

Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna oparta na wolnym DNA płodowym obecnym we krwi matki



Royal College of
Obstetricians and
Gynaecologists

Ustalenie standardów postępowania
w celu poprawy zdrowia kobiet

Scientific Advisory Committee, Opinion Paper numer 15, czerwiec 2009

1. Wstęp i podstawy

Diagnostyka prenatalna statusu genetycznego płodu oraz aneuploidii opiera się obecnie na wykorzystaniu inwazyjnych badań diagnostycznych niosących ze sobą niewielkie, chociaż istotne, ryzyko poronienia. Wiele lat badań naukowych poświęcono próbom identyfikacji komórek płodowych w krążeniu matki jako potencjalnego źródła materiału pochodzenia płodowego, który mógłby posłużyć dla celów bezpieczniejszej diagnostyki nieinwazyjnej (non-invasive prenatal diagnosis, NIPD). Dzisiaj wiadomo, że ze względu na zbyt małą ilość tych komórek oraz brak wiarygodnych metod ich analizy ta strategia ma małe szanse na szersze zastosowanie kliniczne.¹ W 1997 roku Lo i wsp. zidentyfikowali w krążeniu ciężarnych pozakomórkowe, wolne DNA płodowe (cell-free fetal DNA, cffDNA).² Pochodzi ono z łożyska³ i może być wykrywane już od czwartego tygodnia ciąży,⁴ jest szybko usuwane z krwiobiegu po porodzie,⁵ co czyni je potencjalnym źródłem materiału pochodzenia płodowego do diagnostyki prenatalnej. Ogromna większość pozakomórkowego DNA w krążeniu pochodzi od matki, materiał płodowy stanowi zaledwie 3% we

wczesnej ciąży i dochodzi do 6% w terminie porodu.⁴ Obecnie stosowane metody nie pozwalają na całkowite odseparowanie DNA maczynego od płodowego, stąd diagnostyka opiera się na wykryciu lub wykluczeniu obecności genów nieobecnych u matki, takich jak sekwencje charakterystyczne dla chromosomu Y czy allel D czynnika Rh u kobiety Rh ujemnej. Po wyizolowaniu całkowitego cffDNA, w celu amplifikacji konkretnego genu, na przykład *RHD* u kobiety Rh ujemnej czy *SRY* lub *DYS14* w przypadku identyfikacji płci, wykorzystuje się wysoce czułą metodę reakcji łańcuchowej polimerazy (polymerase chain reaction, PCR), określaną jako PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Sygnał pozytywny oznaczałby, że płód jest Rh(+), lub że płód jest płci męskiej, brak sygnału wskazywałby, że płód nie ma badanego genu, czyli że jest odpowiednio Rh(-) lub jest dziewczynką. Brak sygnału może jednak oznaczać także niepowodzenie amplifikacji płodowego DNA, dlatego trwają intensywne badania nad określeniem uniwersalnych markerów płodowych, które mogłyby być wykorzystane jako standardy laboratoryjne.

2. Typowanie płodowego RHD

Od 2001 roku typowanie płodowego *RHD* przy wykorzystaniu cffDNA stosowane jest w prowadzeniu ciężarnych obarczonych dużym ryzykiem choroby hemolitycznej noworodka (HDN-c) spowodowanym ciążą z konfliktem serologicznym w wywiadzie

