

ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ**Non Invasive Prenatal Testing (NIPT) 2023****ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος (Non Invasive Prenatal Testing NIPT ή Non Invasive Prenatal Screening NIPS) είναι μια μέθοδος προληπτικού ελέγχου για την ανίχνευση πιθανών γενετικών ανωμαλιών του εμβρύου σε ελεύθερο DNA (cfDNA) στη μητρική κυκλοφορία. Το NIPT αναλύει υπολειμματικές ποσότητες cfDNA που κυκλοφορεί στο αίμα της μητέρας το οποίο αποτελείται, τόσο από μητρικά όσο και από εμβρυϊκά συστατικά [1]. Το NIPT έχει πλέον υιοθετηθεί ευρέως στην κλινική πράξη καθώς δεν ενέχει κανέναν κίνδυνο για την εγκυμοσύνη σε σύγκριση με τις παραδοσιακές επεμβατικές μεθόδους που συνεπάγονται μέτριο αλλά σημαντικό κίνδυνο αποβολής περίπου 0,1–2% [2]. Επιπλέον, η ακρίβειά του είναι βελτιωμένη σε σύγκριση με άλλες μη επεμβατικές προσεγγίσεις προσυμπτωματικού ελέγχου, όπως η μέτρηση βιοχημικών δεικτών ορού της μητέρας σε συνδυασμό με υπερηχογραφικούς δείκτες του εμβρύου. Το NIPT έχει εγκριθεί από επαγγελματικούς φορείς και οργανισμούς ως κύρια μέθοδος προσυμπτωματικού ελέγχου, ανεξάρτητα από την κατάσταση κινδύνου εγκυμοσύνης [3] και υιοθετείται ταχέως ως η πρώτη επιλογή για τον προσυμπτωματικό έλεγχο των τρισωμιών 13, 18, 21. Μια σειρά από τεστ NIPT με βάση ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος που χρησιμοποιούν την Αλληλουχία Επόμενης Γενιάς (NGS) έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόσει στην κλινική πράξη [4-8]. Με περαιτέρω τεχνικές εξελίξεις ο έλεγχος επεκτείνεται και σε άλλες γενετικές καταστάσεις όπως ανωμαλίες χρωμοσωμάτων φύλου (SCAs), σπάνιες αυτοσωματικές τρισωμίες (RATs), μικροελλείμματα/μικροδιπλασιασμοί, δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες και μονογονιδιακές ασθένειες.

Στο κείμενο το οποίο ακολουθεί περιγράφονται οι συστάσεις και κατευθυντήριες οδηγίες των διεθνώς αναγνωρισμένων επαγγελματικών φορέων για το NIPT και με βάση αυτές ακολουθούν περιληπτικά οι συστάσεις και κατευθυντήριες οδηγίες του Συνδέσμου Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδος (Σ.Ι.Γ.Ε.).

Γενικές Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–7.

2. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic vil-lus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:16–26.
3. Screening for fetal chromosomal abnormalities: ACOG practice bul-letin summary, number 226. *Obstet Gynecol.* 2020;136: 859–67.
4. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, et al. 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;105:20458–63.
5. Chitkara U, Hudgins L, Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun se-quencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16266–71.
6. Koumbaris G, Kypri E, Tsangaras K, Achilleos A, Mina P, Neofytou M, et al. Cell-Free DNA analysis of targeted genomic regions in ma-ternal plasma for non-invasive prenatal testing of trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13, and fetal sex. *Clin Chem* 2016; 62:848–55.
7. Stokowski R, Wang E, White K, Batey A, Jacobsson B, Brar H, et al. Clinical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies. *Prenat Diagn* 2015;35: 1243–6.
8. Benn P, Cuckle H. Theoretical performance of non-invasive prenatal testing for chromosome imbalances using counting of cell-free DNA frag-ments in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2014; 34:778–83

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΑΙ ΔΗΛΩΣΕΙΣ ΘΕΣΕΩΝ ΑΠΟ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

ACMG (American College of Medical Genetics) 2022

ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ

Ισχυρή σύσταση για NIPT (NIPS) screening λόγω καλύτερης απόδοσης ως διαδικασία σε:

- Όλες τις έγκυες με μονήρη κύηση για έλεγχο Τρισωμιών Αυτοσωμάτων του εμβρύου
- Σε δίδυμες κυήσεις για τις συχνότερες Τρισωμίες
- Σε μονήρεις κυήσεις έλεγχος Ανευπλοειδιών του Φύλου
- Σε όλες τις κυήσεις NIPS για 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome)

- Δεν δύνανται να συστήσει NIPS για RATs (Rare Autosomal Trisomies) λόγω ανεπαρκών δεδομένων από κλινικές μελέτες.
- Δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την ευαισθησία ή την ειδικότητα του NIPS στην αναγνώριση μητρικών νεοπλασμάτων. Επιπλέον, δεν υπάρχουν επικυρωμένες κλινικές προσεγγίσεις για την αξιολόγηση ατόμων που βρέθηκαν να έχουν αποτέλεσμα NIPS που υποδηλώνει νεοπλασματική νόσο, αν και ορισμένα κέντρα έχουν προτείνει πρωτόκολλα. Η στοιχειοθετημένη συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν βρήκε μελέτες που επιτρέπουν τον προσδιορισμό των καλύτερων μεθόδων αξιολόγησης για ασθενείς με τέτοια αποτελέσματα.

