

Estudio prenatal no invasivo para la detección de aneuploidías mediante ADN fetal libre en sangre materna: descripción de tres metodologías

Rafael Alfonso Sánchez Usabiaga,¹ Anaid Batista Espinoza,² Sergio Romero Tovar²

RESUMEN

Después de décadas de investigación, el estudio prenatal no invasivo para la detección de aneuploidías mediante ADN fetal libre de células en sangre materna es una realidad. Diferentes metodologías de secuenciación masiva ya se utilizan en la práctica clínica. En este artículo se describen tres metodologías capaces de identificar alteraciones cromosómicas fetales mediante la secuenciación masiva y análisis del ADN fetal libre de células en sangre materna. La secuenciación masiva en paralelo, el análisis digital de regiones seleccionadas y la metodología de Parental Support® son métodos precisos y confiables para la detección de las aneuploidías cromosómicas más frecuentes, como la trisomía 21 (T21), trisomía 18 (T18), trisomía 13 (T13), monosomía X0 (síndrome de Turner) y síndrome de Klinefelter (XXY), mediante el análisis de ADN fetal libre en sangre materna. La metodología Parental Support® otorga grandes ventajas para lograr alta precisión al identificar las anomalías cromosómicas más frecuentes (T21, T18, T13, X0 y XXY). La implementación de tecnologías de secuenciación de nueva generación en el diagnóstico prenatal no invasivo promete ser una herramienta de tamizaje de aneuploidías fetales y puede integrarse a los algoritmos existentes en la atención prenatal.

Palabras clave: diagnóstico prenatal no invasivo, aneuploidías, ADN fetal libre en sangre materna, trisomía 21, síndrome de Turner.

¹ Director General de Médica Fértil.

² Médica Fértil, Querétaro.

Correspondencia: Dr. Rafael Sánchez U. Médica Fértil. Prolongación Constituyentes 218, El Jacal, CP 76180, Querétaro, Qro.

Recibido: agosto 2013.

Aceptado: octubre 2013.

Este artículo debe citarse como: Sánchez-Usabiaga RA, Batista-Espinoza A, Romero-Tovar S. Estudio prenatal no invasivo para la detección de aneuploidías mediante ADN fetal libre en sangre materna: descripción de tres metodologías. Reproducción (Méjico) 2013;6:83-89.

ABSTRACT

After decades of research, the noninvasive study of prenatal detection of aneuploidy using cell-free DNA in maternal blood is a reality. Different mass sequencing methodologies are already used in clinical practice. This paper describes three methodologies able to identify fetal chromosomal abnormalities by massive sequencing and analysis of cell-free DNA in maternal blood. Massively parallel sequencing, digital analysis and technology selected regions of Parental Support™ (PS) are accurate and reliable methods for detecting the most common chromosomal aneuploid cells, such as trisomy 21 (T21), trisomy 18 (T18), trisomy 13 (T13), monosomy X0 (Turner syndrome) and Klinefelter syndrome (XXY) by analysis of free fetal DNA in maternal blood. Parental Support™ methodology provides great advantages to achieve high accuracy in identifying frequent chromosomal abnormalities (T21, T18, T13, X0 and XXY). The implementation of technologies of next-generation sequencing in the noninvasive prenatal diagnosis promises to be a screening tool for fetal aneuploidy and can be integrated into existing algorithms in prenatal care.

Key words: non-invasive prenatal diagnosis, aneuploidy, maternal blood free fetal DNA, trisomy 21, Turner syndrome.

Hasta hace poco tiempo, las mujeres embarazadas con deseo de conocer el estado cromosómico fetal tenían como opciones no invasivas los marcadores bioquímicos maternos y ultrasonográficos fetales. El tamizaje prenatal para aneuploidías fetales inició en la década de 1960 y la edad materna se usaba como parámetro de detección.

En la Obstetricia moderna, el tamizaje prenatal y el diagnóstico de aneuploidías fetales, como la trisomía 21 (T21), están bien establecidos en la práctica clínica cotidiana.

