

Non-invasive prenatal testing for aneuploidy screening: the state-of-the-art

Testes pré-natais não invasivos para rastreio de aneuploidias: o estado da arte

Carolina Vaz-de-Macedo*

Serviço de Ginecologia-Obstetria, Hospital Garcia de Orta, E.PE.

Laboratório de Genética e Instituto de Saúde Ambiental, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Abstract

Non-invasive prenatal testing (NIPT) is a recent approach to prenatal aneuploidy screening. NIPT has an excellent test performance but it is not a diagnostic test, as there are known limitations associated with false positive and false negative results. When compared to standard screening, pre-test counselling is complicated by concepts such as the possibility of incidental findings. It is important for all the health professionals involved in this field to be familiarised with the state-of-the-art knowledge in NIPT. The aim of this article is to review the evidence on the clinical use of NIPT for aneuploidy screening.

Keywords: Prenatal screening; Aneuploidy.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a medicina fetal tem evoluído com a introdução na prática clínica de novos métodos de rastreio e diagnóstico pré-natal. Embora a lista de testes pré-natais de natureza não invasiva inclua em sentido lato os métodos de imagem e todas as análises ao sangue materno, o termo «teste pré-natal não invasivo» (TPNI) tem sido utilizado como sinónimo da pesquisa de ácidos nucleicos de «origem fetal» no sangue materno. Tem-se assistido a um grande esforço no desenvolvimento e introdução clínica destes testes, com um crescimento exponencial na sua aplicabilidade¹. Acredita-se que, das várias aplicações da pesquisa de ácidos nucleicos de origem fetal em circulação materna, o TPNI para rastreio de aneuploidias seja o de maior impacto na prática clínica¹, reconhecido como o teste genético/genómico de mais rápido crescimento na história da medicina². Perante a rápida evolução na área, o objectivo deste artigo é rever a evidência científica relativa à utilização clínica do TPNI como método de rastreio pré-natal de aneuploidias.

*Especialista em Ginecologia/Obstetria; Assistente Convidada do Laboratório de Genética e Instituto de Saúde Ambiental da Faculdade de Medicina de Lisboa

DESENVOLVIMENTO E PRINCÍPIOS DO TPNI

Em 1997, foi identificada pela primeira vez a presença de ácidos desoxiribonucleicos (ADN) circulantes de «origem fetal» no plasma materno³. Foi pouco depois demonstrado que este ADN («*cell-free fetal DNA*», cffDNA) era específico da gravidez, sendo rapidamente eliminado da circulação após o parto⁴. O cffDNA pode ser detectado no plasma materno a partir das 4 semanas de gestação⁵ e a sua fracção aumenta durante a gravidez⁶⁻⁸, representando uma média de 10% do total de ADN livre em circulação às 12-14 semanas⁹. Estes dados abriram a possibilidade de um rastreio de aneuploidias fetais no sangue materno, baseado sumariamente na comparação entre a quantidade real em circulação e a quantidade expectável de cffDNA com sequências específicas para um determinado cromossoma. Existem diferentes metodologias moleculares em uso para este fim, com distintos graus de amplificação e selectividade para o cffDNA que é analisado. As principais assentam em uma de três bases: sequenciação paralela massiva (MPS) de todo o genoma^{10,11}, sequenciação paralela massiva (MPS) dirigida^{12,13} e sequenciação de SNPs («single-nucleotide polymorphisms»)^{14,15}. Embora existam diferenças práticas entre estes méto-

dos, o seu desempenho clínico é, em termos gerais, considerado sobreponível¹⁶. O desenvolvimento de ensaios comerciais para estas metodologias culminou com a oferta no mercado de TPNI para rastreio das aneuploidias mais frequentes, disponibilizado pela primeira vez em 2011¹⁷.

O QUE O TPNI TRAZ DE NOVO

O TPNI pode ser encarado como um teste de rastreio alternativo ou complementar ao rastreio combinado de aneuploidias do primeiro trimestre. Nas mais recentes meta-análises é confirmado um alto desempenho para o rastreio de trissomia 21 (T21), com uma sensibilidade combinada de 99,3-99,7%^{6,18,19}. O desempenho do TPNI é globalmente mais baixo para a trissomia 18 (T18), trissomia 13 (T13) e monossomia X (MX), com sensibilidades combinadas de 97,4-98,2%, 90,6-99,0% e 92,9-95,8%, respectivamente^{6,18,19}. O TPNI é um teste altamente específico (99,8-100%) para todas estas aneuploidias^{6,18,19}, sendo superior ao rastreio «clássico» de aneuploidias (definido como a determinação de marcadores bioquímicos com ou sem avaliação da translucência da nuca às 11-13 semanas)²⁰.

POPULAÇÃO-ALVO

Alto-risco versus população em geral

As primeiras publicações referentes à utilização clínica do TPNI reportavam a uma população de grávidas de risco aumentado para aneuploidias, a quem tinha sido efectuado diagnóstico pré-natal invasivo^{21,22}. Já a extensão do TPNI à população em geral é marcada por controvérsia. Apesar de o teste ter um bom desempenho neste contexto²³⁻²⁵, gestações de baixo risco implicam um valor predictivo positivo mais baixo, particularmente para T13 e aneuploidias sexuais²⁶. Um análise-modelo sugeriu que, se forem incluídas na análise as T18, T13 e aneuploidias sexuais, o TPNI tem na realidade uma sensibilidade mais baixa do que o rastreio sequencial como método de rastreio primário²⁷. Contudo, todas as formas de mosaicismo foram consideradas neste modelo como não detectáveis, o que pode não ser uma boa representação da realidade.

