

Effet du dépistage par ADN libre circulant (ADNlc) versus par diagnostic invasif sur le taux de fausse couche chez les femmes enceintes à risque élevé de trisomie 21

Un essai clinique randomisé

Valérie Malan, MD, PhD ^{1,2,3} ; Laurence Bussi eres, PhD ^{4,5} ; Norbert Winer, MD, PhD ^{6,7} ; et al Jean-Philippe Jais, MD, PhD ^{3,8}; Amandine Baptiste, MSc ⁵; Marc Le Lorc'h ¹; Caroline Elie, MD, PhD ⁵; Neil O'Gorman, MD ^{3,4}; Nicolas Fries, MD ^{9,10}; V eronique Houfflin-Debarge, MD, Ph.D. ^{7,11}; Loic Sentilhes, MD, PhD ^{7,12,13}; Michel Vekemans, MD, PhD ^{1,3}; Yves Ville, MD ^{3,4}; Laurent J. Salomon, MD, PhD ^{3,4,7,10}; pour le groupe d'étude SAFE 21

Affiliations des auteurs Information sur l'article

JAMA. 2018; 320 (6): 557-565. doi: 10.1001 / jama.2018.9396

Traduction et commentaires : Philippe Boukobza

Dans cet article récent, mais sorti peu de temps avant la décision de remboursement du test d'ADN libre circulant, les auteurs ont souhaité évaluer si l'introduction de ce test pour les patientes à risque élevé de trisomie 21 par le dépistage combiné au 1^{er} trimestre ( ge maternel-clarté nucale-marqueurs sériques maternels du 1^{er} trimestre), réduisait le taux de fausses couches par rapport aux procédures invasives ^[L L L]_[SEP;SEP] immédiates (prélèvement de villosités choriales et amniocentèse).

Au moment de la publication de cet essai randomisé, les patientes étaient considérées à risque élevé quand le résultat du dépistage combiné était \geq à 1/250

Des notions extrêmement importantes ressortent de ce travail :

- *il n'a pas été démontré de différence significative du taux de fausses couches pour les patientes du groupe ADNlc suivi d'un prélèvement quand le test était positif, par rapport au groupe procédures invasives immédiates*
- *le taux de fausses couches des procédures invasives doit être réévalué à la baisse, probablement entre 0,1 et 0,2% comme le prouvent deux articles d'Anne Tabor publiés à 20 ans d'écart, le deuxième sur près de 150 000 patientes*
- *il est probable que certaines anomalies chromosomiques non dépistées par le test ADNlc vont être « loup es » alors qu'elles sont plus fréquentes dans le groupe à risque*

Ce dernier point est d'autant plus crucial que le seuil du risque élevé a été récemment abaissé à 1/50 avec le remboursement du test d'ADN foetal pour les patientes entre 1/51 et 1/1000 et une proposition de caryotype lorsque le risque est \geq à 1/50 (voir également dans ce numéro les recommandations de la HAS aux patientes)

Cela rejoint l'étude menée actuellement par le Collège Français d'Echographie Fœtale (CFEF) « Etude 50/250 » pour évaluer ces anomalies potentiellement loup es par le test ADNlc www.cfef.org et dont nous diffuserons les résultats lors du congrès annuel des Nouvelles Journées d'Echographie Fœtale du 30 mai au 1^{er} juin prochains

De plus, nous utilisons de plus en plus largement des techniques comme la CGH array ou l'ACPA (Analyse Chromosomique par Puce Adn) qui permettent de dépister les principales

microdélétions et d'aller plus loin dans le diagnostic

Tout cela risque modifier l'utilisation actuelle du test d'ADNlc, même si la performance exceptionnelle de ce test en terme de dépistage n'est pas remise en cause et qu'il est possible que ce test, très spécifique pour la trisomie 21 (et moins pour la T13 et la T18), puisse prochainement être utilisé pour d'autres anomalies chromosomique avec la même performance

Points clés

Question La réalisation de tests ADNlc sur les femmes dont la grossesse est à risque élevé de trisomie 21, suivie de tests invasifs uniquement si les résultats des tests ADNlc sont positifs, réduit-t-il le taux de fausse couche par rapport aux tests invasifs immédiats?

Résultats Dans cet essai clinique randomisé comprenant 2111 femmes dont le risque de trisomie 21 était supérieur à 1/250 après dépistage combiné au premier trimestre, le taux de fausse couche était de 0,8% dans le groupe ADNlc et de 0,8% dans les procédures invasive une différence qui n'était pas statistiquement significative.

Signification L'utilisation d'ADNlc pour stratifier les individus en vue d'un test invasif par rapport à un test invasif direct n'a pas été associée à une réduction significative du taux de fausse couche chez les femmes dont la grossesse était à risque élevé de trisomie 21.

Abstract

Importance On propose de plus en plus souvent des tests d'ADNlc au 1^{er} trimestre de la grossesse aux femmes présentant un risque élevé de trisomie 21 afin de réduire le nombre de procédures invasives et les fausses couches qui leur sont associées. L'effet de cette stratégie n'a pas été évalué.

Objectif Comparer les taux de fausse couche à la suite de procédures invasives uniquement dans le cas de résultats positifs au test d'ADNlc par rapport à des procédures invasives immédiates (amniocentèse ou prélèvement de villosités choriales) chez les femmes dont le risque de trisomie 21 était élevé par le dépistage combiné du premier trimestre.

Conception, cadre et participants Essai clinique randomisé mené du 8 au 4 avril 2016 dans 57 centres en France sur 2111 femmes enceintes avec un risque de trisomie 21 compris entre 1 sur 5 et 1 sur 250 après dépistage par le risque combiné du 1^{er} trimestre.

Interventions Les patients ont été randomisés pour recevoir soit un test d'ADNlc suivi par des procédures de test invasives uniquement lorsque les résultats des tests étaient positifs (n = 1034), soit des procédures invasives immédiates (n = 1017). Le test d'ADNlc a été réalisé à l'aide d'une méthode interne validée basée sur un séquençage de nouvelle génération.

Principaux résultats et principales mesures Le principal critère de jugement était le nombre de fausses couches avant 24 semaines de gestation. Les critères de jugement secondaires comprenaient le taux de détection de la trisomie 21 par le test de l'ADNlc. Les résultats secondaires ont été soumis à des tests bilatéraux.

Résultats Parmi les 2051 femmes randomisées et analysées (âge moyen: 36,3 ans), 1997 (97,4%) ont terminé l'essai. Le taux de fausse couche n'était pas significativement différent entre les groupes à 8 (0,8%) vs 8 (0,8%), pour une différence de risque de -0,03% (IC

unilatéral à 95%, -0,68% à ∞; $P = .47$). Le taux de détection de l'ADNlc pour la trisomie 21 était de 100% (IC à 95%, 87,2% à 100%).

