



FACULTAT
DE CIÈNCIES
I TECNOLOGIA

UVIC | UVIC·UCC

Treball de Fi de Grau

ESTUDI DE LES TÈCNiques DE
DIAGNÒSTIC PRENATAL A PARTIR DE
L'ÀCID DESOXIRIBONUCLEIC LLIURE A
LA SANG MATERNA
I AVALUACIÓ DE LA SEVA
IMPLANTACIÓ AL SISTEMA SANITARI
ESPANYOL

ISAAC LEÓN ORTIZ

Grau en Biologia

Tutora: Alba Casellas Comallonga

Vic, Juny de 2020

Resum

Títol: *Estudi de les tècniques de diagnòstic prenatal a partir de l'àcid desoxiribonucleic lliure a la sang materna i avaluació de la seva implementació al sistema sanitari espanyol.*

Autor: Isaac León Ortiz

Tutora: Alba Casellas Comallonga (UAB i Uvic UCC)

Data: Juny de 2020

Paraules clau: ADN lliure, trisomia, aneuploidia, sensibilitat, especificitat, valors predictius positius, defecte estructural, taxa de falsos positius.

Introducció: Des del seu descobriment l'any 2011, les proves de detecció amb ADN lliure per alteracions fetals genètiques han sigut una molt bona alternativa als mètodes tradicionals. Aquest treball fa una revisió bibliogràfica dels estudis rellevants en relació a les noves tècniques de cribratge a partir de l'ADN fetal lliure i avalua la seva possible implementació clínica.

Metodologia: Es va realitzar una cerca dels estudis, emprant Pubmed i Ovid Medline, amb un criteri de selecció determinat. Els articles inclosos van ser revisats per experts, estudien més de 1000 mostres i presenten una anàlisi estadística de les seves dades. A partir dels seus resultats, es va fer una interpretació i comparació de la informació.

Resultats: La prova de detecció presenta una sensibilitat, especificitat i valors predictius positius més alts que els de mètodes habituals però, en canvi, té un major cost i no detecta patologies com l'espina bífida. La utilització de les tècniques de cribratge amb ADN fetal lliure aconsegueix detectar defectes estructurals i augmentar la precisió de detecció d'alteracions cromosòmiques com són la síndrome de Down, o les trisomies 18 i 13. També redueix la taxa de falsos positius i és ben acceptada per les dones embarassades.

Conclusions: Aquest treball ha demostrat que el cribratge prenatal a partir d'ADN fetal lliure pot ser incorporat al sistema de salut públic com a prova de contingència dintre del programa prenatal per la detecció de les trisomies 21, 18 i 13. La seva implementació reduiria en més d'un 50 % el nombre de procediments invasius realitzats.

Summary

Title: *Study of prenatal diagnostic techniques based on cell-free deoxyribonucleic acid and evaluation of its implementation in the Spanish healthcare system.*

Author: Isaac León Ortiz

Supervisor: Alba Casellas Comallonga (UAB - Uvic UCC)

Date: June 2020

Keywords: cell-free DNA (cfDNA), trisomy, aneuploidy, chromosome, screening test, accuracy, specificity, positive predictive values, structural defect, false positive rate.

Introduction: The new technologies of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing for the detection of fetal genetic alterations, such as the trisomy 21 or the sex chromosome aneuploidy, have been an excellent alternative of the traditional methods since they were employed for the first time in 2011. This work aims to make a bibliographic review of all the important studies about the non-invasive screening test and evaluate its clinical implementation.

Methods: A Medline search was performed, employing Pubmed and Ovid Medline platforms, for all studies on non-invasive prenatal testing with determined inclusion criteria. All papers were pair-review. Only studies with more than 1000 patients, in English, and with a statistical analysis of its data were included in this work. The results were compared and interpreted.

Results: The screening tests based on cfDNA exhibit a sensibility, specificity, and positive predictive values higher than traditional methods. However, non-invasive prenatal test has a considerable price and does not detect structural defects like the spine bifida. Cell-free DNA test contingent detects structural defects and increments the detection rate for chromosomal alterations, such as the Down's syndrome, the Edwards's syndrome or the Patau's syndrome. Furthermore, its use reduces the false positive rate and is well accepted in pregnant women.

Conclusions: This work has evidenced that non-invasive screening tests can be implemented in the health care system as a contingency test inside the prenatal program for the detection of the trisomies 21, 18 and 13. Additionally, its implementation would reduce the number of invasive procedures by more than 50%.

Índex de continguts

1. Introducció	1
1.1 Proves de cribratge	2
1.1.1 Proves de cribratge a partir del sèrum matern	3
1.1.2 Proves de cribratge amb ultrasò	4
1.1.3 Cribratge amb l'ADN lliure de cèl·lules	4
1.1.4 Cribratge dels portadors	6
1.2 Obtenció de mostres pel diagnòstic	6
1.2.1 Biòpsia de vellositats coriòniques	7
1.2.2 Amniocentesi.....	8
1.2.3 Funiculocentesi (o cordocentesi).....	8
1.3 Proves de diagnòstic	9
1.3.1 Prova del cariotip	9
1.3.2 Array CGH (Hibridació genòmica comparada) o cariotip molecular prenatal	9
1.3.3 Seqüenciació de tot l'exoma	10
2. Objectius	11
3. Metodologia	12
3.1 Estudi de les noves tècniques de cfDNA per a la detecció d'alteracions congènites	12
3.2 Disseny de l'estudi.....	13
3.3 Fonts bibliogràfiques	13
3.4 Criteris de selecció dels estudis	14
3.5 Criteris d'inclusió dels estudis.....	14
4. Resultats	15
4.1 Exactitud de la prova de cribratge amb ADN fetal lliure	15
4.1.1 Cribratge en embarassos únics	16
4.1.2 Cribratge en embarassos gemel·lars.....	16
4.1.3 Precisió de la prova en general.....	17
4.1.4 Precisió de la prova per aneuploïdies	20
4.2 Errors en la prova de cribratge prenatal no invasiu	21
4.2.1 Possibles causes d'un error en la prova.....	22
4.2.2 Implicacions d'un fracàs en la prova de cribratge no invasiu	23
4.3 Ús dels cfDNA com a prova de contingència.....	24

4.4	Implementació clínica de NIPT com a cribratge rutinari	25
4.4.1	Actual situació de les proves prenatales no invasives a España	25
4.4.2	Viabilitat de la implementació del cribratge amb cfDNA a tot el país	26
5.	Discussió	29
5.1	Principals resultats de l'estudi	29
5.2	Implicacions.....	29
5.3	Comparació amb estudis previs	30
5.4	Limitacions	30
6.	Conclusió.....	31
7.	Bibliografia	32

Llista de taules

Taula 1: Procediments i tècniques de diagnòstic prenatal (Krstić N i Običan SG, 2020) .	7
Taula 2: Estudis sobre la precisió de les NIPT per la detecció de les trisomies 21 i 18 en embarassos gemel·lars	16
Taula 3: Estudis sobre la implementació de les NIPT per la detecció del sexe dels nounats	17
Taula 4: Estudis sobre la implementació de les NIPT per la detecció malalties hemolítiques en nounats	19
Taula 5: Estudis sobre l'aplicació de les NIPT per les tres trisomies més comunes	20
Taula 6: Fracassos en els NIPT a causa d'errors tècnics.....	21
Taula 7: Comparació dels valors de diferents marcadors funcionals de la placenta entre un cohort on les NIPT han fracassat i un cohort amb resultats (Chan <i>et al.</i>, 2017)	23
Taula 8: Model teòric de les implicacions dels fracassos en les NIPT en una població hipotètica de 372.777 pacients, assumint que la incidència de la trisomia 21 és del 1:691 i la probabilitat d'afectar l'embaràs a causa de l'amniocentesi és del 0'11%.....	24
Taula 9: Característiques de l'estudi poblacional a 917 embarassades d'acord amb el risc de presentar la trisomia 21, 18 o 13 (Galeva <i>et al.</i>,2019)	25
Taula 10: Proves prenatales no invasives disponibles des d'Espanya (Desembre 2019)...	26
Taula 11: Resultat del model teòric (per 100.000 embarassos) de l'estudi de García Pérez <i>et al.</i>, 2016.....	27
Taula 12: Resultat de l'anàlisi d'impacte pressupostari anual per diversos escenaris (García Pérez <i>et al.</i>, 2016).....	28

Llista de figures

Figura 1: Imatge de la intersecció del cordó umbilical dins la placenta (Tanvisut R. <i>et al.</i>, 2020).....	8
Figura 2: Diagrama de flux del procés de selecció resumit per a la selecció dels estudis inclosos en els resultats del treball.....	13
Figura 3: Esquema del Teorema de Bayes per les proves de diagnòstic.....	15

1. Introducció

Les proves prenatales van començar a ser utilitzades a partir de finals de la dècada de 1970, quan el cariotip de les cèl·lules fetals va poder ser extret de les mostres de líquid amniòtic obtingudes a partir d'una amniocentesi. Aquesta prova, en ser invasiva, en molts casos acabava provocant l'avortament del nounat. És per aquest motiu que no podia ser emprada per tots els embarassos i va ser necessari el desenvolupament d'estratègies de cribratge no invasives que permetessin determinar en quins casos és necessari oferir una prova de diagnòstic. En general, els procediments de cribratge més efectius són aquells amb una sensibilitat molt propera al 100 % i una taxa de falsos positius (FPR, per les seves sigles en anglès *False positive rate*) la més baixa possible¹.

Les primeres proves de cribratge es fonamentaven en l'edat de la mare i l'historial familiar per les aneuploïdies. Si una pacient tenia més de 35 anys o tenia relatiu de primer grau que patien una aneuploïdia, se li ofería una prova de diagnòstic invasiva amb mostres obtingudes a partir d'una amniocentesi en el segon trimestre¹. En un principi tan sols es buscava la presència dels marcadors per a la síndrome de Down emprant només alfa-fetoproteïnes extretes d'una biòpsia de vellositats coriòniques (en anglès, *chorionic villous sampling* o CVS)¹⁻⁷.

L'avanç continuat de les tecnologies implicades en aquest camp de la medicina va comportar que, a finals de la dècada de 1980, les proves de cribratge s'enfoquessin més en el segon trimestre de gestació amb l'anàlisi dels nivells d'anàlits en el sèrum matern corresponents a cada prova¹. No va ser fins a finals de la dècada de 1990 que va aparèixer l'ultrasò i els marcadors bioquímics com a alternativa de les proves de detecció emprades fins aleshores. Amb aquests va ser possible detectar anomalies a partir, per exemple, de la transparència de la nuca que pot arribar a ser patològica en el cas d'alteracions cromosòmiques. També permetia l'estudi dels nivells de proteïna A associada al plasma (PAPP-A); una baixa presència d'aquesta està associada amb l'existència aneuploïdies^{2,8-13}.

Continuant amb el que s'ha comentat anteriorment, les proves prenatales proporcionen informació sobre la salut d'un nadó nounat i, en alguns casos, de la seva mare. En la primera visita prenatal, els sanitaris analitzen diversos factors que inclouen, a part de les aneuploïdies més comunes (Trisomies 21, 18 i 13), problemes amb la sang de la mare, signes d'infeccions i una vista general del seu sistema immunitari, entre altres¹⁴.

Durant l'embaràs, el metge encarregat pot arribar a suggerir altres proves necessàries depenent de: l'edat de la mare, l'historial clínic o familiar, l'ètnia o el resultat de proves anteriors¹⁴.

Existeixen dos tipus de proves prenatales:

En primer lloc, tenim les proves de cribratge. Aquestes s'encarreguen de detectar possibles problemes de salut tant en el nadó com en la mare. Avaluen el risc de patir cap alteració congènita però no diagnostiquen l'anomalia sinó que, principalment, identifiquen aquelles persones en perill dintre d'una població de baix risc. Si el resultat d'una prova de cribratge dóna positiu no significa que hi ha un defecte congènit, sinó que el risc de patir una anomalia és més elevat i és necessària més informació. Segons els resultats, el metge informarà als progenitors del procediment ideal i si es passarà a realitzar una prova de diagnòstic, sempre amb el

consentiment de la mare. Una bona prova de cribratge ha de ser capaç d'identificar aquelles mostres fetals no afectades per tal de poder donar confort a les embarassades i descartar la necessitat d'una prova més invasiva. A més, ha de tenir una bona relació cost-efectivitat i ser fàcil de reproduir¹⁵⁻¹⁷.

En segon lloc, hi ha les proves de diagnòstic definitiu. Aquestes confirmen o descarten problemes específics envers la salut del nounat. En alguns casos aquestes poden comportar un perill per la vida del nadó i augmentar la probabilitat de patir un avortament involuntari. És per això que, abans de procedir amb cap prova, el personal sanitari adequat ha d'informar dels riscos abans de demanar el consentiment de la mare. El més important d'aquest tipus de prova és la seva sensibilitat i és que, el seu resultat, té molt de pes de cara a la presa de decisions dels progenitors. En cas de donar positiu, és molt probable que aquests decideixin intervenir l'embaràs o preparar-se per a les possibles necessitats que comporti l'estat del nadó^{16,17}.

Actualment existeix un gran ventall de proves, tant de detecció com de diagnosi, per la identificació de possibles alteracions, tant estructurals com genètiques, durant l'embaràs i l'objectiu d'aquest treball és avaluar la implantació d'una d'elles, el cribratge prenatal a partir d'ADN fetal lliure a la sang materna, al programa de detecció prenatal espanyol i estudiar els avantatges que presenta dintre del panorama actual del cribratge prenatal genètic.

Context actual del diagnòstic prenatal d'alteracions congènites

Amb el pas del temps s'han desenvolupat noves tecnologies i proves, cadascuna amb un enfocament i objectiu diferents. A continuació hi ha una introducció de les tècniques més comunes en l'actualitat segons el tipus de prova.

1.1 Proves de cribratge

Com s'ha comentat anteriorment, les proves de cribratge només són vàlides per poder saber la probabilitat de patir una certa alteració¹⁷. Abans de qualsevol prova, un metge ha de realitzar un exhaustiu examen físic que inclou el control del pes, la pressió sanguínia i un examen de mames i pelvis. Amb els resultats obtinguts el personal sanitari podrà identificar, a grans trets, si hi ha patologies i, en cas afirmatiu, quines són les que més poden preocupar als progenitors¹⁶. Seguidament es passarà a realitzar les proves de cribratge rutinàries establertes pel Ministeri de Salut (o l'òrgan pertinent de cada país).

El resultat de les proves sol ser una aproximació del risc de tenir un nadó amb algun defecte congènit, no la presència real d'aquesta alteració. En general, la població pot ser dividida en dos grups^{16,18}:

- El grup de baix risc: els seus integrants presenten una probabilitat menor de patir cap anomalia. Això, al resultar d'una prova de detecció i no pas de diagnòstic, no vol dir que en el 100 % dels casos sigui cert¹⁸.
- El grup d'alt risc: en aquest cas, els nounats identificats presenten una probabilitat bastant elevada de patir una alteració. Si la prova de cribratge indica que el nadó segurament tindrà un defecte congènit, caldrà emprar una prova de diagnòstic per aciençar-nos. És possible que es tracti d'un fals positiu¹⁸.

En aquest apartat es proporciona un recull de la informació de les proves de detecció existents més emprades en el comú de la població i que es creuen rellevant per aquest treball.

1.1.1 Proves de cribatge a partir del sèrum matern

La prova de cribatge a partir del sèrum matern és una prova de sang que determina la probabilitat que l'embaràs es vegi afectat per una condició anòmala com la síndrome de Down, la trisomia 18 o un defecte del tub neural obert (NTD), com l'espina bífida¹⁸. Actualment és la prova més emprada en els embarassos d'arreu del món^{16,18}.

Existeixen diversos tipus de proves amb el sèrum matern però, per norma general, es parla de tres proves. Aquestes, poden ser dutes a terme tant en el primer trimestre com en el segon o, si és necessari, com a prova de detecció integrada que combina la informació de les proves del 1r i 2n trimestre. Segons variables com l'edat gestacional, el poder adquisitiu dels pares (en països sense sanitat pública) o accés a l'instrumental necessari, entre d'altres, es decidirà per una de les opcions anteriors i, a partir de la que es realitzi, la precisió enfront d'aneuploidies (o altres anomalies congènites) variarà^{16,18-27}.

La prova del primer trimestre (en anglès *First trimestre screening* o FTS) requereix que es faci una única extracció de la sang de la mare i un ultrasò especialitzat que inclogui el mesurament del teixit clar en la part posterior del cap del nadó. Aquesta última es denomina transparència de la nuca. Aquesta mesura, combinada amb la informació dels marcadors químics de la sang, ajudarà a proporcionar una estimació del risc per patir trisomia 21 o trisomia 18 (en alguns casos també serveix per detectar la trisomia 13), i alteracions estructurals. La precisió varia segons el defecte analitzat. Per detectar trisomies 21, FTS presenta una taxa de detecció d'entre el 82 i el 87 %. Per altres, com la trisomia 18 o síndrome d'Edwards, la seva taxa ronda el 80 %^{16,18,21,23,28,29}.

La prova del segon trimestre, també coneguda com a prova de detecció quàdruple, necessita una sola extracció de sang de la mare en la qual es buscaran 4 marcadors químics específics: l'alfa-fetoproteïna materna, l'estriol, la gonadotropina i la inhibina immunorreactiva^{16,18,24,30}. En aquest cas, la prova també detecta el risc per anomalies com la síndrome de Down o d'Edwards amb una taxa de detecció del 75-83 % i 60-70 %, respectivament^{16,18,21,25}. A més, també detecta la probabilitat de presentar defectes en el tub neural (en anglès, *open neural tube defects* o NTD) amb una taxa de detecció d'aproximadament el 80 %^{16,18,20-22,24}.

En un FTS de rutina, com s'ha comentat anteriorment, les dones són classificades en dos grups (a vegades s'inclou un grup intermedi) segons el risc que presenta el seu embaràs de patir una alteració congènita. En primer lloc, trobem el grup d'alt risc; aquestes presenten un risc >1:250 per les trisomies 13, 18 o 21 o la seva transparència de la nuca mesura més de 3 mm. En canvi, un embaràs es considera de baix risc si la probabilitat de patir una trisomia és menor d'1:250. En cas d'afegir un grup de risc moderat el criteri canvia; persones amb una probabilitat igual o superior a 1:10 o amb una transparència en la nuca ≥ 3 mm són considerades d'alt risc. Persones amb una probabilitat entre 1:11 i 1:1500 entren dins del risc moderat i, persones amb una probabilitat de patir cap aneuploidia inferior a 1:1500, de baix risc³¹.

Pel que fa a la prova integrada, resulta de la informació obtinguda a partir de les proves anteriors, incloent el mesurament del teixit clar al clatell del nadó i la proteïna plasmàtica A associada a l'embaràs (en anglès *pregnancy-associated plasma protein A* o PAPP-A) en el FTS i

la prova de detecció quàdruple. Aquesta última presenta una taxa de detecció del 87 % per la trisomia 21, el 90 % per la trisomia 18 i del 80 % pels defectes en el tub neuronal^{16,18,22}.

