

RECOMANACIONS PER A L'APLICACIÓ CLÍNICA DE LA DETECCIÓ D'ANEUPLOÏDIES EN ADN FETAL LLIURE EN SANG MATERNA (v. 2017)

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, i Grup de Bioquímica del Programa de Diagnòstic Prenatal de Catalunya.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. ADN FETAL LLIURE

En la sang materna existeixen fragments d'ADN fetal lliure (ADNfl) de procedència placentària que es poden analitzar per determinar 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'aneuploïdia, que requereix confirmació mitjançant una prova diagnòstica invasiva en cas de resultat positiu.

1.2. MÈTODES D'ANÀLISI DE L'ADNfl

Els principals mètodes d'anàlisi de l'ADNfl per la detecció d'aneuploïdies són: a) *Shotgun Massive Parallel Sequencing*, que seqüencia fragments de tots els cromosomes i després determina el nombre de còpies d'uns cromosomes determinats ³⁻⁴; b) enriquiment mitjançant sondes específiques de regions dels cromosomes d'interès i hibridació en arrays ⁵ (abans *Targeted Massive Parallel Sequencing*) i c) seqüenciació de SNPs (polimorfismes de nucleòtid únic), que analitza les distribucions de polimorfismes en els cromosomes estudiats en la mare i el fetus ⁶. A part d'aquestes 3 tècniques, n'hi ha de noves en desenvolupament. No hi ha evidència científica per decantar-se per un mètode 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 mètodes disponibles ofereixen sensibilitats similars per a les trisomies autosòmiques i per a les aneuploïdies sexuals, i la majoria ofereixen l'estudi opcional d'algunes síndromes de microdeleció. La tècnica basada en SNP es pot realitzar a partir de les 9 setmanes de gestació i la resta a partir de les 10 setmanes.

1.3. EFECTIVITAT DE L'ESTUDI DE L'ADNfl EN GESTACIONS ÚNIQUES

Una recent revisió sistemàtica i metaanàlisi recull que la **taxa de detecció** de l'ADNfl és actualment del 99.3% per a la trisomia 21, el 97.4% per a la trisomia 18 i el 97.4% 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

mosaicisme 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 òrgan. Així doncs, l'estudi de l'ADNfl presenta una sensibilitat i especificitat molt altes per a la trisomia 21 i menors per a les trisomies 18 i 13.

Aquestes taxes de detecció disminueixen si només es tenen en compte les sèries de casos de gestacions de primer trimestre (96.0%, 92.5% i 85.0% per a les trisomies 21,18 i 13), les sèries provinents de 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 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 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) d'ADNfl, calculada com a percentatge de l'ADNfl sobre el total de l'ADN lliure en 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 donar un resultat quan la FF < 4%, a excepció d'alguna tècnica més recent que sembla mantenir una alta fiabilitat en FF baixes⁸.

Les tècniques d'ADNfl presenten una **taxa de no-resultat** ("no-call") relativament elevada, que varia entre el 0 i el 12%. Una metaanàlisi mostra l'existència d'un 4.3% de mostres inadequades que no es processen i un 5.1% adicional de fallades de laboratori, la meitat de les quals són degudes a una baixa FF i l'altra meitat per una fallada de l'assaig⁹. S'ha observat un alt risc d'aneuploidia (3%-4%) en cas de resultat fallit¹⁰. 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 corporal¹¹. Si es consideren els no-resultats com a resultats positius¹², 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 13⁷.

1.5 EFECTIVITAT DE L'ESTUDI DE L'ADNfl EN GESTACIONS GEMEL·LARS

En gestacions múltiples l'efectivitat de l'ADNfl disminueix, amb unes taxes de detecció del 89.4% per a la trisomia 21 i del 73.3% per a la trisomia 18⁷. 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 donar un resultat, fet que comporta que la taxa de fallada de laboratori augmenti fins al

7.2%⁹ Com que les sèries publicades inclouen un nombre relativament petit de trisomies, cal ser cautes en l'oferta de l'ADNfl en les gestacions gemel·lars¹³.