A utilização do TPNI está a ser considerada e/ou implementada no sistema público de saúde de vários países como teste contingente após o rastreio combinado

no primeiro trimestre, com oferta do teste a gestações de risco intermédio e/ou elevado²⁸⁻³². Nesta abordagem, cabe a cada país a definição dos limiares de rastreio adequados no equilíbrio entre a taxa de detecção e a taxa de resultados falsos-positivos^{1,33}. No Reino Unido, foi estimado que não existirá alteração significativa dos custos quando o TPNI é oferecido como teste contingente para grávidas com um rastreio combinado com risco igual ou superior a 1 em 150³⁴. Já na Holanda, foi estimado um aumento de 21% nos custos directamente relacionados com o rastreio³⁵. No cenário norte-americano, uma análise de modelação sugeriu que o TPNI não será mais dispendioso do que o rastreio clássico de aneuploidias quando considerados os custos relacionados com o nascimento de crianças com as aneuploidias rastreadas³⁶. Perante dados limitados sobre o custo-eficácia do TPNI, o *American Congress of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) recomenda a manutenção dos métodos convencionais como primeira linha de rastreio de aneuploidias¹⁶.

Gestações múltiplas

Embora o uso do TPNI nas gestações múltiplas tenha defensores³⁷, existem limitações associadas a esta prática. Para além da incapacidade de distinção de qual/is dos fetos contribuiu/ram para um resultado alterado, existe um pequeno número de casos de gestações gemelares incluídas nos estudos publicados, com valores de sensibilidade variáveis^{19,38,39} e com uma maior taxa de resultados inconclusivos³⁹. Este menor desempenho parece encontrar-se relacionado com a menor fracção fetal de cada co-gémeo em comparação com fetos em gestações simples, o que pode dever-se a um maior efeito de diluição pela particular expansão de volume plasmático materno³⁸. Ainda assim, é importante salientar que o rastreio combinado do primeiro trimestre, que é a principal alternativa na gravidez de baixo risco, também apresenta um menor desempenho nas gestações múltiplas do que nas gestações simples⁴⁰. Muito embora não se tenha encontrado um estudo comparativo directo entre estas abordagens, uma revisão do tópico sugere que o TPNI tem um melhor desempenho na gravidez gemelar do que o rastreio combinado do primeiro trimestre⁴¹.

POR QUE O TPNI NÃO É UM TESTE DIAGNÓSTICO

Apesar do excelente desempenho do TPNI como tes-

QUADRO I. PRINCIPAIS MOTIVOS PARA RESULTADOS DISCORDANTES EM TPNI

Resultados falsos-positivos	Resultados falsos-negativos
Mosaicismo placentário Síndrome do gêmeo desaparecido Doença maligna materna Aneuploidia materna	Baixa fracção fetal

te de rastreio, a existência de resultados falsos-positivos e falsos-negativos preclui a sua utilização como teste de diagnóstico – Quadro I. A este nível, é importante ter em consideração a natureza do cfDNA, que é na realidade de origem trofoblástica⁴²⁻⁴⁵, bem como o facto de esta avaliação ser efectuada numa amostra de sangue materno.

Resultados falsos-positivos

Resultados falsos-positivos podem ocorrer como resultado de alterações confinadas à placenta. Apesar de o mosaicismo feto-placentário ser uma causa reconhecida de resultados discordantes no TPNI⁴⁶, a percentagem mínima de mosaicismo necessária para o resultado ser positivo é desconhecida e pode ser dependente quer do tipo de tecnologia utilizada quer do tipo de aneuploidia presente^{47,48}. Os resultados do TPNI foram inconsistentes em casos de mosaicismo fetal confirmado por cariótipo⁴⁹⁻⁵¹.

O cfDNA de um «gêmeo desaparecido» (*vanishing twin*) também pode levar a uma representação errónea da constituição cromossómica do co-gêmeo vivo⁵². O TPNI baseado em SNPs oferece a possibilidade de detecção de haplotipos fetais adicionais, o que pode ser útil na síndrome do «gêmeo desaparecido», bem como em gestações múltiplas não reconhecidas antes da colheita de sangue e em gestações triplóides⁵³. Ainda assim, é importante referir que este teste baseado em SNPs não se encontra clinicamente validado para o rastreio de aneuploidias em gestações múltiplas⁵³.

Dada a natureza do TPNI como um teste ao sangue materno, uma outra causa de resultados falsos-positivos relaciona-se com achados inesperados (e provavelmente não desejados) referentes à grávida. Uma implicação chocante do TPNI é a detecção acidental de patologia maligna materna por um resultado onde são reveladas alterações cromossómicas atípicas^{54,55}. Embora tal possa parecer benéfico, na realidade uma detecção mais precoce de cancro pode não melhorar o desfecho devido a um viés de tempo de sobrevivência após o

diagnóstico («*lead time bias*») ou à incapacidade de intervir na história natural da doença⁵⁶.

Adicionalmente, o TPNI está associado a um aumento da consciencialização relativa a alterações cromossómicas da própria grávida. Por exemplo, numa análise de 109 casos consecutivos de resultado discordante de TPNI, 8,6% das aneuploidias sexuais detectadas eram na realidade de origem materna²⁶. Foram ainda relatados casos de resultados falsos-positivos para T18 e monossomia 13 por duplicações 18q maternas e por um mioma uterino de grandes dimensões, respectivamente⁵⁷⁻⁵⁹. Um estudo recente em que foram incluídos 74 casos falsos-positivos revelou que 8,1% destes se reportavam a aneuploidias maternas⁶⁰.