lub podwyższonym mianem przeciwciał. W Wielkiej Brytanii niemal całkowicie zastąpiło ono amniopunkcję oraz biopsję kosmówki.⁶ Ta metoda jest pracochłonna, ale wiele grup badawczych potwierdziło jej dużą dokładność.⁷ Wykorzystanie tej metody opisano także w odniesieniu do określania płodowych antygenów RhC, c, E i Kell.⁸ W ostatnim czasie International Blood Group Reference Laboratory w Bristolu doniosło o skutecznym zastosowaniu wysoce wydajnej metody opartej na zautomatyzowanych technikach, potencjalnie nadającej się do masowych przesiewowych badań wszystkich kobiet Rh ujemnych. Metodę tę wykorzystano w określeniu płodowego antygeny D czynnika Rh u 1788 Rh ujemnych kobiet w 28 tygodniu ciąży. W porównaniu z serologicznym typowaniem Rh u płodów po urodzeniu dokładność metody określono na 95,7%, a wskaźnik wyników fałszywie ujemnych wyniósł 0,2%.⁹ Jeżeli potwierdzi się skuteczność tej metody także we wczesnej ciąży, przy czym należy pamiętać, że względna proporcja cffDNA jest mniejsza w początkowych tygodniach ciąży,⁴ będzie to potencjalny sposób ograniczenia stosowania immunoglobuliny anti-D u kobiet Rh ujemnych, których dziecko jest również Rh ujemne. Obecnie w kilku ośrodkach w Wielkiej Brytanii trwają badania pilotażowe, mające na celu określenie klinicznej przydatności oraz wiarygodności tej wysoce zaawansowanej metody w rutynowym typowaniu płodowego czynnika RhD u wszystkich Rh ujemnych ciężarnych we wczesnej

W imieniu Royal College of Obstetricians and Gynaecologists przygotowali: Dr LS Chitty PhD, MRCOG, Dr J Crolla PhD, FRCPath i zrecenzowali: GC Manson FRCOG, Leeds, Professor PW Soothill FRCOG, Bristol. Głównymi recenzentami z ramienia Scientific Advisory byli: S Quenby FRCOG, Professor S Thornton FRCOG, przewodniczący. Za ostateczną wersję odpowiada Scientific Advisory Committee RCOG.

ciąży (RfBP NIHR Programme PB-PG-0107-12005).

3. Określanie płci płodu

Na podstawie identyfikacji genów (*DYS14* lub *SRY*) obecnych na chromosomie Y w wyizolowanym cffDNA można określić płeć płodu. Wiele z dostępnych badań poświęconych jest dokładności nieinwazyjnych metod określania płci płodu wykorzystujących różne techniki, spośród których najczęściej stosowaną jest PCR w czasie rzeczywistym.¹⁰ W Wielkiej Brytanii ta metoda wykorzystywana jest do określania płci płodu u kobiet obciążonych ryzykiem przeniesienia na potomstwo chorób dziedziczonych z chromosomem X. Stwierdzenie płci męskiej płodu jest wskazaniem do diagnostyki inwazyjnej w celu sprawdzenia, czy dziedziczony przez płód chromosom X jest obciążony mutacją, natomiast w przypadku płci żeńskiej płodu można odstąpić od dalszej diagnostyki. Metoda określania płci na podstawie cffDNA jest także szeroko stosowana w przypadkach ciąży zwiększonego ryzyka wrodzonego przerostu nadnerczy (congenital adrenal hyperplasia, CAH), w którym wcześniej wdrożone leczenie płodów żeńskich ma udowodnione działanie zmniejszające stopień wirylizacji zewnętrznych narządów płciowych. Wykazano, że w takich przypadkach zastosowanie NIPD zmniejsza o około 50% potrzebę wykonywania badań inwazyjnych i pozwala na wczesne odstąpienie od leczenia deksametazonem w sytuacjach, kiedy płód jest płci męskiej.^{11,12} Ostatnio przeprowadzono analizę badań krajowych, która objęła wszystkie przypadki diagnozowane w dwóch laboratoriach oferujących tego rodzaju badania i wykazano 97,8% zgodność wyników między określeniem płci z wykorzystaniem cffDNA w 7 tygodniu ciąży lub później z wynikami badania inwazyjnego lub określeniem płci po urodzeniu. Badanie wykonane przed 7 tygodniem ciąży było mniej dokładne, a dwa z pięciu wyników okazały się sprzeczne. Przyczyny tych rozbieżności wymagają dalszych badań, wydaje się jednak, że obejmują