Conclusions et pertinence Parmi les femmes dont le risque de trisomie 21 était élevé, le dépistage par ADNlc, suivi d'un test invasif si les résultats du test était positif, par rapport aux procédures invasives seules, n'a pas entraîné de réduction significative de la fausse couche avant 24 semaines. L'étude a peut-être été insuffisante pour détecter des différences cliniquement importantes dans les taux de fausse couche.

Enregistrement de l'essai Identifiant [ClinicalTrials.gov: NCT02127515](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02127515)

introduction

Le dépistage prénatal du syndrome de Down a considérablement évolué au cours des deux dernières décennies. Le dépistage combiné du premier trimestre, basé sur l'âge de la mère, la mesure de la clarté nucale fœtale et le dépistage du sérum maternel, a été adopté dans la plupart des pays. Il en résulte un taux de détection de 90% avec un taux de faux positif de 5%.¹ Le caryotype fœtal par amniocentèse ou prélèvement de villosités choriales (CVS) est proposé lorsque le risque de trisomie 21 dépasse une valeur limite prédéfinie, ce qui définit le patient comme présentant un risque élevé.

Les analyses du plasma maternel basées sur l'ADN libre circulant (ADNlc) ont une sensibilité supérieure à 99% pour le syndrome de Down lors de grossesses à risque élevé de développer ce syndrome^{2,3} sans les risques associés d'une procédure invasive.³⁻⁸ La sécurité a été l'argument le plus largement utilisé pour la mise en œuvre des tests ADNlc chez les patients à haut risque sans preuve de sa supériorité sur l'utilisation immédiate de tests invasifs.⁹ Cet avantage théorique des tests ADN avant tout essai invasif, sur l'utilisation immédiate de l'amniocentèse ou CVS pour caryotype n'a pas été testé dans un essai randomisé et doit être mis en balance avec la sensibilité et la spécificité inférieure de l'ADNlc dans la détection de la trisomie 21.² En outre, le test de l'ADNlc peut négliger d'autres aneuploïdies et anomalies chromosomiques structurelles courantes détectées par le caryotype conventionnel après un test invasif.^{dix}

Cet essai clinique randomisé a comparé les taux de fausse couche après l'un ou l'autre des tests d'ADNlc avec des procédures invasives uniquement lorsque les résultats du test étaient positifs par rapport aux procédures de test invasives immédiates des grossesses à haut risque de trisomie 21 identifiées par le dépistage combiné du premier trimestre.

Les méthodes

Étudier le design

Le protocole d'étude et le plan d'analyse statistique sont fournis dans les [Suppléments 1 et 2](#). Cette étude était un essai clinique ouvert randomisé national d'une durée de deux ans, mené dans 64 centres sur l'ensemble du territoire français. Il a comparé les taux de fausse couche suivant un test d'ADNlc (suivis d'un test invasif si les résultats du test étaient positifs) ou d'un caryotype fœtal direct par des procédures de test invasives chez les femmes enceintes qui avaient un risque de trisomie 21 entre 1 sur 5 et 1 sur 250 après un dépistage par le risque combiné au 1^{er} trimestre. L'approbation du comité d'éthique a été obtenue et le financement a été reçu du ministère français de la Santé. Les femmes éligibles qui ont donné leur consentement pour participer ont été enregistrées dans une base de données sécurisée (<https://www.bionuqual.org/echo.php>).

Procédures

Dans le cadre de la pratique de routine en France, toutes les femmes ont été informées du dépistage du syndrome de Down et ont été en mesure de bénéficier du dépistage combiné au premier trimestre ou du dépistage combiné séquentiel dans le cadre de leurs soins prénatals de routine.¹¹ Les femmes présentant un risque supérieur à 1 sur 250 ont été considérées comme dépistées positives.^{12, 13} Les praticiens pratiquant la mesure de la clarté nucale dans le cadre du dépistage prénatal de la trisomie 21 étaient certifiés pour cette mesure et étaient enregistrés dans un réseau périnatal, ce qui garantissait un contrôle continu de la qualité des mesures. Les analyses biochimiques et les calculs de risque ont été effectués dans 82 laboratoires accrédités qui adhèrent à une politique de qualité nationale.^{12, 13}

Toutes les femmes ayant une grossesse avec un risque de syndrome de Down entre 1 sur 5 et 1 sur 250 ont été invitées à s'inscrire à cette étude dans l'un des centres de diagnostic prénatal participants. Les critères d'inclusion supplémentaires étaient l'âge maternel d'au moins 18 ans, une grossesse unique, la couverture des soins de santé par le système national d'assurance maladie (Assurance Maladie) et un âge gestationnel entre 11 et 18 semaines. Les femmes éligibles ont accepté a priori le caryotype fœtal par prélèvement de villosités choriales ou amniocentèse et ont donné leur consentement écrit. Les critères d'exclusion étaient une clarté nucale supérieure à 3 mm et des concentrations de gonadotrophine chorionique humaine protéique A ou β associées à la grossesse inférieures à 0,3 ou supérieures à 5 multiples de la médiane (MoM), ces caractéristiques ayant été associées à d'autres anomalies chromosomiques.

Avant l'inclusion du patient dans l'étude, des informations standard en face à face, des séances de conseil et des brochures d'information imprimées étaient fournies aux patients par les professionnels de santé de chaque centre participant. Ce contenu présentait les avantages et les limites des deux tests. Cela incluait le potentiel du test invasif à rechercher des anomalies chromosomiques pouvant être négligées par le test de l'ADNlc, ainsi que le risque supplémentaire de 1% de fausse couche associé à des procédures invasives. Les préférences des femmes concernant l'ADNlc et les tests invasifs ont été enregistrées au regard de l'éligibilité (les détails seront décrits dans une étude ultérieure).

La randomisation en test ADNlc suivi de procédures de test invasives uniquement lorsque les résultats du test est positif ou en utilisant directement des procédures de test invasives a été réalisée avec un rapport 1: 1 en utilisant le même système Web centralisé et sécurisé (<https://www.bionuqual.org/echo.php>). La séquence de randomisation a été créée par un gestionnaire de données indépendant à l'aide d'une liste de nombres aléatoires générés par ordinateur (tailles de bloc aléatoires de 2, 4 et 6) et a été stratifiée en fonction de chaque centre. Les patients, les enquêteurs et tous les membres du personnel participant à l'essai étaient au courant de la répartition des groupes.

