

Kontingentní NIPT screening – výsledky centra prenatální diagnostiky GENNET 2017 - 2019

David Stejskal, Monika Koudová

GENNET, s.r.o., Praha

Korespondenční adresa: MUDr. David Stejskal, GENNET, s.r.o., Kostelní 9, 170 00 Praha 7, tel.: +420 222 313 000, e-mail: david.stejskal@gennet.cz

Publikováno: 19. 8. 2020
Actual Gyn 2020, 12, 46-51

Přijato: 15. 7. 2020
ISSN 1803-9588

Akceptováno: 11. 8. 2020
© 2020, Aprofema s.r.o.



Článek lze stáhnout z www.actualgyn.com

Citujte tento článek jako: Stejskal D, Koudová M. Kontingentní NIPT screening – výsledky centra prenatální diagnostiky GENNET 2017 – 2019. Actual Gyn. 2020;12:46-51

CONTINGENT NIPT SCREENING – RESULTS FROM CENTRE OF PRENATAL DIAGNOSIS GENNET 2017 – 2019

Original article

Abstract

Aim of the study: Analysis of the contribution of segments of antenatal screening using non-invasive testing of free DNA in maternal plasma (NIPT). Creating a model of contingent NIPT screening using results of combined first trimester screening (FTS).

Material and methods: From total 460 prenatal findings in 2017 – 2019 the contribution of FTS, NIPT and 2nd trimester results to indication of diagnosis of 161 trisomies No. 21 (T21) and 53 trisomies No. 18 (T18) was assessed. The results of 24,052 FTS in the same period were sorted into three contingents: 1) combined risk > 1/100, ultrasound finding or marker atypia (high risk – indicated to invasive procedure), 2) risk 1/100 – 1/500 (intermediate risk indicated to NIPT) and 3) risk 1/501 – 1/2,500 (medium risk indicated to integrated test).

Results: In 161 cases of T21 85% were indicated by FTS results, 7.5% by NIPT, 4.5% by integrated test and 3% by ultrasound. In 53 cases of T18 FTS results indicated 77%, NIPT 6%, integrated test 2% and ultrasound 15% cases. 3.8% those screened got into the high risk contingent, 9.4% into the intermediate contingent and 25% into medium risk contingent. More than 25% from all 460 prenatal findings could not be diagnosed by NIPT.

Conclusion: FTS and ultrasound in 1st and 2nd trimesters followed by invasive procedure at high risk mothers remain the basic tools of prenatal diagnosis even in the age of widespread implementation of standard NIPT. Our results can help plan whole-population contingent NIPT screening.

Key words: contingent NIPT screening

Původní práce

Abstrakt

Cíl studie: Retrospektivní analýza přínosu jednotlivých segmentů screeningu vrozených vad s využitím vyšetření volné DNA v mateřské plazmě (NIPT) a vytvoření modelu kontingentního NIPT screeningu na základě výsledku kombinovaného testu v I. trimestru (FTS).

Materiál a metody: Z celkem 460 prenatálních nálezů v období 2017 – 2019 jsme u 161 trizomií č. 21 (T21) a 53 trizomií č. 18 (T18) hodnotili podíl výsledků FTS, NIPT, integrovaného testu a ultrazvukových (UZ) nálezů ve II. trimestru na indikacích. Výsledky 24 052 FTS ve stejném období jsme rozdělili do tří kontingentů: 1) s rizikem > 1/100, ultrazvukovým nálezem nebo atypii markerů (vysoké riziko - indikace invazivního vyšetření),

2) s rizikem v rozmezí 1/100 – 1/500 (intermediární riziko - indikace NIPT) a 3) s rizikem v rozmezí 1/501 – 1/2 500 (střední riziko - indikace integrovaného testu).

Výsledky: U 161 případů T21 bylo 85 % diagnóz indikováno vysokým rizikem FTS, 7,5 % pozitivním výsledkem NIPT, 4,5 % výsledkem integrovaného testu a 3 % ultrazvukovým nálezem. Z 53 případů T18 byl FTS indikací u 77 %, výsledek NIPT u 6 %, integrovaný test u 2 % a ultrazvukový nález u 15 %. 3,8 % výsledků FTS bylo v kontingentu s vysokým rizikem, 9,4 % s intermediárním rizikem a 25 % se středním rizikem. Více než 25 % ze všech 460 prenatalních nálezů by nebylo možno NIPT zachytit.

