

การตรวจคัดกรองความผิดปกติของโครโมโซมทารกในครรภ์ ชนิดไตรโซมี 21 และไตรโซมี 18 แบบไม่รุกรานในมารดาตั้งครรภ์แฝดสอง ด้วยเทคโนโลยีการอ่านลำดับเบสที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ A paired-end sequencing based Noninvasive Prenatal Testing (NIPT) to screen Trisomy 21 and Trisomy 18 in twin pregnancies

กุลวดี ตั้งมั่นสกุลชัย¹ วาสนิ จอนสวรรค์¹ กฤษกร เสวทวงศ์พระ¹ ศศิธร พรหมวัลย์¹

สุจินต์ จันทร์จำเริญ² วิวัฒน์ กว้างคณานุรักษ์²

¹บริษัท เน็ก เจนเนอเรชั่น จีโนมิกส์ จำกัด ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 Email: niptmanager@nggthailand.com

²บริษัท เซฟเฟอร์ติลิตี เซ็นเตอร์ จำกัด ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 Email: suj.in.ch@safe fertilitycenter.com

บทคัดย่อ

ความผิดปกติของโครโมโซมทารก ในระหว่างการตั้งครรภ์ มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแท้งหรือความพิการแต่กำเนิด โดยความผิดปกติของโครโมโซมทารกแรกเกิดที่พบได้บ่อย คือ Trisomy 21 (กลุ่มอาการดาวน์) หรือการมีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 แท่ง นอกจากนี้ ยังมีความผิดปกติของโครโมโซมคู่อื่นๆ ที่พบรองลงมา เช่น Trisomy 18 (กลุ่มอาการเอ็ดเวิร์ด) และ Trisomy 13 (กลุ่มอาการพาทัว) โดยความผิดปกติที่เกิดจากการเพิ่มขึ้น หรือ ขาดหายไปของโครโมโซมนี้ เรียกว่า Aneuploidy ในประเทศไทย การตรวจคัดกรอง ความผิดปกติของโครโมโซมทารกในครรภ์ แบบไม่รุกราน จากเลือดมารดา หรือที่เรียกว่า Noninvasive Prenatal Test (NIPT) กำลังได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นการทดสอบที่ปลอดภัย และ ไม่เป็นอันตรายต่อทารกในครรภ์ นอกจากนี้ยังสามารถทำการทดสอบได้ตั้งแต่อายุครรภ์เพียง 10 สัปดาห์เท่านั้น ส่งผลให้ NIPT ถูกนำมาใช้เป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้น ในการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมทารกในครรภ์ ซึ่งผลการตรวจคัดกรองนี้ สามารถนำมาใช้ช่วยเหลือ

แพทย์และคนไข้ ในการประเมินและวางแผนการดูแลระหว่างและหลังการตั้งครรภ์ แต่อย่างไรก็ตาม จากหลายๆ การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า NIPT ในแต่ละการศึกษา มีค่าความไว (Sensitivity) และค่าความจำเพาะ (Specificity) ในการทดสอบ รวมถึงอัตราการเกิดผลบวกคลวงและลบคลวง ที่แตกต่างกัน เนื่องจากเทคโนโลยีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์นั้น มีความหลากหลาย ดังนั้นการทดสอบประสิทธิภาพของ NIPT ในแต่ละห้องปฏิบัติการ จึงมีความจำเป็น ก่อนที่จะนำ NIPT มาใช้ทางคลินิก การศึกษานี้จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ NIPT เพื่อตรวจคัดกรองความผิดปกติของโครโมโซมทารก ชนิด Trisomy 21 และ Trisomy 18 ซึ่งเป็นความผิดปกติที่พบได้บ่อยในทารกแรกคลอด โดยใช้เทคโนโลยีการอ่านลำดับเบส ที่ปลายทั้งสองข้างของดีเอ็นเอ (Paired-end sequencing) ในหญิงตั้งครรภ์แฝดสอง (Twin pregnancies) ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ปัจจุบันยังมีการศึกษาทางด้านนี้ไม่มากนัก จากผลการศึกษาพบว่า เทคโนโลยีนี้มีความไวและความจำเพาะของการทดสอบอยู่ที่ >99.9% ในหญิงตั้งครรภ์แฝดสอง และไม่พบผลบวกคลวงหรือผลลบคลวงในการศึกษานี้

