

Utilidad de QF-PCR en el diagnóstico prenatal de aneuploidías fetales

Utility of QF-PCR in the
prenatal diagnosis for fetal
aneuploidies.

Executive summary

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN



MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD



RED ESPAÑOLA DE AGENCIAS DE EVALUACIÓN
DE TECNOLOGÍAS Y PRÁCTICAS DEL SISTEMA NACIONAL DE SALUD



JUNTA DE ANDALUCÍA
CONSEJERÍA DE SALUD

Utilidad de QF-PCR en el diagnóstico prenatal de aneuploidías fetales.

Utility of QF-PCR in the
prenatal diagnosis for fetal
aneuploidies.

Executive summary

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA

Sabalet-Moya, Trinidad

Utilidad de QF-PCR en el diagnóstico prenatal de aneuploidías fetales. Trinidad Sabalet Moya, Ana María Carlos Gil, Antonio Romero Tabares, Carmen Beltrán Calvo. — Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía, 2015.

81 p; 24 cm. (Colección: Informes, estudios e investigación. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Serie: Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias)

ISBN: 978-84-15600-64-4

1. Aneuploidía / diagnóstico 2. Diagnóstico prenatal / métodos 3. Reacción en cadena de la polimerasa I. Carlos Gil, Ana María II. Romero Tabares, Antonio III. Beltrán Calvo, Carmen IV. Andalucía. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias V. España. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad VI. España. Ministerio de Economía y Competitividad

Autores: Trinidad Sabalet-Moya, Ana María Carlos-Gil, Antonio Romero-Tabares y Carmen Beltrán-Calvo.

Este documento se ha realizado al amparo del convenio de colaboración suscrito por el Instituto de Salud Carlos III, organismo autónomo del Ministerio de Economía y Competitividad, y la Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales de la Junta de Andalucía, en el marco del desarrollo de actividades de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del SNS, financiadas por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad

**Edita: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía
Consejería de Salud
JUNTA DE ANDALUCÍA
Avda. de la Innovación, s/n. Edificio ARENA 1, s/n. Planta baja.
41020 Sevilla
España – Spain**

ISBN: 978-84-15600-64-0

NIPO: 680-15-099-9

Este documento puede ser reproducido en todo o en parte, por cualquier medio, siempre que se cite explícitamente su procedencia

Utilidad de QF-PCR en el diagnóstico prenatal de aneuploidías fetales.

Utility of QF-PCR in prenatal
diagnosis of fetal aneuploidies.
Executive summary

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA

Conflicto de interés

Los autores y revisores declaran que no tienen intereses que puedan competir con el interés primario y los objetivos de este informe e influir en su juicio profesional al respecto.

Implicaciones éticas

No se consideraron relevantes los aspectos éticos y legales relacionados con el informe.

Contribución de los autores

Trinidad Sabalette Moya. *Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA).* Planteamiento del proyecto mediante la elaboración de la pregunta de investigación, desarrollo del proyecto realizando la selección de artículos, extracción y síntesis de datos y elaboración del informe.

Ana María Carlos Gil. *Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA).* Coordinación científica, planteamiento del proyecto mediante la elaboración de la pregunta de investigación, desarrollo del proyecto participando en la selección de artículos, extracción y síntesis de datos y elaboración de informe. Revisión del informe.

Antonio Romero Tabares. *Doctor en Medicina, Jefe de Servicio de Documentación e Información, Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA).* Desarrollo del proyecto mediante la elaboración de búsquedas bibliográficas y localización de documentación. Revisión del informe.

Carmen Beltrán Calvo. *Jefa de Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA).* Coordinación y desarrollo del proyecto mediante el planteamiento y la planificación del mismo, participando en el desarrollo de la pregunta de investigación y conformación del equipo evaluador. Revisión del informe.

Agradecimientos

La Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía y los autores agradecen a los revisores expertos, Dra. María Luisa Hortas Nieto, Laboratorios de Análisis Clínicos, Hospital Costa del Sol, Dr. Antonio Martínez Peinado, Unidad de Gestión Clínica Laboratorio Clínico, Hospital Reina Sofía, Dra. Susana Pedrinaci Rodríguez, Unidad de Gestión Clínica Laboratorio Clínico, Hospital Virgen de las Nieves y Dr. Javier Sánchez García, Unidad de Gestión Clínica Genética, Reproducción Asistida y Medicina Fetal, Hospital Virgen del Rocío, por el esfuerzo realizado, su dedicación y sus aportaciones.

Los contenidos del informe son responsabilidad de los autores, procediendo al eximente habitual en el caso de los asesores y revisores.

Índice

| | |
|----------------------------------|----|
| Índice de tablas y figuras | 13 |
| Abreviaturas y acrónimos..... | 15 |
| Glosario | 17 |
| Resumen ejecutivo..... | 19 |
| Executive summary | 25 |
| Introducción | 27 |
| Justificación y Objetivos | 37 |
| Material y Métodos..... | 39 |
| Resultados | 43 |
| Discusión..... | 61 |
| Conclusiones..... | 65 |
| Recomendaciones | 67 |
| Referencias | 69 |
| Anexos | 75 |
| Anexo 1 | 75 |
| Anexo 2 | 80 |
| Anexo 3 | 81 |

Índice de tablas y figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Diagrama de estudios seleccionados | 44 |
| Tabla 1. Descripción de las características de los estudios de precisión de la QF-PCR | 46 |
| Tabla 2. Resultados de QF-PCR en estudio de Speevak 2011 | 52 |
| Tabla 3. Resultados de QF-PCR en estudio de Christopoulou 2009 | 54 |
| Tabla 4. Resultados de QF-PCR en estudio de Armengol 2012..... | 55 |
| Tabla 5. Resultados de QF-PCR en estudio de Hills 2010. | 59 |
| Tabla 6. Parámetros de validez diagnóstica de los estudios seleccionados | 60 |

Abreviaturas y acrónimos

ACC: *Association for Clinical Cytogenetics (UK).*

AFP: Alfa-fetoproteína.

AUnETS: Agencias y Unidades de Evaluación de tecnologías sanitarias.

βhCG: Fracción libre de la subunidad beta de la gonadotropina humana.

CADTH: *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health.*

CMGS: *Clinical Molecular Genetics Society.*

CRD: *Centre for Reviews and dissemination.*

FISH: *Fluorescence in situ hybridization.*

IC: intervalo de confianza

INAHTA: *International Network of Agencies for Health Technology Assessment.*

LA: Líquido amniótico.

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (amplificación de sondas dependientes de ligación múltiple).

NHS: *National Health System.*

NICE: *National Institute for Health and Care Excellence.*

PAPP-A: Proteína plasmática A asociada al embarazo.

PCP: Programa de cribado prenatal.

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa).

QF-PCR: *Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa fluorescente cuantitativa).

STR: *Short Tandem Repeat* (repeticiones en tándem cortas).

T13: Trisomía 13.

T18: Trisomía 18.

T21: Trisomía 21.

TN: Translucencia nucal.

Glosario

Amniocentesis: procedimiento médico utilizado en el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas e infecciones fetales, en la que una pequeña cantidad de líquido amniótico que contiene células fetales es extraída del amnios o saco amniótico que rodea al feto en desarrollo.

Aneuploidía: número anómalo de cromosomas. El cariotipo humano normal tiene 46 cromosomas, 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales.

Biopsia de vellosidad corial: extracción de una pequeña cantidad de tejido de las vellosidades coriales de la placenta. La aguja puede ser introducida a través del cuello uterino (transcervical), o a través del abdomen (transabdominal).

Cariotipo: constitución cromosómica de un individuo. El término también se refiere a la ordenación de los cromosomas en metafase por pares homólogos según tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas específico.

Fenotipo: conjunto de características observables de un organismo o grupo, fruto de la interacción entre su genotipo y el ambiente en que éste se expresa.

FISH: hibridación de una sonda (secuencia) de ADN marcada con fluorescencia sobre células en interfase o preparaciones cromosómicas.

Inhibina A: hormona glicoproteica dimérica producida durante el embarazo por el cuerpo lúteo, las deciduas y la placenta.

