

PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN ADN FETAL LIBRE EN SANGRE MATERNA



AUTORÍA:

Comisión de Seguimiento del Programa de Detección Prenatal de Anomalías Cromosómicas

Mar Sánchez Movellán. Dirección General de Salud Pública

Clara Esparza del Valle. Análisis Clínicos. HUMV

Juan José Montero Fanjul. Obstetricia y Ginecología. HUMV

Begoña Loidi Fernandez-Troconiz. Citogenética. HUMV

Marta Borge Martínez. Ginecología y Obstetricia. Hospital Sierrallana.

Isabel Calvo González. Ginecología y Obstetricia. Hospital de Laredo

Asunción Azofra Olave. Matrona de Atención Primaria

Aprobado por la Comisión de Seguimiento: 2016

INDICE

	Pagina
Justificación	4
Objetivos	5
Indicaciones para estudio de ADNfe en sangre materna	6
Asesoramiento pretest (Información y oferta de estudio de ADNfe en sangre materna)	6
Obtención de la muestra para estudio de ADNfe en sangre materna	7
Procedimiento de estudio de ADNfe en sangre materna	8
Asesoramiento postest (Información y actuación ante el resultado del estudio de ADNfe en sangre materna)	9
Información de la prueba diagnóstica de confirmación	9
Indicadores de evaluación	10
Bibliografía de referencia	11

Justificación

Hasta la actualidad, el diagnóstico de una anomalía cromosómica en el feto conlleva la obtención de células fetales mediante pruebas invasivas (amniocentesis) para la determinación del cariotipo. Estas pruebas invasivas tienen efectos adversos, el más importante de ellos la pérdida fetal postpunción.

Por otro lado, el progresivo incremento de la edad de las gestantes al que estamos asistiendo en los últimos años, resultado de los cambios sociales (en Cantabria en 2015, el 41% de las embarazadas tienen una edad ≥ 35 años) lleva asociado un mayor riesgo de aneuploidías. Estas mujeres tienen que hacer frente a la decisión de someterse a pruebas invasivas que añaden riesgo a su gestación.

El *Programa de Detección Prenatal de Anomalías Cromosómicas* (PDPAC) puesto en marcha en el Servicio Cántabro de Salud (SCS) en 2011, ha conseguido mejorar la detección de dichas anomalías, reduciendo paralelamente y de manera significativa el número de amniocentesis. Sin embargo, según datos de 2014, todavía hay un 3% de falsos positivos en el cribado que generan la realización de pruebas invasivas innecesarias con sus consecuentes efectos adversos.

Por todo ello, y a la luz de las evidencias actuales, se hace necesario introducir nuevas estrategias para seleccionar mejor las gestantes de alto riesgo de aneuploidía fetal a las que se ofrece una amniocentesis.

En la actualidad conocemos que existen fragmentos de ADN fetal extracelular (ADNfe) en la sangre materna de procedencia placentaria, que se pueden analizar para determinar el número de copias de determinados cromosomas fetales (21, 18, 13, X e Y). Según la literatura, es posible aislar ADNfe en sangre materna a partir de la 5ª semana de embarazo. La fuente principal de ADNfe libre en sangre materna son las células apoptóticas placentarias, aunque existe cierta evidencia de que la apoptosis de eritroblastos fetales también puede generar ADNfe que podría cruzar la placenta y entrar en la circulación materna.

Las técnicas de detección de ADNfe en sangre materna permiten además de la identificación de aneuploidías, la determinación del sexo fetal, el factor RhD fetal y algunos casos de enfermedades monogénicas. Para su realización se requiere únicamente la extracción de sangre materna periférica y su procesamiento mediante amplificación e identificación del ADNfe, a través de diferentes técnicas de genética molecular.