one małą ilość cffDNA we wczesnej ciąży oraz utrzymującą się obecność tkanek trofoblastu w ciąży wielopłodowej po obumarciu jednego z płodów płci męskiej. Nieinwazyjne określanie płci płodu na podstawie cffDNA znalazło już swoje zastosowanie w praktyce klinicznej, wciąż jednak konieczny jest dalszy rozwój protokołów laboratoryjnych oraz standardów i wytycznych klinicznych, aby zapewnić jednakowy i odpowiednio bezpieczny standard usług dla pacjentek z grupy dużego ryzyka. W Stanach Zjednoczonych laboratoria oferują bezpośrednio pacjentkom tego rodzaju badania, ale nie spełniają one odpowiednich standardów diagnostycznych.

4. Diagnostyka chorób monogenowych

Opisano pojedyncze przypadki diagnostyki chorób monogenowych przez potwierdzenie lub wykluczenie obecności allelu ojcowskiego dziedziczonego od mężczyzny z autosomalną dominującą chorobą genetyczną, na przykład płasawicą Huntingтона.¹³ Istnieją również doniesienia dotyczące potwierdzenia achondroplazji *de novo* u płodu, u którego obserwowano w trzecim trymestrze skrócenie wymiaru kości długich,¹⁴ jednak w chwili obecnej stosowane techniki nie nadają się do diagnostyki chorób sprzężonych z chromosomem X ani większości chorób autosomalnych recesywnych, gdyż nie ma możliwości izolacji genów płodu dziedziczonych od matki z matczynego pozakomórkowego DNA, którego jest wielokrotnie więcej. W przypadku chorób dziedziczonych recesywnie, takich jak talasemia czy mukowiscydoza, jeżeli rodzice są nosicielami różnych mutacji, wykluczenie obecności ojcowskiego allelu w osoczu matki wskazuje na to, że płód nie jest dotknięty chorobą, jeśli natomiast ten allel jest obecny, dopiero badanie inwazyjne rozstrzygnie, czy płód odziedziczył również wadliwy allel od matki i jest w związku z tym obciążony chorobą. Potencjalne możliwości nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej w przypadku chorób monogenowych i rozszerzenie jej zasto-

sowania w rozpoznawaniu chorób recesywnych lub dziedziczonych od matki przedstawili w listopadzie 2008 roku Lo i wsp., kiedy przy zastosowaniu cyfrowej metody PCR zdołali wykazać niewielkie różnice w ilości dzikiego i zmutowanego allelu wywołującego chorobę oraz określić, czy są to ilości zrównoważone, czy nie, diagnozując tym samym, czy płód jest dotknięty chorobą, czy nie.¹⁵

5. Diagnostyka aneuploidii

Metody nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej wykorzystujące techniki opisane powyżej nie znajdują zastosowania w przypadku zespołu Downa. Nie są one wystarczająco czułe, aby wykryć relatywnie niewielkie zwiększenie ilości materiału genetycznego pochodzącego z chromosomu 21 (mniej niż 3%) u płodu z trisomią 21 wśród olbrzymiej ilości materiału genetycznego chromosomu 21 pochodzącego od matki (ponad 97%). Ostatnio Lo i wsp. opisali nowatorską metodę nieinwazyjnej diagnostyki zespołu Downa.¹⁶ Przedstawiona przez nich strategia opiera się na analizie pozakomórkowego matrycowego kwasu rybonukleinowego (cff mRNA) pochodzącego wyłącznie od płodu, a zatem pozbawionego zanieczyszczeń materiałem matczynym. Wykazano, że gen zlokalizowany na chromosomie 21 (*PLAC4*) ulega ekspresji w łożysku, ale nie jest obecny we krwi matki (co oznacza, że jest swoisty dla płodu). Ekstrahując z osocza matki pozakomórkowy RNA (cell-free RNA, cfrRNA) zamiast cfDNA i badając polimorfizm pojedynczego nukleotydu (powszechną zmienność sekwencji obecną w normalnej populacji [single nucleotide polymorphism, SNP]) dla genu *PLAC4* na mRNA pochodzenia płodowego, można określić stosunek ilości matczynego i ojcowskiego materiału pochodzącego z chromosomu 21. Stosunek 1:1 wskazuje, że płód odziedziczył dwie kopie chromosomu 21 (stan prawidłowy), natomiast stosunek 2:1 potwierdza, że ma on trzy kopie chromosomu 21 (zespół Downa). W przypadkach, w których płód będzie homozygotą pod względem polimorfi-

