



Continguts: <http://www.acclc.cat/volumen/vol-18/>

In vitro veritas

Pàgina web de la revista: www.acclc.cat/ivv.php



Recomanació

Recomanacions per a l'aplicació clínica de la detecció d'aneuploidies en el DNA fetal lliure en la sang materna

Comitè Conjunt de la Secció d'Ecografia i Medicina Fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia, Secció de Medicina Materno-Fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia, Comissió de Genètica i Reproducció Humana del Col·legi de Biòlegs de Catalunya, Grup de Genètica Clínica i Dismorfologia de la Societat Catalana de Pediatria, Grup de Bioquímica del Programa de Diagnòstic Prenatal de Catalunya

Antoni Borrell Vilaseca ^a, Elena Casals Font ^b, Gerard Albaiges Baiget ^c, Teresa Vendrell Bayona ^d, Ros Ana de la Chica Díaz ^e, Alberto Plaja Rustein ^f, Lluís Armengol Dulcet ^g, Vincenzo Cirigliano ^h

^a President de la Secció d'Ecografia i Medicina Fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia

^b Coordinadora del Grup de Bioquímica del Programa de Diagnòstic Prenatal de Catalunya

^c Secretari de la Secció de Medicina Materno-fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia

^d Membre del Grup de Genètica Clínica i Dismorfologia de la Societat Catalana de Pediatria

^e Coordinadora de la Comissió de Genètica i Reproducció Humana del Col·legi de Biòlegs de Catalunya

^f Assessor (Hospital Vall d'Hebron)

^g Assessor (Q-Genomics)

^h Assessor (Labco Diagnostics)

2017 ©Publicat per l'Associació catalana de ciències de Laboratori Clínic

1. Introducció

1.1. DNA fetal lliure

En la sang materna existeixen fragments de DNA fetal lliure (d'ara endavant DNAfl) de procedència placentària que es poden estudiar per a conèixer el nombre de còpies d'uns cromosomes determinats (habitualment 21, 18, 13, X i Y) en el fetus (1, 2). És un mètode de cribratge avançat d'aneuploidia, que requereix confirmació mitjançant un procediment diagnòstic invasiu en cas de resultat positiu.

1.2. Procediments analítics per a l'estudi del DNAfl

Els principals procediments analítics per a l'estudi de les aneuploidies en el DNAfl són la seqüenciació massiva paral·lela a l'atzar (*shotgun massive parallel sequencing* en anglès), que seqüencia fragments de tots els cromosomes i després determina el nombre de còpies d'uns cromosomes determinats (3, 4), l'enriquiment mitjançant sondes específiques de regions dels cromosomes d'interès i hibridació en matrius (*arrays* en anglès) (5) (abans seqüenciació paral·lela massiva dirigida, *targeted*

massive parallel sequencing en anglès) i la seqüenciació de polimorfismes de nucleòtid únic (SNPs), que estudia les distribucions de polimorfismes en els cromosomes estudiats en la mare i el fetus (6). A part d'aquests 3 procediments, n'hi ha de nous en desenvolupament. No hi ha evidència científica per decantar-se per un o un altre, amb l'excepció de les gestacions múltiples i l'ovodonació, on la presència d'un tercer genoma dificulta l'estudi de les distribucions d'SNPs. Els diferents procediments disponibles ofereixen sensibilitats diagnòstiques similars per a les trisomies autosòmiques i per a les aneuploidies sexuals, i la majoria ofereixen l'estudi opcional d'algunes síndromes de microdeleció. El procediment basat en la seqüenciació dels SNPs es pot realitzar a partir de les 9 setmanes de gestació i la resta a partir de les 10 setmanes.

