



Neinvazivní prenatalní test (NIPT) Harmony® je CE-IVD test, který nachází široké uplatnění při zkvalitnění péče o matku a dítě. Při analýze se vychází ze vzorku krve matky, ze které je izolována volná cirkulující DNA (cell-free DNA, cfDNA). Část této cfDNA je přítom během těhotenství do krevního řečiště matky uvolňována plodem, jako tzv. fetální frakce, a může sloužit k detekci případných genetických vad plodu bez nutnosti přímého odebrání vzorku tkáně z placenty nebo plodové vody (amniocentéza). Vzorky krve jsou odesílány do certifikovaných laboratoří a nejpozději do jednoho týdne jsou výsledky testu zaslány ošetřujícímu lékaři prostřednictvím mailu.

## Použití neinvazivního prenatalního testu (NIPT) Harmony®

Mgr. TOMÁŠ DRÁB, Ph.D.  
ROCHE s.r.o., Diagnostics Division

Díky spolehlivým a včasným výsledkům pomáhá test Harmony® již od 10. týdne těhotenství identifikovat zvýšené riziko aneuploidii\* chromozomů 21, 18 a 13 a určit pohlaví plodu jak u jednočetných,

tak i dvojčetných těhotenství. Pro jednočetná těhotenství také umožňuje vyšetření aneuploidie pohlavních chromozomů a detekci tzv. DiGeorgova syndromu, který patří k nejčastějším mikrolečným syndromům\*. Díky svému širokému zaměření představuje test Harmony® ideální nástroj pro začlenění do komplexního prvotrimestrálního screeningu nejběžnějších genetických vad s minimálním dopadem na zdraví matky i plodu.





## Screening DiGeorgova syndromu (delece 22q11.2) pomocí neinvazivního prenatalního testu (NIPT) Harmony®

### Genetické pozadí

DiGeorgův syndrom (delece 22q11.2, nebo také 22qDS) se řadí mezi tzv. mikrodeleční syndromy a je většinou způsoben delecí na dlouhém raménku chromozomu 22, přičemž nejčastější je delece úseku 22q11.2 o délce 3 Mb (u 80–90 % pacientů), vzácněji pak 1,5 Mb (kolem 8 % případů). Touto delecí bývá zasaženo kolem 30–50 genů, které jsou umístěny na dlouhém raménku chromozomu 22. Úsek 22q11.2 patří mezi strukturně nejkomplexnější v celém genomu – převážně díky několika velkým blokům míst kontrolujících expresi genů\* – LCR (locus control region). Tyto LCR jsou z více než 96 % identické, a proto jsou náchylné k chybám při meióze\*, kdy může dojít k jejich delecí. Četnost DiGeorgova syndromu se odhaduje na 1 z 1 000 těhotenství.<sup>1</sup> Tento syndrom není obvykle vázán na předchozí výskyt v rodině.<sup>2,3</sup>

### Projevy DiGeorgova syndromu

Delece 22q11.2 vede k poruše vývoje struktur odvozených od třetí a čtvrté žaberní výchlípy. Výsledkem je nevyvinutý nebo i chybějící thymus\* a příštítná tělíska, což vede k nízkým hladinám T-lymfocytů a poruchám imunity (především náchylnost k některým virovým nebo mykotickým onemocněním). Dalšími projevy bývají poruchy regulace vápníku, poruchy štítné žlázy, abnormality vývoje obličeje (rozštěp patra) a vrozené srdeční problémy. DiGeorgův syndrom je považován za druhou nejčastější genetickou příčinu vrozených srdečních vad (VSV) a je silně spojován s konotrunkálními anomáliemi\* jako Fallotova tetralogie, defekt komorového septa (VSD), interrupce aortálního oblouku (IAA)\* a artérový trunкус\*. DiGeorgův syndrom bývá také

často doprovázen opožděným vývojem, poruchami učení nebo mentální retardací a zvýšeným rizikem vzniku schizofrenie (viz tab. 1).<sup>2,5,10,12</sup> Tento syndrom je významnou příčinou morbidity a mortality v průběhu celého života, nicméně kvůli velké rozmanitosti jeho klinických projevů se může diagnóza zpozdit i o celé roky.<sup>4</sup> Přestože je tento syndrom relativně častý, je povědomí o této problematice u laické veřejnosti obecně malé. Např. v rámci nedávné studie screeningu běžných trizomií a DiGeorgova syndromu v Německu pouze 8,1 % žen podstupujících vyšetření NIPT mělo o tomto syndromu nějaké základní znalosti.<sup>13</sup>

