



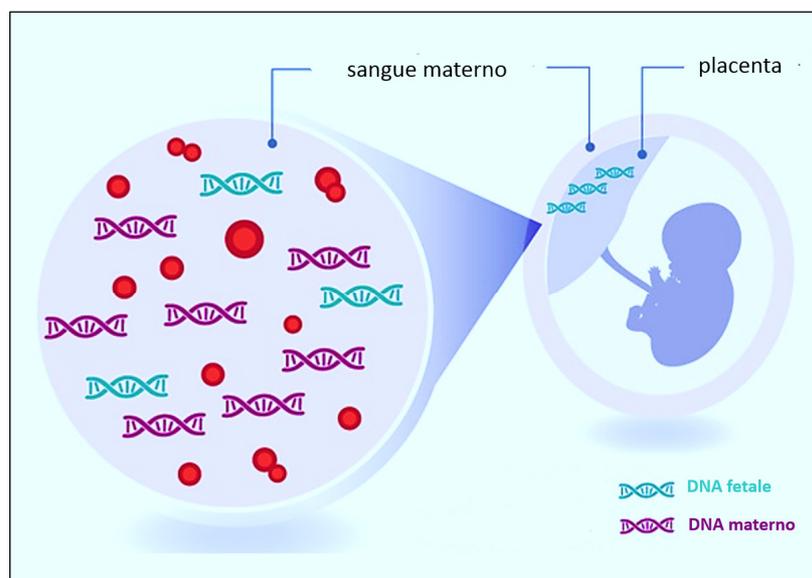
Ministero della Salute

Consiglio Superiore di Sanità

Sezione I

Linee-Guida

Screening prenatale non invasivo basato sul DNA (*Non Invasive Prenatal Testing – NIPT*)



Nel plasma materno in gravidanza sono presenti cellule fetali nucleate e DNA libero (cffDNA) non-cellulare proveniente dalle cellule della placenta

Maggio 2015

GRUPPO DI LAVORO CSS

“Screening prenatale non invasivo basato sul DNA (*Non Invasive Prenatal Testing – NIPT*)”

Indice

Gruppo di lavoro della Sezione I del Consiglio Superiore di Sanità	3
1. Introduzione	4
2. Il DNA libero nel sangue materno	6
2.1 Generalità sul NIPT e sulla frazione fetale.....	6
2.2 Campioni non utilizzabili.....	7
3. Tecniche di analisi del cfDNA	8
4. Esperienze sull’uso del cffDNA nello screening prenatale	9
4.1 Aneuploidie autosomiche.....	9
4.1.a Sensibilità e specificità delle T13, T18, T21 nelle gravidanze singole.....	9
4.1.b Sensibilità e specificità delle T13, T18, T21 nelle gravidanze gemellari.....	9
4.2 Aneuploidie dei cromosomi sessuali.....	10
Sensibilità e specificità delle aneuploidie dei cromosomi X e Y nelle gravidanze singole.....	10
4.3 Microdelezioni.....	10
4.4 Patologie mendeliane e altre indicazioni.....	11
5. Sensibilità, specificità e implicazioni etiche	12
<u>Limiti biologici</u>	12
<u>Profili etici</u>	12
6. Impatto economico e sociale	14
7. Accreditamento e qualità	16
8. Raccomandazioni sull’uso del test del cffDNA	17
9. Conclusioni	18
10. Allegati	
10.1 Allegato - Sensibilità (SENS), specificità (SPEC), prevalenza (PREV), valore predittivo positivo (PVV) e valore predittivo negativo (PPN) dei test di screening.....	21
10.2 Allegato - Tecniche di analisi del cffDNA.....	23
10.3 Allegato - Modello di consenso informato per gravidanza singola.....	25
10.4 allegato - Modello di consenso informato per gravidanza gemellare (dizigote)	28
11. Bibliografia	31

CONSIGLIO SUPERIORE DI SANITÀ, SEZIONE I
(PRESIDENTE PROF. ROCCO BELLANTONE)

GRUPPO DI LAVORO

“Screening prenatale non invasivo basato sul DNA (*Non Invasive Prenatal Testing – NIPT*)”

Coordinatore:

Prof. Bruno Dallapiccola componente Sezione I CSS – Professore ordinario di Genetica Medica - Direttore Scientifico IRCCS Ospedale Pediatrico “Bambino Gesù”, Roma - Componente Comitato Nazionale per la Bioetica (Presidenza del Consiglio dei Ministri)

Segretario tecnico:

Dott. Stefano Moriconi Dirigente medico, Segretario Sezione I del Consiglio Superiore di Sanità

Componenti:

Prof. Domenico Arduini Professore ordinario di Ginecologia e Ostetricia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Tor Vergata, Roma

Prof. Lorenzo D’Avack Professore ordinario di Filosofia del Diritto - Facoltà di Giurisprudenza dell’Università di Roma Tre, Roma - Vice Presidente Vicario del Comitato Nazionale per la Bioetica (Presidenza del Consiglio dei Ministri)

Prof.ssa Assunta Morresi Professore associato di Chimica Fisica, Università di Perugia - Componente del Comitato Nazionale per la Bioetica (Presidenza del Consiglio dei Ministri) - Componente Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze per la Vita (Presidenza del Consiglio dei Ministri)

Dott. Antonio Novelli Direttore U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico “Bambino Gesù”, Roma;

Prof.ssa Eleonora Porcu Vice Presidente del CSS - Professore associato - Dipartimento Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna - Responsabile del Centro Sterilità Procreazione Medica Assistita, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna

Prof. Antonio G. Spagnolo Professore ordinario di Medicina legale e delle assicurazioni - Direttore dell'Istituto di Bioetica, Facoltà di Medicina e Chirurgia "A. Gemelli", Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Esperti in audizione:

Prof. Antonio Amoroso Presidente **SIGU** (Società Italiana di Genetica Umana)
Dott. Giuseppe Cali' Presidente **SIEOG** (Società Italiana di Ecografia Ostetrica e Ginecologica e Metodologie Biofisiche)

1. Introduzione

Le tecniche di diagnosi prenatale comprendono indagini strumentali e di laboratorio, sviluppate negli ultimi 50 anni, con l'obiettivo di monitorare il concepito, a partire dalle prime fasi dello sviluppo embrionale fino ai momenti che precedono il parto.

L'**ecografia prenatale**, cioè il monitoraggio della gravidanza mediante ultrasuoni, è la tecnica non invasiva di diagnosi prenatale più importante e diffusa. Viene impiegata per monitorizzare lo sviluppo dell'embrione e del feto, verificarne il benessere, seguire l'evoluzione della gravidanza e come supporto alle indagini invasive che prevedono l'acquisizione di tessuti fetali. La non invasività e l'innocuità della tecnica, che ne consente la ripetizione nel corso della gravidanza, insieme all'elevato grado di risoluzione ottenuta con le apparecchiature di ultima generazione, giustificano la straordinaria diffusione dell'ecografia prenatale che, nei paesi industrializzati, viene utilizzata pressoché in tutte le gravidanze, proponendosi come un vero e proprio strumento di screening prenatale. Le potenzialità della tecnica correlano direttamente con l'epoca gestazionale in cui viene utilizzata, la risoluzione della apparecchiatura e l'esperienza dell'operatore.

L'**amniocentesi** è la tecnica invasiva di diagnosi prenatale maggiormente utilizzata (>100.000 prelievi/anno in Italia), finalizzata all'acquisizione, mediante puntura transaddominale, sotto controllo ecografico, del liquido amniotico, idealmente attorno alla XV-XVI settimana di amenorrea. Il rischio di aborto, collegato all'invasività della tecnica, è calcolato in circa 1:200, ma varia ampiamente in rapporto all'esperienza dell'operatore. Il liquido amniotico contiene una parte non corpuscolata, cioè priva di cellule, che viene isolata, per centrifugazione del campione, ed una parte corpuscolata, formata dagli amniociti, cioè le cellule che derivano dalla cute, dalle mucose, dalle vie genito-urinarie, dall'apparato gastrointestinale del feto e dalle membrane amniotiche. Sulla porzione non corpuscolata è possibile dosare l'alfafetoproteina (AFP) e, eventualmente, altri marcatori biochimici, mentre gli amniociti si utilizzano, in primo luogo, per le indagini citogenetiche, ed eventualmente per le analisi molecolari e biochimiche, sia direttamente che sulle cellule coltivate.

La **villocentesi** è una tecnica invasiva, utilizzata per il prelievo del trofoblasto (>25.000 prelievi/anno in Italia), mediante puntura transaddominale, sotto controllo ecografico, idealmente attorno alla X-XII settimana di amenorrea. Il rischio di aborto, collegato all'invasività della tecnica, è circa 2-3%, ma varia significativamente in rapporto all'esperienza dell'operatore. Il tessuto acquisito può essere utilizzato per l'analisi citogenetica, direttamente sulle cellule del citotrofoblasto o sulle colture (cellule mesenchimali del villo). L'uso combinato delle due tecniche fornisce informazioni su popolazioni cellulari che hanno un'origine embrionale diversa, consentendo, nella maggior parte dei casi, di risolvere il potenziale problema delle discrepanze tra il cariotipo placentare ed il cariotipo fetale (riscontrabile in circa il 2% dei campioni), che è riconducibile ad una condizione di mosaicismo postzigotico. La villocentesi permette di acquisire materiale biologico in quantità relativamente abbondanti ed è perciò la tecnica di elezione per la diagnosi molecolare dei geni-malattia e per le analisi biochimiche. Il vantaggio della precocità della tecnica, rispetto all'amniocentesi, è controbilanciato dalla sua maggiore invasività e dalla acquisizione di tessuto placentare e non fetale.

La **cordocentesi** è la tecnica di acquisizione del sangue fetale, per puntura transaddominale, attorno alla XVIII settimana di amenorrea. Il rischio di aborto, collegato all'invasività della tecnica, è circa 2%, ma varia significativamente in base all'esperienza dell'operatore. La tecnica è fortemente in disuso (<350 prelievi/anno in Italia), essendo utilizzata soprattutto per monitorizzare alcune patologie infettive ed eventualmente per dirimere risultati citogenetici non informativi con l'analisi degli amniociti.

Gli **screening prenatali non invasivi**, sviluppati negli ultimi 30 anni, si basano essenzialmente sull'analisi di marcatori biochimici sul sangue materno, combinati con le indagini ecografiche. Il prototipo di queste analisi è stato il dosaggio dell'alfa fetoproteina (AFP), inizialmente utilizzato come marcatore dei difetti del tubo neurale (valore aumentato) e, successivamente, della sindrome di Down (SD; valore ridotto). Con il tempo questi screening, basati sulla associazione di marcatori diversi, hanno ottenuto un crescente sviluppo nel calcolo della probabilità delle aneuploidie fetali, soprattutto nelle madri che rientravano nella fascia di età a bassa probabilità di patologie cromosomiche nel feto, e perciò non candidate al monitoraggio invasivo della gravidanza. Il triplo-test (o tri-test) basato sul dosaggio, nel secondo trimestre, dell'AFP, della gonadotropina corionica e dell'estriolo non coniugato, combinato con l'età materna e con l'età gestazionale misurata ecograficamente, consentiva di predire circa il 65% delle SD, con una percentuale di falsi positivi compresa tra il 5 ed il 10%. A questo protocollo ne sono stati affiancati nel tempo numerosi altri, basati su vari marcatori, in diverse combinazioni, e sull'anticipazione dello screening dal secondo al primo trimestre. Parallelamente, i marcatori biochimici sono stati integrati con quelli ecografici, in particolare l'analisi dello spessore della cute nucale (translucenza nucale - TN), che, sebbene non patognomonico della SD, tra l'XI e la XIV settimana di amenorrea, diagnostica circa il 75% dei casi, con una percentuale di falsi positivi del 5%. Negli ultimi anni si è affermato il bi-test, che utilizza il sangue materno acquisito attorno alla XI settimana, sul quale viene dosata la frazione libera della beta gonadotropina corionica ed una glicoproteina ad elevato peso molecolare, la *Pregnancy Associated Plasma Protein A* (PAPP-A). Questa analisi, integrata con la misurazione della TN e l'età materna, predice circa l'80% delle SD, con una percentuale di falsi positivi pari a circa il 6% (si veda anche l'allegato 1). In questo contesto va considerato anche il test contingente (TN + marker biochimici a 11-13 settimane; marker ecografici a 12-13 settimane o biochimici a 14-16 settimane nei gruppi a probabilità intermedia), che consente di migliorare la specificità del test (Nicolaidis et al 2014).