คำสำคัญ: การคัดกรองความผิดปกติของโครโมโซมทารกในครรภ์จากเลือดมารดาแบบไม่รุกราน กลุ่มอาการดาวน์ กลุ่มอาการเอ็ดเวิร์ด ครรภ์แฝดสอง

Abstract

Chromosomal abnormalities in pregnancy are responsible for miscarriages and congenital birth defects. Trisomy21 is probably the most well-known example of a chromosomal abnormalities caused by an extra copy of chromosome21. This causes a condition called Down's syndrome which is the most common genetic disease at birth. The other major chromosomal abnormalities seen in live birth are Trisomy18 (Edward's syndrome) and Trisomy13 (Patau syndrome). In Thailand, noninvasive prenatal testing (NIPT) is widely used and can be used as a primary screening method for detection of chromosomal abnormalities that are caused by the presence of an extra or missing copy of a chromosome (Aneuploidy). NIPT is an emerging technology and has been introduced clinically which is available to all pregnant patients because it is a simple test and safe for a baby. Moreover, NIPT can be done as early as 10 weeks pregnancy. However, there were differences between studies in estimating of sensitivity, specificity, and false positive/negative rate. Thus, screening performance of NIPT should be evaluated by individual laboratory prior to clinical offering. This study evaluated the clinical screening performance of NIPT for the detection of Trisomies 21 and 18 on Illumina paired-end sequencing platforms in twin pregnancies. Our evaluation suggests that paired-end sequencing based noninvasive prenatal test provides a high combined

sensitivity and specificity of NIPT (>99.9%) in twin pregnancies. No false positive and negative case were observed.

Keywords: Noninvasive Prenatal Testing, Trisomy 21, Trisomy 18, Twin Pregnancy

1. บทนำ

ความผิดปกติของโครโมโซม ที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของโครโมโซม (Aneuploidy) สามารถเป็นสาเหตุนำไปสู่การแท้งหรือความพิการแต่กำเนิดได้ [1-2] ความผิดปกติชนิด Aneuploidy ที่พบได้บ่อยในทารกแรกคลอด ได้แก่ Trisomy21 รองลงมา คือ Trisomies 18 และ 13 [3-5] ดังนั้นการตรวจคัดกรองโครโมโซมของทารกก่อนคลอด จึงมีความสำคัญ สำหรับการวางแผนดูแลการตั้งครรภ์ หากโครโมโซมทารกมีความผิดปกติ ซึ่งในปัจจุบันการตรวจหาความผิดปกติ ของโครโมโซมทารกก่อนคลอดนั้น สามารถทำได้โดยการตรวจวินิจฉัย (Diagnostic test) หรือ การตรวจคัดกรอง (Screening test) โดยการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดนั้น มีความแม่นยำสูง เนื่องจาก เป็นการทดสอบเนื้อเยื่อของทารกในครรภ์โดยตรง ซึ่งต้องใช้กระบวนการแบบรุกราน เช่น การตรวจน้ำคร่ำและตัวอย่างรก จึงทำให้มีความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะแทรกซ้อนได้ สำหรับการตรวจคัดกรองก่อนคลอด เป็นการทดสอบที่ง่ายและไม่มีหัตถการที่เป็นอันตราย โดยทั่วไปการตรวจคัดกรองจะทำได้ด้วยการอัลตราซาวด์ และการตรวจเลือด เช่น การตรวจซีรัมของมารดา (Maternal serum marker test) และ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของทารกที่อยู่ในกระแสเลือดมารดา (cell-free fetal DNA, cfDNA) ที่เรียกว่า Noninvasive Prenatal Testing (NIPT) ซึ่งเป็นการตรวจคัดกรองโครโมโซมทารกในครรภ์ก่อนคลอดแบบไม่รุกราน สามารถตรวจหาความผิดปกติแบบ Aneuploidy ของทารกในครรภ์