ACOG (American College of Obstetrics and Gynecology) & SMFM (Society for Maternal Fetal Medicine) 2020

ΔΗΛΩΣΗ

Το NIPT αποτελεί την πλέον ευαίσθητη και ειδική screening εξέταση για τις συχνότερες ανευλοειδίες του εμβρύου (T21, T18, T13)

ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ

Οι παρακάτω συστάσεις και συμπεράσματα βασίζονται σε ορθή και αξιόπιστη επιστημονική τεκμηρίωση (Επίπεδο A)

- Το προγεννητικό γενετικό screening (βιοχημικό με ή χωρίς μέτρηση αυχενικής διαφάνειας NT -ή το screening με ελεύθερο εμβρυϊκό DNA) και η επεμβατική προγεννητική διάγνωση (CVS ή αμνιακό υγρό) πρέπει να συζητηθούν με το ζευγάρι ως επιλογές και να προσφέρονται **σε όλες τις εγκύους**, ανεξαρτήτως ηλικίας ή κινδύνου για χρωμοσωματικές ανωμαλίες.
- Στο no-call αποτέλεσμα συστήνεται διαγνωστικός προγεννητικός έλεγχος.
- Εάν ο έλεγχος γίνει αποδεκτός, στις εγκύους θα πρέπει να προσφέρεται μία μόνον προσέγγιση προγεννητικού ελέγχου και να μην εκτελούνται πολλαπλές εξετάσεις ελέγχου screening ταυτόχρονα.
- Σε όλες τις εγκύους θα πρέπει να προσφέρεται υπερηχογράφημα δεύτερου τριμήνου για ανατομικές ανωμαλίες του εμβρύου, καθώς αυτές είναι δυνατό να εμφανιστούν με ή χωρίς εμβρυϊκή ανευλοειδία. Ιδανικά, αυτό πραγματοποιείται μεταξύ 18 και 22 εβδομάδων κύησης (με ή χωρίς άλφα-εμβρυϊκή πρωτεΐνη μητρικού ορού δεύτερου τριμήνου).

- Έγκυοι με θετικό αποτέλεσμα στο NIPT για ανευλοειδία του εμβρύου θα πρέπει να πάρουν γενετική συμβουλευτική και θα πρέπει να ακολουθήσει ολοκληρωμένη υπερηχογραφική αξιολόγηση με δυνατότητα διαγνωστικού ελέγχου για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.
- Οι έγκυοι με αρνητικό αποτέλεσμα στο NIPT θα πρέπει να είναι έχουν επίγνωση ότι αυτό μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο των στοχευμένων ανευλοειδίων που εξετάζονται, αλλά δεν εξασφαλίζει ότι το έμβρυο δεν πάσχει. Η πιθανότητα το έμβρυο να πάσχει από γενετικές διαταραχές που δεν αξιολογούνται από την εξέταση θα πρέπει να επικοινωνηθεί. Ακόμη και στην περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος η έγκυος μπορεί να επιλέξει να προβεί σε διαγνωστικές εξετάσεις αργότερα στην εγκυμοσύνη, ιδιαίτερα εάν παρουσιασθούν υπερηχογραφικά ευρήματα.
- Στις περιπτώσεις όπου δεν εκδίδεται αποτέλεσμα από το εργαστήριο ή τα αποτελέσματα δεν μπορούν να ερμηνευτούν (no-call) θα πρέπει να ενημερώνεται η έγκυος ότι η αποτυχία της δοκιμής σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανευλοειδίας του εμβρύου να λάβει περαιτέρω γενετική συμβουλευτική και να ακολουθήσει ολοκληρωμένη υπερηχογραφική αξιολόγηση και διαγνωστικός έλεγχος.
- Εάν ανιχνευθεί αυξημένη αυχενική διαφάνεια ή ανωμαλία κατά την υπερηχογραφική εξέταση, θα πρέπει να προσφέρεται γενετική συμβουλευτική και διαγνωστικός έλεγχος για γενετικές παθήσεις, καθώς και ολοκληρωμένη υπερηχογραφική αξιολόγηση που περιλαμβάνει λεπτομερές υπερηχογράφημα στις 18-22 εβδομάδες κύησης για την αξιολόγηση δομικών ανωμαλιών.

Οι παρακάτω συστάσεις και συμπεράσματα βασίζονται σε περιορισμένη ή ανεπαρκή επιστημονική τεκμηρίωση (Επίπεδο Β)

- Η χρήση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA σε εγκύους με αποτελέσματα αυξημένου κινδύνου στον βιοχημικό έλεγχο πρώτου τριμήνου αποτελεί μια επιλογή για εγκύους που επιθυμούν να αποφύγουν το διαγνωστικό έλεγχο. Ωστόσο, οι έγκυοι θα πρέπει να ενημερώνονται ότι η προσέγγιση αυτή μπορεί να καθυστερήσει την οριστική διάγνωση και θα αποτύχει να εντοπίσει κάποια έμβρυα με χρωμοσωματικές ανωμαλίες.
- Σε κλινικές περιπτώσεις ενός απομονωμένου υπερηχογραφικού δείκτη (soft marker) όπως υπερηχογενούς καρδιακής εστίας, κύστεων χοριοειδούς πλέγματος, πυελεκτασίας, βραχέος

βραχιονίου ή μηριαίου οστού) όπου δεν έχει πραγματοποιηθεί προ-συμπτωματικός έλεγχος (screening) για ανευπλοειδίες του εμβρύου, η έγκυος θα πρέπει να ενημερώνεται σχετικά με τον κίνδυνο ανευπλοειδίας που σχετίζεται με το υπερηχογραφικό εύρημα και τη δυνατότητα πραγματοποίησης εξέταση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA, τετραπλού βιοχημικού ελέγχου ή αμνιοπαρακέντησης. Εάν πραγματοποιηθεί έλεγχος ανευπλοειδίας και ο κίνδυνος είναι χαμηλός, τότε δεν υπάρχει περαιτέρω ανάγκη υπολογισμού κινδύνου. Εάν παρατηρηθούν περισσότεροι από ένας υπερηχογραφικούς δείκτες, είναι απαραίτητη η γενετική συμβουλευτική, η συμβουλευτική από εξειδικευμένο ιατρό στην εμβρυομητρική, ή και τα δύο.

