

Gruppo di Lavoro Regionale Test Prenatali Non Invasivi (NIPT)

Resoconto delle attività: marzo - giugno 2015

Gruppo di Lavoro

Coordinatore:

Luciana Ballini Responsabile dell'Area di Programma Osservatorio Regionale per l'Innovazione, Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale - Emilia-Romagna

Componenti:

Paolo Accorsi Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita e Direttore del Dipartimento Materno Infantile - Azienda USL - di Modena

Giuseppe Battagliarin Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita e Direttore del Dipartimento Materno Infantile - Azienda USL della Romagna

Silvana Borsari Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita e Direttore U.O Consulteri famigliari Azienda USL di Modena

Olga Calabrese Direttore f.f. Unità Operativa di Genetica Medica, Azienda USL di Imola

Stefano Canestrari Professore ordinario, Dipartimento di Scienze Giuridiche, Università degli Studi di Bologna

Elena Castelli Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita - Servizio assistenza Territoriale - DGSPS

Paola Dalla Casa Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita

Carla Dazzani Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita e responsabile assistenziale del PDTA "percorso nascita" Ausl di Bologna

Fabio Facchinetti Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita e Direttore ff della Clinica Ostetrica e Ginecologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena

Tiziana Frusca Direttore della Clinica Ostetrica e Ginecologica, Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma

Pantaleo Greco	Direttore della Clinica Ostetrica e Ginecologica Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara
Cristina Incerti Medici	Direttore Medico di Stabilimento, Ospedale Magati di Scandiano, Azienda USL di Reggio Emilia
Marina Lalatta Costerbosa	Dipartimento di Filosofia e Comunicazione, Università degli Studi di Bologna
Marinella Lenzi	Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita e dirigente medico UO Ostetricia e Ginecologia, Azienda USL di Bologna
Nicola Rizzo	Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita e Direttore UO Ostetricia e Medicina dell'Età Prenatale, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna
Elisa Rozzi	Servizio Presidi Ospedalieri - DGSPS
Fabrizio Sandri	Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita e Direttore del Dipartimento Materno-Infantile, Azienda USL di Bologna
Sandra Santucci	Dirigente medico, U.O. Consultori familiari, Azienda USL di Modena
Maria Grazia Stagni	Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita e Direttore Ospedale di Ravenna, Azienda USL della Romagna
Tommaso Trenti	Direttore del Dipartimento Interaziendale integrato di Laboratorio, Azienda USL di Modena
Silvia Zoli	Unione Comuni della Bassa Romagna

Gruppo tecnico:

Vittorio Basevi	Componente della Commissione Consultiva tecnico-scientifica sul Percorso Nascita - Servizio Assistenza Territoriale - Direzione Generale Sanità e Politiche Sociali - DGSPS
Maria Camerlingo	Area di Programma Osservatorio Regionale per l'Innovazione, Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale

Susanna Maltoni	Area di Programma Osservatorio Regionale per l'Innovazione, Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale
Barbara Mazzoni	Aree di Programma "Governance della Ricerca" e Osservatorio Regionale per l'Innovazione, Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale
Antonella Negro	Area di Programma Osservatorio Regionale per l'Innovazione, Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale
Fabio Trimaglio	Area di Programma Osservatorio Regionale per l'Innovazione, Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale

Indice

Premessa	5
1.Introduzione	6
1.1 Percorso di Screening Prenatale in Regione Emilia-Romagna	6
1.2 Test Prenatali Non Invasivi (NIPT)	8
2.Obiettivi	10
3.Metodi	10
3.1 Definizione dei quesiti di ricerca	10
3.2 Revisione sistematica della letteratura	11
3.3 Presentazione dei risultati al gruppo di lavoro	12
3.4 Sviluppo delle raccomandazioni	12
4.Risultati	13
4.1 Quesiti di ricerca	13
4.2 Revisione sistematica della letteratura	15
4.3 Presentazione dei risultati al gruppo di lavoro	25
4.4 Sviluppo delle raccomandazioni	27
5.Conclusioni	28
Referenze	29

Premessa

Nel gennaio 2015 l'Area di Programma Osservatorio Regionale per l'Innovazione dell'Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale ha ricevuto mandato dal Gruppo di Coordinamento della Commissione Nascita della Regione Emilia-Romagna di effettuare una valutazione tecnico-scientifica dei test prenatali non invasivi basati su DNA (Non Invasive Prenatal Testing - NIPT).

Con Determinazione n.3223/2015 dell'Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale è stato costituito un gruppo di lavoro multidisciplinare con il compito di formulare raccomandazioni relative all'utilizzo e inserimento dei nuovi test genetici nell'attuale percorso di indagini prenatali per la diagnosi di aneuploidie cromosomiche fetali (T13, T18, T21 e dei cromosomi sessuali).

Di seguito viene riportato un resoconto delle attività svolte dal gruppo di lavoro, presentato alla Commissione Nascita in data 21 gennaio 2016.

Il rapporto tecnico-scientifico completo sul processo di valutazione è in corso di finalizzazione e verrà pubblicato sul sito della ASSR (<http://assr.regione.emilia-romagna.it/it>).

1. Introduzione

Il percorso di indagini prenatali in Regione Emilia-Romagna

Attualmente, in Emilia-Romagna, il ri-calcolo del rischio di aneuploidie fetali viene proposto a tutte le donne in gravidanza ed effettuato mediante il test combinato. Il test combinato calcola il rischio di aneuploidie fetali attraverso un algoritmo [Wilson 2013] che combina

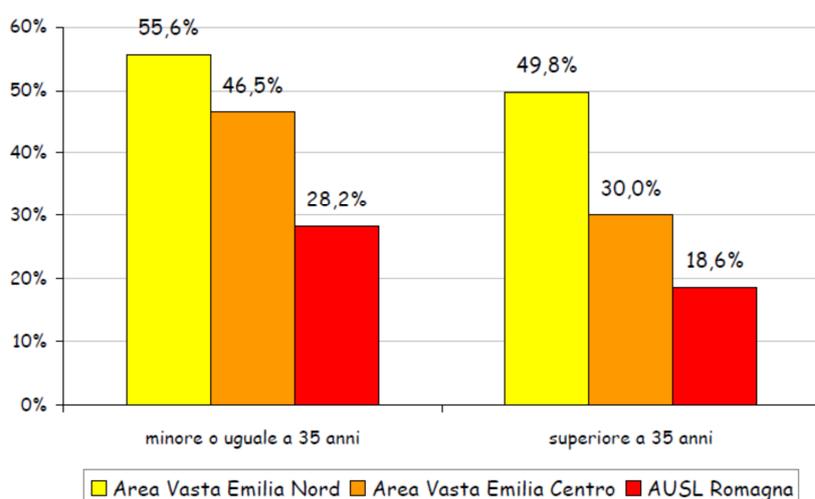
- l'età della madre
- i valori di due markers sierologici materni (maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A, PAPP-A, e maternal serum β -human chorionic gonadotrophin, β -hCG) misurati tra 10⁺⁰ e 14⁺¹ settimane di gestazione
- il valore della translucenza nucale misurata ecograficamente tra 11⁺² e 14⁺⁰ settimane di gestazione

Il test combinato fornisce una stima della probabilità individuale di partorire un feto affetto da trisomia 13, 18 o 21; può inoltre essere d'aiuto nella determinazione di altre anomalie congenite, quali i difetti cardiaci [Wilson 2013]. Il risultato del test viene presentato come probabilità che il feto sia affetto da anomalie dei cromosomi 13, 18 o 21.