Un resultat positiu en la prova significa un major risc de tenir un defecte congènit. Seria necessari realitzar més proves de detecció amb una precisió més alta o passar a una prova de diagnòstic definitiu. La decisió estarà en mans dels progenitors, sempre informats pel seu metge^{16,19,32}.

1.1.2 Proves de cribatge amb ultrasò

Durant l'embaràs, l'ultrasò és una eina molt eficaç per la detecció de variacions en el desenvolupament fetal que poden acabar originant defectes congènits. A partir d'imatges de les estructures corporals, els metges poden mesurar la mida del nounat, revisar què tan avançat es troba l'embaràs i detectar alguns tipus de problemes, entre altres^{16,18}. El període idoni per dur a terme l'ecografia és després de la setmana divuit de gestació per tal de maximitzar la capacitat de poder veure possibles anormalitats. Tot i això, l'història familiar i l'estat de la mare (edat i ritme cardíac entre altres) són uns dels criteris que poden avançar l'ús de la prova^{16,18,28}.

Com s'indica en estudis com el de Nicolaidis de 2004, existeix una relació entre l'augment de la transparència del clatell o nuca (NT) i els defectes cromosòmics o, fins i tot, estructurals, particularment del cor^{16,33,34}. La NT mesura un espai ple de líquid sota la pell del clatell del nounat en el primer trimestre de l'embaràs i que creix a mesura que augmenta l'edat gestacional^{16,35}. Mesures de la transparència de la nuca amb un gruix superior als 3 mm estan relacionades amb problemes genètics, entre d'altres, i es necessiten més proves per tal de poder fer un diagnòstic^{16,36,37}. Així mateix, l'absència de l'espai també és una de les condicions que poden indicar perill de presentar trisomia 21. Tot i això, diferents estudis donen raons plausibles per aquest resultat que no implicarien una aneuploidia i, per tant, un consens mèdic seria necessari per interpretar els resultats de la prova. Entre les causes que podrien comportar l'absència de l'espai, hi ha: la realització de l'ultrasò massa aviat, això implicaria que la transparència de la nuca i l'os nasal del nadó encara no s'han desenvolupat prou per ser detectat amb aquesta tècnica, i l'ètnia de la mare, la qual també pot arribar a comportar el desenvolupament d'aquestes característiques^{16,18,38,39}. Tot i això, la taxa de detecció per la síndrome de Down mitjançant una ecografia és del 65 % amb una taxa de falsos positius del 0'8 %; tot i que pot arribar al 9'3 % en alguns casos^{16,21,28,40}. Igual que passa amb les altres proves de cribatge, després d'un resultat negatiu no se solen continuar amb les proves i, per tant, és molt difícil poder identificar els falsos negatius i calcular la seva taxa de manera precisa¹⁶.

A part de la síndrome de Down i algunes deficiències congènites del cor, la prova de l'ultrasò ha demostrat ser bastant eficient a l'hora de detectar o predir anomalies cromosòmiques com són la trisomia 18 i mutacions d'un sol gen (deleccions i duplicacions) com la síndrome de displàsia esquelètica^{16,28,33-39,41-44}.

1.1.3 Cribatge amb l'ADN lliure de cèl·lules

El cribatge a partir de l'ADN lliure o sense cèl·lula (en anglès *cell-free DNA* o cfDNA), també anomenada prova de detecció prenatal no invasiva (NIPT, per les seves sigles en anglès), és una prova desenvolupada recentment que, a partir del cfDNA originat per la mateixa renovació de les cèl·lules, detecta certes alteracions genètiques durant l'embaràs^{16,18,45}. Tot i anomenar-se ADN fetal, la realitat és que prové de l'apoptosi de les cèl·lules de la placenta^{16,38,46}. És important

remarcar que diversos estudis han trobat diferències genotípiques entre el fetus i la placenta i, per tant, els resultats d'una NIPT no poden ser 100 % precisos^{16,47}. Actualment, la prova identifica la síndrome de Down, la trisomia 18, la trisomia 13 i la síndrome de Turner (monosomia del cromosoma X), tot i que podria arribar a detectar un ventall molt més ampli d'alteracions congènites^{16,18}.

La NIPT es desenvolupa de la següent manera: després de 9-10 setmanes de gestació, es pren una mostra de sang de la mare per tal de poder extreure l'ADN lliure que conté el seu plasma. Se sap que aproximadament el 90 % prové de la mare mentre que el 10 % pertany a la placenta i, per tant, al fetus. Mitjançant proteïnes específiques, s'extrau l'ADN lliure del plasma i es passa a la seva anàlisi. Un cop es tenen els fragments d'ADN, es preparen llibreries de seqüències que seran comparades amb el genoma humà per tal de, primer, identificar l'ADN fetal i, després, cercar per alteracions cromosòmiques. Estudis realitzats fins ara demostren que els embarassos afectats amb defectes cromosòmics tenen una quantitat d'ADN fetal anormalment elevat en la mostra de sang materna. Aquesta prova també cerca ADN dels cromosomes sexuals per tal de poder identificar aneuploidies sexuals o, directament, el sexe del nadó. En pensar amb els resultats de les proves, un resultat positiu significa que hi ha una probabilitat alta de que l'embaràs es vegi afectat, i un resultat negatiu disminueix la probabilitat per sota de l'1 %; Això, juntament amb la presència significativa d'ADN matern dintre de la mostra de plasma, fa que es tracti d'una prova de cribratge i, per tant, que no s'obtingui un diagnòstic definitiu. Els resultats positius han de ser confirmats a partir d'una mostra de vellositat coriònica (CVS, per les seves sigles en anglès) o una amniocentesi^{16,18,48}.

En qualsevol embaràs es recomana dur a terme la prova de cfDNA tot i que, segons l'historial clínic i familiar, la precisió pot anar variant. La NIPT presenta una menor precisió en alguns casos com, per exemple, amb dones menors de 35 anys. Aquestes, per la seva edat, es consideren de baix risc i, per tant, tenen una menor prevalença. Una prova de detecció positiva tindrà més probabilitats d'acabar resultant ser un fals positiu. Les dones amb 35 anys o més tenen un risc més alt i, per tant, una prevalença més alta que fa que un resultat positiu en la prova de detecció probablement sigui més precís^{16,18,48}. Aquest últim cas és molt evident per la trisomia 21, la NIPT presenta una taxa de detecció del 80 % en dones amb 25 anys mentre que, per aquelles embarassades amb 35 anys la taxa puja fins al 90 %^{16,21,48-54}. A Espanya, la majoria de les companyies d'assegurances cobreixen les proves amb ADN fetal lliure en dones que: tinguin trenta-cinc anys o més, hagin tingut un resultat positiu en la prova de sèrum matern o en l'ultrasò i/o el seu embaràs previ s'hagi vist afectat per un defecte congènit^{18,53,54}.

En el cas dels embarassos únics (on només s'està gestant un únic fetus), existeix un risc més alt de patir anomalies cromosòmiques i, per tant, la NIPT és molt precisa. La prova de cfDNA pot detectar el 99 % dels embarassos afectats per la síndrome de Down^{16-18,49}. La taxa de detecció és molt alta per la trisomia 13, la trisomia 18 i la síndrome de Turner. Pel que fa a altres anomalies, el cribratge amb cfDNA també pot identificar el risc per trisomies com són la 9, la 16, la 22 i la 23, aquesta última amb una menor precisió. La NIPT pot identificar, a més a més, algunes de les SNPs més comunes^{16,18,21,48-50}. Tot i això, la prova no detecta defectes com el tub neural obert^{16,18}.

Cal tenir en compte que, diversos estudis, han detectat una disminució en la precisió de les proves amb ADN fetal lliure per embarassos gemel·lars. Tot i que encara no hi ha molts estudis al respecte, els resultats indiquen que, amb menor sensibilitat, la prova de cfDNA pot dir si hi ha un grau de risc més elevat que un o més dels nounats pateixin el trastorn. Actualment, no hi ha informació disponible envers la precisió de les proves per embarassos de trigèmins o altres embarassos múltiples^{16,18}.

És important entendre que, tot i la seva eficàcia, aproximadament un 5 % de les proves no arriben a donar cap resultat. Existeixen diferents motius que poden explicar aquest problema. Principalment es tracta d'un problema de baix percentatge d'ADN fetal lliure en la sang materna (en anglès, el percentatge d'aquests fragments d'ADN s'anomena *fetal fraction*). En la majoria dels laboratoris, que analitzen cfDNA per proves de cribratge, es requereix un "*fetal fraction*" d'entre el 2 i el 4 % per tal de poder validar els resultats. Això es fa, ja que l'ADN fetal prové de la placenta i es troba fragmentat, per tant, es necessita un mínim d'ADN per poder fer una cobertura adequada del genoma del nounat. Altres motius d'error són: errors estadístics o de protocol, la pèrdua d'un o més bessons, aneuploïdia materna o variacions en el nombre de còpies, entre altres^{16,21,47,50,52,55-60}.

Donat que la prova de cfDNA és una tecnologia que s'està desenvolupant ràpidament, aviat podria ser capaç de cercar les condicions diferents dels defectes congènits més comuns i evolucionar per passar d'identificar defectes cromosòmics a mirar variacions en un sol gen. Aquestes són productes de mutacions, normalment en una sola parella de bases. A més, s'està desenvolupant una nova prova que miraria tot l'exoma sencer dels fragments d'ADN fetal lliure^{16,18,47,61-66}.

1.1.4 Cribratge dels portadors

La prova per portadors s'encarrega de fer un cribratge als progenitors per tal de trobar qualsevol condició anormal que podria posar en perill l'embaràs. El seu objectiu és identificar parelles portadores recessives per a la mateixa herència autosòmica. D'aquesta manera, el nounat presentarà les dues còpies alterades d'un gen i desenvoluparà el trastorn o malaltia. Per aquesta prova de detecció és important tenir en compte l'historial familiar i l'ètnia dels progenitors. A Espanya es recomana que totes les dones embarassades es facin la prova per la fibrosi quística i l'atròfia muscular espinal, ja que són les que presenten major prevalença en tota la població^{16,67,68}.

Actualment existeix la possibilitat de realitzar un cribratge per identificar el risc per centenars de defectes recessius a la vegada. En cas de detectar la mateixa condició en tots dos progenitors, la probabilitat que la seva descendència hereti els dos al·lels pot arribar al 50 %. En aquesta situació, es recomana l'ús de proves de diagnòstic invasiu per tal de confirmar les deficiències congènites^{16,68-70}.

1.2 Obtenció de mostres pel diagnòstic

La majoria de les proves de diagnòstic prenatales requereixen d'algun tipus de mostra provinent del fetus per tal de poder identificar possibles anomalies. Aquestes mostres s'obtenen per mitjà de tècniques invasives que podrien comportar un risc per l'embaràs. Les proves de diagnòstic emprades a partir d'aquestes mostres presenten un procediment clar que cal seguir per tal de

poder obtenir resultats vàlids pel diagnòstic¹⁶. Entre les proves de diagnòstic, trobem que la més emprada en el comú de la societat és l'anàlisi dels cromosomes, el cariotip, per poder detectar aneuploidies i variacions en l'estructura cromosòmica amb un 99 % de sensibilitat^{16,18,71}.

A continuació es presenten les tres intervencions a partir de les quals s'obtenen les mostres necessàries per a poder realitzar una prova de diagnòstic. A la taula 1 es poden observar les tècniques que es comenten en aquest estudi junt amb les proves de diagnòstic recomanades per cadascuna.

1.2.1 Biòpsia de vellositats coriòniques

La mostra de vellositats coriòniques (en anglès *Chorionic villus sampling* o CVS) és una prova que, generalment, es realitza entre les setmanes 11 i 14 de l'embaràs i que permet avaluar el cariotip d'una mostra de la placenta en desenvolupament en els primers estats de gestació. D'aquesta manera s'evita penetrar en el sac amniòtic durant el segon trimestre. La CVS generalment comprova aneuploidies com les trisomies 21 (síndrome de Down) i 18 (síndrome d'Edwards). També pot detectar altres trastorns genètics com la fibrosi quística^{16,18}.

Per la CVS, el metge insereix una agulla buida en la placenta. Per tal d'arribar-hi, es pot fer a través de l'abdomen fins a l'úter, o bé anant per la vagina i el coll uterí. Dependrà de com estigui situada la placenta (en la part anterior o posterior de l'úter). Mitjançant ultrasò, el metge determina on col·locar l'agulla amb seguretat. Una vegada es troba la seva localització, el personal sanitari extraurà una petita mostra de la placenta i l'enviarà a un laboratori per ser analitzada^{16,18,72}.

La CVS pot produir malestar; enrampades, hemorràgies i infecció. També presenta una taxa molt baixa de provocar avortaments en 1 de cada 300-500 procediments realitzats. Recents estudis parlen de la possibilitat que, amb tots els avenços científics realitzats fins ara, ja no es trobi diferència significativa en la pèrdua del nadó entre persones que han patit una CVS i grups controls. Es creu que en l'actualitat, l'experiència del metge és la variable que podria afectar a les taxes d'avortament^{16,18,38,72}.

La CVS pot identificar si el nadó pateix un trastorn genètic amb una precisió de més del 99 %. Per la qual cosa, aquest procediment és emprat per diagnosticar alteracions congèniques^{16,38}.

Taula 1: Procediments i tècniques de diagnòstic prenatal (Krstić N i Običan SG, 2020)

Procediment	Mostra	Temps	Proves de Diagnòstic	Risc de provocar avortament
CVS	Cori de la placenta	11-14 setmanes	Cariotip; Array CGH; Seqüenciació	1 de cada 400 casos
Amniocentesi	Líquid amniòtic	16-20 setmanes	Cariotip; Array CGH; Seqüenciació; PCR	1 de cada 500 a 900 casos
Funiculocentesi	Sang fetal	18-23 setmanes	Cariotip; Array CGH; Seqüenciació; PCR; Anàlisi de sang	Entre l'1 i el 3 %

1.2.2 Amniocentesi

L'amniocentesi és una prova que generalment es realitza entre les setmanes 16 i 20 de l'embaràs, tot i que pot ser duta a terme més tard. Consisteix a prendre mostres del líquid amniòtic que envolta el nounat i, així, detectar defectes congènits o condicions genètiques anòmales. L'amniocentesi, per exemple, detecta defectes en el tub neural i trastorns genètics com les aneuploïdies. També pot detectar alguns dels problemes genètics com és la fibrosi quística^{16,18}.

Durant l'amniocentesi, el metge insereix una agulla buida a través de l'abdomen fins a penetrar l'úter, sempre amb l'ajut de l'ultrasò per tal que el metge pugui determinar on col·locar l'agulla amb seguretat. Una vegada l'agulla estigui situada, el metge extrau una petita quantitat del fluid. Després, retira l'agulla i envia la mostra al laboratori per realitzar la prova. Aquesta, analitza les cèl·lules fetals dins del líquid amniòtic producte de la descamació de la pell del nounat^{16,18,73}.

Els resultats s'obtenen amb una precisió superior al 99 %. L'amniocentesi presenta certs riscos que cal tenir en compte abans de ser realitzada. Anteriorment es calculava que la prova originava un avortament instantani en menys de l'1 % dels casos, actualment se sap que el percentatge no arriba al 0,11 %^{16,72}. Així i tot, hi ha estudis que relacionen aquesta prova amb la malaltia del peu equinovar (o talipes equinovarus) amb un 1-2 % dels procediments realitzats^{16,74}. Malauradament, aquest estudi és bastant antic i no hi ha evidència científica recent que ho corrobori. Sí que és cert, però, que recents articles indiquen que actualment el risc seria bastant menor, al voltant del 0,8 %⁷³. Seria necessari una actualització per veure si, amb totes les millores i innovacions, el perill segueix existint.

1.2.3 Funiculocentesi (o cordocentesi)

La Funiculocentesi o anàlisi de la sang fetal, és el procediment pel qual, a partir d'una extracció de sang umbilical, es diagnostiquen trastorns congènits. En aquest cas, en tractar-se d'una extracció directa de la sang del mateix cordó umbilical, aquesta és molt més difícil i, per tant, implica més riscos. El procediment comença amb l'aspiració de sang pertanyent a la vena umbilical propera al lloc d'intersecció amb la placenta. Això és així per tal de mantenir l'estabilitat del corrent sanguini del fetus i disminuir el perill al mínim^{16,75}. Acostuma a ser realitzada en el segon o tercer trimestre de l'embaràs. Està associada amb un 1-3 % de risc de pèrdua del fetus^{16,76}.

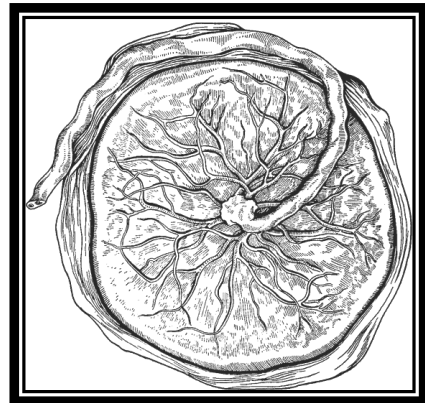


Figura 1: Imatge de la intersecció del cordó umbilical dins la placenta (Tanvisut R. *et al.*, 2020)

1.3 Proves de diagnòstic

1.3.1 Prova del cariotip

La prova del cariotip, també anomenat anàlisi dels cromosomes, examina la mida, forma i número dels cromosomes d'un cultiu de cèl·lules fetals obtingudes a partir de CVS o amniocentesi. Les persones normalment tenen 46 cromosomes, dividits en 23 parelles, en cada cèl·lula i la prova analitza tots 23 parells amb l'objectiu de detectar qualsevol defecte congènit^{16,77}.

El resultat d'aquesta prova pot ser senzill d'interpretar, com és el cas d'un cromosoma extra, o complexa com passa amb les mutacions. Alguns dels exemples d'anormalitats que la prova del cariotip és capaç de reconèixer, són: les aneuploïdies abans comentades, les variacions estructurals monosòmiques; com és el cas de la variació en el nombre de còpies (delecions, insercions i duplicacions), les translocacions i les inversions; o cromosomes marcadors i circulars. Algunes de les variacions en els cromosomes poden acabar essent beneficioses. Altres són causants de malalties^{16,71}.

Entre els defectes congènits, el resultat de la prova del cariotip també pot presentar mosaïcisme, coexistència de més d'una línia cel·lular amb diferent dotació cromosòmica en una sola mostra⁷⁸. El mosaïcisme només es detecta en l'1-2% de les mostres obtingudes a partir de la mostra de vellositats coriòniques i, per tant, de cèl·lules de la placenta. Per aquest motiu també s'anomena Mosaïcisme confinat a la placenta^{16,79}. Al voltant del 30% de les vegades, aquest resulta en la presència de la síndrome de Turner^{16,47}.