- Δεν υπάρχει μέθοδος ελέγχου ανευπλοειδίας σε δείγμα ορού που είναι τόσο ακριβής σε δίδυμες κυήσεις, όσο σε μονήρεις κυήσεις. Η πληροφορία αυτή πρέπει να δίνεται στο πλαίσιο της συμβουλευτικής πριν οποιοδήποτε έλεγχο σε πολύδυμες κυήσεις.
- Ο έλεγχος με ελεύθερο DNA είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί σε δίδυμες κυήσεις. Συνολικά, η απόδοση του προσυμπτωματικού ελέγχου για τρισωμία 21 με ελεύθερο DNA σε δίδυμες κυήσεις είναι ενθαρρυντική, αλλά ο συνολικός αριθμός των περιπτώσεων που έχει αναφερθεί να πάσχουν είναι μικρός. Δεδομένου του μικρού αριθμού πασχόντων είναι δύσκολο να προσδιοριστεί και το ακριβές ποσοστό ανίχνευσης για τρισωμία 18 και 13.
- Επειδή ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος δεν είναι ακριβής, ο προγεννητικός έλεγχος και η προγεννητική διάγνωση θα πρέπει να προσφέρονται σε όλες τις εγκύους ανεξάρτητα από τον προηγούμενο προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο.

Οι ακόλουθες συστάσεις και συμπεράσματα βασίζονται κυρίως στη συναίνεση και τη γνώμη εμπειρογνομόνων (Επίπεδο Γ):

- Η χρήση πολλαπλών προσεγγίσεων ελέγχου σε ορό που εκτελούνται ανεξάρτητα στην ίδια κύηση (π.χ., βιοχημικός έλεγχος πρώτου τριμήνου που ακολουθείται και από βιοχημικό έλεγχο με τετραπλό τεστ) δεν συνιστάται, επειδή οδηγεί σε απαράδεκτα υψηλό ποσοστό θετικών ελέγχων και αντιφατική εκτίμηση κινδύνου.
- Στις πολύδυμες κυήσεις, σε περίπτωση εμβρυϊκού θανάτου ενός εμβρύου, εξαφανισθέντος δίδυμου, ή ανωμαλίας που εντοπίζεται σε ένα έμβρυο, υπάρχει σημαντικός κίνδυνος ανακριβούς αποτελέσματος υπολογισμού κινδύνου για ανευπλοειδίες κατά τον βιοχημικό έλεγχο σε ορό ή ελέγχου με ελεύθερο DNA. Αυτές οι πληροφορίες θα πρέπει να συζητούνται

με τον ασθενή και θα πρέπει να προσφέρεται διαγνωστικός έλεγχος.

- Σε κυήσεις με ασυνήθιστες ή πολλαπλές ανευπλοειδίες κατά τον έλεγχο με ελεύθερο DNA θα πρέπει να παραπέμπονται για γενετική συμβουλευτική και συμβουλή από εξειδικευμένο ιατρό στην εμβρυομητρική.

ISPD (International society of Prenatal Diagnosis) 2023

ΔΗΛΩΣΗ

Το NIPT είναι την πλέον ακριβή εξέταση screening για τις συχνότερες αυτοσωματικές ανευπλοειδίες (τρισωμίες 21, 13 και 18) σε μονήρεις κυήσεις στον γενικό πληθυσμό και σε κυήσεις με αυξημένο κίνδυνο στον συμβατικό προγεννητικό έλεγχο.

ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ

1. Στο NIPT υπάρχουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, η ISPD συνιστά ανεπιφύλακτα σε όλες τις εγκύους με αυξημένο κίνδυνο στα αποτελέσματα NIPT να παρέχεται γενετική συμβουλευτική και διαγνωστικός έλεγχος εάν σκέφτονται να διακόψουν την εγκυμοσύνη.
2. Το εμβρυϊκό κλάσμα αποτελεί μια σημαντική μέτρηση ποιοτικού ελέγχου, αλλά υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ εργαστηρίων και μεθοδολογιών δοκιμών. Τα εργαστήρια θα πρέπει να πραγματοποιούν τη δική τους εσωτερική επικύρωση του ορίου ανίχνευσης και του ορίου για τα αποτελέσματα «no call».
3. Οι πάροχοι (εργαστήρια και κλινικοί γιατροί) θα πρέπει να έχουν καθιερώσει τρόπους για τη διαχείριση ασθενών με αποτέλεσμα «no call» αποτέλεσμα. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει λεπτομερή υπερηχογράφημα, προσφορά επανάληψης NIPT, εναλλακτική εξέταση προσυμπτωματικού ελέγχου ή/και διαγνωστική εξέταση.
4. Εάν είναι τεχνικά εφικτό, τα εργαστήρια θα πρέπει να αναπτύσσουν πρωτόκολλα για τον εντοπισμό και την αποκάλυψη ύποπτης κακοήθειας.
5. Το NIPT για τις συχνότερες αυτοσωματικές ανευπλοειδίες αποδίδει αρκετά καλά ώστε να προσφέρεται στον προσυμπτωματικό προγεννητικό έλεγχο στο πλαίσιο των υπάρχοντων προσεγγίσεων (primary or contingent screening).
6. Το συμβούλιο του ISPD αναγνωρίζει ότι οι ειδικές εκτιμήσεις στο πλαίσιο των πολιτικών για την υγεία επηρεάζουν τις αποφάσεις και τα μοντέλα εφαρμογής.