Resultados falsos-negativos e inconclusivos/não-reportáveis

Os resultados falsos-negativos em TPNI relacionam-se especialmente com a inexistência de uma proporção suficiente de ADN de origem fetal para que uma quantidade anormal de um determinado cromossoma seja detectada como um desvio do normal (num conjunto de fragmentos de ADN que são maioritariamente maternos, pelo que provavelmente euplóides). Para que esta dita fracção fetal seja suficiente para resultados conclusivos, é recomendada uma idade gestacional de pelo menos 9-10 semanas para a utilização clínica do TPNI⁶¹. No entanto, este valor, e consequentemente a taxa de resultados inconclusivos/não-reportáveis, é dependente de factores como o peso materno e a existência de hipertensão crónica^{7,8,62,63}. É sugerido um limite mínimo de 4% para a emissão de um relatório⁵¹. Nos casos em que o resultado seja inconclusivo pode ser efectuada uma nova colheita, sendo que a fracção fetal é geralmente superior nessa segunda amostra⁸. Por exemplo, nas grávidas com um índice de massa corporal superior a 35 kg/m², a probabilidade de um resultado inconclusivo diminui com o aumento da idade gestacional, deixando de ser superior à das grávidas normoponderais a partir das 21 semanas de gestação⁶⁴. É, assim, razoável

adiar por algumas semanas a colheita de sangue neste grupo populacional como estratégia para diminuir a probabilidade de falsos positivos⁶⁴.

Foram recentemente desenvolvidos novos métodos para quantificação da fracção fetal no plasma materno^{65,66} e deve ser considerado que abordagens distintas têm diferentes limites de detecção⁶⁷. Uma revisão da taxa de falha em reportar um resultado mostrou que esta varia entre 1,58% para os métodos baseados em MPS e 6,39% nos métodos baseados em análise de SNPs⁶⁸. Por outro lado, sabe-se que a percentagem de cfDNA em circulação é maior na T21 e menor nas T18, T13 e monossomia X em comparação com fetos euplóides^{62,69}. Em concordância com este dado, nos casos de falha de resultado existe um risco aumentado para T18 e T13, mas não para T21⁷⁰.

Na presença de malformações fetais detectadas por ecografia, o valor predictivo positivo do TPNI atinge valores superiores a 90% (mas ainda assim não é diagnóstico)⁷¹. Devido à possibilidade de resultados falsos-negativos, a utilização do TPNI em casos de malformações fetais é desencorajada por certas sociedades profissionais, pois um resultado negativo poderá não ser suficientemente tranquilizador^{16,72}. Ainda assim, esta recomendação não é seguida de forma universal⁷³.

IMPACTO NO DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL

Perante um resultado de rastreio por TPNI com risco aumentado para uma dada aneuploidia, e face a um desejo expresso de interrupção de gravidez, é essencial a confirmação por um teste invasivo^{16,72,74}. Infelizmente, existem casos na literatura em que o procedimento de interrupção de gravidez foi accionado sem teste confirmatório da presença de aneuploidia⁷¹. É ainda importante salientar que as utilizadoras do TPNI incluem mulheres que não aceitariam técnicas invasivas de diagnóstico pré-natal face ao seu risco, mas pretendem informação precoce para preparação do nascimento de uma criança afectada^{75,76}. O número de amniocenteses e biopsias de vilosidades coriônicas (BVCs) poderá ser significativamente reduzido⁷⁷⁻⁷⁹, com diminuições de 53-77% reportadas em comparação com coortes históricas de grávidas^{77,79}. Dado que os riscos associados ao diagnóstico pré-natal invasivo são dependentes da experiência do operador⁸⁰ e que esta será previsivelmente menor, foi proposta a utilização de simuladores no treino inicial para procedimentos invasivos⁸¹.

Também o diagnóstico pré-natal ecográfico de malformações fetais não deverá ser substituído pelo TPNI, continuando a existir um óbvio papel a este nível para a ecografia fetal^{16,72}. Foram publicadas recentemente novas recomendações sobre o papel da ecografia nas grávidas que realizaram TPNI, na tentativa de esclarecer a conduta perante a presença de marcadores *minor* de aneuploidias neste grupo de gestações⁸². A este nível, é importante salientar que o cálculo de risco por métodos convencionais (como o rastreio combinado do primeiro trimestre) é claramente desaconselhado nas grávidas que já são portadoras de um resultado de TPNI^{59,72}. Também a pesquisa sistemática de vários marcadores *minor* de aneuploidias é desaconselhada neste grupo, pela alta taxa de resultados falsos-positivos e baixo valor preditivo do positivo a que se associará⁷².

Existem dados limitados na literatura sobre o melhor teste confirmatório perante um resultado de TPNI de risco aumentado para uma dada aneuploidia. Uma análise teórica baseada em amostras de biopsia de vilosidades coriônicas (BVS) sugeriu que o risco de mosaicismo placentário após um TPNI de risco aumentado depende da aneuploidia específica detectada⁴⁷. Em particular, face ao elevado risco de mosaicismo na T13 e MX, foi sugerida uma abordagem cautelosa com evicção da BVC como teste confirmatório neste grupo⁴⁷. Outros autores sugerem BVC com análise directa e por cultura de todas as amostras, com amniocentese confirmatória nos casos de discordância entre os resultados obtidos pelas duas técnicas⁸³.

NOVAS ABORDAGENS

Novas abordagens em estudo incluem optimizações do TPNI para melhoria do seu desempenho no rastreio de aneuploidias sexuais⁸⁴, do valor preditivo do positivo (através de método de sequenciação *shotgun* com automação completa)⁸⁵ e da distinção da origem materna de alterações⁸⁶. A aplicação de uma técnica quantitativa, «*droplet digital PCR (ddPCR)*»^{87,88}, associa-se à promessa de uma diminuição nos gastos associados ao TPNI⁸⁹⁻⁹¹ com detecção de T21 a partir de uma fracção fetal de 5%⁹². No extremo oposto de custos, após publicação em 2013 de um estudo de princípio para a detecção de alterações sub-cromossómicas (isto é, anomalias cromossómicas limitadas a parte de um cromossoma – como é o caso das micro-deleções) através da utilização de uma abordagem de MPS⁴⁷, esta

possibilidade também passou a encontrar-se disponível comercialmente⁹³. No entanto, a implementação da prática clínica corrente desta versão «expandida» do TPNI tem vindo a ser questionada^{94,95}. Apesar dos avanços na técnica de sequenciação^{96,97}, foi recomendada prudência pelo facto de a baixa prevalência destas patologias implicar um valor predictivo positivo limitado⁹⁸, aliás confirmado na prática clínica⁹⁹. Também a este nível, a presença de mosaicismo placentário é uma possível causa de resultados falsos-positivos¹⁰⁰.