1.3.2 Array CGH (Hibridació genòmica comparada) o cariotip molecular prenatal

Aquesta prova és una eina de diagnòstic genètic que permet detectar anomalies cromosòmiques amb una resolució superior a les altres, millor precisió i més rapidesa, mitjançant la qual es poden identificar alteracions en l'ADN, incloses microdelecions i duplicacions tan petites que, tècniques com l'anterior, la prova del cariotip, no és capaç de veure. Aquestes, igual que passava abans, són variacions del nombre de còpies (CNV, per les sigles en anglès)^{16,18,77,80,81}. Algunes de les CNV originen malalties mentre que d'altres no hi ha suficient informació. A més, algunes de les variacions patògenes poden tenir diferents graus d'expressió. Això comporta que hi hagi casos on les malalties puguin ser més o menys greus^{16,21,77}.

Igual que en qualsevol xip d'ADN (en anglès, *microarray*), es tracta d'una sèrie de sondes d'ADN (ADN fixat al xip) de longitud variable, unides a un suport sòlid en una disposició regular i preestablerta, sobre les quals podem hibridar una mostra prèviament marcada. Cada sonda és representativa d'un gen o un transcrit, tot i que un gen pot ser representat per més d'una sonda⁸².

En primer lloc s'obté una mostra de la placenta o del líquid amniòtic mitjançant biòpsia corial o amniocentesi. Seguidament, s'extreu el genoma de la mostra, s'hibrida i s'estudia mitjançant milers de sondes que analitzen el nombre de còpies dels petits fragments d'ADN, comparant-lo amb una mostra de referència⁷⁷. A diferència de la prova del cariotip, l'array pot treballar amb cèl·lules fora d'un cultiu cel·lular^{16,71}. Això fa que els resultats siguin molt més ràpids però, a la

vegada, es perdi informació. Els estudis realitzats fins ara indiquen que aquesta pèrdua no comporta una menor precisió per malalties d'origen cromosòmic^{16,77,83-85}.

Mentre la prova del cariotip fetal roman sent la més comuna, l'array d'hibridació genòmica comparada diagnòstica 6 % més defectes que el cariotip. Per tant, l'array CGH és la més recomanada pels professionals per diagnosticar anomalies que, prèviament, l'ultrasò ha detectat. El rang de defectes congènits que el cariotip molecular pot arribar a identificar també és més ampli^{16,21,77}.

De cara a l'anàlisi del genoma a partir dels xips d'ADN (en anglès *chromosome microarray analysis* o CMA), aquest pot ser dut a terme amb diferents formats. Per un costat tenim el xip basat en oligonucleòtids, l'array CGH prèviament comentat que detecta defectes cromosòmics. Altres, en canvi, s'enfoquen en els polimorfismes de nucleòtids simples (SNP, per les sigles en anglès). També existeix una tècnica que combina les dues anteriors per tal d'ampliar el ventall de defectes genètics que es poden detectar. Això, però, fa variar la precisió^{16,71}.

1.3.3 Seqüenciació de tot l'exoma

La seqüenciació de tot l'exoma (WES, per les sigles en anglès) és una nova prova en la línia de la seqüenciació de nova generació que detecta mutacions en les seqüències codificants del genoma fetal. Aquesta, és capaç de trobar més del 85 % de les malalties congènites originades per mutacions. L'alternativa d'aquesta prova és la seqüenciació del tot el genoma (en anglès, *whole genome sequencing* o WGS)^{16,77,86}.

Les variacions identificades amb la WES, normalment, es classifiquen segons el grau de patogenicitat; incloent-hi aquells casos on la variació és benigne. Actualment, l'ús de la seqüenciació de tot l'exoma pel diagnòstic prenatal és limitat i només se sol veure en recerca científica. No hi ha estudis clínics per la seva implementació, tot i això, aquesta tècnica presenta un rendiment del 80 %. Cal comentar que, aquest, pot ser més alt en casos amb major prevalença o persones d'alt risc^{16,86,87}.

Alguns dels desavantatges de la prova són que els resultats tarden molt a arribar i té un elevat cost (al voltant dels 2.000 €), que no entra dins de cap asseguradora. A més, amb les tècniques actuals, donen resultats que sobresurten de l'àmbit prenatal com són les predisposicions a malalties^{16,86,88}. Cal comentar que el problema més gran que cal solucionar, per tal de poder promoure aquestes tècniques, és la interpretació de resultats per variacions del genoma amb conseqüències desconegudes (en anglès *variants of uncertain significance* o VUS)^{16,89,90}. Aquesta interpretació depèn dels avanços en la recerca envers la genòmica en general i, sobretot, la fetal. La informació que es té en l'actualitat és bastant incompleta o incorrecta, ja que no tenim les tècniques necessàries per a poder detectar la patologia de les VUS i les seves implicacions fenotípiques. Un exemple de les conseqüències que no es poden preveure a escala prenatal són els fenotips que minven la intel·ligència^{16,60,90-93}.

És per aquesta raó que les proves emprades per la presa de decisions envers el futur de l'embaràs, es troben limitades per la tecnologia del moment. A més, cal tenir en compte que la interpretació dels resultats pot variar segons el centre sanitari i no existeix cap protocol, nacional o internacional. És necessari tenir tots aquests inconvenients en compte abans de realitzar la prova i que els progenitors estiguin informats en tot moment de les seves possibles conseqüències^{16,21}.

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest estudi és adquirir una visió integrada de l'existència, característiques i utilitat dels àcids nucleics circulants en l'àmbit prenatal, així com identificar les principals diferències que presenta el seu ús pel diagnòstic prenatal amb les tècniques emprades fins al seu descobriment.

Per tal de poder reconèixer els avantatges d'aquesta prova i la necessitat d'implementar-la en el nostre sistema sanitari públic com a un pas més en el calendari prenatal, s'han tingut en compte els següents objectius:

- Determinar l'exactitud de la prova de cribratge amb ADN fetal lliure.
- Conèixer els errors que es poden donar en un cribratge amb cfDNA i les seves implicacions, tant en l'àmbit sanitari com en la presa de decisions dels progenitors.
- Estudiar l'ús del test prenatal no invasiu, NIPT, com a prova de contingència.
- Estudiar la situació actual de la prova en tot el territori.
- Avaluar la implementació de la prova no invasiva en el sistema de salut públic espanyol.

3. Metodologia

El cribratge no invasiu, a partir de l'ADN fetal lliure (en anglès *cell-free fetal DNA* o cffDNA), és un mètode emprat per detectar trisomies en el fetus a partir d'una mostra de la sang perifèrica de la mare. Actualment s'utilitza en menor o major mesura a tota Europa, Àsia, Àfrica i Amèrica^{94,95}. La seva precisió i rapidesa fa que, cada vegada més, sigui la primera opció dels progenitors, per sobre del cribratge del primer trimestre (FTC, per les sigles en anglès). Tot i això, cal entendre que es tracta d'una prova de detecció i, per tant, els seus resultats no poden ser emprats pel diagnòstic de deficiències congènites^{94,96,97}.

Per tal de poder assolir els objectius establerts, a continuació es presenta la metodologia emprada en aquest treball.

3.1 Estudi de les noves tècniques de cfDNA per a la detecció d'alteracions congènites

Les proves prenatales de cribratge no invasiu (En anglès, *non-invasive prenatal test* o *non-invasive prenatal screening*, abreviat NIPT o NIPS respectivament) són emprades amb l'objectiu de proveir als progenitors la informació útil per poder optimitzar la viabilitat del part^{50,98}.

Entenent això i tenint sempre present la informació donada a la introducció, el meu treball pretén donar una visió sistemàtica de les característiques de les NIPT i els seus avantatges. Per tal de poder-ho fer, es van cercar referències vàlides que informin, sobretot, dels següents punts:

- La validesa analítica. Aquesta fa referència als estadístics de sensibilitat i especificitat. Respecte a les NIPS, la validesa analítica determina la viabilitat de la prova, amb les mostres obtingudes d'ADN matern i placentari, per determinar la presència o absència d'aneuploides fetal, entre altres condicions congènites. Institucions internacionals estableixen una validesa analítica a partir de diferents articles. Espanya, de moment, no en té cap protocol per a les proves prenatales de cribratge no invasiu^{46,50,99-102}.
- La validesa clínica. Aquesta, en canvi, fa referència al rendiment de les NIPS. S'enfoca en la taxa de detecció (DR), o proporció de vertaders positius (sensibilitat clínica), i la proporció de falsos positius (especificitat clínica, o SPEC). Com les NIPS aborden condicions bastant poc comunes, els estudis de validació s'utilitzen per entendre la DR i SPEC utilitzant mostres d'un banc de recerca. Això permet la sobre representació de les mostres per a la condició d'interès. Fins ara, els estudis de validació presenten resultats semblants^{50,103-110}. Les NIPS tenien una DR i SPEC molt elevada, arribant a gairebé el 99% per la síndrome de Down. La DR i SPEC van ser del 80-100% per la síndrome d'Edwards i la síndrome de Patau. Superant, així, els resultats de proves realitzades amb mètodes convencionals^{50-52,111}.
- La utilitat clínica. Finalment, els estudis revisats, havien d'observar si la nova prova de cribratge és fiable i útil per les pacients. Els estudis d'aquest punt parlen de la utilitat clínica que té la prova per la presa de decisions. Aquests estudis poden proporcionar mètriques de prova objectives, com ara els valors predictius positius (PPV) i els valors predictius negatius (NPV). Cal destacar que aquests poden ser resultat d'una població model (mitjançant la DR i ESPEC, així com la prevalença poblacional) o, per altra banda,

calculats a partir de mesures reals. Una altra variable que ens parla de la utilitat de les NIPT és la seva relació cost-eficàcia. Tot i això, en estudiar variables amb bastants assumpcions, com són el sistema sanitari o els preus de la prova, aquests estudis presenten un alt risc de ser parcials. És per això que, en aquest treball, només es treuen recomanacions dels estudis de la relació cost-eficàcia i no pas resultats conclouents⁵⁰.

3.2 Disseny de l'estudi

Es tracta d'una revisió sistemàtica d'alguns dels treballs més rellevants en el camp de la genètica prenatal. Els articles inclosos en aquest estudi es van obtenir a partir d'una cerca a PubMed, *Obstetrics & Gynaecology* (OBGYN) i *Ovid Medline* emprant un criteri de selecció específic. Els estudis seleccionats havien de ser en anglès, català o castellà per tal de poder entendre el seu contingut. A més, han d'haver passat una revisió i ser validats per la comunitat científica. Les referències inclouen articles des del 2011, moment en què el primer va ser publicat, fins a l'actualitat. Els termes emprats van ser: "*maternal blood cfDNA*", "*non-invasive prenatal detection*", "*non-invasive prenatal test*", "*non-invasive prenatal screening*" o "*non-invasive prenatal diagnosis*", incloent-hi totes les seves variants. Els resums de cada article van ser revistats per escollir tots els rellevants abans de passar a examinar el contingut sencer. A la figura 2 es troba un diagrama de flux que representa gràficament el procediment dut a terme en la selecció de la bibliografia científica emprada per assolir els nostres objectius. Un cop els articles van ser escollits, es van descarregar i dividir en tres grups segons la seva rellevància per l'estudi; en primer grau aquells amb informació directa pel treball, en segon grau els articles que donen informació complementària i, en tercer grau els que parlen d'aspectes més generals.

A part dels articles científics utilitzats en la metodologia de cara a l'obtenció de resultats, també s'ha realitzat una cerca més senzilla per la redacció de la introducció.

El treball també recull algunes de les notícies més rellevants que donen una imatge de la situació actual de les NIPT en el conjunt de tot el territori espanyol. Les notícies seleccionades s'han restringit a aquelles provinents de diaris de rellevància i publicades en un període que comprèn des del 2017 fins a l'actualitat, 2020.

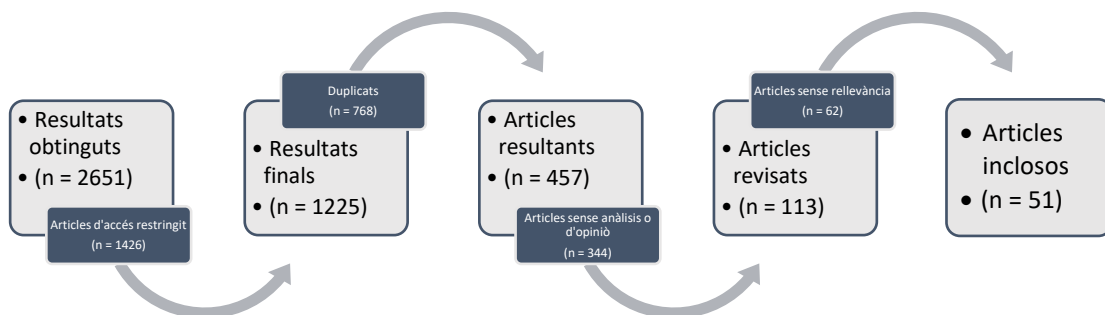


Figura 2: Diagrama de flux del procés de selecció resumit per a la selecció dels estudis inclosos en els resultats del treball

3.3 Fonts bibliogràfiques

Com s'ha comentat anteriorment, la cerca d'informació rellevant pel meu treball va ser duta a terme a través dels principals motors de cerca gratuïts per a accedir a MEDLINE, base de dades bibliogràfiques de recerca biomèdica. Els cercadors escollits van ser PubMed i *Ovid Medline*, tot

i que alguns dels articles finals s'han extret directament de la web *Obstetrics & Gynaecology* (OBGYN).

Junt amb el mètode anterior, es van emprar diferents fonts per la redacció i confecció de la introducció, i la resolució d'alguns dels meus objectius. Un exemple d'això és la valoració de la situació actual de la prova de cribratge no invasiu a Espanya. Molta de la informació presentada en aquest treball s'ha extret a partir de notícies i butlletins, tant del govern espanyol com dels de les comunitats autonòmiques.

Per la correcta redacció de la introducció es van buscar, per exemple, en enciclopèdies digitals i llibres científics, els termes específics emprats per tal de poder validar la informació que presento. A més, es va extreure molta informació detallada de cada prova, tant de cribratge com de diagnòstic, a partir dels articles referenciats dintre dels estudis que utilitzo en el meu treball.

3.4 Criteris de selecció dels estudis

El primer pas per a la confecció d'aquest treball bibliogràfic, va ser la cerca d'estudis que poguessin donar la informació suficient per a treure conclusions pròpies i assolir els meus objectius. Aquesta recerca d'informació, com és evident, va tenir un criteri a partir del qual se seleccionava un article i no un altre.

La cerca realitzada va filtrar els articles de la següent manera. En primer lloc, tots els articles havien d'estar en anglès, català o castellà. En segon lloc, els estudis han d'haver estat revisats per experts (en anglès, *peer-reviewed articles*) en l'àmbit del diagnòstic prenatal i l'ús dels NIPT per la detecció d'aneuploidies. A causa de la gran quantitat d'articles que compleixen aquests requisits, es va passar a descartar tot aquell estudi amb un nombre menor de 1000 pacients, ja que els resultats amb un nombre inferior no haurien de ser representatius¹¹². El període d'inclusió va ser des d'octubre de 2011, any en el qual es va publicar el primer article, fins a l'actualitat. Els paràmetres emprats en la cerca inclouen els següents termes: "*maternal blood cfDNA*", "*non-invasive prenatal detection*", "*non-invasive prenatal test*", "*non-invasive prenatal screening*" o "*non-invasive prenatal diagnosis*", amb totes les seves variants.

En el cas de les fonts no científiques es va tenir en compte un altre criteri. Per les notícies, es van acceptar només les publicades a partir de 2018 i de diaris amb un cert prestigi (en aquest cas, entenent per prestigi la nominació o guany d'algun premi relacionat amb la divulgació) i sense revelació d'interessos.

3.5 Criteris d'inclusió dels estudis

A partir dels articles escollits amb el criteri de selecció anterior, es va passar a identificar aquells estudis rellevants per aquest treball i que permetessin assolir els meus objectius. El criteri d'inclusió dels estudis va ser bastant senzill de comprendre però més difícil de dur a terme. Amb tots els articles seleccionats, es va passar a fer una revisió dels resums (en anglès, *abstract*) de cada estudi per escollir els més rellevants abans de passar a examinar el contingut sencer. Els articles finalment inclosos dintre del treball també havien d'incloure, com a mínim, una anàlisi estadística. D'aquesta manera, tots els articles finals podien ser d'utilitat per l'obtenció de resultats.

4. Resultats

4.1 Exactitud de la prova de cribratge amb ADN fetal lliure

Des que l'any 2011 es va fer la primera prova de cribratge amb cfDNA per la detecció d'aneuploïdies, els avanços tecnològics i la recerca científica han anat millorant la seva precisió. La majoria dels estudis li donen una sensibilitat per les aneuploïdies més comunes >99'9 %^{105,106,110,112}. Tot i això, cal entendre que les NIPT són un mètode de detecció molt sensible, no una prova infal·libre de diagnòstic. En l'àmbit de la medicina els paràmetres de sensibilitat i especificitat són importants però, de cara a un diagnòstic, altres com els valors predictius; tant positius (PPV per les seves sigles en anglès) com negatius (NPV per les seves sigles en anglès); són encara més importants. Mentre el PPV dóna la probabilitat de patir una malaltia si el resultat de la prova és positiu ($PPV = \frac{VP}{FP+VP}$; on VP són els positius vertaders i FP els positius falsos), el NPV proporciona la probabilitat de no patir la malaltia si el resultat de la prova és negatiu ($NPV = \frac{VN}{FN+VN}$; on VN són els negatius vertaders i FN els negatius falsos)¹¹³. Cal recordar que, en termes estadístics, les proves diagnòstiques s'expliquen segons el Teorema de Bayes (Fig. 3)¹¹⁴.

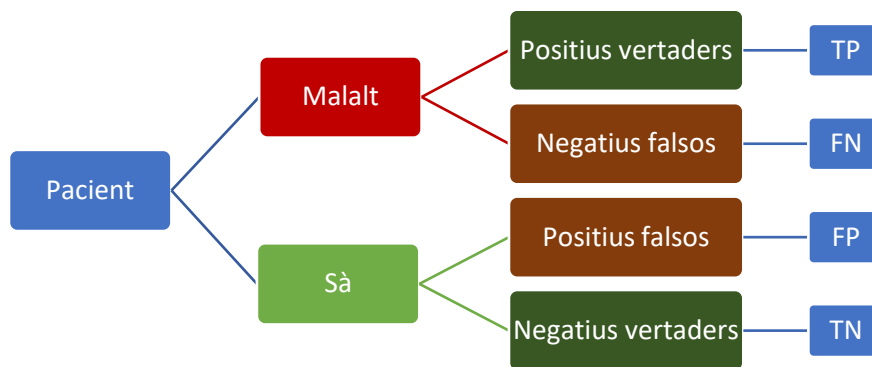


Figura 3: Esquema del Teorema de Bayes per les proves de diagnòstic

És important estudiar els valors predictius, ja que aquest sí que es troben influenciats per la prevalença, proporció d'individus d'un grup o una població que presenten una malaltia. Si els estudis de validesa de les NIPT han estat realitzats a partir d'una població d'alt risc, l'alta prevalença comporta un PPV molt elevat. En el moment de realitzar el cribratge amb cfDNA en un grup de risc normal, els valors predits disminuiran^{112,115}. Diferents estudis han detectat una disminució dels PPV fins al 45'5 %. Tot i això, els NIPT segueixen sent molt superiors al cribratge convencional amb PPV entre el 3'4 i el 4'2 %^{51,52}.