Závěr: FTS a ultrazvuk v I. a II. trimestru s následným invazivním vyšetřením těhotných s vysokým rizikem zůstávají základními nástroji prenatalní diagnostiky i v případě plošné implementace NIPT v současném standardu. Naše výsledky mohou pomoci pro nastavení plošného kontingentního NIPT screeningu u nás.

Klíčová slova: kontingentní NIPT screening

Úvod

Neinvazivní prenatalní screening vrozených vad pomocí volných fragmentů kyseliny deoxyribonukleové (cfDNA) umožnilo zjištění, že cfDNA v plazmě těhotných je směsí tvořenou DNA z apoptotických mateřských buněk (průměrně 90 % cfDNA) a buněk trofoblastu (průměrně 10 % cfDNA) (1). K detekci cfDNA v mateřské plazmě a výpočtu relativního zastoupení fragmentů příslušejících ke sledovaným chromozomům a klinicky významným oblastem genomu se používají různé laboratorní a statistické metody využívající rychlého vývoje molekulárně genetických metod a počítačové techniky (2,3,4,5,6). Od doby klinické implementace roku 2012 bylo podáno dostatek důkazů o vysoké efektivitě neinvazivního prenatalního testování pomocí cfDNA (NIPT) a jeho limitujících a korigujících faktorech (7,8). Současné metody NIPT významně ovlivnily způsob prenatalního screeningu častých aneuploidií - trizomií chromozomů č. 21 (T21), č. 18 (T18) a č. 13 (T13) (9,10). Metody NIPT pro screening aneuploidií pohlavních chromozomů, subchromozomální deleční a duplikační varianty počtu kopií (CNV) nebo prenatalní diagnózu monogenních chorob (NIPD) se vyvíjejí a současné názory na jejich implementaci jsou kontroverzní (11,12).

Kontingentní NIPT screening zaměřený na časté aneuploidie je jednou ze strategií inkorporující NIPT do screeningového systému častých aneuploidií (13,14). Naše modifikace kontingentního NIPT screeningu vychází z doporučení Společnosti lékařské genetiky a genomiky (SLG) k indikaci NIPT (15) a doporučení k provádění diagnostických prenatalních vyšetření (16). Základním screeningovým vyšetřením je kombinovaný test v prvním trimestru (FTS), jehož výsledky rozdělují těhotné do tří skupin (kontingentů):

1. s vysokým kombinovaným rizikem aneuploidie ($> 1/100$), ultrazvukovým nálezem nebo snížením jednoho z biochemických markerů pod 0,2 násobku mediánu (MoM) (17), kterým je doporučena genetická konzultace. Diagnostickým vyšetřením první volby je rychlé stanovení T21, T18, T13, aneuploidií pohlavních chromozomů a polyploidii pomocí kvantitativní fluorescenční polymerázové reakce (QFPCR) (18). Následným vyšetřením při negativním výsledku QFPCR je chromozomální microarray (CMA) detekující deleční a duplikační CNV (19). Ve specifických indikacích může být CMA metodou první volby.

2. s intermediárním rizikem v rozmezí 1/100 – 1/500 bez ultrazvukového nálezu (NIPT kontingent) s doporučením NIPT zaměřeným na časté aneuploidie. V případě pozitivního výsledku NIPT je doporučena konfirmace invazivním vyšetřením (většinou AMC).
3. se středním rizikem (kontingent II. trimestru). V současném prostředí regulujícím genetickou prenatalní péči a vzhledem k publikovaným datům (13) doporučujeme pokračovat do II. trimestru k provedení integrovaného testu těhotným s rizikem $> 1/2 500$. Prahové riziko integrovaného testu je 1/150 s očekávanou iniciální pozitivitou 2 % a dalším postupem dle výsledku konzultace.

U všech těhotných doporučujeme expertní ultrazvukové vyšetření ve 20. – 22. týdnu.