Les services associés à cette étude ont été fournis gratuitement aux participants. Pour les femmes du groupe ADNlc, des échantillons de sang ont été prélevés dans chaque centre participant, identifiés par un code d'étude et envoyés au laboratoire de cytogénétique de référence de l'hôpital Necker – Enfants Malades à Paris. La technique d'ADNlc ainsi que l'interprétation et le compte rendu des résultats sont décrits dans l'annexe e du Supplément 3. Les résultats positifs du test ADNlc ont toujours été confirmés par un test

invasif classique avant que les décisions de gestion ne soient prises. Les femmes du groupe de diagnostic prénatal invasif ont subi un caryotype dans l'un des laboratoires de cytogénétique locaux agréés.¹³

Analyse ADN

L'ADN génomique a été extrait de 5 ml de plasma et utilisé pour la préparation de banques avec réparation d'extrémité, A-tailing et ligature d'adaptateur avec une étiquette spécifique. Ensuite, le séquençage d'un groupe de 11 patients avec 1 cas de trisomie 21 (échantillon de contrôle) a été réalisé avec un HiSeq 1500 (Illumina) en utilisant une analyse rapide pour des lectures uniques de 50 longueurs de base. Après démultiplexage, les comptages de lecture par chromosome et les z-scores ont été effectués à l'aide du progiciel R RAPIDR, version 0.1.117.¹⁴ Le z-score est la différence entre le nombre de lectures du chromosome 21 dans le jeu de tests et de références divisé par l'écart type du nombre de lectures. Un résultat était considéré comme positif lorsque le z-score était supérieur à +1,645.

La technique, y compris les outils de séquençage et de bioinformatique, ainsi que l'interprétation et le rendu des résultats d'ADNlc, est détaillée dans l'Appendix du supplément 3.

Les résultats

Les résultats des tests d'ADN libre circulant et les résultats cytogénétiques des tests invasifs ont été recueillis pour les participants en fonction du groupe randomisé. Les résultats de la grossesse ont été rassemblés et classés comme suit: fausse couche avant 24 semaines de gestation, mort fœtale in-utero (c'est-à-dire mort spontanée d'un fœtus après 24 semaines de gestation et avant l'accouchement), interruption de grossesse, naissance vivante et mort périnatale (mort à la naissance et mort néonatale avant 6 jours). Le résultat principal était une fausse couche avant 24 semaines de gestation. C'est le résultat couramment utilisé dans les articles sur lesquels est basé le calcul de la taille de l'échantillon, comme détaillé dans les protocoles d'essai^{15 et 16} et dans des articles de synthèse récents sur ce sujet.^{17, 18} Dans le protocole initial, un terme moins bien défini de «pertes de grossesse» était utilisé. Cependant, la définition actuelle de la viabilité est de 24 semaines de gestation.¹⁹ Ainsi, à ce seuil, « naissance extrêmement prématurée » est plus approprié que « la perte de la grossesse. » Bien que le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) a récemment tenté de mieux définir les fausses couches et a publié des directives pratiques,²⁰ il y a un manque d'un ensemble internationalement acceptée de définitions pour de nombreux termes utilisés pour décrire les pertes de grossesse et également l'absence d'une terminologie ou d'un glossaire réciproque normalisé français-anglais.

Les résultats secondaires comprenaient le nombre et le pourcentage de procédures invasives pratiquées dans les deux groupes de traitement, les caractéristiques de performance du test ADNlc (y compris les tests ayant échoué et l'évaluation utilisant la sensibilité et la spécificité par rapport au caryotype ou au phénotype de référence à la naissance), le délai entre la réception de l'échantillon et le résultat disponibilité et diagnostic des anomalies chromosomiques dans chaque groupe. Le taux de faux positifs de tests d'ADNlc était estimé post hoc si une valeur de seuil z-score conventionnelle de 3,0 avait été utilisée.² Parmi les autres résultats secondaires non mentionnés dans cet article

figurent la relation entre les caractéristiques cliniques des femmes et les résultats de l'ADNlc, les préférences des femmes en ce qui concerne l'ADNlc et les tests invasifs et l'anxiété. Le protocole a également pré-spécifié une analyse économique. Au moment de la rédaction du protocole en 2012, il existait peu de données sur ce sujet et le test ADNlc était beaucoup plus coûteux. Cependant, nous avons utilisé une méthode interne validée basée sur le séquençage de nouvelle génération pour rester indépendants des fournisseurs de tests privés. Dans une évaluation des coûts, cette méthode serait très défavorable par rapport aux tests plus récents et moins coûteux (avec l'introduction des technologies d'automatisation). Plus important encore, diverses stratégies pour la mise en œuvre du test d'ADNlc, y compris l'utilisation occasionnelle^{21, 22} rendent l'analyse économique planifiée moins pertinente.

Les autres résultats de la grossesse (mort fœtale in utero, interruption de grossesse, naissance vivante et décès périnatal) ont été analysés comme résultats post-hoc.

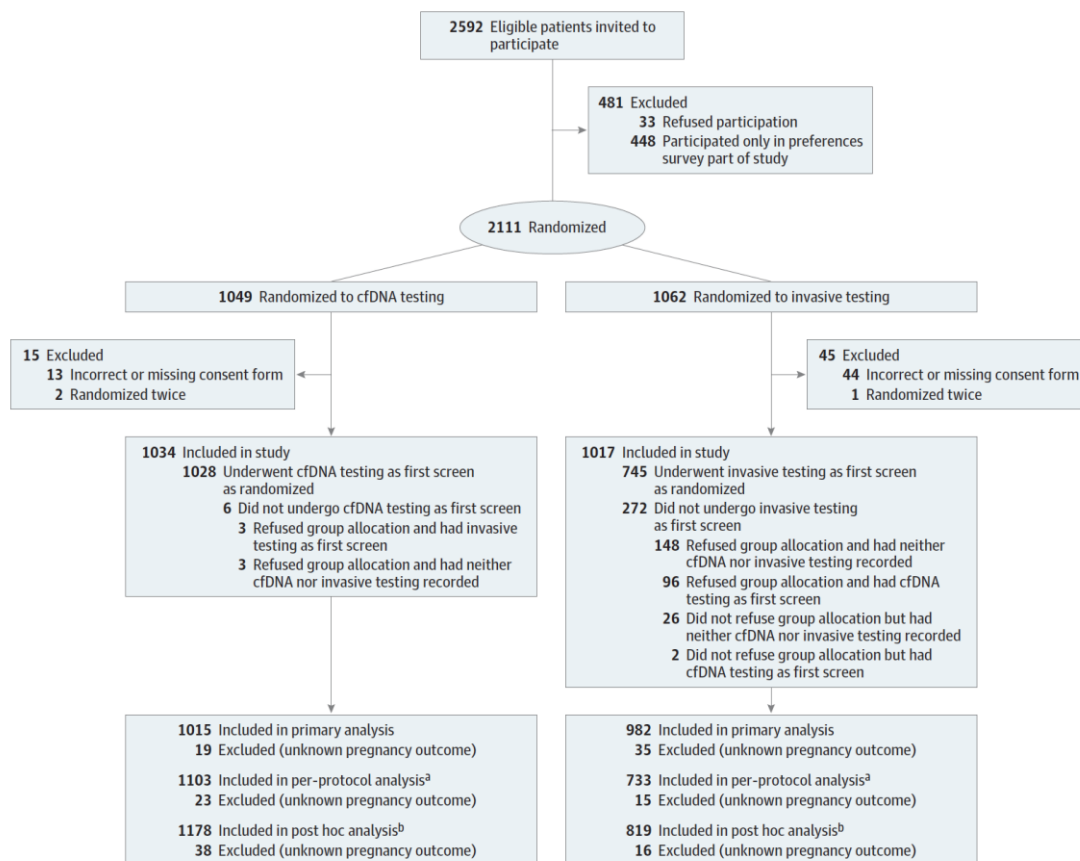
Analyses statistiques

La taille de l'échantillon a été calculée en supposant une réduction du nombre de fausses couches à l'aide du test d'ADNlc. Pour observer une diminution de la fausse couche de 1,5% à 0,5% entre les groupes de test invasif et ADNlc, respectivement, avec une puissance unilatérale $\alpha = 0,05$ et une puissance de 80%, il fallait 1250 patientes par groupe, ce qui donnait un échantillon total de 2500 patients. Ces hypothèses ont été dérivées du seul essai clinique randomisé existant, qui a révélé un taux supplémentaire de 1% de fausse couche après un test invasif.¹⁶