Teòricament no hi hauria d'haver diferències en l'efectivitat de l'estudi de l'ADNfl 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 EFECTIVITAT DE L'ESTUDI DE L'ADNfl EN LA DETECCIÓ D'ANEUPLOÏDIES SEXUALS

La inclusió de l'estudi dels cromosomes sexuals és controvertida, pel fet que les conseqüències clíniques de les aneuploïdies sexuals són relativament lleus i no comprometen l'estat neurocognitiu de l'individu. La troballa de determinades anomalies ecogràfiques poden 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 aneuploïdies sexuals és del 93.0%, amb unes taxes de falsos positius del 0.23% i el 0.14%, respectivament⁹. 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 EFECTIVITAT DE L'ADNfl EN LA DETECCIÓ DE MICRODELECCIONS

Tot i que hi ha síndromes de microdelecció bastant prevalents (1/2000-1/4000 per a la microdelecció 22q11.2, 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'ADNfl 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 reals de les tècniques d'ADNfl en la detecció de microdeleccions són actualment desconegudes. En relació a la delecció 22q11.2, la microdelecció més prevalent i de la qual disposem de més informació, tan sols s'han publicat tres estudis, que presenten diversos problemes metodològics¹⁴⁻¹⁶. El valor predictiu positiu s'estima en un 4% en població de baix risc, molt inferior al reportat per a la trisomia 21¹⁷. Les síndromes de microduplicació no són tan prevalents, tenen un menor impacte clínic i sobretot presenten més dificultats per a la seva detecció mitjançant ADNfl 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'aneuploïdia, com és en cas d'anomalia fetal ecogràfica, translucència nucal augmentada o restricció de creixement de segon trimestre, es recomana realitzar directament una prova invasiva amb estudi de dosi del genoma fetal mitjançant un

microarray. En cas d'anomalia cromosòmica en els progenitors també estarà indicada una tècnica invasiva.

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 d'ADNfl publicats s'han realitzat en població d'alt risc de trisomia 21, 18 i 13 i és en aquesta població on està ben establerta la indicació de l'estudi de l'ADNfl, com a cribratge secundari i en substitució del procediment invasiu d'entrada ^{3,6,9}.

El principal avantatge de l'estudi de l'ADNfl és que evita el risc de pèrdua fetal inherent als procediments invasius, que una recent metanàlisi quantifica en un 0.11% (1 en 910) post-amniocentesi i un 0.22% (1 en 455) post-biòpsia corial ¹⁸. El tema del cost en un cribratge secundari és força neutre, ja que el cost de l'ADNfl és similar o discretament superior al de la prova invasiva actual amb realització de cariotip.

Els principals inconvenients de l'estudi de l'ADNfl en substitució d'un procediment invasiu és que 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, que 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 test de cribratge. De tota manera, els casos doblement positius per a la trisomia 21 (combinat + ADNfl) presentaran 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 ADNfl no estigui cobert pel sistema públic de salut, es contempla mantenir l'oferta de la prova invasiva 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 LA POBLACIÓ GENERAL (CRIBRATGE PRIMARI)

Publicacions més recents en què s'ha aplicat l'estudi de l'ADNfl en gestants de la població general, han confirmat que manté una alta taxa de detecció i una baixa taxa de falsos positius, independentment del nivell de risc basal ²³. Això ha comportat que diverses societats científiques (ACOG-SMFM, ACMG, ISPD) actualment considerin l'estudi de l'ADNfl com una estratègia vàlida de cribratge de primera intenció (cribratge primari) ^{7,24-26}.

El principal avantatge del ADNfl com a mètode de cribratge primari és la seva alta efectivitat, 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'hi 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 de l'ADNfl com a cribratge primari és el seu cost molt superior al cribratge combinat, sobretot si es té en compte que 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.

2.4 GESTACIONS DE RISC INTERMEDI (CRIBRATGE CONTINGENT)

A mig camí entre les opcions d'oferir l'estudi d'ADNfl només en població d'alt risc, o d'oferta 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 s'ofereix aquest test, però no prova invasiva. Existeix el model danès (implementat fins el 2016) amb un grup d'alt risc ($\geq 1/300$) on s'ofereix estudi d'ADNfl o prova invasiva i un grup intermedi ($1/301 - 1/1000$) on s'ofereix només l'estudi ADNfl. El model suís té 4 grups de risc: molt alt risc ($\geq 1/10$) on només s'ofereix prova invasiva, alt risc ($1/11 - 1/380$) on s'ofereixen les 2 opcions i un grup intermedi ($1/381 - 1/1000$) on només s'ofereix l'estudi ADNfl. En el grup de més baix risc no s'oferiria cap prova més.