Ainda assim, a evidência de que os genomas materno e fetal completos estão presentes no plasma materno a uma percentagem relativa constante é um argumento a favor do uso do TPNI com análise de todo o genoma⁸⁷. De facto, o TPNI poderá vir a fornecer a mesma quantidade de informação que um *array*⁴⁹. Em tal cenário, os serviços de saúde terão de estar preparados para lidar com variantes de significado indeterminado («*variants of unknown/uncertain significance*» - VOUS) e «zonas-cinzentas» no aconselhamento e orientação das grávidas e casais¹⁰¹.

IMPLICAÇÕES PARA OS SERVIÇOS DE SAÚDE: POLÍTICA E ÉTICA

Foi alegado que os grandes desafios relativos à utilização do TPNI não são de natureza técnica, mas sim a nível de políticas de saúde¹. De facto, a comercialização do TPNI levantou novas questões, com a publicação recente de vários consensos e recomendações por parte das sociedades profissionais de vários países na tentativa de uniformização da prática clínica^{16,61,72,74,102,103}.

As grávidas encaram de forma positiva a inclusão do TPNI como oferta¹⁰⁴, com elevada intenção/efectivação de adesão^{79,105,106}. No entanto, a provisão de uma adequada informação pré-teste é desafiante e complicada por questões como a possibilidade de achados acidentais¹⁰⁶ – amplificada se se optar por incluir a «versão expandida» com rastreio de microdeleções¹⁰⁸. Por exemplo, um estudo recente mostrou que, na maioria dos casos, as grávidas não são informadas sobre a possibilidade de achado acidental de neoplasia materna¹⁰⁹. É expectável que a introdução do TPNI se reflecta numa sobrecarga para os profissionais de saúde envolvidos no rastreio pré-natal¹¹⁰ e é possível que a maior complexidade do teste prejudique o processo de escolha informada¹¹¹. Uma das principais preocupações das partes envolvidas é a possibilidade de «normalização» do teste, com um aumento da pressão so-

cial para realização do teste dada a sua segurança¹¹². Ainda assim, foram encontradas taxas elevadas de escolha informada quer em contexto de investigação¹¹³ quer na utilização clínica do TPNI⁷⁶, sendo que a maioria das mulheres compreende a existência de um risco residual após um resultado de baixo risco¹¹⁴.

Em 2014, o TPNI já se encontrava disponível em mais de 60 países¹¹⁵. Questões demográficas, culturais e legais seguramente influenciarão a sua implementação e aceitação regional^{116,117}. Uma sondagem a profissionais de saúde confirmou que a informação e o acesso ao TPNI são heterogéneos, com uma grande variabilidade do preço do teste¹⁷. Esta heterogeneidade levanta a questão da discriminação injusta com subsequente enfraquecimento da autonomia reproductiva das grávidas¹¹⁸.

Por outro lado, a implementação do TPNI pressupõe uma visão crítica renovada sobre os limites dessa mesma autonomia reproductiva¹¹⁹. Por exemplo, a sua utilização precoce poderá possibilitar aos pais uma interrupção de gravidez dependente do sexo do feto⁷⁴. Também a posição das pessoas e famílias das pessoas afectadas pelas doenças alvo do TPNI deverá ser tida em conta⁷⁴. Um grupo de pais de crianças com T21 exprimiu várias preocupações sobre o TPNI, relacionadas em particular com o possível impacto deste teste na forma como a sociedade encara os indivíduos afectados¹²⁰. Finalmente, e de um ponto de vista legal, poderão aumentar os processos nas chamadas «acções de vida» («*wrongful life*» e «*wrongful birth*») por uma atitude expectante perante uma forte suspeita de aneuploidia¹¹⁷.