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R version 2.11.1, le plan d'analyse statistique étant préalablement spécifié avant le verrouillage de la base de données. Le résultat principal a été soumis à des tests unilatéraux; les résultats secondaires ont été soumis à des tests bilatéraux. Pour tous les tests utilisés, $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif. Les caractéristiques de base des 2 groupes de traitement ont été décrites en tant que moyennes et écarts-types ou médianes et intervalles interquartiles (IQR) pour les variables quantitatives et les fréquences et pourcentages pour les variables qualitatives.

Pour toutes les analyses, les patients sans formulaires de consentement appropriés ont été exclus. En ce qui concerne l'analyse du résultat principal, l'ensemble d'analyse primaire a été défini de manière à ce que tous les patients soient randomisés, à l'exclusion de ceux dont le résultat est manquant. La population per protocole a été définie comme les patients du groupe d'analyses primaires analysé selon la première procédure réellement réalisée (ADNlc ou test invasif) et exclut ceux qui n'ont subi ni test ADNlc ni test invasif. Une analyse post-hoc a été réalisée en analysant les patients selon qu'ils avaient ou non subi une procédure de test invasive, quel que soit leur groupe d'affectation (Figure).

Figure. Participant Flow in the Study of Cell-Free DNA Screening and Miscarriage in High-Risk Pregnancies



Les taux de fausse couche (résultat principal) et les taux de mortalité fœtale intra-utérine (résultat post-hoc) ont été comparés entre les groupes en utilisant un test unilatéral χ^2 sur l'ensemble d'analyse primaire.

Les paramètres secondaires étaient principalement descriptifs; sinon, ils ont été comparés entre les groupes à l'aide de tests bilatéraux: le test 2 (ou le test exact de Fisher, selon le cas) a été utilisé pour comparer les résultats qualitatifs et le test t (ou le test de Wilcoxon pour les variables non distribuées normalement) pour la comparaison des résultats quantitatifs. Les analyses des critères d'évaluation secondaires n'ont pas été ajustées pour les comparaisons multiples et doivent être interprétées comme exploratoires.

Un modèle linéaire généralisé binomial avec lien d'identité a été utilisé pour calculer les intervalles de confiance des différences de risque (groupe de test d'ADNlc moins groupe de test invasif). Pour la performance du test de l'ADNlc, des intervalles de confiance de 95% ont été calculés en utilisant une distribution binomiale.

Des analyses de sensibilité post-hoc ont été effectuées pour étudier la robustesse des résultats pour le critère d'évaluation principal. Un modèle linéaire généralisé à effet central aléatoire a été calculé pour gérer la conception multi-sites.²³ Les imputations multiples par des équations chaînées basées sur 2 méthodes différentes (échantillon aléatoire à partir des valeurs observées et régression logistique comprenant le groupe de randomisation, l'âge, l'indice de masse corporelle et le risque de trisomie 21 en tant que co-variables) ont été testées pour traiter les données manquantes.²⁴ En outre, une analyse

point de basculement a été réalisée pour évaluer la robustesse des résultats pour le principal résultat en examinant la façon dont il serait modifié par les différents scénarios de remplacement des données manquantes. ²⁵

Résultats

Population de patients

Au total, 2592 femmes ont été évaluées pour déterminer leur éligibilité dans 57 centres entre avril 2014 et avril 2016 (7 centres n'ont recruté aucun participant pour l'étude). Parmi ces femmes, 481 (18,6%) ont refusé de participer avant la randomisation, parmi lesquelles 448 ont déclaré préférer le test invasif ou l'ADNlc. 2111 femmes ont donc été randomisées, 1049 dans le groupe de test ADNlc et 1062 dans le groupe de test invasif direct. Après exclusion des patients sans formulaires de consentement dûment remplis, 1034 patients étaient éligibles pour le test de l'ADNlc et 1017 pour le test invasif. Cinquante-quatre femmes (2,6%) ont été perdues de vue (19 [1,8%] dans le groupe de test d'ADNc et 35 [3,4%] dans le groupe de test invasif). Le flux de participants au cours de l'essai est présenté à la figure. Les données démographiques et les résultats de dépistage de la trisomie étaient similaires dans les deux groupes (Tableau n°1)

Table 1. Baseline Participant Characteristics

| Characteristics | Cell-Free DNA Testing Group (n = 1034) | Invasive Testing Group (n = 1017) |
|--|--|-----------------------------------|
| Age, mean (SD), y | 36.2 (5.2) | 36.3 (4.9) |
| ≥35, No. (%) | 696 (67.3) | 683 (67.2) |
| ≥38, No. (%) | 478 (46.2) | 468 (46.0) |
| Gestational age on day of randomization, mean (SD), wk | 15.0 (1.3) | 15.1 (1.3) |
| Weight, mean (SD), kg | 67.4 (14.8) | 68.0 (14.6) |
| Height, mean (SD), cm | 164.4 (6.2) | 164.7 (6.5) |
| Body mass index, mean (SD) ^a | 24.9 (5.2) | 25.1 (5.2) |
| ≥30, No. (%) | 145 (14) | 169 (16.6) |
| Gravidity, median (IQR) | 3 (2-4) | 3 (2-4) |
| Parity, median (IQR) | 1 (0-2) | 1 (0-2) |
| First-trimester serum markers, No. (%) with data | 961 (92.9) | 927 (91.2) |
| Crown-rump length, mean (SD), mm | 63.7 (8.3) | 63.7 (7.9) |
| Nuchal translucency, mean (SD), mm ^b | 1.85 (0.56) | 1.81 (0.54) |
| Nuchal translucency multiple of the median, mean (SD) ^c | 1.18 (0.37) | 1.15 (0.35) |
| Human chorionic gonadotropin β fraction multiple of the median, mean (SD) | 2.36 (1.09) | 2.39 (1.13) |
| Pregnancy-associated plasma protein A multiple of the median, median (IQR) | 0.73 (0.49-1.03) | 0.66 (0.48-1.02) |
| Risk of trisomy 21, median (IQR) ^d | 1:152 (1:92-1:212) | 1:157 (1:93-1:210) |
| Risk of trisomy 21 ≥1:50, No. (%) ^d | 115 (11.1) | 96 (9.4) |
| Personal or family history of Down syndrome, No. (%) | 32 (3.1) | 37 (3.6) |
| Personal or family history of chromosomal abnormality, No. (%) | 12 (1.2) | 7 (0.7) |

Abbreviation: IQR, interquartile range.