Mosaicismo: presencia, en un mismo individuo, de dos o más poblaciones celulares que contienen diferentes dotaciones genéticas.

Parálogo: dos o más genes de una especie con una secuencia de ADN similar y que codifican para proteínas con funciones similares pero no idénticas. Los genes parálogos probablemente se han originado de un gen ancestral común.

Prueba combinada: determinación serológica de proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) y fracción β libre de la hormona coriónica (β hCG) junto a medición ecográfica de la translucencia nucal.

Prueba cuádruple: determinación serológica de AFP, β -hCG, uE3 e inhibina.

Translocación: anomalía cromosómica estructural que consiste en un intercambio de material cromosómico entre dos cromosomas. Si no hay pérdida o ganancia de material cromosómico se denomina equilibrada. Si hay pérdida o ganancia de material cromosómico se dice que está en desequilibrio.

Translucencia nucal: aspecto ecográfico de una acumulación de líquido debajo de la piel, detrás del cuello del feto, en el primer trimestre del embarazo.

uE3 (estriol no conjugado): marcador bioquímico serológico del segundo trimestre de embarazo.

Resumen ejecutivo

Título: Utilidad de QF-PCR en el diagnóstico prenatal de aneuploidías fetales.

Autores: Trinidad Sabaleta-Moya, Ana María Carlos-Gil, Antonio Romero-Tabares y Carmen Beltrán-Calvo.

Introducción

Las cromosopatías fetales son un grupo de enfermedades congénitas que representan un importante problema de salud, por ser causa de mortalidad perinatal y discapacidad infantil. Su estudio constituye la indicación más frecuente de diagnóstico prenatal mediante amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales.

El diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas consiste en el análisis de las células fetales presentes en el líquido amniótico o en vellosidades coriales. El cariotipo mediante bandas G es una técnica que lleva aplicándose desde los años 70 en el diagnóstico de anomalías cromosómicas fetales. En la actualidad, además del análisis citogenético convencional se utilizan otras técnicas basadas en la citogenética y en la genética molecular.

QF-PCR es una de estas técnicas y está basada en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en la amplificación de secuencias genómicas repetitivas (más concretamente, de STR altamente polimórficos, y, por tanto, muy informativos) localizadas en los cromosomas de interés. Se analizan el número de alelos por cromosoma y la intensidad fluorescente relativa, permitiendo conocer el número de cromosomas presentes por célula.

Objetivo

Evaluación de la utilidad diagnóstica en términos de precisión y seguridad de QF-PCR en el diagnóstico prenatal de aneuploidías fetales en muestras de líquido amniótico o vellosidades coriales en mujeres embarazadas con alto riesgo de anomalías cromosómicas en el cribado prenatal.

Material y métodos

Revisión sistemática de la literatura sobre la precisión y seguridad de diagnóstico prenatal con QF-PCR en muestras procedentes de mujeres embarazadas con riesgo de anomalías cromosómicas, obtenidas mediante técnicas invasivas (líquido amniótico o vellosidades coriales).

Se realizó una búsqueda de documentos hasta septiembre de 2013 en las bases de datos referenciales MEDLINE (Ovid), EMBASE, SCI y PREMEDLINE. Se complementó con consultas a la base de datos de Cochrane Collaboration, CRD, NICE, INAHTA, CADTH y AUnETS.

Tras la extracción de datos, se clasificaron los documentos recuperados en dos grupos, uno de ellos formado por los programas de detección de anomalías cromosómicas y otro grupo constituido por los estudios primarios que evaluaban la precisión.

Resultados

Se seleccionaron 5 estudios para evaluar la precisión y 4 programas de detección de anomalías cromosómicas que incluyeron información sobre la utilización de la técnica QF-PCR.

- En los 5 estudios seleccionados, la detección de anomalías cromosómicas fetales en embarazos de alto riesgo mediante QF-PCR obtuvo una sensibilidad entre 82 % y 100 % y una especificidad entre 99 % y 100 %.
- Con la utilización de QF-PCR como técnica única en el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas, en los 5 estudios se obtuvo una tasa de falsos negativos entre 0 y 18 %. Solo en un estudio se expone un resultado falso positivo e informado como trisomía 13 mediante QF-PCR. La tasa de falsos positivos calculada para este estudio es del 1 %.
- El valor predictivo positivo fue calculado en 3 de los 4 estudios incluidos, obteniéndose unos resultados entre el 99 % y el 100 %. El valor predictivo negativo solo pudo ser calculado en un estudio y su resultado fue del 98 %.
- Entre las anomalías cromosómicas no detectadas mediante QF-PCR, se encontraron anomalías estructurales como translocaciones, deleciones, inversiones, marcadores supernumerarios que no contenían alguno de los marcadores cromosómicos analizados, mosaicismos con presencia de una

línea celular anómala en menos del 15 % de la muestra y otras aneuploidías distintas a las de los cromosomas 13, 18 y 21.

- En los estudios localizados no se incluyeron resultados referidos a la seguridad.

Conclusiones

- La QF-PCR es una técnica menos precisa que el cariotipo y no permite estudiar la dotación cromosómica completa fetal. Frente a los estudios citogenéticos clásicos, presenta ventajas como un menor coste, posibilidad de automatización y rapidez en el diagnóstico, no siendo necesario el cultivo de la muestra. Como desventajas se presentan los fallos de detección de aneuploidías de otros cromosomas diferentes al 13, 18, 21, no detección de pequeños mosaicismos de estos cromosomas y no detección de anomalías estructurales.
- La tasa de falsos negativos de la QF-PCR fue mayor que la detectada en los análisis citogenéticos y se obtuvo principalmente en mosaicismos y anomalías estructurales. Las trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21 fueron las patologías con menor número de falsos negativos, siendo, por tanto, de mayor rentabilidad diagnóstica. Sólo un estudio presentó un resultado falso positivo, debido a mosaicismo confinado en la placenta.
- En los estudios localizados no se describieron resultados referidos a la seguridad. Al ser una técnica invasiva no exenta de riesgo, sería relevante conocer los datos obtenidos sobre posibles eventos adversos relacionados con la recogida de la muestra mediante registro de eventos adversos.
- Se ha localizado una única experiencia en el Reino Unido que recomienda la realización de QF-PCR para el diagnóstico prenatal de síndrome de Down en embarazos con un riesgo superior a 1/150 en el cribado prenatal de síndrome de Down. Para el resto de las indicaciones la técnica diagnóstica elegida es el cariotipo. En otros países, como Suecia y Holanda, se ofrece a las embarazadas la posibilidad de elegir entre cariotipo o QF-PCR.
- En España, en concreto en la Comunidad de Asturias, se ha comenzado a recomendar como técnica única la QF-PCR, aunque señalan la conveniencia de ser prudente y solicitar ambas pruebas

por el momento. Indican que la QF-PCR es admisible para gestaciones con prueba de cribado positiva, pero el cariotipo debe realizarse de forma simultánea si hay antecedentes familiares o personales de anomalías cromosómicas o datos ecográficos positivos.

Executive summary

Title: Utility of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies.

Authors: Trinidad Sabaleta-Moya, Ana María Carlos-Gil, Antonio Romero-Tabares & Carmen Beltrán-Calvo.

Background

Fetal chromosomal abnormalities are congenital diseases that represent a important problem of health. They are main cause of perinatal mortality and childhood disability.

The diagnosis of fetal chromosomal abnormalities consists in the analysis of fetal cells found in the amniotic fluid or chorionic villi. Prenatal chromosomal analyses are used since seventies years. The analysis of fetal cells is performed by conventional cytogenetic analysis, or by techniques based on molecular genetics and cytogenetics.

QF-PCR is a polymerase chain reaction technique (PCR) to analyze specific short tandem repeat (STR) markers for target chromosomes. The number of chromosomal alleles and the fluorescence intensity are analyzed, allowing us to know the number of chromosomes in each cell.

Objective

To assess the utility in terms of accuracy and safety of QF-PCR in prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in high risk pregnancies.