### Screening

Mikrodelece obecně není snadné nebo možné odhalit pomocí běžných cytogenetických vyšetření a pro detekci DiGeorgova syndromu neexistuje standardizovaný prenatalní screeningový program.<sup>6,7</sup> Vinou toho může být velká část nositelů delece 22q11.2 prvního měsíce nebo i roky svého života nediagnostikována.<sup>4</sup> Včasné zásahy, preventivní péče a přístup k dostupným službám mohou



▲ Obr. 1: Rozštěp páteře (spina bifida); zobrazeno technologií HDlive™ (9. týden)

snížit pravděpodobnost předčasné mortality.<sup>8,9</sup>

Nejnovější pokroky v ultrazvukovém vyšetření a analýze z krve matky umožňují již v prvním trimestru komplexní screening výskytu závažných anomálií a chromozomálních aberací. Tyto metody se vzájemně doplňují a zajišťují prokázané, klinicky relevantní informace a poskytují včasné odpovědi.

Běžně používané ultrazvukové vyšetření v prvním trimestru může obecně pomoci identifikovat anomálie spojené s výskytem

Projev	Výskyt u jedinců s DiGeorgovým syndromem
Růstová a vývojová zpoždění	>90 %
Muskuloskeletální poruchy (pes equinovarus congenitus*, anomálie žeber, páteře, skolióza)	>90 %
Imunodeficience	77 %
Velofaryngeální anomálie*	67 %
Gastrointestinální poruchy	65 %
Vrozené vady srdce	64 %
Neuropsychiatrické poruchy (autismus, schizofrenie)	60 %
Endokrinní poruchy	55 %
Genitourinární* (obvykle poruchy ledvin)	16 %
Schizofrenie	1 %

▲ Tab. 1: Typické projevy DiGeorgova syndromu<sup>2,3,10,12</sup>



Nález ultrazvuku	Odhadnutá četnost
Srdeční defekty	
Defekt komorového septa (VSD)	7–23 % <sup>5,10</sup>
Fallotova tetralogie	18–21 % <sup>5,10</sup>
Anomálie aortálního oblouku	14 % <sup>10</sup>
Interrupce aortálního oblouku	11–24 % <sup>5,10</sup>
ASD	10 % <sup>10</sup>
Hypo-/aplazie thymu	>26 % <sup>5</sup>
Centrální nervový systém (neurální trubice, mozkové struktury)	38 % <sup>5</sup>
Skeletální vady (páteř, pes equinovarus congenitus)	19 % <sup>5</sup>
Genitourinární vady	17 % <sup>5</sup>
Obličejové odlišnosti	21 % <sup>5</sup>
Polyhydramnion*	30 % <sup>5</sup>

▲ Tab. 2: Nálezy pomocí ultrazvukových vyšetření ve spojitosti s delecí 22q11.2

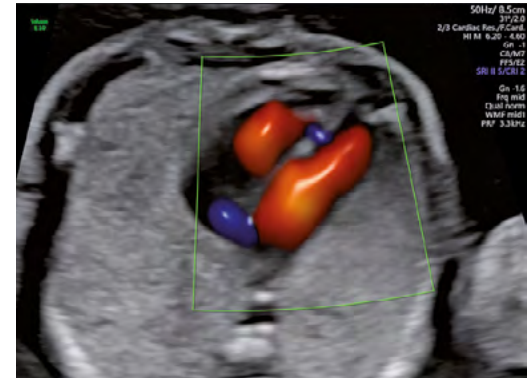
DiGeorgova syndromu, včetně vady neurální trubice a srdečních a obličejových vad, a upozornit tak ošetřujícího lékaře na potřebu chromozomálních diagnostických testů. Nicméně mnoho klinických manifestací je nejlépe detekovatelných až v období druhého trimestru, kdy je již prostor či příležitost pro potvrzující prenatální testy zúžený či promeškaný.