zmu pojedynczego nukleotydu (około 40% ciąży), co oznacza, że sekwencje matczyne i ojcowskie allele będą identyczne, badanie nie wniesie żadnych informacji, ponieważ ocena ilościowa nie będzie w takiej sytuacji możliwa. W oryginalnej pracy Lo badaniu poddano 67 próbek cfRNA pochodzących od płodów, o których wiadomo było, że nadają się do analizy PLAC4 SNP. Prawidłowo zidentyfikowano 9 z 10 płodów z zespołem Downa oraz 55 z 57 zdrowych, co dało czułość metody 90% (95% PU 60,6–99,5%) oraz swoistość 96,5% (95% PU 89,4–99,5%), a badanie okazało się przydatne u 45% badanej populacji. Na podstawie danych przedstawianych podczas spotkań naukowych można wnioskować, że przez zwiększenie liczby analizowanych SNP w pewnych populacjach badanie mogłoby być z powodzeniem stosowane w około 95% ciąży, co znacznie rozszerzyłoby możliwości jego wykorzystania.

Opisano także alternatywną strategię postępowania wykorzystującą wysoce wydajną technikę analizowania DNA nazywaną sekwencjonowaniem shotgun, przy zastosowaniu której u 18 ciężarnych zdołano wykryć 12 przypadków aneuploidii (dziewięć trisomii 21, dwie trisomie 18 oraz jedną trisomię 13).¹⁷ Metoda obejmuje ekstrakcję pofragmentowanego DNA pozakomórkowego z surowicy matki, a następnie jego sekwencjonowanie w wielu przypadkowych lokalizacjach, co daje miliony krótkich fragmentów DNA. Porównanie tych sekwencji z wzorcowymi sekwencjami ludzkiego genomu pozwala określić, ile sekwencji pochodzi z każdego chromosomu. Porównanie całkowitej liczby sekwencji charakterystycznych dla chromosomu 21 uzyskanych z badanej próbki pozakomórkowego DNA z liczbą sekwencji uzyskanych z próbki prawidłowego, wzorcowego DNA daje możliwość wykrycia płodu posiadającego dodatkowy chromosom 21. W tym przypadku badanie wykryje niewielkie zwiększenie (mniej niż 3%) ilości materiału pochodzącego z chromosomu 21.

Niezależnie od rodzaju stosowanej strategii dotychczas przedstawiane

prace dotyczyły względnie małych liczebnie grup. Jeżeli NIPD w kierunku aneuploidii ma być wprowadzona do rutynowej praktyki klinicznej, należy podjąć starania prowadzące do formalnego zatwierdzenia metody, jej standaryzacji oraz edukacji osób zainteresowanych. To, czy nowe metody zastąpią obecnie stosowaną diagnostykę inwazyjną, czy raczej będą wykorzystywane do badań przesiewowych, pokaże dalsza ocena ich przydatności, szczególnie w aspekcie czułości i swoistości testów.