Material and Methods

A systematic review was performed with accuracy and safety of QF-PCR in prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in high risk pregnancies in invasive samples (amniotic fluid or chorionic villi).

A systematic search for documents was conducted in the bibliographic databases MEDLINE (Ovid), EMBASE, Science Citation Index expanded and PREMEDLINE up to September 2013. Specific search for systematic review was performed on the database of Cochrane Collaboration, CRD, INAHTA, NICE, CADTH and AUnETS.

After data extraction, a qualitative synthesis for the accuracy results was performed. The studies were classified en two groups: screening

programmes for fetal chromosomal abnormalities and primary studies that assessed the accuracy.

Results

5 documents were included for extraction of accuracy results. Moreover, 4 screening programmes for fetal chromosomal abnormalities were selected.

- In 5 selected studies, detection of fetal chromosomal abnormalities in high risk pregnancies by QF-PCR had a sensibility between 82 % and 100 % and specificity between 99 % and 100 %.
- By using QF-PCR as a stand-alone test for prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities, in the 5 studies, a false negative rate between 0 and 18 % was obtained.
- Only one study presents a false positive and reported as trisomy 13 by QF-PCR. The false positive rate was 1 % for this study.
- In 4 of the 5 included studies was obtained between 99 % and 100 % positive predictive value. The negative predictive value could only be calculated in a studio and the result was 98 %.
- Among the chromosomal abnormalities not detected by QF-PCR, were found structural abnormalities such as translocations, deletions, inversions, supernumerary markers that do not contained any of the chromosomal markers analyzed, mosaicism with presence of an abnormal cell line in less than 15 % of the sample and different aneuploidies to those involving chromosomes 13, 18 and 21.
- Results related to safety were no found in the included studies.

Conclusions

- The QF-PCR is a technique less accurate than the karyotype and not allowed to study the whole fetal chromosomes. From the classic cytogenetics, QF-PCR offers advantages such as lower cost, possibility of automation and speed in diagnosis, not being necessary culturing the sample. Missed detection of different aneuploidies that involve chromosomes 13, 18, 21, no detection of small mosaicism of these chromosomes and no detection of structural abnormalities are presented as disadvantages. Technical failures are mainly due to maternal contamination.
- The false negative rate of the QF-PCR was higher than that detected in the cytogenetic analysis and was obtained mainly in mosaicism and structural abnormalities. Trisomies of chromosomes 13, 18 and 21 were the diseases with fewer false negative, with higher diagnostic yield. Only one study had a false positive result due to confined placental mosaicism.
- In studies localized no results related to safety were described. Being a risk invasive technique would be relevant to know the data obtained on possible adverse events related with sample collection by record of adverse events.
- It was located a unique experience in the UK recommends performing QF-PCR for prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities in pregnancies at higher risk to 1/150 in prenatal screening for Down syndrome. For all other indications the diagnostic technique of choice is the karyotype. In other countries, such as Sweden and Holland, the choice between QF-PCR and karyotyping is offered to pregnant.
- In Spain, specifically in the Community of Asturias, has started recommending QF-PCR as a stand-alone test although they argue the convenience of being prudent and request both tests yet. They indicate that QF-PCR is eligible for pregnancies with positive screening test, but the karyotype must be performed simultaneously if there is a family or personal history of chromosomal abnormalities or positive echographic data record.

Introducción

El cribado prenatal de cromosopatías fetales tiene como objetivo fundamental estratificar el riesgo de padecer anomalías cromosómicas durante el embarazo.

En los centros del Sistema Nacional de Salud se realiza el cribado prenatal de tipo combinado y se ofrece en el primer trimestre para clasificar a las pacientes en función del riesgo de padecer anomalías cromosómicas (Servicio de Salud del Principado de Asturias, 2011). El cribado combinado del primer trimestre está compuesto por tres parámetros, dos de ellos se obtienen entre la semana 8 y 11 (PAPP-A y β hCG) y el tercero corresponde a una prueba ecográfica para la medición de la TN, que se realiza entre la semana 11 y 13. Cuando se efectúa el cribado en el segundo trimestre, el momento recomendado para su realización es entre la semana 15 y 20. Los valores que se han establecido como punto de corte, están comprendidos entre los índices de riesgo 1/250 y 1/270 y son variables entre las diferentes comunidades autónomas.

La exactitud del cribado combinado en la detección de alteraciones cromosómicas varía entre el 79 y 94 % con una tasa de falsos positivos del 3-5 % (Saller, 2008; Nicolaidis, 2011).

Una vez detectado el riesgo, en función de los resultados obtenidos en la prueba combinada, se ofrece a las mujeres embarazadas con posible cromosopatía fetal la realización de una prueba invasiva, amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales, con el objetivo de obtener muestras de células fetales para el análisis citogenético.

La citogenética, campo de la genética que comprende el estudio de la estructura, función y comportamiento de los cromosomas, utiliza en la actualidad técnicas moleculares, además del cariotipo (prueba de referencia), como métodos diagnósticos para la determinación de anomalías cromosómicas fetales. Las técnicas moleculares han emergido como alternativas rápidas para la detección de algunas cromosopatías, ofreciendo resultados en 3 días o menos desde que se obtiene la muestra para estudio, siendo esta característica su principal ventaja, al conseguir proporcionar un diagnóstico entre 5 y 11 días antes que con la prueba de referencia.

En el diagnóstico prenatal de cromosopatías hay dos aspectos importantes detallados a continuación, el procedimiento para extraer la muestra fetal para estudio y el tipo de técnica utilizada para analizar las muestras obtenidas.

Procedimientos para obtención de muestras

La obtención de muestras fetales para el estudio de anomalías cromosómicas puede realizarse mediante métodos invasivos (amniocentesis, biopsia de vellosidades coriales, cordocentesis) o no invasivos (sangre materna), siendo actualmente los métodos invasivos los de primera elección.

Los procedimientos invasivos para la extracción de muestras fetales incluyen la amniocentesis, método de elección en el 2º trimestre de embarazo y la biopsia de vellosidades coriales vía transabdominal, considerada de primera elección cuando la prueba se realiza antes de la 15ª semana de gestación.

A continuación se muestran los procedimientos y una descripción de las características de cada una de ellos:

Amniocentesis

Extracción de líquido amniótico mediante punción transabdominal entre las 15ª-20ª semanas de gestación. Se recomienda su realización a partir de las 15ª semanas de embarazo debido a que la cantidad de líquido amniótico es alrededor de 150–200 ml, existiendo, además, un mayor número de células fetales. Esto permite la obtención de una muestra de 10 a 20 ml, suficiente para el estudio. Las células obtenidas del líquido amniótico antes de la 15ª semana o después de la 24ª semana, presentan una menor capacidad de crecimiento en los cultivos celulares.

La amniocentesis presenta un riesgo de aborto relacionado con la intervención. Una revisión sistemática sobre las complicaciones relacionadas con la amniocentesis expone que la tasa de pérdidas fetales por abortos espontáneos después del procedimiento es de 0,9 % (Mujezinovic, 2007).

Se han descrito otras complicaciones, derivadas de la amniocentesis, además de abortos espontáneos, como perforación de la placenta durante el procedimiento (Tabor, 1986; Andreassen, 1989; Antsaklis, 2000), transmisión maternofetal de infecciones (Giorlandino, 1994) y aumento de los niveles de AFP. El aumento de AFP podría llevar a resultados falsos positivos en la evaluación del riesgo si se encuentra elevada por otra causa, como ocurre en el cáncer hepático u otras patologías hepáticas. Durante el embarazo, la variación de los niveles de AFP, como parte de una prueba de cribado de anomalías cromosómicas, pueden deberse a anomalías congénitas, como anencefalia, atresia duodenal, gastrosquisis, onfalocelo,

esпина bífida y tetralogía de Fallot o a trastornos genéticos, como el síndrome de Turner o el síndrome de Down. Otras posibles causas de variaciones de los niveles de AFP dentro del embarazo son la muerte intrauterina o el embarazo múltiple, por lo que la presencia de valores alterados podría generar dificultades en el cálculo de riesgo.