Diverses revisions i estudis han avaluat la precisió del mètode de cribratge amb cfDNA. Tot i això, la majoria presenta les següents limitacions:

- Els articles treballen amb una única alteració; ja sigui el sexe del nounat, malalties hemolítiques del fetus o aneuploïdies, entre altres; fet que impossibilita les comparacions.
- En treballar amb casos control, els resultats presenten una alta parcialitat.

- c) Els estudis analitzats presenten un risc significatiu de tenir parcialitat amb les verificacions. En cas d'obtenir negatiu en els NIPT, els progenitors no solen verificar els resultats amb, per exemple, la prova del cariotip.

4.1.1 Cribratge en embarassos únics

En embarassos amb un sol fetus, la detecció a partir del cfDNA fetal extret de la sang materna, proporciona un cribratge efectiu per les trisomies 21, 18 i 13. Una recent meta-anàlisi de la seva validació clínica conclou que, per la síndrome de Down presenta una sensibilitat del 99'7 % (95% I.C. 99'1% al 99'9%); per la síndrome d'Edwards presenta una sensibilitat del 97'9 % (95% I.C. 94'9% al 99'1%); per la síndrome de Patau presenta una sensibilitat del 99'0 % (95% I.C. 65'8% al 100%);. En tots tres casos, la taxa de falsos positius (FPR) va ser del 0'04 % (95% I.C. 0'02% al 0'07%)⁴⁹.

4.1.2 Cribratge en embarassos gemel·lars

En contrast amb els embarassos únics, el nombre d'estudis que treballen amb pacients d'embarassos gemel·lars, més d'un fetus, és bastant limitat. Segons una revisió bibliogràfica realitzada l'any 2017, només cinc estudis van estudiar la precisió dels NIPT en embarassos múltiples fins al moment. Segons els seus resultats, el cribratge presenta una sensibilitat del 100 per la trisomia 21⁴⁹. Tot i això, el baix nombre de la cohort estudiada (n= 986) impedia treure resultats concloents¹¹⁶.

Segons Gil *et al.*, Un total de cinc estudis informen de la precisió del mètode de cribratge amb cfDNA fetal per les trisomies 21, 18 (Taula 2) en embarassos múltiples⁴⁸. En canvi, fins a l'actualitat, només tres articles avaluen la sensibilitat i la taxa de falsos positius per la detecció de la trisomia 13. Els resultats van des d'un FPR del 0'19 % al 0'4 %. La taxa de detecció és del 66'7 %^{48,117,118}.

Taula 2: Estudis sobre la precisió de les NIPT per la detecció de les trisomies 21 i 18 en embarassos gemel·lars

Estudi	Trisomia 21				Trisomia 18			
	Sensibilitat	Especificitat	PPV	NPV	Sensibilitat	Especificitat	PPV	NPV
Huang (2014) ¹¹⁹	100%	100%	100%	0'0%	50%	100%	100%	0'0%
Le Conte (2018) ¹¹⁸	100%	99'7%	75%	25%	100%	100%	100%	0'0%
Yang (2018) ¹²⁰	100%	100%	100%	0'0%	100%	100%	100%	0'0%
Yu (2019) ¹¹⁷	100%	100%	100%	0'0%	100%	100%	100%	0'0%
Gil (2019) ⁴⁸	100%	100%	100%	0'0%	90%	99'9%	90%	10%

Només es dona el nom del primer autor.

4.1.3 Precisió de la prova en general

Un dels avantatges que presenten les noves tecnologies de cribratge a partir del cfDNA fetal és la seva precisió en vers la detecció de diverses condicions d'interès, a part de la identificació de possibles aneuploidies. A continuació es presenten els resultats de diferents estudis respecte a diverses condicions detectaves per proves prenatales.

Detecció del sexe del nounat

Les NIPT van ser emprades per identificar el sexe d'un fetus per primera vegada l'any 1997 per Lo *et al.* es va detectar el cromosoma Y per poder diagnosticar el gènere⁴⁶. Amb una revisió de diferents estudis, disponible a la taula 3, es pot observar que, en general, les proves no invasives presenten una sensibilitat del 97'8 % (95 % I.C. 96'7 % al 98'8 %), una especificitat d'aproximadament 97'6 % (95 % I.C. 96'2 % al 99'0 %), un PPV del 98'2% (95% I.C. 97'2% al 99'2 %) i un NPV de l'1'8 % (95 % I.C. 0'08 % al 2'7 %).

Pels estudis revisats, 11 (de 60) presenten resultats impossibles d'interpretar, la NIPT va fracassar. La principal causa és una baixa presència de cfDNA fragmentat en les mostres. En el cas dels falsos positius, els autors reclamen una possible contaminació de la mostra, tot i que això no es confirma en cap estudi.

Taula 3: Estudis sobre la implementació de les NIPT per la detecció del sexe dels nounats

Estudi	TP	FP	FN	TN	Sensibilitat	Especificitat	PPV	NPV
Lo (1997) ⁴⁶	24	0	6	13	80,00	100,00	100,00	0,00
Smid (1999) ¹²¹	16	1	0	10	100,00	90,91	94,12	5,88
Chen (2001) ¹²²	44	0	2	19	95,65	100,00	100,00	0,00
Al-Yatama (2001) ¹²³	53	3	2	22	96,36	88,00	94,64	5,36
Costa (2001) ¹²⁴	61	0	0	60	100,00	100,00	100,00	0,00
Rijnders (2001) ¹²⁵	23	0	1	21	95,83	100,00	100,00	0,00
Sekizawa (2001) ¹²⁶	139	0	4	159	97,20	100,00	100,00	0,00
Zhong (2001) ¹²⁷	19	0	0	11	100,00	100,00	100,00	0,00
Wei (2001) ¹²⁸	16	0	0	18	100,00	100,00	100,00	0,00
Siva (2003) ¹²⁹	10	3	0	11	100,00	78,57	76,92	23,08
Cremonesi (2004) ¹³⁰	183	0	5	168	97,34	100,00	100,00	0,00
Rijnders (2004) ¹³¹	35	0	1	29	97,22	100,00	100,00	0,00
Hwa (2004) ¹³²	20	0	3	33	86,96	100,00	100,00	0,00
Ho (2004) ¹³³	13	0	0	10	100,00	100,00	100,00	0,00
Zhao (2004) ¹³⁴	29	4	0	11	100,00	73,33	87,88	12,12
Hyett (2005) ¹³⁵	13	0	0	15	100,00	100,00	100,00	0,00
Zhu (2005) ¹³⁶	17	2	0	13	100,00	86,67	89,47	10,53
Zolotukhina (2005) ¹³⁷	34	3	2	21	94,44	87,50	91,89	8,11
Zhou (2005) ¹³⁸	68	0	4	26	94,44	100,00	100,00	0,00
Ge (2006) ¹³⁹	40	0	2	34	95,24	100,00	100,00	0,00
Deng (2006) ¹⁴⁰	30	0	0	34	100,00	100,00	100,00	0,00

Davalieva (2006) ¹⁴¹	25	0	3	18	89,29	100,00	100,00	0,00
Chi (2006) ¹⁴²	6	0	0	4	100,00	100,00	100,00	0,00
Martinhago (2006) ¹⁴³	36	0	3	40	92,31	100,00	100,00	0,00
Santacroce (2006) ¹⁴⁴	22	0	0	18	100,00	100,00	100,00	0,00
Al-Yatama (2007) ¹⁴⁵	25	2	1	20	96,15	90,91	92,59	7,41
Boon (2007) ¹⁴⁶	44	2	0	52	100,00	96,30	95,65	4,35
Liu (2007) ¹⁴⁷	13	0	0	17	100,00	100,00	100,00	0,00
Illanes (2007) ¹⁴⁸	15	1	0	10	100,00	90,91	93,75	6,25
Bustamante-Aragones (2008) ¹⁴⁹	177	0	6	163	96,72	100,00	100,00	0,00
Picchiassi (2008) ¹⁵⁰	81	2	1	61	98,78	96,83	97,59	2,41
Tungwiwat (2008) ¹⁵¹	95	0	2	71	97,94	100,00	100,00	0,00
Minon (2008) ¹⁵²	278	0	0	266	100,00	100,00	100,00	0,00
Vecchione (2008) ¹⁵³	8	0	0	18	100,00	100,00	100,00	0,00
Wagner (2008) ¹⁵⁴	154	0	6	129	96,25	100,00	100,00	0,00
Sesarini (2009) ¹⁵⁵	33	2	1	20	97,06	90,91	94,29	5,71
Hyland (2009) ¹⁵⁶	24	0	0	16	100,00	100,00	100,00	0,00
Wang (2009) ¹⁵⁷	41	0	0	37	100,00	100,00	100,00	0,00
Akolekar (2010) ¹⁵⁸	90	1	1	119	98,90	99,17	98,90	1,10
Scheffer (2010) ¹⁵⁹	105	0	0	81	100,00	100,00	100,00	0,00
Vora (2010) ¹⁶⁰	30	0	0	22	100,00	100,00	100,00	0,00
Hill (2011) ¹⁶¹	209	0	2	194	99,05	100,00	100,00	0,00
Tynan (2011) ¹⁶²	74	5	1	70	98,67	93,33	93,67	6,33
Sehnert (2011) ¹⁶³	23	0	0	19	100,00	100,00	100,00	0,00
Sirichotiyakul (2011) ¹⁶⁴	72	0	0	86	100,00	100,00	100,00	0,00
Mortarino (2011) ¹⁶⁵	63	1	14	103	81,82	99,04	98,44	1,56
Zadeh (2011) ¹⁶⁶	6	0	0	9	100,00	100,00	100,00	0,00
Aghanoori (2012) ¹⁶⁷	92	2	6	100	93,88	98,04	97,87	2,13
Fernandez-Martinez (2012) ¹⁶⁸	220	1	0	183	100,00	99,46	99,55	0,45
Rong (2012) ¹⁶⁹	25	0	0	15	100,00	100,00	100,00	0,00
Sbarsi (2012) ¹⁷⁰	10	0	0	10	100,00	100,00	100,00	0,00
Kolialexi (2012) ¹⁷¹	10	0	0	5	100,00	100,00	100,00	0,00
Kim (2012) ¹⁷²	81	3	1	77	98,78	96,25	96,43	3,57
Lim (2012) ¹⁷³	99	0	0	104	100,00	100,00	100,00	0,00
Lau (2012) ¹⁷⁴	61	0	0	47	100,00	100,00	100,00	0,00
Perlado-Marina (2013) ¹⁷⁵	111	0	0	115	100,00	100,00	100,00	0,00
Moise (2013) ¹⁷⁶	167	1	1	168	99,40	99,41	99,40	0,60
Nicolaidis (2013) ¹⁰⁷	116	0	0	109	100,00	100,00	100,00	0,00
Porreco (2014) ¹⁷⁷	1634	4	3	1681	99,82	99,76	99,76	0,24

Només es dona el nom del primer autor. Els estadístics de sensibilitat, especificitat i els valors predictius estan representats en percentatge.

Detecció de malalties hemolítiques del nounat

En total, trenta estudis seleccionats avaluen la precisió de les proves no invasives per detectar malalties hemolítiques com la rhesus D en els nounats. Segons els resultats observats (Taula 4), es pot resumir que les proves no invasives presenten una sensibilitat del 97'2 % (95 % I.C. 95'5 % al 99 %), una especificitat d'aproximadament 94'7 % (95 % I.C. 90'8 % al 99 %), un PPV del 97'8 % (95 % I.C. 96'1 % al 100 %) i un NPV del 2'2 % (95 % I.C. 0'04 % al 3'9 %).

Pel que fa a la taxa de fracàs de la prova, 13 estudis presenten resultats intel·ligibles. La majoria no identifica la causa, o no la presenta en el seu estudi. Tot i això, en el cas dels resultats erronis; falsos positius o negatius; un baix percentatge d'ADN fetal podria ser la causa. A part, no es descarta la contaminació de la mostra o un error en el procediment.

Taula 4: Estudis sobre la implementació de les NIPT per la detecció malalties hemolítiques en nounats

Estudi	TP	FN	FP	TN	Sensibilitat	Especificitat	PPV	NPV
Lo (1997) ⁴⁶	37	0	2	18	94,87	100,00	100,00	0,00
Zhong (2001) ¹²⁷	26	0	1	7	96,30	100,00	100,00	0,00
Costa (2002) ¹²⁴	62	0	0	40	100,00	100,00	100,00	0,00
Siva (2003) ¹²⁹	17	2	3	4	85,00	66,67	89,47	10,53
Turner (2003) ¹⁷⁸	30	0	4	14	88,24	100,00	100,00	0,00
Rijnders (2004) ¹³¹	43	1	0	28	100,00	96,55	97,73	2,27
Hromadnikova (2005) ¹⁷⁹	24	0	0	21	100,00	100,00	100,00	0,00
Gautier (2005) ¹⁸⁰	170	0	0	102	100,00	100,00	100,00	0,00
Zhou (2005) ¹³⁸	68	0	0	26	100,00	100,00	100,00	0,00
Machado (2006) ¹⁸¹	58	1	1	15	98,31	93,75	98,31	1,69
Al-Yatama (2007) ¹⁴⁵	21	0	5	28	80,77	100,00	100,00	0,00
Rouillac-Le (2007) ¹⁸²	229	2	0	77	100,00	97,47	99,13	0,87
Minon (2008) ¹⁵²	359	1	0	185	100,00	99,46	99,72	0,28
Hyland (2009) ¹⁵⁶	95	0	0	40	100,00	100,00	100,00	0,00
Grill (2009) ¹⁸³	122	2	5	49	96,06	96,08	98,39	1,61
Wang (2009) ¹⁵⁷	60	5	0	10	100,00	66,67	92,31	7,69
Sesarini (2019) ¹⁵⁵	34	6	2	18	94,44	75,00	85,00	15,00
Aykut (2010) ¹⁸⁴	21	0	0	8	100,00	100,00	100,00	0,00
Mohammed (2010) ¹⁸⁵	12	3	1	5	92,31	62,50	80,00	20,00
Gunel (2010) ¹⁸⁶	7	0	0	12	100,00	100,00	100,00	0,00
Achargul (2011) ¹⁸⁷	83	1	5	31	94,32	96,88	98,81	1,19
Bombard (2011) ¹⁸⁸	278	3	4	121	98,58	97,58	98,93	1,07
Tynan (2011) ¹⁶²	86	0	0	62	100,00	100,00	100,00	0,00
Han (2012) ¹⁸⁹	24	0	0	8	100,00	100,00	100,00	0,00
Clausen (2012) ¹⁹⁰	1368	6	2	862	99,85	99,31	99,56	0,44
Sbarsi (2012) ¹⁷⁰	13	0	0	7	100,00	100,00	100,00	0,00

Moise (2013) ¹⁷⁶	220	3	1	96	99,55	96,97	98,65	1,35
Manzanares (2013) ¹⁹¹	73	1	1	40	98,65	97,56	98,65	1,35
Polin (2013) ¹⁹²	88	0	0	34	100,00	100,00	100,00	0,00
Chitty (2015) ¹⁹³	2563	18	19	1920	99,26	99,07	99,30	0,70

Només es dona el nom del primer autor. Els estadístics de sensibilitat, especificitat i els valors predictius estan representats en percentatge.

4.1.4 Precisió de la prova per aneuploidies

Tot i que tots els estudis concorden en la gran sensibilitat de les NIPT amb ADN fetal lliure, els valor exactes varien segons el disseny de l'estudi i la seva metodologia.

Segons la revisió de Taylor-Phillips S, Freeman K, Gepper J, *et al.*, la gran majoria dels estudis actuals presenten un gran biaix. Pel que fa a la precisió de la prova per les trisomies 13, 18 i 21; la sensibilitat varia des del 99 % (95 % I.C. 98'9 % al 99'6 %) per la síndrome de Down, el 97'4 % (95 % I.C. 95'8 % al 98'4 %) per la síndrome d'Edwards i el 97'4 % (95 % I.C. 86'1 % al 99'6 %) per la síndrome de Patau. L'especificitat, en canvi, roman en el 99'9% (95 % I.C. 99'9 % al 100 %) per totes tres trisomies. El mateix treball detecta una disminució en la sensibilitat pels embarassos gemel·lars⁹⁴.

Taula 5: Estudis sobre l'aplicació de les NIPT per les tres trisomies més comunes

Estudi	T21	T18	T13
Chen (2011) ¹⁹⁴	NA	91'9, 78'1–98'3	100, 86'3–100
Palomaki (2011) ¹⁰³	98'6, 95'9–99'7	100, 93'9–100	91'7, 61'5–99'8
Sehnert (2011) ¹⁶³	100, 75'3–100	100, 63'1–100	NA
Ashoor (2012) ¹⁰⁸	100, 92'9–100	98'0, 89'4–99'9	80'0, 44'4–97'5
Bianchi (2012) ¹⁰⁶	100, 95'9–100	97'2, 85'5–99'9	78'6, 49'2–95'3
Jiang (2012) ¹⁹⁵	100, 79'4–100	100, 73'5–100	100, 15'8–100
Lau (2012) ¹⁷⁴	100, 71'5–100	100, 69'2–100	100, 15'8–100
Nicolaidis (2012) ¹⁹⁶	100, 63'1–100	100, 15'8–100	NA
Norton (2012) ¹⁰⁵	100, 95'6–100	97'4, 86'2–99'9	NA
Sparks (2012) ¹⁰⁹	100, 90'3–100	100, 63'1–100	NA
Guex (2013) ¹⁹⁷	100, 88'4–100	95'0, 75'1–99'9	100, 75'3–100
Liang (2013) ¹⁹⁸	100, 91'0–100	100, 75'3–100	100, 29'2–100
Nicolaidis (2013) ¹⁰⁷	100, 86'3–100	100, 29'2–100	100, 2'5–100
Song (2013) ¹⁹⁹	100, 63'1–100	100, 15'8–100	100, 2'5–100
Bianchi (2014) ⁵¹	100, 47'8–100	100, 15'8–100	100, 2'5–100
Pergament (2014) ²⁰⁰	100, 93'8–100	100, 85'8–100	100, 71'5–100
Porreco (2014) ¹⁷⁷	100, 97'3–100	92'3, 79'1–98'4	87'5, 61'7–98'5
Shaw (2014) ²⁰¹	100, 71'5–100	100, 59'0–100	87'5, 61'7–98'5
Stumm (2014) ²⁰²	97'06, 87'2–99'9	100, 63'1–100	100, 47'8–100
Quezada (2015) ²⁰³	100, 89'1–100	90'0, 55'5–99'8	40'0, 52'8–85'3

Norton (2015) ⁵²	100, 91'0-100	90'0, 55'0-100	100, 16'0-100
Song (2015) ²⁰⁴	100, 15'8-100	100, 2'50-100	100, 2'5-100

Només es dona el nom del primer autor. Els valors indicats són les taxes de detecció (Interval de confiança, %).