6. Aspekty etyczne

Jak w przypadku każdej nowo wprowadzonej metody, opisane techniki nie pozostają bez oddźwięku natury etycznej.¹⁸ Pozbawienie ryzyka związanego z badaniami inwazyjnymi sprawi, że diagnostyka prenatalna stanie się bezpieczniejsza dla wielu kobiet. Ten fakt może mieć jednak niekorzystny wpływ na proces podejmowania świadomych decyzji, ponieważ brak konieczności dyskusji dotyczącej ryzyka poronienia może sprawić, że osoba podejmująca taką decyzję nie przemyśli wszystkich implikacji, jakie niesie ze sobą wynik badania zarówno korzystny, jak i niekorzystny.¹⁹ Niezbędnym warunkiem zrozumienia znaczenia „prostego, bezpiecznego badania”, jakie być może wkrótce będzie proponowane kobietom w celu wykrycia zespołu Downa lub innych chorób płodu, jest doskonała komunikacja między pacjentkami a pracownikami opieki zdrowotnej.

Kolejny problem związany jest z potencjalną prostotą NIPD. Ponieważ badanie będzie wymagało jedynie pobrania próbki krwi, nie będzie wymagało udziału wykwalifikowanego specjalisty. Stwarza to ryzyko, że testy będą dostępne na zasadach komercyjnych, w Internecie lub w postaci przesyłek pocztowych, jak to się już zdarzyło w Stanach Zjednoczonych, gdzie kilka stron internetowych oferuje określanie płci płodu na podstawie kropli krwi przesłanej na bibule do laboratorium działającego niezależnie od profesjonalnych środowisk me-

dycznych. Potencjalna komercjalizacja tej technologii będzie wymagała dyskusji dotyczącej kwestii, czy i w jaki sposób regulować stosowanie metody.

Przedyskutowanie wszystkich problemów etycznych związanych z opisaną metodą przekracza ramy niniejszej publikacji, jednak w globalnej perspektywie jedna kwestia wymaga podkreślenia. Metoda pozwalająca z dużą dokładnością określić płeć płodu na tak wczesnym etapie jak siódmy tydzień ciąży, niesie ze sobą szereg implikacji społeczno-etycznych, włączając promowanie selektywnej terminacji płodów ze względu na niepożądaną płeć.²⁰ Innym problemem jest fakt, że wprowadzenie metody pozbawionej ryzyka poronienia sprowokuje kobiety do poddawania się diagnostyce prenatalnej w kierunku rosnącej liczby schorzeń lub badaniu ojcostwa.

7. Podsumowanie

- Dla niektórych wskazań NIPD stała się już rzeczywistością. Od kilku lat położnicy stosują NIPD w postępowaniu z ciężarnymi z ujemnym czynnikiem Rh będącymi w grupie ryzyka HDN. Obecne wytyczne powinny zostać zaktualizowane, aby zmiana miała także swoje odbicie w praktyce.
- Określanie płci płodu ze wskazań medycznych w sytuacjach zwiększonego ryzyka genetycznego stało się praktyką, wymaga jednak dalszych badań, rozwoju standardów i protokołów laboratoryjnych oraz zasad postępowania w określonych sytuacjach klinicznych. Zapewni to równy dostęp do bezpiecznych procedur diagnostycznych rodzinom z grupy zwiększonego ryzyka.
- Opisano zastosowanie diagnostyki nieinwazyjnej w innych wskazaniach, takich jak diagnostyka chorób monogenowych czy zespołu Downa, co potencjalnie może wpłynąć na postrzeganie znaczenia diagnostyki prenatalnej i badań przesiewowych.
- Zanim NIPD zostanie wdrożona do praktyki klinicznej na szeroką skalę, konieczna jest dalsza ocena

kliniczna (włączając gruntowną ocenę kliniczną oraz laboratoryjną czułości i swoistości metody, kosztów i opłacalności, potrzeb konsumentów oraz opinii). Pozwoli to na poprawę jakości procedur oraz rozwój właściwych i bezpiecznych systemów opieki zdrowotnej odpowiednich do potrzeb pacjentów, przy jednoczesnej minimalizacji ryzyka, jakie mogłoby nieść niewłaściwe zastosowanie nowych technologii. National Institute of Health Research ustanowił wieloosrodkowy (RAPID) grant w celu: a) ewaluacji optymalnych technologii w zastosowaniu dla celów NIPD w systemie zdrowotnym w Wielkiej Brytanii, b) formalnej oceny społecznych, etycznych i ekonomicznych konsekwencji wdrożenia NIPD do szerokiej praktyki klinicznej.