7. Το NIPT για SCA (Sex Chromosomal Abnormalities, ανευπλοειδίες φύλου) είναι επαρκώς ακριβές ώστε να προσφέρεται παράλληλα με τον έλεγχο αυτοσωματικών ανευπλοειδίων με ειδική συμβουλευτική και συγκατάθεση πριν από την εξέταση.
8. Ωστόσο, άλλοι κοινωνικοί, οικονομικοί, πολιτιστικοί και ηθικοί παράγοντες μπορεί να χρειαστεί να ληφθούν υπόψη στις αποφάσεις πολιτικής υγείας σχετικά με τον πληθυσμιακό προσυμπτωματικό έλεγχο για SCA. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αξιολόγηση των επιπτώσεων της προσφοράς NIPT για παθήσεις χρωμοσωμάτων φύλου.
9. Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την αξιολόγηση της απόδοσης και της κλινικής χρησιμότητας του NIPT ρουτίνας για RATs (Rare Autosomal Trisomies). Επομένως, το NIPT για RATs δεν συνιστάται σε μη επιλεγμένους πληθυσμούς.
10. Όπου διενεργείται έλεγχος για RATs, η διαχείριση μετά από ένα αποτέλεσμα υψηλού κινδύνου απαιτείται συμβουλή ειδικών και εξειδικευμένη διαχείριση.
11. Λόγω της μεγάλης πιθανότητας ένα θετικό αποτέλεσμα NIPT για ένα RAT να υποκρύπτει CPM, η αμνιοπαρακέντηση είναι η μοναδική και πιο κατατοπιστική εξέταση για τον εμβρυϊκό καρυότυπο.
12. Εάν στο NIPT υπάρχει ένα αποτέλεσμα υψηλού κινδύνου για τρισωμία χρωμοσώματος που υπόκειται σε γενωμική αποτύπωση (imprinting), συνιστάται αμνιοπαρακέντηση με κατάλληλες μελέτες για την ανίχνευση UPD. 14. Απαιτούνται περαιτέρω προοπτικές μελέτες για την αξιολόγηση όλων των πτυχών του NIPT για RATs.
13. Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την αξιολόγηση της απόδοσης και της κλινικής χρησιμότητας του NIPT ρουτίνας για υπομικροσκοπικές χρωμοσωματικές ανισοζυγίες. Έως ότου τα δεδομένα αποτελέσματος είναι ξεκάθαρα και αποδειχθεί ότι μπορούν να αναπαραχθούν, το NIPT για υπομικροσκοπικές χρωμοσωματικές ανισοζυγίες δεν συνιστάται για τη συνήθη φροντίδα μη επιλεγμένων πληθυσμών.
14. Όπου διενεργείται έλεγχος για υπομικροσκοπικές χρωμοσωματικές ανισοζυγίες, η διαχείριση μετά από ένα αποτέλεσμα υψηλού κινδύνου απαιτεί συμβουλευτική μετά την εξέταση και εξειδικευμένη διαχείριση.
15. Το NIPT σε όλο το γονιδίωμα που περιλαμβάνει υπομικροσκοπικές χρωμοσωματικές ανισοζυγίες δεν θα πρέπει να θεωρείται ολοκληρωμένη εξέταση για όλα τα παθογόνα CNV, καθώς πολλά παθογόνα CNV είναι κάτω από τα όρια ανάλυσης του NIPT σε όλο το γονιδίωμα.
16. Απαιτούνται περαιτέρω προοπτικές μελέτες για την αξιολόγηση όλων των πτυχών του NIPT για υπομικροσκοπικές χρωμοσωματικές ανισοζυγίες.

17. Το σύνδρομο ελλείμματος 22q11.2 αποτελεί το πιο κοινό σύνδρομο μικροελλειμμάτων. Μόνο μία μελέτη έχει αξιολογήσει τον έλεγχο βάσει cfDNA για το σύνδρομο 22q11.2 με γενετική επιβεβαίωση όλων των συμμετεχόντων. Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την αξιολόγηση της απόδοσης και της κλινικής χρησιμότητας του NIPT ρουτίνας για μαζικό screening. Επομένως, το NIPT δεν συνιστάται για τη συνήθη φροντίδα μη επιλεγμένων πληθυσμών
18. Όπου διενεργείται έλεγχος για μαζικό screening, η διαχείριση μετά από ένα αποτέλεσμα υψηλού κινδύνου απαιτεί συμβουλή ειδικών και εξειδικευμένη διαχείριση.
19. Απαιτούνται περαιτέρω προοπτικές μελέτες για την αξιολόγηση όλων των πτυχών του μαζικού ελέγχου screening με cfDNA.
20. Θα πρέπει να προσφέρεται τουλάχιστον ένα πρώιμο υπερηχογράφημα πρώιμου πρώτου τριμήνου για χρονολόγηση, διάγνωση πολύδυμης κύησης και επιβεβαίωση της βιωσιμότητας του εμβρύου πριν από τη διενέργεια NIPT.
21. Στα άτομα που επιλέγουν το NIPT ως κύρια προσέγγιση screening, θα πρέπει να προσφέρεται υπερηχογράφημα 11-13 εβδομάδων εφόσον το επιτρέπουν οι συνθήκες.
22. Σε έμβρυο με ανωμαλίες στους υπερήχους, συμπεριλαμβανομένης της μέτρησης NT $\geq 3,5$ mm, θα πρέπει να προσφέρεται διαγνωστικός έλεγχος και αξιολόγηση με χρωμοσωματικές μικροσυστοιχίες, ανεξάρτητα από το προηγούμενο αποτέλεσμα NIPT. Δεν υπάρχει συναίνεση σχετικά με τη χρήση εναλλακτικών ορίων NT (όπως 3,0 mm ή 99ο εκατοστημόριο) για τον καθορισμό του πληθυσμού στον οποίο θα πρέπει να προσφέρεται διαγνωστική εξέταση. Το NIPT είναι το πιο ακριβές τεστ προσυμπτωματικού ελέγχου για τις κοινές αυτοσωματικές ανευπλοειδίες (τρισωμίες 21, 13 και 18) σε μη επιλεγμένους πληθυσμούς με μονήρη κύηση και σε αυτούς με ήδη γνωστό αυξημένο κίνδυνο. Μπορεί να προσφερθεί σε μοντέλα πρωτογενούς ή συνδυαστικού προσυμπτωματικού ελέγχου με συγκεκριμένες εκτιμήσεις λαμβάνοντας υπόψη το πλαίσιο των τοπικών πολιτικής υγείας που επηρεάζουν τις αποφάσεις και τα μοντέλα εφαρμογής.

ΕΙΔΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ

ΕΜΒΡΥΪΚΟ ΚΛΑΣΜΑ (FF: Fetal Fraction)

ACOG, ACMG, ISPD, SFMF

Εμβρυϊκό κλάσμα

- Αναλογία cfDNA εμβρύου στη μητρική κυκλοφορία
- Κορυφώνεται (10-20%) μεταξύ 10-21 εβδομάδων κύησης
- Η ακριβής αξιολόγηση FF εξασφαλίζει επαρκείς ποσότητες cffDNA για αξιόπιστα αποτελέσματα
- Αυξημένος κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων αν δεν υπολογίζεται ορθά

Βιολογικοί μητρικοί και εμβρυϊκοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν το FF

- Μητρικό βάρος, εθνικότητα, μη φυσιολογικός πλακούντας (π.χ. προεκλαμψία)
- Ηλικία κύησης, πολύδυμη κύηση, αποβολή ενός διδύμου, ανευπλοειδία, IUGR

Οι κατευθυντήριες γραμμές τονίζουν:

- Τη σημασία του FF και τον ρόλο των εργαστηριακών διαδικασιών και της βιοπληροφορικής στη σωστή μέτρηση του FF για αξιόπιστα αποτελέσματα
- Ο αξιόπιστος έλεγχος με ελεύθερο DNA χωρίς κύτταρα απαιτεί ελάχιστο FF, που συνήθως υπολογίζεται σε περίπου 2-4%» (ACOG, 2020)
- Όλα τα εργαστήρια θα πρέπει να περιλαμβάνουν ένα ευδιάκριτο FF στις αναφορές NIPS (ACMG 2016)
- Το κατώτερο όριο του cffDNA για αξιόπιστο αποτέλεσμα είναι περίπου 4%» (ACMG 2016)

ΔΙΔΥΜΕΣ και ΠΟΛΥΔΥΜΕΣ ΚΥΗΣΕΙΣ ISPD 2021

1. Η χρήση του ελέγχου cfDNA πρώτου τριμήνου για τις κοινές αυτοσωματικές τρισωμίες είναι κατάλληλη για δίδυμες κυήσεις λόγω επαρκών στοιχείων που δείχνουν υψηλή ανιχνευσιμότητα και χαμηλά ψευδώς θετικά ποσοστά με υψηλή προγνωστική αξία. Μέτρια σύσταση.
2. Η διαπίστωση αυξημένου κινδύνου σε ένα τεστ προσυμπτωματικού ελέγχου cfDNA σε πολύδυμες κυήσεις θα πρέπει να ακολουθείται από συμβουλευτική και προσφορά διαγνωστικών εξετάσεων για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ισχυρή σύσταση.
3. Είναι προτιμότερο τα εργαστήρια που εκτελούν εξετάσεις cfDNA σε πολυεμβρυϊκές κυήσεις να λαμβάνουν υπόψη τη ζυγωτικότητα (π.χ. χοριονικότητα, φύλο εμβρύων, ιστορικό εμ-

βρυομεταφοράς) για την ορθή ερμηνεία, τόσο των αποτελεσμάτων των εξετάσεων, όσο και των εμβρυϊκών κλασμάτων. Μέτρια σύσταση.

4. Όταν η εξέταση cfDNA αποτυγχάνει, συστήνεται διενέργεια υπερήχων και διαγνωστικών εξετάσεων. Εάν υπάρχει επαρκής χρόνος, μπορεί επίσης να εξεταστεί το ενδεχόμενο επανάληψης. Μέτρια σύσταση
5. Οι επιλογές προσυμπτωματικού ελέγχου για τρίδυμες κυήσεις δεν είναι πολλές και το cfDNA μπορεί να αποτελέσει μια πιθανή επιλογή. Ωστόσο, θα πρέπει πάντα να προσφέρεται διαγνωστικός έλεγχος και να τονίζονται οι περιορισμοί των δοκιμών προσυμπτωματικού ελέγχου. Ασθενής σύσταση.

SCA (Sex Chromosomal Aneuploidies) ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΕΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ

Υπό το πρίσμα της πολυπλοκότητας στον έλεγχο SCA και στη διαχείριση μετά την εξέταση, υπάρχει ανάγκη για συστάσεις από επαγγελματικές εταιρείες. Έχουν δημοσιευτεί διεθνώς περιορισμένες κατευθυντήριες οδηγίες, ειδικά για τον προσυμπτωματικό έλεγχο SCA, οι οποίες ποικίλλουν στις συστάσεις τους. Ορισμένοι υιοθετούν μια επιτρεπτική προσέγγιση που δίνει προτεραιότητα στην παροχή πληροφοριών και στη λήψη αποφάσεων από τους χρήστες, ενώ άλλοι ακολουθούν μια πιο περιοριστική προσέγγιση, τονίζοντας τις ανησυχίες σχετικά με τις πιθανές βλάβες του ελέγχου για SCA.

- Το **ISPD** συνιστά ότι όταν προσφέρεται στους υποψήφιους γονείς NIPT, θα πρέπει να έχουν την επιλογή να αποδεχτούν ή να απορρίψουν την ανάλυση SCA.
- Το **ACMG** παρέχει σαφή καθοδήγηση σχετικά με τον προσυμπτωματικό έλεγχο για SCA. Η ACMG σημειώνει ότι η χρήση του NIPT για τον έλεγχο SCA είναι πλέον συνήθης, καθώς δεν υπάρχει άλλη επιλογή ελέγχου για αυτές τις καταστάσεις. Συνεπώς, η παροχή συμβουλευτικής πριν από την εξέταση πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες και για SCA. Αυτό περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τα ψευδώς θετικά ποσοστά και τις πιθανές αιτίες αυτών και τις μεταβλητές προγνώσεις των SCA. Προτείνει επίσης ότι μετά από ένα θετικό αποτέλεσμα, οι χρήστες πρέπει να παραπέμπονται σε εκπαιδευμένο γενετικό σύμβουλο και να τους προσφέρεται διαγνωστική εξέταση.
- Το **ACOG** υιοθετεί μια ουδέτερη προσέγγιση στον προσυμπτωματικό έλεγχο SCA γενικά, αλλά σημειώνει τους πρόσθετους κινδύνους ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων των φυλετικών

χρωμοσώματος για ασθενείς που έχουν προηγουμένως υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνων και την ανάγκη παροχής συμβουλευτικής σχετικά με τυχαία μητρικά ευρήματα.