La stima di probabilità individuale viene confrontata con un cut-off (in Regione Emilia-Romagna definito pari a 1/250): nel caso in cui la probabilità individuale sia inferiore al cut-off il risultato del test combinato è da ritenersi negativo, se invece il valore individuale è superiore a 1/250, il risultato del test è da ritenersi positivo. In questo ultimo caso alla donna viene offerta la possibilità di effettuare il test diagnostico invasivo (villocentesi, CVS, entro 13⁺⁶ settimane o amniocentesi, a partire da 15⁺⁰ settimane) per stabilire se il feto sia affetto o meno da aneuploidia fetale.

Con Delibera regionale 533/2008 il test combinato è stato introdotto come test per le indagini prenatali nel percorso nascita della Regione Emilia-Romagna. Dal rapporto sui dati del 2014 del Certificato di Assistenza al Parto (CedAP) risulta una adesione al test combinato da parte delle donne che portano a termine la gravidanza del 44%, con una marcata variabilità di adesione tra le Aree Vaste (Figura 1). Il ricorso diretto alle procedure diagnostiche invasive – non precedute da test combinato - risulta essere del 14,6% delle donne che hanno partorito nel 2014 (12° Rapporto sui dati del Certificato di Assistenza al Parto (CedAP) – Anno 2014).

Figura 1: Adesione al test combinato per età e per Area Vasta (anno 2014)



I Test Prenatali Non Invasivi (NIPT)

Con il termine Test Prenatali Non Invasivi (NIPT) si intende il riconoscimento della presenza di aneuploidie autosomiche fetali attraverso l'analisi di frammenti di DNA libero (cell-free DNA - cfDNA) presenti nel sangue materno. Il test viene proposto a donne tra 10⁺⁰ e 14⁺⁰ settimane di gestazione e consiste in un prelievo di sangue venoso della madre [Bianchi 2014].

Il cell-free DNA isolato nel sangue materno è un insieme del DNA libero fetale (cell-free fetal DNA, cffDNA) e materno. Essendo i frammenti materni e fetali diversi in lunghezza (166 appaiamenti di base per la madre e 143 per il feto), la differenza in lunghezza tra il DNA fetale e quello materno viene sfruttata per l'arricchimento selettivo del DNA fetale. Il cffDNA è presente nel sangue materno in proporzioni variabili a seconda dell'epoca gestazionale e la sua concentrazione aumenta gradualmente durante la gravidanza: può essere rilevato a partire dalla quinta settimana e quasi sempre dopo la nona. Viene rapidamente rimosso dalla circolazione materna subito dopo il parto.

Oltre che dall'epoca gestazionale, la concentrazione di cffDNA dipende anche dal peso corporeo materno, in quanto la concentrazione di cffDNA diminuisce proporzionalmente con il crescere del peso corporeo della gestante. Inoltre la rilevazione di aneuploidie attraverso questa metodica presenta particolari difficoltà nelle gravidanze multiple.

Il DNA fetale libero circolante è isolato dalla componente plasmatica del sangue materno e sottoposto a processo di sequenziamento massivo parallelo per il rilevamento di aneuploidie,.

Attualmente sono disponibili tre tipi di tecniche di sequenziamento: Massive Parallel Sequencing - MPS, che sequenzia l'intero genoma, Targeted Sequencing Chromosome o Selective Sequence Analysis (CSS), che limita il processo ai cromosomi di interesse (e.g., 13, 18, 21, X, and Y), e la tecnica del Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) che utilizza le differenze nel polimorfismo del singolo nucleotide tra madre e feto.

Gli NIPT non sono test diagnostici, bensì test per il ri-calcolo del rischio di presenza di aneuploidie fetali, che per essere confermata necessita di procedure diagnostiche invasive. I risultati vengono forniti sotto forma di rischio (alto o basso).

Gli NIPT presentano le seguenti potenzialità:

1. capacità di fornire un calcolo più accurato del rischio di trisomia 13, 18 e 21 rispetto al test combinato, portando a una riduzione dei falsi positivi e, quindi, delle donne con feto sano alle quali – sulla base del risultato del test - viene proposto l'intervento diagnostico invasivo;
2. capacità di fornire un calcolo del rischio di aneuploidie fetali più precocemente rispetto al test combinato.

In Regione Emilia-Romagna gli NIPT non sono rimborsati dal Servizio sanitario regionale, ma possono essere eseguiti solo privatamente.

2. Obiettivi

Valutare accuratezza diagnostica, efficacia clinica e sicurezza dei Test Prenatali Non Invasivi (NIPT) e formulare raccomandazioni relative al loro utilizzo e inserimento nell'attuale percorso di indagini prenatali per la diagnosi di aneuploidie cromosomiche fetali.

3. Metodi

Durante la riunione di insediamento - tenutasi il 4 marzo 2015 - il gruppo di lavoro ha concordato la seguente metodologia per il raggiungimento degli obiettivi assegnati.

3.1 Definizione dei quesiti di ricerca

I quesiti di ricerca sono stati definiti dal gruppo di lavoro nel corso di due riunioni collegiali (4 e 19 Marzo 2015) utilizzando il metodo GRADE per la formulazione di raccomandazioni per la pratica clinica (Schünemann 2008). Il metodo prevede che - per ogni quesito di ricerca - il gruppo condivida la definizione della popolazione target, dell'intervento da valutare e dell'appropriato comparatore e che identifichi gli esiti clinici e organizzativi rilevanti, classificandoli per livello di importanza (critico, importante, non importante). L'importanza di ogni esito è stata stabilita attraverso la media matematica del voto (tra 1 e 9) espresso individualmente da ogni componente del gruppo di lavoro (escluso il gruppo tecnico).

3.2 Revisione sistematica della letteratura

Una revisione sistematica della letteratura, necessaria a rispondere ai quesiti identificati dal gruppo di lavoro, è stata effettuata dal gruppo tecnico dell'Area di Programma Osservatorio Regionale per l'Innovazione.

La ricerca in letteratura è stata effettuata - inizialmente con data 1 gennaio 2011/6 marzo 2015 - nelle seguenti banche dati: MEDLINE, MEDLINE InProcess, EMBASE, Cochrane Library: Cochrane Database of Systematic Reviews. La ricerca è stata limitata a studi pubblicati in lingua inglese, italiana, francese e spagnola ed è stata aggiornata in data 2 e 20 Aprile e 15 Maggio 2015.

Due revisori indipendenti hanno verificato l'eligibilità degli studi applicando i seguenti criteri di inclusione: studi randomizzati-controllati; studi cross-sectional prospettici che confrontano NIPT con test combinato e Reference Standard o con solo Reference Standard (test diagnostico invasivo o esito alla nascita). Serie temporali interrotte prospettiche sono state incluse per valutare gli esiti diversi dall'accuratezza diagnostica,

Sono stati inclusi solamente gli studi per i quali è stato possibile ottenere o estrapolare valori per i Veri Positivi, Veri Negativi, Falsi Positivi e Falsi Negativi; gli studi con insufficienti informazioni sui metodi o con una percentuale di validazione dei risultati dei test in studio inferiore all'85% sono stati esclusi. Sono stati esclusi gli studi sulle gravidanze multiple.