La majoria d'estudis de cost-efectivitat consideren que l'aplicació de l'ADNfl és cost-efectiu només en una estratègia contingent, encara que hi ha algun estudi que dona suport al cribratge primari en la població general o al cribratge secundari ²⁷⁻²⁹. En el nostre entorn, el cribratge contingent s'ha considerat l'opció més cost efectiva, amb la introducció d'un grup de risc intermedi, on s'ofereix l'ADNfl com a test per cribratge d'aneuploidies autosòmiques. Els valors dels cut-offs són sempre arbitraris i poden 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

Degut a que l'estudi de l'ADNfl és una tècnica de cribratge, s'hauran de confirmar tots els resultats positius amb una prova invasiva. Abans de les 15 setmanes, la tècnica d'obtenció de mostra fetal serà preferentment la biòpsia corial per no diferir els resultats fins al 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. La primera tècnica genètica d'elecció en cas de sospita d'aneuploidia és la QF-PCR que permet l'obtenció ràpida d'un resultat, seguida d'un cariotip per descartar translocacions Robertsonianes en cas de trisomia 21 o 13, o bé mosaïcismes de baix grau en cas de resultat normal. En cas de sospita de microdeleció caldrà

realitzar un microarray, després d'una 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 d'ADN fetal en la sang materna és un exemple clar de com les noves tecnologies permeten millorar els programes de cribratge i de com es poden crear grans expectatives, tant per part dels 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, que amplii el seu coneixement sobre aquesta tecnologia, especialment en relació a les indicacions i limitacions de la tècnica. 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/parella, i per poder resoldre satisfactòriament els seus dubtes ³¹.

3.2 ASSESSORAMENT GENÈTIC PRE-TEST

Com en qualsevol test 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 pre-test per part de professionals qualificats. Cal assegurar que la gestant/parella hagi rebut i entès la informació sobre la utilitat de la prova, les seves limitacions i possibles resultats. L'objectiu immediat d'aquest assessorament no és la presa de decisions, sinó aportar informació sobre avantatges i limitacions del test, de forma objectiva i entenedora. Només així la gestant/parella podrà escollir lliurement entre realitzar el test, sol·licitar un altre prova genètica, o no sotmetre's a cap cribratge o prova prenatal. Finalment caldrà un consentiment explícit i per escrit de la gestant, per assegurar-ne una aplicació lliure i voluntària ³¹⁻³⁴.

L'assessorament pre-test ha de contenir informació sobre:

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

S'ha de preguntar l'opinió de la gestant/parella sobre si estan interessats 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 POST-TEST

En l'assessorament post-test en cas de **resultat positiu** caldrà informar sobre la conveniència de confirmar els resultats mitjançant una prova invasiva i sol·licitar-ne el consentiment. En el curs d'aquest nou assessorament pre-test invasiu, s'haurà d'escollir la tècnica diagnòstica més adequada per confirmar l'anomalia sospitada: preferentment cariotip en les trisomies 21 i 13, i 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 es difícil transmetre el concepte de risc residual, la gestant/parella han de saber quin es aquest risc per poder optar a altres proves de diagnòstic ³⁶.

ANNEX: SITUACIÓ ACTUAL A EUROPA

A data 1 d'abril del 2017, hi ha 5 estats europeus que financien el cribratge prenatal d'aneuploïdies mitjançant ADNfl. N'hi ha 4 que ofereixen l'ADNfl com a possible alternativa a la prova invasiva en un cribratge secundari a partir d'un risc de 1/300 (Dinamarca), 1/250 (Finlàndia), 1/200 (Holanda; Suècia, regió d'Estocolm). A Suïssa s'ofereix en riscos alts (1/11-1/380) com a alternativa a la prova invasiva i en riscos intermedis com a opció única (1/381-1/1000). A Holanda s'ofereix com a cribratge primari amb co-pagament. 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.

