como 40% das gestantes RhD negativas carregam fetos também RhD negativos, a profilaxia nesses casos é

desnecessária. Adicionalmente, o medicamento é obtido a partir de sangue humano (derivado do plasma), apresentando um risco teórico de propagação de infecções e ocorrência de reações de sensibilidade³¹.

No momento, poucos laboratórios particulares disponibilizam o teste comercialmente no Brasil. A implantação do teste no sistema de saúde pública brasileiro é de extrema importância para evitar os riscos atrelados à profilaxia com a imunoglobulina anti-D, sendo inclusive economicamente vantajoso, pois eliminaria os custos despendidos com a profilaxia desnecessária e com a realização dos testes para o monitoramento da sensibilização materna, como já foi demonstrado em outros países³².

NOVAS POSSIBILIDADES DE APLICAÇÃO

ANEUPLOIDIAS CROMOSSÔMICAS

Existem duas grandes linhas de pesquisa de testes de DPN não invasivo de aneuploidias cromossômicas fetais. Uma delas está focada na análise de DNA fetal livre, por meio de técnicas extremamente sofisticadas³³, como PCR digital³⁴ (contagem de cada molécula de DNA) e sequenciamento em massa, (sequenciamento simultâneo de milhões de moléculas de DNA)^{35,36}, que permitem, em teoria, uma quantificação precisa das pequenas variações no DNA livre total (materno + fetal) consequente à presença de material genético extra ou ausência de material em relação ao normal, dependendo da aneuploidia. As duas grandes limitações da implantação prática desta técnica são seus custos elevados e a complexidade que envolve esta tecnologia, incluindo sofisticados *softwares* de bioinformática. Além disso, o diagnóstico só foi alcançado em situações experimentais, em que era necessário um volume inicial de sangue muito grande e proporções de DNA livre fetal que não condizem com a realidade prática.

A outra linha de pesquisa está focada na análise da expressão gênica fetal, onde são isolados do plasma materno mRNAs específicos do feto (os quais são expressos principalmente pelo tecido placentário). O teste é baseado na abordagem SNP/mRNA, em que a razão entre os alelos de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) localizados em genes expressos pelo tecido placentário permite a detecção da cópia extra do cromossomo onde estão localizados os genes investigados³⁷⁻³⁹. A frequência de heterozigose dos polimorfismos varia entre diferentes populações, portanto o teste deve utilizar polimorfismos informativos para cada grupo étnico.

Recentemente foram publicados três grandes estudos sobre a eficácia dos testes que analisam DNA fetal utilizando sequenciamento em massa⁴⁰⁻⁴², demonstrando sensibilidade e especificidade elevadas. Contudo, como esses testes estão baseados em tecnologias extremamente caras e sofisticadas que não permitem a análise simultânea de muitas amostras (baixo rendimento) e o tempo para a liberação do resultado é alto, não há viabilidade de aplicação

em laboratórios clínicos individuais e menos especializados. O teste teria que ser realizado em grandes centros isolados que detêm a tecnologia, a altos custos.

Alguns especialistas apontam a abordagem SNP/mRNA como a mais promissora para o DPN não invasivo de aneuploidias cromossômicas, pois a metodologia é relativamente simples de ser implantada em laboratórios clínicos pequenos, os custos são razoáveis e o diagnóstico já foi alcançado utilizando amostras de plasma materno com alto rendimento, sensibilidade de 92% e especificidade de 100%⁴³. Para que isso seja confirmado, são esperados resultados de estudos em larga escala.

Uma empresa privada norte-americana está oferecendo o teste comercialmente neste país desde março deste ano, prometendo resultados em 10 dias úteis. A empresa baseia-se em resultados recém publicados de um estudo prospectivo utilizando sequenciamento em massa do DNA fetal no plasma materno, feito com 532 amostras, que alcançou 100% de especificidade nas trissomias mais prevalentes⁴⁴. No Brasil não há, até o presente momento, nenhum estudo publicado a respeito de diagnóstico não invasivo de aneuploidias cromossômicas fetais.

DOENÇAS MONOGÊNICAS

A investigação de doenças monogênicas com prevalência elevada, como talassemias em populações de origem mediterrânea e fibrose cística em populações de origem europeia, deveria, em teoria, fazer parte da rotina de investigação pré-natal. Nos casos de doenças monogênicas raras, como doença de Huntington, a investigação deveria ser realizada quando há histórico familiar da doença.