Vysoká citlivost a specifčnost neinvazivního prenatálního testu (NIPT) Harmony® umožňují získat relevantní informace již od 10. týdne těhotenství při minimálním riziku pro matku i plod.<sup>11</sup> Test Harmony® využívá volnou cirkulující DNA (cfDNA) z krve matky k analýze částých chromozomálních aberací a DiGeorgova syndromu. Při analýze spoléhá na tzv. fetální frakci, tedy DNA pocházející přímo z plodu. Navíc se jedná se o cílený test, který se soustředí na speciálně vybrané úseky chromozomů (DANSR™ metoda – Digital Analysis of Selected Regions), které dále analyzuje pomocí algoritmu FORTE™ (Fetal Fraction Optimized Risk of Trisomy) pro získání individualizovaného rizika.

Validita prenatálního neinvazivního testu Harmony® pro screening DiGeorgova syndromu byla prokázána v klinické studii čítající 735 těhotenství s validovanými genetickými výsledky. Test Harmony® identifikoval správně 32 ze 46 případů delecí 22q11.2 při nulové falešné pozitivitě (falešná pozitivita určuje míru rizika nesprávného stanovení u nepostížených těhotenství).<sup>11</sup>

## Závěr

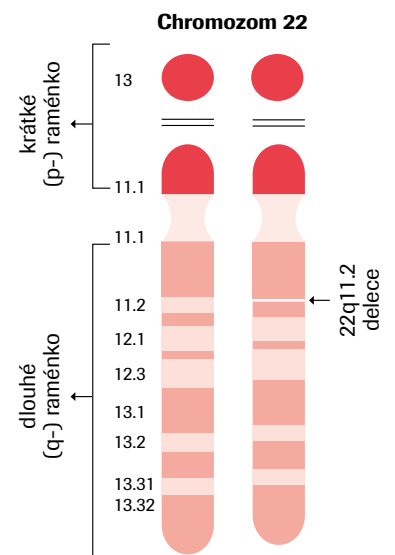
Rutinní testování DiGeorgova syndromu pomocí prenatálního testu Harmony® může pomoci identifikovat těhotenství se zvýšeným rizikem delecí 22q11.2. Vysoká senzitivita a specifčnost testu jsou zárukou minimalizace stresu pro nastávající rodiče v důsledku falešně pozitivních výsledků. A spolu v kombinaci s ultrazvukovým vyšetřením může poskytnout důležité informace již během prvního trimestru s dostatkem času na jejich potvrzení pomocí invazivních testů a detailnějšího ultrazvukového vyšetření včetně echokardiogramu plodu.<sup>2,3,7</sup>



▲ Obr. 2: Defekt komorového septa (VSD); zobrazeno pomocí Radiantflow™



▲ Obr. 3: Rozštěp rtu/patra



▲ Obr. 4: Mikrodelece 22q11.2 na chromozomu 22 má za následek DiGeorgův syndrom.

\* **Aneuploidie** – změny počtu chromozomů; \* **Mikrodeleční syndrom** – ztráta části chromozomu, která není viditelná v optickém mikroskopu; pro její odhalení nestačí rutinní vyšetření chromozomů; \* **Expresí genu** – proces, kterým se převádí informace uložená v genu v reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci; \* **Meióza** – redukční dělení buňky, při kterém vznikají pohlavní buňky s polovičním počtem chromozomů; při tomto dělení dochází k náhodnému rozdělení otcovských a mateřských chromozomů do pohlavních buněk; \* **Thymus** – brzlík; primární lymfatický orgán nacházející se v hrudním koši, ve kterém se množí a dozrávají T-lymfocyty; v pubertě dochází



## Využití neinvazivního prenatalního testu (NIPT) Harmony® u dvojčetných těhotenství

### Úvod

Vícečetná těhotenství jsou hlavně díky metodám asistované reprodukce dnes častější než dříve, např. v České republice se rodí kolem 1 500 dvojčat ročně, což je přibližně o 300–400 dětí více než před 30 lety.<sup>14</sup> Děti z vícečetných těhotenství čelí vyššímu riziku nežádoucích následků včetně vrozených vad, nízké porodní hmotnosti a předčasných porodů. Odborníci po celém světě tedy doporučují zvýšený dohled nad těmito těhotenstvími a jejich pravidelný screening.<sup>15–20</sup> Zároveň bývají vícečetná těhotenství často riziková a mohou být doprovázena celou řadou komplikací, což je faktor, který se při vyšetření zdraví plodu a matky musí brát v úvahu, obzvláště s ohledem na vyšší riziko potratu, které je s některými vyšetřeními spojené.