- Μια κοινή επιτροπή του **Βασιλικού Κολλεγίου Μαιευτήρων και Γυναικολόγων της Αυστραλίας και της Νέας Ζηλανδίας και της Εταιρείας Ανθρώπινης Γενετικής της Αυστραλασίας** θεωρεί το NIPT ως αποδεκτό τεστ πρώτης γραμμής για εμβρυϊκές χρωμοσωματικές ανωμαλίες στο πρώτο τρίμηνο και συστήνει παροχή συμβουλής πριν από την εξέταση όπου θα πρέπει να περιλαμβάνονται πληροφορίες για SCA. Σημειώνεται ο μεταβλητός και γενικά ήπιος φαινότυπος των SCA, η περιορισμένη ακρίβεια του NIPT στην ανίχνευση SCA και η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.
- Στο Ηνωμένο Βασίλειο, το **Nuffield Council on Bioethics** συνιστά να μην χρησιμοποιείται η NIPT SCA. Το Συμβούλιο συνιστά συγκεκριμένα στους πάροχους NIPT να μην προσφέρουν τον προσδιορισμό του φύλου των εμβρύων, εκτός εάν υπάρχει ανησυχία ότι το έμβρυο πάσχει από κλινικά σημαντική ανευπλοειδία του φύλου ή φυλοσύνδετη διαταραχή.
- Κοινή δήλωση της **ESHG** και της **ASHG** συνιστά επίσης να μην γίνεται χρήση του NIPT για SCA. Οι συγγραφείς σημειώνουν ότι ο έλεγχος SCA, όχι μόνο εγείρει ηθικές ανησυχίες σχετικά με την ενημέρωση και την παροχή συμβουλής, αλλά επίσης κινδυνεύει να αντιστρέψει την σημαντική μείωση των επεμβατικών δοκιμών που επιτεύχθηκε με την εφαρμογή του NIPT για τις ανευπλοειδίες. Μια επιπλέον ανησυχία είναι ότι ο έλεγχος για SCA από το NIPT θα καταστήσει αδύνατη την αποφυγή παροχής πληροφοριών σχετικά με το εμβρυϊκό φύλο σε άτομα που μπορεί να θέλουν να το χρησιμοποιήσουν για διακοπή θήλων εμβρύων σε ιδιαίτερα κοινωνικοπολιτισμικά πλαίσια.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλες οι κατευθυντήριες οδηγίες συμφωνούν σε:

- ❖ **Το NIPS (NIPT) αποτελεί την πλέον αξιόπιστη μέθοδο για την πρόγνωση της τρισωμίας 21, τρισωμίας 18, τρισωμίας 13 στο έμβρυο.** Τα στοιχεία καταδεικνύουν ότι για μονήρεις κυήσεις τα ποσοστά ανίχνευσης NIPS είναι για Τρισωμία 21 98.8%, για Τρισωμία 18 98.83%, για Τρισωμία 13 92.85% και για Ανευπλοειδίες του Φύλου 99.6%.
- ❖ **Τα αποτελέσματα υψηλού κινδύνου θα πρέπει να επιβεβαιώνονται με διαγνωστική μέθοδο.**

- ❖ Οι έγκυοι θα πρέπει να έχουν την ευκαιρία να ενημερώνονται προκειμένου να επιλέξουν αν θα αποδεχτούν ή θα απορρίψουν την εξέταση NIPT.
- ❖ Η συμβουλευτική είναι απαραίτητη πριν και μετά την εξέταση σχετικά με τα συνολικά οφέλη, τους κινδύνους και τους περιορισμούς.
- ❖ Έγκυοι με **θετικό αποτέλεσμα στο NIPT** για ανευπλοειδία του εμβρύου θα πρέπει να πάρουν γενετική συμβουλευτική και θα πρέπει να ακολουθήσει ολοκληρωμένη υπερηχογραφική αξιολόγηση με δυνατότητα διαγνωστικού ελέγχου για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.
- ❖ Οι έγκυοι με **αρνητικό αποτέλεσμα στο NIPT** θα πρέπει να έχουν επίγνωση ότι αυτό μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο των στοχευμένων ανευπλοειδιών που εξετάζονται, αλλά δεν εξασφαλίζει ότι το έμβρυο δεν πάσχει. Η πιθανότητα το έμβρυο να πάσχει από γενετικές διαταραχές που δεν αξιολογούνται από την εξέταση θα πρέπει να επικοινωνηθεί. Ακόμη και στην περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος η έγκυος μπορεί να επιλέξει να προβεί σε διαγνωστικές εξετάσεις αργότερα στην εγκυμοσύνη, ιδιαίτερα εάν παρουσιασθούν υπερηχογραφικά ευρήματα.
- ❖ Το προγεννητικό γενετικό screening (βιοχημικό με ή χωρίς μέτρηση αυχενικής διαφάνειας NT - ή το screening με ελεύθερο εμβρυϊκό DNA) και η επεμβατική προγεννητική διάγνωση (CVS ή αμνιακό υγρό) πρέπει να συζητηθούν με το ζευγάρι ως επιλογές και να προσφέρονται **σε όλες τις εγκύους**, ανεξαρτήτως ηλικίας ή κινδύνου για χρωμοσωματικές ανωμαλίες.
- ❖ Σε όλες τις εγκύους θα πρέπει να προσφέρεται υπερηχογράφημα δεύτερου τριμήνου για ανατομικές ανωμαλίες του εμβρύου, καθώς αυτές είναι δυνατό να εμφανιστούν με ή χωρίς εμβρυϊκή ανευπλοειδία. Ιδανικά, αυτό πραγματοποιείται μεταξύ 18 και 22 εβδομάδων κύησης (με ή χωρίς άλφα-εμβρυϊκή πρωτεΐνη μητρικού ορού δεύτερου τριμήνου).
- ❖ Στις περιπτώσεις όπου δεν εκδίδεται αποτέλεσμα από το εργαστήριο ή τα αποτελέσματα δεν μπορούν να ερμηνευτούν (**no-call**) θα πρέπει να ενημερώνεται η έγκυος ότι η αποτυχία της δοκιμής σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανευπλοειδίας του εμβρύου και να λάβει περαιτέρω γενετική συμβουλευτική. Συστή-

νεται να ακολουθήσει ολοκληρωμένη υπερηχογραφική αξιολόγηση, προσφορά επανάληψης NIPT, εναλλακτική εξέταση προ-συμπτωματικού ελέγχου ή/και διαγνωστική εξέταση.