Biopsia de vellosidades coriales

Mediante punción-aspiración guiada por ecografía se extrae tejido placentario fetal por vía transcervical o transabdominal entre las 10ª y 13ª semanas. Una revisión Cochrane, que comparó la amniocentesis y la biopsia de vellosidades coriales (BVC) tanto transabdominal como transcervical, concluyó que la amniocentesis y la BVC transabdominal presentan un riesgo de pérdida fetal similar (RR 0,90, IC 95 % de 0,66–1,23). Por el contrario la BVC transcervical presenta una tasa de pérdidas fetales ligeramente superior (RR 1,68, IC 95 % de 0,79–3,58) (Alfirevic, 2003).

En situaciones donde la placenta está en localización posterior o el útero está en retroversión, la vía transabdominal no puede realizarse, pudiendo ofrecerse como alternativa la vía transcervical o la amniocentesis.

Como patrón de referencia a nivel internacional, para la detección de anomalías cromosómicas en muestras de vellosidades coriales se utiliza el método combinado con dos tipos de técnicas:

- Técnica corta o directa (que puede ser semi-directa si se realiza un período corto de cultivo), que consiste en realizar una extensión del tejido corial, una vez separado el tejido materno contaminante, directamente, sin cultivar, para visualizar las metafases espontáneas.
- Técnica larga, que consiste en disociar las células mesenquimales del tejido con proteasas, para cultivarlas posteriormente durante 2 o 3 semanas, y luego aprovechar las metafases existentes para el cariotipo (Simoni, 1986; Vejerslev, 1989; Barranco, 2011).

Una de las limitaciones de la biopsia de vellosidades coriales es la presencia de mosaicismo confinado a la placenta, en el que se detecta la presencia de una línea celular anómala que no está presente en el feto. El mosaicismo confinado a placenta es detectado en aproximadamente el 1 % de las muestras de vellosidades coriales, con una frecuencia de detección 10 veces mayor que en líquido amniótico. Para descartar este tipo de

anomalías es necesario confirmar el diagnóstico con el análisis de una muestra de líquido amniótico.

La aplicación de una técnica rápida como FISH o QF-PCR a una muestra de vellosidades coriales para el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas permite la detección durante el primer trimestre del embarazo, posibilitando la toma de decisiones en las primeras semanas de embarazo.

Cordocentesis

Extracción de sangre fetal mediante la punción del cordón umbilical a partir de la semana 19 de gestación. El riesgo de aborto asociado a cordocentesis es mayor que el asociado a amniocentesis o biopsia corial, con tasas de 1,4 % (Ghidini, 1993) y está estrechamente relacionado con la experiencia del profesional que realiza la intervención.

Análisis de células fetales

Para el análisis de las muestras de las células fetales se utilizan, además del análisis citogenético convencional, otras técnicas basadas en la citogenética y en la genética molecular. A continuación se describen las características más destacadas de las principales técnicas diagnósticas utilizadas.

Análisis citogenético: cariotipo

El inicio de la citogenética comienza a partir de 1956, cuando se descubrió que el número correcto de cromosomas era 46. El cariotipo mediante bandas G es una técnica que lleva aplicándose desde los años 70 en el diagnóstico de anomalías cromosómicas fetales (Caspersson, 1970). El estudio completo del cariotipo tiene una sensibilidad y especificidad prácticamente del 100 % en la detección de aneuploidías cromosómicas. Además, tiene la ventaja de detectar otras aberraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales. (Sparkes, 2008). Sin embargo, no es una técnica exenta de limitaciones como las descritas a continuación:

- No se detectan variaciones menores del tamaño de una banda de un cromosoma de alta resolución (menor de 50-100 megabases).
- El tiempo requerido para el cultivo celular y el proceso de análisis puede llevar a demorar el resultado 7-14 días.
- Posibilidad de contaminación con células maternas.
- Fallo en el crecimiento celular.

Reacción en cadena de la polimerasa fluorescente cuantitativa (QF-PCR)

QF-PCR es una técnica utilizada en el diagnóstico prenatal rápido de algunas anomalías cromosómicas numéricas o aneuploidías. Fue desarrollada a principios de los años 90 (Mansfield, 1993) y actualmente se ofrece de forma rutinaria en función del riesgo fetal de anomalías cromosómicas en muchos centros de Europa, Asia y América.

QF-PCR es una técnica basada en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en la amplificación de secuencias genómicas repetitivas (más concretamente, de STR altamente polimórficos, y, por tanto, muy informativos) localizadas en los cromosomas de interés. Se analizan el número de alelos por cromosoma y la intensidad relativa fluorescente, permitiéndonos conocer el número de cromosomas presentes en las células fetales.

La QF-PCR permite el diagnóstico prenatal de aneuploidías relacionadas con el cromosoma 13, 18, 21, X e Y en 24-48 horas, con una exactitud cercana al 100 %. Es una técnica rápida, coste-efectiva y adecuada para la automatización. En algunos laboratorios, el análisis de los cromosomas sexuales está implantado como técnica de rutina, aunque en la mayoría de los centros solo se analizan si existe evidencia de riesgo por detección de anomalías ecográficas (Langlois, 2011).

Desde su descubrimiento, la técnica QF-PCR ha ido evolucionando, añadiéndose nuevos marcadores microsatélites para la detección de las regiones cromosómicas específicas de interés. Además de la mejora en el diagnóstico de las cromosopatías numéricas que afectan a los cromosomas 13, 18 y 21, es posible la detección de mosaicismos de estas trisomías cuando la línea celular anómala está presente en al menos el 15 % de la muestra. En el año 2009 se introdujeron los marcadores parálogos TAF9L dentro de los ensayos de cromosomas sexuales, proporcionando una mayor confianza en el diagnóstico de monosomía X. En la actualidad, en la realización de QF-PCR se recomienda la evaluación de un mínimo de cuatro marcadores por cromosoma (ACC-CMGS, 2012).

La Sociedad de Genética Molecular Clínica (CMGS), que forma parte de la Federación de Sociedades Británicas de Genética Humana, ha desarrollado, en colaboración con la Asociación de Citogenetistas Clínicos (ACC) una Guía de Buenas prácticas para la utilización de QF-PCR en el diagnóstico de aneuploidías. En su última actualización, publicada en 2012, recoge una serie de requisitos y recomendaciones sobre el diagnóstico de aneuploidías mediante métodos moleculares y recomienda la confirmación

del diagnóstico mediante cariotipo, cuando el resultado obtenido no cumpla con todos los criterios establecidos (ACC-CMGS, 2012).

Otras técnicas de diagnóstico rápido de anomalías cromosómicas

Seguidamente se describen otras técnicas rápidas disponibles para el diagnóstico de anomalías cromosómicas.

Hibridación in situ fluorescente (FISH)

La FISH utiliza sondas fluorescentes que se unen exclusivamente a la región cromosómica complementaria. Mediante un microscopio de fluorescencia es posible visualizar tanto la cantidad de señales fluorescentes (permitiendo identificar el número de cromosomas) como la localización de las mismas. Utilizando sondas para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y es posible diagnosticar las anomalías cromosómicas más frecuentes.

Se puede utilizar en células en interfase no cultivadas y en células cultivadas, incluso en metafases.

Amplificación de sondas dependientes de ligación múltiple (MLPA)

Mediante la técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) podemos detectar la duplicación y delección de diferentes fragmentos de un gen o de diferentes fragmentos de distintas zonas del genoma. Mediante una amplificación múltiple es posible determinar el número de copias de un gen o región cromosómica concreta.

Análisis cromosómico por microarray (CAM)

Los sistemas microarray o matriciales, realizan en la muestra estudiada un análisis genómico masivo sobre un número elevado de genes, obteniendo información rápida y reproducible en un solo experimento.

Basado en el análisis mediante microarray, se han desarrollado nuevos métodos citogenéticos que permiten la detección de polimorfismos puntuales (*Single Nucleotide Polymorphisms* o SNPs) así como la detección de variaciones en la dosificación o número de copias del genoma mediante arrays de Hibridación Genómica Comparada (CGH array).