4.2 Errors en la prova de cribratge prenatal no invasiu

Una de les mètriques que sovint es passa per alt en l'avaluació de les proves amb cfDNA és la taxa de proves errònies o de resultats indeterminats. Aquesta és el percentatge de pacients sense resultats o amb resultats impossibles d'interpretar¹¹². Segons la bibliografia cercada, hi podem trobar tres causes principals^{49,112,205}:

- Problemes tècnics en el laboratori. Aquests poden ser administratius, com són els errors a l'hora d'etiquetar les mostres o de transportar-los.
- Baix nivell d'ADN fetal, el que se sol anomenar *fetal fraction*. En la majoria de laboratoris, es considera que els resultats no són vàlids si el percentatge d'ADN placentari dins la mostra és inferior al 4 %.
- Errors en l'anàlisi de la mostra. Aquests són problemes originats en el laboratori mentre es treballa amb la mostra. Poden ser errors durant l'extracció de l'ADN, la seva amplificació o la seva seqüenciació, entre altres.

Si observem la taula 6, on es presenten els percentatges de fracassos en el laboratori per errors tècnics de diferents estudis, veurem que la taxa de fracàs es troba quasi sempre entre el 0 % i el 5 %^{51,103,105-108,174,177,195,196,199-204}. Un cas on la taxa de fracàs supera el 5 % el trobem a l'article de Pergament *et al.* Aquest analitza les mostres de 1051 pacient emprant un algoritme basat en els polimorfismes d'un únic nucleòtid i identifica que no hi ha resultat pel 16 % de les aneuploidies reals. El 50 % de les mostres que fracassen es deuen en el fet que el percentatge d'ADN fragmentat és molt inferior del 4 % estipulat en el protocol general per a les NIPT^{21,200}. A més, també demostra que les mostres que han fracassat, tenen una probabilitat més alta de patir defectes congènits^{112,200}.

Taula 6: Fracassos en els NIPT a causa d'errors tècnics

Estudi	Aneuploidies cercades	Pacients	Percentatge de fracàs
Palomaki (2011) ¹⁰³	21,18,13	1988	0'86
Ashoor (2012) ¹⁰⁸	21,18,13	2167	2'86
Bianchi (2012) ¹⁰⁶	21,18,13	1696	0'77
Jiang (2012) ¹⁹⁵	21,18,13	11105	1'58
Lau (2012) ¹⁷⁴	21,18,13,SCA	1982	1'16
Nicolaidis (2012) ¹⁹⁶	21,18	2049	4'88
Norton (2012) ¹⁰⁵	21,18	3228	4'58
Nicolaidis (2013) ¹⁰⁷	21,18,13,SCA	100000	1'93
Song (2013) ¹⁹⁹	21,18,13,SCA	1916	3'81
Bianchi (2014) ⁵¹	21,18,13	2050	0'39

Pergament (2014) ²⁰⁰	21,18,13,SCA	1051	8'09
Porreco (2014) ¹⁷⁷	21,18,13	3430	3'15
Shaw (2014) ²⁰¹	21,18,13,SCA	85399	0'12
Stumm (2014) ²⁰²	21,18,13	1005	4'78
Quezada (2015) ²⁰³	21,18,13	2905	4'23
Song (2015) ²⁰⁴	21,18,13,SCA	5974	0'72

Només es dona el nom del primer autor. SCA, aneuploidies en els cromosomes sexuals (en anglès, *sex chromosome aneuploidy*).

4.2.1 Possibles causes d'un error en la prova

Un resultat positiu fals succeeix quan el resultat d'una prova de cribratge a partir de cfDNA fetal és anòmal. No coincideix amb el resultat diagnosticat a partir d'un cariotip o chip de cromosomes (En anglès, *chromosome microarray* o CMA).

Recentment, Hartwig *et al.*, va realitzar una revisió sistemàtica de la literatura sobre les NIPT publicada des de l'1 de gener de 1997 fins a l'1 de març de 2016, cercant per evidències específiques de resultats discordants. Els investigadors van trobar que el 88 % dels resultats discordants eren falsos positius i un 12 % eren falsos negatius, dels quals, un 54 % van ser originats a partir de problemes tècnics o biològics⁵⁸.

A part dels problemes tècnics, la principal causa de resultats erronis o fracàs de la prova, són condicions maternes específiques. Entre les més importants, trobem: problemes mèdics i el seu tractament, càncer, alteracions en els cromosomes sexuals, mosaïcisme i variacions en el nombre de còpies, entre d'altres²⁰⁶.

Segons Bianchi *et al.*, una afecció mèdica en la mare (o el tractament d'aquesta) pot comportar l'obtenció de resultats positius falsos en proves de cribratge no invasives. Per aquesta raó, els investigadors suggereixen introduir les alteracions de l'ADN matern a l'hora d'orientar i assessorar els progenitors²⁰⁶.

Chan *et al.* calcula que aproximadament un 2-3 % de les proves de cribratge no invasives retornen resultats poc concloents. Aquests inclouen problemes en la logística a causa d'errors en l'extracció de la mostra, el transport i emmagatzematge d'aquesta, o pràctiques de laboratori. Amb tot això, el més comú segueix essent un percentatge insuficient d'ADN fetal lliure²⁰⁷.

L'estudi de Chan *et al.*, descriu que les dones amb resultat erroni presentaven baixos nivells de PAPP-a i fβhCG, així com un nivell significativament més alt d'índex de pulsacions a l'artèria uterina (en anglès, *uterine artery PI*) que el de les progenitores que van rebre els resultats correctament. A la Taula 7 es mostren les comparacions detallades. Els investigadors informen que la mitjana d'edat en la cohort amb errors en les NIPT és més alta. A més, detecten un risc significativament major de presentar major proporció d'aneuploidies cromosòmiques (6'5 % vers 0'2 %, P < 0'0001), preeclàmpsia (11 % contra 1'5 %, P < 0'0001), diabetis gestacional (23 % contra 7'5 %, P < 0'0001) en comparació amb la població general²⁰⁷.

Taula 7: Comparació dels valors de diferents marcadors funcionals de la placenta entre un cohort on les NIPT han fracassat i un cohort amb resultats (Chan *et al.*, 2017)

Marcadors funcionals de la placenta estudiats	Mitjanes del cohort amb fracàs a la NIPT (mida de la mostra)	Mitjanes del cohort amb èxit a la NIPT (mida de la mostra)	P-valor a partir de la prova de U de Mann-Whitney
PAPP-A MoM	0'75 (99)	1'14 (2469)	< 0'0001
PIGF MoM	0'93 (58)	1 (2252)	0'07
fβhCG MoM	0'71 (100)	1'01 (12.515)	< 0'0001
Uterine artery PI	1'79 (86)	1'65 (2959)	0'02

PAPP-A, proteïna plasmàtica A associada a l'embaràs (en anglès, *pregnancy-associated plasma protein A*); PIGF, factor de creixement placentari (en anglès, *placental growth factor*); fβhCG, gonadotropina coriònica humana lliure (en anglès, *free beta hCG*); MoM, múltiple de la mitjana.

4.2.2 Implicacions d'un fracàs en la prova de cribratge no invasiu

El fracàs en una prova de detecció pot arribar a tenir un alt impacte en la seva precisió i es que, en la gran majoria de laboratoris, la taxa de fracàs no es té en compte a l'hora de calcular els estadístics de sensibilitat i especificitat de la prova de cribratge no invasiu (NIPT).

Enfront d'una prova errònia, en la qual no s'obtingui un resultat o aquest no pugui ser interpretat, el Col·legi Nord-americà d'Obstetres i Ginecòlegs (ACOG, per les seves sigles en anglès) recomana la repetició de la prova o el pas a proves invasives de diagnòstic, ja que els estudis realitzats fins ara relacionen el fracàs de la prova amb un risc elevat de patir una alteració congènita⁶⁶. De la mateixa manera, el comitè de genètica de la societat de medicina materno-fetal recomana una avaluació amb ultrasò i l'ús de proves de diagnòstic, a causa de l'alt risc del nadó per presentar una aneuploidia²⁰⁸. Tot i això, cal entendre que un fracàs en la prova de cribratge a partir d'ADN fetal lliure, incrementa la taxa de falsos positius i disminueix el valor predictiu positiu, tal com es pot veure a la taula següent. A més, aquesta mateixa taxa de fracàs implica un augment de l'ús de les proves de diagnòstic invasiu que, no només tenen un cost econòmic, sinó que a més comporten un risc de causar un avortament involuntari.

Per tal de poder avaluar en profunditat les implicacions clíniques d'un fracàs en les NIPT, s'ha fet ús d'un model teòric on una població de 372.777 embarassades (nombre de naixements a Espanya l'any 2018²⁰⁹) realitza un cribratge no invasiu a partir de cfDNA en 5 laboratoris amb una taxa de fracàs dels estudis anteriors (0'12 %²⁰¹, 0'39 %⁵¹, 1'16 %¹⁷⁴, 4'88 %¹⁹⁶ i 8'09 %²⁰⁰) i una sensibilitat reportada del 99'9 %. Si assumim que la incidència de la síndrome de Down és de 1:691, s'espera que aproximadament 540 pacients presentin la trisomia 21 en aquest cohort²¹⁰. A més, s'assumeix que tots els positius i fracassos comporten una prova de diagnòstic, l'amniocentesi, amb un risc del 0'11 % d'originar avortament⁷². A la taula 8 podem observar que, en el millor dels casos, es realitzarien 447 tests invasius addicionals i, comportaria la pèrdua d'un embaràs. A més, la sensibilitat passaria del 99'9 % al 99'8 % amb un PPV del 54'8 %. En el cas contrari, amb una taxa de fracàs del 8'09 %, es realitzarien 30.158 test invasius addicionals amb una sensibilitat del 91'9 % (es detecten 496 dels 540 possibles) i un PPV del 1'76 %.

Taula 8: Model teòric de les implicacions dels fracassos en les NIPT en una població hipotètica de 372.777 pacients, assumint que la incidència de la trisomia 21 és del 1:691 i la probabilitat d'afectar l'embaràs a causa de l'amniocentesi és del 0'11%

Taxa de fracàs de la prova (%)	Taxa de detecció (%)	Casos detectats	Taxa de detecció real (%)	Proves de diagnostic necessàries	PPV (%)	Avortaments originats per proves invasives
0'12	99'9	539	99'8	986	54'8	1
0'39	99'9	538	99'6	1.992	27'1	2
1'16	99'9	534	98'9	4.858	11'1	5
4'88	99'9	514	95'2	18.696	2'89	21
8'09	99'9	496	91'9	30.654	1'76	34

NIPT, proves prenatales no invasives (en anglès, *non-invasive prenatal testing*); PPV, valors predits positivament o valor predictiu positiu (en anglès, *positive predictive value*).

La mateixa ACOG suggereix la repetició de la prova sempre que no hagi sigut possible obtenir un resultat en el primer intent⁶⁶. Tot i això, molts dels estudis revisats en aquest treball indiquen que en aproximadament el 50 % dels casos, aquesta repetició, no ha donat bons resultats²⁰⁵. Segons aquests estudis, com el de Palomaki *et al.*, la repetició de la prova només presenta una eficiència del 30 % i, a causa de l'espera (de 10 a 15 dies laborals), porta insatisfacció a les pacients⁵⁹. Aquesta espera, a més, pot limitar el poder de decisió dels progenitors.

4.3 Ús dels cfDNA com a prova de contingència

El cribratge prenatal a partir d'ADN fetal lliure presenta una sensibilitat d'aproximadament el 90 % per detectar trisomies 21, 18 i 13, amb una taxa de falsos positius (FPR) del 5 %²¹¹. Una solució per aprofitar la seva gran sensibilitat i disminuir els falsos positius seria la implementació de les NIPT com a cribratges de contingència. D'aquesta manera, en introduir els cfDNA a les proves rutinàries es poden abaratir costos i millorar la detecció d'alteracions congènites^{107,196}.

A partir dels estudis revisats, trobem que aquest cribratge combinat detecta el 100 % de les trisomies 21 i el 98 % de les trisomies 18²¹². L'utilitat més gran del mètode de contingència és detectar el risc de cada pacient. Amb un 100 % de precisió, les NIPT són capaços d'identificar el grup de risc (alt, intermedi o baix) de l'embaràs¹⁷.

Segons Galeva *et al.*, en un grup de risc alt, la decisió dels progenitors entre CVS i el cribratge amb cfDNA sol acabar en la prova invasiva (Taula 9). En tres de cada sis casos de síndrome de Down, els progenitors decideixen dur a terme una prova de diagnòstic²¹². Es calcula que per 2050, la població amb la síndrome de Down serà quasi inexistent²¹³.

Taula 9: Característiques de l'estudi poblacional a 917 embarassades d'acord amb el risc de presentar la trisomia 21, 18 o 13 (Galeva *et al.*,2019)

	Risc per Trisomies 21, 18 o 13		
	Alt (n=47)	Intermedi (n=203)	Baix (n=667)
Risc estimat (1 de cada X)	24 (5-57)*	463 (276-1182)*	3833 (1952-7321)
Decisió dels progenitors:			
Cribratge per cfDNA	27 (57.4)	186 (91.6)	Ø
Biòpsia de vellositats coriòniques	17 (36.2)	Ø	Ø
Cap	3 (6.4)*	17 (8.4)*	667 (100)

Les dades es troben representades com valors o en percentatge. Alt risc: persones amb una probabilitat igual o superior a 1:10 o amb una transparència en la nuca ≥ 3 mm; Risc moderat o intermedi: persones amb una probabilitat entre 1:11 i 1:1500; Baix risc: persones amb una probabilitat inferior a 1:1500. *Diferències significatives amb el grup de baix risc.

4.4 Implementació clínica de NIPT com a cribratge rutinari

Des de la seva primera implementació clínica l'any 2011, el cribratge amb cfDNA fetal en sang materna s'ha anat estenent arreu del món. Amb el temps, els hospitals més especialitzats en la detecció i diagnòstic prenatal d'alteracions congènites, estan incorporant les proves no invasives (NIPT) al seu ventall de proves rutinàries avançades²¹⁴. En específic, a Europa ja hi ha laboratoris que ofereixen les NIPT, amb cap perill de provocar d'avortaments espontanis, per totes les dones embarassades²¹⁵.

4.4.1 Actual situació de les proves prenatales no invasives a Espanya

El test prenatal no invasiu ja s'ofereix a les embarassades en la sanitat pública de diverses comunitats autònomes; com són Catalunya²¹⁶, Castilla y León²¹⁷, Comunitat Valenciana²¹⁸, Andalucía²¹⁹, Cantabria²²⁰ i Principado de Asturias²²¹. Tot i això, encara no existeix un protocol nacional que reguli la detecció d'aneuploidies, i altres, en l'ADN fetal lliure en sang materna²¹⁴.

A la taula 10 podem observar les principals característiques de les proves no invasives disponibles al mercat amb els seus preus.

Taula 10: Proves prenatales no invasives disponibles des d'Espanya (Desembre 2019)

Prova	Fabricant	País	Elegibilitat	Mètode	Preu
Baby Test Plus ²²²	Sistemas Genómicos	Espanya	Alt risc	NGS	450
Harmony ²²³	Ariosa Diagnostic - Roche	EE.UU.	General i alt risc	TMPS (DANSR)	485
MaternitiT21 Plus ²²⁴	Sequenom	EE.UU.	Alt risc	MPSS	1200
NACE ²²⁵	igenomics	Espanya	General i alt risc	NGS	545
Neobona ²²⁶	Labco-Illumina	Europa	General i alt risc	MPSS	480
Panorama ²²⁷	Natera	EE.UU.	General i alt risc	SNP TMPS	510
Trisomin	NIMGenetics	Espanya	Alt risc	NGS	575
Verifi ²²⁴	Verinata Health (Illumina)	EE.UU.	Alt risc	MPSS	947

El preu està representat en EUROS. Només hi ha les proves disponibles per tot el territori espanyol. MPSS, seqüenciació massiva en paral·lel (en anglès, massively parallel shotgun sequencing); NGS, seqüenciació de nova generació (en anglès, Next Generation Sequencing); SNP, polimorfismes de nucleòtids simples (en anglès, single nucleotide polymorphisms); TMPS, seqüenciació massiva dirigida en paral·lel (en anglès, targeted massively parallel sequencing).

4.4.2 Viabilitat de la implementació del cribratge amb cfDNA a tot el país

4.4.2.1 Avaluació de la relació cost-rendiment de la prova

Substituir les tècniques de cribratge convencional per les proves amb cfDNA reduiria la despesa del sistema sanitari si el cost de la prova és inferior als 744 € per la població general²²⁸. Actualment, el cost d'una prova prenatal no invasiva ronda els 600 € sense assegurança²²⁹. Les variables més importants a tenir en compte són el temps per l'obtenció de resultats, el cost del cribratge, la reducció de les pèrdues fetals relacionades amb les proves invasives i la taxa de naixements viables. En el cas de l'estudi de Benn P, Cumow KJ, *et al.*, 2015, de les 13.176 participants amb embarassos afectats, les NIPT van detectar el 96'5 % dels casos, comparat amb el 85'9 % resultant de cribratges convencionals. Això va comportar una disminució de les proves de diagnòstic invasives del 60 %²²⁸.

Sánchez-Durán *et al.* van avaluar, l'any 2019, l'aplicació clínica dels NIPT com a mètode de contingència en embarassades de risc moderat realitzant un cribratge per les trisomies 21, 18 i 13. Específicament, es compara l'ús de les NIPT com a segona línia en pacients amb resultat positiu pel cribratge habitual enfront del cribratge rutinari de primer/segon trimestre (sense NIPT) en dones embarassades. Es realitza una anàlisi del cost en vers el rendiment en el qual, per mitjà d'un model, s'avaluen diferents mesures dels resultats amb el cost directe dels pagadors. El model divideix la població en dues cohorts depenent del mètode emprat. En primer lloc, els embarassos estudiats amb els mètodes convencionals, que es dividiran en dos grups segons el seu risc detectat; alt (risc $\geq 1:250$) o baix risc ($< 1:250$). En segon lloc, les gestacions estudiades a partir del mètode de contingència; dividides en tres grups: alt risc (risc $\geq 1:10$ o una transparència a la nuca ≥ 3 mm), risc moderat (risc entre 1:11 a 1:1500) i baix risc ($< 1:1500$). A aquelles dones amb un risc moderat, se'ls hi va oferir realitzar un cribratge a partir de l'ADN fetal lliure a la sang materna³¹.

El cost de les dues cohorts va ser bastant similar, tot i que el cribratge de contingència amb NIPT sí que va ser lleugerament més car. S'observa, també, que aquest últim mètode presenta una sensibilitat molt més alta per totes tres trisomies i una reducció important en el nombre de proves de diagnòstic invasiu realitzades. Amb això, els autors poden concloure que l'estratègia de contingència té una millor relació cost-rendiment³¹.