CONCLUSÃO

O extraordinário desenvolvimento da tecnologia relacionada com o TPNI a que se assistiu nas últimas duas décadas originou uma rápida expansão comercial que não terá sido prevista pela maioria dos profissionais de saúde envolvidos em diagnóstico pré-natal. O TPNI é um excelente método de rastreio de aneuploidias, mas não é isento de limitações e de questões em aberto. É vital o fornecimento de informação adequada e abrangente a todos os profissionais envolvidos no processo de aconselhamento das grávidas para que a implementação desta tecnologia possa decorrer de forma responsável¹¹⁷. É nossa expectativa que este artigo de revisão em Língua Portuguesa seja um passo nesse sentido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chitty LS, Kroese M. Realising the promise of non-invasive prenatal testing. *BMJ* 2015;350:h1792.
2. Chitty LS, Bianchi DW. Next generation sequencing and the next generation: how genomics is revolutionizing reproduction. *Prenat Diagn* 2015;35:929-930.
3. 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.
4. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-224.
5. Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev* 2007;83:563-566.
6. Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbebiyi A, Uthman OA, Madan J, Clarke A, Quenby S, Clarke A. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2016;6:e010002.
7. Kinnings SL, Geis JA, Almasri E, Wang H, Guan X, McCullough RM, Bombard AT, Saldivar JS, Oeth P, Deciu C. Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn* 2015;35:816-822.
8. 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.
9. Lun FM, Chiu RW, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Lo YM. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2008;54:1664-1672.
10. 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 U S A* 2008;105:16266-16271.
11. 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 U S A* 2008;105:20458-20463.
12. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, McBride C, Zahn J, Lee K, Shen N, Doshi J, Sun M, Garrison J, Sandler J, Hollemon D, Pattee P, Tomita-Mitchell A, Mitchell M, Stuelpegel J, Song K, Oliphant A. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 2012;32:3-9.
13. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, Nicolaides KH. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:322.e1-5.
14. Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M, Barry J, Betz J, Franz K, Gold K, Vellecillo B, Varney J. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 2007;369:474-481.
15. Ghanta S, Mitchell ME, Ames M, Hidestrand M, Simpson P, Goetsch M, Thilly WG, Struble CA, Tomita-Mitchell A. Non-invasive prenatal detection of trisomy 21 using tandem single nucleotide polymorphisms. *PLoS One* 2010;5:e13184.
16. ACOG. Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2015;126:e31-37.
17. Minear MA, Lewis C, Pradhan S, Chandrasekharan S. Global perspectives on clinical adoption of NIPT. *Prenat Diagn* 2015;35:959-967.
18. Mackie FL, Hemming K, Allen S, Morris RK, Kilby MD. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG* 2017;124:32-46.
19. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;doi: 10.1002/uog.17484.
20. 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, for the CARE Study Group. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014;370:799-808.
21. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, Lun FM, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, van Vugt JM, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* 2011;342:c7401.
22. Ehrlich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, Lu V, McCullough R, McCarthy E, Nygren AO, Dean J, Tang L, Hutchison D, Lu T, Wang H, Angkathachai V, Oeth P, Cantor CR, Bombard A, van den Boom D. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:205.e1-11.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Wang JC, Sahoo T, Schonberg S, Kopita KA, Ross L, Patek K, Strom CM. Discordant noninvasive prenatal testing and cytogenetic results: a study of 109 consecutive cases. *Genet Med* 2015;17:234-236.
27. Norton ME, Baer RJ, Wapner RJ, Kuppermann M, Jelliffe-Pawlowski LL, Currier RJ. Cell-free DNA vs sequential screening for the detection of fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 2016;214:727.e1-6.
28. Gil MM, Revello R, Poon LC, Akolekar R, Nicolaides KH. Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: cell-free DNA test contingent on results from first-tri-

mester combined test. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;47:45-52.

29. 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:e93559.

30. Neyt M, Hulstaert F, Gyselaers W. Introducing the non-invasive prenatal test for trisomy 21 in Belgium: a cost-consequences analysis. *BMJ Open* 2014;4:e005922.

31. Oepkes D, Page-Christiaens GC, Bax CJ, Bekker MN, Bilarado CM, Boon EM, Schuring-Blom GH, Coumans AB, Fass BH, Galjaard RH, Go AT, Henneman L, Macville MV, Pajkrt E, Suijkerbuijk RF, Huisjdsens-van Amsterdam K, Van Opstal D, Verweij EJ, Weiss MM, Sistermans EA, for the Dutch NIPT Consortium. Trial by Dutch laboratories for evaluation of non-invasive prenatal testing. Part I-clinical impact. *Prenat Diagn* 2016;36:1083-90.

32. Eastwood A, Webster D, Taylor J, McKay R, McEwen A, Sullivan J, Pope-Couston R, Stone P. Antenatal screening for aneuploidy—surveying the current situation and planning for non-invasive prenatal diagnosis in New Zealand. *N Z Med J* 2016;129:57-63.

33. Maxwell S, James I, Dickinson JE, O'Leary P. First trimester screening cut-offs for noninvasive prenatal testing as a contingent screen: Balancing detection and screen-positive rates for trisomy 21. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2016;56:29-35.

34. Chitty LS, Wright D, Hill M, Verhoef TI, Daley R, Lewis C, Mason S, McKay F, Jenkins L, Howarth A, Cameron L, McEwan A, Fisher J, Kroese M, Morris S. Uptake, outcomes, and costs of implementing non-invasive prenatal testing for Down's syndrome into NHS maternity care: prospective cohort study in eight diverse maternity units. *BMJ* 2016;354:i3426.

35. Beulen L, Grutters JP, Faas BH, Feenstra I, van Vugt JM, Bekker MN. The consequences of implementing non-invasive prenatal testing in Dutch national health care: a cost-effectiveness analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;182:53-61.

36. Benn P, Curnow KJ, Chapman S, Michalopoulos SN, Hornberger J, Rabinowitz M. An Economic Analysis of Cell-Free DNA Non-Invasive Prenatal Testing in the US General Pregnancy Population. *PLoS One* 2015;10:e0132313.

37. 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;34:335-40.

38. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaidis KH, Ordonez 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;45:61-6.

39. Sarno L, Revello R, Hanson E, Akolekar R, Nicolaidis KH. Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;47:705-11.

40. Prats P, Rodríguez I, Comas C, Puerto B. Systematic review of screening for trisomy 21 in twin pregnancies in first trimester combining nuchal translucency and biochemical markers: a meta-analysis. *Prenat Diagn*. 2014;34:1077-83.

41. Gagnon A, Audibert F. Prenatal screening and diagnosis of aneuploidy in multiple pregnancies. *Best Pract Res Clin Obstet Gy-*

naecol. 2014;28:285-94.

42. Faas BH, de Ligt J, Janssen I, Eggink AJ, Wijnberger LD, van Vugt JM, Vissers L, Geurts van Kessel A. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12 Suppl 1:S19-26.

43. Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P, Flori J, Costa JM. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report. *Hum Reprod* 2004;19:723-4.

44. Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetal-placental DNA. *Am J Pathol* 2006;169:400-4.

45. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007;27:415-8.

46. 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;16:620-4.