Invazivní vyšetření je doporučeno vždy při ultrazvukovém nálezem a pro konfirmaci výsledků NIPT.

Materiál a metody

V 2017 – 2019 bylo v laboratořích GENNET vyšetřeno celkem 886 biopsií choria (CVS), 3 028 amniocentéz (AMC) a 3 920 NIPT a diagnostikováno celkem 460 závažných chromozomálních nálezů, jejichž distribuce je uvedena v **Tab. 1**. Část vzorků byla transportována z jiných pracovišť (převážně ze Sanus Hradec Králové, ÚPMD Praha a FTN Praha). Pro odhad přínosu jednotlivých kontingentů pro prenatalní diagnózu častých aneuploidií (T21, T18, T13) jsme použili podskupinu 161 případů T21, které byly geneticky konzultovány na klinikách GENNET a 53 případů T18, u kterých byla známa indikační kritéria. U případů T13 se známými indikačními kritérii byla indikace k diagnóze vždy na základě výsledků FTS. T13 byla proto z této analýzy vyjmuta. Ve sledovaném období bylo na všech klinikách GENNET (Praha, Liberec) a spolupracujícím prenatalním centru Gynekologie MUDr. Brožek, s.r.o. Ústí nad Labem provedeno celkem 24 052 FTS. Část těhotných byla doporučena k FTS nebo genetické konzultaci na klinice GENNET po zachytu na jiném pracovišti. Z výsledků FTS jsme odhadli velikosti jednotlivých kontingentů a jejich ovlivnění věkem.

Výsledky

Tab. 1 Souhrn všech nálezů častých aneuploidií a CNV 2017 – 2019 (celkem 460 závažných nálezů)

Výsledky	CVS (Σ 886)	AMC (Σ 3 028)	Celkem
Bez nálezu	612	2 904	3 516
Trizomie 21	126	79	205
Trizomie 18	37	16	53
Trizomie 13	14	3	17
Ostatní aneuploidie	41	28	69
CNV	56	60	116

V rámci kontingentního testu bylo provedeno 3 920 NIPT. Výsledky jsou uvedeny v **Tab. 2 a 3**.

Tab. 2 Souhrnné výsledky NIPT (n = 3 920)

	Testy	Opakováno	Neuzavřeno	Uzavřeno	IPR	PPV
n	3 920	103	105	3 712	67	37/67
%	100	2,6	2,7	97,3	1,8	55

Legenda: IPR – iniciální pozitivita, PPV – pozitivní prediktivní hodnota

Tab. 3 Nálezy častých aneuploidií při NIPT v rámci kontingentního testu

Trizomie	Počet	IPR	PPV
T21	29	49 (1,3 %)	59 %
T18	5	10 (0,3 %)	50 %
T13	3	8 (0,2 %)	37 %

Legenda: IPR – iniciální pozitivita, PPV – pozitivní prediktivní hodnota

Komentář k **Tab. 2 a 3**: Iniciální pozitivita (IPR) udává část pozitivních nálezů NIPT, které vyžadují confirmaci invazivním vyšetřením. Část invazivně confirmovaných trizomií na základě výsledku NIPT udává pozitivní prediktivní hodnota testu (PPV).

Odhad přínosu jednotlivých segmentů kontingentního screeningu pro diagnózu T21 a T18 podle příslušnosti ke kontingentům na základě výsledků FTS je uveden v **Tab. 4**.

Tab. 4

	Riziko > 1/100	Riziko 1/100 - 1/500 (NIPT)	Riziko < 1/501	
			(Integrovaný test)	(UZ II. trim.)
T21 (Σ 161)	85 %	7,5 %	4,5 %	3 %
T18 (Σ 53)	77 %	6 %	2 %	15 %

Komentář k **Tab. 4**: Trizomie 21 (celkem 161 případů): 85 % případů bylo v kontingentu s vysokým rizikem, 7,5 % případů v NIPT kontingentu a 7,5 % případů v kontingentu II. trimestru (4,5 % výsledky integrovaného testu s rizikem FTS < 1/500, 3 % ultrazvukový nález).