MEMBRES DEL COMITÈ CONJUNT

Antoni Borrell: *President de la Secció Ecografia i Medicina Fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia*

Elena Casals: *Coordinadora del Grup de Bioquímica del Programa de Diagnòstic Prenatal de Catalunya*

Gerard Albaiges: *Membre de la Secció de Medicina Materno-fetal de la Societat Catalana d'Obstetrícia i Ginecologia*

Teresa Vendrell: *Grup de Genètica Clínica i Dismorfologia*

Rosa Ana de la Chica: *Coordinadora de la Comissió de Genètica i Reproducció Humana del Col·legi de Biòlegs de Catalunya*

Alberto Plaja: *Assessor (Hospital Vall d'Hebron)*

Lluís Armengol: *Assessor (Q-Genomics)*

Vincenzo Cirigliano: *Assessor (Labco Diagnostics)*

APROVACIÓ Abril 2017

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, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, Nelson SF, Canick JA. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study *Genet Med*. 2011 Nov;13(11):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, Balanarasimha M, Hollemon D, Sparks A, Nicolaides K, Musci TJ. 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 Dec;35(12):1243-6.
- 6.- Dar P, Curnow KJ, Gross SJ, Hall MP, Stosic M, Demko Z, Zimmermann B, Hill M, Sigurjonsson S, Ryan A, Banjevic M, Kolacki PL, Koch SW, Strom CM, Rabinowitz M, Benn P. 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, Clarke A, Quenby S, Clarke A. 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 Jan 18;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*. 2016 Dec 15.
- 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 Mar;45(3):249-66.
- 10.- Quezada MS, Del Mar Gil M, Francisco C, Oròsz 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 Jan;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 Jun;47(6):698-704.
- 12.- Borrell A, Stergiotou I. Cell-free DNA testing: inadequate implementation of an outstanding technique. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 May;45(5):508-11.
- 13.- Fosler L, Winters P, Jones KW, Curnow KJ, Sehnert AJ, Bhatt S, Platt LD Aneuploidy Screening Using Noninvasive Prenatal Testing in Twin Pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016 May 19.
- 14.- Gross SJ, Stosic M, McDonald-McGinn DM, Bassett AS, Norvez A, Dhamankar R, Kobara K, Kirkizlar E, Zimmermann B, Wayham N, Babiarz JE, Ryan A, Jinnett KN, Demko Z, Benn P. 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, Saldivar JS, Dharajiya N, Monroe TJ, Farkas DH, Grosu DS, McCullough RM. 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 Jul 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: 123–28.
- 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 Mar;43(3):265-71.
- 21.- Shani H, Goldwasser 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 Jun;214(6):729.e1-729.e11.
- 22.- Armengol L, Nevado J, Serra-Juhé C, Plaja A, Mediano C, García-Santiago FA, García-Aragonés M, Villa O, Mansilla E, Preciado C, Fernández L, Ángeles Mori M, García-Pérez L, Lapunzina PD, Pérez-Jurado LA. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum Genet.* 2012 Mar;131(3):513-23.
- 23.- Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, Tomlinson MW, Pereira L, Spitz JL, Holleman D, Cuckle H, Musci TJ, Wapner RJ. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med.* 2015 Apr 23;372(17):1589-97
- 24.- Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, Klugman S, Watson MS. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics *Genet Med.* 2016 Oct;18(10):1056-65.
- 25.- Benn P, Borrell A, Chiu R, Cuckle H, Dugoff L, Faas B, Gross S, Johnson J, Maymon R, Norton M, Odibo A, Schielen P, Spencer K, Huang T, Wright D, Yaron Y. Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn.* 2013 Jul;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 Aug 30;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 Jul;33(7):636-42.
- 30.- Grati FR, Bajaj K, Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Malvestiti B, Pompilii E, Maggi F, Gross S, Simoni G, Ferreira JC. The type of feto-placental aneuploidy detected by cfDNA testing may influence the choice of confirmatory diagnostic procedure. *Prenat Diagn.* 2015 Oct;35(10):994-8.
- 31.- Hui L, Bianchi DW. Noninvasive Prenatal DNA Testing: The Vanguard of Genomic Medicine. *Annu Rev Med.* 2016 Oct 10.
- 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 Nov 8.

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 Sep;36(9):875-81.

34.- www.comitedebioetica.es/files/documentacion/consejo-genetico-prenatal.pdf.

35.- Oepkes D, Yaron Y, Kozlowski P, Rego de Sousa MJ, Bartha JL, van den Akker ES, Dornan SM, Krampfl-Bettelheim E, Schmid M, Wielgos M, Cirigliano V, Di Renzo GC, Cameron A, Calda P, Tabor A. Counseling for non-invasive prenatal testing (NIPT): what pregnant women may want to know. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014 Jul;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. *Rep.* 2016 Oct;6(4):e391-e406.