1.3. Eficiència diagnòstica de l'estudi del DNAfl en les gestacions úniques

Una recent revisió sistemàtica i metanàlisi recull que la **taxa de detecció** mitjançant l'estudi del DNAfl és actualment del 99,3 % per a la trisomia 21, el 97,4 % per a la trisomia 18 i el 97,4 %

<http://www.acclc.cat/invitro/recomanacions-per-a-laplicacio-clinica-de-la-deteccio-daneuploidies-en-el-dna-fetal-lliure-en-la-sang-materna/>

2017 ©ACCLC. Tots els drets reservats.

per a la trisomia 13, amb una **taxa de falsos positius** del 0,1 % per a cada una d'aquestes trisomies (7). Una part d'aquests falsos positius podrien explicar-se per causes biològiques com són el mosaïcisme placentari o matern, la presència d'un bessó no evolutiu, i més rarament una neoplàsia materna o un transplantament de moll d'os o d'un altre òrgan. Així doncs, l'estudi del DNAfl presenta una sensibilitat i especificitat molt altes per a la trisomia 21 i menor per a les trisomies 18 i 13.

Aquestes taxes de detecció disminueixen si només es tenen en compte les sèries de casos de les gestacions de primer trimestre (96,0 %, 92,5 % i 85,0 % per a les trisomies 21,18 i 13), les sèries provinents de la població general (95,9 %, 86,5 % i 77,5 % respectivament), o les cohorts de casos consecutius (93,2 %, 86,8 % i 85,1 %, respectivament)(7).

El **valor predictiu positiu** (VPP) o la probabilitat que es confirmi un resultat positiu a una gestant determinada, varia en funció de la prevalença de les trisomies en la població estudiada. Per a la trisomia 21, el VPP és del 91 % en la població d'alt risc i del 82 % en la població general. Per a la trisomia 18 els VPP són del 84 % i el 37 % i per a la trisomia 13 són del 87 % i 49 %, respectivament.

1.4. Fracció fetal i no obtenció de resultat

Tots els informes de resultats haurien d'incloure la **fracció fetal** (FF) del DNAfl, calculada com a percentatge del DNAfl sobre el total del DNA lliure en la circulació materna. La FF està situada al voltant del 10 %, augmenta amb l'edat gestacional i disminueix amb el pes matern i amb un baix volum placentari. A mesura que augmenta la FF, augmenta la fiabilitat del resultat i també a la inversa. La majoria dels laboratoris consideren que no és prou fiable lliurar un resultat quan la FF < 4 %, a excepció d'algun procediment més recent que sembla mantenir una alta fiabilitat en FF baixes (8).

Els procediments analítics per l'estudi del DNAfl presenten una **taxa de no-resultat** relativament elevada, que varia entre el 0 i el 12 %. Una metanàlisi mostra l'existència d'un 4,3 % de mostres inadequades i un 5,1 % de fallades de laboratori, la meitat degudes a una baixa FF i l'altra meitat a una fallada del procediment (9). S'ha observat un alt risc d'aneuploidia (3 %-4 %) (10) en cas de resultat fallit. En aquesta circumstància, es pot optar per la repetició de l'extracció de sang materna en una edat gestacional més avançada o bé per la realització d'un procediment invasiu, opció que està especialment indicada en baixes FF i en gestants amb un alt índex de massa corporal (11). Si es consideren els no-resultats com a resultats positius (12), per l'alt risc d'aneuploidia associat, les taxes de falsos positius augmenten al 1,9 % per la trisomia 21, 1,7 % per la trisomia 18 i 1,9 % per la trisomia 13 (7).

1.5. Eficiència diagnòstica de l'estudi del DNAfl en les gestacions gemel-lars

En gestacions múltiples l'eficiència diagnòstica de l'estudi del DNAfl disminueix, amb unes taxes de detecció del 89,4 % per a la trisomia 21 i del 73,3 % per a la trisomia 18 (7). En les gestacions gemel-lars dicorials existeixen dues FF diferents que haurien de constar a l'informe. Alguns laboratoris que analitzen les FF dels 2 bessons, requereixen una FF mínima del 4 % per a cada bessó per a lliurar un resultat, fet que comporta que la taxa de fallada de laboratori augmenti fins al 7,2 % (9). A causa que les sèries publicades inclouen un nombre relativament petit de trisomies, cal ser cautes en l'oferta d'estudis del DNAfl en les gestacions gemel-lars (13).