La qualità degli studi è stata valutata applicando i criteri forniti dalla checklist QUADAS-2 (Whiting 2003), da Cochrane Handbook (Higgins 2011) e EPOC group (EPOC 2013).

La qualità delle evidenze è stata valutata applicando il metodo GRADE che classifica la qualità relativa a una determinata stima in "alta", "moderata", "bassa" e "molto bassa" (Guyatt 2008; Schünemann 2008; Balshem 2011).

Gli studi sono stati analizzati estraendo i dati in apposite tabelle e i dati di accuratezza diagnostica (sensibilità e specificità) sono stati riportati in forest-plot per il calcolo della stima metanalitica.

3.3 Presentazione dei risultati al gruppo di lavoro

I risultati della revisione sistematica della letteratura sull'accuratezza diagnostica degli NIPT e del comparatore (test combinato) sono stati presentati al gruppo di lavoro secondo la metodologia GRADE per lo sviluppo di raccomandazioni per i test diagnostici (Schünemann 2008). Per confrontare le diverse strategie di screening (test combinato seguito da procedure diagnostiche invasive versus NIPT seguito da procedure diagnostiche invasive oppure test combinato seguito da procedure diagnostiche invasive versus test combinato seguito da NIPT, seguito da procedure diagnostiche invasive), sono stati riportati i valori dei Veri Positivi, Veri Negativi, Falsi Positivi e Falsi Negativi dei test in studio (Gigerenzer 2007). I valori sono stati ottenuti attraverso una simulazione dell'applicazione delle stime di sensibilità e specificità alla popolazione target dell'Emilia-Romagna e della corrispondente probabilità pre-test della condizione target (Trisomia 13, 18 e 21) (Gigerenzer 2007).

3.4 Sviluppo delle raccomandazioni

Il metodo GRADE per lo sviluppo di raccomandazioni per i test diagnostici (Schünemann 2008) è stato utilizzato dal gruppo di lavoro per decidere sull'utilizzo e l'inserimento degli NIPT nell'attuale percorso prenatale per la diagnosi di aneuploidie cromosomiche fetali.

Nel corso di due riunioni collegiali (in data 20 maggio e 5 giugno 2015) il gruppo di lavoro ha discusso e valutato i rischi e i benefici delle diverse strategie possibili. Al termine della discussione i componenti del gruppo (escluso il gruppo tecnico) hanno espresso il proprio voto individuale sulla opportunità o meno di raccomandare i test. Il risultato della votazione, analizzata sia per maggioranza che per consenso attraverso il metodo RAND (RAND/UCLA Appropriateness Method), ha sancito la conclusione dei lavori.

4. Risultati

4.1 Quesiti di ricerca

Al termine della seconda riunione collegiale (10 marzo 2015), il gruppo di lavoro ha definito tre quesiti di ricerca, per i quali ha dato mandato al gruppo tecnico di effettuare la revisione sistematica della letteratura.

I tre quesiti espressi dal gruppo di lavoro sono :

1. I Test Prenatali Non Invasivi (NIPT) dovrebbero sostituire il test combinato per tutte le donne che richiedono di essere sottoposte a indagini prenatali per la diagnosi di Trisomia 13, 18 o 21?
2. I Test Prenatali Non Invasivi (NIPT) dovrebbero essere utilizzati in aggiunta al test combinato per le donne identificate ad alto rischio (superiore a 1/250) di Trisomia 13, 18 o 21?
3. I Test Prenatali Non Invasivi (NIPT) dovrebbero essere utilizzati in aggiunta al test combinato per le donne identificate a rischio intermedio (tra 1/100 e 1/1000) di Trisomia 13, 18 o 21?

Gli esiti clinici e organizzativi individuati come rilevanti al fine di effettuare la comparazione tra NIPT e Test Combinato sono riportati in Tabella 1, con indicato il livello di importanza risultato dalla votazione del gruppo di lavoro.

Tabella 1: Esiti rilevanti

Esito	Livello di Importanza
<u>Veri Positivi</u> : Donne portatrici di feto affetto a cui viene offerta procedura diagnostica invasiva	Critico
<u>Veri Negativi</u> : Donne portatrici di feto non affetto che concludono il percorso	Critico
<u>Falsi Positivi</u> : Donne portatrici di feto non affetto a cui viene offerta procedura diagnostica invasiva	Critico
<u>Falsi Negativi</u> : Donne portatrici di feto affetto a cui non viene offerta procedura diagnostica invasiva	Critico
% di campioni inutilizzabili	Importante
Numero o % di donne inviate a procedura diagnostica invasiva	Critico
Numero o % di eventi avversi correlati a procedura diagnostica invasiva	Critico
Probabilità di completamento del percorso diagnostico in epoca gestazionale avanzata (oltre le 15 settimane)	Critico
Livello di ansia correlata al processo di indagini prenatali	Importante
Complessità del percorso	Importante
Costi	Importante

4.2 Revisione sistematica della letteratura

Quesito 1: NIPT in sostituzione al test combinato per la popolazione generale di donne gravide

Accuratezza Diagnostica

Sono stati inclusi 10 studi cross-sectional prospettici di confronto tra NIPT e Reference Standard oppure tra NIPT, test combinato e Reference Standard (Bianchi 2014, Comas 2014, Dan 2012, Lau 2014, Norton 2015, Pergament 2014, Quezada 2015, Shaw 2014, Song 2015, Zhang 2015).

Il Reference Standard utilizzato è il test invasivo (villocentesi o amniocentesi) oppure l'esito alla nascita, eseguito su almeno l'85% dei soggetti reclutati, eccetto in due studi (Dan 2012, Zhang 2015).

La popolazione inclusa negli studi è sia popolazione generale di donne in gravidanza che mista per livello di rischio e il numero totale delle donne in studio sottoposte anche a Reference Standard è risultato essere 145958.

La qualità degli studi è risultata essere buona, permettendo di eseguire una metanalisi, Il disegno di studio è risultato appropriato senza rilevanti bias di conduzione, le stime di sensibilità e specificità risultano concordanti. Gli intervalli di confidenza per la specificità sono piuttosto stretti e simili tra gli studi, mentre per la sensibilità si registra una maggiore variabilità di ampiezza dell'intervallo di confidenza. Poiché solo 4 studi riportano le stime di sensibilità e specificità del test combinato, la stima di sensibilità e specificità del test combinato è stata derivata dalla letteratura secondaria di riferimento .

Due studi con attrition bias (meno dell'85% dei soggetti inclusi sottoposti a Reference Standard) sono stati comunque inclusi per via della grande dimensione. Un'analisi di sensibilità effettuata eliminando i due studi con attrition bias non ha evidenziato cambiamenti sostanziali nelle stime e intervalli di confidenza.

Il principale elemento di criticità per trasferibilità e applicabilità delle stime di sensibilità e specificità al quesito d'interesse è l'alta prevalenza di donne ad alto rischio, rispetto a quanto atteso nella popolazione generale di donne gravide, riscontrata in tre (Dan 2012, Pergament 2014, Shaw 2014) dei 10 studi. La qualità totale delle evidenze per la stima metanalitica di sensibilità e specificità è stata pertanto considerata "moderata".