47. Grati FR, Bajaj K, Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Malvestiti B, Pompili E, Maggi F, Gross S, Simoni G, Ferreira JC. The type of fetal-placental aneuploidy detected by cfDNA testing may influence the choice of confirmatory diagnostic procedure. *Prenat Diagn* 2015;35:994-8.

48. Pan Q, Sun B, Huang X, Jing X, Liu H, Jiang F, Zhou J, Lin M, Yue H, Hu P, Ning I. A prenatal case with discrepant findings between non-invasive prenatal testing and fetal genetic testings. *Mol Cytogenet* 2014;7:48.

49. Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H, Sehnert AJ, Rava RP. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma. *Am J Hum Genet* 2013;92:167-76.

50. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012;119:890-901.

51. 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;33:667-74.

52. Gromminger S, Yagmur E, Erkan S, Nagy S, Schock U, Bonnet J, Smerdka P, Ehrish M, Wegner RD, Hofmann W, Stumm M. Fetal Aneuploidy Detection by Cell-Free DNA Sequencing for Multiple Pregnancies and Quality Issues with Vanishing Twins. *J Clin Med* 2014;3:679-92.

53. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, Kirkizlar E, Stosic M, Hall MP, Sigurjonsson S, Demko Z, Rabinowitz M, Gross SJ. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212:79.e1-9.

54. Bianchi DW. Pregnancy: Prepare for unexpected prenatal test results. *Nature* 2015;522:29-30.

55. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ, Bhatt S, Murray K, Prosen TL, Garber JE, Wilkins-Haug L, Vora NL, Warsof S, Golberg J, Ziania T, Halks-Miller M. Noninvasive Prenatal Testing and Inci-

dental Detection of Occult Maternal Malignancies. *JAMA* 2015;314:162-169.

56. Prasad V. Non-invasive, serum DNA pregnancy testing leading to incidental discovery of cancer: a good thing? *Eur J Cancer* 2015;51:2272-2274.

57. Snyder MW, Simmons LE, Kitzman JO, Coe BP, Henson JM, Daza RM, Eichler EE, Shendure J, Gammill HS. Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. *N Engl J Med* 2015;372:1639-1645.

58. Flowers N, Kelley J, Sigurjonsson S, Bruno DL, Pertile MD. Maternal mosaicism for a large segmental duplication of 18q as a secondary finding following non-invasive prenatal testing and implications for test accuracy. *Prenat Diagn* 2015;35:986-989.

59. Dharajiya NG, Namba A, Horiuchi I, Miyai S, Farkas DH, Almasri E, Saldivar JS, Takagi K, Kamei Y. Uterine leiomyoma confounding a noninvasive prenatal test result. *Prenat Diagn* 2015;35:990-993.

60. Zhou X, Sui L, Xu Y, Song Y, Qi Q, Zhang J, Zhu H, Sun H, Tian F, Xu M, Cram DS, Liu J. Contribution of maternal copy number variations to false-positive fetal trisomies detected by noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn* 2017;37:318-322.

61. Benn P, Borrell A, Chiu RW, Cuckle H, Dugoff L, Faas B, Gross S, Huang T, Johnson J, Maymon R, Norton M, Odibo A, Schieler P, Spencer K, Wright D, Yaron Y. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn* 2015;35:725-734.

62. Zhou Y, Zhu Z, Gao Y, Yuan Y, Guo Y, Zhou L, Liao K, Wang J, Du B, Hou Y, Chen Z, Chen F, Zhang H, Yu C, Zhao L, Tau TK, Jiang F, Wang W. Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma. *Reprod Sci* 2015;22:1429-1435.

63. Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, Mosimann B, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors. *Fetal Diagn Ther* 2012;31:237-243.

64. Livergood MC, LeChien KA, Trudell AS. Obesity and cell-free DNA «no calls»: is there an optimal gestational age at time of sampling? *Am J Obstet Gynecol* 2017;216:413.e1-413.e9.

65. Xu XP, Gan HY, Li FX, Tian Q, Zhang J, Liang RL, Li M, Yang XX, Wu YS. A Method to Quantify Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma Using Next Generation Sequencing: Its Application in Non-Invasive Prenatal Chromosomal Aneuploidy Detection. *PLoS One* 2016;11:e0146997.

66. Kang X, Xia J, Wang Y, Xu H, Jiang H, Xie W, Chen F, Zeng P, Li X, Xie Y, Liu H, Huang G, Chen D, Liu P, Jiang H, Zhang X. An Advanced Model to Precisely Estimate the Cell-Free Fetal DNA Concentration in Maternal Plasma. *PLoS One* 2016;11:e0161928.

67. Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F, Mariano M, Polverari A, Duca S, Sessa M, Baldi M, Diano L, Spinella F. The importance of determining the limit of detection of non invasive prenatal testing methods. *Prenat Diagn* 2016;36:304-311.

68. Yaron Y. The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon. *Prenat Diagn* 2016;36:391-396.

69. Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem* 2014;60:243-250.

70. Revello R, Sarno L, Ispas A, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;47:698-704.

71. Dobson L, Reiff E, Little S, Wilkins-Haug L, Bromley B. Patient Choice and Clinical Outcomes Following Positive Noninvasive Prenatal Screening for Aneuploidy with Cell-free DNA (cfDNA). *Prenat Diagn* 2016;36:456-462.

72. Salomon LJ, Alfirevic Z, Audibert F, Kagan KO, Paladini D, Yeo G, Raine-Fenning N, for the 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.

73. Oneda B, Steindl K, Masood R, Reshetnikova I, Krejci P, Baldinger R, Reissmann R, Taralczak M, Guetg A, Wissner J, Fauchère JC, Rauch A. Noninvasive prenatal testing: more caution in counseling is needed in high risk pregnancies with ultrasound abnormalities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016;200:72-75.

74. 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, Radowski W, Solter M, Tranebaerg L, van El CG, Cornel MC, European Society of Human Genetics, American Society of Human Genetics. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet* 2015;23:1438-1450.