- ❖ Εάν ανιχνευθεί **αυξημένη αυχενική διαφάνεια** ή ανωμαλία κατά την υπερηχογραφική εξέταση, θα πρέπει να προσφέρεται γενετική συμβουλευτική και διαγνωστικός έλεγχος για γενετικές παθήσεις, καθώς και ολοκληρωμένη υπερηχογραφική αξιολόγηση που περιλαμβάνει λεπτομερές υπερηχογράφημα στις 18-22 εβδομάδες κύησης για την αξιολόγηση δομικών ανωμαλιών.
- ❖ Συστήνεται σε όλες τις κυήσεις NIPS screening για 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome) (ACMG, 2022). Δεν υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες για άλλες **υποмикροσκοπικές χρωμοσωματικές ανισοζυγίες**.
- ❖ Όσον αφορά στο NIPS για **Χρωμοσωματικές Ανευπλοειδίες του Φύλου (SCA)**, οι συστάσεις των επαγγελματικών φορέων δίστανται. Υπέρ είναι ISPD, ACMG, ουδέτερη η στάση του ACOG, Βασιλικού Κολλεγίου Μαιευτήρων και Γυναικολόγων Αυστραλίας και Νέας Ζηλανδίας, της Εταιρείας Ανθρώπινης Γενετικής της Αυστραλασίας και αρνητική των ESHG, ASHG, Nuffield Council on Bioethics (UK).
- ❖ Είναι απαραίτητο να υπολογίζεται ορθά και να αναγράφεται στα αποτελέσματα το ποσοστό του **εμβρυϊκού κλάσματος (fetal fraction: FF)**. Το εμβρυϊκό κλάσμα αποτελεί μια σημαντική μέτρηση ποιοτικού ελέγχου, αλλά υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ εργαστηρίων και μεθοδολογιών δοκιμών. Τα εργαστήρια θα πρέπει να πραγματοποιούν τη δική τους εσωτερική επικύρωση του ορίου ανίχνευσης και του ορίου για τα αποτελέσματα «no call».
- ❖ Το NIPT είναι αξιόπιστο και για **δίδυμες κυήσεις**.
- ❖ Για την επιλογή μεταξύ **λήψης χοριακών λαχνών (CVS) ή αμνιοπαρακέντησης** κατόπιν αποτελέσματος NIPT αυξημένου κινδύνου, δεν υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες από επαγγελματικούς φορείς. Από δημοσιευμένες μελέτες προτείνονται τα εξής: Για χρωμοσώματα με υψηλά ποσοστά CPM (τρισωμία 13, μονοσωμία X και σπάνιες αυτοσωματικές τρισωμίες [RATs]), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο αμνιοπαρακέντησης, εάν το υπερηχογράφημα πρώτου τριμήνου είναι φυσιολογικό. Για τη μονοσωμία X σε cfDNA μετά από κανονικό εμβρυϊκό διαγνωστικό έλεγχο με αμνιοπαρακέντηση και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ο μητρικός καρυότυπος για την πιθανότητα χαμηλού

μωσαϊκισμού τρισωμίας Χ. Σε περιπτώσεις cfDNA με τρισωμία που περιλαμβάνει ένα χρωμόσωμα με αποτυπωμένα γονίδια (imprinting) (χρωμ. 6, 7, 11, 14, 15 και 20), συστήνεται η λήψη με αμνιοπαρακέντηση και εάν τα αποτελέσματα είναι φυσιολογικά, να ακολουθεί μοριακός έλεγχος μονογονεϊκής δισωμίας (UPD). Στην περίπτωση αυξημένου κινδύνου για τρισωμία 16 στο NIPT και υπερηχογραφικά φυσιολογικού εμβρύου, συστήνεται ένα λεπτομερές υπερηχογράφημα ανάπτυξης τρίτου τριμήνου. Για ασθενείς με πολλαπλά αποτελέσματα ανευπλοειδιών στο NIPT, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο εξέτασης για κακοήθεια της μητέρας .

- ❖ Σε κυήσεις με υπερηχογραφικά ευρήματα και γονέων φορέων χρωμοσωματικών αναδιατάξεων, συνιστάται επεμβατική προγεννητική διάγνωση.

ΕΙΔΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

ACMG. Systematic evidence-based review: Noninvasive prenatal screening (NIPS) for fetal chromosome abnormalities in a general-risk population: An evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) *Genetics in Medicine* 2023 Feb;25(2):100336. doi: 10.1016/j.gim.2022.11.004.

ACOG. Committee on Practice Bulletins—Obstetrics. Committee on Genetics; Society for Maternal-Fetal Medicine. Practice Bulletin 226, Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin, Number 226. *Obstet Gynecol.* 2020 Oct;136(4):e48-e69. doi: 10.1097/AOG.0000000000004084. PMID: 32804883.

ACMG. Systematic evidence-based review: Noninvasive prenatal screening (NIPS) for fetal chromosome abnormalities in a general-risk population: An evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) *Genetics in Medicine* 2023 Feb;25(2):100336. doi: 10.1016/j.gim.2022.11.004.