2. Il DNA libero nel sangue materno

Lo (1997) ha descritto per primo la presenza del cromosoma Y nel plasma di alcune donne con feto di sesso maschile, utilizzando l'analisi del DNA libero presente nel circolo materno (cfDNA).

E' stato dimostrato che, a partire dal primo trimestre di gravidanza, è presente nel circolo ematico materno DNA libero di origine fetale (*cell free fetal DNA*, cffDNA), che può essere recuperato in maniera non-invasiva ed utilizzato per lo studio di alcune patologie fetali.

Il cfDNA origina dalla lisi delle cellule materne e placentari. A partire dalla V settimana di amenorrea, il citotrofoblasto placentare si è ancora alla decidua parietale uterina, le arterie spirali deciduali irrorano le lacune presenti tra la decidua e la placenta, il citotrofoblasto invade e tappezza le pareti delle arterie uterine spiraliformi e le rimodella. Il ricambio delle cellule del trofoblasto, che ricopre le pareti delle arterie spiraliformi, mediato dalle citochine, libera il DNA. I frammenti di DNA fetale degradato contengono circa 180 paia di basi (bp) e sono sospesi nel plasma arterioso.

Il cffDNA può essere isolato precocemente a partire dalla X settimana, quando raggiunge quantità sufficienti per il potenziale impiego clinico. La sua percentuale può variare tra <4%, una quantità non utile per la diagnosi, e circa il 40%, con una media del 10%, alla XII settimana, quando il 90% circa dei frammenti di DNA libero circolante nel plasma originano dall'apoptosi degli epitelii materni, creando una commistione di cfDNA materno e cffDNA. La percentuale del cffDNA viene definita "frazione fetale" (FF). Il cffDNA non è più reperibile nel circolo materno poche ore dopo il parto e probabilmente viene eliminato attraverso l'escrezione renale.

2.1 Generalità sul NIPT e sulla frazione fetale

Il principio dei protocolli di *Non Invasive Prenatal Test* (NIPT), indipendentemente dalla tecnica utilizzata, si basa su comparazioni. Prendendo ad esempio il cromosoma 21 (CR21), la tecnica confronta il numero dei frammenti appartenenti al CR21 nella gravidanza in esame, con il numero dei frammenti di un altro cromosoma dello stesso campione (confronto interno), atteso in una condizione di disomia (due copie di un determinato cromosoma, ad esempio il cromosoma 1 o il 10 o una loro combinazione), oppure con quelli di un *pool* di gravidanze disomiche (due CR21) di riferimento. Se il campione ottenuto dalla gravidanza in esame contiene due coppie di CR21 (due della madre e due del feto), il rapporto tra i conteggi (numero dei frammenti del CR21 nel test/numero dei frammenti nei campioni di riferimento disomici) è all'incirca uguale a 1.

Se nella gravidanza in esame è presente un feto con trisomia 21 (T21), aumenta la FF per la presenza di frammenti circolanti aggiuntivi rilasciati dal CR21 soprannumerario del feto. L'entità dell'aumento dipende dalla percentuale della FF totale e dal numero di bp del CR21, in rapporto alle bp del genoma complessivo del feto.

Il plasma materno contiene percentuali variabili della FF, che differiscono nei diversi campioni. Attorno alla XII settimana, mediamente, la FF corrisponde al 10% circa del cfDNA, con un *range* compreso tra <4% ed il 40%. A seconda della percentuale della FF totale presente nel campione, l'accuratezza dell'analisi del cromosoma può variare, analogamente all'aumento della percentuale

della FF totale, in presenza di una trisomia.

Prendendo come riferimento una percentuale del 10% della FF circolante, l'aumento della FF in presenza di una T21 è pari a circa il 5% del totale ed il rapporto (R) tra il numero di frammenti del CR21 nel campione in esame ed il numero dei frammenti di riferimento disomici aumenta da 1 a circa 1,05. Per una percentuale della FF pari al 20%, l'aumento della FF totale correlata alla presenza di una T21 nel feto è circa 10%, con il conseguente aumento del valore di R da 1 a circa 1,10. In presenza di una FF del 4%, l'aumento della FF correlato ad una T21 fetale è circa 2% ed il valore di R aumenta da 1 a circa 1,02. Infine, se la FF è inferiore al valore soglia del 4%, R è <1,02, un valore statisticamente non differenziabile da 1, che predice la disomia del CR21, cioè la normalità del feto. Questo spiega perché la soglia $\geq 4\%$ sia critica per evitare di avere risultati falsi negativi (FNR), in base all'assenza/insufficiente quantità della FF.

E' quindi opportuno verificare la percentuale della FF nel campione in esame, utilizzando protocolli che prevedono, prima o durante il NIPT, un altro test che di solito si basa sull'analisi di siti polimorfici a singolo nucleotide (cosiddetti SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms*).

Tuttavia non tutti i protocolli di NIPT al momento disponibili effettuano questa analisi. Alcuni test NIPT inseriscono la percentuale della FF nell'algoritmo per la formulazione della probabilità di presenza della trisomia indagata, mentre altri utilizzano fattori di normalizzazione predeterminati, che possono comunque raggiungere elevati livelli di affidabilità (Dan et al, 2012; Zhang et al, 2015)

2.2 Campioni non utilizzabili

E' stato stimato che, in circa il 2% dei campioni prelevati al termine del primo trimestre di amenorrea, la FF non superi la soglia del 4%. Uno studio preliminare suggerisce che la percentuale delle patologie cromosomiche in questi campioni sia significativamente più elevata, rispetto a quella dei campioni con $FF \geq 4\%$ (13,8% rispetto al 2,4%). Circa la metà di questi casi, sottoposti ad un secondo campionamento, confermano che la FF è <4%. Questi risultati, se confermati, suggerirebbero che i campioni in cui non è possibile ottenere un risultato predittivo, a causa della bassa FF, potrebbero fornire indirettamente la spia di un aumento della probabilità di una patologia cromosomica nel feto. Di conseguenza, la disponibilità dell'informazione sulla percentuale della FF presente nel campione potrebbe orientare la gestione clinica della gravidanza (Turocy et al, 2015).

3. Tecniche di analisi del cfDNA

Le tecniche in uso analizzano il cfDNA totale, senza differenziare quello fetale da quello materno. Trattandosi, di fatto, di indagini basate su una commistione di DNA materno e placentare, **il NIPT non è un test diagnostico, ma di screening**. Infatti, come nei test tradizionali, l'impiego di algoritmi dedicati permette di definire la probabilità post-test che il feto sia affetto da una delle principali trisomie autosomiche (trisomia 21 [T21], trisomia 18 [T18], trisomia 13 [T13]) o da un'aneuploidia dei cromosomi sessuali (X, XXX, XXY, XYY), analizzando selettivamente il numero dei frammenti di cffDNA contribuiti da ciascuno dei cromosomi oggetto del test.

Per l'analisi delle aneuploidie mediante NIPT si utilizzano tre principali tecniche basate sulle tecniche di sequenziamento di seconda generazione (*Next Generation Sequencing - NGS*): NGS dell'intero genoma; NGS di specifiche regioni; SNP, cioè polimorfismi di singoli nucleotidi. Si stanno attualmente proponendo NIPT basati sulla tecnologia degli *array* che, in base ai primi dati di validazione, sembrerebbero garantire le stesse *performance*, o addirittura superiori, rispetto alle tecniche di NGS (Juneau et al, 2014).

La tecnica della NGS dell'intero genoma si basa sul sequenziamento del cffDNA presente nel plasma materno, per generare milioni di sequenze brevi dell'intero genoma, che vengono poi mappate su una sequenza di riferimento del genoma umano, per stabilire la loro origine e contare il numero dei frammenti che originano dal cromosoma di interesse, messo a confronto con il numero dei frammenti ottenuti dagli altri cromosomi (Fan et al, 2008). Sono stati sviluppati diversi algoritmi per stabilire se, nel campione in esame, sia aumentato o diminuito il numero dei frammenti, in rapporto ad una soglia suggestiva di una aneuploidia (Fan et al, 2008; Lo et al, 2014; Sehenert et al, 2011). Così ad esempio, se un feto ha una T21, nel plasma materno saranno presenti più frammenti del CR21, rispetto a quanto atteso nei controlli senza T21.

Una tecnica alternativa di NGS amplifica selettivamente specifici loci genomici sul cromosoma d'interesse, che vengono in seguito sequenziati. Questa tecnica è più economica, in quanto riduce le regioni da sequenziare, ma ha il limite di studiare solo alcune regioni di interesse preselezionate. Successivamente ai primi studi di validazione della tecnica per le T21 e T18 su alcune popolazioni ad alto rischio, le successive indagini sulla popolazione generale hanno dimostrato che essa fornisce risultati affidabili anche sulle gravidanze che con un basso rischio a priori (Lau et al, 2014; McCullough et al, 2014; Norton et al, 2014; Norton et al, 2015; Pergament et al, 2014).

La terza tecnica è una variazione di quella precedente e si basa sull'amplificazione di numerosi loci polimorfi (SNP) sul cromosoma d'interesse (Nicolaidis et al, 2013; Zimmermann et al, 2012).

La sensibilità e la specificità nei confronti delle principali aneuploidie sono elevate per tutte e tre le tecniche, indipendentemente dagli strumenti utilizzati per il sequenziamento e dall'algoritmo bioinformatico utilizzato (Boon et al, 2013; Gil et al, 2014).

4. Esperienze sull'uso del cffDNA nello screening prenatale

Gli studi relativi all'uso del NIPT come test di screening sono stati promossi e realizzati dalle aziende che, a partire dal 2012, hanno avviato la sua commercializzazione, con finalità cliniche: *Sequenom (MaterniT21)*, *Verinata (Verifi)*, *Ariosa (Harmony)*, *Natera (Panorama)*, *BGI (Nifty)*.

Alcune Società Scientifiche (ACOG, ACMG, ASHG, ESHG, ISPD, ISUOG, NSGC, SIEOG, SIGU) hanno nel frattempo assunto posizioni concordanti sulla validità clinica, i limiti, gli aspetti etici ed economici, il significato ed il ruolo del NIPT (Dondorp et al, 2015).

4.1 Aneuploidie autosomiche

4.1.a Sensibilità e specificità dello screening delle T13, T18, T21 nelle gravidanze singole

Una recente metanalisi (Gil et al, 2015), relativa a 37 studi, ha riportato, per le tre principali aneuploidie autosomiche, nelle gravidanze singole, le seguenti percentuali di sensibilità (*detection rate - DR*) e di specificità (risultati falsi positivi - FPR) del NIPT:

- T21 - DR 99,2% (95% CI, 98,5-99,6%); FPR 0,09% (95% CI, 0,05-0,14%);
- T18 - DR 96,3% (95% CI, 94,3-97,9%); FPR 0,13% (95% CI, 0,07-0,20%);
- T13 - DR 91,0% (95% CI, 85,0-95,6%); FPR 0,13% (95% CI, 0,05-0,26%).

Diversi fattori giustificano queste discrepanze, compresa la presenza di un *vanishing twin*, una malattia metastatica materna, un mosaicismo cromosomico materno, l'assenza/insufficienza della FF, anche se la ragione principale sarebbe ascrivibile ad un mosaicismo feto-placentare. Infatti, il cffDNA presente nel plasma materno origina dal citotrofoblasto placentare che, come è noto, mostra, in una percentuale dei casi, un cariotipo discordante rispetto a quello fetale. Le analisi cromosomiche del trofoblasto hanno, di fatto, individuato percentuali variabili di discordanza per le diverse aneuploidie.