Teòricament no hi hauria d'haver diferències en l'eficàcia diagnòstica de l'estudi del DNAfl entre les gestacions monocorials i les gestacions úniques, ja que només hi ha una FF, però en la pràctica no hi ha dades que ho demostrin. En les

gestacions amb un bessó no evolutiu, seria d'esperar una taxa superior de falsos positius, degut a una alta probabilitat que el bessó no viable sigui aneuploide.

1.6. Eficiència diagnòstica de l'estudi del DNAfl en la detecció d'aneuploidies sexuals

La inclusió de l'estudi dels cromosomes sexuals és controvertida, pel fet que les conseqüències clíniques de les aneuploidies sexuals són relativament lleus i no comprometen l'estat neurocognitiu de l'individu. La troballa de determinades anomalies ecogràfiques pot suggerir la presència d'una monosomia X, però en aquest cas, estaria indicat la realització d'un procediment invasiu.

Si s'estudien els cromosomes sexuals, la taxa de detecció de la monosomia X és del 90,3 % i per a les altres aneuploidies sexuals és del 93,0 %, amb unes taxes de falsos positius del 0,23 % i el 0,14 %, respectivament (9). Així, si s'estudia la dotació de 5 cromosomes (21, 18, 13, X Y), la taxa total de falsos positius és d'un 0,67 %.

1.7. Eficiència diagnòstica de l'estudi del DNAfl en la detecció de microdeleccions

Tot i que hi ha síndromes de microdelecció bastant prevalents (1/2000-1/4000 per a la microdelecció 22q11, causant de la síndrome de diGeorge) i que la seva detecció s'oferta comercialment des de fa anys, la seva inclusió en el cribratge prenatal a partir de l'estudi del DNAfl és actualment controvertida, a causa de la manca d'estudis de validació clínica. Així doncs, les taxes de detecció i valors predictius positius i negatius dels estudis del DNAfl en la detecció de microdeleccions són actualment desconeguts. En relació a la delecció 22q11, la microdelecció més prevalent i de la qual disposem de més informació, tan sols s'han publicat tres estudis, que presenten diversos problemes metodològics (14-16). El valor predictiu positiu s'estima en un 4 % en la població de baix risc, molt inferior al reportat per a la trisomia 21 (17). Les síndromes de microduplicació no són tan prevalents, tenen un menor impacte clínic i sobretot presenten més dificultats per a la seva detecció mitjançant l'estudi del DNAfl i per aquests motius no està clar que s'hagin d'ofertar en l'actualitat.

2. Recomanacions

2.1. Gestacions de molt alt risc (anomalies fetals)

En cas de molt alt risc d'aneuploidia, com és en cas d'anomalia fetal ecogràfica, translucència nugal augmentada o restricció de creixement de segon trimestre, es recomana realitzar directament un procediment invasiu amb estudi de dosi del genoma fetal mitjançant una micromatriu (*microarray*). En cas d'anomalia cromosòmica en els progenitors també estarà indicat un procediment invasiu.

2.2. Gestacions d'alt risc (cribratge secundari)

En el nostre entorn assistencial, l'alt risc es defineix com un risc $\geq 1/250$ en el cribratge combinat de primer trimestre o en el cribratge bioquímic de segon trimestre, i també inclouria les gestacions amb trisomia prèvia. La majoria dels estudis del DNAfl publicats s'han realitzat en la població d'alt risc de trisomia 21, 18 i 13 i és en aquesta població on està ben establerta la indicació de l'estudi del DNAfl, com a cribratge secundari i en substitució del procediment invasiu d'entrada (3, 6, 9).

El principal avantatge de l'estudi del DNAfl és que evita el risc de pèrdua fetal inherent als procediments invasius, que una recent metanàlisi quantifica en un 0,11 % (1 en 910) postamniocentesi i un 0,22 % (1 en 455) postbiòpsia corial (18). El tema del cost en un cribratge secundari és força neutre, ja que

el cost de l'estudi del DNAfl és similar o discretament superior al del procediment invasiu actual amb realització del cariotip.