ได้ ตั้งแต่ในช่วงไตรมาสแรก ทั้งในครรภ์เดี่ยวและครรภ์แฝด [6-7] นอกจากนี้ข้อมูลจากการวิเคราะห์แบบ meta-analysis ยังระบุว่าประสิทธิภาพของการตรวจคัดกรองด้วย NIPT นั้นเหนือกว่าการคัดกรองวิธีอื่น [8] ส่งผลให้ NIPT ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจคัดกรองเบื้องต้น สำหรับการตรวจหา ความผิดปกติของโครโมโซมทารกก่อนคลอด อย่างไรก็ตาม ด้วยเทคโนโลยีที่แตกต่างกันของการตรวจ NIPT ทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรองมีความแตกต่างกันด้วย การศึกษานี้จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของ NIPT ในการคัดกรองความผิดปกติของโครโมโซมชนิด Trisomy 21 และ Trisomy 18 ซึ่งเป็นความผิดปกติที่พบได้บ่อยในทารกแรกคลอด โดยทำการทดสอบในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์แฝดสอง เนื่องจาก ปัจจุบันยังมีข้อมูลประสิทธิภาพของ NIPT ในตัวอย่างกลุ่มนี้ไม่มากนัก สำหรับเทคโนโลยีของ NIPT ที่ใช้ในการศึกษานี้ อาศัยหลักการอ่านลำดับเบสที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Paired-end sequencing) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ได้เป็นสองเท่าในเวลาเดียวกัน ทำให้ได้ข้อมูลลำดับเบสเป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว และ เนื่องจาก NIPT เป็นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของทารกที่ปะปนกับดีเอ็นเอของมารดาในกระแสเลือด ดังนั้น การอ่านลำดับเบสที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จะช่วยให้สามารถหาความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ และนำไปสู่ความไวของการทดสอบที่เพิ่มมากขึ้นเพราะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่านั้น ส่วนใหญ่จะพบว่าเป็นดีเอ็นเอของทารก [9]

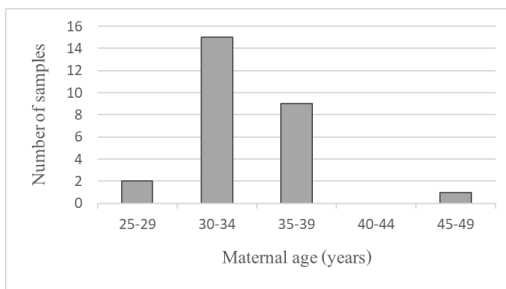
2. วิธีการดำเนินการวิจัย

การคัดกรองความผิดปกติของโครโมโซมทารกด้วย NIPT ในการศึกษาี้ จะทำในตัวอย่าง พลาสมาแช่แข็ง จากหญิงตั้งครรภ์แฝดสอง ที่มีอายุครรภ์ตั้งแต่ 10 สัปดาห์ เป็นต้นไป จำนวน 27 คน โดยนำ