O DPN não invasivo de doenças monogênicas de herança paterna dominante é possível por causa da ausência do alelo causador da doença no genoma materno, e, até o momento, foi realizado em pelo menos uma gestação para as seguintes doenças: doença de Huntington⁴⁵⁻⁴⁷, acondroplasia⁴⁸⁻⁵⁰, distrofia miotônica⁵¹ e síndrome de Apert⁵².

Doenças autossômicas recessivas geralmente são difíceis de diagnosticar não invasivamente, pois ainda não há uma maneira de fazer a distinção entre os alelos maternos e paternos idênticos. Por isso, o DNA fetal livre no plasma materno só pode ser utilizado para determinar o estado de portador do feto em heterozigotos compostos, pela detecção do alelo da doença herdado do pai (nos casos em que mais de um alelo é conhecido para tal doença), e quando os alelos maternos e paternos são diferentes. Até o momento, o estado portador do feto foi determinado utilizando DNA fetal livre nas seguintes doenças genéticas recessivas, em ao menos uma gestação, em alguns países da Europa: fibrose cística⁵³⁻⁵⁵, β -talassemia⁵⁶, α -talassemia 1⁵⁷, hiperplasia congênita da adrenal⁵⁸ e hemofilia⁵⁹. Ainda não há estudos ou relatos de casos no Brasil da utilização de ANFL para o diagnóstico não invasivo de doenças autossômicas recessivas, nem para doenças monogênicas de herança paterna.

DISTÚRBIOS RELACIONADOS COM A PLACENTA

A literatura recente tem proposto que os ANFL podem ser utilizados para a predição de distúrbios cuja etiologia tem como base o desenvolvimento placentário deficiente, uma vez que este está associado ao aumento da apoptose das células trofoblásticas que compõem a camada mais externa da placenta⁵.

Diversos grupos fizeram associação entre o aumento da quantidade de ANFL no plasma materno e distúrbios cuja etiologia parece estar relacionada ao desenvolvimento placentário deficiente. Alguns exemplos são pré-eclâmpsia⁶⁰⁻⁶², síndrome HELLP⁶³, restrição de crescimento fetal^{64,65}, parto prematuro^{66,67}, placenta acreta⁶⁸, placenta increta⁶⁹, hiperemese gravídica⁷⁰ e polidrâmnio⁷¹. Em alguns casos, foi constatado que há um aumento nos níveis de ANFL antes do estabelecimento dos sintomas, e, que sua quantidade se correlaciona com a gravidade da doença.

A grande limitação da utilização de ANFL como marcadores desses distúrbios placentários é que muitas delas apresentam etiologia multifatorial, ou, muitas vezes, ainda desconhecida. É necessário primeiro elucidar a natureza dessas patologias, bem como estabelecer uma curva de normalidade de concentração de ANFL em gestações normais, para que, posteriormente, se proceda a análise nas gestações afetadas.

CONCLUSÃO

A determinação não invasiva do sexo e do Rh fetal já está bem estabelecida e é utilizada clinicamente há mais de cinco anos por diversos países da Europa⁷²⁻⁷⁴. No Brasil, esses testes têm uso restrito pelo alto custo. Sua implantação no sistema de saúde pública seria de extrema importância como alternativa aos procedimentos invasivos, pois estes geram riscos à gestação e acabam se tornando ultrapassados se comparados à segurança e à precisão dos novos testes. Além disso, a utilização dos testes não invasivos pode ser vantajosa do ponto de vista econômico, dado que o valor de um teste não invasivo tende a ser inferior ao de um teste invasivo, e com o resultado precoce é possível evitar os gastos desnecessários com profilaxia Rh em gestantes Rh negativas e terapia para HCA em fetos do sexo masculino.