Becking EC, Schuit E, van Baar de Knecht SME, Sistermans EA, Henneman L, Bekker MN, Scheffer PG. Association between low fetal fraction in cell-free DNA screening and fetal chromosomal aberrations: A systematic review and meta-analysis. *Prenat Diagn.* 2023 Jun;43(7):838-853. doi: 10.1002/pd.6366. Epub 2023 May 17. PMID: 37143173.

Bedei I, Gehrke T, Gloning KP, Meyer-Wittkopf M, Willner D, Krapp M, Scharf A, Degenhardt J, Heling KS, Kozlowski P, Trautmann K, Jahns KM, Geipel A, Baumüller JE, Wilhelm L, Gottschalk I, Schröer A, Graf A, Wolter A, Schenk J, Weber A, Van den Veyver IB, Axt-Flidner R. Multicenter clinical experience with non-invasive cell-free DNA screening for monosomy X and related X-chromosome variants. *Prenat Diagn.* 2023 Feb;43(2):192-206. doi: 10.1002/pd.6320. Epub 2023 Feb 9. PMID: 36726284.

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; 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 Nov;23(11):1438-50. doi: 10.1038/ejhg.2015.57. Epub 2015 Mar 18. Erratum in: *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1592. PMID: 25782669; PMCID: PMC4613463.

van Eekhout JCA, Bekker MN, Bax CJ, Galjaard RH. Non-invasive prenatal testing (NIPT) in twin pregnancies affected by early single fetal demise: A systematic review of NIPT and vanishing twins. *Prenat Diagn.* 2023 Jun;43(7):829-837. doi: 10.1002/pd.6388. Epub 2023 May 31. PMID: 37226326.

Johnston M, Warton C, Pertile MD, Taylor-Sands M, Delatycki MB, Hui L, Savulescu J, Mills C. Ethical issues associated with prenatal screening using non-invasive prenatal testing for sex chromosome aneuploidy. *Prenat Diagn.* 2023 Feb;43(2):226-234. doi: 10.1002/pd.6217. Epub 2022 Aug 27. PMID: 35929376.

Hui L, Langlois S. Prenatal screening and diagnosis of sex chromosome conditions: The new normal? *Prenat Diagn.* 2023 Feb;43(2):131-132. doi: 10.1002/pd.6323. Epub 2023 Feb 4. PMID: 36690923.

ISPD. Position Statement. Palomaki GE, Chiu RWK, Pertile MD, Sisktermans EA, Yaron Y, Vermeesch JR, Vora NL, Best RG, Wilkins-Haug L.: cell free (cf)DNA screening for Down syndrome in multiple pregnancies. *Prenat Diagn.* 2021 Sep;41(10):1222-1232. doi: 10.1002/pd.5832. Epub 2020 Nov 15. PMID: 33016373.

ISPD. Position statement from the International Society for Prenatal Diagnosis on the use of non-invasive prenatal testing for the detection of fetal chromosomal conditions in singleton pregnancies. Hui L, Ellis K, Mayen D, Pertile MD, Reimers R, Sun L, Vermeesch J, Vora NL, Chitty LS. *Prenat Diagn.* 2023 Jun;43(7):814-828. doi: 10.1002/pd.6357. Epub 2023 May 16. PMID: 37076973.

La Verde M, De Falco L, Torella A, Savarese G, Savarese P, Ruggiero R, Conte A, Fico V, Torella M, Fico A. Performance of cell-free DNA sequencing-based non-invasive prenatal testing: experience on 36,456 singleton and multiple pregnancies. *BMC Med Genomics.* 2021 Mar 30;14(1):93. doi: 10.1186/s12920-021-00941-y. PMID: 33785045; PMCID: PMC8011149.

Luo Y, Hu H, Zhang R, Ma Y, Pan Y, Long Y, Hu B, Yao H, Liang Z. An assessment of the analytical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) in detecting sex chromosome aneuploidies: 34,717-patient sample in a single prenatal diagnosis Centre in China. *J Gene Med.* 2021 Sep;23(9):e3362. doi: 10.1002/jgm.3362. Epub 2021 Jun 14. PMID: 33973298.

Mardy AH, Norton ME. Diagnostic testing after positive results on cell free DNA screening: CVS or Amnio? *Prenat Diagn.* 2021 Sep;41(10):1249-1254. doi: 10.1002/pd.6021. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34386984.

Nuffield Council on Bioethics. Non-invasive Prenatal Testing: Ethical Issues (Review of Activities since Publication) [Internet]; 2018. [cited 2022 Feb 15]. <https://www.nuffieldbioethics.org/assets/pdfs/Nuffield-Council-NIPT-review-of-activites.pdf>

[Screening for Down's syndrome, Edwards' syndrome and Patau's syndrome: NIPT - GOV.UK \(www.gov.uk\)](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/614422/Screening_for_Down's_syndrome,_Edwards'_syndrome_and_Patau's_syndrome_-_NIPT_-_GOV.UK_(www.gov.uk).pdf)

SOGC-CCMG Guideline: Update on Prenatal Screening for Fetal Aneuploidy, Fetal Anomalies, and Adverse Pregnancy Outcomes. Audibert F, De Bie I, Johnson JA, Okun N, Wilson RD, Armour C, Chitayat D, Kim R. No. 348-Joint J Obstet Gynaecol Can. 2017.Sep;39(9):805-817. doi: 10.1016/j.jogc.2017.01.032.

Shear MA, Swanson K, Garg R, Jelin AC, Boscardin J, Norton ME, Sparks TN. A systematic review and meta-analysis of cell-free DNA testing for detection of fetal sex chromosome aneuploidy. *Prenat Diagn.* 2023 Feb;43(2):133-143. doi: 10.1002/pd.6298. Epub 2023 Jan 8. PMID: 36588186; PMCID: PMC10268789.

Touch-phone B, Lindsay C, Langlois S, Little J, Rousseau F, Reinharz D. Non-invasive prenatal testing for the prenatal screening of sex chromosome aneuploidies: A systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *Mol Genet Genomic Med.* 2021 May;9(5):e1654. doi: 10.1002/mgg3.1654. Epub 2021 Mar 23. PMID: 33755350; PMCID: PMC8172189.