Fairbrother *et al.* suggereixen que un cost de 407 €, o menys, posaria els NIPT com la prova de cribratge principal per sobre dels mètodes convencionals. Aquest valor es va basar en el rendiment de cribratges rutinaris per la detecció de la síndrome de Down, la síndrome d'Edwards i la síndrome de Patau però no per la monosomia associada al cromosoma X. L'estudi presenta un cost total per l'estratègia de contingència de 3.433.218.000 € amb un cost de 497.909 € per cas detectat. Tot i no presentar el cost total de l'estratègia alternativa, l'estudi conclou que, sempre que el cost de la prova sigui inferior als 407 €, el cribratge amb NIPT es presenta com l'alternativa més eficient amb menor cost²³⁰.

Benn *et al.* és un altre estudi en el qual els autors utilitzen el test prenatal Harmony fabricat per Ariosa Diagnostic, departament prenatal de Roche^{223,228}. Aquest estudi analitza el valor econòmic de substituir el cribratge habitual per detectar aneuploidies fetals amb les noves tecnologies de cribratge prenatal no invasives (NIPT) en la població general. Es realitza una anàlisi de la relació cost-rendiment. El resultat de l'estudi presenta una reducció de les proves de diagnòstic invasiu entre el 73'5 % i el 90'9 %²²⁸.

La taula 11 representa els resultats del cas base avaluat per García Pérez *et al.* En aquest, el cost mitjà del programa de cribratge prenatal actual per una població de 100.000 dones embarassades puja fins als 97.675.449 €, amb un cost per pacient de 963 €, mentre que el cost de l'estratègia de cribratge prenatal que incorpora les proves de detecció no invasives com a contingència és de 95.609.469 €, amb un cost per pacient de 949 € aproximadament. Els casos diagnosticats s'ha estimat a partir del ràtio d'incidència de les aneuploidies congènites i ha resultat en 296 i 287 pel mètode rutinari i de contingència, respectivament. Per tant, per una població de 100.000 embarassades, el cribratge amb NIPT suposaria un estalvi de 2.065.980 €. El RCEI es va estimar en 234.596 € per cas de trisomia correctament detectat⁶⁷.

Taula 11: Resultat del model teòric (per 100.000 embarassos) de l'estudi de García Pérez *et al.*, 2016

Característiques	Preu (Abril 2016)	Casos diagnosticats
Cribratge tradicional (sense NIPT)	97.675.449	296
Cribratge prenatal amb NIPT	95.609.469	287
Diferència	-2.065.980	-9
RCEI	234.596 €/cas*	

Preu en EUROS (€). RCEI: Ràtio cost-efectivitat incremental (RCEI = Δ Cost / Δ Efectivitat)
 (*) RCEI positiva, ja que la diferència entre l'efectivitat i el cost tenen el mateix sentit. Negatiu en aquest cas, indicant que l'estratègia avaluada és més econòmica i és més efectiva.

A la taula 12 queden representats els resultats de l'anàlisi de l'impacte pressupostari del programa de cribratge prenatal per la detecció de trisomies amb l'escenari actual o amb diversos escenaris teòrics d'acord amb l'estudi de García Pérez *et al.* En aquest cas teòric, s'ha utilitzat un preu base dels NIPT de 289 €. Aquest va ser el recentment adjudicat en un concurs públic en un hospital de Santander^{67,231}. Es pot observar com, amb una cobertura pública del 80 %, l'impacte econòmic és negatiu. Té menor impacte que els mètodes convencionals⁶⁷.

Taula 12: Resultat de l'anàlisi d'impacte pressupostari anual per diversos escenaris (García Pérez *et al.*, 2016)

Escenari	Població (participació del 80% dels embarassos)	Impacte brut	Impacte net
Actual (sense NIPT)	325.373	317.809.791 €	Ø
Hipotètic (amb NIPT) <i>Cost del NIPT: 289 €</i>	325.373	311.087.643 €	-6.722.148 €

4.4.2.2 Preferència dels progenitors

Per tal de calcular els estadístics d'una prova, o directament la precisió d'aquesta, és molt important tenir en compte la voluntat de les pacients. En aquest cas, si amb el resultat positiu per qualsevol alteració cromosòmica d'una prova de cribratge, la dona embarassada no vol continuar amb el diagnòstic. Serà impossible arribar a discernir entre positius reals o erronis. D'igual manera, enfront d'un resultat negatiu per qualsevol cribratge l'embarassada no realitza cap prova de diagnòstic, normal tenint en compte el perill que poden arribar a comportar, i el seu resultat s'identifica com vertader fals sense cap validesa científica^{31,232}.

És per això que la voluntat de les pacient és molt important a l'hora d'avaluar la possible implementació del cribratge amb cfDNA. Segons Sánchez-Durán *et al.* Després d'una prova de detecció, més del 80 % de les embarassades en el grup de risc moderat van decidir realitzar una NIPT, i més del 90 % de les dones que el van dur a terme van considerar que la duració de la prova i el temps fins a obtenir resultats va ser apropiat^{31,233}.

5. Discussió

5.1 Principals resultats de l'estudi

Els resultats d'aquest estudi confirmen la nostra hipòtesi. Les proves de cribratge a partir de l'ADN fetal lliure en la sang materna presenten una millora important en el poder de detecció d'anomalies cromosòmiques com són les aneuploïdies. Les dades obtingudes corroboren la validesa analítica d'aquesta tècnica descrita en anteriors articles^{46,99-102}. Tot i això, les proves de detecció no invasives no són emprades clínicament pel cribratge d'alteracions en un únic gen; com són les variacions en el genoma originades per canvis, relativament, petits en la seqüència de nucleòtids; d'anomalies en el tub neuronal; com és el cas de l'espina bífida^{50,234}. Les NIPT tampoc poden predir possibles complicacions durant les últimes etapes de l'embaràs⁵⁰. Per tot això, les noves tècniques de detecció anomalies cromosòmiques no poden substituir a totes les proves de cribratge habituals. Cal cercar una estratègia que s'aprofiti de la gran precisió de les NIPT però, alhora, no deixi de detectar altres alteracions com són els defectes estructurals.

Aquest estudi ha donat validesa a la implementació de les proves no invasives amb ADN fetal lliure com a estratègia de contingència de les proves de cribratge combinades habituals per la detecció de les principals alteracions congènites^{20,31,212,235,236}. El test combinat tenia una sensibilitat potencial del 87 % per la síndrome de Down i del 93 % per les síndromes d'Edwards o Patau amb una taxa de positius falsos del 3'4 %; de manera individual, la taxa de detecció per les trisomies anteriors va ser del 98 % i 82 %, respectivament, amb una FPR del 0'25 %. La pràctica de les NIPT com a estratègia de contingència, potencialment, podria identificar la majoria dels embarassos afectats amb una taxa de procediments invasius molt baixa si totes les dones amb un risc elevat escollissin les proves amb cfDNA per sobre de l'anàlisi de les vellositats coriòniques^{17,31,67,205,236,237}.

5.2 Implicacions

Mentre que els estudis previs se centraven a avaluar la implementació de les proves de cribratge no invasives com a alternativa de les tècniques de detecció habituals, aquest treball demostra la seva ineficàcia i estudia l'estratègia de l'ús de les NIPT com a mètode de contingència per aquells grups de risc, reduint així el nombre de procediments invasius realitzats a la població.

Els resultats d'aquest estudi esclareixen la viabilitat de la introducció de les NIPT en el sistema nacional de salut espanyol. Aquest treball ha permès identificar diversos articles i revisions sistemàtiques enfocats en l'estudi de l'ús de les proves prenatales no invasives per la detecció d'alteracions congènites; principals aneuploïdies, com la trisomia 21. Els resultats obtinguts corroboren que les proves de detecció amb cfDNA treuen la millor utilitat com a proves de cribratge i no pas com proves de diagnòstic, de manera que un resultat positiu en les NIPT requereix ser confirmada mitjançant una prova de diagnòstic invasiva com l'amniocentesi o l'anàlisi de les vellositats coriòniques.

Amb tot això, els resultats obtinguts en aquest estudi demostren que és possible introduir el cribratge no invasiu, amb ADN fetal lliure a la sang, al sistema nacional de salut com a prova contingent dintre del programa de cribratge prenatal amb la finalitat de contribuir a la detecció de les aneuploïdies més comunes.

5.3 Comparació amb estudis previs

Les dades presentades en aquest estudi provenen de la revisió sistemàtica de treballs previs que, de manera generalitzada, estudiaven la implementació del cribratge prenatal no invasiu a partir d'ADN fetal lliure a la sang materna.

Totes les anàlisis identificades coincideixen en el fet que la sensibilitat d'aquest cribratge és molt alta per la detecció de la síndrome de Down i menys eficient per les síndromes d'Edwards i Patau. Taylor-Phillips *et al.*, van observar que l'eficàcia més gran de les NIPT s'obtenia en poblacions d'alt risc⁹⁴. Altres estudis com el de Strom *et al.*, també arriben a la conclusió que la prevalença influeix en gran manera a la precisió del cribratge no invasiu²³⁸⁻²⁴². La meta-anàlisi de Mackie *et al.*, en canvi, conclou que el risc de la cohort estudiada no influeix de manera significativa als resultats de la prova. Aquesta dissensió pot ser explicada pels diferents criteris d'inclusió, ja que en la seva revisió només s'inclouen estudis realitzats amb embarassos únics i no es tenen en compte les mides mostrals de la població d'estudi²⁴³. El criteri d'inclusió d'aquest treball sí que té present la mida de la cohort, ja que els resultats d'una població petita no sempre poden arribar a ser representatius de la realitat.

El principal ús de l'estratègia de contingència és aprofitar la gran precisió de les NIPT i, a la mateixa vegada, seguir obtenint informació important; com és l'edat exacta de l'embaràs, el diagnòstic d'anomalies fetals estructurals i embarassos múltiples en etapes inicials de la gestació. Els estudis revisats en aquest treball permeten concloure que, amb la implantació d'aquesta estratègia de contingència, les NIPT permeten millorar la detecció d'anomalies cromosòmiques, disminuir l'ús de proves invasives; les quals comporten un perill per l'embaràs; i disminuir el cost, millorant així la relació preu-rendiment del cribratge prenatal no invasiu^{67,205,236,237}. Amb tot això, estudis com el de Lindquist *et al.*, perceben un risc de pèrdua de diagnòstics d'anomalies cromosòmiques amb l'ús de les proves de detecció no invasives. Aquesta discordança pot ser explicada per la diferència en el criteri de selecció de cada risc. En l'estudi només s'identifiquen dos grups de risc; alt risc ($\geq 1:10$) i baix risc ($< 1:11$)²⁴⁴. En canvi, aquest treball incorpora tres grups de risc seguint les recomanacions del Col·legi Nord-americà d'Obstetres i Ginecòlegs (ACOG, per les seves sigles en anglès); alt risc (risc $\geq 1:10$ o una transparència a la nuca ≥ 3 mm), risc moderat (risc entre 1:11 a 1:1500) i baix risc ($< 1:1500$)⁷⁰.

5.4 Limitacions

La generalització dels resultats està limitada pel nombre de treballs enfocats en l'estudi de les NIPT. Amb tot i això, hi ha alguns aspectes on la fiabilitat d'aquestes dades es veu afectada per la manca de dades disponibles o la metodologia emprada. A causa de la manca de dades disponibles, no es poden confirmar els estadístics de precisió; sensibilitat, especificitat i valors predictius; del cribratge prenatal amb cfDNA en embarassos gemel·lars^{17,48,118,155,245}.

Un altre aspecte a tenir en compte és que, el rendiment teòric observat de l'estratègia de contingència per la detecció de trisomies no resulta en els mateixos avantatges a la realitat. A la pràctica, la majoria de les dones amb resultat positiu per les proves combinades decideixen prosseguir amb les proves de diagnòstic invasiu per sobre de la prova amb cfDNA^{31,232,233}. Això comporta que, els avantatges identificats a partir de les anàlisis i avaluacions de l'impacte econòmic que podria comportar introduir les NIPT, no siguin del tot vàlides³¹.

6. Conclusió

La revisió bibliogràfica duta a terme en aquest treball, em permet concloure que:

- 1) Hi ha suficient evidència disponible per a demostrar la gran precisió de les NIPT per la detecció d'alteracions congènites a part de les trisomies més conegudes. Els estudis revisats, a més, observen una precisió de les NIPT semblant tant en embarassos únics com múltiples per detectar la trisomia 21. Per altres aneuploïdies, les dades existents són massa petites per a distingir canvis significatius.
- 2) Les dones que no reben un resultat per a la prova de cribratge no invasiu, presenten un increment del risc de patir una aneuploïdia.
- 3) Les organitzacions internacionals més prestigioses recomanen la repetició de la prova o el pas a tècniques de diagnòstic invasiu, en cas de fracassar la NIPT.
 - Això redueix la taxa de falsos negatius però, alhora, comporta un augment de les proves invasives. Es redueix el valor predictiu positiu.
- 4) La repetició de la prova de cribratge amb cfDNA només resol el 50 %, aproximadament, dels fracassos. El millor que es pot fer és optar per realitzar el cribratge en un laboratori amb baixa taxa de fracàs, ja que aquesta varia segons les instal·lacions.
- 5) La taxa de fracàs és molt important i hauria de ser inclosa en les mètriques d'una prova, ja que taxes molt elevades impliquen una reducció de la sensibilitat real i dels PPV; i un augment de les proves invasives i dels avortaments involuntaris relacionats amb aquestes.
- 6) La implementació clínica del cribratge amb cfDNA com a mètode de contingència és viable i, a més, podria comportar una major precisió a l'hora de detectar alteracions congènites. Tot i això, la implementació podria acabar tenint un impacte quasi negligible en la realitat a l'hora de reduir el percentatge de proves invasives realitzades, per la decisió dels progenitors.
- 7) La introducció de les NIPT en el sistema nacional de salut requereix considerar molts aspectes tècnics, organitzatius, legals i informatius, destacant especialment l'establiment d'un sol consell genètic i un protocol de bones pràctiques nacional.
- 8) El cribratge prenatal a partir de cfDNA fetal es pot incorporar al sistema de salut públic com a prova de contingència dintre del programa prenatal per la detecció de les trisomies 21, 18 i 13 igual que s'ha fet en algunes de les comunitats autònomes de l'estat espanyol. Això comportaria un impacte pressupostari net d'aproximadament 6.722.148 € al sistema nacional de salut espanyol.

7. Bibliografía

1. Long, A. A., Abuhamad, A. Z. & Warsof, S. L. Modifying Risk of Aneuploidy with a Positive Cell-Free Fetal DNA Result. *Clinics in Laboratory Medicine* **36**, 249–259 (2016).
2. Carmichael, J. B. *et al.* Expanded conventional first trimester screening. *Prenat. Diagn.* **37**, 802–807 (2017).
3. Merkatz, I. R., Nitowsky, H. M., Macri, J. N. & Johnson, W. E. An association between low maternal serum α -fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **148**, 886–894 (1984).
4. Bogart, M. H., Pandian, M. R. & Jones, O. W. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat. Diagn.* **7**, 623–630 (1987).
5. CANICK, J. A. *et al.* Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **95**, 330–333 (1988).
6. Macri, J. N. *et al.* Maternal serum Down syndrome screening: Free β -protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **163**, 1248–1253 (1990).
7. Aitken, D. A. *et al.* Dimeric inhibin A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1231–1236 (1996).
8. Yu, X. H. *et al.* Pregnancy-associated plasma protein-A in atherosclerosis: Molecular marker, mechanistic insight, and therapeutic target. *Atherosclerosis* **278**, 250–258 (2018).
9. Souka, A. P., Von Kaisenberg, C. S., Hyett, J. A., Sonek, J. D. & Nicolaides, K. H. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**, 1005–1021 (2005).
10. Santorum, M., Wright, D., Syngelaki, A., Karagiotti, N. & Nicolaides, K. H. Accuracy of first-trimester combined test in screening for trisomies 21, 18 and 13. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **49**, 714–720 (2017).
11. Kagan, K. O. *et al.* First-trimester risk assessment based on ultrasound and cell-free DNA vs combined screening: a randomized controlled trial. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **51**, 437–444 (2018).
12. Cicero, S., Spencer, K., Avgidou, K., Faiola, S. & Nicolaides, K. H. Maternal serum biochemistry at 11-13+6 weeks in relation to the presence or absence of the fetal nasal bone on ultrasonography in chromosomally abnormal fetuses: An updated analysis of integrated ultrasound and biochemical screening. *Prenat. Diagn.* **25**, 977–983 (2005).
13. Krantz, D. *et al.* First trimester Down syndrome screening with dried blood spots using a dual analyte free beta hCG and PAPP-A immunofluorometric assay. *Prenat. Diagn.* **31**, 869–874 (2011).
14. Henrion, R. (Roger), Dorn, L. & Prado Marcilla, J. M. de. *Manual de diagnóstico prenatal y medicina fetal.* (Masson, 1990).
15. Herman, C. What makes a screening exam “good”? *Virtual Mentor* **8**, 34–37 (2006).
16. Krstić, N. & Običan, S. G. Current landscape of prenatal genetic screening and testing. *Birth Defects Research* **112**, 321–331 (2020).
17. Galeva, S., Gil, M. M., Konstantinidou, L., Akolekar, R. & Nicolaides, K. H. First-trimester screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in singleton and twin pregnancies: factors affecting test failure. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **53**, 804–809 (2019).
18. Intermountain healthcare. *Guía de pruebas prenatales.* (2014).
19. Muller, F., Thalabard, J. C., Ngo, S. & Dommergues, M. Detection and false-positive rates of maternal serum markers for Down syndrome screening according to maternal age in women over 35 years of age. A study of the agreement of eight dedicated software

- packages. *Prenat. Diagn.* **22**, 350–353 (2002).
20. Wald, N. J., Rudnicka, A. R. & Bestwick, J. P. Sequential and contingent prenatal screening for Down syndrome. *Prenat. Diagn.* **26**, 769–777 (2006).
 21. Practice Bulletin No. 163: Screening for Fetal Aneuploidy. *Obstet. Gynecol.* **127**, e123–e137 (2016).
 22. Wald, N. J., Rodeck, C., Hackshaw, A. K. & Rudnicka, A. SURUSS in perspective. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **111**, 521–531 (2004).
 23. 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.* **34**, 1077–1083 (2014).
 24. Cuckle, H. Biochemical screening for Down syndrome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **92**, 97–101 (2000).
 25. Wald, N. J. *et al.* First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: The results of the serum, urine and ultrasound screening study (SURUSS). *Health Technol. Assess. (Rockv)*. **7**, 1–77 (2003).
 26. Matias, A., Montenegro, N. & Blickstein, I. Down syndrome screening in multiple pregnancies. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **32**, 81–96 (2005).
 27. Neveux, L. M., Palomaki, G. E., Knight, G. J. & Haddow, J. E. Multiple marker screening for Down syndrome in twin pregnancies. *Prenat. Diagn.* **16**, 29–34 (1996).
 28. Wapner, R. *et al.* First-trimester screening for trisomies 21 and 18. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1405–1413 (2003).
 29. Zimmermann, R. *et al.* Serum parameters and nuchal translucency in first trimester screening for fetal chromosomal abnormalities. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **103**, 1009–1014 (1996).
 30. Kloza, E. M. & Haddow, J. E. Maternal serum alpha-fetoprotein screening. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **136**, 145 (1980).
 31. Sánchez-Durán, M. Á. *et al.* Clinical application of a contingent screening strategy for trisomies with cell-free DNA: A pilot study. *BMC Pregnancy Childbirth* **19**, 274 (2019).
 32. Baer, R. J. *et al.* Detection rates for aneuploidy by first-trimester and sequential screening. in *Obstetrics and Gynecology* **126**, 753–759 (Lippincott Williams and Wilkins, 2015).
 33. Nicolaides, K. H. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **191**, 45–67 (2004).
 34. Mogra, R., Alabbad, N. & Hyett, J. Increased nuchal translucency and congenital heart disease. *Early Hum. Dev.* **88**, 261–267 (2012).
 35. Nicolaides, K. H., Azar, G., Byrne, D., Mansur, C. & Marks, K. Fetal nuchal translucency: Ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *Br. Med. J.* **304**, 867–869 (1992).
 36. Bakker, M., Pajkrt, E., Mathijssen, I. B. & Bilardo, C. M. Targeted ultrasound examination and DNA testing for Noonan syndrome, in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenat. Diagn.* **31**, 833–840 (2011).
 37. Sotiriadis, A., Papatheodorou, S., Eleftheriades, M. & Makrydimas, G. Nuchal translucency and major congenital heart defects in fetuses with normal karyotype: A meta-analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **42**, 383–389 (2013).
 38. Sankaran, S. Creasy and Resnik's Maternal–Fetal Medicine: Principles and Practice Sixth edition. *Obstet. Med.* **5**, 88–89 (2012).
 39. Sonek, J. D., Cicero, S., Neiger, R. & Nicolaides, K. H. Nasal bone assessment in prenatal screening for trisomy 21. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **195**, 1219–1230 (2006).
 40. Fonseca, A., Nazaré, B. & Canavarro, M. C. *Medical information concerning an infant's congenital anomaly: Successful communication to support parental adjustment and transition Part of the content of this manuscript has been presented at a National Conference in 2013. Disability and Health Journal* **9**, (2016).