Otros métodos disponibles están basados en la secuenciación masivamente paralela (MPS o *massively parallel sequencing*), una variante de las *next generation sequencing* o NGS, o las basadas en cromosomas artificiales bacterianos ligados a partículas (*Bacs-on-Beads* o BoBs).

Utilidad clínica

Las cromosomopatías fetales son un grupo de enfermedades congénitas que representan un problema de salud importante, al ser causa de mortalidad perinatal y discapacidad infantil. El riesgo de anomalía cromosómica es la indicación más frecuente para un diagnóstico prenatal mediante amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales.

Las anomalías cromosómicas fetales pueden clasificarse como anomalías numéricas o estructurales.

Las aneuploidías o anomalías cromosómicas numéricas, se deben a errores durante la gametogénesis (formación de los gametos) o de las primeras divisiones del cigoto. En el primer caso la anomalía estará presente en todas las líneas celulares del individuo, mientras que cuando la anomalía se produce en el cigoto puede dar lugar a mosaicismo, coexistiendo varias líneas celulares con dotaciones cromosómicas diferentes.

Las aneuploidías o cambio en el número de cromosomas, pueden deberse a la pérdida de un cromosoma (monosomía), ganancia de un cromosoma (trisomía), de varios cromosomas o de toda una dotación haploide. Las anomalías cromosómicas numéricas de los autosomas más frecuentes son la trisomía 21 (síndrome de Down), trisomía 13 (síndrome de Patau) y la trisomía 18 (síndrome de Edwards).

La trisomía 21 presenta un cuadro clínico caracterizado por defectos cardíacos, anomalías del tracto digestivo y de moderado a severo retraso mental. El riesgo de síndrome de Down aumenta con la edad materna (Saller, 2008).

Las comorbilidades asociadas a la trisomía 18 incluyen retraso de crecimiento intrauterino, malformaciones cardíacas, hidrocefalia y defectos de la pared abdominal. Presenta una alta tasa de mortalidad neonatal y perinatal, pocos casos superan el año de vida.

La trisomía 13 se asocia a profundo retraso mental, holoprosencefalia y múltiples malformaciones. Al igual que la trisomía 18, la probabilidad de supervivencia después del primer año de vida es escasa.

La aneuploidía de los cromosomas sexuales se define como la ausencia o ganancia de alguno de los cromosomas sexuales, X e Y. Los trastornos monosómicos, en general, son incompatibles con el desarrollo fetal. La única monosomía conocida es la correspondiente al síndrome de Turner, 45,X, aun cuando presenta una alta tasa de muerte intraútero. Las características clínicas de la monosomía del cromosoma X son: talla baja, disgenesia gonadal, ausencia de las características del desarrollo secundario. El síndrome de Turner también puede, igualmente, ser debido a alteraciones estructurales del cromosoma X, pero siempre tiene pérdida de todo o parte del brazo corto del cromosoma X. Es frecuente que las personas con síndrome de Turner presenten un mosaicismo cromosómico, aumentando la variabilidad fenotípica de este síndrome. La presencia de un cromosoma sexual extra, 47,XXX, 47,XXY (síndrome de Klinefelter) o 47,XYY se asocia a un fenotipo leve con un desarrollo e intelecto normal. En el caso de síndrome de Klinefelter se asocia a una esterilidad masculina.

Las anomalías cromosómicas estructurales pueden ser translocaciones, inserciones, inversiones, isocromosomas, duplicaciones, deleciones y reordenamientos complejos. Estos reordenamientos estructurales pueden presentarse como:

- Reordenamientos equilibrados, donde no hay pérdida/ganancia de material genético y suele asociarse a un fenotipo normal, aunque hay riesgos para su descendencia.
- Reordenamientos en desequilibrio, donde hay pérdida o ganancia de un segmento cromosómico y se asocia a un fenotipo anómalo.

La translocación Robertsoniana es un tipo de translocación que afecta a los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22). Los portadores de translocaciones Robertsonianas que involucren a los cromosomas 13 y 21, tienen riesgo de tener hijos con trisomía 13 y 21.

Aproximadamente un 10 % de los casos de trisomía 13 y 18 son debidos a una translocación desequilibrada (Matthews, 1999). El síndrome de Down, al igual que los síndromes de Edward y Patau, puede ocurrir como consecuencia de tres diferentes mecanismos: no disyunción, translocación y mosaicismo. Los tres mecanismos tienen en común que los individuos presentan todo o parte de una copia adicional del cromosoma 21 y todos tienen algunas de las características asociadas al síndrome de Down. La no disyunción representa el 94 % de los casos, la translocación

el 3-4 % mientras que el 1-2 % de los pacientes con síndrome de Down pueden presentar un mosaicismo (Bandyopadhyay, 2003; Hartway, 2009).

Prevalencia de anomalías cromosómicas

Las anomalías cromosómicas fetales se presentan en 1 de cada 160 recién nacidos vivos. Alrededor de 1 de cada 800 recién nacidos presenta síndrome de Down, 1 de cada 6.000 nace con trisomía 18 y 1 de cada 10.000 presenta trisomía 13 (Driscoll, 2009). Las aberraciones de los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21 comprenden cerca del 95% de todos los desórdenes cromosómicos en los recién nacidos (Zeinali, 2012). La tasa de muerte fetal entre las 12 semanas y el embarazo a término es alrededor del 30 % para T21, y del 80 % para T18 y T13 (Nicolaidis, 2011).

La prevalencia de anomalías cromosómicas diferentes a las trisomías con significación clínica en mujeres con riesgo elevado de cromosomopatías es alrededor de 0,07 %, similar a la prevalencia de la población general (Mann, 2012a; Ogilvie, 2005).

Las trisomías cromosómicas sexuales (XXX, XXY o síndrome de Klinefelter y XYY), representan las anomalías cromosómicas más comunes compatibles con la vida, con una prevalencia general de 1 de cada 500 gestaciones.

El síndrome de Turner o monosomía X presenta una prevalencia de 1 de cada 1.500 a las 12 semanas y de 1 de cada 4.000 a las 40 semanas debido a la tasa de muerte fetal (Nicolaidis, 2011).

Justificación y objetivos

La aparición de la QF-PCR como técnica diagnóstica de anomalías cromosómicas en mujeres embarazadas de alto riesgo, con menor coste y mayor rapidez en la obtención de resultados, hace posible considerarla como alternativa a la prueba de referencia (cariotipo), sin embargo aún no se ha demostrado una mayor precisión y seguridad frente al patrón de referencia. Esta circunstancia hace que la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía realice este informe a petición de la Comisión de Prestaciones, Aseguramiento y Financiación, dependiente del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud.

El objetivo de este informe es la evaluación de la utilidad diagnóstica en términos de precisión y seguridad de QF-PCR en el diagnóstico prenatal de aneuploidías fetales en muestras de líquido amniótico o vellosidades coriales en mujeres embarazadas con alto riesgo de anomalías cromosómicas.

Con este trabajo se pretende dar respuesta a la siguiente pregunta:

¿Es más precisa y segura la QF-PCR que el cariotipo en el análisis de células de líquido amniótico o vellosidades coriales para el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas en mujeres embarazadas con alto riesgo en el cribado prenatal?

Material y Métodos

Tipo de Estudio

Se realizó una revisión sistemática de la literatura sobre la precisión y seguridad del diagnóstico prenatal con QF-PCR en muestras de líquido amniótico o vellosidades coriales de mujeres embarazadas con riesgo de anomalías cromosómicas.

Búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda de documentos en las bases de datos referenciales MEDLINE (Ovid), EMBASE (Evidence Based Medicine), *Science Citation Index expanded* (SCI) y PREMEDLINE, desde agosto de 1996 hasta septiembre de 2013. Además, se efectuó una búsqueda, mediante las palabras clave “*prenatal diagnosis*”, “*chromosome aberrations*”, “*chromosome disorders*” “*polimerase chain reaction*” y “*qf-pcr*”, para localizar documentos de síntesis de evidencia en la base de datos de Cochrane Collaboration, *Centre for Reviews and dissemination* (CRD), *Nacional Institute for Health and Care Excellence* (NICE), *Internacional Network of Agencies for Health Technology Assessment* (INAHTA), *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health* (CADTH) y Agencias y Unidades de Evaluación de Tecnologías Sanitarias españolas (AUnETS).