Sembrerebbe dunque che la specificità dei test sul cffDNA, negli studi che hanno arruolato oltre 10.000 campioni, riveli una FPR <1/1.000, in accordo con la percentuale delle discordanze feto-placentari emersa dalle analisi cromosomiche effettuate sul citotrofoblasto.

4.1.b Sensibilità e specificità dello screening delle T13, T18, T21 nelle gravidanze gemellari

L'analisi del cffDNA può essere effettuata sulle gravidanze bigemine, anche dopo donazione di gameti. L'analisi è limitata allo screening delle principali trisomie autosomiche ed risultato esprime una probabilità distribuita tra i due feti.

Sebbene la casistica sia limitata, gli studi che hanno quantizzato la percentuale della FF mediante SNP, che consente nelle gravidanze dizigoti (DZ) di distinguere e misurare il contributo di ciascuno dei due gemelli, hanno permesso di acquisire dati interessanti. Nelle gravidanze DZ, il gemello più piccolo, che fornisce una quantità minore di DNA, produce una FF statisticamente inferiore alla media della FF presente nelle gravidanze singole (8,7%, range 4,1-30%, rispetto a 11,7%, range 4-38,9%; $p < 0.001$) (Bevilacqua et al, 2015).

Questi dati suggeriscono che, nelle gravidanze DZ, il contributo della FF da parte delle due placenti sia disomogeneo e, addirittura, sia possibile che una di esse non sia sufficientemente rappresentata (FF <4%). Pertanto, in queste gravidanze aumenta la probabilità di un FNR per l'assente/insufficiente contributo della FF da parte di una delle due placenti.

La metanalisi di cinque pubblicazioni ha riportato, per la T21, una sensibilità del 95%; per la T18, dell'86%; per la T13, del 100% (i dati numerici delle T13 e T18 sono comunque troppo limitati per raggiungere un valore verosimile di sensibilità). Non sono stati ottenuti FPR per nessuna delle tre trisomie (Gil et al, 2014; Huang et al, 2014; Bevilacqua et al, 2015). Il test come tale non indica comunque, in presenza di un risultato positivo, quale dei due feti sia affetto.

4.2 Aneuploidie dei Cromosomi Sessuali

Sensibilità e specificità per le aneuploidie dei cromosomi X e Y nelle gravidanze singole

La specificità del NIPT nello screening delle aneuploidie dei cromosomi sessuali è inferiore rispetto a quella riportata per gli autosomi.

Una metanalisi relativa a 37 studi ha descritto per la monosomia X una sensibilità (DR) del 90,3% (95% CI, 85,7-94,2%) ed una specificità (FPR) dello 0,23% (95% CI, 0,14-0,34%). Per tutte le altre aneuploidie dei cromosomi sessuali (SCA), la sensibilità è risultata del 93,0% (95% CI, 85,8-97,8%) e la specificità dello 0,14% (95% CI, 0,06-0,24%) (Gil et al, 2015).

Le analisi cromosomiche del trofoblasto hanno indicato, per la monosomia X, una FPR, per la presenza di un mosaicismo confinato al citotrofoblasto, ed una FNR, per la presenza di un mosaicismo confinato al feto, rispettivamente di 1/1.421 (95%CI: 1.031-1.958) e di 1/14 (95%CI: 8-26). Si tratta complessivamente di probabilità più elevate rispetto a quelle riportate per gli autosomi, in quanto la monosomia X è l'aneuploidia maggiormente presente nei mosaicismi fetoplacentari (Grati, 2014). Di conseguenza, relativamente alla monosomia X (e in generale a tutte le SCA), il NIPT mostra una ridotta specificità, con una FPR cumulativa >1%, ascrivibile non solo ai mosaicismi confinati alla placenta, ma anche ai mosaicismi costituzionali della madre, presenti in circa l'8,6% dei NIPT positivi per una SCA (Nielsen et al. 1991; Thompson e Thompson, 2001; Wang et al, 2014).

4.3 Microdelezioni

Il cfDNA può essere, in teoria, utilizzato per cercare specifiche delezioni nella sequenza del DNA. Nella prospettiva di sviluppare tecniche in grado di analizzare l'intero genoma, sono stati messi a punto pannelli che analizzano singole microdelezioni associate ad alcune sindromi clinicamente riconoscibili (ad es. delezione 1p36, delezione 5p, delezione 15q, delezione 22q). I risultati preliminari indicano tuttavia una bassa sensibilità (62-95%) (Sequenom Presentations, NSGC, 2014), ed un elevato FPR. L'unico studio finora pubblicato ha utilizzato lo *SNP genotyping* ed ha indagato quattro microdelezioni (22q11.2, 1p36, 5pter, 15q11.2 associata alle sindromi di Prader Willi e di Angelman; Wapner et al, 2014). Il processo di validazione ha mostrato alcune criticità. In

particolare, la maggior parte dei casi utilizzati per la validazione non riguardava gli screening prenatali (plasma delle gestanti), ma campioni creati in laboratorio, che simulavano una patologia (PlasmArt™). Per questo, la sensibilità e la specificità dichiarate non sono rappresentative delle *performances* reali del test in ambito clinico. Ad esempio, considerando i valori di sensibilità e specificità del test maggiormente ottimistico (assumendo una prevalenza dell'1/1000 della delezione 22q11), il valore predittivo positivo del test (cioè la probabilità che la microdelezione identificata dal protocollo considerato fosse vera) non superava il 7%.

4.4 Patologie Mendeliane e altre indicazioni

La prima applicazione clinica del cffDNA ha riguardato la determinazione del sesso del feto (Lo et al, 1997), in base alla presenza/assenza nel plasma materno di sequenze di SRY e DYS14 del cromosoma Y. Nel 2000, la stessa tecnica è stata utilizzata in Italia per escludere la segregazione paterna della distrofia miotonica (Amicucci et al, 2000). Questa tecnica viene attualmente utilizzata in alcuni Paesi per monitorizzare le gravidanze a rischio per alcune malattie legate al cromosoma X, come la distrofia muscolare di Duchenne, indirizzando poi alle indagini molecolari mirate solo le gravidanze con feto di sesso maschile (Hill et al, 2011; Pan et al, 2014).

Un'ulteriore potenziale applicazione riguarda la diagnosi precoce non invasiva del sesso fetale nelle gravidanze a rischio per iperplasia congenita dei surreni (sindrome adreno-genitale), nelle quali l'identificazione di un feto maschio giustifica l'interruzione del trattamento con steroidi (Tardy-Guidollet et al, 2014). L'analisi può anche essere utile nella gestione dei feto nei quali le indagini ecografiche identifichino un'ambiguità dei genitali (Everett e Chitty, 2014).

Un'altra applicazione clinica del cffDNA riguarda la definizione del fenotipo Rh del feto concepito dalle madri RhD-negative. Un risultato positivo nel plasma materno sarebbe riconducibile alla segregazione nel feto del genotipo RhD-positivo del padre. Il test consente, nei casi positivi, di avviare tempestivamente la profilassi con immunoglobuline anti-RhD (Finning et al, 2008).

La trombocitopenia alloimmune fetale o neonatale è causata da alloanticorpi materni diretti contro gli antigeni ereditati dal padre, presenti sulle piastrine fetali. Questa patologia causa nel 20% dei casi emorragie intracraniche, che possono produrre sequele a lungo termine nei bambini. Lo studio del cffDNA è in grado di analizzare precocemente il gene HPA-1a correlato alla malattia e perciò di identificare i feto affetti (Le Toriellet et al, 2013).

La sfida più importante che attende lo sviluppo e la ricerca relativa all'impiego clinico del cffDNA riguarda le malattie mendeliane. Esistono al momento alcune esperienze, come quelle relative alla diagnosi fetale di acondroplasia originata *de novo* al concepimento o segregata da un padre affetto (Chitty et al, 2011; Lench et al, 2013), al nanismo tanatoforo (Chitty et al, 2013) e alla sindrome di Apert (Everett e Chitty, 2014).

Nel caso delle malattie autosomiche recessive, nelle quali i genitori sono eterozigoti per mutazioni diverse, l'esclusione o la presenza dell'allele paterno possono essere utilizzate per precisare la probabilità che il feto sia affetto; tale probabilità viene esclusa in assenza della mutazione paterna, mentre aumenta quando è presente. In quest'ultimo caso, il genotipo del feto deve essere poi diagnosticato con una tecnica invasiva. Questo approccio è già stato sperimentato nelle gravidanze a rischio per talassemia (Papasavva et al, 2013; Saijun Liu et al, 2014) e per fibrosi cistica (Twiss et al, 2014).

La maggior parte dei protocolli che utilizzano il cffDNA per l'analisi delle gravidanze a rischio per malattie monogeniche sono ancora sperimentali; tuttavia alcuni protocolli sono stati recentemente approvati per uso clinico nel Regno Unito (Everett e Chitty, 2014).

5. Sensibilità, specificità e implicazioni etiche

I dati emersi dalle analisi citogenetiche sugli amniociti indicano che le T21, T18, T13 incidono tra il 50 e il 75% di tutte le patologie cromosomiche, in rapporto all'età materna.

La sensibilità e la specificità dei test sul cfDNA per le T21, T18, T13 sono elevate ed in linea con i risultati ottenuti con l'analisi cromosomica del trofoblasto.

Limiti biologici

Oltre alle discordanze feto-placentari, a cui sono soggette tutte le indagini che utilizzano il DNA fetale nel primo trimestre e che possono generare FPR e FNR, le analisi del cfDNA possono essere inficiate da altri fattori, compresa la presenza di:

1. mosaicismi cromosomici costituzionali nella madre: dato che il test è eseguito sul DNA plasmatico materno e fetale, nel caso in cui l'assetto cromosomico della madre non sia normale, ad esempio per la presenza di una linea cellulare anomala non necessariamente associata ad evidenze cliniche, il risultato del test può essere compromesso;
2. anomalie cromosomiche materne di origine iatrogena, e perciò non costituzionali: il test può essere compromesso dalla presenza nel plasma di frammenti di DNA materno mutati a causa di agenti clastogeni (ad es. farmacologici, fisici, virali, in grado di danneggiare il DNA);
3. una placenta evanescente appartenente ad una gravidanza interrotta: una importante causa di discrepanza nei test genetici nel primo trimestre di gravidanza basati sul DNA di origine placentare è la presenza di frammenti di DNA originati dalla placenta di un feto abortito nelle prime settimane.

Profili etici

L'introduzione del NIPT nella pratica clinica ha aperto un dibattito basato su argomentazioni, rispettivamente a favore e contrarie al suo impiego come metodo di screening delle gravidanze:

- si tratta di uno screening prenatale non invasivo, che ha una sensibilità più elevata rispetto agli attuali test di screening che combinano le analisi biochimiche e la translucenza nucale, che possono precedere o meno i test diagnostici invasivi;

- il NIPT riduce drasticamente il ricorso alle indagini diagnostiche invasive, abbattendo il numero degli aborti collegati alle tecniche di prelievo dei tessuti fetali e le possibili, ancorché rare, complicanze per le gestanti;

- la facilità di accesso al NIPT mediante un prelievo ematico non rappresenta un incentivo al ricorso inappropriato alle indagini prenatali rispetto all'attuale prassi; di fatto, al momento lo screening è mirato a tre trisomie autosomiche, rispetto alle quali un'elevata percentuale di donne già ora richiede di essere informata; il NIPT riduce pertanto il ricorso inappropriato ai test genetici, limitatamente alle trisomie citate, permettendo di tranquillizzare e diminuire l'ansia della gestante.

Per altro verso:

- la maggiore sensibilità di questo test di screening nell'individuare le tre principali aneuploidie autosomiche, rischia di fare passare il messaggio che, con un semplice esame del sangue, sia più facile identificare i feti malati, mettendo la gestante nella condizione di eliminarli, anche se la tecnica limita il numero degli aborti dei feti non affetti, collegato all'invasività delle tecniche tradizionali di diagnosi prenatale.

Il fine del NIPT è quello di fornire informazioni corrette alle coppie che lo desiderano, perché le successive scelte e decisioni, qualunque esse siano, siano fondate su conoscenze il più possibile accurate, precoci e basate su protocolli che non mettono a rischio la gravidanza.