El tradicional tamizaje no invasivo se considera seguro; sin embargo, es poco preciso. El tamizaje sérico de marcadores bioquímicos tiene un intervalo de falsos negativos de 12 a 23% y falsos positivos de 1.9 a 5.2%.¹⁻³ El tamizaje ultrasonográfico de aneuploidías depende de la edad gestacional y sólo 35% de las alteraciones anatómicas se detectaron en 15,000 mujeres estudiadas por ultrasonido; en 17% de éstas se pudieron detectar antes de la semana 24 de gestación,⁴ precisando un gran número de procedimientos diagnósticos invasivos (biopsia de vellosidades coriales o amniocentesis).

Décadas de investigación del estudio prenatal no invasivo con base en ADN fetal libre de células para identificar alteraciones cromosómicas finalmente comienzan a dar frutos. El desarrollo de las denominadas tecnologías de secuenciación masiva actualmente permite obtener millones de secuencias de ADN a una velocidad sin precedentes y a menor costo. Los avances tecnológicos han conducido al desarrollo de la secuenciación de nueva generación, también conocida como secuenciación masiva en paralelo; tecnologías que permiten logros clínicos trascendentales con potencial en su aplicación y que están revolucionando el diagnóstico prenatal no invasivo.

Los estudios iniciales de investigación se dirigieron al aislamiento del ADN en células fetales en sangre materna. Dada la relación ~ 1:1,000,000 de células materno-fetales en la circulación fue difícil obtener resultados satisfactorios.

Estudios recientes se centraron en el análisis del ADN libre en sangre materna, porque contiene cantidades apreciables de ADN fetal, presumiblemente de origen placentario.⁵⁻⁷ Hoy en día, se han reportado por tres metodologías datos clínicos del estudio prenatal no invasivo; estas técnicas implican detección directa de las diferencias observadas en el perfil del ADN fetal libre en sangre materna.

La técnica más sencilla, secuenciación masiva en paralelo, detecta con precisión las trisomías 21 (síndrome de Down), 18 (síndrome de Edwards) y 13 (síndrome de Patau), así como la monosomía X (síndrome de Turner), con menor precisión.⁸⁻¹⁶

Un enfoque cuantitativo, denominado análisis digital de regiones selectivas, demostró mayor precisión para la detección de la T18 y T21 que la secuenciación

masiva en paralelo, al incluir la amplificación de pasos específicos.¹⁷⁻¹⁹

Una tercera metodología, denominada Parental Support®, combina la secuenciación con un análisis bioinformático extenso y detecta T13, T21, T18, 45,X, además de trisomías de cromosomas sexuales, como 47,XXY (síndrome de Klinefelter), con adecuada precisión.²⁰⁻²⁵

Estas metodologías evitan en la práctica incluso 98% de los estudios diagnósticos invasivos.²⁶

Este documento describe una visión general de las tres metodologías para la detección prenatal de aneuploidías fetales y considera sus ventajas e inconvenientes al aplicarlas en la práctica clínica.

Factores importantes a considerar en el estudio prenatal no invasivo

La prevalencia de las siete causas más comunes de aneuploidías se muestran en la Figura 1.²⁷⁻³⁰ Los siguientes tres factores son importantes al evaluar los métodos de

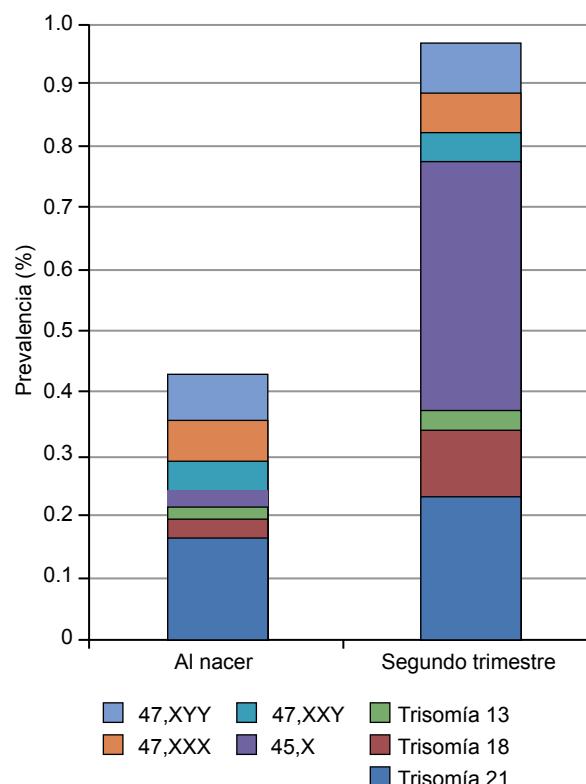


Figura 1. Prevalencia de anomalías cromosómicas.

estudio prenatal no invasivo para la detección de aneuploidías: alcance, precisión y costo.