ตัวอย่างพลาสมาแช่แข็งที่เหลือจากการตรวจ NIPT ประจำวันของห้องปฏิบัติการ เน็ก เจนเนอร์เรชั่น จีโนมิก ประเทศไทย ที่ได้ทำการทดสอบและรายงานผลในช่วงปี ค.ศ. 2018-2020 มาใช้ในการศึกษานี้ โดยได้รับความยินยอมจากผู้เข้าร่วมการทดสอบทุกคน ในการนำตัวอย่างที่เหลือมาใช้ในการวิจัย หรือพัฒนาคุณภาพการตรวจ NIPT ซึ่งผลการทดสอบที่ได้จากการวิเคราะห์ชิ้นนี้ ด้วยชุดน้ำยาและโปรแกรมการวิเคราะห์ผลที่ต่างกัน จะไม่ถูกส่งต่อไปให้แพทย์ผู้ดูแลหรือคนไข้ ขั้นตอนการตรวจ NIPT จะเริ่มจาก cell free DNA (cfDNA) ของทารกและมารดาที่ลอยผสมกันอยู่ในพลาสมา จะถูกสกัดออกมาเพื่อใช้เตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library) สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งขั้นตอนการสกัด cell-free DNA และการเตรียม DNA library นี้ทำโดยเครื่องอัตโนมัติ Microlab STAR (Hamilton, NV, USA) และใช้ชุดน้ำยา VeriSeq NIPT solution v2 (Illumina Inc, CA, USA) หลังจากนั้น คลังดีเอ็นเอต้นแบบ จะถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับเบส ด้วยเทคโนโลยีการอ่านลำดับเบส ที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยเครื่อง NextSeq550 (Illumina Inc, CA, USA) ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการอ่านลำดับเบส หรือ Sequencing outputs นี้ จะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยซอฟต์แวร์ VeriSeq NIPT solution v2 (Illumina inc, USA) เพื่อหาอัตราส่วนของโครโมโซมแต่ละคู่ ว่ามีปริมาณมากหรือน้อยเกินไปหรือไม่ โดยเทียบกับฐานข้อมูล Human genome เพื่อระบุตำแหน่งของลำดับเบสที่อ่านได้สุดท้ายจะทำการนับจำนวน ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อ่านได้ และคำนวณเป็นค่า Normalized chromosome value (NCV) และ Log Likelihood Ratio (LLR) Scores เพื่อใช้สำหรับการรายงานผลการทดสอบ

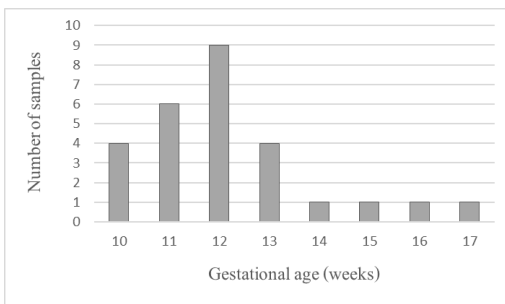
3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากข้อมูลของผู้เข้าร่วมการทดสอบทั้ง 27 คน พบว่าค่าเฉลี่ยของอายุมารดา (Maternal age) ขณะตั้งครรภ์อยู่ที่ 34.11 ปี โดยส่วนใหญ่ (63%) มีอายุน้อยกว่า 35 ปี และ 37% เป็นการตั้งครรภ์ที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 35 ปี (Advanced maternal age) ซึ่งเป็นช่วงอายุที่มีความเสี่ยงสูง ที่จะพบความผิดปกติของโครโมโซมทารกในระหว่างตั้งครรภ์ [10,11] การกระจายของอายุมารดาขณะตั้งครรภ์แสดงดัง รูปที่ 1



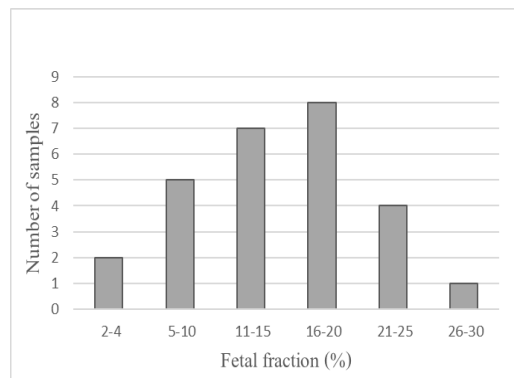
รูปที่ 1 การกระจายของอายุมารดาขณะตั้งครรภ์