75. Lewis C, Hill M, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis for single gene disorders: experience of patients. *Clin Genet* 2014;85:336-342.

76. van Schendel RV, Page-Christiaens GC, Beulen L, Bilardo CM, de Boer MA, Coumans AB, Fass BH, van Langen IM, Lichtenbelt KD, van Maarle . Trial by Dutch laboratories for evaluation of non-invasive prenatal testing. Part II-women's perspectives. *Prenat Diagn* 2016;36:1091-1098.

77. Tiller GE, Kershberg HB, Goff J, Coffeen C, Liao W, Sehnert AJ. Women's views and the impact of noninvasive prenatal testing on procedures in a managed care setting. *Prenat Diagn* 2015;35:428-433.

78. Wax JR, Cartin A, Chard R, Lucas FL, Pinette MG. Noninvasive prenatal testing: impact on genetic counseling, invasive prenatal diagnosis, and trisomy 21 detection. *J Clin Ultrasound* 2015;43:1-6.

79. Larion S, Warsof SL, Romary L, Mlynarczyk M, Peleg D, Abuhamad AZ. Uptake of noninvasive prenatal testing at a large academic referral center. *Am J Obstet Gynecol* 2014;211:651.e1-7.

80. Margioulas-Siarkou C, Karkanaki A, Kalogiannidis I, Petousis S, Dagklis T, Mavromatidis G et al. Operator experience reduces the risk of second trimester amniocentesis-related adverse outcomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;169:230-233.

81. Rose NC, Eller AG. The impact of noninvasive fetal evaluation: its effect on education, training, and the maintenance of clinical competence in prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2014;26:117-123.

82. Norton ME, Biggio JR, Kuller JA, Blackwell SC. The role of ultrasound in women who undergo cell-free DNA screening. *Am J Obstet Gynecol* 2017;216:B2-b7.

83. Mardy A, Wapner RJ. Confined placental mosaicism and its impact on confirmation of NIPT results. *Am J Med Genet C Semin*

Med Genet 2016;172:118-122.

84. Wang T, He Q, Li H, Ding J, Wen P, Zhang Q, Xiang J, Li Q, Xuan L, Kong L, Mao Y, Zhu Y, Shen J, Liang B, Li H. An Optimized Method for Accurate Fetal Sex Prediction and Sex Chromosome Aneuploidy Detection in Non-Invasive Prenatal Testing. *PLoS One* 2016;11:e0159648.

85. Strom CM, Anderson B, Tsao D, Zhang K, Liu Y, Livingston K, Elzinga C, Evans M, Nguyen Q, Wolfson D, Rowland C, Kolacki P, Maxwell M, Wang JC, Rabin D, Catanese J, Owen R, Braastad C, Sun W. Improving the Positive Predictive Value of Non-Invasive Prenatal Screening (NIPS). *PLoS One* 2017;12:e0167130.

86. Yu SC, Jiang P, Chan KC, Faas BH, Choy KW, Leung WC, Leung TY, Lo YM, Chiu RW. Combined Count- and Size-Based Analysis of Maternal Plasma DNA for Noninvasive Prenatal Detection of Fetal Subchromosomal Aberrations Facilitates Elucidation of the Fetal and/or Maternal Origin of the Aberrations. *Clin Chem* 2017;63:495-502.

87. Fan HC, Quake SR. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal Chem* 2007;79:7576-7579.

88. Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13116-13121.

89. Seung Yong L, and Seung Yong H. Application of digital polymerase chain reaction technology for noninvasive prenatal test. *Journal of Genetic Medicine* 2015;12:72-78.

90. Orhant L, Anselm O, Fradin M, Becker PH, Beugnet C, Deburggrave N, Tafuri G, Letourneur F, Goffinet F, Allach El Khattabi L, Leturcg F, Bienvenu T, Tsatsaris V, Nectoux J. Droplet Digital PCR combined with minisequencing, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia. *Prenat Diagn* 2016;36:397-406.

91. Svobodova I, Pazourkova E, Horinek A, Novotna M, Calda P, Korabecna M. Performance of Droplet Digital PCR in Non-Invasive Fetal RHD Genotyping - Comparison with a Routine Real-Time PCR Based Approach. *PLoS One* 2015;10:e0142572.

92. El Khattabi LA, Rouillac-Le Scieillour C, Le Tessier D, Luscian A, Coustier A, Porcher R, Bhourri R, Nectoux J, Sérazin V, Quibel T, Mandelbrot L, Tsatsaris V, Vialard F, Dupont JM. Could Digital PCR Be an Alternative as a Non-Invasive Prenatal Test for Trisomy 21: A Proof of Concept Study. *PLoS One* 2016;11:e0155009.

93. Yin AH, Peng CF, Zhao X, Caughey BA, Yang JX, Liu J, Huang WW, Liu C, Luo DH, Liu HL, Chen YY, Wu J, Hou R, Zhang M, Ai M, Zheng L, Xue RQ, Mai MQ, Guo FF, Wang DM, Krawczyk M, Zhang D, Wang YN, Huang QF, Karin M, Zhang K. Noninvasive detection of fetal subchromosomal abnormalities by semiconductor sequencing of maternal plasma DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:14670-14675.

94. Lo KK, Karampetsou E, Boustred C, McKay F, Mason S, Hill M, Plagnol V, Chitty LS. Limited Clinical Utility of Non-invasive Prenatal Testing for Subchromosomal Abnormalities. *Am J Hum Genet* 2016;98:34-44.

95. Wapner RJ, Babiarez JE, Levy B, Stosic M, Zimmermann B, Sigurjonsson S, Wayham N, Ryan A, Banjevic M, Lacroute P, Hu J, Hall MP, Demko Z, Siddiqui A, Rabinowitz M, Gross SJ, Hill M, Benn P. Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212:332.e1-9.