Analýza volné cirkulující DNA (cell-free DNA, cfDNA) získané z krve matky se používá jako bezpečnější alternativa ke klasickým invazivním testům pro stanovení rizika aneuploidie u dvojčetných těhotenství od roku 2013. Nicméně publikovaná data hodnotící účinnost v porovnání s odlišnými metodologiemi testování jsou pro dvojčetná těhotenství stále relativně vzácná v porovnání s těhotenstvími jednočetnými.<sup>21</sup> Analýza cfDNA u dvojčetných těhotenství je totiž ztížena celou řadou specifických technických a biologických faktorů. Správná interpretace a klinické využití analýzy cfDNA u dvojčetných těhotenství vyžadují průkazný materiál, který podporuje využití této technologie.<sup>22–24</sup>

### Technické aspekty NIPT vyšetření u dvojčetných těhotenství

#### Přesné stanovení fetální frakce

Korektní stanovení fetální frakce z celkové cfDNA je klíčové pro přesnost všech NIPT technologií.<sup>33</sup> V případě dvojčetných těhotenství však představuje výzvu. Plody dvojčat mohou do mateřského oběhu přispívat rozdílnými množstvími cfDNA a nedostatečné množství cfDNA od jednoho dvojčete pak může vést k nepřesným výsledkům.<sup>22</sup> U dvojčetných těhotenství je vyšší pravděpodobnost neplatného vyhodnocení prvního odebraného vzorku krve v závislosti na věku plodu v době odběru, na váze matky a dalších neznámých faktorech.<sup>30,42</sup> Dvojčetná těhotenství totiž vykazují zhruba o 25 % nižší hladinu fetální frakce v porovnání s těhotenstvími jednočetnými.<sup>25,29,30</sup> Některé studie navíc naznačují, že i umělé oplodnění (IVF) by mohlo být spojené s nižší hladinou fetální frakce, přičemž k řadě vícečetných těhotenství dochází právě v důsledku IVF. V současnosti ovšem nejsou dostupná dostatečná data, která by tuto teorii potvrdila.<sup>29,39</sup>

Prenatální test Harmony® stanovuje fetální frakci cfDNA pomocí detekce jednonukleotidových polymorfismů (SNPs). Tato metoda se prokázala jako přesná a je využívána ve validačních studiích jednočetných i dvojčetných těhotenství, aneuploidii pohlavních chromozomů a syndromu delece 22q11.2.<sup>34–37</sup> Získané údaje jsou poté analyzovány pomocí algoritmu FORTE™ (Fetal Fraction Optimized Risk of

Trisomy), který dokáže zohlednit i aspekt dvojčetného těhotenství a vyhodnotit příspěvek fetální frakce od každého dvojčete. Spolu s dalšími parametry, jakými jsou např. věk matky a plodu, pak tento algoritmus identifikuje riziková těhotenství. FORTE™ algoritmus umožňuje přesně odlišit mezi vysoce a nízké rizikovými výsledky dokonce i při malé fetální frakci.<sup>22,25,26,28–31</sup>

Významnou komplikací pro stanovení aneuploidii plodu z krve matky v případě vícečetných těhotenství bývá tzv. syndrom mizejícího nebo vymizelého dvojčete, kdy dojde ke spontánnímu zániku jednoho z plodů v průběhu prvního nebo počátku druhého trimestru. Zaniklý plod bývá většinou resorbován matkou nebo druhým plodem, případně může dojít k jeho stlačení a mumifikaci.<sup>40</sup> Fetální cfDNA z neživého embrya je ale stále uvolňována do krevního řečiště matky, avšak není dobře známo, v jakém množství a jak dlouho.<sup>24,41–44</sup> To může vést ke zvýšenému riziku špatných výsledků testu (jak falešně negativních, tak i falešně pozitivních). Z tohoto důvodu není test Harmony® validován pro použití v případech, kdy je známo, že u těhotenství došlo k zániku plodu. Validací data pro dvojčetná těhotenství se týkají pouze případů dvou živých plodů v děloze.