Els principals inconvenients de l'estudi del DNAfl en substitució d'un procediment invasiu són que l'estudi no detecta el 100 % de les trisomies estudiades, no detecta les triploïdies i que només estudia entre 3 i 5 cromosomes. S'ha calculat que en la població general es deixarien de detectar un 12 % de les anomalies citogenètiques clínicament significatives detectables en un cariotip (19), les quals representen una incidència aproximada del 0,1 % (20). Aquestes anomalies no detectables augmenten en incidència en la població d'alt risc, tot i que la seva proporció disminueix en el context del total d'anomalies cromosòmiques (20). Aquestes taxes d'anomalies no detectades augmentarien fins al 45 % si es tinguessin en compte també les anomalies submicroscòpiques (21, 22).

Una altra limitació, és que els resultats positius s'han de confirmar finalment amb un procediment invasiu, ja que es tracta d'un mètode de cribratge. De tota manera, els casos doblement positius per a la trisomia 21 (cribratge combinat + estudi del DNAfl) presenten un valor predictiu positiu molt superior en comparació amb el del cribratge convencional, ja que augmenta del 10 % al 90 %.

Fins que l'estudi del DNAfl no estigui cobert pel sistema públic de salut, es contempla mantenir l'oferta del procediment invasiu com a primera elecció, per raons d'equitat i perquè ofereix la possibilitat de realitzar diferents tipus d'estudis, segons la indicació.

2.3. Gestacions de població general (cribratge primari)

Publicacions més recents en què s'ha aplicat l'estudi del DNAfl en gestants de la població general, han confirmat que manté una alta taxa de detecció i una baixa taxa de falsos positius, independentment del risc basal (23). Això ha comportat que diverses societats científiques (el Col·legi Americà d'Obstetres i Ginecòlegs, ACOG, la Societat de Medicina Materno-Fetal, SMFM, el Col·legi Americà de Genètica Mèdica i Genòmica, ACMG, i la Societat Internacional pel Diagnòstic Prenatal, ISPD) actualment considerin l'estudi del DNAfl com una estratègia vàlida de cribratge de primera intenció (cribratge primari) (7, 24, 26).

El principal avantatge del DNAfl com a mètode de cribratge primari és la seva alta eficiència diagnòstica, amb una taxa de detecció superior per a les trisomies 21 i 18 i una taxa de falsos positius molt inferior a la del cribratge combinat de primer trimestre que s'està oferint a Catalunya en l'actualitat (si no s'inclouen els resultats fallits), el qual detecta el 90 % de les 3 trisomies, amb un 4-5 % de falsos positius.

El principal inconvenient de l'estudi del DNAfl com a mètode de cribratge primari és el seu cost molt superior al cribratge combinat, sobretot si es té en compte que la realització de l'ecografia de primer trimestre s'ha de mantenir amb d'altres finalitats, com ara la confirmació de la viabilitat de la gestació, la seva datació, la detecció de gestacions múltiples i l'estudi precoç de l'anatomia fetal. Els estudis de cost-efectivitat presenten un resultat controvertit, ja que el preu de l'ecografia i dels procediments invasius és molt variable segons els països i n'hi ha que inclouen en la seva avaluació el cost sanitari total de les síndromes de Down. La majoria d'estudis consideren que l'aplicació de l'estudi del DNAfl és cost-efectiu només en una estratègia contingent, en què s'ofereix l'estudi del DNAfl en un grup de risc intermedi. De tota manera d'altres estudis demostren que el cribratge primari en la població general és cost efectiu, o bé que només ho seria el cribratge secundari (27-29).

2.4. Gestacions de risc intermedi (cribratge contingent)

A mig camí entre les opcions d'oferir l'estudi del DNAfl només en la població d'alt risc, o d'oferir-lo de forma universal a tota la població gestant, en la sanitat pública d'Europa es va obrir camí l'estratègia de definir un grup de risc intermedi després del cribratge combinat de primer trimestre a qui oferir aquest cribratge. Existeix el model suís que inclou gestacions amb riscos intermedis entre 1/100 i 1/1000 i el model danès entre 1/300 i 1/1000 (implementat fins el 2016). En gestacions de més alt risc s'oferiria la realització d'una biòpsia corial o una amniocentesi i en els de més baix risc no s'oferiria cap estudi més.