Este estudio es ya una realidad en nuestro medio y según las últimas evidencias, el análisis de ADNfe en sangre materna tiene una alta sensibilidad y especificidad para establecer el riesgo de las principales trisomías fetales. Un reciente metaanálisis recoge que la tasa de detección para la trisomía 21 es actualmente de un 99,0%, con una tasa de falsos positivos del 0,08%, la detección para las trisomías 18 y 13, es del 96,8 y el 92,1%, con unos falsos

positivos del 0,15 y el 0,20%, respectivamente. Para la monosomía X, la tasa de detección es del 88,6% y para las otras aneuploidías sexuales es de un 93,8%, con unos falsos positivos del 0,24%. Así, si se determinan las aneuploidías de estos 5 cromosomas, la tasa total de falsos positivos es de un 0,67%.

Los datos publicados indican que como método de cribado, el estudio del ADNfe tendría una tasa de detección superior y una tasa de falsos positivos inferior al Cribado Combinado de primer trimestre. Sin embargo uno de los aspectos más limitantes y controvertidos en la actualidad es el del elevado coste, así como determinar qué población puede beneficiarse de la prueba de forma que sea coste-efectiva, ya que la mayoría de los estudios publicados se han realizado en población de alto riesgo de trisomía 21, 18 y 13 y es en esta población donde está bien establecida la indicación de este estudio en sustitución del procedimiento invasivo. Por tanto, se considera un método de cribado no invasivo avanzado de aneuploidía, que requiere confirmación mediante una prueba invasiva en caso de resultado positivo.

Por otro lado, dada la prontitud en la que se puede realizar el estudio en el embarazo (a partir de las 10 semanas) y la rapidez de la obtención del resultado (7-15 días), permite adelantar el diagnóstico de una posible aneuploidía.

Conocemos además que esta prueba se está realizando sin protocolización fuera del SCS, ya que según la memoria 2015 del PDPAC, al menos un 61,36% de las mujeres con gestaciones evolutivas y cribado prenatal de riesgo alto no optaron por la amniocentesis, porque se habían realizado de forma privada un test de ADNfe en sangre materna y este fue negativo.

Por todo ello, el presente Protocolo establece las condiciones para la aplicación clínica de la detección de aneuploidías en sangre materna como estrategia para reducir la práctica de pruebas invasivas innecesarias y sus efectos adversos, en el contexto del PDPAC.

Con ello, se contribuye también a la reducción de desigualdades en salud, ya que hasta la actualidad solo podían acceder a este tipo de estudios las mujeres con mayor poder adquisitivo.

Objetivos

Objetivo general:

- Reducir las técnicas invasivas y sus efectos adversos en el PDPAC, ofreciendo un estudio de ADNfe en sangre materna a las gestantes de alto riesgo que cumplan los criterios establecidos.

Objetivo específico:

- Reducir el número de amniocentesis.
- Reducir el número de pérdida de fetos sanos postpunción.

Indicaciones para estudio de ADNfe en sangre materna

Con la evidencia científica actual, el estudio para la detección de aneuploidías mediante el análisis del ADNfe en sangre materna está indicado en la población de alto riesgo de trisomía 21, 18 y 13; por lo tanto, la prueba se ofrecerá en las siguientes circunstancias:

- 1º. Gestante con cribado combinado del primer trimestre de riesgo alto ($\geq 1/270$), siempre que:
 - Sea una gestación única (En la gestación gemelar, dada la menor sensibilidad de la prueba y los distintos tipos de gestación, se individualizará cada caso).
 - No exista malformación mayor ecográfica fetal.
 - La translucencia nucal esté en el rango de valores normales.
- 2º. Gestante con embarazo previo con aneuploidías en los cromosomas 21,18 o 13.
- 3º. Gestante y/o pareja portadora de anomalía cromosómica equilibrada. En este caso, deberá individualizarse el asesoramiento según la anomalía.

No se ofrecerá el estudio con DNAfe a las mujeres que rechacen el cribado combinado del primer trimestre.

En las gestantes que acudan para el control de embarazo y hayan superado las 14 semanas, se seguirá actuando de acuerdo a lo establecido en el documento marco del PDPAC.

Limitaciones del test:

- Las siguientes situaciones no permiten obtener un resultado fiable en el test: madre portadora de alguna de las trisomías analizadas o mosaicismo fetal de las trisomías analizadas.
- Si la embarazada que se somete al test ha recibido recientemente una transfusión sanguínea alogénica, trasplante, terapia inmunitaria o terapia de células madre, es posible que el resultado sea falso debido a la interferencia por ADN exógeno.
- En el caso de embarazos gemelares no es posible ajustar un riesgo individualizado y la tasa de detección es menor que en embarazos únicos.