สำหรับค่าเฉลี่ยของอายุครรภ์มารดา (Gestational age) ณ วันที่เจาะเลือดเพื่อทำการตรวจ NIPT อยู่ที่ 12.15 สัปดาห์ ซึ่งส่วนใหญ่ (89%) เป็นการตั้งครรภ์ที่อยู่ในช่วงไตรมาสแรก การกระจายของอายุครรภ์มารดาแสดงดัง รูปที่ 2



รูปที่ 2 การกระจายของอายุครรภ์มารดา

จากผลการตรวจ NIPT พบว่าสัดส่วนปริมาณดีเอ็นเอของลูกที่อยู่ในเลือดมารดา (Fetal fraction: FF) มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 14.96% และตัวอย่างพลาสมาทั้ง 27 ตัวอย่าง มีค่า fetal fraction อยู่ระหว่าง 3-29% ซึ่งโดยทั่วไปเกณฑ์ขั้นต่ำของ FF หรือ minimum FF threshold จะมีค่าอยู่ที่ประมาณ 2-4% [12] ดังนั้นตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ จึงมีปริมาณดีเอ็นเอของลูกที่อยู่ในเลือดมารดาเพียงพอ สำหรับการวิเคราะห์ผล NIPT การกระจายของปริมาณดีเอ็นเอของลูกที่อยู่ในเลือดมารดา แสดงดัง รูปที่ 3



รูปที่ 3 การกระจายของปริมาณดีเอ็นเอของลูกที่อยู่ในเลือดมารดา

ส่วนรายละเอียดลักษณะต่างๆ ของกลุ่มการทดสอบ (Demographic data) เกี่ยวกับ อายุของมารดาขณะตั้งครรภ์ อายุครรภ์ของมารดา (ณ วันที่เจาะเลือดเพื่อตรวจ NIPT) และ สัดส่วนปริมาณดีเอ็นเอของลูกที่อยู่ในเลือดมารดา (%FF) แสดงดัง ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดลักษณะของกลุ่มการทดสอบ

Characteristic	Twins N = 27
Maternal age (years) Mean $\pm$ SD Median (range) < 35 ≥ 35	34.11 $\pm$ 3.89 34 (28-47) 17 (63%) 10 (37%)
Gestational age (weeks) Mean $\pm$ SD Median (range) 10-14 (1 st trimester) 15-28 (2 nd trimester)	12.15 $\pm$ 1.75 12 (10-17) 24 (89%) 3 (11%)
% Fetal fraction Mean $\pm$ SD Median (range)	14.96 $\pm$ 6.49 15 (3-29)

ผลการตรวจ NIPT พบตัวอย่างพลาสมาที่มีความเสี่ยงสูง 3 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย ความเสี่ยงสูงที่จะพบ Trisomy 21 จำนวน 2 ตัวอย่าง และความเสี่ยงสูงที่จะพบ Trisomy 18 จำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างพลาสมาที่ผลการตรวจ NIPT มีความเสี่ยงสูงนี้ได้รับการตรวจยืนยันผลโดยการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดจากน้ำคร่ำ โดยรายละเอียดทางคลินิก (Clinical details) ของผู้ได้รับผลการตรวจ NIPT มีความเสี่ยงสูง แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายละเอียดทางคลินิกของหญิงตั้งครรภ์แฝดสองที่ได้รับผลการตรวจ NIPT มีความเสี่ยงสูง

Case	NIPT result	Karyotyping	Maternal age (years)	Gestational age (weeks)	%FF
1	T21 High risk	47,XX,+21 46,XX	33	10	9
2	T21 High risk	47,XX,+21 46,XX	39	12	25
3	T18 High risk	47,XY,+18 46,XX	31	12	21

ส่วนตัวอย่างพลาสมาที่ได้รับผลการตรวจ NIPT มีความเสี่ยงต่ำ มีจำนวนทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย 8 ตัวอย่าง ที่ได้รับการติดตามผลจากแพทย์