41. Estroff, J. A. Imaging clues in the prenatal diagnosis of syndromes and aneuploidy. *Pediatr. Radiol.* **42**, 5–23 (2012).
42. Agathokleous, M., Chaveeva, P., Poon, L. C. Y., Kosinski, P. & Nicolaides, K. H. Meta-analysis of second-trimester markers for trisomy 21. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **41**, 247–261 (2013).
43. Alanay, Y., Krakow, D., Rimoin, D. L. & Lachman, R. S. Angulated femurs and the skeletal dysplasias: Experience of the International Skeletal Dysplasia Registry (1988-2006). *Am. J. Med. Genet. Part A* **143**, 1159–1168 (2007).
44. Nyberg, D. A. *et al.* Isolated sonographic markers for detection of fetal Down syndrome in the second trimester of pregnancy. *J. Ultrasound Med.* **20**, 1053–1063 (2001).
45. Flori, E. *et al.* Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report. *Hum. Reprod.* **19**, 723–724 (2004).
46. Dennis Lo, Y. M. *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* **350**, 485–487 (1997).
47. Grati, F. R. *et al.* Fetoplacental mosaicism: Potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genet. Med.* **16**, 620–624 (2014).
48. Gil, M. M. *et al.* Screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in twin pregnancy: update of The Fetal Medicine Foundation results and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* **53**, 734–742 (2019).
49. Gil, M. M., Accurti, V., Santacruz, B., Plana, M. N. & Nicolaides, K. H. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* **50**, 302–314 (2017).
50. Gregg, A. R. *et al.* Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: A position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet. Med.* **18**, 1056–1065 (2016).
51. Bianchi, D. W. *et al.* DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N. Engl. J. Med.* **370**, 799–808 (2014).
52. Norton, M. E. *et al.* Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1589–1597 (2015).
53. Sachs, A., Blanchard, L., Buchanan, A., Norwitz, E. & Bianchi, D. W. Recommended pre-test counseling points for noninvasive prenatal testing using cell-free DNA: A 2015 perspective. *Prenat. Diagn.* **35**, 968–971 (2015).
54. Lam, W. K. J. *et al.* DNA of erythroid origin is present in human plasma and informs the types of anemia. *Clin. Chem.* **63**, 1614–1623 (2017).
55. Snyder, M. W. *et al.* Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1639–1645 (2015).
56. Bianchi, D. W. *et al.* Noninvasive prenatal testing and incidental detection of occult maternal malignancies. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **314**, 162–169 (2015).
57. Ashoor, G., Poon, L., Syngelaki, A., Mosimann, B. & Nicolaides, K. H. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: Effect of maternal and fetal factors. *Fetal Diagn. Ther.* **31**, 237–243 (2012).
58. Hartwig, T. S., Ambye, L., Sørensen, S. & Jørgensen, F. S. Discordant non-invasive prenatal testing (NIPT) – a systematic review. *Prenat. Diagn.* **37**, 527–539 (2017).
59. Palomaki, G. E. *et al.* Circulating cell free DNA testing: Are some test failures informative? *Prenat. Diagn.* **35**, 289–293 (2015).
60. Abou Tayoun, A. N., Spinner, N. B., Rehm, H. L., Green, R. C. & Bianchi, D. W. Prenatal DNA Sequencing: Clinical, Counseling, and Diagnostic Laboratory Considerations. *Prenat. Diagn.* **38**, 26–32 (2018).
61. Hill, M. *et al.* Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: Detection of paternal mutations, exploration of patient preferences and cost analysis. *Prenat. Diagn.* **35**, 950–958 (2015).
62. Zhang, J. *et al.* Non-invasive prenatal sequencing for multiple Mendelian monogenic

- disorders using circulating cell-free fetal DNA. *Nat. Med.* **25**, 439–447 (2019).
63. Huseman, A. Baylor Genetics launches PreSeek™ - 1st non-invasive prenatal multi-gene sequencing screen. *Baylor College of Medicine News* (2017). Available at: <https://www.bcm.edu/news/genetics/baylor-genetics-prenatal-sequencing>. (Accessed: 14th May 2020)
 64. Rink, B. D. & Norton, M. E. Screening for fetal aneuploidy. *Semin. Perinatol.* **40**, 35–43 (2016).
 65. Progenity launches first commercially available, custom-designed, noninvasive prenatal test for monogenic diseases | Progenity. (2019). Available at: <https://www.progenity.com/news/progenity-launches-first-commercially-available-custom-designed-noninvasive-prenatal-test>. (Accessed: 14th May 2020)
 66. Cell-free DNA to Screen for Single-Gene Disorders | ACOG. (2019). Available at: <https://www.acog.org/clinical/clinical-guidance/practice-advisory/articles/2019/02/cell-free-dna-to-screen-for-single-gene-disorders>. (Accessed: 14th May 2020)
 67. García Pérez L. *et al.* Análisis de ADN fetal en sangre materna para la detección de trisomías 21, 18 y 13. (2016).
 68. Ross, L. F. A re-examination of the use of ethnicity in prenatal carrier testing. *Am. J. Med. Genet. Part A* **158 A**, 19–23 (2012).
 69. Carrier screening in the age of genomic medicine. *Obstet. Gynecol.* **129**, e35–e40 (2017).
 70. Stevens, B., Krstic, N., Jones, M., Murphy, L. & Hoskovec, J. Finding Middle Ground in Constructing a Clinically Useful Expanded Carrier Screening Panel. *Obstet. Gynecol.* **130**, 279–284 (2017).
 71. Moore, B. A. & Barnett, J. E. *Oxford Clinical Psychology Military Psychologists ' Desk Reference. Case Studies in Clinical Psychological Science: Bridging the Gap from Science to Practice* (2015). doi:10.1093/med
 72. Akolekar, R., Beta, J., Picciarelli, G., Ogilvie, C. & D'Antonio, F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **45**, 16–26 (2015).
 73. Alfirevic, Z., Navaratnam, K. & Mujezinovic, F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, (2017).
 74. Sundberg, K. *et al.* Randomised study of risk of fetal loss related to early amniocentesis versus chorionic villus sampling. *Lancet* **350**, 697–703 (1997).
 75. Tanvisut, R. *et al.* Cordocentesis-associated fetal loss and risk factors: experience of 6650 cases from a single center. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* (2020). doi:10.1002/uog.21980
 76. Berry, S. M., Stone, J., Norton, M. E., Johnson, D. & Berghella, V. Fetal blood sampling. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **209**, 170–180 (2013).
 77. The American College of Obstetricians and Gynecologists. Prenatal Genetic Diagnostic Tests. *American College of Obstetricians and Gynecologists* 3–5 (2015). Available at: <http://www.acog.org/Patients/FAQs/Diagnostic-Tests-for-Birth-Defects>. (Accessed: 16th May 2020)
 78. Poduri, A., Evrony, G. D., Cai, X. & Walsh, C. A. Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science (80-)*. **341**, 1237758 (2013).
 79. Kalousek, D. K. & Vekemans, M. Confined placental mosaicism. *J. Med. Genet.* **33**, 529–533 (1996).
 80. Srebniak, M. I. *et al.* Prenatal SNP array testing in 1000 fetuses with ultrasound anomalies: Causative, unexpected and susceptibility CNVs. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**, 645–651 (2016).
 81. Wapner, R. J. *et al.* Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2175–2184 (2012).
 82. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (80-)*. **270**, 467–

- 470 (1995).
83. Donnelly, J. C. *et al.* Association of copy number variants with specific ultrasonographically detected fetal anomalies. in *Obstetrics and Gynecology* **124**, 83–90 (Lippincott Williams and Wilkins, 2014).
 84. Levy, B. & Wapner, R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. *Fertil. Steril.* **109**, 201–212 (2018).
 85. Stosic, M., Levy, B. & Wapner, R. The Use of Chromosomal Microarray Analysis in Prenatal Diagnosis. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **45**, 55–68 (2018).
 86. Best, S. *et al.* Promises, pitfalls and practicalities of prenatal whole exome sequencing. *Prenat. Diagn.* **38**, 10–19 (2018).
 87. Ferretti, L., Mellis, R. & Chitty, L. S. Update on the use of exome sequencing in the diagnosis of fetal abnormalities. *Eur. J. Med. Genet.* **62**, 103663 (2019).
 88. Mone, F., Quinlan-Jones, E. & Kilby, M. D. Clinical utility of exome sequencing in the prenatal diagnosis of congenital anomalies: A Review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **231**, 19–24 (2018).
 89. Westerfield, L. E. *et al.* Reproductive genetic counseling challenges associated with diagnostic exome sequencing in a large academic private reproductive genetic counseling practice. *Prenat. Diagn.* **35**, 1022–1029 (2015).
 90. Westerfield, L., Darilek, S. & van den Veyver, I. Counseling Challenges with Variants of Uncertain Significance and Incidental Findings in Prenatal Genetic Screening and Diagnosis. *J. Clin. Med.* **3**, 1018–1032 (2014).
 91. Wou, K., Chung, W. K. & Wapner, R. J. Laboratory considerations for prenatal genetic testing. *Semin. Perinatol.* **42**, 307–313 (2018).
 92. Horn, R. & Parker, M. Opening Pandora’s box?: ethical issues in prenatal whole genome and exome sequencing. *Prenat. Diagn.* **38**, 20–25 (2018).
 93. Reiff, M. *et al.* ‘What does it mean?’: Uncertainties in understanding results of chromosomal microarray testing. *Genet. Med.* **14**, 250–258 (2012).
 94. Taylor-Phillips, S. *et al.* Open 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* **6**, (2016).
 95. Chandrasekharan, S., Minear, M. A., Hung, A. & Allyse, M. Noninvasive prenatal testing goes global. *Sci. Transl. Med.* **6**, 231fs15 (2014).
 96. Leighton, J. W., Valverde, K. & Bernhardt, B. A. The general public’s understanding and perception of direct-to-consumer genetic test results. *Public Health Genomics* **15**, 11–21 (2011).
 97. Chetty, S., Garabedian, M. J. & Norton, M. E. Uptake of noninvasive prenatal testing (NIPT) in women following positive aneuploidy screening. *Prenat. Diagn.* **33**, 542–546 (2013).
 98. Edwards, J. G. *et al.* Expanded carrier screening in reproductive medicine—points to consider. *Obstet. Gynecol.* **125**, 653–662 (2015).
 99. Stokowski, R. *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.* **35**, 1243–1246 (2015).
 100. Fan, H. C. & Quake, S. R. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal. Chem.* **79**, 7576–7579 (2007).
 101. Lo, Y. M. D. *et al.* Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13116–13121 (2007).
 102. Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L. & Quake, S. R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16266–16271 (2008).
 103. Palomaki, G. E. *et al.* DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An

- international clinical validation study. *Genet. Med.* **13**, 913–920 (2011).
104. Ehrich, M. *et al.* Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: A study in a clinical setting. in *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **204**, 205.e1-205.e11 (Mosby Inc., 2011).
 105. Norton, M. E. *et al.* Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: Results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **207**, 137.e1-137.e8 (2012).
 106. Bianchi, D. W. *et al.* Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet. Gynecol.* **119**, 890–901 (2012).
 107. Nicolaides, K. H., 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.* **33**, 575–579 (2013).
 108. Ashoor, G., Syngelaki, A., Wagner, M., Birdir, C. & Nicolaides, K. H. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **206**, 322.e1-322.e5 (2012).
 109. Sparks, A. B., Struble, C. A., Wang, E. T., Song, K. & Oliphant, A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: Evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **206**, 319.e1-319.e9 (2012).
 110. Zimmermann, B. *et al.* Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat. Diagn.* **32**, 1233–1241 (2012).
 111. Zhang, H. *et al.* Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: Clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **45**, 530–538 (2015).
 112. Yaron, Y. The implications of non-invasive prenatal testing failures: A review of an under-discussed phenomenon. *Prenatal Diagnosis* **36**, 391–396 (2016).
 113. Naeger, D. M. *et al.* Correctly using sensitivity, specificity, and predictive values in clinical practice: How to avoid three common pitfalls. *Am. J. Roentgenol.* **200**, (2013).
 114. Bayes, T. LII. An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. By the late Rev. Mr. Bayes, F. R. S. communicated by Mr. Price, in a letter to John Canton, A. M. F. R. S. *Philos. Trans. R. Soc. London* **53**, 370–418 (1763).
 115. Morain, S., Greene, M. F. & Mello, M. M. A new era in noninvasive prenatal testing. *N. Engl. J. Med.* **369**, 499–501 (2013).
 116. Bevilacqua, E. *et al.* Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **45**, 61–66 (2015).
 117. Yu, W. *et al.* Screening of fetal chromosomal aneuploidy diseases using noninvasive prenatal testing in twin pregnancies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **19**, 189–196 (2019).
 118. Le Conte, G. *et al.* Cell-free fetal DNA analysis in maternal plasma as screening test for trisomies 21, 18 and 13 in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **52**, 318–324 (2018).
 119. Huang, X. *et al.* Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies. *Prenat. Diagn.* **34**, 335–340 (2014).
 120. Yang, J. *et al.* Performance of non-invasive prenatal testing for trisomies 21 and 18 in twin pregnancies. *Mol. Cytogenet.* **11**, (2018).
 121. Smid, M. *et al.* Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cells. *Clinical Chemistry* **45**, (1999).
 122. Chen, H., Wang, T., He, G., Zhu, L. & Ma, T. Gene analysis of free fetal DNA in maternal plasma. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.* **21**, 329–331 (2001).
 123. Al-Yatama, M. K. *et al.* Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction. *Prenat. Diagn.* **21**, 399–402 (2001).

124. Costa, J. M. *et al.* First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat. Diagn.* **21**, 1070–1074 (2001).
125. Rijnders, R. J. P., van der Schoot, C. E., Bossers, B., de Vroede, M. A. M. J. & Christiaens, G. C. M. L. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet. Gynecol.* **98**, 374–378 (2001).
126. Sekizawa, A. *et al.* Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* **47**, 1856–1858 (2001).
127. Xiao Yan Zhong, Holzgreve, W. & Hahn, S. Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. *Swiss Med. Wkly.* **131**, 70–74 (2001).
128. Wei, C., Saller, D. N. & Sutherland, J. W. H. Detection and quantification by homogeneous PCR of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* **47**, 336–338 (2001).
129. Siva, S. C., Johnson, S. I., McCracken, S. A. & Morris, J. M. Evaluation of the clinical usefulness of isolation of fetal DNA from the maternal circulation. *Aust. New Zeal. J. Obstet. Gynaecol.* **43**, 10–15 (2003).
130. Cremonesi, L. *et al.* Feasibility study for a microchip-based approach for noninvasive prenatal diagnosis of genetic diseases. in *Annals of the New York Academy of Sciences* **1022**, 105–112 (New York Academy of Sciences, 2004).
131. Rijnders, R. J. P. *et al.* Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet. Gynecol.* **103**, 157–164 (2004).
132. Hwa, H. L., Ko, T. M., Yen, M. L. & Chiang, Y. L. Fetal gender determination using real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of maternal plasma. *J. Formos. Med. Assoc.* **103**, 364–368 (2004).
133. Ho, S. S. *et al.* Non-invasive prenatal diagnosis of fetal gender using real-time polymerase chain reaction amplification of SRY in maternal plasma. *Ann. Acad. Med. Singapore* **33**, (2004).
134. Zhao, X. X., Suzumori, N., Ozaki, Y., Sato, T. & Suzumori, K. Examination of fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood for fetal gender determination. *Gynecol. Obstet. Invest.* **58**, 57–60 (2004).
135. Hyett, J. A. *et al.* Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat. Diagn.* **25**, 1111–1116 (2005).
136. Zhu, B. *et al.* Prenatal fetal sex diagnosis by detecting amelogenin gene in maternal plasma. *Prenat. Diagn.* **25**, 577–581 (2005).
137. Zolotukhina, T. V., Shilova, N. V. & Voskoboeva, E. Y. Analysis of cell-free fetal DNA in plasma and serum of pregnant women of pregnant women. in *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **53**, 297–299 (J Histochem Cytochem, 2005).
138. Zhou, L. *et al.* Noninvasive prenatal RHD genotyping by real-time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **193**, 1966–1971 (2005).
139. Ge, Q. *et al.* Detection of fetal DNA in maternal plasma by microarray coupled with emulsions PCR. *Clin. Chim. Acta* **369**, 82–88 (2006).
140. Deng, Z. H. *et al.* Noninvasive genotyping of 9 Y-chromosome specific STR loci using circulatory fetal DNA in maternal plasma by multiplex PCR. *Prenat. Diagn.* **26**, 362–368 (2006).
141. Davaliev, K., Dimcev, P., Efremov, G. & Plaseska-Karanfilska, D. Non-invasive fetal sex determination using real-time PCR. *J. Matern. Neonatal Med.* **19**, 337–342 (2006).
142. Chi, C., Hyett, J. A., Finning, K. M., Lee, C. A. & Kadir, R. A. Non-invasive first trimester determination of fetal gender: A new approach for prenatal diagnosis of haemophilia. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **113**, 239–242 (2006).
143. Dresch Martinhago, C. *et al.* Accuracy of fetal gender determination in maternal plasma at 5 and 6 weeks of pregnancy. *Prenat. Diagn.* **26**, 1219–1223 (2006).
144. Santacroce, R. *et al.* Identification of fetal gender in maternal blood is a helpful tool in