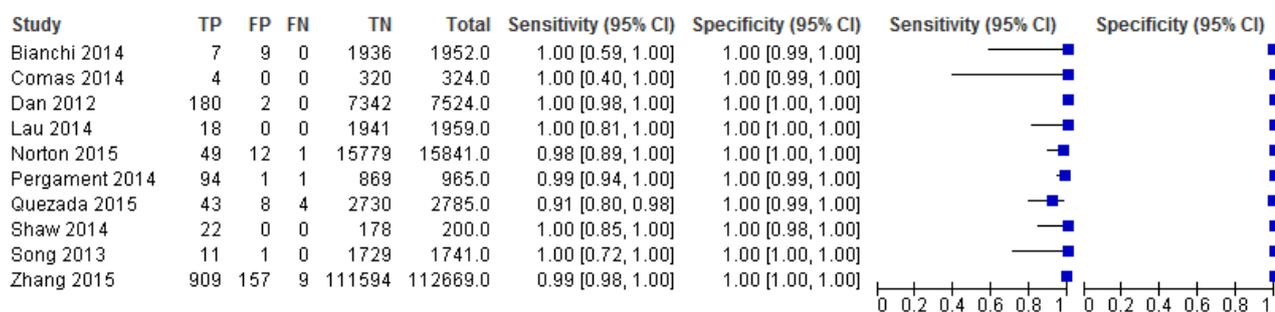
In Tabella 2 sono riportati i risultati della metanalisi, mentre nella Figura 2 è rappresentato il forest plot delle stime per gli NIPT riportate dai singoli studi: sensibilità e specificità (I.C. 95%), Veri Positivi (TP), Falsi Positivi (FP), Falsi Negativi (FN) e Veri Negativi (TN).

Tabella 2: Risultati della metanalisi

Accuratezza diagnostica T21 + T18 + T13		Stima	Qualità delle evidenze
Sensibilità (pooled)	NIPT	99.43% (97.43%-99.87%)	Moderata
	Test combinato*	85% *	
Specificità (pooled)	NIPT	99.91% (99.80%-99.95%)	Moderata
	Test combinato*	95% *	
Test Failure (mediana + range)	NIPT	1.5 % (0.0% - 8.8%)	Alta
Pre-Test Probability (prevalenza media)	T21 + T18 + T13	2.9%	Moderata

* stime tratte da Messerlian GM, Farina A, Palomaki GE. First trimester combined test and integrated tests for screening for Down syndrome and trisomy 18. Uptodate, April 2015.

Figura 2: Forest plot di sensibilità e specificità di NIPT (T21, T18, T13).



Summary Sensitivity: 99.43% (97.43%-99.87%)

Summary Specificity: 99.91% (99.80%-99.95%)

Test Failure

Per valutare la percentuale di campioni inutilizzabili sono stati inclusi i medesimi dieci studi di accuratezza diagnostica prospettici di buona qualità, con popolazione generale e mista per livello di rischio, per un totale di donne sottoposta a Index test di 185180.

La percentuale mediana di campioni inutilizzabili è risultata essere 1.5% (range: 0.0% - 8.8%) e la qualità della stima è stata giudicata "alta".

Numero o % di donne inviate a successivo test diagnostico invasivo

E' stato incluso uno studio osservazionale prima-dopo (Larion 2014) rianalizzato secondo il metodo delle Serie Temporal Interrotte, condotto negli Stati Uniti sulla popolazione generale di donne gravide, che ha raccolto i dati nell'arco di 51 mesi per un totale di 1385 test invasivi tra amniocentesi e villocentesi. Lo studio ha confrontato il periodo pre-introduzione del test NIPT (aprile 2009 – febbraio 2012) con il periodo post introduzione del test, (marzo 2012 - giugno 2013; data di introduzione del test: marzo 2012). Il disegno di studio prima-dopo non è stato giudicato appropriato per valutare l'impatto dell'intervento sull'esito. Tuttavia sono

stati contattati gli autori, che hanno fornito i dati su base mensile, permettendo di includere lo studio ed effettuare una analisi statistica più affidabile, pur non ovviando ai bias strutturali del disegno di studio.

L'analisi ha fornito un risultato di "nessuna differenza" per quanto concerne l'amniocentesi e di diminuzione di 0.5/mese per la villocentesi. La qualità delle evidenze è stata giudicata " molto bassa"

Numero o % di eventi avversi correlati a procedura diagnostica invasiva

Nessuno studio reperito e incluso.

Probabilità di completamento del percorso diagnostico in epoca gestazionale avanzata (oltre 15 settimane di età gestazionale)

Nessuno studio reperito e incluso.

Livello di ansia correlata al processo di screening

Nessuno studio reperito e incluso.

Complessità del percorso di screening

Nessuno studio reperito e incluso

Costi

Sono stati inclusi 6 studi di comparazione tra NIPT e test combinato (o una chiara descrizione della pratica corrente) su popolazione generale di donne gravide, che riportano (o permettono di calcolare) il costo incrementale per T21 diagnosticata, il costo incrementale per evento avverso grave da test invasivo evitato (aborto spontaneo) e l'impatto complessivo sul budget (Ayres 2014; Beulen 2014; Morris 2014; Neyt 2014; Okun 2014; Walker 2014).

Gli studi sono di buona qualità, ma con una elevata eterogeneità, dovuta sia alla valorizzazione dei parametri di input che alla prospettiva di analisi adottata: alcuni studi includono i costi dell'eventuale aborto spontaneo, interruzione di gravidanza e/o della tipologia di parto; altri ancora includono i costi sanitari e/o i costi non

sanitari associati alla vita di un soggetto con Sindrome di Down. Per la valorizzazione dei parametri, quasi tutti gli studi utilizzano come proxy il costo dei test: costo mediano NIPT €571 (range €322 – €1,079); costo mediano test combinato €104 (range €36 – €340); costo mediano test invasivo € 935 (range €199.17 – €1,501).

Nonostante l'alta qualità degli studi, la qualità delle evidenze relativa alle stime fornite è risultata bassa per la scarsa trasferibilità. Questo risultato è frequente per gli studi di impatto economico, che risultano utili principalmente come termine di riferimento per la conduzione di una valutazione economica ad hoc relativa al contesto di interesse. La Tabella 3 riporta i risultati degli studi presi in esame.

Tabella 3: Risultati (mediana e range) dei costi

Esito	Risultati	Qualità delle evidenze
Costi	Costo incrementale per T21 diagnosticata : mediana: € 537,909 range: € 305,444 – € 1358,387	Bassa
	Costo incrementale per evento avverso evitato: mediana: € 1595,257 range: € 703,746– € 6398,2	Bassa
	Impatto sul budget: 4 volte budget pratica corrente (range 1.9-12.7 volte budget pratica corrente)	Bassa

Quesito 2: NIPT in aggiunta al test combinato per le donne con livello di rischio superiore a 1/250

Accuratezza Diagnostica

Sono stati inclusi 8 studi cross-sectional prospettici (Li 2015, Liang 2013, Nicolaidis 2013, Norton 2012, Porreco 2014, Song 2015, Stumm 2014, Verweij 2013) di confronto tra NIPT e Reference Standard eseguito su almeno l'85% dei soggetti reclutati. Gli studi inclusi hanno utilizzato come Reference Standard il test invasivo (villocentesi o amniocentesi) oppure l'esito alla nascita e hanno reclutato una popolazione ad alto rischio mista: positiva al test combinato e/o definita ad alto rischio sulla base di altri criteri. Il totale delle donne sottoposte a Index Test e Reference Standard ammonta a 8112.