Alcance

La mayor parte de los métodos de estudio prenatal no invasivo se centran en detectar trisomías autosómicas (T21, T18, T13), ya que son más fáciles de detectar por ser fenotípicamente más severas. Sin embargo, estas trisomías representan aproximadamente sólo la mitad de las anomalías cromosómicas al nacimiento y, más aún, sólo una pequeña fracción durante el segundo trimestre de embarazo, que es cuando se realizan las pruebas de tamizaje de aneuploidías. El alcance más amplio de los métodos de estudio prenatal no invasivo se logrará cuando revelen las diferentes anomalías cromosómicas diagnosticadas mediante los métodos invasivos.

Precisión

La precisión se evalúa típicamente como la especificidad, que es la medida de evitar falsos positivos, y la sensibilidad, que es la manera de evitar falsos negativos. Los estudios con alta especificidad son óptimos para evitar seguimientos innecesarios mediante procedimientos invasivos, mientras que los estudios con alta sensibilidad son mejores para evitar nacimientos con alteraciones cromosómicas. Los estudios tradicionales miden con precisión global basada en datos de grandes ensayos clínicos; mientras más avanzada es la prueba, puede calcular con mayor exactitud el estudio específico. Dado que la detección de aneuploidías mediante ADN depende de la posibilidad de medir el ADN fetal, existe una estrecha correlación entre la fracción de ADN fetal en el plasma materno y la exactitud del diagnóstico. Al tiempo de que se realiza la mayor parte de tamizaje prenatal, el promedio de la fracción fetal es entre 10 y 15%; sin embargo, en cualquier edad gestacional, la fracción fetal varía de paciente a paciente, aproximadamente en orden de magnitud, por tanto, la edad gestacional en sí es un mal sustituto para la exactitud. (Note que los diferentes métodos de medición proporcionan diferentes, pero autoconsistentes, números para la fracción fetal; por ejemplo, entre 2 y 20% o entre 4 y 40%). Mediciones directas de la fracción fetal pueden proporcionar mayor precisión al estimar la exactitud

de cada prueba individual; si la fracción fetal es menor, mayor es la probabilidad de tener resultados erróneos. Entre mayor sea la precisión en la estimación individual de las pruebas, mejores serán la especificidad y sensibilidad del estudio, ya que los resultados de baja calidad por baja fracción fetal pueden ser marcados como “no call” y requerirán una nueva toma de sangre materna para su resultado definitivo.^{8,12}

Costo

El costo del estudio prenatal no invasivo está determinado en función de diferentes variables, que incluyen la logística de la toma de muestras y su envío, los detalles en las técnicas de biología molecular, necesarias para la preparación de la muestra, y la medición e interpretación. Muchos de estos factores no varían significativamente entre diferentes metodologías. Actualmente, el principal factor diferenciador entre los diversos métodos se debe al número de secuencias necesarias para determinar la copia del número de cromosomas de interés; sin embargo, conforme el costo de la secuenciación se reduce, la relevancia de esta diferencia disminuirá.

Secuenciación de nueva generación en el diagnóstico prenatal

El uso de esta tecnología en el diagnóstico prenatal, hasta el momento, es eficaz en la detección de aneuploidías a partir de ADN fetal presente en la sangre materna (Figura 2).