O Brasil possui um grande potencial para o desenvolvimento de pesquisa de ponta e inovadora em DPN, uma vez que dados recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelam que há 2,5 milhões de nascimentos por ano no país e um número ainda maior de gestações, tanto saudáveis quanto afetadas por diferentes complicações. Tal potencial deveria ser explorado pelos grupos de pesquisa especializados em cada tipo de complicação decorrente da gestação (como pré-eclâmpsia, fetos com aneuploidias, doenças monogênicas, entre outras), para que o resultado dessas pesquisas seja devolvido à sociedade sob a forma de testes mais seguros e eficazes, disponibilizados nos sistemas de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- 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;350:485-7.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM *et al*. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998;62:768-75.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 1999;64:218-24.
- Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update*. 2005;11:59-67.
- Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P, Flori J *et al*. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytiotrophoblastic cells. Case report. *Hum Reprod*. 2004;19:723-4.
- Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, Umansky SR. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;945:239-49.
- Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2000;46:1832-4.
- Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW *et al*. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008;54:482-90.
- Farina A, Chan CW, Chiu RW, Tsui NB, Carinci P, Concu M *et al*. Circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma: relationship with gestational age and severity of preeclampsia. *Clin Chem*. 2004;50:1851-4.
- Ng EK, Leung TN, Tsui NB, Lau TK, Panesar NS, Chiu RW *et al*. The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin Chem*. 2003;49:727-31.
- Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Saito H *et al*. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2001;47:1856-8.
- Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christiaens GC. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol*. 2001;98:374-8.
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T *et al*. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet*. 2002;110:75-9.
- Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2005;51:1598-604.
- Deng Z, Wu G, Li Q, Zhang X, Liang Y, Li D, *et al*. Noninvasive genotyping of 9 Y-chromosome specific STR loci using circulatory fetal DNA in maternal plasma by multiplex PCR. *Prenat Diagn*. 2006;26:362-8.
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin Chem*. 2001;47:41-6.
- Stanghellini I, Bertorelli R, Capone L, Mazza V, Neri C, Percesepe A *et al*. Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe. *Mol Hum Reprod*. 2006;12:587-91.
- Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011;16:88-93.
- Hyett JA, Gardener G, Stojilkovic-Mikic T, Finning KM, Martin PG, Rodeck CH *et al*. Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat Diagn*. 2005;25:1111-6.
- Sekizawa A, Saito H. Prenatal screening of single-gene disorders from maternal blood. *Am J Pharmacogenomics*. 2001;1:111-7.
- Newson AJ. Ethical aspects arising from non-invasive fetal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008;13:103-8.
- 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;80:68-75.
- Levi JE, Wendel S, Takaoka DT. Determinação pré-natal do sexo fetal por meio da análise de dna no plasma materno. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2003;25:687-90.
- Hill M, Taffinder S, Chitty LS, Morris S. Incremental cost of non-invasive prenatal diagnosis versus invasive prenatal diagnosis of fetal sex in England. *Prenat Diagn*. 2011;31:267-73.
- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF *et al*. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*. 1998;339:734-8.
- Macher HC, Noguero P, Medrano-Campillo P, Garrido-Marquez MR, Rubio-Calvo A, Carmona-Gonzalez M *et al*. Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: results in clinical benefits and cost saving. *Clin Chim Acta*. 2012;413:490-4.
- Machado IN, Castilho L, Pellegrino Jr J, Barini R. Fetal rhd genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52:232-5.
- Chinen PA, Nardoza LM, Martinhago CD, Camano L, Daher S, Pares DB *et al*. Noninvasive determination of fetal rh blood group, D antigen status by cell-free DNA analysis in maternal plasma: experience in a Brazilian population. *Am J Perinatol*. 2010;27:759-62.