Trizomie 18 (celkem 53 případů): 77 % případů bylo v kontingentu s vysokým rizikem, 6 % případů v NIPT kontingentu a 17 % případů v kontingentu II. trimestru (2 % výsledky integrovaného testu s rizikem FTS < 1/500, 15 % ultrazvukový nález). Výsledek NIPT předcházel diagnostickému prenatálnímu vyšetření u 3/53 případů T18 (6 %). U všech tří případů však byl pozitivní ultrazvukový nález (edém plodu, růstová retardace, meningokéla) a NIPT bylo provedeno spíše z psychologické indikace. U dalšího případu T18 indikovaného podle doporučení nebyl výsledek NIPT vydán pro nízkou fetální frakci a následná indikace k AMC byla provedena na základě UZ nálezu ve II. trimestru.

Retrospektivní stanovení velikosti screeningových kontingentů:

Relativní velikost screeningových kontingentů byla stanovena z výsledků 24 052 FTS provedených na klinikách GENNET (průměrný věk těhotných žen 32,5 roku v termínu, 37 % žen ve věku 35 let a více, 120 případů T21, 31 případů T18, 13 případů T13) a jejich ovlivnění věkem těhotné – viz **Tab. 5**.

Tab. 5 Relativní velikosti kontingentů dle doporučení SLG a v závislosti na věkových skupinách (rozmezí rizik pro indikaci integrovaného testu 1/501 - 1/2 500)

Věk	Riziko > 1/100			Riziko 1/100 – 1/500			Riziko 1/501 – 1/2 500
	T21	T13/18	Celkem	T21	T13/18	Celkem	Celkem
Všichni	3,4 %	0,3 %	3,7 %	8,8 %	0,6 %	9,4 %	25 %
=> 35 let	7,3 %	0,6 %	7,9 %	17,3 %	0,8 %	18,1 %	39,4 %
< 35 let	1,2 %	0,1 %	1,3 %	3,8 %	0,4 %	4,2 %	16 %

Diskuze

Naše výsledky potvrzují úlohu NIPT v kontingentním screeningu hlavně pro diagnózu T21. U trizomií T18 a T13 byly prakticky všechny indikace k diagnostickému vyšetření buď v kontingentu s vysokým rizikem FTS nebo na základě ultrazvukového nálezu. Při vysokém riziku FTS nebo ultrazvukovém nálezu indikace NIPT s velkou pravděpodobností oddálí a prodraží prenatalní diagnózu. U prenatalní diagnostiky T21 a T18 jsme potvrdili již dříve publikovaný význam integrovaného testu (20). V našem souboru bylo 4,5 % diagnóz T21 a 2 % diagnóz T18 indikováno výsledky integrovaného testu s rizikem FTS < 1/500.

NIPT je součástí prenatalních screeningových programů v řadě zemí většinou v kontingentní strategii, pouze v Holandsku (NL) a Belgii (B) je NIPT univerzálním prenatalním testem s přibližně 50% (NL) a více než 75% (B) utilizací (21). Kontingentní NIPT screening je ekonomicky přijatelnější alternativou se zachováním vysoké detekce častých aneuploidii a snížením invazivních výkonů. Gil et al. (13) uvádí v populaci 11 692 těhotných s průměrným věkem 31 let 3,9 % s rizikem > 1/100 indikovaných k invazivnímu vyšetření a 30,4 % v rozmezí rizik 1/100 – 1/2 500 indikovaných k NIPT s očekávanou detekcí 97 % T21 a 95 % T18 a T13. Wald et al. (14) uvádí ve skupině 22 812 těhotných (medián 31 let, věkové rozmezí 28-35 let) celkem 10 % těhotných indikovaných k NIPT s rizikem FTS vyšším než 1/800 a detekci 95 % T21 a 96 % T18. Kontingenty ve švédské populační studii Iwarssona et al. jsou 4,5 % těhotných s rizikem FTS > 1/200 a 10,2 % s rizikem v rozmezí 1/200 – 1/1 000 (129 493 těhotných, průměr 32 let, 33 % starších 35 let) (22). Výsledkem naší modelové strategie tří kontingentů je kromě 3,8 % výsledků FTS s vysokým rizikem také zpřesnění indikace k NIPT pomocí výsledků integrovaného testu u 25 % vyšetřených s rizikem FTS v rozmezí 1/501 – 1/2 500 (kontingent II. trimestru). Očekávaná iniciální pozitivita integrovaného testu v této rizikové skupině je nižší než 2 %, což představuje méně než 0,5 % screenovaných FTS, které by doplnily primární NIPT kontingent přibližně na 10 % všech screenovaných.