- the prenatal diagnosis of haemophilia. *Haemophilia* **12**, 417–422 (2006).
145. Al-Yatama, M. K. *et al.* Polymerase-chain-reaction-based detection of fetal rhesus D and Y-chromosome-specific DNA in the whole blood of pregnant women during different trimesters of pregnancy. *Med. Princ. Pract.* **16**, 327–332 (2007).
 146. Boon, E. M. J. *et al.* Y chromosome detection by Real Time PCR and pyrophosphorolysis-activated polymerisation using free fetal DNA isolated from maternal plasma. *Prenat. Diagn.* **27**, 932–937 (2007).
 147. Liu, F. M. *et al.* Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **86**, 535–541 (2007).
 148. Illanes, S., Denbow, M., Kailasam, C., Finning, K. & Soothill, P. W. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum. Dev.* **83**, 563–566 (2007).
 149. Bustamante-Aragones, A. *et al.* Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: Direct and indirect study. *Eur. J. Neurol.* **15**, 1338–1344 (2008).
 150. Picchiassi, E. *et al.* The best approach for early prediction of fetal gender by using free fetal DNA from maternal plasma. *Prenat. Diagn.* **28**, 525–530 (2008).
 151. Tungwiwat, W., Fucharoen, S., Fucharoen, G., Ratanasiri, T. & Sanchaisuriya, K. Accuracy of fetal gender detection using a conventional nested PCR assay of maternal plasma in daily practice. *Aust. New Zeal. J. Obstet. Gynaecol.* **48**, 501–504 (2008).
 152. Minon, J. M., Gerard, C., Senterre, J. M., Schaaps, J. P. & Foidart, J. M. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: A four-year experience in Belgium. *Transfusion* **48**, 373–381 (2008).
 153. Vecchione, G. *et al.* Fetal sex identification in maternal plasma by means of short tandem repeats on chromosome X. in *Annals of the New York Academy of Sciences* **1137**, 148–156 (Blackwell Publishing Inc., 2008).
 154. Wagner, J., Džijan, S., Pavan-Jukić, D., Wagner, J. & Lauc, G. Analysis of multiple loci can increase reliability of detection of fetal Y-chromosome DNA in maternal plasma. *Prenat. Diagn.* **28**, 412–416 (2008).
 155. Sesarini, C. *et al.* Non invasive prenatal genetic diagnosis of fetal RhD and sex through the analysis of free fetal DNA in maternal plasma. *Arch. Argent. Pediatr.* **107**, 405–409 (2009).
 156. Hyland, C. A. *et al.* Evaluation of non-invasive prenatal RHD genotyping of the fetus. *Med. J. Aust.* **191**, 21–25 (2009).
 157. Wang, X. D. *et al.* Non-invasive foetal RHD genotyping via real-time PCR of foetal DNA from Chinese RhD-negative maternal plasma. *Eur. J. Clin. Invest.* **39**, 607–617 (2009).
 158. Akolekar, R., Farkas, D. H., VanAgtmael, A. L., Bombard, A. T. & Nicolaides, K. H. Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) at 11 to 13 weeks of gestation. *Prenat. Diagn.* **30**, 918–923 (2010).
 159. Scheffer, P. G. *et al.* Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. *Obstet. Gynecol.* **115**, 117–126 (2010).
 160. Vora, N. L. *et al.* Circulating cell-free DNA levels increase variably following chorionic villus sampling. *Prenat. Diagn.* **30**, 325–328 (2010).
 161. Hill, M. *et al.* Non-invasive prenatal determination of fetal sex: Translating research into clinical practice. *Clin. Genet.* **80**, 68–75 (2011).
 162. Tynan, J. A. *et al.* Multiplexed analysis of circulating cell-free fetal nucleic acids for noninvasive prenatal diagnostic RHD testing. in *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **204**, 251.e1–251.e6 (Mosby Inc., 2011).
 163. Sehnert, A. J. *et al.* Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin. Chem.* **57**, 1042–1049 (2011).
 164. Sirichotiyakul, S., Charoenkwan, P. & Sanguansermisri, T. Prenatal diagnosis of homozygous alpha-thalassemia-1 by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Prenat. Diagn.* **32**, 45–49 (2012).

165. Mortarino, M. *et al.* Non-invasive tool for foetal sex determination in early gestational age. *Haemophilia* **17**, 952–956 (2011).
166. MokariZadeh, N., Mesbah-Namin, A. & Ala, F. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal sex by a new highly sensitive Real-time PCR. *Clin. Biochem.* **44**, S100–S101 (2011).
167. Aghanoori, M. R., Vafaei, H., Kavoshi, H., Mohamadi, S. & Goodarzi, H. R. Sex determination using free fetal DNA at early gestational ages: A comparison between a modified mini-STR genotyping method and real-time PCR. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **207**, 202.e1-202.e8 (2012).
168. Fernández-Martínez, F. J. *et al.* Noninvasive fetal sex determination in maternal plasma: A prospective feasibility study. *Genet. Med.* **14**, 101–106 (2012).
169. Rong, Y., Gao, J., Jiang, X. & Zheng, F. Multiplex PCR for 17 Y-chromosome specific short tandem repeats (STR) to enhance the reliability of fetal sex determination in maternal plasma. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 5972–5981 (2012).
170. Sbarsi, I. *et al.* Implementing non-invasive RHD genotyping on cell-free foetal DNA from maternal plasma: The Pavia experience. *Blood Transfus.* **10**, 34–38 (2012).
171. Kolialexi, A. *et al.* Early non-invasive detection of fetal y chromosome sequences in maternal plasma using multiplex PCR. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **161**, 34–37 (2012).
172. Kim, S. Y. *et al.* Non-invasive prenatal determination of fetal gender using QF-PCR analysis of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chim. Acta* **413**, 600–604 (2012).
173. Lim, J. H. *et al.* Effective detection of fetal sex using circulating fetal DNA in first-trimester maternal plasma. *FASEB J.* **26**, 250–258 (2012).
174. Lau, T. K. *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing. *J. Matern. Neonatal Med.* **25**, 1370–1374 (2012).
175. Perlado-Marina, S. *et al.* Overview of Five-Years of Experience Performing Non-Invasive Fetal Sex Assessment in Maternal Blood. *Diagnostics* **3**, 283–290 (2013).
176. Moise, K. J. *et al.* Circulating cell-free fetal DNA for the detection of RHD status and sex using reflex fetal identifiers. *Prenat. Diagn.* **33**, 95–101 (2013).
177. Porreco, R. P. *et al.* Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **211**, 365.e1-365.e12 (2014).
178. Turner, M. J., Martin, C. M. & O’Leary, J. J. Detection of fetal Rhesus D gene in whole blood of women booking for routine antenatal care. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **108**, 29–32 (2003).
179. Hromadnikova, I. *et al.* Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. in *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **53**, 301–305 (J Histochem Cytochem, 2005).
180. Gautier, E. *et al.* Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: A two-year experience. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**, 666–669 (2005).
181. Machado, I. N., Castilho, L., Pellegrino, J. & Barini, R. Fetal RHD genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **52**, 232–235 (2006).
182. Rouillac-Le Sciellour, C. *et al.* Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD®. *Transfus. Clin. Biol.* **14**, 572–577 (2007).
183. Grill, S. *et al.* High throughput non-invasive determination of foetal Rhesus D status using automated extraction of cell-free foetal DNA in maternal plasma and mass spectrometry. *Arch. Gynecol. Obstet.* **279**, 533–537 (2009).
184. Aykut, A. *et al.* Determination of fetal Rhesus D status by maternal plasma DNA analysis. *Balk. J. Med. Genet.* **16**, 33–38 (2013).
185. Mohammed, N., Kakal, F., Somani, M. & Zafar, W. Non-invasive prenatal determination of fetal RhD genotyping from maternal plasma: A preliminary study in Pakistan. *J. Coll.*

- Physicians Surg. Pakistan* **20**, 246–249 (2010).
186. Günel, T., Kalelioğlu, I., Ermiş, H. & Aydınli, K. Maternal kandan fetal RhD tayini. *J. Turkish Ger. Gynecol. Assoc.* **11**, 82–85 (2010).
 187. Achargui, S., Tijane, M. & Benchemi, N. Fetal RHD genotyping by PCR using plasma from D negative pregnant women. *Transfus. Clin. Biol.* **18**, 13–19 (2011).
 188. Bombard, A. T. *et al.* Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. *Prenat. Diagn.* **31**, 802–808 (2011).
 189. Han, S. *et al.* Noninvasive Fetal RhD Genotyping Using Circulating Cell-free Fetal DNA from Maternal Plasma in RhD-negative Pregnant Women. in *Journal of Molecular Diagnostics* **14**, 648 (2012).
 190. Clausen, F. B. *et al.* Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D-pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion* **52**, 752–758 (2012).
 191. Manzanares, S. *et al.* Noninvasive fetal RhD status determination in early pregnancy. *Fetal Diagn. Ther.* **35**, 7–12 (2014).
 192. Polin, J. I. & Frangipane, W. L. Current concepts in management of obstetric problems for pediatricians. I. Monitoring the high-risk fetus. *Pediatr. Clin. North Am.* **33**, 621–647 (1986).
 193. Chitty, L. S. & Kroese, M. Realising the promise of non-invasive prenatal testing: It should transform the quality of antenatal care. *BMJ* **350**, (2015).
 194. Chen, E. Z. *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma dna sequencing. *PLoS One* **6**, (2011).
 195. Jiang, F. *et al.* Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: An advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies. *BMC Med. Genomics* **5**, 57 (2012).
 196. Nicolaides, K. H., 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.* **207**, 374.e1-374.e6 (2012).
 197. Guex, N. *et al.* A robust second-generation genome-wide test for fetal aneuploidy based on shotgun sequencing cell-free DNA in maternal blood. *Prenat. Diagn.* **33**, 707–710 (2013).
 198. Liang, D. *et al.* Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing. *Prenat. Diagn.* **33**, 409–415 (2013).
 199. Song, Y. *et al.* Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat. Diagn.* **33**, 700–706 (2013).
 200. Pergament, E. *et al.* Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. *Obstet. Gynecol.* **124**, 210–218 (2014).
 201. Shaw, S. W. S. *et al.* Noninvasive prenatal testing for whole fetal chromosomal aneuploidies: A multicenter prospective cohort trial in Taiwan. *Fetal Diagn. Ther.* **35**, 13–17 (2014).
 202. Stumm, M. *et al.* Diagnostic accuracy of random massively parallel sequencing for non-invasive prenatal detection of common autosomal aneuploidies: A collaborative study in Europe. *Prenat. Diagn.* **34**, 185–191 (2014).
 203. Quezada, M. S., Gil, M. M., Francisco, C., Oròsz, G. & Nicolaides, K. H. Screening for trisomies 21, 18 and 13 by cell-free DNA analysis of maternal blood at 10-11 weeks' gestation and the combined test at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **45**, 36–41 (2015).
 204. Song, Y. *et al.* Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidies in the first trimester of pregnancy. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **45**, 55–60 (2015).
 205. Dar, P. *et al.* Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. in *American Journal of*

- Obstetrics and Gynecology* **211**, 527.e1-527.e17 (Mosby Inc., 2014).
206. Bianchi, D. W. Cherchez la femme: maternal incidental findings can explain discordant prenatal cell-free DNA sequencing results. *Genetics in Medicine* **20**, 910–917 (2018).
 207. Chan, N., Smet, M. E., Sandow, R., Da Silva Costa, F. & McLennan, A. Implications of Failure to Achieve a Result from Prenatal Maternal Serum Cell-Free DNA Testing: A Historical Cohort Study. *Obstetrical and Gynecological Survey* **73**, 611–613 (2018).
 208. Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy. *Obstetrics and gynecology* **126**, e31–e37 (2015).
 209. Instituto Nacional de Estadística. *España en cifras 2019*. (2019).
 210. Mai, C. T. *et al.* National population-based estimates for major birth defects, 2010–2014. *Birth Defects Res.* **111**, 1420–1435 (2019).
 211. Nicolaides, K. H. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenatal Diagnosis* **31**, 7–15 (2011).
 212. Galeva, S., Konstantinidou, L., Gil, M. M., Akolekar, R. & Nicolaides, K. H. Routine first-trimester screening for fetal trisomies in twin pregnancy: cell-free DNA test contingent on results from combined test. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **53**, 208–213 (2019).
 213. Pascual, A. La población Down se hunde en España: de 300.000 al país con menos nacimientos. *El Confidencial* (2019).
 214. Dolores, H. & Mujer y Madre. Diagnóstico prenatal: test prenatal no invasivo | Mujer y MADRE hoy. (2019). Available at: <https://mujerymadrehoy.com/diagnostico-prenatal-que-es-el-test-prenatal-no-invasivo/>. (Accessed: 30th April 2020)
 215. Pennelli, F. & La Vanguardia. COMUNICADO: Prueba prenatal no invasiva (NIPT) de Dante Labs para las mamás europeas embarazadas. *La Vanguardia* (2019).
 216. El Ramón y Cajal, primer hospital español en certificarse para el test prenatal. *TeleMadrid* (2018).
 217. Catalina Coello, M., García Mangas, M. J., Vázquez González, R., Herrador García, I. & Álvarez Blanco, A. *Análisis del test prenatal no invasivo desde su inclusión en nuestra cartera de servicios en enero de 2018*. (2018).
 218. Europa Press. Sanidad incluye el Test Prenatal No Invasivo como prueba complementaria en el primer trimestre de embarazo. (2019).
 219. Fornieles García, Y. & Díaz Martínez, A. *Programa Andaluz para el Cribado de Anomalías Congénitas. Plan de Genética de Andalucía, Sistema Sanitario Publico de Andalucía* **2010**, (2011).
 220. Mar Sanchez Movellan *et al.* *Protocolo para la detección de aneuploidías en ADN fetal libre en sangre materna*. (2016).
 221. Fernández Vic, Á., Prieto García, B., Moreno Calvo, F. & García Gonzalez, M. C. *Programa de Detección de Anomalías Cromosómicas Fetales del Principado de Asturias*. (2009).
 222. Centro Médico Teknon. Test Prenatal No Invasivo. *Sanitas* (2019). Available at: <http://www.teknon.es/servicio-de-diagnosticos/laboratorio-analisis-clinico/test-prenatal-no-invasivo>. (Accessed: 31st May 2020)
 223. Test prenatal no invasivo Harmony Test en Megalab Santander. *iGlobalMed* (2019). Available at: <https://www.iglobalmed.com/santander/test-prenatal-no-invasivo-harmony-test-en-megalab-santander>. (Accessed: 31st May 2020)
 224. New prenatal test for spotting genetic issues is less invasive but its pricey. *The Washington Post* Available at: https://www.washingtonpost.com/gdpr-consent/?next_url=https%3A%2F%2Fwww.washingtonpost.com%2Fnational%2Fhealth-science%2Fa-new-prenatal-test-for-spotting-genetic-issues-is-less-invasive-but-its-pricey%2F2012%2F11%2F26%2F8dd799de-2780-11e2-b4f2-8320a9f0086. (Accessed: 31st May 2020)
 225. Test prenatal no invasivo: en qué consiste, opiniones de usuarios y precio. *iGenomix* (2019). Available at: <https://nace.igenomix.es/test-prenatal-no-invasivo/#precio>. (Accessed: 31st May 2020)

226. Interactiva, C. La nueva generacin de Test Prenatal No Invasivo. *neoBona* (2020). Available at: <http://www.neobona.es/profesional-sanitario.aspx/>. (Accessed: 31st May 2020)
227. Art, L. Common Questions : Layers. Available at: <https://www.natera.com/constellation-genetic-testing/common-questions>. (Accessed: 31st May 2020)
228. Benn, P. *et al.* An economic analysis of cell-free DNA Non-invasive prenatal testing in the US general pregnancy population. *PLoS One* **10**, 132313 (2015).
229. R. López, M. La alternativa a la amniocentesis existe, pero no para todos los bolsillos. *El País* (2017).
230. Fairbrother, G., Burigo, J., Sharon, T. & Song, K. Prenatal screening for fetal aneuploidies with cell-free DNA in the general pregnancy population: A cost-effectiveness analysis. *J. Matern. Neonatal Med.* **29**, 1160–1164 (2016).
231. Boletín Oficial de Cantabria. 102. *Resolución del Servicio Cántabro de Salud, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander, por la que se hace pública la formalización del contrato del procedimiento abierto HV 2016/0/0039.* (2016).
232. Guy, C. *et al.* Prenatal cell-free DNA screening for fetal aneuploidy in pregnant women at average or high risk: Results from a large US clinical laboratory. *Mol. Genet. Genomic Med.* **7**, (2019).
233. Howard-Bath, A., Poulton, A., Halliday, J. & Hui, L. Population-based trends in the prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidy before and after non-invasive prenatal testing. *Prenat. Diagn.* **38**, 1062–1068 (2018).
234. Racusin, D. A. *et al.* Role of Maternal Serum Alpha-Fetoprotein and Ultrasonography in Contemporary Detection of Spina Bifida. in *American Journal of Perinatology* **32**, 1287–1291 (Thieme Medical Publishers, Inc., 2015).
235. Gil, M. M., Revello, R., Poon, L. C., Akolekar, R. & Nicolaides, K. H. Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: Cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **47**, 45–52 (2016).
236. Miltoft, C. B. *et al.* Contingent first-trimester screening for aneuploidies with cell-free DNA in a Danish clinical setting. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **51**, 470–479 (2018).
237. Gil, M. M., Quezada, M. S., Revello, R., Akolekar, R. & Nicolaides, K. H. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: Updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **45**, 249–266 (2015).
238. Strom, C. M. *et al.* Improving the positive predictive value of Non-Invasive Prenatal Screening (NIPS). *PLoS One* **12**, (2017).
239. Tamminga, S. *et al.* Maternal Plasma DNA and RNA Sequencing for Prenatal Testing. in *Advances in Clinical Chemistry* **74**, 63–102 (Academic Press Inc., 2016).
240. Cai, A. J. *et al.* [Analysis of non-invasive prenatal screening detection in fetal chromosome aneuploidy]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **52**, 765–769 (2017).
241. Mak, A. *et al.* Factors associated with common and atypical chromosome abnormalities after positive combined first-trimester screening in Chinese women: A retrospective cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth* **19**, (2019).
242. Voigt, H. J., Beinder, E. & Claussen, U. Sonographical recognition of indications of chromosomal anomalies in the first and second trimester: Results of a prospective study. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* **54**, 460–467 (1994).
243. Mackie, F. L., Hemming, K., Allen, S., Morris, R. K. & Kilby, M. D. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* **124**, 32–46 (2017).
244. Lindquist, A., Poulton, A., Halliday, J. & Hui, L. Prenatal diagnostic testing and atypical chromosome abnormalities following combined first-trimester screening: implications for contingent models of non-invasive prenatal testing. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **51**, 487–492 (2018).

245. Sarno, L., Revello, R., Hanson, E., Akolekar, R. & Nicolaides, K. H. Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **47**, 705–711 (2016).