La consulenza prenatale è parte integrante dello screening mediante NIPT, avendo lo scopo di definire le motivazioni che giustificano il ricorso allo screening, fornire informazioni sulle conoscenze che possono essere acquisite, sui rischi e sui benefici, sulle possibili conseguenze in rapporto alla percezione e all'accettabilità da parte dei genitori delle informative ricevute e delle decisioni da prendere, sulle possibilità di assistenza disponibili e sul percorso per la donna/coppia nel caso in cui il risultato sia patologico.

I Centri che erogano il test devono avere competenze nella diagnosi ecografica e nella diagnosi prenatale, devono essere in grado di fornire la consulenza pre-test e post-test, devono essere collegati con un servizio di genetica medica e con il laboratorio che effettua il test, che deve essere certificato, deve partecipare ai controlli di qualità nazionali ed internazionali ed essere dotato di personale con competenze specifiche nelle tecniche di NGS.

Queste tecniche pongono problemi nuovi man mano che aumenta il numero delle patologie genetiche individuabili. La disponibilità di una grande mole di informazioni attraverso un semplice prelievo di sangue cambia la visione generale della indagine prenatale, amplificando talvolta problematiche già presenti, ad esempio l'opportunità di offrire il NIPT a tutte le donne in gravidanza o piuttosto solo a quelle a maggior rischio di specifiche malattie genetiche nei propri figli.

6. Impatto economico e sociale

Al momento, in Italia, il NIPT viene proposto presso alcuni poliambulatori e laboratori privati, per lo più collegati con aziende commerciali, che si fanno carico di eseguire materialmente il test, i cui risultati sono stati validati dai documenti prodotti da alcune Società Scientifiche. Alcuni laboratori nazionali stanno iniziando ad effettuare il test in maniera pressoché autonoma ed altri si stanno attrezzando. Si stima che l'utenza di questo servizio interessi potenzialmente al momento nel nostro paese circa 50.000 madri/anno. Il test è a carico dell'utente, con costi variabili tra i 350 e i 900 Euro.

L'esperienza di alcuni genetisti ed ostetrici evidenzia nel nostro Paese diverse realtà: da un lato, alcune strutture applicano un protocollo informativo di consulenza pre-test e post-test; dall'altro lato, numerose pazienti candidate al test lamentano di essersi confrontate con l'uso, talvolta tendenzioso, dei dati scientifici, l'approssimazione nella comunicazione dei limiti del test, la carenza delle consulenze pre-test e post-test, l'inadeguatezza del consenso informato.

La valutazione del rapporto costo-beneficio del NIPT non è agevole. Infatti qualsiasi modello di implementazione del test dovrebbe tenere conto di una serie di variabili, compresa l'effettiva accettazione del test da parte delle gestanti, il tasso di falsi positivi nel caso in cui il test sia esteso a più aneuploidie, l'accettazione della diagnosi invasiva in presenza di un test positivo, il tasso di interruzione della gravidanza dopo la conferma della patologia fetale. Va inoltre ricordato che altre metodologie, in primo luogo lo screening combinato, danno informazioni aggiuntive e più ampie, rispetto al solo assetto cromosomico (ad es. malformazioni cardiache), per cui non sarebbe corretto considerare il NIPT come un loro test sostitutivo.

Limitatamente alla T21, Beulen et al. (2014) hanno valutato l'impatto economico dell'introduzione del NIPT nel programma sanitario nazionale Olandese ed hanno suggerito che la scelta più efficace sarebbe l'applicazione del NIPT come metodo principale di screening. Infatti, hanno calcolato che, utilizzando il test da solo, il tasso di rilevazione della T21 poteva aumentare di oltre il 50%. Se tuttavia veniva impiegato come test di screening secondario opzionale, a supporto dello screening combinato del primo trimestre, il tasso di rilevazione della T21 poteva aumentare solo del 36%. L'applicazione su larga scala del NIPT consentirebbe in ogni caso di ridurre significativamente i test diagnostici prenatali invasivi e, di conseguenza, il rischio di aborto. D'altra parte, il NIPT non solo è il più efficace metodo di screening non invasivo, ma al momento è anche quello più costoso; il suo impiego come metodo di screening primario farebbe lievitare il costo del programma nazionale Olandese di screening del 157%, mentre l'uso del NIPT come test secondario facoltativo farebbe aumentare i costi solo del 21%. L'uso del NIPT come test di screening principale è perciò vincolato ad un significativo abbattimento dei costi della tecnica.

L'utilità clinica ed i costi del NIPT basati sull'analisi del cfDNA erano stati oggetto di un altro studio negli USA, in cui era stato messo a confronto con il Test Combinato (TC, comprendente TN, β HCG, PAPP-A) e con il Test INTEGRATO (TINT, comprendente TC + AFP, estriolo, hCG, Inibina A) (Song et al, 2013). Il NIPT, ad un prezzo base di \$795, è risultato maggiormente efficace a livello clinico e meno costoso rispetto al TC e al TINT. Il NIPT ha identificato 4.823 T21 su 5.330 tecniche invasive; il TC 3.364 T21 su 108.364 indagini; il TINT 3.760 T21 su 108.760 indagini. Di conseguenza, il NIPT ha identificato il 28% in più delle T21 rispetto al TINT e il 43% in più rispetto al TC, ed ha ridotto di oltre il 95% le tecniche invasive e di oltre il 99% gli aborti dei feti euploidi. I costi complessivi sono

stati pari a \$3.786 milioni per il TC, \$3.919 milioni per il TINT e \$ 3.403 milioni per il NIPT. Pertanto, rispetto alle altre tecniche non invasive, il NIPT ha migliori capacità diagnostiche, riduce le perdite fetali e comporta costi ridotti per il sistema sanitario.

Nella prospettiva di offrire anche nel nostro Paese lo screening delle principali aneuploidie autosomiche mediante il NIPT, è indispensabile programmare la centralizzazione dei laboratori di screening in un numero limitato di strutture, con un'utenza sovraregionale. In questo modo sarebbe possibile contenere i costi dell'analisi che diventerebbero competitivi rispetto a quelli attualmente coperti dai programmi di diagnosi prenatale invasiva (Kagan et al, 2015). Indicativamente, al momento il SSN rimborsa mediamente €922,89 per ogni indagine citogenetica effettuata sui villi coriali e €595,11 per ogni indagine citogenetica effettuata sugli amniociti (costi comprensivi della consulenza, dell'ecografia, del prelievo e del cariotipo). Tuttavia non deve sfuggire, nell'analisi dei costi, che il NIPT è una metodica di laboratorio automatizzabile, per la quale può essere complessa la gestione e la messa a punto, ma, una volta completata tale fase, l'analisi di un numero elevato di campioni non crea complessità particolari. La sua precocità e la sua esecuzione programmata, inoltre, non comportano situazioni critiche ed emergenziali, peraltro frequenti nella diagnosi invasiva classica (ad es. il riscontro di malformazioni all'ecografia, con conseguente necessità di una diagnosi citogenetica urgente mediante procedura invasiva). Le situazioni critiche ed emergenziali possono e devono essere gestite, ma hanno un inevitabile riflesso sui costi di gestione del laboratorio (personale a disposizione, reagenti, strumenti).

Ovviamente la centralizzazione riguarderebbe l'esecuzione del test, mentre la sua gestione in termini di accettazione (consulenza pre-test, consenso informato) e comunicazione dell'esito (consulenza post-test) deve essere organizzata tenendo conto delle diverse realtà territoriali. Tale rete deve essere collegata ai centri/servizi di medicina fetale ed ai laboratori di genetica per la gestione dei casi con test positivo.

7. Accreditemento e qualità

I test basati sulle tecniche e sulle piattaforme di NGS richiedono un'interazione tra le diverse figure professionali coinvolte nella diagnosi prenatale (in primo luogo tra i genetisti e gli ostetrici), che è superiore a quella richiesta dai test genetici tradizionali.

Ciò al fine di ottimizzare la definizione dell'ambito dell'indagine e delle sue finalità e per stabilire di volta in volta i risultati che richiedono di essere approfonditi.

I laboratori che si accingono ad implementare e ad offrire queste indagini, in rapporto alle tecnologie disponibili, devono possedere le competenze, incluse quelle bioinformatiche, necessarie a caratterizzare le varianti di potenziale rilevanza clinica, in particolare attraverso l'uso di *database* e strumenti informatici aggiornati, e devono essere certificati (ISO 15189 o simili; Laboratory accreditation and certification; <http://www.eurogentest.org/>).

8. Raccomandazioni sull'uso del test del cfDNA

I test basati sul cfDNA, in quanto analisi del DNA, sono test genetici a tutti gli effetti. I risultati ottenuti e i dati di sensibilità e specificità devono essere interpretati alla luce dei dati emersi dalle analisi citogenetiche effettuate sul citotrofoblasto e sugli amniociti.

Il NIPT deve essere collegato e preceduto da un accurato controllo ecografico dopo l'XI settimana, effettuato da operatori accreditati nell'esame delle XI-XIV settimane. Nel caso in cui i dati ecografici suggeriscano un aumento del rischio di patologia cromosomica nel feto, deve essere valutata l'opportunità di eseguire direttamente una diagnosi prenatale invasiva per lo studio del cariotipo fetale, integrato eventualmente da altre tecniche (ad es. array-CGH, per elevare il potere diagnostico nei confronti degli sbilanciamenti submicroscopici patogenetici, stimato in circa il 6%) (Novelli et al, 2012; Wapner et al, 2012).

E' necessario che le donne che intendano sottoporsi al NIPT ricevano preliminarmente, attraverso un colloquio e, se indicato, una consulenza genetica, le informazioni necessarie a comprendere le caratteristiche del test ed i suoi limiti, anche in rapporto alle altre tecniche di diagnosi prenatale disponibili, e che, prima del test, sottoscrivano un consenso informato.

Il Centro che offre il test deve essere in grado di garantire la consulenza genetica post-test ed il completo supporto alla paziente durante l'intero iter diagnostico prenatale.

Il Centro deve anche farsi carico del follow-up della gravidanza, con particolare riferimento al suo sito.

9. Conclusioni

1. Lo screening prenatale non invasivo basato sul DNA (NIPT) non è un test diagnostico. Il test verifica la possibilità che il feto sia affetto dalle più comuni aneuploidie, con una specificità e sensibilità significativamente superiori rispetto allo screening non invasivo combinato (TN+PAPP-A/ β HCG). Il NIPT definisce, su base probabilistica, la presenza nel feto di una specifica patologia indagata. **Pertanto, ogni risultato positivo deve essere confermato con una tecnica invasiva tradizionale (villocentesi /amniocentesi).**

2. Il test deve essere preceduto da un'ecografia e dalla consulenza pre-test, che ha il compito di illustrare il significato del test e tutte le opzioni alternative disponibili per il monitoraggio della gravidanza. Prima del test deve essere acquisito il consenso della donna e specificato l'uso dei campioni biologici residui (Allegati 10.3 e 10.4).

3. In almeno il 2% dei casi, il campione acquisito non è idoneo ad essere refertato. Per essere affidabile il risultato deve essere ottenuto a partire da una percentuale di DNA fetale libero non inferiore al 4% del totale del DNA libero presente nel plasma materno.

4. L'indagine è al momento mirata e validata per le principali aneuploidie autosomiche (T21, T18, T13). Le anomalie cromosomiche indagate riguardano solo una parte, sia pure significativa (50-70%), delle aberrazioni cromosomiche eventualmente presenti nel feto. In rapporto alla tecnica utilizzata, si potranno in prospettiva ottenere informazioni più ampie anche su altre aneuploidie (ad es. dei cromosomi sessuali), su alcuni microriarrangiamenti e su alcune patologie mendeliane. In questo caso dovrà essere riconsiderato il razionale del test. **Il NIPT può essere effettuato sulle gravidanze gemellari bigemine, anche dopo eventuale donazione dei gameti.**

5. Un risultato indicativo di una "bassa probabilità di trisomia" deve essere considerato, di massima, rassicurante per la donna, in considerazione dell'elevata specificità del test e del

suo elevato valore predittivo negativo. Il risultato dello screening fa comunque riferimento alle caratteristiche genetiche del citotrofoblasto (placenta) che, in rari casi, possono essere discordanti rispetto a quelle del feto (discrepanza feto-placentare).