96. Gross SJ, Ryan A, Benn P. Noninvasive prenatal testing for 22q11.2 deletion syndrome: deeper sequencing increases the positive predictive value. *Am J Obstet Gynecol* 2015;213:254-255.

97. Neofytou MC, Tsangaras K, Kypri E, Loizides C, Ioannides M, Achilleos A et al. Targeted capture enrichment assay for non-invasive prenatal testing of large and small size sub-chromosomal deletions and duplications. *PLoS One* 2017;12:e0171319.

98. Vora NL, O'Brien BM. Noninvasive prenatal testing for microdeletion syndromes and expanded trisomies: proceed with caution. *Obstet Gynecol* 2014;123:1097-1099.

99. Valderramos SG, Rao RR, Scibetta EW, Silverman NS, Han CS, Platt LD. Cell-free DNA screening in clinical practice: abnormal autosomal aneuploidy and microdeletion results. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215:626.e1-e10.

100. Bunnell M, Zhang C, Lee C, Bianchi DW, Wilkins-Haug L. Confined Placental Mosaicism for 22q11.2 Deletion as the Etiology for Discordant Positive NIPT Results. *Prenat Diagn* 2017;37:416-419

101. Hillman SC, Skelton J, Quinlan-Jones E, Wilson A, Kilby MD. «If it helps...» the use of microarray technology in prenatal testing: patient and partners reflections. *Am J Med Genet A* 2013;161a:1619-1627.

102. SMFM. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Publications Committee #36: Prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212:711-716.

103. RCOG. Non-invasive prenatal testing for chromosomal abnormality using maternal plasma DNA. RCOG Scientific Impact Paper No 15 2014.

104. Lewis C, Hill M, Chitty LS. Women's Experiences and Preferences for Service Delivery of Non-Invasive Prenatal Testing for Aneuploidy in a Public Health Setting: A Mixed Methods Study. *PLoS One* 2016;11:e0153147.

105. Chan YM, Leung WC, Chan WP, Leung TY, Cheng YK, Sahota DS. Women's uptake of non-invasive DNA testing following a high-risk screening test for trisomy 21 within a publicly funded healthcare system: findings from a retrospective review. *Prenat Diagn* 2015;35:342-347.

106. Chetty S, Garabedian MJ, Norton ME. Uptake of noninvasive prenatal testing (NIPT) in women following positive aneuploidy screening. *Prenat Diagn* 2013;33:542-546.

107. Sachs A, Blanchard L, Buchanan A, Norwitz E, Bianchi DW. Recommended pre-test counseling points for noninvasive prenatal testing using cell-free DNA: a 2015 perspective. *Prenat Diagn* 2015;35:968-971.

108. Gammon BL, Kraft SA, Michie M, Allyse M. «I think we've got too many tests!»: Prenatal providers' reflections on ethical and clinical challenges in the practice integration of cell-free DNA screening. *Ethics Med Public Health* 2016;2:334-342.

109. Giles ME, Murphy L, Krstic N, Sullivan C, Hashmi SS, Stevens B. Prenatal cfDNA screening results indicative of maternal neoplasm: survey of current practice and management needs. *Prenat Diagn* 2017;37:126-132.

110. Fonda Allen J, Stoll K, Bernhardt BA. Pre- and post-test genetic counseling for chromosomal and Mendelian disorders. *Semin Perinatol* 2016;40:44-55.

111. Silcock C, Liao LM, Hill M, Chitty LS. Will the introduction of non-invasive prenatal testing for Down's syndrome undermine informed choice? *Health Expect* 2015;18:1658-1671.

112. Hill M, Lewis C, Chitty LS. Stakeholder attitudes and needs regarding cell-free fetal DNA testing. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2016;28:125-131.

113. Lewis C, Hill M, Skirton H, Chitty LS. Development and validation of a measure of informed choice for women undergoing non-invasive prenatal testing for aneuploidy. *Eur J Hum Genet* 2015.

114. Wittman AT, Hashmi SS, Mendez-Figueroa H, Nassef S, Stevens B, Singletary CN. Patient Perception of Negative Noninvasive Prenatal Testing Results. *AJP Rep* 2016;6:e391-e406.

115. Chandrasekharan S, Minear MA, Hung A, Allyse M. Non-invasive prenatal testing goes global. *Sci Transl Med* 2014;6:231fs15.

116. Platt LD, Janicki MB, Prosen T, Goldberg JD, Adashek J, Figueroa R, Rodis J, Liao W, Sehnert AJ, Snyder HL, Warsof SL. Impact of noninvasive prenatal testing in regionally dispersed medical centers in the United States. *Am J Obstet Gynecol* 2014;211:368.e1-7.

117. Pergament D, Ilijic K. The Legal Past, Present and Future of Prenatal Genetic Testing: Professional Liability and Other Legal Challenges Affecting Patient Access to Services. *J Clin Med* 2014;3:1437-1465.

118. Rolfes V, Schmitz D. Unfair discrimination in prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016;198:27-29.

119. de Jong A, Maya I, van Lith JM. Prenatal screening: current practice, new developments, ethical challenges. *Bioethics* 2015;29:1-8.

120. van Schendel RV, Kater-Kuipers A, van Vliet-Lachotzki EH, Dondorp WJ, Cornel MC, Henneman L. What Do Parents of Children with Down Syndrome Think about Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT)? *J Genet Couns* 2017;26:522-531.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Carolina Vaz-de-Macedo
Hospital Garcia de Orta, E.PE.
Serviço de Ginecologia-Obstetria
Av. Torrado da Silva
2805-267 Almada, Portugal
E-Mail: carolina.macedo@hgo.min-saude.pt

RECEBIDO EM: 17/03/2017

ACEITE PARA PUBLICAÇÃO: 25/06/2017