- Joint Committee on Medical Genetics zatwierdził raport Public Health Genetics Foundation, w którym zamieszczono rekomendacje dotyczące systematycznej oceny klinicznej i laboratoryjnej rozwijających się technologii NIPD oraz ich prawidłowego wdrożenia do opieki przedporodowej w ramach NHS. Ten raport opublikowano na początku 2009 roku.²¹
- Potencjalne wdrożenie opisywanych technologii na szeroką skalę mogłoby mieć istotne implikacje dla obecnie stosowanego modelu diagnostyki prenatalnej, wpływając przede wszystkim na pracę laboratoriów wykorzystujących metody

przesiewowych badań biochemicznych z krwi, cytogenetyki klinicznej oraz genetyki molekularnej. Konieczne będzie szczegółowe zaplanowanie rekonfiguracji i zmiany organizacji pracy takich laboratoriów, zwłaszcza współpracujących z National Screening Committee.

- Jest to bardzo szybko rozwijająca się dziedzina. Konieczne jest kontynuowanie edukacji publicznej, opieki zdrowotnej oraz środowisk ustawodawczych, aby uniknąć wygórowanych oczekiwań, jednocześnie zapewniając sprawne i właściwie wdrożenie nowych technologii do codziennej praktyki.

© 2009 Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Tłumaczenie i publikowanie artykułu Noninvasive prenatal diagnosis using cell-free DNA in maternal blood, Opinion Paper 15 przez Medical Tribune Polska za zgodą RCOG. Jakikolwiek kopiowanie w którymkolwiek języku w części lub w całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia wydawcy całkowicie zabronione.

PIŚMIENNICTWO

1. Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. *National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study*. *Prenat Diagn* 2002;22:609–15.
2. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–7.
3. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn*. 2007;27:415–18.
4. 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 non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768–75.
5. 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.
6. Daniels G, Finning K, Martin P, Summers J. Fetal blood group genotyping. Present and future. *Ann NY Acad Sci* 2006;1075:88–95.
7. 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.
8. Finning K, Martin P, Summers J, Daniels G. Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2007;47:2126–33.
9. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008;12;336:816–18.
10. Finning KM, Chitty LS. Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:69–75.
11. Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouanin JM, Ernault P, Dumez Y. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn* 2001;21:1070–4.
12. Hyett JA, Gardiner 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. *Prenatal Diagnosis* 2005;25:1111–16.
13. Norbury G, Norbury CJ. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: how close are we? *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:76–83.
14. Li Y, Page-Christians 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;27:11–17.
15. Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:19920–5.
16. Lo YMD, Tsui NBY, Chui RWK, Lau TK, Leung TN, Heung MMS, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007;13:218–23.
17. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Nat Acad Sci USA* 2008;105:16266–71.
18. Newson AJ. Ethical aspects arising from non-invasive fetal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:103–8.
19. van den Heuvel A, Chitty LS, Hogg J, Marteau TM. Will noninvasive prenatal diagnosis using free fetal nucleic acids in maternal blood erode informed choices? *Prenat Diagn* 2008;28:S16.
20. Marteau TM, Chitty LS, editors. *Fetal sexing: Global Perspectives on Practices, Ethics and Policy*. *Prenat Diagn* 2006;26:597–647.
21. Wright C. *Cell-free Fetal Nucleic Acids for Non-invasive Prenatal Diagnosis*, report of the UK Expert Working Group. Cambridge: PHG Foundation; 2009.