#### Stanovení pohlaví plodu a aneuploidie pohlavních chromozomů

Prenatální test Harmony® je schopen stanovit pohlaví plodu také u dvojčetných těhotenství, což potvrzuje i validační studie.<sup>27</sup> Nepřítomnost chromozomu Y znamená, že oba plody jsou ženského pohlaví, zatímco přítomnost chromozomu Y znamená, že alespoň jeden plod je mužského pohlaví.

k jeho pomalému zániku a nahrazování tukovou tkání; \* **Konotrunkální anomálie** – vrozené vady výtokové části srdce; \* **Interrupce aortálního oblouku** – přerušení/chybění aortálního oblouku; \* **Artéřiový trunкус** – ze srdce vystupuje jediná velká artérie (neodděluje se aorta a plicnice); \* **Pes equinovarus congenitus** – složitá malformace nohy neboli „vrozená koňská noha“; \* **Velofaryngeální anomálie** – anomálie zadní části měkkého patra a hltanu; \* **Genitourinární** – močopohlavní; \* **Polyhydramnion** – patologické zvýšení objemu plodové vody.





Studie	Trizomie 21	Trizomie 18	Trizomie 13	Euploidní	Pohlaví
Gil et al (2014) <sup>25</sup>	9 z 10		1 z 1	181 z 181	
Bevilacqua et al (2015) <sup>29</sup>	11 z 12	5 z 5		323 z 323	
Sarno et al (2016) <sup>30</sup>	8 z 8	3 z 4	0 z 1	403 z 404	
Jones et al (2017) <sup>27</sup>					39 z 39
Galeva et al (2019) <sup>31</sup>	6 z 6	2 z 3	0 z 0	206 z 206	
Gil et al (2019) <sup>26</sup>	16 z 17	9 z 10	1 z 2	962 z 968	
Judah et al (2021) <sup>45</sup>	20 z 21	9 z 10	1 z 2	1235 z 1240	

▲ Tab. 3: Výsledky vybraných validačních studií použití testu Harmony® pro dvojčetná těhotenství

Analýza cfDNA pocházející z chromozomů X a Y vyžaduje rigorózní a pokročilý algoritmus. Test Harmony® hodnotí pravděpodobnost pěti možných variant aneuploidií pohlavních chromozomů (monozomie X, XXX, XYY, XXY a XYY) u jednočetných těhotenství.<sup>27,38</sup> Přítomnost více než jednoho plodu však exponenciálně zvyšuje komplexitu analýzy. Z tohoto důvodu není test Harmony® validován pro stanovení aneuploidie pohlavních chromozomů u dvojčetných těhotenství.

## Validační studie testu Harmony® u dvojčetných těhotenství

Prenatální test Harmony® patří celosvětově k jednomu z nejpoužívanějších NIPT testů, který byl validován v řadě provedených studií, včetně rozsáhlé prospektivní

studie z roku 2015, ve které bylo otestováno téměř 16 000 žen.<sup>46</sup> Mnoho dalších studií pak validovalo použití testu Harmony® přímo i pro dvojčetná těhotenství (viz tab. 3). Srovnání výsledků ukazuje, že přestože je citlivost testu Harmony® v případech vícečetných těhotenství o něco nižší než u jednočetných, dosahuje test velmi dobrých prediktivních hodnot pro trizomie 21, 18 a 13 i detekci pohlaví plodu a lze jej bezpečně používat v rámci prvotrimestrálního screeningu.<sup>25,26,27,29-30,45-46</sup>

## Závěr

Zvýšená rizika spojená s dvojčetným těhotenstvím a zároveň technologické komplikace v diagnostice, které tato těhotenství přináší, vytváří potřebu spolehlivých, citlivých a současně bezpečných screeningových nástrojů. Neinvasivní prenatální test (NIPT) Harmony® splňuje tyto požadavky



a může být použit v rámci prvotrimestrálních screeningových programů pro vyhodnocení rizik aneuploidií chromozomu 21, 18 a 13 a stanovení pohlaví plodů i pro dvojčetná těhotenství, což bylo potvrzeno řadou validačních studií. Díky přesnému vyhodnocení podílů fetální frakce cfDNA a použití pokročilého algoritmu odhadu rizika test Harmony® poskytuje vysoce citlivé a zároveň specifické výsledky nezbytné pro racionální rozhodování o vedení těhotenství.



### Mgr. Tomáš Dráb, Ph.D.

ROCHE s.r.o., Diagnostics Division

Kontakt: tomas.drab@roche.com

Pracuje ve společnosti Roche s.r.o. jako marketingový a produktový manažer pro sekvenační a molekulární portfolio.

Kromě vědy a techniky rád tráví čas na cestách a své volno věnuje sportu, dobrým knihám a občasnému experimentování v kuchyni.