Gli studi sono di buona qualità e hanno permesso di eseguire una metanalisi. Il disegno di studio è risultato appropriato e l'unico bias rilevante è il reclutamento spesso opportunistico delle donne. Le stime di sensibilità risultano lievemente variabili, con intervalli di confidenza ampi solo per gli studi di piccole dimensioni e a bassa prevalenza della condizione target. Le stime di specificità risultano concordanti con intervalli di confidenza molto stretti.

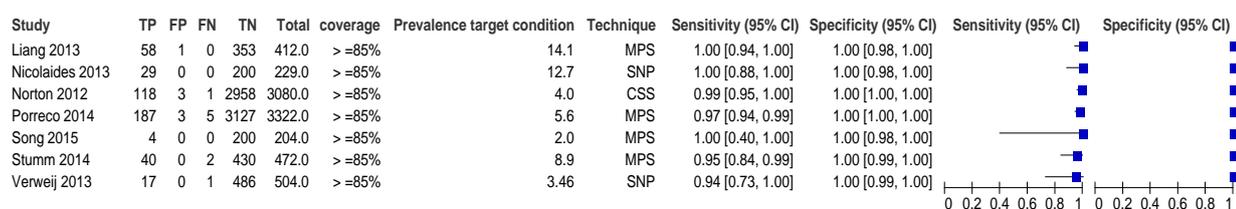
Il principale elemento di criticità per la trasferibilità e applicabilità delle stime di sensibilità e specificità al quesito d'interesse è rappresentato dal fatto che la popolazione ad alto rischio è spesso definita come avente indicazione per il test invasivo. Tuttavia l'indicazione al test invasivo ha una definizione variabile, che include la positività al test combinato, l'età materna avanzata, la familiarità e l'ansia materna. La qualità totale delle evidenze per la stima metanalitica di sensibilità e specificità è stata pertanto considerata "moderata".

In Tabella 4 sono riportati i risultati della metanalisi, mentre nella Figura 3 è rappresentato il forest plot delle stime per gli NIPT riportate dai singoli studi: sensibilità e specificità (I.C. 95%), Veri Positivi (TP), Falsi Positivi (FP), Falsi Negativi (FN) e Veri Negativi (TN).

Tabella 4: Risultati della metanalisi

Accuratezza diagnostica T21 + T18 + T13		Stima	Qualità delle evidenze
Sensibilità (pooled)	NIPT	98.05% (96.79%-99.31%)	Moderata
Specificità (pooled)	NIPT	99.91% (99.84%-99.98%)	Moderata
Test Failure (mediana + range)	NPT	4.6 % (0,5% - 6,3%)	Alta
Pre-Test Probability (prevalenza media)	T21 + T18 + T13	7.3 %	Moderata

Figura 3: Forest plot NIPT (T21, T18, T13)



Summary Sensitivity: 98.05% (96.79%-99.31%)

Summary Specificity: 99.91% (99.84%-99.98%)

Test Failure

Per valutare la percentuale di campioni inutilizzabili sono stati inclusi i medesimi 7 studi di accuratezza diagnostica prospettici di buona qualità, con popolazione ad alto rischio, per un totale di donne sottoposta a Index test di 8572

La percentuale mediana di campioni inutilizzabili è risultata essere 4.6 % (range: 0,5% - 6,3%) e la qualità della stima è stata giudicata "alta".

Numero o % di donne inviate a successivo test diagnostico invasivo

E' stato incluso uno studio osservazionale prima-dopo (Beamon 2014), rianalizzato secondo il metodo delle Serie Temporal Interrotte, condotto negli Stati Uniti su una popolazione ad alto rischio, che ha raccolto i dati sui test invasivi dal maggio 2011 al settembre 2012 (totale di 17 mesi per un totale di 208 test invasivi tra amniocentesi e villocentesi). La data di introduzione del test è gennaio 2012.

La qualità delle evidenze è risultata molto bassa in quanto il disegno di studio prima-dopo non è stato giudicato appropriato per valutare l'impatto dell'intervento sull'esito. Tuttavia nell'articolo gli autori hanno riportato i dati su base mensile, permettendo di includere lo studio ed effettuare una analisi statistica più affidabile, pur non ovviando ai bias strutturali del disegno di studio

L'analisi ha fornito un risultato di "nessun impatto" in termini di riduzione di numero o percentuale di amniocentesi e villocentesi. La qualità delle evidenze è stata giudicata "molto bassa".

Numero o % di eventi avversi correlati a procedura diagnostica invasiva

Nessuno studio reperito e incluso.

Probabilità di completamento del percorso diagnostico in epoca gestazionale avanzata (oltre le 15 settimane)

Nessuno studio reperito e incluso.

Livello di ansia correlata al processo di screening

Nessuno studio reperito e incluso.

Complessità del percorso di screening

Nessuno studio reperito e incluso

Costi

Sono stati inclusi 8 studi di comparazione tra NIPT e test combinato (o una chiara descrizione della pratica corrente), che riportano (o permettono di calcolare) il costo incrementale per T21 diagnosticata, il costo incrementale per evento avverso grave da test invasivo evitato (aborto spontaneo) e l'impatto complessivo sul budget (Ayres 2014; Beulen 2014; Garfield 2012; Morris 2014; Neyt 2014; Okun 2014; O'Leary 2013; Song 2013)

Gli studi sono di buona qualità ma con una elevata eterogeneità dovuta sia alla valorizzazione dei parametri di input che alla prospettiva di analisi adottata: alcuni studi includono i costi dell'eventuale aborto spontaneo, interruzione di gravidanza e/o della tipologia di parto; altri ancora includono i costi sanitari e/o i costi non sanitari associati alla vita di un soggetto con Sindrome di Down. Per la valorizzazione dei parametri, quasi tutti gli studi utilizzano come proxy il costo dei test: costo mediano NIPT €571 (range €322 – €1,079); costo mediano TC €104 (range €36–€340); costo mediano test invasivo € 935 (range €199.17 – €1,501).

Anche in questo caso, nonostante l'alta qualità degli studi, la qualità delle evidenze relativa alle stime fornite è risultata bassa per la scarsa trasferibilità. La Tabella 5 riporta i risultati degli studi presi in esame.

Tabella 5: Risultati (mediana e range) dei costi

Esito	Risultati	Qualità delle evidenze
Costi	Costo incrementale per T21 diagnosticata : mediana: (-)€ 404 range: (-)€ 235,885 – € 2,674,952)	Bassa
	Costo incrementale per evento avverso evitato: mediana: € 950.29 range: (-)€ 659,303.29 – € 742,491.69	Bassa
	Impatto sul budget: mediana: 0.3% range: (-)11.1% – 21.2% [N.B: in 4 studi il budget si riduce (mediana: (-)6.3%) in 4 studi il budget aumenta (mediana: 5.6%)]	Bassa

Quesito 3: NIPT in aggiunta al test combinato per le
donne con livello di rischio tra 1\100 e 1\1000

Non è stato reperito alcuno studio per questo quesito.