Secuenciación masiva en paralelo

La secuenciación masiva en paralelo de ADN libre en sangre materna es un método preciso y confiable para la detección de aneuploidías cromosómicas fetales a partir de la semana 10 de gestación.^{8,14,16,31}

Esta tecnología funciona al detectar mayores cantidades de ADN en el plasma materno del cromosoma fetal triploide, en comparación con los cromosomas de referencia. Un feto con trisomía tiene 50% más de material genético del cromosoma triploide, lo que resulta en aumento de 1 a 10% de la cantidad de ADN libre del cromosoma afectado en plasma materno.

El ADN libre es amplificado y secuenciado, las lecturas de las secuencias son identificadas en un mapa genómico y se calcula mediante una puntuación Z, que

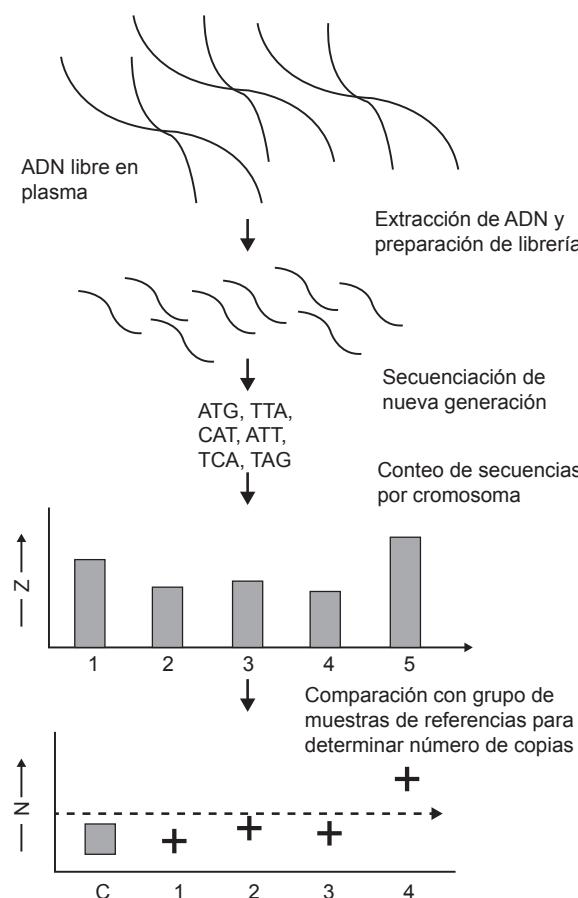


Figura 2. Esquema de la detección de aneuploidías fetales usando secuenciación de nueva generación. En este procedimiento se aislan los fragmentos de ADN fetal libres en el plasma materno y se produce una librería de secuencias especiales; la librería se somete a secuenciación para determinar la secuencia de cada fragmento; las secuencias se alinean con el genoma de referencia y se identifica su localización cromosómica mediante métodos bioinformáticos; la comparación de estos datos con un banco de muestras de referencia y el uso de valores prefijados de corte (puntuación Z) permite determinar la dotación cromosómica. Adaptada de Hahn y colaboradores.³²

representa el número de desviaciones estándar de la medición por encima de la media.

La puntuación Z, por encima de cierto valor, típicamente entre 2.5 y 4, se reporta como positiva para la trisomía. Una ventaja de este método es que la secuenciación masiva en paralelo es sencilla de aplicar, tanto para la técnica de biología molecular, como la metodología estadística sencilla.

Como se observa en el Cuadro 1, la metodología de secuenciación masiva en paralelo muestra una precisión satisfactoria para detectar T21 y T18 debido a las concentraciones adecuadas de ADN fetal; sin embargo, la capacidad para detectar T13 y 45X es limitada.^{12,15,16}

Esto se debe a la gran variabilidad de las secuencias en algunos cromosomas, lo que limita el alcance para reconocer con precisión las anomalías cromosómicas mediante los métodos cuantitativos. Esta limitación se agrava en las muestras extraídas en etapas gestacionales tempranas, ya que la cantidad de la fracción fetal de ADN libre es baja. Los casos de fracción de ADN fetal bajo generalmente resultarán no afectados, sesgando el resultado hacia falsos negativos y no hacia falsos positivos. Como se realiza la secuenciación masiva en paralelo, no utiliza un método para determinar la precisión específica de la prueba, que podría disminuir esta limitante. Además, esta metodología amplifica universalmente el ADN total de manera indiscriminada, a pesar de que los cromosomas 13, 18, 21, X y Y representan aproximadamente 14% del genoma. Dado que sólo un pequeño porcentaje de lectura de secuencias son relevantes para la detección de aneuploidías de los cromosomas de interés, se requieren entre 20 y 30 millones de lecturas para lograr el objetivo de precisión y es mayor a los requeridos en el análisis digital de regiones selectivas o en Parental Support®.