6. Il NIPT non è sostitutivo e perciò non evita di effettuare le altre indagini cliniche, laboratoristiche e strumentali che fanno parte integrante del monitoraggio della gravidanza.

7. I Centri che erogano il test devono:

- a) avere competenze nella diagnosi ecografica;**
- b) avere competenza nella diagnosi prenatale;**
- c) essere in grado di offrire la consulenza pre-test e post-test;**
- d) essere collegati con il laboratorio di cui al punto 8.**

8. I laboratori che eseguono il test devono:

- a) essere certificati;**
- b) partecipare a programmi di controllo della qualità, nazionali ed internazionali;**
- c) essere dotati di personale con competenza specifica nelle tecniche di NGS.**

Nel caso in cui i laboratori sviluppino protocolli originali, è necessario che le tecniche e le procedure bioinformatiche siano rese pubbliche e disponibili alla validazione scientifica.

9. Considerato che il NIPT è il test prenatale non invasivo maggiormente sensibile, è necessario che, a livello centrale (Ministero della Salute, SSN) e regionale (SSR), venga presa in considerazione la sua introduzione come test di prima o di seconda scelta, per il monitoraggio delle principali aneuploidie autosomiche.

10. Le caratteristiche del test raccomandano che esso venga eseguito presso un numero ristretto di laboratori a livello nazionale; per questo è auspicabile una pianificazione ed un accordo interregionale.

11. E' necessario predisporre campagne di informazione alla popolazione e di formazione dei professionisti, per garantire equità nell'accesso al test.

12. Il progressivo impatto clinico delle tecniche genetiche di ultima generazione, associato ad un abbattimento dei loro costi, raccomanda un dibattito proattivo a livello professionale e della Società sugli scopi futuri degli screening prenatali dei difetti fetali. Al momento, lo screening basato sul NIPT non ha ragioni di essere esteso oltre le T21, T18, T13 (Allegato 10.1).

Sensibilità (SENS), specificità (SPEC), prevalenza (PREV), valore predittivo positivo (PPV) e valore predittivo negativo (PPN) dei test di screening

Il termine screening definisce una strategia (protocollo) di indagini utilizzate per identificare, all'interno di una popolazione, i soggetti a rischio per una patologia, che costituisce un problema importante di salute pubblica in termini di prevalenza (elevata) e di sintomi clinici (gravi).

Secondo Wilson e Jungner (1968), le principali caratteristiche di uno screening sono:

- La malattia indagata rappresenta un importante problema di salute pubblica;
- È disponibile un trattamento accettabile per i pazienti;
- Sono disponibili strutture per la diagnosi e il trattamento della patologia oggetto dello screening;
- La malattia ha una fase sintomatica latente o pre-clinica riconoscibile;
- È disponibile un test o un esame appropriato per il riconoscimento delle persone a rischio di malattia;
- Il test è accettabile da parte della popolazione;
- La storia naturale della malattia, compreso lo sviluppo da una fase latente alla malattia conclamata, è sufficientemente conosciuta;
- E' disponibile un protocollo condiviso di cura;
- Il costo del riconoscimento dei casi (compresa la diagnosi e il trattamento dei pazienti) è equilibrato dal punto di vista economico in rapporto al costo complessivo dell'assistenza medica;
- Lo screening è un processo continuo (di sorveglianza) e non un evento sporadico.

Il test di screening per l'identificazione dei soggetti a rischio deve essere valido, affidabile ed avere una resa accettabile in termini di valore predittivo positivo (PPV) e valore predittivo negativo (PPN).

Lo screening per le aneuploidie fetali si è evoluto notevolmente negli ultimi decenni, portando complessivamente al miglioramento dei tassi di rilevamento (sensibilità, SENS), ma, soprattutto, ad una riduzione dei tassi di risultati falsi positivi (FPR 5%), stante la percentuale delle donne che si sottopongono ad un test invasivo successivamente ad un FPR emerso da uno screening. I recenti sviluppi dei test di screening basati sul cffDNA hanno consentito di ridurre ulteriormente il FPR (<0,1% per le T13,18,21).

SENS, SPEC, PPV E PPN

La sensibilità (SENS), la specificità (SPEC), il valore predittivo positivo (PPV) ed il valore predittivo negativo (PPN) sono indicatori della validità di un test di screening.

SENS e SPEC definiscono la sua "efficienza", nel senso che misurano la frequenza con la quale il risultato del test è confermato da una indagine diagnostica, in grado di separare coloro che hanno la condizione indagata, rispetto a coloro che non ne sono affetti. Nello specifico, la capacità di un test di classificare come positive le persone con la malattia è definito "sensibilità" (SENS) e la capacità di classificare come negative quelle senza la malattia è definita "specificità" (SPEC). La SENS misura il tasso di falsi negativi (1-SENS) e la SPEC il tasso di falsi positivi (1-SPEC). SENS e SPEC sono considerate caratteristiche stabili del test, che tuttavia possono variare con il variare delle impostazioni del test (caratteristiche della popolazione in esame, qualità e tipologia del campione analizzato, calibrazione dello strumento, corretta manipolazione del campione, abilità del laboratorio, verifica delle qualità dei controlli interni, ecc.).

SENS e SPEC devono essere valutate in relazione reciproca. Un test con un'elevata SENS può essere inutile, se si raggiunge una sensibilità del 100%, utilizzando la semplice strategia di produrre sempre un risultato positivo: chiunque, con o senza la malattia, darebbe un risultato positivo e la SPEC sarebbe zero, rendendo il test inutile per il processo clinico decisionale. Un test di screening ideale è quello in cui la SENS è del 100% e la SPEC del 100%, riuscendo quindi a separare le due popolazioni (quella dei sani e quella degli affetti), senza classificare erroneamente nessun soggetto (un soggetto sano classificato come affetto, ovvero un falso positivo [FP]; un soggetto affetto classificato come sano, ovvero un falso negativo [FN]). Verosimilmente, una condizione di questo tipo non esiste, in quanto gli screening hanno sempre SENS e/o SPEC <100%. Ne consegue che gli screening hanno sempre una quota di soggetti classificati erroneamente. E' quindi parte integrante delle impostazioni di un test la definizione di un *cut-off* arbitrario, che, a sua volta, determina la percentuale "accettabile" di casi FP e FN, in rapporto alle caratteristiche della patologia oggetto dello screening.

Il valore predittivo positivo (PPV) ed il valore predittivo negativo (PPN) definiscono la "resa" di un test di screening. La resa è la misura della malattia (palese o latente) precedentemente non diagnosticata, che viene diagnosticata e portata al trattamento successivamente allo screening. La resa è quindi in primo luogo dipendente dalla prevalenza (PREV) della malattia nella popolazione (che in alcuni casi è il rischio pre-test della malattia). Le rese più elevate degli screening si ottengono quando viene indagata una condizione molto diffusa in una popolazione.

Un ulteriore fattore importante che influenza la resa è l'efficienza del test. Se il test ha una SENS bassa nell'identificare la condizione in esame, la resa è conseguentemente bassa. Pertanto, PPV e PPN mettono in relazione la SENS, la SPEC con la PREV della malattia.

Nel caso specifico degli screening per la T21, il PPV riguarda la probabilità che una gravidanza con un test di screening positivo (elevata probabilità) per la T21 abbia realmente la T21 (probabilità che il test positivo rispecchi la reale presenza della T21). Il PPN riguarda la probabilità che una gravidanza con un test di screening negativo (bassa probabilità) per la T21 non abbia realmente la T21 (probabilità che il test negativo rispecchi la reale assenza di T21).

Tecniche di analisi del cfDNA

La linea di sequenziamento (*sequencing lane*) è l'unità operativa del test; ogni linea può leggere 100 Gbasi (100 milioni di letture - *reads*) di DNA.

Cattura del DNA fetale: sequenziare il genoma.

La tecnica MPSS sequenzia l'intero genoma senza distinguere specifici cromosomi di interesse; esegue contemporaneamente 4-5 test per linea; è sensibile alle differenze di densità delle basi GC, che possono compromettere il risultato. Per questo, viene utilizzato un fattore di normalizzazione (CNV), che rende confrontabili i blocchi di lettura delle sequenze. Per identificare la T21 occorrono 25 Gb (25 milioni) di letture di sequenza, in una linea che ne legga 100 milioni. Se vengono analizzati blocchi più piccoli, la dose dei frammenti del campione trisomico non può essere differenziata da quella di un campione disomico.

Cattura del DNA fetale: sequenziamento dei cromosomi 21, 18, 13, X e Y.

La tecnica DANSR esegue un sequenziamento selettivo (*high multiplexed*) dei frammenti di DNA limitata ai cromosomi di interesse per il test. Per identificare la T21 occorre un milione di blocchi di sequenza. Se si analizzano blocchi più piccoli, la dose dei frammenti del campione trisomico non può essere differenziata da quella di un campione disomico. La selezione dei frammenti avviene ibridando sonde fluorescenti a 576 marcatori SNP non polimorfi dei cromosomi (21, 18, 13) per la ricerca delle trisomie, e a 192 marcatori SNP polimorfi dei cromosomi compresi tra l'1 e il 12, per definire la frazione fetale di ciascun campione. Solo i frammenti che alla fine di una reazione di ligazione locus-specifica sono 'agganciati' alle sonde fluorescenti vengono sequenziati per il dosaggio e l'elaborazione della probabilità. La DANSR esegue 96 test per linea di sequenziamento.

PCR target SNP cfDNA.

Dal cfDNA isolato vengono amplificati, in una singola reazione, 19.488 SNP polimorfi che mostrano un elevato livello di eterozigotità; successivamente il prodotto di questa amplificazione viene sequenziato mediante NGS. E' necessario acquisire anche un campione di sangue paterno per quantificare la frazione fetale ed analizzare i dati mediante un algoritmo specifico. Questa tecnica è anche in grado di identificare le triploidie.

Calcolo della probabilità di trisomia

L'applicazione di algoritmi dedicati consente di eseguire l'analisi dei frammenti del cfDNA prevedendo la probabilità delle più comuni aneuploidie fetali. Il test calcola il rapporto di verosimiglianza tra le probabilità che il campione sia disomico o trisomico, utilizzando metodi diversi per i vari metodi di cattura.

Per la tecnica MPSS l'algoritmo che definisce il valore soglia della probabilità di trisomia si basa sul *one sample set*. Il calcolo su un singolo campione è reso necessario dal basso numero di test per linea di sequenza:

- 1) ipotesi binaria positivo-negativo con t-Student (*z-score*) e *Likelyhood Odds Ratio* (rapporto di verosimiglianza);
- 2) fattore di normalizzazione di sequenza CNV;

- 3) variazioni di corsa tra le varie linee di sequenziamento corrette con un algoritmo *z-score*;
- 4) definizione di un valore soglia per la trisomia (valore di *z-score* fra 3 e 4).

L'algoritmo non considera la frazione fetale. Pertanto, in presenza di una FF bassa, i valori di score positivo e negativo sono molto vicini, aumentando la probabilità di FPR e FNR.

Per la tecnica DANSR, SNP-target, l'algoritmo che definisce il valore soglia della probabilità di trisomia si basa sul *multiple sample set*. Il calcolo su campioni multipli è reso possibile dalle piccole dimensioni del blocco di lettura della sequenza (1 milione di letture), che consente di analizzare, in una linea di sequenza, molti campioni che vengono confrontati.

- 1) ipotesi percentuale con *Odds ratio* (rapporto di verosimiglianza) tra i modelli disomico/trisomico (curve normali di distribuzione);
- 2) calcolo della frazione fetale;
- 3) inserimento dell'età materna e dell'epoca gestazionale nel calcolo dell'algoritmo.

L'algoritmo considera la frazione fetale; pertanto, i valori dello *score* con FF bassa sono normalizzati, in modo da valutare la probabilità indipendentemente dalla quantità del cffDNA.