Positivní prediktivní hodnota NIPT pro T21 (59 %) a T18 (50 %) byla v našich výsledcích nižší, než je většinou udáváno (23). Hlavním důvodem nižší PPV při NIPT v našem souboru byla kromě zvýšeného základního rizika v NIPT kontingentu (1/100 – 1/500) i určitá opatrnost při hodnocení výsledků. NIPT také nebylo indikováno vždy podle doporučení, především z důvodu ohledů na přání těhotné – část indiko-

vaných k invazivnímu vyšetření výkon odmítla a část indikovaných k NIPT vyžadovala invazivní vyšetření s kompletní informací včetně výsledku CMA. V praxi to ale znamenalo iniciální pozitivitu v kontingentu NIPT a tím i konfirmační invazivní vyšetření pouze u 1,8 % testů (67/3 712).

Pokud vezmeme v úvahu vrozené vývojové vady (VVV), které vedly k spontánnímu potratu nebo umělému přerušování těhotenství a vady s pozdní manifestací, je možno odhadnout prevalenci všech VVV plodu až u 6 % těhotenství. Přibližně u poloviny z nich (u 3 % těhotných) jsou vady plodu multifaktoriální etiologie, často s morfologickým nálezem, 0,5 – 1 % plodů má mikroskopickou chromozomální vadu, 1 % má subchromozomální CNV a 0,5 – 1 % plodů je postiženo monogenní vadou. Časté aneuploidie tedy tvoří přibližně třetinu VVV s prokazatelnou genetickou etiologií, z toho přibližně polovina (celkem 15 % vad) připadá na trizomii chromozomu 21. Současná prenatalní genetická diagnostika musí počítat i s klinicky významnými subchromozomálními CNV detekovanými pomocí CMA a vadami způsobenými s mutacemi v jednom genu (monogenní) detekovanými většinou sekvenováním nové generace (NGS) z materiálu plodu. Pro tuto skupinu vad s významným podílem nových mutací stále zůstávají hlavními indikátory rizika FTS nebo integrovaného testu, expertní ultrazvukový nález v I. a II. trimestru nebo významná atypie biochemických markerů FTS. U těchto VVV nemůže současné NIPT konkurovat metodám přímého vyšetření tkáně plodu (11,12) i přes rychlý vývoj nových technik NIPT (30). Riziko CNV plodu není ovlivněno věkem těhotné a frekvence klinicky významných CNV u plodů bez prokázané morfologické vady a s normálním klasickým karyotypem je 0,5 – 1,3 % (24). Pravděpodobnost nálezu klinicky významné CNV se zvyšuje při nálezem morfologické vady plodu – CNV jsou prokazovány navíc u 5 – 10 % vyšetřovaných plodů s mnohočetnými vadami a normálním karyotypem (25). V našem materiálu přineslo vyšetření choriové biopsie pomocí CMA u těhotných s významným rizikem FTS závažný nález CNV navíc u 6 % indikovaných. U skupiny AMC s širším spektrem indikací (např. věk, anxiozita, výsledek integrovaného testu, mužský faktor) byly závažné CNV diagnostikovány u 2 % vyšetřených. Celkem CNV představovaly 25 % všech závažných nálezů prenatalní diagnostiky. I když u heterogenní skupiny CNV není možné odhadnout část spontánně potracených plodů během dalšího průběhu těhotenství, je pravděpodobné, že poměr

CNV k častým aneuploidii u narozených dětí by byl ještě vyšší. Evans (26) uvádí, že u mladších těhotných je 10x vyšší riziko nálezu CNV než časté aneuploidie zjištěné pomocí současné NIPT. Použití NIPT jako screeningového testu první volby v Holandsku sice zvýšilo detekci častých aneuploidii spolu se snížením počtu invazivních výkonů, ale došlo k významnému snížení prenatalní detekce CNV (10,11). Pro optimální detekci všech atypických chromozomálních nálezů (až 55 % očekávaných) doporučuje Iwarsson (22) invazivní vyšetření u těhotenství s rizikem FTS > 1/200. V dánské studii (27) byla většina CNV diagnostikována ve skupině rizik FTS 1/100 – 1/300.