Análisis digital de regiones seleccionadas

Este método es cualitativo y selectivamente se dirige sólo a los cromosomas de interés e incluye una amplificación específica, dirigida aproximadamente a 400 locus por cromosoma. La amplificación dirigida resulta en aumento significativo de la eficiencia de la secuenciación, requiriendo entre 100,000 y 300,000 lecturas por cromosoma en el estudio. El análisis digital de regiones seleccionadas recientemente demostró en la práctica clínica detectar con adecuada precisión T21 y T18.¹⁹

Sin embargo, como todos los métodos puramente cuantitativos, el enfoque depende de los cromosomas que tienen baja variabilidad en la amplificación, lo que limita su utilidad diagnóstica para algunos cromosomas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Sensibilidad y especificidad de los métodos de estudio prenatal no invasivo para detectar diversas anomalías cromosómicas

	Sensibilidad			Especificidad						
	Trisomía 13	Trisomía 18	Trisomía 21	45X	47,XXY	Trisomía 13	Trisomía 18	Trisomía 21	45X	47,XXY
Secuenciación masiva en paralelo ^{12,15}	91.7% (11/12)	100% (59/59)	98.6% (209/212)			99.03% (1,672/1,688)	99.70% (1,683/1,688)	99.80% (1,468/1,471)		
Secuenciación masiva en paralelo ¹⁶	78.6% (11/14)	97.2% (35/36)	100% (89/89)	93.8% (15/16)		99.39% (485/488)	99.78% (460/461)	100% (404/404)	99.76% (416/417)	
Análisis digital de regiones selectivas ¹⁹		98% (49/50)	100% (50/50)			100% (297/297)	100% (297/297)			
Parental Support ²⁵	100% (2/2)	100% (3/3)	100% (12/12)	100% (1/1)	100% (2/2)	100% (135/135)	100% (135/135)	100% (135/135)	100% (135/135)	100% (135/135)

Parental Support[®]

La metodología Parental Support[®], también referida como NATUS (por sus siglas en inglés de pruebas de aneuploidia de última generación con polimorfismos de nucleótido simple), es más compleja, ya que combina una amplificación selectiva multiplex, dirigida aproximadamente a 20,000 locus en cada cromosoma evaluado, aunado a un análisis estadístico avanzado. A diferencia de los métodos cuantitativos, Parental Support[®] se centra en la medición de polimorfismos de nucleótido único. Mediante la medición de locus polimórficos, esta metodología es capaz de extraer múltiples piezas de información –el número e identidad de cada alelo– en cada una de las secuencias leídas, por lo que Parental Support[®] incorpora información altamente confiable de alelos paternos y su frecuencia de entrecruzamiento de datos suficientes para establecer un modelo de hipótesis (por ejemplo, monosomías, disomías o trisomías), cada una correspondiente a los diferentes patrones de herencia genética relativos a los sitios de entrecruzamiento para cada número de copias posible.

Se utiliza estadística bayesiana para asignar una probabilidad de cada hipótesis y una máxima estimación de la posibilidad para seleccionar la hipótesis más probable y calcular que la probabilidad de la hipótesis sea la correcta (Figura 3).

El análisis de Parental Support[®] se basa en el patrón de distribución de alelos, a diferencia de los métodos cuantitativos, y compara la especificidad cromosómica con las cuentas leídas; por tanto, no sucede variabilidad en la amplificación cromosómica. Como resultado, esta

metodología es capaz de determinar el número de copias de los cromosomas fetales 13, 18, 21, X y Y, con precisión similarmente alta.