4.3 Presentazione dei risultati al gruppo di lavoro

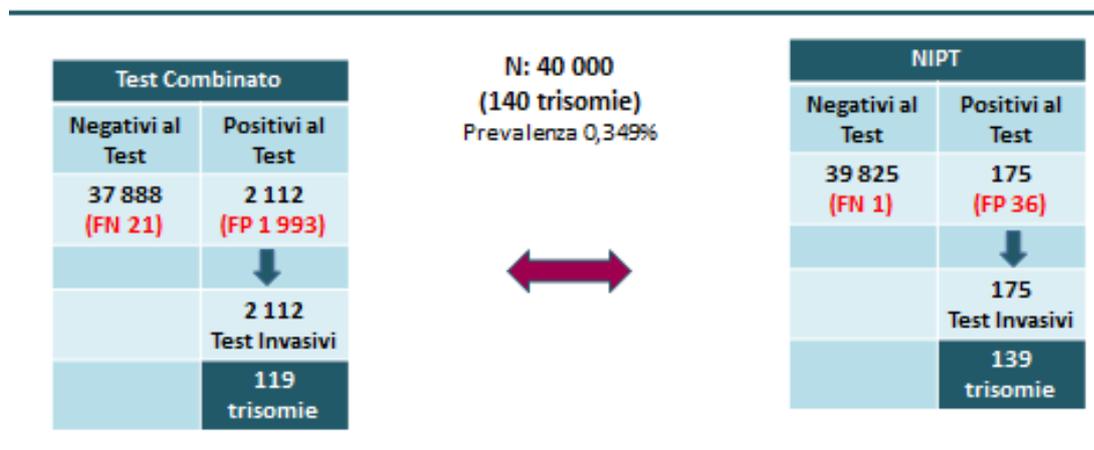
Nella riunione collegiale del 20 maggio 2015 sono stati presentati al gruppo di lavoro i risultati della revisione sistematica della letteratura relativi al Quesito 1 e Quesito 2, sotto forma di Summary of Findings (metodo GRADE), riportando per ogni esito il valore della stima estrapolato dagli studi inclusi e la qualità delle evidenze.

Poiché le evidenze più robuste riguardano i dati di sensibilità e specificità, l'attenzione si è principalmente focalizzata sul confronto tra le diverse strategie di screening in termini di accuratezza diagnostica.

Quesito 1: NIPT in sostituzione al test combinato per la popolazione generale

Applicando le stime di sensibilità e specificità del test combinato e degli NIPT alla presunta popolazione generale annuale di donne gravide dell'Emilia-Romagna (circa 40000), con una probabilità pre-test per la Trisomia 21 stimata di 0,349% (corrispondente a n. 140 Trisomie 21), sono stati calcolati e presentati al gruppo di lavoro i valori stimati di Veri Positivi, Falsi Positivi, Veri Negativi e Falsi Negativi per le due strategie a confronto (Figura 4).

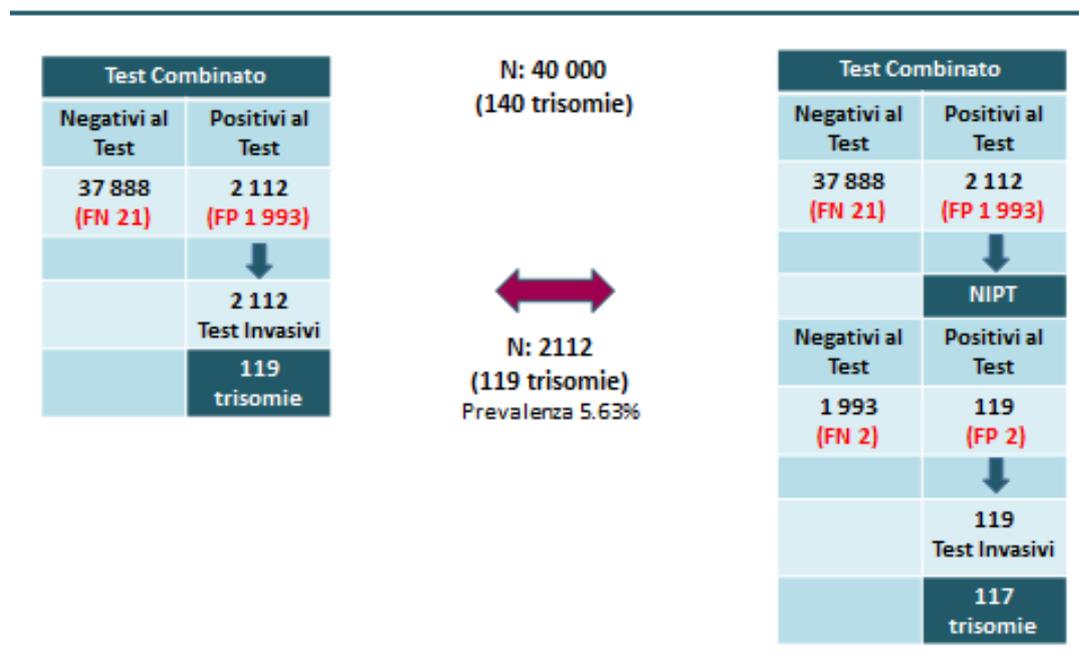
Figura 4: Quesito 1 - NIPT in sostituzione al test combinato



Quesito 2: NIPT in aggiunta al test combinato per le donne con livello di rischio superiore a 1/250

Per confrontare le due strategie di screening (utilizzo del solo test combinato versus aggiunta degli NIPT alle donne con calcolo del rischio al test combinato superiore a 1/250), è stata presa in considerazione la medesima popolazione generale annuale di donne gravide dell'Emilia-Romagna (circa 40 000), con una probabilità pre-test per la Trisomia 21 stimata al 0,349% (corrispondente a n.140 Trisomie 21), e sono state applicate le stime di sensibilità e specificità del NIPT al sottogruppo di popolazione stimato con livello di rischio superiore a 1/250 (n. 2112), per il quale la probabilità pre-test di Trisomia 21 è del 5,63% (corrispondente a n. 119 Trisomie 21). Sono quindi stati calcolati e presentati al gruppo di lavoro i valori stimati di Veri Positivi, Falsi Positivi, Veri Negativi e Falsi Negativi per le due strategie a confronto (Figura 5).

Figura 5: Quesito 2 - NIPT in aggiunta al Test Combinato per rischio superiore a 1/250



4.4 Sviluppo delle raccomandazioni

Il componenti del gruppo di lavoro sono stati chiamati a esprimere il proprio voto sulla raccomandabilità degli NIPT nel percorso prenatale in Regione Emilia-Romagna nel corso dei due incontri del 20 maggio 2015 e del 5 giugno 2015.