Dalším zpřesněním prenatalní diagnostiky je klinicky dostupné vyšetření exomu (WES) z materiálu plodu zaměřené na mutace v protein kódujících oblastech genomu, které jsou příčinou až 85 % monogenních VVV. Lord et al. (28) uvádí další nárůst nálezů významných genových variant při WES u 8,5 – 15,4 % plodů se strukturálními vadami. Při dostatečné hloubce sekvenace je možné při WES detekovat i varianty počtu kopií (CMV) s vyšší citlivostí (~ 40 Kb) než většina současných CMA. Teoreticky je možné pomocí WES detekovat CNV na úrovni jednoho exonu (~ 200 bp) a samozřejmě i chromozomální aneuploidie a jejich mozaiky. Při optimalizaci doby vyšetření (cca 7 – 10 dní) se může rychlý WES (rWES) stát prenatalním diagnostickým testem první volby (29).

Závěr

Kontingentní NIPT screening a navazující diagnostická prenatalní vyšetření podle doporučení SLG (15,16) vytváří spolu s expertním ultrazvukovým vyšetřením efektivní systém prenatalní diagnostiky. Kontingentní NIPT obohacený výsledky integrovaného testu tvořil v našem modelu přibližně 10 % vyšetřených FTS.

U části těhotenství s nejvyšším rizikem častých aneuploidii vyšetřené invazivně (přibližně 4 % výsledků FTS) byly zjištěny další vady nezachytitelné NIPT, které představovaly 25 % všech prenatalně diagnostikovaných nálezů. Vývoj prenatalní diagnostiky směřuje ke zvýšení prahu citlivosti NIPT na subchromozomální a genovou úroveň, k vyšetření kolujících fetálních buněk a klinické implementaci prenatalního rWES.

Seznam použitých zkratk:

AMC	amniocentéza
bp	pár bází DNA
cfDNA	volná DNA
CMA	chromozomální microarray
CNV	varianty počtu kopií
CVS	biopsie choria
DNA	kyselina deoxyribonukleová
FTS	kombinovaný screening prvního trimestru
IPR	iniciální pozitivita
Kb	tisíc párů bází DNA
MoM	násobek mediánu
NGS	sekvenování nové generace
NIPT	neinvazivní screening s využitím cfDNA
NIPD	NIPT zaměřený na monogenní mutace
PPV	pozitivní prediktivní hodnota
QFPCR	kvantitativní fluorescenční polymerázové reakce
SLG	Společnost lékařské genetiky a genomiky
T21	trizomie chromozomu č. 21
T18	trizomie chromozomu č. 18
T13	trizomie chromozomu č. 13
UZ	ultrazvuk
WES	celoexomové sekvenování
rWES	celoexomové sekvenování v rychlém režimu

Literatura

- Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350(9076):485–7
- Chiu RW, Allen KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:20458–63
- Palomaki GE, Kloza EM, Messerlian GM. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med*. 2011 Nov;13(11):913–20
- Nicolaides KH, Syngelaki A, Gil M, Atanasova V, Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn*. 2013;33:575–9
- Stokowski R, Wang E, White K, et al. Clinical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies. *Prenat Diagn*. 2015 Dec;35(12):1243–6
- Dahl F, Ericsson O, Karlberg O, et al. Imaging single DNA molecules for high precision NIPT. *Sci Rep*. 2018 Mar 14;8(1):4549
- Kinnings SL, Geis JA, Almasri E, et al. Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn*. 2015;35:816–22
- Brady P, Brison N, van Den Bogaert K, et al. Clinical implementation of NIPT - technical and biological challenges. *Clin Genet*. 2016 May;89(5):523–30
- Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;50:302–14