Parental Support[®] es capaz de detectar T13, T18, T21, 45X y d7 XXY sin errores; sin embargo, estos datos partieron de un estudio clínico ciego. Debido a la falta de especificidad cromosómica y a que esta metodología no requiere cromosoma de referencia, detecta trisomías de cromosomas sexuales como 47XXX y 47XYY, disomías uniparentales y triploidías.²⁵

CONCLUSIONES

La demanda creciente de técnicas de secuenciación a bajo costo condujo al desarrollo de tecnologías de secuenciación que producen miles de millones de secuencias de manera simultánea. Esta nueva tecnología pone a disposición de la medicina perinatal un excelente recurso para el diagnóstico genético antenatal, con la gran ventaja de ser no invasivo y de una elevada seguridad diagnóstica. Tres diferentes metodologías aplicadas en la práctica clínica demuestran ser precisas, confiables y capaces de detectar anomalías cromosómicas mediante la secuenciación y análisis del ADN fetal libre de células en sangre materna. Sin embargo, una de las limitantes de los métodos cuantitativos (secuenciación masiva en paralelo-análisis digital de regiones seleccionadas) es la gran variabilidad de secuencias de ciertos cromosomas, lo que limita su precisión en los resultados. La metodología Parental Support[®] otorga grandes ventajas para lograr una alta precisión al identificar las anomalías cromosómicas más frecuentes. La alta sensibilidad y es-

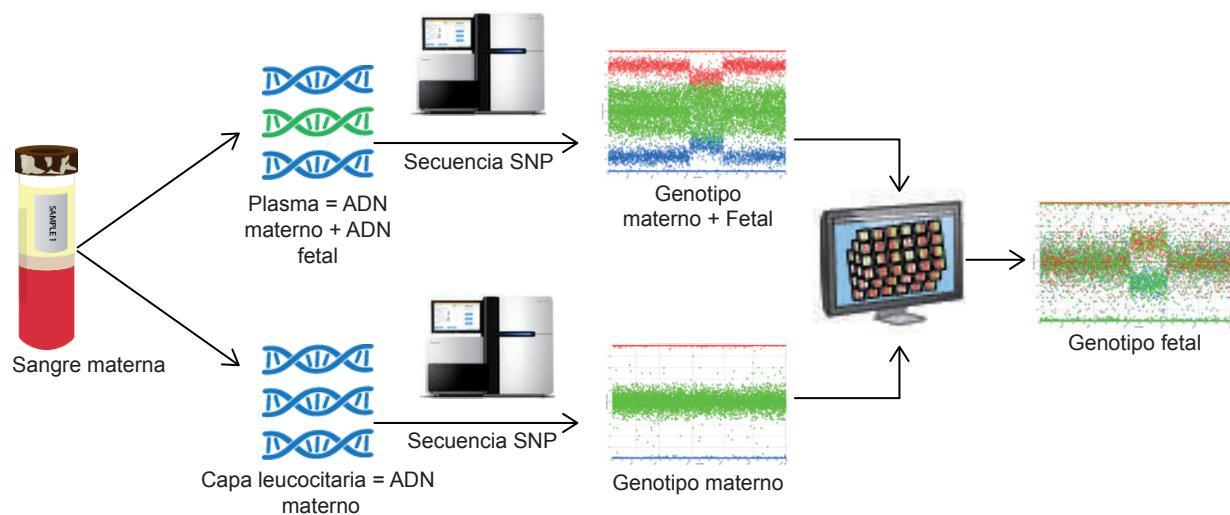


Figura 3. Detección de aneuploidías mediante PS. En esta metodología la muestra de sangre materna se separa en capas mediante centrifugación; las capas están compuestas por el plasma, la capa leucocítica y los glóbulos rojos; posteriormente, la muestra se amplifica y analiza con un equipo de secuenciación que mide las variaciones genéticas de los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) entre los genomas materno y fetal; a continuación, los datos de la secuenciación se analizan con un algoritmo específico que distingue la señal de ADN fetal, genera un informe de los cromosomas e incluye los puntajes de riesgo que incorporan exactitudes calculadas para cada cromosoma específico.

pecificidad en la detección de las trisomías 21, 18 y 13 y la monosomía X sugieren que la secuenciación masiva de ADN se puede incorporar a los algoritmos actuales para la detección de aneuploidías y de esta manera reducir los innecesarios procedimientos invasivos.