^a Calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared.

^b Nuchal translucency is sonographic measurement of the size of the translucent space behind the neck of the fetus and is correlated with risk of trisomy 21.

^c Multiple of the median is a measure of how far an individual test result deviates from the median (multiple of the median value = patient value/median population value).

^d First-trimester combined screening or sequential combined screening of trisomy 21.

Résultat primaire

Il n'y avait pas de différence significative dans les taux de fausse couche entre le groupe ADNlc et les groupes de tests invasifs (8 [0,8%] vs 8 [0,8%] fausses couches; différence de risque, -0,03%; IC unilatéral à 95%, -0,68% à; $P = 0,47$) ([tableau 2](#)). À la suite d'un test d'ADNlc et de tests invasifs, des fausses couches sont survenues à une médiane de 19,9 (IQR, 16,9-21,1) semaines de gestation et à 19,9 (IQR, 18,8-22) semaines de gestation, respectivement.

Une femme randomisée dans le groupe de tests invasifs ayant subi une fausse couche avait refusé de se soumettre à un test invasif. Lors de l'analyse des données par protocole, il n'y avait pas de différence significative dans les taux de fausse couche entre le test d'ADNlc (n = 1103) et le test invasif (n = 733) (8 [0,7%] vs 7 [1%] fausses couches; différence de risque, -0,23 IC à 1 côté à 95%, -0,95% à ∞; $P = .30$). Aucune patiente n'a eu de fausse couche à la suite d'un test invasif réalisé après un résultat positif au test d'ADNlc.

Résultats secondaires

Il y avait 84 (8,3%) et 751 (76,5%) procédures invasives réalisées dans les groupes ADNlc et test invasif, respectivement.

Les tests d'ADNlc ont été réussis chez 984 des 1028 femmes (95,7%) qui avaient été randomisées dans le groupe de test d'ADNlc et qui avaient été testées au hasard. Quarante-quatre échantillons (4,3%) ont échoué aux contrôles de qualité (hémolyse d'échantillons de plasma; échantillon reçu au bout de 5 jours). Trois femmes dont les premiers tests ont échoué ont refusé de fournir un deuxième échantillon de sang et 38 des 41 échantillons répétés ont été satisfaisants, ce qui a permis de réussir les tests d'ADNlc, y compris les tests répétés, chez 1022 (99,4%) des 1028 femmes.

La performance du test d'ADNlc a été estimée pour les 984 échantillons avec une qualité satisfaisante au premier contrôle. Le taux de détection (sensibilité) des tests d'aide sur la trisomie 21 était de 100% (IC à 95%, 87,2% à 100%) (27/27), avec un taux de faux positifs de 5,6% (IC à 95%, 4,2% à 7,2%). (55/984) pour le seuil z -score choisi ($z = 1,645$). Le z -score moyen était de 12,9 (ET, 5,6) dans les cas vrais positifs. Dans les cas de faux positifs, tous les z -scores étaient inférieurs à 3 sauf deux cas avec des z -scores de 3,5 et 14. Dans le dernier cas, ce z -score élevé a été confirmée avec un autre échantillon prélevé 3 mois plus tard, alors que l'amniocentèse excluait la trisomie 21. Cela indiquait une possible mosaïque confinée du placenta, bien que cela n'ait pas pu être confirmé à la naissance. Si une valeur de seuil du z -score de 3,0 avait été utilisée, le taux de faux positifs aurait été de 0,2% (IC à 95%, 0,03% à 0,7%).

L'intervalle de temps moyen entre la réception de l'échantillon sanguin et la disponibilité des résultats était de 13,0 (ET, 5,0) jours et était inférieur à 3 semaines pour 903 femmes (88%) ayant subi un test d'ADNc.

Les anomalies chromosomiques identifiées dans les deux groupes sont résumées dans les [tableaux 2 et 3](#). Au total, 28 (2,8%) et 49 (5%) anomalies chromosomiques ont été diagnostiquées respectivement dans les groupes ADNlc et test invasif (différence de risque, -2,23%; IC95%, -3,93% à -0,54%; $P = .01$). Celles-ci comprenaient respectivement 1 (0,1%) et 11 (1,1%) anomalies autres que la trisomie 21 (différence de risque, -1,02%, IC95%, -1,71% à -0,34%; $P = 0,003$) ([Tableau 2](#)). et décrit en détail dans le tableau électronique du [supplément 3](#).

Table 2. Primary, Secondary, and Post Hoc Outcomes in the Cell-Free DNA and Invasive Testing Groups (Primary Analysis Set)

| Outcomes | No. (%) | | Absolute Risk Difference, % (95% CI) ^a | P Value |
|--|--------------------------------------|--------------------------------|---|-------------------|
| | Cell-Free DNA Testing Group (n=1015) | Invasive Testing Group (n=982) | | |
| Primary outcome | | | | |
| Miscarriage <24 weeks' gestation | 8 (0.8) | 8 (0.8) | -0.03 (-0.68 to ∞) | .47 ^b |
| Secondary outcomes | | | | |
| Chromosomal anomalies | 28 (2.8) | 49 (5) | -2.23 (-3.93 to -0.54) | .01 ^c |
| Trisomy 21 | 27 (2.7) | 38 (3.9) | -1.21 (-2.77 to 0.35) | .13 ^c |
| Other anomalies | 1 (0.1) | 11 (1.1) | -1.02 (-1.71 to -0.24) | .003 ^c |
| Post hoc outcomes ^d | | | | |
| Intrauterine fetal death | 9 (0.9) | 9 (0.9) | -0.03 (-0.72 to ∞) | .47 ^b |
| Miscarriage + intrauterine fetal death | 17 (1.7) | 17 (1.7) | -0.06 (-1.01 to ∞) | .46 ^b |
| Termination of pregnancy | 30 (3) | 39 (4) | -1.02 (-2.62 to 0.59) | .21 ^c |
| Trisomy 21 | 23 | 35 | | |
| Other ^e | 7 | 4 | | |
| Live birth | 965 (95.1) | 924 (94.1) | 0.98 (-1.01 to 2.97) | .33 ^c |
| Perinatal death | 3 (0.3) | 2 (0.2) | 0.09 (-0.35 to 0.53) | >.99 ^c |

^a Absolute risks differences were calculated as the cell-free DNA group minus the invasive testing group, with 1-sided 95% CIs for 1-sided tests and 2-sided 95% CIs for 2-sided tests, respectively.

^b One-sided test.

^c Two-sided test.