Asesoramiento pretest (Información y oferta de estudio de ADNfe en sangre materna)

Cuando se cumpla cualquiera de las indicaciones contempladas en el apartado anterior, el ecografista responsable del cribado prenatal (1ª y 2ª indicación) o el profesional responsable del control del embarazo (3ª indicación) remitirá a la gestante a la Unidad de Genética del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV).

Desde la Unidad de Genética, se ofrecerá a la gestante como primera opción un estudio de ADNfe en sangre materna y se le facilitará una información adecuada sobre el test. Como cualquier test genético, requiere un asesoramiento genético previo, para asegurarse de que la gestante y pareja hayan recibido y entendido la información adecuadamente.

Información básica que deben conocer la gestante y su pareja:

- Es un test de cribado prenatal que se realiza a partir del análisis del ADNfe presente en la sangre materna.
- Este test tiene el propósito de establecer con una alta probabilidad (99%) si el feto presenta las trisomías 21, 18 ó 13.
- Se trata de una prueba de cribado, no diagnóstica, por lo que ante un riesgo alto se debe realizar una prueba invasiva para confirmar el diagnóstico.
- No tiene riesgos para el feto y para su realización solo es necesario una extracción de 10 ml de sangre materna.
- En un pequeño porcentaje de casos (1-7%) no es posible obtener suficiente ADNfe en sangre materna para determinar el riesgo (sobre todo en obesas), por lo que puede ser necesario una nueva extracción de sangre para repetir la prueba y esto implica un incremento en el tiempo de respuesta.
- Si el resultado del test es negativo (riesgo bajo), no se ofrecerá ninguna prueba invasiva diagnóstica.

Dada la consideración del test de ADNfe como prueba de cribado, se le informará a la gestante de la posibilidad de realizar una amniocentesis para obtención de líquido amniótico en el que realizar una técnica diagnóstica definitiva en lugar de dicho test.

Si tras la información de ambas posibilidades la gestante acepta el estudio de ADNfe en sangre materna:

- Se entregará el documento de Consentimiento Informado que deberá ser firmado por la gestante y por el profesional que realiza el asesoramiento.
- Se entregará el documento para solicitar la analítica, cuya extracción se realizará en el HUMV.

Si por el contrario se opta por la realización de una amniocentesis, se procederá de manera habitual

Obtención de la muestra para estudio de ADNfe en sangre materna

La extracción de sangre se realizará en el HUMV en un tubo de extracción de sangre de vacío, con EDTA como anticoagulante, especial para la

preservación del ADN, de acuerdo al Kit de extracción suministrado por el laboratorio que va a realizar el estudio.

El envío de la muestra al laboratorio de referencia se realizará siguiendo las instrucciones del interior del Kit de extracción.

La recogida de la muestra se tramitará previo aviso desde el centro Hospitalario. El envío de la muestra debe hacerse junto con el documento de Consentimiento Informado.

Procedimiento de estudio de ADNfe en sangre materna

Este estudio precisa de una alta tecnología y de un laboratorio de genética especializado y validado, con profesionales con amplia experiencia en la realización de este tipo de estudios. Por todo ello, en el momento actual y dado que el número de test que se estima que se generaran al año es muy reducido, se considera más coste-efectivo realizar este test a un laboratorio externo especializado en este tipo de estudios genéticos.

Prestaciones del laboratorio:

- Control total de la trazabilidad de todo el proceso desde la extracción hasta la emisión del informe clínico.
- Seguimiento informático de las muestras desde el HUMV a través de un software de laboratorio, para garantizar la información del proceso de análisis en cada momento y en tiempo real.
- Tiempo de respuesta óptimo para la emisión del informe: ≤ 5 días laborables desde la recepción de la muestra.
- Asesoramiento por parte del personal facultativo del laboratorio, en todos los aspectos relacionados con informes y resultados.