En el nostre entorn, aquesta sembla ser l'opció més cost-efectiva, és a dir, establir un interval de risc intermedi on oferir l'estudi del DNAfl com a cribratge d'aneuploidies autosòmiques, després d'haver realitzat un cribratge combinat convencional. L'interval de risc intermedi és arbitrari i pot variar en funció dels recursos disponibles. Aquesta estratègia, adreçada a reduir costos, ja s'ha començat a explorar al nostre país en el marc d'un pla pilot.

2.5. Confirmació de resultats

A causa que l'estudi del DNAfl és un mètode de cribratge, s'hauran de confirmar tots els resultats positius amb un procediment invasiu. Abans de les 15 setmanes, la tècnica d'obtenció de la mostra fetal serà preferentment la biòpsia corial per no diferir els resultats fins el segon trimestre. En cas de sospita de trisomia 13 o monosomia X sense que s'observin anomalies fetals a l'ecografia, s'haurà d'optar preferentment per la realització d'una amniocentesi, per alt risc d'anomalia confinada a la placenta (30). El procediment d'estudi genètic d'elecció en cas de sospita d'aneuploidia és la reacció en cadena per la polimerasa quantitativa fluorescent o QF-PCR (acrònim de l'anglès *quantitative fluorescence polymerase chain reaction*) que permet l'obtenció ràpida d'un resultat, seguida de la realització d'un cariotip per descartar translocacions robertsonianes en cas de trisomia 21 o 13, o bé mosaïcismes de baix grau en cas de resultat sense alteracions. En cas de sospita de microdeleció, caldrà realitzar una micromatriu (*microarray*), després del procediment basat en la QF-PCR prèvia per descartar contaminació cel·lular materna i determinar el sexe fetal.

3. Formació i assessorament genètic

3.1. Formació dels professionals

L'estudi de les anomalies genètiques fetals a partir de fragments del DNA fetal en la sang materna és un exemple clar de com els nous procediments permeten millorar els programes de cribratge i de com es poden crear grans expectatives, tant en els professionals implicats, com en la població en general. De tota manera, per aconseguir-ne una aplicació eficient i equitativa en la pràctica clínica, és indispensable assolir una bona formació dels professionals de la salut, a fi que ampliïn els seus coneixements sobre aquest procediment, especialment en relació a les seves indicacions i limitacions. També és important que els professionals adquireixin les habilitats necessàries per poder explicar de forma clara aquests conceptes, que sovint seran nous per a la gestant o parella, i per poder resoldre satisfactòriament els seus dubtes (31).

3.2. Assessorament genètic previ

Com en qualsevol procediment d'estudi genètic i segons la llei 14/2007 d'investigació biomèdica que regula i ordena el dret a ser informat i a consentir, cal realitzar un assessorament genètic previ per part de professionals qualificats. Cal assegurar que la gestant o parella hagi rebut i entès la informació sobre la utilitat del procediment, les seves limitacions i els possibles resultats. L'objectiu immediat d'aquest assessorament no és la presa de

decisiones, sinó aportar informació sobre els avantatges i les limitacions, de forma objectiva i entenedora. Només així la gestant o parella podrà escollir lliurement entre realitzar el procediment, sol·licitar un altre procediment d'estudi genètic, o no sotmetre's a cap cribratge o estudi prenatal. Finalment caldrà un consentiment explícit i per escrit de la gestant, per assegurar-ne una aplicació lliure i voluntària (31-34).

L'assessorament previ ha de contenir informació sobre:

- El **concepte de cribratge**, és a dir, procediment no diagnòstic que només dona informació sobre el risc de trisomies, algunes microdeleccions o d'altres anomalies i que no reemplaça els procediments invasius.
- La **possibilitat de falsos negatius i falsos positius** i, en aquest cas, la necessitat de procediments invasius per confirmar o descartar el diagnòstic inicial.
- El **temps de resposta** necessari per obtenir el resultat i, en cas de resultat positiu, per la confirmació diagnòstica.
- Les **conseqüències clíniques** de les anomalies genètiques objecte del cribratge.