^d Pregnancy outcomes were collected and categorized as follows: miscarriage before 24 weeks' gestation, intrauterine fetal death (ie, spontaneous death of a fetus after 24 weeks' gestation and before delivery), termination of

pregnancy, and live birth and perinatal death (restricted to intrapartum stillbirth and neonatal death before 6 days).

^e There were 7 terminations of pregnancy for other reasons in the cell-free DNA testing group: CHARGE syndrome (n=1), multiple fetal malformation (n=1), severe intrauterine growth restriction (n=1), congenital heart disease (n=1), maternal distress (n=2), and tetrasomy 12p (n=1). There were 4 terminations of pregnancy for other reasons in the invasive testing group: bilateral renal agenesis (n=1), brain anomaly (n=1), Turner syndrome (n=1), and cytomegalovirus infection (n=1).

Dans le groupe ADNlc, l'anomalie était une tétrasomie 12p retrouvée lors d'une amniocentèse après échographie révélant de multiples malformations au second trimestre. Les anomalies du groupe de tests invasifs sont résumées dans le [tableau 3](#).et décrites en

Table 3. Summary of Chromosomal Anomalies Other Than Trisomy 21 Detected by Karyotyping in 751 Women in the Invasive Testing Group^a

| Case | Chromosomal Anomaly | Typical Clinical Consequences |
|------|--|--|
| 1 | Apparently balanced reciprocal translocation between chromosomes 5 and 17 inherited from the father | No obvious clinical manifestation |
| 2 | Balanced robertsonian translocation inherited from the father | No obvious clinical manifestation |
| 3 | Type II confined placental mosaicism (trisomy 12) | No obvious clinical manifestation |
| 4 | Apparently balanced reciprocal translocation between chromosomes 2 and 13 occurring de novo | No obvious clinical manifestation |
| 5 | Mosaic trisomy 13 | Syndromic developmental delay/intellectual disability |
| 6 | 3q11.2q13.11 mosaic trisomy: 1 clone with an interstitial deletion of the long arm of chromosome 3 and a marker derived from chromosome 3 and 1 clone with normal chromosome 3 and the same marker | Syndromic developmental delay/intellectual disability |
| 7 | Two distinct clones: 1 with a small-ring X (containing XIST locus) and 1 with a small-ring X and a large-ring X (which does not contain XIST locus) | Syndromic developmental delay/intellectual disability |
| 8 | Mosaic trisomy 13 resulting from a homologous robertsonian translocation | Syndromic developmental delay/intellectual disability |
| 9 | Monosomy X (45,X) | Turner syndrome: short stature, gonadal dysgenesis, and multisystemic complications (eg, congenital heart defects, renal and skeletal anomalies) |
| 10 | Mosaic 45,X and 46,XY | Turner syndrome |
| 11 | 47,XXY | Klinefelter syndrome: tall stature, hypogonadism, infertility, variable cognitive impairments |

^a Anomaly descriptions according to the 2016 International System for Human Cytogenomic Nomenclature are available in the eAppendix in Supplement 3.

détail dans le tableau électronique du [supplément 3](#).
Analyse post-hoc du résultat principal

L'analyse post-hoc des patients analysés selon qu'ils subissent ou non une procédure invasive ne montre pas non plus de différence significative entre les taux de fausses couches (9/1178 [0,8%] et 7/819 [0,9%]; différence de risque, -0,09%; unilatérale IC 95%, -0,76% à; $P = .41$).

Un modèle linéaire généralisé binomial avec un lien d'identité incluant le site en tant qu'effet aléatoire n'était pas pertinent. Lors de la modélisation du lien logit, l'erreur type du coefficient β incluant le centre en tant qu'effet aléatoire était très proche de celle estimée par le modèle sans effet aléatoire (SE [β] = 0,50205 vs 0,50199 sans effet de site). Des imputations multiples de données manquantes basées sur un échantillonnage aléatoire à partir de valeurs observées et une régression logistique multiple ont conduit à des résultats comparables (différences de risque, -0,02% [IC unilatéral à 95%, -0,68% à ∞ ; $P = .47$] et -0,03% [IC 95% recto, -0,67% à ∞ ; $P = .48$], respectivement). Les résultats d'une analyse des points de basculement sont présentés dans la figure électronique du supplément 3.

Analyse postérieure aux autres issues de la grossesse

À la suite de la recherche d'ADNlc et de tests invasifs, il y a eu respectivement 9 (0,9%) et 9 (0,9%) morts fœtales in utero (différence de risque, -0,03%; IC unilatéral à 95%, -0,72% à ∞ ; $P = .47$) et 3 (0,3%) et 2 (0,2%) décès périnataux (différence de risque, 0,09%; IC 95%, -0,35% à 0,53%; $P > 0,99$), et 30 (3%) et 39 (4%) femmes ayant subi une interruption de grossesse (différence de risque, -1,02%; IC95%, -2,62% à 0,59%; $p = 0,21$) (tableau 2).

Il n'y avait pas de différence significative dans les taux de perte de grossesse globaux entre le groupe ADNlc et les groupes de tests invasifs (17 [1,7%] vs 17 [1,7%]; différence de risque, -0,06%; IC unilatéral à 95%, -1,01%; $P = 0,46$) (tableau 2). Les pertes de grossesse sont survenues à un âge gestationnel médian de 21,3 semaines (IQR, 18-23,1) semaines et de 20 semaines (IQR, 17,1-22) semaines, respectivement.

Lors de l'analyse des données par protocole, il n'y avait pas de différence significative dans les taux de perte de grossesse entre le test d'ADNlc ($n = 1103$) et le test invasif ($n = 733$) (17 [1,5%] contre 14 [1,9%], respectivement; différence de risque, -0,37%; IC 95% recto, -1,40% à; $P = .27$). Ceci est resté vrai dans l'analyse post-hoc entre le test ADNlc ($n = 1178$) et le test invasif ($n = 819$) (20 [1,7%] vs 14 [1,7%], respectivement; différence de risque, -0,01%; unilatérale IC 95%, -0,98% à; $P = .49$).

Discussion

Dans cet essai clinique randomisé, il n'y avait pas de réduction significative du risque de fausse couche avant 24 semaines dans les grossesses à haut risque après le test d'ADNlc suivi d'un test invasif uniquement chez les femmes dont le résultat était positif par rapport au test invasif immédiat. La conception multicentrique de cette étude comprenait des procédures invasives réalisées dans 57 centres différents; cela rend le résultat plus généralement applicable. À notre connaissance, il s'agit du premier essai clinique randomisé comparant les taux de fausse couche suite à l'administration d'ADNlc et de tests invasifs chez les femmes enceintes à haut risque de trisomie 21 par dépistage combiné au cours du premier trimestre de la grossesse.