Para la localización de documentos utilizados en la elaboración de la revisión sistemática de la literatura, se emplearon diferentes estrategias de búsqueda muy sensibles y centradas en los objetivos del documento, complementándose posteriormente con búsquedas más específicas.

La estrategia de búsqueda se adjunta en el Anexo 1.

Selección de artículos

Para la selección de los artículos se eliminaron en primer lugar los estudios duplicados y se realizó una lectura del título y resumen de los artículos recuperados en la búsqueda. Los artículos seleccionados se leyeron a texto completo, examinando la bibliografía para asegurar que se habían incluido todos los documentos relacionados con el objetivo de la revisión.

Para la selección de los estudios se definieron los siguientes **criterios de inclusión** a partir de la pregunta de investigación formulada con el

formato PICO (Población, Intervención, Comparación y Outcomes/Resultados), identificados a continuación:

- Población: mujeres embarazadas con alto riesgo de cromosomopatía fetal.
- Intervención: QF-PCR en vellosidades coriales y/o líquido amniótico.
- Comparación: cariotipo en líquido amniótico o vellosidades coriales.
- Resultados: validez diagnóstica, sensibilidad, especificidad, tasa de falsos positivos y negativos, valores predictivos y eventos adversos.

Los **criterios de exclusión** establecidos se detallan a continuación:

- Referencias que no abordan en título y/o resumen la intervención y las indicaciones establecidas para el estudio.
- Revisiones narrativas, cartas científicas, editoriales y comunicaciones a congresos.
- Artículos editados en idiomas diferentes a español, inglés, francés e italiano.
- Estudios con fecha de publicación anterior a cinco años
- Estudios preliminares o con población contenida en otro estudio en los que no se aportaran resultados significativamente relevantes.
- Estudios que no presentaran datos desagregados de la prueba estudiada.
- Estudios de serie de casos que incluyeran menos de 20 pacientes.
- Estudios simulados o realizados en animales o *ex vivo*.
- Detección de anomalías cromosómicas en muestras de moco cervical, tejidos, sangre fetal y sangre periférica de la embarazada.
- Estudios en los que el procesamiento de muestras de vellosidades coriales se realizara antes de 2007, debido a modificaciones en el procedimiento recogidas en la Guía de Buenas prácticas sobre el uso de QF-PCR para el diagnóstico de aneuploidías (ACC-CMGS, 2007)
- Estudios donde no se incluyera un marcador parálogo X/autosoma (TAF9L) para el diagnóstico de monosomía X. (ACC-CMGS, 2012).

Evaluación de la calidad y síntesis de datos

Para la evaluación de la calidad metodológica y la valoración de la probabilidad de sesgos se utilizaron las fichas de lectura crítica, elaboradas a partir del instrumento QUADAs (*Quality Assesment of diagnostic Accuracy Studies*) para estudios de validez. Esta valoración fue realizada por dos evaluadores.

La herramienta QUADAS completa está disponible en la página web de QUADAS¹ y la evaluación realizada se adjunta en el Anexo 2. Además, se utilizó la escala para niveles de evidencia de estudios de exactitud diagnóstica elaborada por NICE 2006, que se adjunta en el Anexo 3.

Síntesis de los resultados de precisión y seguridad

Se ha realizado una extracción de datos y una síntesis de los resultados de precisión en tablas *ad hoc*. Para ello, se han clasificado los estudios en dos grupos, presentándose en primer lugar los programas de detección de anomalías cromosómicas y en segundo lugar los estudios primarios que evaluaban la precisión.

No se ha realizado ninguna técnica de síntesis cuantitativa dada la heterogeneidad clínica y metodológica de los estudios incluidos.

En los estudios seleccionados para la síntesis de la evidencia se investigó la utilización de QF-PCR como método diagnóstico de anomalías cromosómicas, las indicaciones para su utilización y si se realiza junto al cariotipo o en solitario, valorando la sensibilidad, especificidad y resultados discordantes.

En los estudios que no aportaron información sobre parámetros de validez diagnóstica como sensibilidad, especificidad o valores predictivos, se elaboró una tabla para cada estudio con los resultados presentados y clasificados como verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) y se calculó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), tasa de falsos positivos (TFP) y tasa de falsos negativos (TFN). Para el cálculo de estos parámetros se utilizaron las siguientes fórmulas (Martín, 2004):

$S = VP/VP+FN$; $E = VN/VN+FP$; $VPP = VP/VP+FP$; $VPN = VN/VN+FN$;
 $TFN = 1-S$; $TFP = 1-E$

¹ <http://www.bris.ac.uk/quadas/history/original.html>

Resultados

Resultados de la búsqueda

La estrategia de búsqueda permitió identificar un total de 492 documentos. De ellos 192 fueron duplicados. De los 300 artículos restantes, se seleccionaron 29 como potencialmente relevantes, descartándose 271 tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión descritos sobre título y resumen.

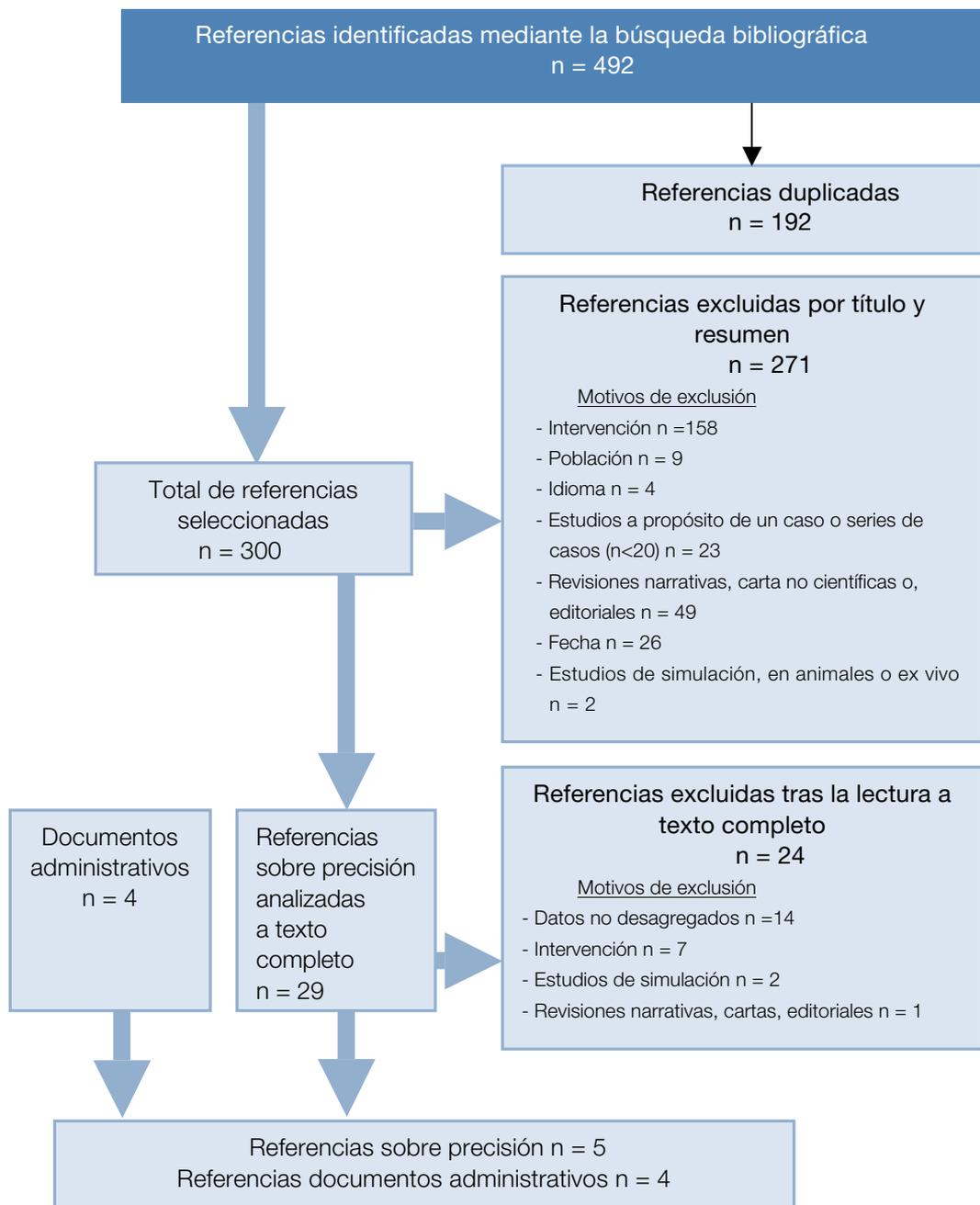
El motivo de exclusión más frecuente fue que la intervención realizada en el estudio no estaba relacionada con la pregunta de investigación, descartándose por este motivo 158 documentos. Otros motivos fueron: fecha de publicación anterior a 2007 (26 documentos), series de casos que incluían menos de 20 pacientes (23 documentos), revisiones narrativas, cartas científicas o editoriales (49 documentos), población no incluida en el estudio (9 documentos), estudios de simulación, en animales o *ex vivo* (2 documentos) e idiomas diferentes a español, inglés, francés o italiano (4 documentos).