S'ha de preguntar l'opinió de la gestant o parella en relació al seu interès a ser informats sobre la detecció de:

- aneuploïdies sexuals, ja que són anomalies cromosòmiques que no inclouen la discapacitat intel·lectual entre les seves conseqüències fenotípiques
- anomalies submicroscòpiques, algunes de les quals presenten una gran variabilitat en les seves conseqüències clíniques (22, 35).

3.3. Assessorament genètic posterior

En l'assessorament posterior, en cas de **resultat positiu**, caldrà informar sobre la conveniència de confirmar els resultats mitjançant un procediment invasiu i sol·licitar-ne el consentiment. En el curs d'aquest nou assessorament previ a l'acte invasiu, s'haurà d'escollir el procediment diagnòstic més adequat per confirmar l'anomalia sospitada, preferentment la realització del cariotip en les trisomies 21 i 13, i la micromatriu (*microarray*) en les microdeleccions.

En cas de **resultat negatiu** també és important donar una informació acurada, per no transmetre una falsa garantia de normalitat. Encara que algunes vegades és difícil transmetre el concepte de risc residual, la gestant o parella han de saber quin és aquest risc per poder optar a altres procediments de diagnòstic (36).

Annex: situació actual a Europa

A data 1 d'abril del 2017, hi ha 5 estats europeus que financen el cribratge prenatal d'aneuploïdies mitjançant l'estudi del DNAfl. N'hi ha 4 que ofereixen l'estudi del DNAfl com a possible alternativa al procediment invasiu en un cribratge secundari a partir d'un risc de 1/300 (Dinamarca), 1/250 (Finlàndia), 1/200 (Holanda, Suècia, a la regió d'Estocolm). A Suïssa s'ofereix en pacients amb un risc alt (1/11-1/380) com alternativa al procediment invasiu i amb riscos intermedis com a opció única (1/380-1/10000). A Holanda s'ofereix com a cribratge primari amb copagament. A partir de l'1 de gener de 2018, el Regne Unit l'oferirà com a cribratge secundari a partir d'un risc 1/150.

Bibliografia

- (1) Lo YM, Chiu RW. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem* 2008;54:461-6.
- (2) 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.
- (3) Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, *et al.* DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011;13:913-20.
- (4) Bianchi DW, Rava RP, Sehnert AJ. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014;371:578.
- (5) Stokowski R, Wang E, White K, Batey A, Jacobsson B, Brar H, *et al.* Clinical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies. *Prenat Diagn* 2015;35(12):1243-6.
- (6) Dar P, Curnow KJ, Gross SJ, Hall MP, Stosic M, Demko Z, *et al.* Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *Am J Obstet Gynecol* 2014;211:527.e1-17.
- (7) Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbebiyi A, Uthman OA, Madan J, *et al.* Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2016;6(1):e010002.
- (8) Cirigliano V, Ordoñez E, Rueda L, Syngelaki A, Nicolaides KH. Performance evaluation of the NeoBona test, a new paired-end massive parallel shotgun sequencing approach for cfDNA based aneuploidy screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;DOI: 10.1002/uog.17386.
- (9) Gil MM, Quezada MS, R. Revello, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45(3):249-66.
- (10) Quezada MS, Del Mar Gil M, Francisco C, Orðsz G, Nicolaides KH. Screening for trisomies 21, 18 and 13 by cell-free DNA analysis of maternal blood at 10-11 weeks' gestation and the combined test at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45(1):36-41.
- (11) Revello R, Sarno L, Ispas A, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;47(6):698-704.
- (12) Borrell A, Stergiotou I. Cell-free DNA testing: inadequate implementation of an outstanding technique. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45(5):508-11.
- (13) Fosler L, Winters P, Jones KW, Curnow KJ, Sehnert AJ, Bhatt S, *et al.* Aneuploidy Screening Using Noninvasive Prenatal Testing in Twin Pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;DOI:10.1002/uog.15964.
- (14) Gross SJ, Stosic M, McDonald-McGinn DM, Bassett AS, Norvez A, Dhamankar R, *et al.* Clinical experience with single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal screening for 22q11.2 deletion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;47:177-183.
- (15) Helgeson J, Wardrop J, Boomer T, Almasri E, Paxton WB, Saldívar JS, *et al.* Clinical outcome of subchromosomal events detected by whole-genome noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn* 2015;35:999-1004.
- (16) Taneja P, Curnow K, Halks-Miller M, Seltzer W, de Feo E, Bhatt S. Noninvasive prenatal screening for microdeletions: Clinical population and outcomes. *Prenat Diagn* 2015;35(Suppl. 1):15.