Le taux total de fausses couches dans le groupe ayant subi une procédure invasive était de 0,8%, ce qui est nettement inférieur au taux total généralement attendu de 1,5%, qui inclut un taux de fausse couche liée à une procédure de 1%. Ce taux, qui a également été

utilisé pour l'estimation de la taille de l'échantillon, est issu d'un essai clinique randomisé réalisé il y a plus de 30 ans.¹⁶ Ces données ont été remises en question par une étude récente et une méta-analyse qui a conclu que les risques réels de fausses couches suivantes prélèvement de villosités chorales ou amniocentèse sont d'environ 0,2% et 0,1%, respectivement,^{17, 18} et ni le prélèvement de villosités chorales, ni l' amniocentèse n'étaient associées à un risque accru de fausse couche dans une cohorte de plus de 147 000 grossesses.¹⁸ En revanche, le taux de fausse couche dans le groupe ADNlc était supérieur au taux anticipé de 0,5%. Bien que cela ne soit pas statistiquement significatif, cela pourrait être lié au statut à haut risque des grossesses.

Un résultat secondaire important a été la détection d'un nombre significatif d'anomalies chromosomiques non liées à la trisomie 21 dans le groupe de tests invasifs. Il est bien établi que le dépistage combiné au premier trimestre produit des anomalies chromosomiques autres que la trisomie 21, même après exclusion d'une augmentation de la clarté nucale, comme dans cet essai.^{26, 27} Dans la présente étude, sur 751 femmes, il y avait 11 (1,5%) anomalies chromosomiques identifiées par des tests invasifs qui n'auraient pas été détectées par l'ADNlc, y compris plusieurs cas pathologiques ou nécessitant un suivi et une gestion spécifiques (Tableau 3). Compte tenu de la nature randomisée de l'étude, une incidence similaire d'anomalies dans le groupe ADNlc serait attendue, bien qu'une seule ait été détectée à la suite de la découverte d'une anomalie fœtale à l'échographie.

Cette étude n'a pas montré de réduction de la fausse couche ou de mort fœtale in utero associée à l'utilisation de l'ADNlc dans les cas à haut risque. Cependant, il y avait beaucoup moins de procédures invasives dans le groupe ADNlc (81 contre 751 dans le groupe de tests invasifs immédiats), et les procédures invasives ont été associées à des résultats extrêmement rares mais graves, tels que la septicémie maternelle et la mort.^{28 - 30} Aucun de ceux-ci ne s'est produit dans cet essai clinique randomisé. Si la sécurité n'est plus un argument pour les tests ADNlc par rapport au caryotype, le risque de négliger des anomalies chromosomiques rares lors de grossesses à haut risque doit être soigneusement évalué. Dans cette étude, le caryotype standard a identifié d'autres anomalies chromosomiques dans 1,5% des grossesses à haut risque. L'utilisation de la micropuce chromosomique, qui est devenue le test génétique de première intention sur le liquide amniotique ou les villosités chorales dans de nombreux laboratoires, aurait pu augmenter encore plus le nombre de découvertes d'anomalies.^{10, 31, 32} En effet, la valeur additionnelle de l'analyse par micropuce chromosomique par rapport au caryotype atteindrait 6% lorsqu'il y avait des anomalies fœtales à l'échographie et dans 0,5 à 2,5% des cas de grossesses avec un âge maternel élevé ou à risque élevé après dépistage combiné au premier trimestre.^{27, 31, 33, 34}

Limites

Cette étude a plusieurs limites. Premièrement, bien que le taux de tests invasifs soit considérablement inférieur après les tests d'ADNlc, le taux observé de faux positifs de 5,6% était supérieur à la moyenne de 0,1% rapportée.^{2, 35} Ce taux plus élevé de faux positifs a été jugé acceptable pour améliorer la sensibilité de l'ADNlc puisqu'il s'agissait du premier essai randomisé évaluant ce test. Bien que cela induise davantage d'interventions invasives secondaires et puisse donc augmenter le taux de fausses couches dans ce groupe,

aucun patient soumis à un test invasif à la suite d'un résultat positif du test d'ADNlc n'a eu une fausse couche. L'analyse exploratoire post-hoc a également suggéré l'absence de risque supplémentaire de fausse couche ou de perte de grossesse chez les femmes ayant subi une intervention invasive. Deuxièmement, dans cette étude, 17% des femmes ont décliné la randomisation et jusqu'à 24% des femmes initialement randomisées pour un test invasif ont refusé le test qui leur avait été attribué. Cette limitation potentielle est due au fait que cette attrition de la participante est survenue après avoir conseillé environ 0,5% à 1% de risque de perte de grossesse liée à la procédure. Cependant, les taux d'abandon plus élevés chez les femmes assignées à un test invasif peuvent avoir reflété une tentative de bénéficier gratuitement du test d'ADNlc par le biais de l'étude. En effet, l'ADNlc est devenu largement disponible via des laboratoires privés à un coût substantiel. Cela a incité les assurances maladie nationales à prendre en compte différentes limites de risque pour proposer un test d'ADNlc de deuxième ligne après un dépistage combiné au premier trimestre.^{9, 36} Ce taux d'abandon pourrait également refléter une meilleure acceptation des tests d'ADNlc par rapport aux procédures invasives. Troisièmement, le test d'ADNlc n'a été effectué que pour la trisomie 21, alors que le potentiel de l'ADNlc pour éliminer d'autres anomalies chromosomiques devrait s'améliorer dans un proche avenir. Quatrièmement, l'évaluation de la valeur clinique de certaines des anomalies chromosomiques détectées dans le groupe invasif pourrait être controversée. Néanmoins, il est difficile de déterminer quelle anomalie chromosomique pourrait modifier la gestion de la grossesse, car elle peut également varier en fonction du conseil prénatal, des résultats de l'échographie, des préférences des parents et des lois locales. Cinquièmement, cet essai clinique randomisé n'a montré aucune différence statistique entre le risque de fausse couche avant 24 semaines et plus de 2 000 femmes ayant une grossesse à risque élevé de syndrome de Down randomisé. Cependant, l'étude a peut-être été insuffisante pour identifier des réductions potentiellement importantes sur le plan clinique du nombre de fausses couches avec le test d'ADNlc. Sixièmement, il n'a pas été possible de réaliser l'analyse économique planifiée. Pour cette raison, les implications en termes de coûts des résultats de l'étude n'ont pas pu être estimées. Septièmement, en raison du risque d'erreur de type 1 dû aux comparaisons multiples, les analyses des critères d'évaluation secondaires doivent être considérées comme exploratoires.

Conclusions

Chez les femmes dont le risque de trisomie 21 était élevé, proposer un dépistage par ADNlc suivi d'un test invasif si le résultat du test était positif, par rapport au test invasif direct, n'a pas entraîné de réduction significative de fausse couche avant 24 semaines. L'étude a peut-être été insuffisante pour détecter des différences cliniquement importantes dans les taux de fausse couche.