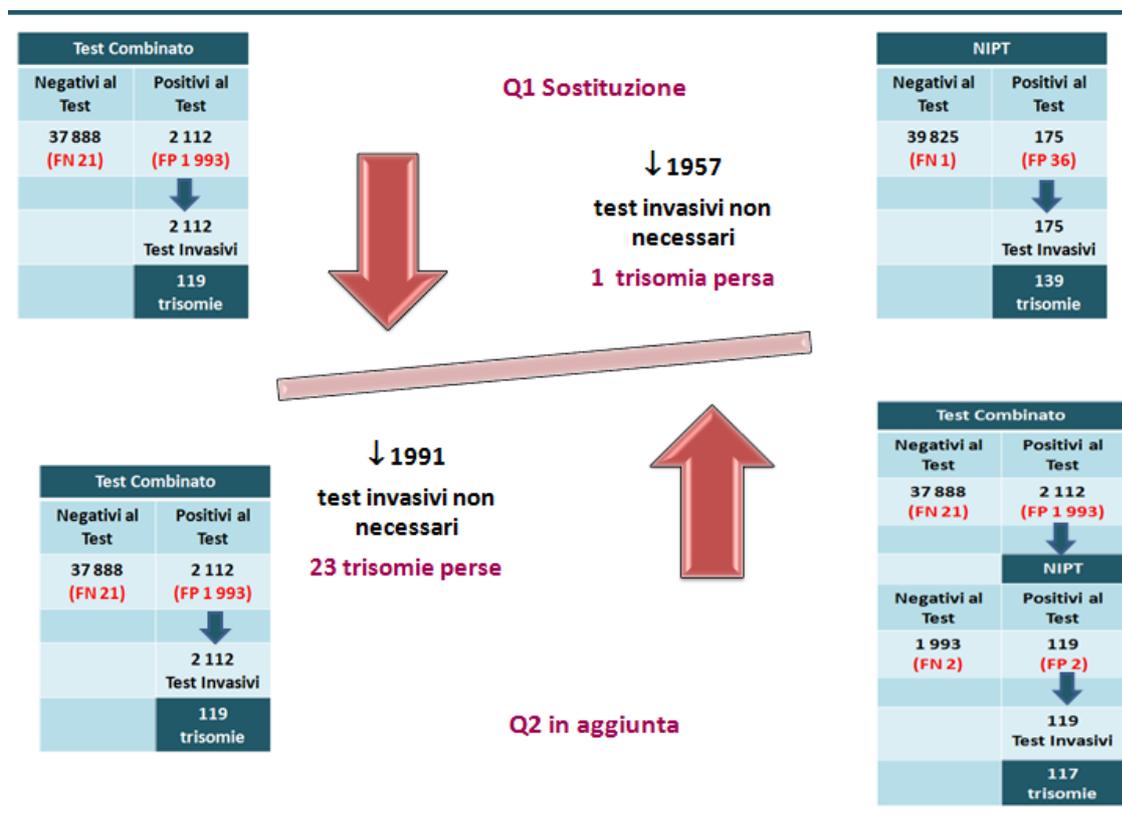
La prima votazione del 20 Maggio aveva la finalità di documentare il livello di accordo/disaccordo tra i componenti, in quanto il gruppo auspicava di raggiungere un giudizio unanime. In questa prima votazione tutti e 3 i quesiti sono stati valutati e votati indipendentemente uno dall'altro e l'analisi dei voti ha registrato un accordo nel raccomandare gli NIPT in sostituzione al test combinato per la popolazione generale di donne in gravidanza (Quesito 1), un forte disaccordo nel raccomandare gli NIPT in aggiunta al Test Combinato per le donne considerate ad alto rischio (Quesito 2) e un forte disaccordo nel raccomandare gli NIPT in aggiunta al test combinato per le donne considerate a rischio intermedio (Quesito 3).

Durante la riunione del 5 giugno il gruppo di lavoro ha concordato di non prendere più in considerazione il terzo quesito - data l'assenza di dati di letteratura - e di operare una scelta tra: raccomandare gli NIPT in sostituzione al test combinato (Quesito 1); raccomandare gli NIPT in aggiunta al test combinato (Quesito 2); non raccomandare gli NIPT in attesa di ulteriori evidenze; non raccomandare gli NIPT.

Per confrontare il trade-off tra rischi e benefici delle due strategie di screening con NIPT, il gruppo ha discusso e confrontato le due strategie (Figura 6), tenendo presente la presumibile differenza di impatto sui costi.

Secondo la simulazione, la prima strategia (NIPT in sostituzione al test combinato) risulterebbe in una riduzione di procedure diagnostiche invasive pari a 1957 e alla mancata identificazione di 1 Trisomia, mentre la seconda strategia (NIPT in aggiunta al test combinato) risulterebbe in una riduzione di procedure diagnostiche invasive pari a 1991 ed alla mancata identificazione di 23 trisomie.

Figura 6: Trade off dei rischi e benefici tra le due strategie di screening (replacement vs add-on)



Al termine della riunione i componenti del gruppo di lavoro hanno espresso il proprio voto per la scelta di una tra le seguenti quattro raccomandazioni:

1. NIPT raccomandato in sostituzione al test combinato nella popolazione generale di donne gravide.
2. NIPT raccomandato in aggiunta al test combinato nelle donne con un livello di rischio superiore a 1/250.
3. NIPT non raccomandato in attesa di ulteriori evidenze.
4. NIPT non raccomandato

La votazione è risultata in un consenso unanime nel raccomandare l'offerta degli NIPT in sostituzione al Test Combinato nell'attuale percorso prenatale della Regione Emilia-Romagna per la popolazione generale di donne in gravidanza che desiderano sottoporsi a indagini prenatali per la diagnosi di aneuploidie cromosomiche fetali.

5. Conclusioni

La raccomandazione sull'inserimento degli NIPT nell'attuale percorso prenatale è basata sulle evidenze scientifiche ed è stata sviluppata da un gruppo multidisciplinare, in cui sono rappresentate competenze sanitarie, gestionali, legali, etiche e di rappresentanza dei cittadini.

I lavori del gruppo sono iniziati il 4 marzo 2015 e si sono conclusi il 5 giugno 2015.

La metodologia utilizzata per lo sviluppo delle raccomandazioni - sperimentata e consolidata a livello internazionale - ha conferito scientificità e trasparenza alle attività.

Nell'ambito della revisione della letteratura è stato raccolto materiale utile ad approfondire le ricadute economiche, le implicazioni organizzative, etiche e legali conseguenti all'offerta dei test genetici prenatali non invasivi.

Se ne venisse riscontrata la necessità, tale materiale può essere utilizzato per sviluppare analisi di trasferibilità nel contesto della Regione Emilia-Romagna e per supportare il gruppo di lavoro nella formulazione di strategie per l'implementazione efficace e sicura degli NIPT.

Referenze

Ayres 2014

Ayres A, Whitty JA, Ellwood DA A cost-effectiveness analysis comparing different strategies to implement non-invasive prenatal testing into a Down syndrome screening program Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology 2014; 54: 412–417.

Balshem 2011

Balshem H, Helfand M, Schünemann HJ, Oxman AD, Kunz R, Brozek J, Vist GE, Falck-Ytter Y, Meerpohl J, Norris S, Guyatt GH. GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence. J Clin Epidemiol 2011 Apr;64(4):401-6.

Bearmon 2014

Beamon CJ, Hardisty EE, Harris SC, Vora NL A single center's experience with non-invasive prenatal testing Genetics in medicine 2014;16(9):681-7.

Beulen 2014

Beulen L, Grutters JPC, Faas BH, Feenstra I, van Vugt JMG, Bekker MN The consequences of implementing non-invasive prenatal testing in Dutch national health care: a cost-effectiveness analysis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2014;182: 53–61.

Bianchi 2014a

Bianchi, Wilkins-Haug L. Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: what has happened since the rubber met the road? Clin Chem. 2014 Jan;60(1):78-87.