- (17) Hui L. Cell-free DNA testing for 22q11.2 deletion syndrome: appraising the viability, effectiveness and appropriateness of screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;47:137-141.
- (18) Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;17.
- (19) Caine A, Maltby AE, Parkin CA, Waters JJ, Crolla JA; for the UK Association of Clinical Cytogeneticists (ACC). Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment. *Lancet* 2005;366:123-8.
- (20) Petersen OB, Vogel I, Ekelund C, Hyett J, Tabor A; Danish Fetal Medicine Study Group; Danish Clinical Genetics Study Group. Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: population-based study from a country with existing first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;43(3):265-71.
- (21) Shani H, Goldwaser T, Keating J, Klugman S. Chromosomal abnormalities not currently detected by cell-free fetal DNA: a retrospective analysis at a single center. *Am J Obstet Gynecol* 2016;214(6):729.e1-729.e11.
- (22) Armengol L, Nevado J, Serra-Juhé C, Plaja A, Mediano C, García-Santiago FA, *et al.* Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum Genet* 2012;131(3):513-23.
- (23) Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, *et al.* Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med* 2015;372(17):1589-97.
- (24) Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, *et al.* Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2016;18(10):1056-65.
- (25) Benn P, Borrell A, Chiu R, Cuckle H, Dugoff L, Faas B, *et al.* Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn* 2013;33(7):622-9.
- (26) American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 545: Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2012;120(6):1532-4.
- (27) Beulen L, Grutters JP, Faas BH, Feenstra I, van Vugt JM, Bekker MN. The consequences of implementing non-invasive prenatal testing in Dutch national health care: a cost-effectiveness analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;182C:53-61.
- (28) Fairbrother G, Burigo J, Sharon T, Song K. Prenatal screening for fetal aneuploidies with cell-free DNA in the general pregnancy population: a cost-effectiveness analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29(7):1160-4.
- (29) Cuckle H, Benn P, Pergament E. Maternal cfDNA screening for Down syndrome--a cost sensitivity analysis. *Prenat Diagn* 2013;33(7):636-42.
- (30) Grati FR, Bajaj K, Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Malvestiti B, *et al.* The type of feto-placental aneuploidy detected by cfDNA testing may influence the choice of confirmatory diagnostic procedure. *Prenat Diagn* 2015;35(10):994-8.
- (31) Hui L, Bianchi DW. Noninvasive Prenatal DNA Testing: The Vanguard of Genomic Medicine. *Annu Rev Med* 2017;68:459-72.
- (32) Chen A, Tenhunen H, Torkki P, Heinonen S, Lillrank P, Stefanovic V. Women's choices for invasive or non-invasive testing: influence of gestational age and service delivery. *Prenat Diagn* 2016;36(13):1217-24.
- (33) Lewis C, Hill M, Chitty LS. A qualitative study looking at informed choice in the context of non-invasive prenatal testing for aneuploidy. *Prenat Diagn* 2016;36(9):875-81.
- (34) Comité de Bioética de España. El consejo genético prenatal <www.comitedebioetica.es/files/documentacion/consejo-genetico-prenatal.pdf> (Accés 2017-03-28).
- (35) Oepkes D, Yaron Y, Kozłowski P, Rego de Sousa MJ, Bartha JL, van den Akker ES, *et al.* Counseling for non-invasive prenatal testing (NIPT): what pregnant women may want to know. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;44(1):1-5.
- (36) Wittman AT, Hashmi SS, Mendez-Figueroa H, Nassef S, Stevens B, Singletary CN. AJP Patient Perception of Negative Noninvasive Prenatal Testing Results. *AJP Rep* 2016;6(4):e391-e406.