REFERENCIAS

- Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, et al. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the serum, urine and ultrasound screening study (SURUSS). *J Med Screen* 2003;10:56-104.
- Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Downs syndrome. *N Engl J Med* 2005;353:2001-2011.
- Wald NJ, Kennard A, Hackshaw A, McGuire A. Antenatal screening for Downs syndrome. *J Med Screen* 1997;4:181-246.
- Ewigman BG, Crane JP, Frigoletto FD, LeFevre ML, et al. Effect of prenatal ultrasound screening on perinatal outcome. RADIUS Study Group. *N Engl J Med* 1993;329:821-827.
- Evans MI, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn* 2002;22:609-615.
- Guetta E, Simchen MJ, Mammon-Daviko K, Gordon D, et al. Analysis of fetal blood cells in the maternal circulation: challenges, ongoing efforts, and potential solutions. *Stem Cells Dev* 2004;13:93-99.
- Lo YM, Chiu RW. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet* 2007;8:71-77.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:16266-16271.
- Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, 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;105:20458-20463.
- Ehrlich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:205-211.
- Liao GJ, Lun FM, Zheng YW, Chan KC, et al. Targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA permits efficient and unbiased detection of fetal alleles. *Clin Chem* 2011;57:92-101.
- Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011;13:913 -920.
- Chen EZ, Chiu RWK, Sun H, Akolekar R, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One* 2011;6:21791.
- Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, de Feo E, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively

- parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem* 2011;57:1042-1049.
15. Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012;14:296-305.
 16. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012;119:890-901.
 17. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, McBride C, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 2012;32:3-9.
 18. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, et al. Non-invasive 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;206:319.
 19. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, et al. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:322.
 20. Rabinowitz M, Banjevic M, Demko Z, Johnson DS. System and method for cleaning noisy genetic data from target individuals using genetic data from genetically related individuals. US patent application 2007/0184467, 2007.
 21. Rabinowitz M, Banjevic M, Demko Z, Johnson DS, et al. System and method for cleaning noisy genetic data and determining chromosome copy number. U.S. patent application US2008/0243398, 2008.
 22. Johnson DS, Gemelos G, Baner J, Ryan A, et al. Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol. *Hum Reprod* 2010;25:1066-1075.
 23. Rabinowitz M, Gemelos G, Banjevic M, Ryan A, Sweetkind-Singer J. Methods for allele calling and ploidy calling. World Intellectual Property Organization Patent application, WO/2010/017214, 2010.
 24. Rabinowitz M, Gemelos G, Banjevic M, Ryan A, Demko Z, Hill M, et al. Methods for non-invasive prenatal ploidy calling. World Intellectual Property Organization Patent application WO/2011/146632, 2011.
 25. Rabinowitz M, Gemelos G, Banjevic M, Zimmermann B, et al. First trimester non-invasive detection of fetal aneuploidy 13, 18, 21, and X by targeted sequencing. Presentation at ACMG Annual Clinical Genetics meeting, 2012.
 26. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* 2011;342:7401.
 27. Jones KL. Smiths recognizable patterns of human malformation. 6th ed. Philadelphia: Saunders an imprint of Elsevier Science, 2006.
 28. Simpson JL, Elias S. Genetics in obstetrics and gynecology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders an imprint of Elsevier Science, 2003.
 29. Hook EB, Topol BB, Cross PK. The natural history of cytogenetically abnormal fetuses detected at midtrimester amniocentesis which are not terminated electively: new data and estimates of the excess and relative risk of late fetal death associated with 47,+21 and some other abnormal karyotypes. *Am J Hum Genet* 1989;45:855-861.
 30. Cockwell A, MacKenzie M, Youings S, Jacobs PA. Cytogenetic and molecular study of a series of 45,X fetuses and their parents. *J Med Genet* 1991;28:151-155.
 31. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Human Gen* 2012;20:521-526.
 32. Hahn S, Lapaire O, Tercanli S, Kolla V, et al. Determination of fetal chromosome aberrations from fetal DNA in maternal blood: has the challenge finally been met? *Expert Rev Mol Med* 2011;13:16.