Actuaciones del laboratorio:

1- Fase de cribado

Fase Preanalítica:

- Suministro de las cajas de transporte y conservación de muestras para una óptima recogida y envío de las muestras al laboratorio.
- Suministro del tubo de extracción de sangre de vacío, con EDTA como anticoagulante, especial para la preservación del ADN.
- Recogida, transporte y recepción de las muestras.

Fase Analítica:

- Extracción y purificación de ADN.
- Preparación de librerías.
- Secuenciación.
- Análisis bioinformático.

Fase Postanalítica:

- Consolidación de resultados y emisión del informe (≤ 5 días laborables)

desde la recepción de la muestra). Posicionamiento del informe en el aplicativo informático para su visualización desde Genética del HUMV

2- Fase de confirmación diagnóstica

Cuando se informe de un alto riesgo, el laboratorio realizará, sin cargo alguno, un test diagnóstico en líquido amniótico obtenido mediante amniocentesis y remitido desde el HUMV.

Asesoramiento posttest (Información y actuación ante el resultado del estudio de ADNfe en sangre materna)

El resultado del estudio del ADNfe será remitido a la Unidad de Genética, pudiéndose obtener los siguientes resultados:

- Test negativo (Riesgo bajo): Cuando se detecta riesgo bajo para las alteraciones genómicas incluidas en el test, y por tanto no se ofrecerá test diagnóstico invasivo.
- Test “sin resultado”: Esta posibilidad ocurre entre el 1 y el 7%, según el método. Este grupo de gestaciones tienen un alto riesgo de aneuploidía (4%). Por tanto, cuando el test “sin resultado” haya sido debido a una baja fracción fetal, y dado que en nuestro programa esta extracción se ha realizado después de las 12 semanas, se valorará la repetición del test o la realización de una amniocentesis.
- Test positivo (Riesgo alto): Cuando se detecta riesgo alto para alguna de las alteraciones genéticas incluidas en el test. El resultado de riesgo alto debe ser confirmado sobre una muestra de líquido amniótico mediante técnicas de citogenética convencional y/o molecular, por lo que se ofrecerá la realización de una amniocentesis siguiendo el procedimiento habitual.

Información de la prueba diagnóstica de confirmación

El resultado del estudio del líquido amniótico será remitido desde el laboratorio de referencia a la Unidad de Genética. Esta será la encargada de informar a la gestante de su resultado:

- Si el resultado es normal, se continuará con el circuito establecido de control del embarazo.
- Si el resultado es anómalo, se informará del significado de dicho resultado y de las opciones clínicas posibles, incluida la interrupción voluntaria del embarazo.

Indicadores de evaluación

- % Gestantes que cumplen criterios para ofrecer estudio de ADNfe en sangre materna sobre el total de gestantes con riesgo alto:

$$\frac{\text{Nº gestantes que cumplen criterios para estudio ADNfe}}{\text{Nº gestantes con riesgo alto}} \times 100$$

- % Gestantes que cumplen criterios y que acepta la realización del estudio ADNfe en sangre materna:

$$\frac{\text{Nº gestantes que cumplen criterios y acepta el estudio de ADNfe}}{\text{Nº gestantes riesgo alto que cumplen criterios y que se ofrece estudio ADNfe}} \times 100$$

- % Test de ADNfe “sin resultado” en un primer test:

$$\frac{\text{Nº gestantes con estudio de ADNfe sin resultado en un primer test}}{\text{Nº gestantes que cumplen criterios y acepta el estudio de ADNfe}} \times 100$$

- % Test de ADNfe positivo (Riesgo alto):

$$\frac{\text{Nº gestantes con estudio de ADNfe positivo (Riesgo alto)}}{\text{Nº gestantes que cumplen criterios y acepta el estudio de ADNfe}} \times 100$$

- % Gestantes con Test ADNfe positivo (Riesgo alto) que aceptan realizarse la amniocentesis:

$$\frac{\text{Nº gestantes que se realizan amniocentesis}}{\text{Nº gestantes riesgo alto con test de ADNfe positivo (Riesgo alto)}} \times 100$$