REFERENCES

1. Alldred SK, Takwoingi Y, Guo B, et al. First trimester ultrasound tests alone or in combination with first trimester serum tests for Down's syndrome screening. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;3:CD012600. doi:10.1002/14651858.CD012600
2. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;50(3):302-314. doi:10.1002/uog.17484
3. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med*. 2015;372(17):1589-1597. doi:10.1056/NEJMoa1407349
4. Salomon LJ, Alfirevic Z, Audibert F, et al; ISUOG Clinical Standards Committee. ISUOG updated consensus statement on the impact of cfDNA aneuploidy testing on screening policies and prenatal ultrasound practice. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;49(6):815-816. doi:10.1002/uog.17483
5. Committee opinion summary No. 640: cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2015;126(3):691-692. doi:10.1097/O1.AOG.0000471171.86798.ac
6. Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee. Clarification of recommendations regarding cell-free DNA aneuploidy screening. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(6):753-754. doi:10.1016/j.ajog.2015.09.077
7. Rink BD, Norton ME. Screening for fetal aneuploidy. *Semin Perinatol*. 2016;40(1):35-43. doi:10.1053/j.semperi.2015.11.006
8. Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, Committee on Genetics, and Society for Maternal-Fetal Medicine. Practice bulletin No. 163: screening for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2016;127(5):e123-e137. doi:10.1097/AOG.0000000000001406
9. UK National Screening Committee, Public Health England. The UK NSC recommendation on Down's syndrome screening in pregnancy. January 2016. <https://legacyscreening.phe.org.uk/downs>. Accessed July 11, 2018.
10. Evans MI, Wapner RJ, Berkowitz RL. Noninvasive prenatal screening or advanced diagnostic testing: caveat emptor. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(3):298-305. doi:10.1016/j.ajog.2016.04.029
11. Journal Officiel de la République Française. Arrêté Du 23 Juin 2009 fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatal avec utilisation des marqueurs sériques maternels de la trisomie 21. 2009. <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000020814373&categorieLien=idSASPO907157A>. Accessed July 11, 2018.
12. Muller F, Dreux S, Czerkiewicz I, et al. Down syndrome maternal serum screening: results' comments recommended by accredited biologists [in French]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2014;43(9):671-679. doi:10.1016/j.jgyn.2014.05.012
13. Royère D; Working Group Trisomy 21 Screening. The impact of introducing combined first-trimester trisomy 21 screening in the French population. *Eur J Public Health*. 2016;26(3):492-497. doi:10.1093/eurpub/ckv214
14. Lo KK, Boustred C, Chitty LS, Plagnol V. RAPIDR: an analysis package for non-invasive prenatal testing of aneuploidy. *Bioinformatics*. 2014;30(20):2965-2967. doi:10.1093/bioinformatics/btu419
15. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther*. 2010;27(1):1-7. doi:10.1159/000271995
16. Tabor A, Philip J, Madsen M, Bang J, Obel EB, Nørgaard-Pedersen B. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet*. 1986;1(8493):1287-1293. doi:10.1016/S0140-6736(86)91218-3
17. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45(1):16-26. doi:10.1002/uog.14636
18. Wulff CB, Gerds TA, Rode L, Ekelund CK, Petersen OB, Tabor A; Danish Fetal Medicine Study Group. Risk of fetal loss associated with invasive testing following combined first-trimester screening for Down syndrome: a national cohort of 147 987 singleton pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;47(1):38-44. doi:10.1002/uog.15820
19. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. *Perinatal Management of Pregnant Women at the Threshold of Infant Viability*. February 2015:15. Scientific Impact Paper No. 41.
20. Delabaere A, Huchon C, Lavoue V, et al. Definition of pregnancy losses: standardization of terminology from the French National College of Obstetricians and Gynecologists (CNGOF) [in French]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2014;43(10):756-763. doi:10.1016/j.jgyn.2014.09.010
21. Cuckle H. Strategies for implementing cell-free DNA testing. *Clin Lab Med*. 2016;36(2):213-226. doi:10.1016/j.cl.2016.01.010
22. Cuckle H, Benn P, Pergament E. Maternal cfDNA screening for Down syndrome—a cost sensitivity analysis. *Prenat Diagn*. 2013;33(7):636-642. doi:10.1002/pd.4157
23. McCullagh P, Nelder JA. *Generalized Linear Models, Second Edition*. London, England: Chapman & Hall Inc; 1989.
24. Van Buuren S, Groothuis-Oudshoorn K. MICE: multivariate imputation by chained equations in R. *J Stat Softw*. 2011;45(3):1-67.
25. Liublinska V, Rubin DB. Sensitivity analysis for a partially missing binary outcome in a two-arm randomized clinical trial. *Stat Med*. 2014;33(24):4170-4185. doi:10.1002/sim.6197
26. Tørring N, Petersen OB, Becher N, Vogel I, Uldbjerg N; Danish Fetal Medicine Study Group; Danish Clinical Genetics Study Group. First trimester screening for other trisomies than trisomy 21, 18, and 13. *Prenat Diagn*. 2015;35(6):612-619. doi:10.1002/pd.4584
27. Vogel I, Petersen OB, Christensen R, Hyett J, Lou S, Vestergaard EM. Chromosomal microarray as a primary diagnostic genomic tool for pregnancies defined as being at increased risk within a population based combined first-trimester screening program. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018;51(4):480-486. doi:10.1002/uog.17548
28. Bodner K, Wierrani F, Bodner-Adler B. Maternal sepsis due to *Clostridium perfringens* after 2nd-trimester genetic amniocentesis. *J Obstet Gynaecol*. 2011;31(4):339-340. doi:10.3109/01443615.2011.556267
29. Okyay RE, Gode F, Saatli B, Guclu S. Late-onset maternal mortality after amniocentesis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;158(2):367-368. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.04.050
30. Erez Y, Ben-Shushan A, Elchalal U, Ben-Meir A, Rojansky N. Maternal morbidity following routine second trimester genetic amniocentesis. *Fetal Diagn Ther*. 2007;22(3):226-228. doi:10.1159/000098723
31. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med*. 2012;367(23):2175-2184. doi:10.1056/NEJMoa1203382
32. Dugoff L, Norton ME, Kuller JA; Society for Maternal-Fetal Medicine. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(4):B2-B9. doi:10.1016/j.ajog.2016.07.016
33. Oneda B, Rauch A. Microarrays in prenatal diagnosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;42:53-63. doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.01.003
34. Fiorentino F, Napolitano S, Caiazzo F, et al. Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(7):725-730. doi:10.1038/ejhg.2012.253
35. Dar P, Shani H, Evans MI. Cell-free DNA: comparison of technologies. *Clin Lab Med*. 2016;36(2):199-211. doi:10.1016/j.cl.2016.01.015
36. Haute Autorité de Santé. *Place des tests ADN libre circulant dans le sang maternel dans le dépistage de la trisomie 21 fœtale: synthèse de l'argumentaire et recommandations*. April 2017. https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-05/dir42/synthese_et_recommandations_place_des_tests_adn_libre_circulant_dans_le_sang_maternel_dans_le_depistage_de_la_trisomie_21_f.pdf. Accessed August 3, 2017.