ผู้ดูแลการตั้งครรภ์ ว่าทารกแรกคลอดมีความปกติ และ 16 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถติดตามผลได้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากไม่ได้รับการติดต่อจากแพทย์ที่ดูแลการตั้งครรภ์เกี่ยวกับผลที่ไม่สอดคล้องกัน ระหว่างผลการตรวจ NIPT กับผลอัลตราซาวด์หรือผลการคลอดของทารก จึงสันนิษฐานว่าผลการตรวจ NIPT ทั้ง 16 ตัวอย่างนี้ เป็นผลลบจริง (True negative) สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพของ NIPT พบว่า วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะของการคัดกรองความผิดปกติชนิด Trisomy21 และ Trisomy18 อยู่ที่มากกว่า 99.9% ในหญิงตั้งครรภ์แฝดสอง และไม่พบผลบวกложหรือผลลบложในการศึกษา

4. สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การตรวจคัดกรองความผิดปกติของโครโมโซมทารกชนิด Trisomy 21 และ Trisomy 18 ด้วย NIPT ในหญิงตั้งครรภ์แฝดสองก่อนคลอด โดยการใช้เทคโนโลยีการอ่านลำดับเบสที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะของการทดสอบสูง แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ยังคงมีข้อจำกัดเกี่ยวกับผลลัพธ์ทางคลินิก (Clinical outcomes) ที่ไม่สมบูรณ์ และกลุ่มตัวอย่างยังมีขนาดเล็ก ดังนั้น เพื่อการประเมินประสิทธิภาพของ NIPT ให้มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น การศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและการมีผลลัพธ์ทางคลินิกที่สมบูรณ์ จึงมีความสำคัญต่อการศึกษาในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณบริษัท เน็ก เจนเนอร์เรชั่น จีโนมิกส์ จำกัด และ บริษัท เซฟ เฟอร์ทิลิตี้ เซ็นเตอร์ จำกัด ที่ให้การสนับสนุนในการเขียนบทความวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Polipalli SK, Karra VK, Jindal A, Puppala M, Singh P, Rawat K, and Kapoor S. (2016). Cytogenetic Analysis for Suspected Chromosomal Abnormalities; A Five Years Experience. *J Clin Diagn Res.* 10(9), GC01–GC05.
- [2] Zhang R, Chen X, Wang D, Chen X, Wang C, Zhang Y, Xu M, and Yu J. (2019). Prevalence of chromosomal abnormalities identified by copy number variation sequencing in high-risk pregnancies, spontaneous abortions, and suspected genetic disorders. *J Int Med Res.* 47(3), 1169–1178.
- [3] Parizot E, Dard R, Janel N, and Vialard F. (2019). Down syndrome and infertility: what support should we provide? *J Assist Reprod Genet.* 36(6), 1063–1067.
- [4] Sheppard O, Wiseman FK, Ruparelia A, Tybulewicz VLJ, and Fisher EMC. (2012). Mouse Models of Aneuploidy. *The Scientific World Journal.* 2012, 214078.
- [5] Dey M, Sharma S, and Aggarwal S. (2013). Prenatal Screening Methods for Aneuploidies. *N Am J Med Sci.* 5(3), 182–190.
- [6] Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, and D’Antonio F. (2015). Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 45(1), 16–26.
- [7] Carlson LM and Vora NL. (2017). Prenatal diagnosis: Screening and diagnostic tools. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 44(2), 245–56.
- [8] Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, and Nicolaides KH. (2015). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: Updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 45(3), 249–66.
- [9] Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. (2004). Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 50, 88–92.
- [10] Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S. (1996). Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet.* 59(1), 176–184.
- [11] Kim YJ, Lee JE, Kim SH, Shim SS, Cha DH. (2013). Maternal age-specific rates of fetal chromosomal abnormalities in Korean pregnant women of advanced maternal age. *Obstet Gynecol Sci.* 56(3), 160–166.
- [12] Hui L, Bianchi DW. (2020). Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know. *Prenat Diagn.* Jan, 40(2), 155–163.