- % Gestantes con Test DNAfe positivo (Riesgo alto) y amniocentesis en las que se confirma la anomalía cromosómica:

$$\frac{\text{Nº gestantes en la que se confirma el diagnostico en liquido amniótico}}{\text{Nº gestantes riesgo alto con estudio de ADNfe positivo (Riesgo alto)}} \times 100$$

BIBIOGRAFIA DE REFERENCIA

- **American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee on Genetics. Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee Opinion.** Cell-free DNA Screening for Fetal Aneuploidy. Number 640, September 2015
- **American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee on Genetics. Committee Opinion No. 545:** Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2012;120:1532-4. t3. Gregg AR, Gross SJ, Best RG, Monaghan KG, Bajaj K, Skotko BG, et al. ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, *Genet Med.* 2013;15:395-8
- **American College of Obstetricians and Gynecologists.** Screening for fetal aneuploidy. *Practice Bulletin.* Number 163, may 2016
- **Baños Álvarez E, Llanos Méndez A.** Detección de ADN fetal libre en sangre materna para diagnóstico prenatal de aneuploidías. Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía. 2012
- **Benn PA, Borrell A, Crossley J, Cuckle H, Dugoff L, Gross S, et al.** Prenatal detection of Down syndrome using massively parallel sequencing (MPS): A rapid response position statement from a committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, 24 October 2011. Disponible en: http://ispdhome.org/public/news12011/ISPD_RRfIPS_24Oct11
- **Borrell A, Armengol L, Casals E, Cirigliano V, Del Campo M, De la Chica R, Figueres F, Plaja A.** Recomendaciones para la aplicación clínica de la detección de aneuploidias en ADN fetal libre en sangre materna. Documento de Consenso. *Prog Obstet Ginecol.* 2015;58(4):199-201
- **Dondorp W, De Wert G, Bombard Y, Diana Bianchi DW, Bergmann C, Borry P, Chitty LS, Fellmann F, Forzano F, Hall A, Henneman L, Howard HC, Lucassen A, Ormond K, Peterlin B, Radojkovic D, Rogowski W, Soller M, Tibben A, Tranebjærg L, Van El CG, Cornel MC.** Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *European Journal of Human Genetics* (2015) 23, 1438–1450; DOI:10.1038/ejhg.2015.57; published online 18 March 2015
- **Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins I, Quake SR.** Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:16266-71.
- **Gil MM, Akolekar R, Quezada MS, Bregant B, Nicolaides KH.** AIHJlysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: Meta-analysis. *Fetal Diagn Ther.* 2014;35:156-73.
- **Gil MM, Giunta G, Macalli EA, Poon LC, Nicolaides KH.** UK NHS pilot study on cell-free DNA testing in screening for fetal trisomies: factors affecting uptake. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):67-73. DOI: 10.1002/uog.14683. Epub 2014 Nov 24.
- **Gil MM, Revello R, Poon LC, Akolekar R, Nicolaides KH.** Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test. *Ultrasound Obstet Gynecol* Article first published online: 26 OCT 2015. DOI: 10.1002/uog.15783
- **Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, Klugman S, Watson MS.** Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016 Oct;18(10):1056-65. doi: 10.1038/gim.2016.97. Epub 2016 Jul 28.
- **Lo YM, Chiu RW.** Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem.* 2008;54:461-6.
- **Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Departamento de Salud del Gobierno Vasco.** Cribado prenatal para la detección del Síndrome de Down mediante el análisis de ADN fetal en sangre materna. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. 2016. Disponible en: www.euskadi.eus/publicaciones
- **Pérez-Pedregosa J, Paredes Ros B, Calles Hernández LC, Izquierdo López L, Cabrillo Rodríguez E, Hurtado Caballero IV, Cirigliano V.** Cribado prenatal no invasivo de aneuploidias mediante análisis de ADN fetal en sangre materna. *Prog Obstet Ginecol.* 2015;58(3):113-117
- **Quezada MS, Gil MM, Francisco C, Orósz G, Nicolaides KH.** Screening for trisomies 21,18 and 13 cell-free DNA analysis of maternal blood at 10-11 weeks' gestation and the combined test at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45:36-41.