De los 29 artículos relacionados con la precisión de la técnica, se eliminaron 24 tras la lectura a texto completo. El motivo de exclusión más frecuente fue que el artículo no incluyera resultados sobre la evaluación de la precisión y seguridad de QF-PCR de forma desagregada (14 documentos). Otros motivos de exclusión fueron que la intervención realizada no estuviera relacionada con la pregunta de investigación (7 documentos), que fuesen revisiones narrativas, cartas científicas o editoriales (1 documento) y estudios de simulación (2 documentos). Finalmente se incluyeron 5 documentos para la extracción de resultados de precisión y seguridad y elaboración de este informe.

Por otra parte, la búsqueda específica de documentos administrativos o de política sanitaria que incluyeran información sobre la utilización de la técnica QF-PCR obtuvo otros 4 documentos. Tres de ellos correspondían a programas de detección de anomalías cromosómicas en tres comunidades autónomas españolas y uno a un documento de buenas prácticas sobre el cribado de síndrome de Down en el sistema nacional de salud del Reino Unido.

El diagrama de flujo de los artículos se muestra de forma detallada a continuación, en la Figura 1.

Figura 1: Diagrama de estudios seleccionados



Descripción general de los estudios incluidos

Año de publicación

Los 5 estudios incluidos en este documento para el análisis de sus resultados fueron publicados entre 2009 y 2012.

Los programas de detección de anomalías cromosómicas localizados que incluyeron información sobre la utilización de QF-PCR, están publicados entre 2009 y 2013.

Tipo de muestra analizada en los estudios de precisión

En 2 estudios se investigaron muestras de líquido amniótico, vellosidades coriales y sangre fetal. En un estudio se investigaron muestras de líquido amniótico y vellosidades coriales. En un estudio se analizaron exclusivamente muestras de líquido amniótico, y en un documento se evaluaron muestras de vellosidades coriales. Los resultados aportados por 2 estudios sobre la evaluación de la precisión de QF-PCR mediante el análisis de sangre fetal, no se consideraron para ser incluidos en este informe.

Los datos descriptivos de cada uno de los estudios incluidos se presentan en la Tabla 1

Tabla 1. Descripción de las características de los estudios de precisión de la QF-PCR.

| Autor y año | Población n | Muestra | |
|--------------------|-------------|--|------------------|
| | | Tipo | Número |
| Armengol 2012 | n = 906 | Líquido amniótico Vellosidades coriales Sangre fetal (no incluidas para la síntesis de resultados) | 728 164 14 |
| Speevak 2011 | n = 1005 | Líquido amniótico | 1.005 |
| Baig 2010 | n = 1.000 | Líquido amniótico Vellosidades coriales Sangre fetal (no incluidas para la síntesis de resultados) | 978 14 8 |
| Hills 2010 | n = 9.737 | Líquido amniótico Vellosidades coriales | 5.878 3.859 |
| Christopoulou 2009 | n = 4.024 | Vellosidades coriales (4 muestras fueron consideradas no adecuadas para el análisis) | 4.020 |

A continuación se detallan los resultados obtenidos, describiendo en primer lugar los programas de detección de anomalías cromosómicas y en segundo lugar los estudios primarios que evaluaban la precisión de QF-PCR.

Programas de detección de anomalías cromosómicas

Se han localizado cuatro programas de cribado prenatal de primer trimestre para todas las embarazadas que acuden a la red pública de los Servicios Sanitarios, con el fin de calcular el riesgo de anomalía cromosómica fetal. En los casos con un aumento del riesgo se ofreció la posibilidad de comprobar la dotación cromosómica fetal mediante una prueba invasiva, amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales.

En estos programas se describieron los procedimientos de actuación con respecto a la utilización de QF-PCR en embarazadas con alto riesgo de anomalías cromosómicas. Un documento localizado correspondió al Modelo de buenas prácticas 2011-2014 del Sistema nacional de salud del Reino Unido (*NHS Fetal Anomaly Screening Programme*, 2011). Los otros tres documentos correspondieron a Programas de cribado de

Comunidades Autónomas españolas, Asturias, Andalucía y País Vasco (Servicio de Salud del Principado de Asturias. Consejería de Salud y Servicios Sanitarios, 2011; Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud, 2009; Osakidetza, 2013).

➤ **Recomendaciones sobre la confirmación diagnóstica de anomalías cromosómicas en Reino Unido incluidas en *Screening for Down's syndrome: UK NSC Policy recommendations 2011–2014 Model of Best Practice* (NHS)**

Este documento recomienda lo siguiente:

- La confirmación diagnóstica de síndrome de Down se ofrece en todos los embarazos de alto riesgo, con una prueba de cribado combinada o cuádruple, positiva, considerando un punto de corte de 1/150 tanto en el primer como en el segundo trimestre. La prueba combinada está recomendada desde la semana 10 hasta la 14, e incluye la determinación de marcadores bioquímicos (β HCG y PAPP-A), y un marcador ecográfico (translucencia nucal). A partir de la semana 14 hasta la semana 20 se recomienda la prueba cuádruple, que consiste en la determinación serológica de AFP, β -hCG, uE3 e inhibina A.
- El tipo de análisis ofrecido, como primera elección para la confirmación diagnóstica tras la prueba combinada, fue la realización de QF-PCR en muestras de vellosidades coriales. Como alternativa o segunda elección, a partir de la semana 15 se ofrece realizar la QF-PCR en líquido amniótico (amniocentesis).

Con respecto al cribado de la trisomía 13 y la trisomía 18, en la actualidad no está incluido dentro del programa de cribado de anomalías fetales del NHS. El grupo de expertos ha decidido examinar la evidencia como un tema separado, pero los programas específicos de cribado de trisomía 18 y trisomía 13 localizados no aportaron información específica sobre los métodos de confirmación diagnóstica que deben ser utilizados en estas dos anomalías (*NHS Fetal Anomaly Screening Programme - Trisomy 18*; *NHS Fetal Anomaly Screening Programme - Trisomy 13*).

A este documento se le ha asignado un nivel de evidencia IV.

➤ **Recomendaciones sobre la confirmación diagnóstica de anomalías cromosómicas en España**

Se localizaron tres programas de cribado prenatal de anomalías cromosómicas de primer trimestre donde se describen las recomendaciones para la realización de QF-PCR. Los informes localizados pertenecen al Principado de Asturias (Servicio de Salud del Principado de Asturias. Consejería de Salud y Servicios Sanitarios, 2011), Andalucía (Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud, 2009) y País Vasco (Osakidetza, 2013).

Los tres documentos coinciden en ofrecer a toda embarazada la realización del cribado combinado del primer trimestre, que incluye la determinación de marcadores bioquímicos (β HCG y PAPP-A) y marcador ecográfico (TN).