Modello di Consenso Informato per gravidanza singola

Gentile Signora,

Il Test Prenatale Non Invasivo (NIPT) può essere eseguito sia nelle gravidanze naturali, sia in quelle avviate con la procreazione medicalmente assistita. Nel secondo caso lei è tenuta a precisare la tecnica applicata.

Il NIPT richiede il prelievo di 10-20 ml di sangue materno.

Nel 2% dei casi la razione di DNA fetale (FF) nel plasma materno non è sufficiente per l'analisi.

Il test, finalizzato alla diagnosi di alcune patologie numeriche dei cromosomi, è stato validato attraverso alcuni studi internazionali che hanno arruolato larghi campioni di gravidanze.

L'identificazione di una trisomia (presenza di un cromosoma in più) attraverso il test si basa sull'analisi del DNA libero presente nel plasma materno (cfDNA), che contiene una quota di DNA di origine materna ed una quota di DNA proveniente dalla placenta del feto (cffDNA). Il test può fornire anche informazioni sul sesso del feto (presenza/assenza del cromosoma Y). Nel caso in cui il test suggerisca la presenza di una anomalia cromosomica, l'interpretazione del risultato viene demandata alla consulenza genetica e ad eventuali successivi approfondimenti diagnostici sui campioni fetali acquisiti con tecniche invasive (villocentesi, amniocentesi), per i quali sarà fornita una informazione specifica, ai fini del consenso.

Al momento, le indagini prenatali basate sull'analisi del DNA fetale presente nel plasma materno permettono di effettuare:

1) TEST PER LE TRISOMIE AUTOSOMICHE.

Questo test valuta la possibilità di identificare la presenza di feti con trisomia dei cromosomi 21,18, 13 (T21, T18, T13), a partire dalla X settimana; tali trisomie assommano al 50-70% di tutte le aneuploidie autosomiche. Il termine "trisomia" identifica una anomalia cromosomica che consiste nella presenza di tre, anziché di due, copie di un cromosoma.

- La trisomia 21 (T21) è l'aneuploidia (anomalia numerica dei cromosomi) più comune: consiste nella presenza di una copia in più di un cromosoma 21 e si associa alla sindrome di Down.
- La trisomia 18 (T18): consiste nella presenza di una copia in più di un cromosoma 18 e si associa alla sindrome di Edwards.
- La trisomia 13 (T13): consiste nella presenza di una copia in più di un cromosoma 13 e si associa alla sindrome di Patau.

Il test analizza direttamente il DNA libero nel sangue materno, integrando nei risultati la frazione fetale DNA (cffDNA), l'età materna (o della donatrice nel caso di ovodonazione), l'età gestazionale, a partire dai dati forniti attraverso il modulo di richiesta del test.

Il test è stato validato sulle gravidanze singole e gemellari bigemine a partire dalla X settimana. Il test non è validato per le gravidanze gemellari con più di due feti, e non predice i mosaicismi, le aneuploidie cromosomiche parziali, le traslocazioni, le aneuploidie materne, ovvero altre anomalie

genetiche a cui si possono associarsi malformazioni e/o disabilità del nascituro.

Si stima che circa il 50% delle anomalie cromosomiche riscontrabili con l'amniocentesi riguardino le T21, T18, T13, che sono l'obiettivo primario del NIPT. L'analisi completa del cariotipo fetale è possibile solo utilizzando una tecnica invasiva (villocentesi o amniocentesi).

Il NIPT è un test di screening, perciò misura la probabilità che il feto presenti una anomalia genetica, ma non è concepito per formulare una diagnosi conclusiva. Il test deve essere interpretato dal medico, nel contesto del quadro clinico complessivo della gravidanza.

La tecnica, per quanto sensibile, non identifica tutti i feti con trisomia.

Gli studi internazionali di validazione dei test sul DNA fetale nel plasma materno per le T21, T18, T13 hanno dimostrato una specificità >99% ed una sensibilità 92-99%. Altri studi sulle gravidanze ad alto e basso rischio, con età media materna di 30 anni, hanno evidenziato una specificità del 99,9% ed una sensibilità del 99%.

La probabilità di un risultato falso negativo (cioè che non venga rilevata la presenza dell'anomalia genetica) è inferiore all'1%. Va comunque tenuto presente che alcune gravidanze con feto trisomico possono fornire un risultato di "bassa probabilità" e perciò non essere identificate. Questi casi possono essere diagnosticati solo con l'analisi diretta del cariotipo sui villi coriali o sugli amniociti.

La probabilità di un risultato falso positivo (cioè che venga sospettata la presenza di una anomalia genetica che di fatto non c'è) è inferiore a 0,1%. Perciò, raramente, alcune gravidanze con feto senza trisomia possono fornire un risultato di "alta probabilità". In questi casi il risultato del NIPT può essere verificato solo con la diagnosi invasiva (villocentesi o amniocentesi).

2) TEST PER LE TRISOMIE AUTOSOMICHE E DEFINIZIONE DEL SESSO FETALE.

Il test valuta la probabilità che il feto sia affetto da trisomia dei cromosomi 21, 18, 13 e la presenza del cromosoma Y.

3) TEST PER LE TRISOMIE AUTOSOMICHE, ANEUPLOIDIE X, Y E DEFINIZIONE DEL SESSO FETALE.

Il test valuta la probabilità della presenza di trisomia dei cromosomi 21, 18, 13, il sesso del feto e la probabilità della presenza di aneuploidie dei cromosomi X e Y (47,XYY; 47,XXX; 47,XXY; monosomia X), con un'efficienza di rilevamento delle aneuploidie dei cromosomi X e Y variabile tra il 60 e il 99%.

Il NIPT può occasionalmente non fornire un risultato, per ragioni diverse, ad esempio per problemi collegati al trasporto dei campioni, per l'assenza del DNA fetale nel campione ematico materno o per altre cause.

Il campione di sangue sarà spedito a *[indicare presso quale centro verrà inviato il campione, con particolare riferimento all'invio all'estero]* _____ che si farà carico di eseguire il test e di comunicarne il risultato a _____

Io sottoscritto dichiaro di aver compreso quanto sopra riportato, in particolare che:

- Il NIPT non fornisce una diagnosi, ma misura la probabilità che il feto sia affetto da trisomia;
- è possibile che il cariotipo del feto NON corrisponda al risultato fornito dal test;

- l'analisi completa del cariotipo del feto può essere effettuata solo utilizzando una tecnica invasiva (villocentesi o amniocentesi);
- per l'esecuzione del test il campione potrebbe essere inviato in un Paese dove potrebbe non esserci lo stesso livello di protezione dei dati previsto in Italia;
- il campione acquisito per il NIPT non sarà utilizzato per nessuna altra indagine senza il mio consenso e sarà comunque *[conservato per - indicare il periodo di tempo; distrutto subito dopo l'esecuzione del test]*.

Firma della donna che ha richiesto il NIPT _____

La mia firma sul presente modulo indica che ho letto, o che mi è stata letta e mi è stata spiegata, l'informativa di cui sopra, che ho compreso pienamente. Di conseguenza do il consenso all'esecuzione del:

- TEST PER LE TRISOMIE AUTOSOMICHE, T21, T18, T13
- TEST PER LE TRISOMIE AUTOSOMICHE T21, T18, T13 E ANALISI DEL SESSO FETALE
- TEST PER LE TRISOMIE AUTOSOMICHE, ANEUPLOIDIE X, Y E ANALISI DEL SESSO FETALE

Ho avuto anche la possibilità di porre tutte le domande che ho ritenuto necessarie e il medico mi ha illustrato lo scopo, le implicazioni e i possibili rischi del test. Sono a conoscenza che, su richiesta, posso ottenere la consulenza di un genetista medico, prima di sottoscrivere questo consenso.

Sono a conoscenza che in circa il 2% dei casi il test non è in grado di fornire un risultato per l'assenza del DNA fetale. In questo caso posso chiedere la ripetizione dell'esame o il rimborso del costo.

In conformità con il Dlgs. 196/03, protezione dei dati a carattere personale, art. 32 della Costituzione e Legge 145/01, i dati personali identificativi e sanitari saranno inseriti in un'anagrafica di proprietà di _____ e saranno utilizzati unicamente per prestare l'assistenza sanitaria richiesta, comunicare con la paziente, fatturare i servizi effettuati.

Luogo _____ Data _____

Firma della donna che ha richiesto il NIPT _____

Residenza/Recapiti _____

Firma del Professionista che ha provveduto all'informativa e raccolto il consenso _____

Modello di Consenso Informato per gravidanza gemellare (dizigote)

Gentile Signora,

Il Test Prenatale Non Invasivo (NIPT) può essere eseguito sulle gravidanze dizigoti (2 gemelli), sia naturali che originate con una tecnica di procreazione medicalmente assistita. Nel secondo caso lei è tenuta a precisare la tecnica applicata.

L'esperienza relativa alla diagnosi prenatale non invasiva nelle gravidanze gemellari è significativamente più limitata rispetto a quella disponibile per le gravidanze singole.

La NIPT richiede il prelievo di 10-20 ml di sangue materno.

Nel 2% dei casi la frazione del DNA fetale nel plasma materno è insufficiente per l'analisi. Il tasso di rilevazione delle aneuploidie, cioè di anomalie di numero dei cromosomi, è simile a quello ottenuto nelle gravidanze singole, ma i dati clinici di validazione del test, in termini di sensibilità e specificità, sulle gravidanze dizigoti sono ancora limitati.

La possibilità di identificare la presenza di una trisomia (presenza di un cromosoma in più) attraverso il test si basa sull'analisi del DNA libero nel plasma materno (cfDNA), al quale contribuisce in parte il DNA della madre e in parte il DNA delle placente dei due feti (cffDNA). Il test NON distingue quale feto abbia eventualmente una probabilità elevata di patologia cromosomica. Il test NON fornisce informazioni sul sesso dei feti. Nel caso in cui il test evidenzi una probabilità elevata di una anomalia cromosomica, l'interpretazione del risultato viene demandata alla consulenza genetica e ad eventuali successivi approfondimenti che utilizzano una tecnica diagnostica invasiva (villocentesi, amniocentesi), per i quali le sarà fornita una informazione specifica ai fini del consenso.

Il NIPT analizza il DNA libero del feto presente nel plasma materno e valuta la presenza di trisomia dei cromosomi 21, 18, 13 (T21, T18, T13) nelle gravidanze a partire dalla X settimana.

Il test analizza il DNA libero circolante nel sangue materno, che contiene una frazione di DNA fetale. Il risultato viene integrato con i dati relativi all'età della madre (o della donatrice) e all'età gestazionale, derivati dalle informazioni fornite con il modulo di richiesta di test. I test sono stati validati in gravidanze singole e doppie di almeno 10 settimane. I test non sono utilizzabili e non sono stati validati per lo screening delle gravidanze con più di due feti, per i casi di mosaicismo, per le aneuploidie cromosomiche parziali, per le traslocazioni o nei casi di aneuploidia materna, ovvero per altre anomalie genetiche a cui possono associarsi malformazioni e/o disabilità del nascituro.

Si stima che circa il 50% delle anomalie cromosomiche riscontrabili con l'amniocentesi riguardino le T21, T18, T13. L'analisi completa del cariotipo del feto è possibile solo utilizzando una tecnica invasiva (villocentesi o amniocentesi).

- La trisomia 21 (T21) è l'aneuploidia più frequente: consiste nella presenza di una copia in più del cromosoma 21 e si associa alla sindrome di Down.
- La trisomia 18 (T18) consiste in una copia in più del cromosoma 18 e si associa alla sindrome di Edwards.

- La trisomia 13 (T13) consiste in una copia in più del cromosoma 13 e si associa alla sindrome di Patau.

Il NIPT è un test di screening e pertanto misura la probabilità che nel feto sia presente una anomalia genetica, ma non è concepito per formulare una diagnosi conclusiva. Il test deve essere interpretato dal medico, nel contesto del quadro clinico complessivo della gravidanza.

La tecnica, per quanto sensibile, non identifica tutti i feti con trisomia.