Bianchi 2014b

Bianchi DW, RL, Wentworth J, Madankumar R., Saffer C et al DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening N Engl J Med 2014;370:799-808.

Comas 2014

Comas C, Echevarria M, Rodrigues MA, Prats P, Rodriguez I, Serra B Initial experience with non-invasive prenatal testing of cell-free DNA for major chromosomal anomalies in clinical setting J Matern Fetal Neonatal Med, 2014 Early Online: 1-6.

Dan 2012

Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, Xu Z, Lau TK et al Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal non-invasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11 105 pregnancies with mixed risk factors Prenatal Diagnosis 2012; 32:1225–1232.

EPOC 2013

Effective Practice and Organisation of Care (EPOC). Data collection form. EPOC Resources for review authors. Oslo: Norwegian Knowledge Centre for the Health Services; 2013. Available at: <http://epoc.cochrane.org/epoc-specific-resources-review-authors>.

Garfield 2012

Garfield SS, Armstrong SO Clinical and Cost Consequences of Incorporating a Novel Non-Invasive Prenatal Test into the Diagnostic Pathway for Fetal Trisomies. Journal of Managed Care Medicine 2012; 15(2): 34-41.

Gigerenzer 2007

Gigerenzer G, Gaissmaier W, Kurz-Milcke E, Schwartz LM, Woloshin S. Helping doctors and patients make sense of health statistics *PSPI*. 2007; 8 (2): 53-96.

Guyatt 2008

Guyatt GH, Oxman AD, Kunz R, Vist GE, Falck-Ytter Y, Schunemann HJ, et al. What is quality of evidence and why is it important to clinicians? *British Medical Journal* 2008;336:995-8.

Higgins 2011

Higgins JPT, Green S (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Available from www.cochranehandbook.org

Larion 2014

Larion S, Warsof SL, Romary L, Mlynarczyk M, Peleg D Uptake of noninvasive prenatal testing at a large academic referral center *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2014: 651.e1-7.

Lau 2014

Lau TK, Cheung SW, Lo P SS, Pursley AN, Chan et al. Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA: review of 1982 consecutive cases in a single center *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014; 43: 254–264.

Liang 2013

Liang D, Lv W, Wang H, Xu L, Liu J et al. Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing *Prenatal Diagnosis* 2013; 33, 409–415.

Morris 2014

Morris S, Karlsen S, Chung N, Hills M, Chitty LS Model-Based Analysis of Costs and Outcomes of Non-Invasive Prenatal Testing for Down's Syndrome Using Cell Free Fetal DNA in the UK National Health Service *PLoS ONE* 2014; 9(4): e93559.

Neyt 2014

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

Nicolaides 2013

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 *Prenatal Diagnosis* 2013; 33, 575–579.

Norton 2012

Norton ME, Brar H, Weiss J, Karimi A, Laurent LC et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18 *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2012; 137.e1-8.

Norton 2015

Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC et al. Cell-free DNA Analysis for Noninvasive Examination of Trisomy *N Engl J Med* April 2015; 1-9.

Okun 2014

Okun N, Teitelbaum M, Huang T, Dewa CS, Hoch JS The price of performance: a cost and performance analysis of the implementation of cell-free fetal DNA testing for Down syndrome in Ontario, Canada *Prenatal Diagnosis* 2014; 34, 350–356.

O'Leary 2012

O'Leary P, Maxwell S, Murch A, Hendrie D Prenatal screening for Down syndrome in Australia: Costs and benefits of current and novel screening strategies *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2013; 53: 425–433.

Pergament 2014

Pergament E, Cuckle, Zimmermann B, Banjevic M, Sigurjonsson S et al. Single-Nucleotide Polymorphism–Based Noninvasive Prenatal Screening in a High-Risk and Low-Risk Cohort *Obstetrics & Gynecology* 2014 ; 124 (2): 210-18.

Porreco 2014

Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, Marusiak B, Ehrich M 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* 2014; 211:365.e1-12-

Quezada 2015

Quezada MS, Gil MM, Francisco C, Gro'sz , Nicolaidis KH 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* 2015; 45: 36–41.

RAND/UCLA Appropriateness Method

http://www.rand.org/pubs/monograph_reports/MR1269.html.

Regione Emilia-Romagna La Nascita in Emilia-Romagna 12° Rapporto sui dati del Certificato di Assistenza al Parto (CedAP) – Anno 2014 (<http://salute.regione.emilia-romagna.it/siseps/sanita/cedap/documentazione/pubblicazioni>)

Schünemann 2008

Schünemann HJ, Oxman AD, Brozek J, Glasziou P, Jaeschke R, Vist GE, Williams JW, Kunz R, Craig J, Montori VM, Bossuyt P, Guyatt GH. GRADE: grading quality of evidence and strength of recommendations for diagnostic tests and strategies *BMJ* 2008; 336: 1106-1110.

Shaw 2014

Shaw SWS, Hsiao CH, Chen CY, Ren Y, Tian F et al. Noninvasive Prenatal Testing for Whole Fetal Chromosomal Aneuploidies: A Multicenter Prospective Cohort Trial in Taiwan *Fetal Diagn Ther* 2014; 35:13–17.

Song 2013

Song K, Musci TJ, Caughey AB Clinical utility and cost of non-invasive prenatal testing with cfDNA analysis in high-risk women based on a US population *J Matern Fetal neonatal Med* 2013; 26(12):1180-1185.

Song 2013

Song Y, Liu C, Qi H, Zhang Y, Bian X, Liu J Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population *Prenatal Diagnosis* 2013; 33, 700–706.

Song 2015

Song Y, Huang S, Zhou X, Jiang Y, Qi Q et al. Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidies in the first trimester of pregnancy *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 45: 55–60.

Stumm 2014

Stumm M, Entezami M, Haug K, Blank C, Wüstemann M et al. Diagnostic accuracy of random massively parallel sequencing for non-invasive prenatal detection of common autosomal aneuploidies: a collaborative study in Europe *Prenatal Diagnosis* 2014; 34, 185–191.

Verveij 2013

Verveij EJ, Jacobsson B, van Scheltema PA, de Boer MA, Hoffers MJV et al European Non-Invasive Trisomy Evaluation (EU-NITE) study: a multicenter prospective cohort study for non-invasive fetal trisomy 21 testing *Prenatal Diagnosis* 2013; 33, 996–1001.

Walker 2014

Walker BS, Jackson BR, LaGrave D, Ashwood ER, Schmidt R A cost-effectiveness analysis of cell free DNA as a replacement for serum screening for Down syndrome *Prenatal Diagnosis* 2014; 34, 1–7.

Whiting 2003

Whiting P, Rutjes AWS, Reitsma JB, Bossuyt PMM, Kleijnen J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews *BMC Medical Research Methodology* 2003; 3: 25.

Wilson 2013

Wilson KL1, Czerwinski JL, Hoskovec JM, Noblin SJ, Sullivan CM, Harbison A, Campion MW, Devary K, Devers P, Singletary CN. NSGC practice guideline: prenatal screening and diagnostic testing options for chromosome aneuploidy *J Genet Couns.* 2013; 22(1):4-15.

Zhang 2015

Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yan Y et al. Noninvasive Prenatal Testing for Trisomy 21, 18 and 13 - Clinical Experience from 146,958 Pregnancies *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015; 45(5):530-8.