Základní informace o zdravotnickém prostředí IVD Harmony® (prenatální neinvasivní diagnostický test – NIPT je zaslací službou Roche) naleznete na webu <https://go.roche.com/Navody>.

## LITERATURA

1. Grati FR, Molina Gomes D, Ferreira, Jose Carlos Pinto B, Dupont C, et al. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenat Diagn.* 2015; 35(8): 801-809.
2. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, et al. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Prim.* 2015; 1: 15071. doi:10.1038/nrdp.2015.71.
3. 22q11.2 Deletion Syndrome - GeneReviews® - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1523/>. Accessed August 5, 2020.
4. Palmer LD, Butcher NJ, Boot E, et al. Elucidating the diagnostic odyssey of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018; 176(4): 936-944. doi:10.1002/ajmg.a.38645.



5. Schindewolf E, Khalek N, Johnson MB, et al. Expanding the fetal phenotype: Prenatal sonographic findings and perinatal outcomes in a cohort of patients with a confirmed 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2018; 176(8): 1735-1741. doi:10.1002/ajmg.a.38665.
6. Morrow BE, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Vermeesch JR, Scambler PJ. Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2018; 176(10): 2070-2081. doi:10.1002/ajmg.a.40504.
7. Rauch A, Hoyer J, Guth S, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet Part A*. 2006; 140(19): 2063-2074. doi:10.1002/ajmg.a.31416.
8. Cheung ENM, George SR, Andrade DM, Chow EWC, Silversides CK, Bassett AS. Neonatal hypocalcemia, neonatal seizures, and intellectual disability in 22q11.2 deletion syndrome. *Genet Med*. 2014; 16(1): 40-44. doi:10.1038/gim.2013.71.
9. Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, et al. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr*. 2011; 159(2). doi:10.1016/j.jpeds.2011.02.039
10. Campbell IM, Sheppard SE, Crowley TB, et al. What is new with 22q? An update from the 22q and You Center at the Children's Hospital of Philadelphia. *Am J Med Genet Part A*. 2018; 176(10): 2058-2069. doi:10.1002/ajmg.a.40637.
11. Bevilacqua, E. et al. (2020) Performance of a targeted cell-free DNA prenatal test for 22q11.2 deletions in a large clinical cohort. Poster presented at the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology's Virtual World Congress.
12. Horowitz A, Shifman S, Rivlin N, Pisanté A, Darvasi A (2005). „A survey of the 22q11 microdeletion in a large cohort of schizophrenia patients“. *Schizophr. Res.* 73 (2-3): 263-7. doi:10.1016/j.schres.2004.02.008.
13. Kagan K, Hoopmann M, Pfaff T et al., First Trimester Screening for Common Trisomies and Microdeletion 22q11.2 Syndrome Using Cell-Free DNA: A Prospective Clinical Study, *Fetal Diagn Ther* 2020; 47: 841-851.
14. Demografická ročenka České republiky, D.21, ČSÚ, roky 1989-2019.
15. Centre NC. Multiple pregnancy. *Heal (San Fr)*. 2011; September).
16. ACOG. Practice Bulletin 169: Multifetal gestations: Twin, triplet and higher-order multifetal pregnancies. *Obstet Gynecol*. 2016; 128(4): e131-e146.
17. Oepkes D, Suetters M. Antenatal fetal surveillance in multiple pregnancies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017; 38: 59-70.
18. Khalil A, Rodgers M, Baschat A, et al. ISUOG Practice Guidelines: role of ultrasound in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016; 47(2): 247-263.
19. American College of Obstetricians and Gynecologists, Society for Maternal-Fetal Medicine. *Obstetric Care Consensus No. 6*. *Obstet Gynecol*. 2017; 130(4): e187-e199.
20. Audibert F, Gagnon A. No. 262-Prenatal Screening for and Diagnosis of Aneuploidy in Twin Pregnancies. *J Obstet Gynaecol Canada*. 2017; 39(9): e347-e361.
21. Gil M, Accurti V, Santacruz B, Plana M, Nicolaides K. Analysis of Cell-Free DNA in Maternal Blood in Screening For Aneuploidies: Updated Meta-Analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017; 50: 302-314.
22. Struble C, Syngelaki A, Oliphant A, Song K, Nicolaides KH. Fetal Fraction Estimate in Twin Pregnancies Using Directed Cell-Free DNA Analysis. *Fetal Diagn Ther*. December 2013.
23. Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn*. 2012; 32(8): 730-734.