Gli studi di validazione del NIPT hanno indicato per la T21, T18, T13 una specificità >99% e una sensibilità del 92-99%. Altri studi su gravidanze ad alto e basso rischio, con un'età media materna di 30 anni, hanno dimostrato una specificità del 99,9% ed una sensibilità del 99%.

La probabilità di un risultato falso negativo (cioè di non rilevare la presenza dell'anomalia genetica) è inferiore all'1%. Tuttavia, alcune gravidanze con feto trisomico possono fornire un risultato di "bassa probabilità" e non essere identificate. Questi casi possono essere diagnosticati solo con l'analisi diretta del cariotipo sui villi coriali o sugli amniociti.

La probabilità di un risultato falso positivo (cioè che venga predetta la presenza di una anomalia genetica che di fatto non c'è) è inferiore a 0,1%. Perciò, raramente, alcune gravidanze con feto senza trisomia possono fornire un risultato di "alta probabilità". In questi casi il risultato del NIPT può essere verificato solo con la diagnosi invasiva (villocentesi o amniocentesi).

E' possibile che il test non fornisca risultati per varie ragioni (ad es. problemi nel trasporto dei campioni, assenza di materiale fetale nel campione prelevato dalla madre, altre cause).

Il campione di sangue sarà spedito a [*indicare presso quale centro verrà inviato il campione, con particolare riferimento all'invio all'estero*] _____ che eseguirà il test e che ne comunicherà il risultato a _____

Io sottoscritto dichiaro di avere compreso quanto sopra riportato, in particolare:

1. Il NIPT non fornisce una diagnosi, ma misura la probabilità che il feto sia affetto da trisomia;
2. è possibile che l'assetto cromosomico del feto non corrisponda al risultato fornito dal test;
3. l'analisi completa del cariotipo del feto è possibile solo utilizzando una tecnica invasiva (villocentesi o amniocentesi);
4. il campione potrebbe essere inviato all'estero per l'esecuzione del test, in Paesi dove potrebbe non esserci lo stesso livello di protezione dei dati come è previsto in Italia;
5. il campione prelevato per il NIPT non sarà utilizzato per nessuna altra indagine senza il mio consenso e sarà comunque [*conservato per - indicare il periodo di tempo; distrutto subito dopo l'esecuzione del test*].

Firma della donna che ha richiesto il NIPT _____

La mia firma sul presente modulo indica che ho letto, o che mi è stata letta e mi è stata spiegata, l'informativa di cui sopra e che l'ho compresa pienamente. Di conseguenza do il consenso all'esecuzione del

Test cffDNA (T13,T18,T21).

Ho avuto la possibilità di porre tutte le domande che ho ritenuto necessarie e il medico mi ha illustrato lo scopo, le implicazioni e i possibili rischi del test. Sono a conoscenza che, su richiesta, posso ottenere la consulenza di un genetista medico, prima di sottoscrivere questo consenso.

Sono a conoscenza che in circa il 2% dei casi il test non è in grado di fornire un risultato per l'assenza del DNA fetale. In questo caso posso chiedere la ripetizione dell'esame o il rimborso del costo.

In conformità con il Dlgs. 196/03, protezione dei dati a carattere personale, art. 32 della Costituzione e Legge 145/01, i dati personali identificativi e sanitari saranno inseriti in un'anagrafica di proprietà di e saranno utilizzati unicamente per prestare l'assistenza sanitaria richiesta, comunicare con il paziente, fatturare i servizi effettuati.

Luogo _____ Data _____

Firma della donna che ha richiesto il NIPT _____

Residenza/Recapiti _____

Firma del Professionista che ha provveduto all'informativa e raccolto il consenso _____

11. Bibliografia

- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem.* 2000;46:301-302.
- Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(1):26-32.
- Ayres AC, Whitty JA, Ellwood DA. A cost-effectiveness analysis comparing different strategies to implement noninvasive prenatal testing into a Down syndrome screening program. *Aust NZ J Obstet Gynaecol.* 2014;54(5):412-417.
- Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;42:15-33.
- Beulen L, Grutters JP.C., Faas B, Feenstra I, van Vugt John M.G., Bekker M: The consequences of implementing non-invasive prenatal testing in Dutch national health care: a cost-effectiveness analysis. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.* 2014;182:53–61.
- Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierickx H, Willems PJ, Jani JC.: Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):61-66.
- Bianchi DW. From prenatal genomic diagnosis to fetal personalized medicine: progress and challenges. *Nat Med.* 2012;18(7):1041-1051.
- Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP, on behalf of the MatEternal BLOOD IS Source to Accurately diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012;119:890–901.
- Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, Craig JA, Chudova DI, Devers PL, Jones KW, Oliver K, Rava RP, Sehnert AJ; CARE Study Group. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808.
- Bianchi DW, Wilkins-Haug L. Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: what has happened since the rubber met the road? *Clin Chem.* 2014;60:78-87.
- Bilardo CM, Timmerman E, Pajkrt E, van Maarle M. Increased nuchal translucency in euploid fetuses--what should we be telling the parents? *Prenat Diagn.* 2010;30:93-102.
- Boon EM, Faas BH. Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2013;33:563-568.
- Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2013;33:667-674.
- Chitty LS, Griffin DR, Meney C, Barrett A, Khalil A, Pajkrt E, Cole TJ. New aids for 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; 37:283-289.
- Chitty LS, Khalil A, Barrett AN, Pajkrt E, Griffin DR, Cole T. Safer, accurate prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia using ultrasound and cell free fetal DNA. *Prenat Diagn* 2013;33:416-423.
- Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, Foo CH, Xie B, Tsui NB, Lun FM, Zee BC, Lau TK, Cantor CR, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:20458-20463.
- Daley R, Hill M, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis: progress and potential. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2014;99:F426-430.

Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, Xu Z, Lau TK, Xie J, Zhao W, Huang H, Xie J, Sun L, Zhang X, Wang W, Liao S, Qiang R, Cao J, Zhang Q, Zhou Y, Zhu H, Zhong M, Guo Y, Lin L, Gao Z, Yao H, Zhang H, Zhao L, Jiang F, Chen F, Jiang H, Li S, Li Y, Wang J, Wang J, Duan T, Su Y, Zhang X. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn*. 2012;32:1225-1232.

Deans Z, Newson AJ. Should non-invasiveness change informed consent procedures for prenatal diagnosis? *Health Care Anal*. 2011;19(2):122-132.

Deans Z, Clarke AJ, Newson AJ.: For your interest? The ethical acceptability of using non-invasive prenatal testing to test 'purely for information'. *Bioethics*. 2015;29(1):19-25.

De Jong A and De Wert GM. Prenatal screening: an ethical agenda for the near future. *Bioethics*. 2015;29(1):46-55.

Devers PL, Cronister A, Ormond KE, Facio F, Brasington CK, Flodman P. Noninvasive prenatal testing/noninvasive prenatal diagnosis: the position of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns*. 2013;22:291-295.

Dondorp WJ, de Wert GM. The 'thousand-dollar genome': an ethical exploration. *Eur J Hum Genet*. 2013;21 Suppl 1:S6-26.

Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, Bianchi DW, Bergmann C, Borry P, Chitty LS, Fellmann F, Forzano F, Hall A, Henneman L, Howard HC, Lucassen A, Ormond K, Peterlin B, Radojkovic D, Rogowski W, Soller M, Tibben A, Tranebjærg L, van El CG, Cornel MC. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. Summary and recommendations. *Eur J Hum Genet*. 2015 Apr 1. doi: 10.1038/ejhg.2015.56.

Everett TR, Chitty LS: Cell-free fetal DNA: The new tool in fetal medicine. *Ultrasound in Obst Gynecol* 2015;45:499-507.

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;105:16266-16271.

Fairbrother G, Johnson S, Musci TJ, Song K. Clinical experience of noninvasive prenatal testing with cell-free DNA for fetal trisomies 21, 18, and 13, in a general screening population. *Prenat Diagn*. 2013;33:580-583.

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;336: 816-818.

Gil MM, Quezada MS, Bregant B, Ferraro M, Nicolaides KH. Implementation of maternal blood cell-free DNA testing in early screening for aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;42:34-40.

Gil MM, Akolekar R, Quezada MS, Bregant B, Nicolaides KH. Analysis of Cell-Free DNA in Maternal Blood in Screening for Aneuploidies: Meta-Analysis. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35:156-173.

Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar E, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015; 45:249-266.

Grati FR, Malvestiti F, Grimi B, Gaetani E, Di Meco AM, Trotta A, Liuti R, Chinetti S, Dulcetti F, Ruggeri AM, Agrati C, Frascoli G, Milani S, De Toffol S, Martinoni L, Paganini S, Marcato L, Maggi F, Simoni G. QF-PCR as a substitute for karyotyping of cytotrophoblast for the analysis of chorionic villi: advantages and limitations from a cytogenetic retrospective audit of 44, 727 first-trimester prenatal diagnoses. *Prenat Diagn*. 2013;33(11):1117.

Grati FR, Malvestiti F, Ferreira JC, Bajaj K, Gaetani E, Agrati C, Grimi B, Dulcetti F, Ruggeri AM, De Toffol S, Maggi F, Wapner R, Gross S, Simoni G: Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genet Med*. 2014;16(8):620-624.

Gregg AR, Gross SJ, Best RG, Monaghan KG, Bajaj K, Skotko BG, Thomson BH, Watson MS. ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genet Med*. 2013; 15: 395-398.

Hayden EC. Prenatal-screening companies expand scope of DNA tests. *Nature*. 2014;507:19.

Hill M, Finning K, Martin P, Hogg J, Meanwey C, Norbury G, Daniels G, Chitty LS. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Genet.* 2011;80: 68-75.

Hill M, Wright D, Daley R, Lewis C, McKay F, Mason S, Lench N, Howarth A, Boustred C, Lo K, Plagnol V, Spencer K, Fisher J, Kroese M, Morris S, Chitty LS. Evaluation of non-invasive prenatal testing (NIPT) for aneuploidy in an NHS setting: a reliable accurate prenatal non-invasive diagnosis (RAPID) protocol. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014;14:229.

Huang X, Zheng J, Chen M, Zhao Y, Zhang C, Liu L, Xie W, Shi S, Wei Y, Lei D, Xu C, Wu Q, Guo X, Shi X, Zhou Y, Liu Q, Gao Y, Jiang F, Zhang H, Su F, Ge H, Li X, Pan X, Chen S, Chen F, Fang Q, Jiang H, Lau TK, Wang W. Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies. *Prenat Diagn.* 2014;34(4):335-340.

Jeon KC, Chen LS, Goodson P. Decision to abort after a prenatal diagnosis of sex chromosome abnormality: a systematic review of the literature. *Genet Med.* 2012;14:27-38.

Juneau K, Bogard PE, Huang S, Mohseni M, Wang ET, Ryvkin P, Kingsley C, Struble CA, Oliphant A, Zahn JM. Microarray-based cell-free DNA analysis improves noninvasive prenatal testing. *Fetal Diagn Ther.* 2014;36(4):282-286.

Kagan K O, Wright D, Nicolaides KH. First-trimester contingent screening for trisomies 21, 18 and 13 by fetal nuchal translucency and ductus venous flow and maternal blood cell-free DNA testing. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45:42-47.

Langlois S, Brock JA, Wilson RD, Audibert F, Brock JA, Carroll J e.a. Current status in non-invasive prenatal detection of down syndrome, trisomy 18, and trisomy 13 using cell-free DNA in maternal plasma. *J Obstet Gynaecol Can.* 2013;35:177-181.

Larion S, Warsof SL, Romary L, Mlynarczyk M, Peleg D, Abuhamad AZ. Association of combined first-trimester screen and noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. *Obstet Gynecol.* 2014;123:1303-1310.

Le Torielléc E, Chenet C, Kaplan C. Safe fetal platelet genotyping: new developments. *Transfusion.* 2013;53:1755-1762.

Lench N, Barrett A, Fielding S, McKay F, Hill M, Jenkins L, White H, Chitty LS. The clinical implementation of non-invasive prenatal diagnosis for single gene disorders: challenges and progress made. *Prenat Diagn.* 2013;33:555-562.