29. Amaral DR, Credidio DC, Pellegrino Jr J, Castilho L. Fetal RHD genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population. *J Clin Lab Anal.* 2011;25:100-4.
30. Bowman J. Thirty-five years of Rh prophylaxis. *Transfusion.* 2003;43:1661-6.
31. Van der Schoot CE, Hahn S, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13:63-8.
32. Benachi A, Delahaye S, Leticee N, Jouannic JM, Ville Y, Costa JM. Impact of non-invasive fetal RhD genotyping on management costs of rhesus-D negative patients: results of a French pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;162:28-32.
33. Chiu RW, Cantor CR, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends Genet.* 2009;25:324-31.
34. Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK *et al.* Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:13116-21.
35. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:20458-63.
36. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16266-71.
37. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM *et al.* Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* 2007;13:218-23.
38. Tsui NB, Wong BC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat Diagn.* 2009;29:1031-7.
39. Tsui NB, Akolekar R, Chiu RW, Chow KC, Leung TY, Lau TK, *et al.* 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;56:73-81.
40. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC *et al.* Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ.* 2011;342:c7401.
41. Ehrlich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R *et al.* Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204:205-11.
42. Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J *et al.* Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem.* 2011;57:1042-9.
43. Deng YH, Yin AH, He Q, Chen JC, He YS, Wang HQ *et al.* Non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49:641-6.
44. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP *et al.* Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012;119:890-901.
45. Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Garcia-Hoyos M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J *et al.* Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn.* 2003;23:232-4.
46. Bustamante-Aragones A, Trujillo-Tiebas MJ, Gallego-Merlo J, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Cantalapiedra D *et al.* Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study. *Eur J Neurol.* 2008;15:1338-44.
47. Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Bustamante Aragones A, Rodriguez de Alba M, Diego Alvarez D *et al.* Improvement in strategies for the non-invasive prenatal diagnosis of Huntington disease. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25:477-81.
48. Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, 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;24:896-8.
49. Li Y, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Holzgreve W, Hahn S. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. *Prenat Diagn.* 2007;27:11-7.
50. Chitty LS, Griffin DR, Meaney C, Barrett A, Khalil A, Pakrj E *et al.* 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;37:283-9.
51. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem.* 2000;46:301-2.
52. Au PK, Kwok YK, Leung KY, Tang LY, Tang MH, Lau ET. 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;31:218-20.
53. Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J *et al.* Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2002;22:946-8.
54. Bustamante-Aragones A, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, de Alba MR, Gonzalez-Gonzalez C, Glover G *et al.* New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma. *J Cyst Fibros.* 2008;7:505-10.
55. Nasis O, Thompson S, Hong T, Sherwood M, Radcliffe S, Jackson L *et al.* Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable noninvasive prenatal detection of cystic fibrosis. *Clin Chem.* 2004;50:694-701.
56. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet.* 2002;360:998-1000.
57. Sirichotiyakul S, Charoenkwan P, Sanguanserm Sri T. Prenatal diagnosis of homozygous alpha-thalassemia-1 by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2012;32:45-9.
58. Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem.* 2002;48:778-80.
59. Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood.* 2011;117:3684-91.
60. Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK *et al.* Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem.* 1999;45:184-8.
61. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2002;21:77-83.
62. Levine RJ, Qian C, Leshane ES, Yu KF, England LJ, Schisterman EF *et al.* Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190:707-13.
63. Swinkels DW, de Kok JB, Hendriks JC, Wiegerinck E, Zusterzeel PL, Steegers EA. Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome as a complication of preeclampsia in pregnant women increases the amount of cell-free fetal and maternal DNA in maternal plasma and serum. *Clin Chem.* 2002;48:650-3.
64. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Matsuoka R, Okai T *et al.* Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:480-4.
65. Smid M, Gabiati S, Lojaccono A, Valsecchi L, Platto C, Cavoretto P *et al.* Correlation of fetal DNA levels in maternal plasma with Doppler status in pathological pregnancies. *Prenat Diagn.* 2006;26:785-90.
66. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet.* 1998;352:1904-5.
67. Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Rizzo N *et al.* High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:421-5.
68. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y *et al.* Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem.* 2002;48:353-4.
69. Jimbo M, Sekizawa A, Sugito Y, Matsuoka R, Ichizuka K, Saito H *et al.* Placenta increta: postpartum monitoring of plasma cell-free fetal DNA. *Clin Chem.* 2003;49:1540-1.
70. Sugito Y, Sekizawa A, Farina A, Yukimoto Y, Saito H, Iwasaki M *et al.* Relationship between severity of hyperemesis gravidarum and fetal DNA concentration in maternal plasma. *Clin Chem.* 2003;49:1667-9.
71. Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K, Hahn S. 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;20:838-41.
72. 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;80:68-75.
73. Scheffer P, van der Schoot C, Page-Christiaens G, de Haas M. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *BJOG.* 2011;118:1340-8.
74. Macher HC, Noguero P, Medrano-Campillo P, Garrido-Marquez MR, Rubio-Calvo A, Carmona-Gonzalez M *et al.* Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: results in clinical benefits and cost saving. *Clin Chim Acta.* 2012;413:490-4.