24. Grömminger S, Yagmur E, Erkan S, et al. Fetal Aneuploidy Detection by Cell-Free DNA Sequencing for Multiple Pregnancies and Quality Issues with Vanishing Twins. *J Clin Med*. 2014; 3(3): 679-692.
24. del Mar Gil M, Quezada MS, Bregant B, Syngelaki A, Nicolaides KH. Cell-Free DNA Analysis for Trisomy Risk Assessment in First-Trimester Twin Pregnancies. *Fetal Diagn Ther*. 2014; 35(3): 204-211.
26. Gil M, Galeva S, Jani J, Konstantinidou L, Akolekar R, Plana M, Nicolaides K. Screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in twin pregnancy: update of The Fetal Medicine Foundation results and meta-analysis *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2019 Jun; 53(6): 734-742.
27. Jones KJ, Wang E, Bogard P, et al. Performance of targeted cell-free DNA (cfDNA) analysis with microarray quantitation for assessment of fetal sex and sex chromosome aneuploidy risk. *Ultrasound Obstet Gynecol*. November 2017. doi:10.1002/uog.18968.
28. 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; 35: 1243-1246.
29. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015; 45(1): 61-66.
30. Sarno L, Revello R, Hanson E, Akolekar R, Nicolaides KH. Prospective screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in first trimester twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. March 2016.
31. Galeva S, Konstantinidou L, Gil MM, Akolekar R, Nicolaides KH. Routine first-trimester screening for fetal trisomies in twin pregnancy: cell-free DNA test contingent on results from combined test. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2019 Feb; 53(2): 208-213.
32. Galeva S, Gil MM, Konstantinidou L, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in singleton and twin pregnancies: factors affecting test failure. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2019 Jun; 53(6): 804-809.
33. Benn P, Borrell A, Chiu RWK, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn*. 2015; 35(8): 725-734.
34. Schmid M, White K, Stokowski R, Miller D, Bogard PE, Valmeekam V, Wang E. Accuracy and reproducibility of fetal-fraction measurement using relative quantitation at polymorphic loci with microarray. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018 Jun; 51(6): 813-817.
35. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, 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*. 2012; 206(4): 319.e1-9.
36. Brar H, Wang E, Struble C, Musci TJ, Norton ME. The fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma is not affected by a priori risk of fetal trisomy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013; 26(2): 143-145.
37. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2013; 33(7): 662-666.
38. Nicolaides KH, Musci, TJ, Struble, C Syngelaki, A Gil, M M. Assessment of Fetal Sex Chromosome Aneuploidy Using Directed Cell-Free DNA Analysis *Fetal Diagn Ther*. 2014; 35(1): 1-6.30.
39. Revello R, Sarno L, Ispas A, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of failed result. *Ultrasound Obstet Gynecol*. January 2016.
40. ACOG. Screening for fetal aneuploidy. *Practice Bulletin Number 163*. *Obstet Gynecol*. 2016.
41. Bevilacqua E, Chen K, Wang Y, Doshi J, White K, de Marchin J, Conotte S, Jani JC, Schmid M. Cell-free DNA analysis after reduction in multifetal pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2019 Jun 10.
42. Thurik FF, Ait Soussan A, Bossers B, et al. Analysis of false-positive results of fetal RHD typing in a national screening program reveals vanishing twins as potential cause for discrepancy. *Prenat Diagn*. April 2015.
43. Kelley JF, Henning G, Ambrose A, Adelman A. Vanished Twins and Misdiagnosed Sex: A Case Report with Implications in Prenatal Counseling Using Noninvasive Cell-Free DNA Screening. *J Am Board Fam Med*. 29(3): 411-413.
44. Vlková B, Hodosy J. Vanishing twin as a potential source of bias in non-invasive fetal sex determination: A case report. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014; 40(4): 1128-1131.
45. Judah H, Gil MM, Syngelaki A et al. Cell-free DNA testing of maternal blood in screening for trisomies in twin pregnancy: cohort study at 10-14 weeks and updated meta-analysis, *Ultrasound Obstet Gynecol* 2021.
46. Norton E, Jacobsson B, Swamy G, et al., Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy, *N Engl J Med*. 2015 Apr 23; 372(17): 1589-97.