Liu S, Chen L, Zhang X, Li J, Lin H, Liu L, Xie J, Ge H, Ye M, Chen C, Ji X, Zhang C, Xu F, Jiang H, Zhen H, Chen S, Wang W. Primer-introduced restriction analysis polymerase chain reaction method for non-invasive prenatal testing of β -thalassemia. *Hemoglobin.* 2015;39(1):18-23.

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;350:485-487.

Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, Zheng YW, Leung TY, Lau TK, Cantor CR, Chiu RW. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med.* 2010;2:61ra91.

Lo YM. Non-invasive prenatal testing using massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: from molecular karyotyping to fetal whole-genome sequencing. *Reprod Biomed Online.* 2013;27:593-598.

Lo KK, Boustred C, Chitty LS, Plagnol V. RAPIDR: an analysis package for non-invasive prenatal testing of aneuploidy. *Bioinformatics.* 2014;30: 2965-2967.

Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, Chow KC, Lo WY, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Cantor CR, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:19920-19925.

Mazloom AR, Džakula Ž, Oeth P, Wang H, Jensen T, Tynan J, McCullough R, Saldivar JS, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Maeder M, McLennan G, Meschino W, Palomaki GE, Canick JA, Deciu C. Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013;33:591-597.

McCullough RM, Almasri EA, Guan X, Geis JA, Hicks SC, Mazloom AR, Deciu C, Oeth P, Bombard AT, Paxton B, Dharajiya N, Saldivar JS. Non-invasive prenatal chromosomal aneuploidy testing-clinical experience: 100,000 clinical samples. *PLoS One*. 2014;9(10):e109173.

Mefford HC, Rosenfeld JA, Shur N, Slavotinek AM, Cox VA, Hennekam RC, Firth HV, Willatt L, Wheeler P, Morrow EM, Cook J, Sullivan R, Oh A, McDonald MT, Zonana J, Keller K, Hannibal MC, Ball S, Kussmann J, Gorski J, Zelewski S, Banks V, Smith W, Smith R, Paull L, Rosenbaum KN, Amor DJ, Silva J, Lamb A, Eichler EE. Further clinical and molecular delineation of the 15q24 microdeletion syndrome. *J Med Genet*. 2012;49(2):110-118.

Meng M, Li X, Ge H, Chen F, Han M, Zhang Y, Kang D, Xie W, Gao Z, Pan X, Dai P, Chi F, Chen S, Liu P, Zhang C, Cao J, Jiang H, Xu X, Wang W, Duan T. Noninvasive prenatal testing for autosomal recessive conditions by maternal plasma sequencing in a case of congenital deafness. *Genet Med*. 2014;16(12):972-976.

Michaelson-Cohen R, Gershoni-Baruch R, Sharoni R, Shochat M, Yaron Y, Singer A. Israeli Society of Medical Genetics NIPT Committee Opinion 072013. Non-invasive prenatal testing of cell-free DNA in maternal plasma for detection of fetal aneuploidy. *Fetal Diagn Ther*. 2014;36(3):242-244.

Morain S, Greene MF, Mello MM. A new era in non-invasive prenatal testing. *N Engl J Med*. 2013;369:499–501.

Morris S, Karlsen S, Chung N, Hill M, Chitty LS. Model-based analysis of costs and outcomes of non-invasive prenatal testing for Down's syndrome using cell free fetal DNA in the UK National Health Service. *PLoS One*. 2014;9(4):e93559.

Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K, Faiola S, Falcon O. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005;25(3):221-226.

Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207:374.e1-6.

Nicolaides KH, Syngelaki A, Gil M, Atanasova V, Markova D. Validation of targeted sequencing of single nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X and Y. *Prenat Diagn*. 2013;33:575-579.

Nicolaides KH, Wright D, Poon LC, Syngelaki A, Gil MM. First-trimester contingent screening for trisomy 21 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;42(1):41-50.

Nicolaides KH, Syngelaki A, Poon LC, Gil MM, Wright D. First-trimester contingent screening for trisomies 21, 18 and 13 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35:185–192.

Norton ME, Jacobsson B, Swamy G, Laurent LC, Renzini A, Brar H, Tomlinson M, Pereira L, Spitz J, Holleman D, Cuckle H, Musci T, Wapner R. Non-invasive examination of trisomy using directed cell-free DNA analysis. The NEXT study. *Prenat Diagn*. 2014;34 (Suppl 1):e2.

Norton ME, Jacobsson B, Swamy G, Laurent LC, Renzini A, Brar H, Tomlinson M, Pereira L, Spitz J, Holleman D, Cuckle H, Musci T, Wapner R. Cell free DNA analysis for non invasive examination of trisomies. *NEJM* 2015; 372:1589-1597.

Novelli A, Grati FR, Ballarati L, Bernardini L, Bizzoco D, Camurri L, Casalone R, Cardarelli L, Cavalli P, Ciccone R, Clementi M, Dalprà L, Gentile M, Gelli G, Grammatico P, Malacarne M, Nardone AM, Pecile V, Simoni G, Zuffardi O, Giardino D. Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012;39(4):384-388.

Pan X, Zhang C, Li X, Chen S, Ge H, Zhang Y, Chen F, Jiang H, Jiang F, Zhang H, Wang W, Zhang X. Non-invasive fetal sex determination by maternal plasma sequencing and application in X-linked disorder counseling. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014;27(18):1829-1833.

Papasavva T, van Ijcken WF, Kockx CE, van den Hout MC, Kountouris P, Kythreotis L, Kalogirou E, Grosveld FG, Kleanthous M. Next generation sequencing of SNPs for non-invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to beta-thalassemia. *Eur J Hum Genet*. 2013;21:1403-1410.

Pergament E, Cuckle H, Zimmermann B, Banjevic M, Sigurjonsson S, Ryan A, Hall MP, Dodd M, Lacroute P, Stosic M, Chopra N, Hunkapiller N, Prosen DE, McAdoo S, Demko Z, Siddiqui A, Hill M, Rabinowitz M. Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. *Obstet Gynecol.* 2014;124(2 Pt 1):210-218.

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.

Pieters JJ, Verhaak CM, Braat DD, van Leeuwen E, Smits AP. Experts' opinions on the benefit of an incidental prenatal diagnosis of sex chromosomal aneuploidy: a qualitative interview survey. *Prenat Diagn.* 2012;32:1151-1157.

Poon LC, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagn Ther.* 2013;33(4):215-223.

Royal College of Obstetricians & Gynaecologists. Non-invasive Prenatal Testing for Chromosomal Abnormality using Maternal Plasma DNA. Scientific Impact Paper No. 15. March 2014.
https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/sip_15_04032014.pdf

Salomon LJ, Alfirevic Z, Audibert F, Kagan KO, Yeo G, Raine-Fenning N. ISUOG Clinical Standards Committee. ISUOG consensus statement on the impact of non-invasive prenatal testing (NIPT) on prenatal ultrasound practice. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;44:122-123.

Samango-Sprouse C, Banjevic M, Ryan A, Sigurjonsson S, Zimmermann B, Hill M, Hall MP, Westemeyer M, Saucier J, Demko Z, Rabinowitz M. SNP-based non-invasive prenatal testing detects sex chromosome aneuploidies with high accuracy. *Prenat Diagn.* 2013;33:643-649.

Sehnert AJ, Rhee B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J, Rapa RP. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem.* 2011;57:1042-1049.

Song K, Musci TJ, Caughey AB. Clinical utility and cost of non-invasive prenatal testing with cfDNA analysis in high-risk women based on a US population. *J Mat Fet Neonat Med.* 2013;26(12):1180-1185.

Song Y, Liu C, Qi H, Zhang Y, Bian X, Liu J. Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat Diagn.* 2013;33:700-706.

Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta.* 2014;35 Suppl:S64-8.

Tary-Gudollet V, Menassa R, Costa JM, David M, Bouvattier-Morel C, Baumann C, Houang M, Lorenzini F, Phillip N, Odent S, Guichet A, Morel Y. New management strategy of pregnancies at risk of congenital adrenal hyperplasia using fetal sex determination in maternal serum: French cohort of 258 cases (2002-2011). *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:1180-1188.

T. K. Lau, S. W. Cheung, P. S. S. Lo, A. N. Pursley, M. K. Chan, F. Jiang, H. Zhang, W. Wang, L. F. J. Jong, O. K. C. Yuen, H. Y. C. Chan, W. S. K. Chan and K. W. Choy. Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA: review of 1982 consecutive cases in a single center *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43:254-264.

Turocy John, Norem Carol, Blumberg Bruce, Norton Mary. Chromosomal abnormalities detected in patients with failure to obtain test results using non-invasive prenatal testing. *AJOG.* 2015; 212(Suppl 1): S45.

Twiss P, Hill M, McKay F, Fielding S, Jenkins L, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: detection of paternal mutations and exploration of patient preferences. *Prenat Diagn.* 2014;34 (Suppl 1):83.

Van El CG, Cornel MC, Borry P, Hastings RJ, Fellmann F, Hodgson SV, Howard HC, Cambon-Thomsen A, Knoppers BM, Meijers-Heijboer H, Scheffer H, Tranebjaerg L, Dondorp W, de Wert GM; ESHG Public and Professional Policy

- Committee. Whole-genome sequencing in health care. Recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet.* 2013;21 Suppl 1:S1-5.
- Van Schendel RV, Kleinveld JH, Dondorp WJ, Pajkrt E, Timmermans DR, Holtkamp KC, Karsten M, Vlietstra AL, Lachmeijer AM, Henneman L. Attitudes of pregnant women and male partners towards non-invasive prenatal testing and widening the scope of prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(12):1345-50.
- Vanstone M, King C, de Vrijer B, Nisker J. Non-invasive prenatal testing: ethics and policy considerations. *J Obstet Gynaecol Can.* 2014;36:515-26.
- Verweij EJ, de Boer MA, Oepkes D. Non-invasive prenatal diagnosis for Down syndrome: no paradigm shift, just better testing...and it is already here! *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;40:484-485.
- Verweij EJ, Oepkes D, de Boer MA. Changing attitudes towards termination of pregnancy for trisomy 21 with non-invasive prenatal trisomy testing: a population-based study in Dutch pregnant women. *Prenat Diagn.* 2013;33:397-399.
- Verweij EJ, de Boer MA, Oepkes D. Non-invasive prenatal testing for trisomy 13: more harm than good? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;44:112-114.
- Vora NL, O'Brien BM. Noninvasive prenatal testing for microdeletion syndromes and expanded trisomies: proceed with caution. *Obstet Gynecol.* 2014;123:1097-1099.
- Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013;33:662-666.
- Wang Y, Chen Y, Tian F, Zhang J, Song Z, Wu Y, Han X, Hu W, Ma D, Cram D, Cheng W. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clin Chem.* 2014;6:251-259.
- Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2175-84.
- Wilson JM, Jungner YG. Principles and practice of screening for disease. World Health Organization, Geneva, 1968.
- Yao H, Jiang F, Hu H, Gao Y, Zhu Z, Zhang H, Wang Y, Guo Y, Liu L, Yuan Y, Zhou L, Wang J, Du B, Qu N, Zhang R, Dong Y, Xu H, Chen F, Jiang H, Liu Y, Zhang L, Tian Z, Liu Q, Zhang C, Pan X, Yang S, Zhao L, Wang W, Liang Z. Detection of fetal sex chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: initial experience in a Chinese hospital. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;44:17-24.
- Yu SC, Jiang P, Choy KW, Chan KC, Won HS, Leung WC, Lau ET, Tang MH, Leung TY, Lo YM, Chiu RW. Noninvasive prenatal molecular karyotyping from maternal plasma. *PLoS One.* 2013;8:e60968.
- Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, Zhu Z, Lin M, Liu Q, Tian Z, Zhang H, Chen F, Lau TK, Zhao L, Yi X, Yin Y, Wang W.. Noninvasive Prenatal Testing for Trisomy 21, 18 and 13 - Clinical Experience from 146,958 Pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan 19. doi: 10.1002/uog.14792. [Epub ahead of print]
- Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, Ryan A, Sigurjonsson S, Chopra N, Dodd M, Levy B, Rabinowitz M. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn.* 2012;32(13):1233-41.