10. van der Meij KRM, Siermans EA, Macville MVE, et al. Dutch NIPT Consortium. TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands. *Am J Hum Genet.* 2019 Dec 5;105(6):1091-1101
11. Srebniak MI, Knapen MFCM, Govaerts LCP, et al. Social and medical need for whole genome high resolution NIPT. *Mol Genet Genomic Med.* 2020 Jan;8(1):e1062
12. Shaw J, Scotchman E, Chandler N, Chitty L. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy, copy number variants and single gene disorders. *Reproduction.* 2020 Mar 1, doi: 10.1530/REP-19-0591
13. Gil MM, Revello R, Poon LC, et al. 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.* 2016 Jan;47(1):45-52
14. Wald NC, et al. Prenatal reflex DNA screening for trisomies 21, 18, and 13. *Genetics in Medicine.* 2018;20(8):825-830
15. <https://slg.cz/doporuceni/prenatalni-diagnostika/indikace-neinvazivniho-prenatalniho-testovani-nipt/>
16. <https://slg.cz/doporuceni/prenatalni-diagnostika/>
17. Vogel I, Petersen OB. Prenatal screening for atypical chromosomal abnormalities: past or future? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018 Apr;51(4):434-43
18. Putzova M, Pecnova L, Dvorakova L, et al. OmniPlex--a new QF-PCR assay for prenatal diagnosis of common aneuploidies based on evaluation of the heterozygosity of short tandem repeat loci in the Czech population. *Prenat Diagn.* 2008 Dec;28(13):1214-20
19. Trková M, Putzová M, Bečvářová V, et al. Implementace array vyšetření do prenatální diagnostiky v I. trimestru. *Česká gynekologie.* 2015;80(3):176-180
20. Springer D, Loucký J, Gregor V, et al. Využití NIPT při definovaném hraničním výsledku konvenčního screeningu dle Doporučení ČSKB a SLG a možnosti úhrady v roce 2020. *Actual Gyn.* 2020;12:8
21. Gadsbøll K, Petersen OB, Gatinois V, et al. Current use of noninvasive prenatal testing in Europe, Australia and the USA: A graphical presentation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2020 Jun;99(6):722-730
22. Iwarsson E, Conner P. Detection rates and residual risk for a postnatal diagnosis of an atypical chromosome aberration following combined first-trimester screening. *Prenat Diagn.* 2020;40(7):852-859, doi: 10.1002/pd.5698
23. Petersen AK, Cheung SW, Smith JL, et al. Positive predictive value estimates for cell-free noninvasive prenatal screening from data of a large referral genetic diagnostic laboratory. *Am J Obstet Gynecol.* 2017 Dec;217(6):691
24. Srebniak MI, Joosten M, Knapen MFCM, et al. Frequency of submicroscopic chromosomal aberrations in pregnancies without increased risk for structural chromosomal aberrations: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018 Apr;51(4):445-452
25. Levy B, Wapner R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. *Fertil Steril.* 2018 Feb;109(2):201-212
26. Evans MI, et al. The epidemic of abnormal copy number variant cases missed because of reliance upon noninvasive prenatal screening. *Prenat Diagn.* 2018 Sep;38(10):730-734
27. Vogel I, Petersen OB, Christensen R, et al. Chromosomal microarray as primary diagnostic genomic tool for pregnancies at increased risk within a population-based combined first-trimester screening program. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018 Apr;51(4):480-486
28. Lord J, et al. Prenatal Assessment of Genomes and Exomes Consortium. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet.* 2019 Feb 23;393(10173):747-757
29. Deden C, Neveling K, Zafeiropoulou D. Rapid whole exome sequencing in pregnancies to identify the underlying genetic cause in fetuses with congenital anomalies detected by ultrasound imaging. *Prenat Diagn.* 2020;40(8):972-983, doi: 10.1002/pd.5717
30. Koumbaris G, Achilleos A, Nicolaou M, et al. Targeted Capture Enrichment Followed by NGS: Development and Validation of a Single Comprehensive NIPT for Chromosomal Aneuploidies, Microdeletion Syndromes and Monogenic Diseases. *Mol Cytogenet.* 2019 Nov 21;12:48