Programa de detección de Anomalías cromosómicas fetales del principado de Asturias 2011

Este documento está dirigido al cribado prenatal del síndrome de Down (T21) y Síndrome de Edwards (T18). Señala que la QF-PCR permite identificar las principales anomalías cromosómicas con significación clínica, siendo aplicable para las gestaciones con un riesgo de 1/250 en la prueba de cribado prenatal de primer trimestre. Para otras situaciones, como anomalías ecográficas y antecedentes familiares o personales de anomalías cromosómicas o genéticas, el cariotipo aportaría una mayor información. Señala, además, que parece prudente, por el momento, determinar el cariotipo de manera simultánea a la determinación de QF-PCR, debido a que la prueba presenta una pequeña probabilidad de falsos negativos y a que la generalización de uso en esta Comunidad autónoma es de implantación reciente. El documento incluye el proceso de diagnóstico de confirmación de anomalía cromosómica fetal en las gestantes con riesgo, recomendándose la realización de una prueba invasiva para la obtención de células fetales y determinación del cariotipo y/o pruebas rápidas solicitadas, así como los estudios complementarios que pudieran ser necesarios. Identifica las posibilidades de resultados confirmatorios de cromosopatías:

- Cuando la prueba rápida (FISH o QF-PCR) y/o el cariotipo sea compatible con trisomía 21, 18 u otra aneuploidía cromosómica con repercusión clínica relevante, se ofertará IVE (interrupción voluntaria del embarazo) a la paciente.
- Si en la prueba rápida se obtiene un resultado normal o compatible con aneuploidía cromosómica sin repercusión clínica

relevante, se esperará al resultado del cariotipo para tomar decisiones.

- Si el cariotipo es normal se recomienda continuar el control habitual de embarazo.

En el análisis de muestras de vellosidades coriales, para el estudio citogenético convencional se puede realizar una técnica corta (semidirecta) o técnica larga. Idealmente se deben hacer ambos procedimientos si bien la técnica corta puede ser sustituida por la técnica rápida (FISH o QF-PCR).

Este informe ha basado sus recomendaciones en la evidencia disponible sobre la capacidad de las pruebas rápidas para detectar aneuploidías de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. En diversos estudios, utilizando el cariotipo como prueba de referencia, esta técnica ha mostrado una sensibilidad = 95,61 % y una especificidad \geq 99,97 %, para diagnosticar las aneuploidías más frecuentes. La evidencia científica mostró que las pruebas rápidas (FISH y QF-PCR) tuvieron una capacidad similar al cariotipo para identificar las aneuploidías de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y.

A este documento se le ha asignado un nivel de evidencia IV.

Plan Andaluz de cribado de anomalías cromosómicas 2009

El plan andaluz de cribado indica la realización de cariotipo en todas las muestras invasivas (amniocentesis o biopsia corial) para la confirmación diagnóstica de anomalías cromosómicas fetales, cuando se detecta un riesgo alto en la prueba combinada del primer trimestre o en la prueba cuádruple en el segundo trimestre. El cariotipo se recomendó como procedimiento de primera elección para el diagnóstico de cromosomopatías y para la confirmación del resultado obtenido con QF-PCR. Las técnicas rápidas no sustituyen al cariotipo. En cuanto a los cromosomas sexuales, el análisis de rutina con QF-PCR se realizará a criterio de cada laboratorio o si hay evidencias de una posible anomalía. Refiere, además, que QF-PCR no debe considerarse como técnica diagnóstica para monosomía del cromosoma X. Este informe se realizó antes de incorporar nuevos marcadores específicos, como TAF9L, para la mejora del diagnóstico de monosomía del cromosoma X. La incorporación de este marcador se ha producido de manera progresiva, iniciándose en Reino Unido, en el año 2009 (Mann, 2012b).

En el diagnóstico de las muestras de vellosidades coriales, se establece la posibilidad de sustituir la técnica directa / 24 horas o corta por el análisis rápido mediante QF-PCR / FISH, complementándolo con la técnica larga.

A este documento se le ha asignado un nivel de evidencia IV.

Programa de cribado prenatal de síndrome de Down y otras anomalías cromosómicas del País Vasco. 2013

El programa de cribado de anomalías cromosómicas del País Vasco de 2013, recomienda, en caso de alto riesgo detectado por el cribado de prueba combinada, la confirmación diagnóstica con cariotipo. Especifican que las técnicas rápidas no sustituyen al cariotipo pero dan un resultado rápido de las trisomías 21, 18 y 13 así como de las aneuploidías de los cromosomas X e Y. En cuanto al análisis de las vellosidades coriales, se recomienda la realización de un cultivo a largo plazo, sin describir otra alternativa de análisis complementario para este tipo de muestras. Refiere, además, que a pesar de que la QF-PCR tiene un menor coste y mayores posibilidades de automatización que el FISH, la elección de una u otra técnica rápida debe tener en cuenta también las condiciones, capacidades y experiencia de cada laboratorio.

A este documento se le ha asignado un nivel de evidencia IV.

Resultados de precisión

A continuación se describen los resultados obtenidos en los 5 estudios localizados que han utilizado QF-PCR para el análisis de muestras en mujeres embarazadas con alto riesgo de cromosopatías fetales. Los estudios se han clasificado en tres grupos, en función del tipo de muestra analizada, líquido amniótico, vellosidades coriales o ambas. En la tabla 2 se muestran los resultados de los parámetros de validez diagnóstica obtenidos en todos los estudios.

Estudios que analizan muestras de líquido amniótico

A continuación se describen los resultados del estudio localizado en el que se analizan exclusivamente muestras de líquido amniótico.

➤ **Speevak, 2011.** Uno de los objetivos de este estudio ha sido la evaluación del impacto al reemplazar el cariotipo por QF-PCR en el contexto del sistema de salud canadiense. Incluyó datos de tres hospitales regionales de la provincia de Ontario, Canadá. Se trata de un estudio prospectivo que evaluó los resultados obtenidos en 4.176 muestras de líquido amniótico durante un periodo de un año. A todas las mujeres embarazadas se les realizaron las dos pruebas con el objetivo de comprobar la validez de la QF-PCR, comparándola con la prueba de referencia, el cariotipo.

Las pacientes fueron asignadas a grupos de riesgo basándose en la edad materna avanzada, resultados de los marcadores bioquímicos incluidos en la serología prenatal, cribado prenatal integrado del primer trimestre (medida de la translucencia nual, edad materna y cribado bioquímico con AFP, β -hCG, uE3, inhibina A) o resultados ecográficos.

Se consideraron para este informe un total de 1005 pacientes de alto riesgo incluidas en la categoría 2 y 3, que estaban clasificadas según los siguientes criterios:

- Categoría 2: edad materna avanzada, cribado prenatal integrado o cribado de suero materno $\geq 4\%$. Se incluyeron 462 mujeres.
- Categoría 3: presencia de un signo menor en ecografía y un factor de riesgo adicional (edad materna avanzada o un segundo marcador) y/o marcadores mayores en ecografía. Se incluyeron 543 mujeres.

Un signo mayor se definió como un diagnóstico ecográfico de anomalía congénita con repercusión clínica, como por ejemplo, una anomalía cardíaca estructural o un defecto de la pared abdominal. Como signos menores ecográficos se incluyeron intestino ecogénico, ventrículomegalia leve, foco ecogénico en el corazón, quistes del plexo coroideo, arteria umbilical única, pielectasia, fémur corto, húmero corto, hipoplasia del hueso nasal, clinodactilia del quinto dedo, braquicefalia, pliegue nual ≥ 3 mm en el primer trimestre, o pliegue nual > 5 mm en el segundo trimestre.

Así mismo, las anomalías cromosómicas detectadas se clasificaron en función del pronóstico y frecuencia de presentación en tres grupos:

- Anomalías comunes con mal pronóstico y detectadas

- mediante QF-PCR: aneuploidías 13, 18, 21 y anomalías cromosómicas sexuales.
- Anomalías poco comunes con mal pronóstico y no detectadas mediante QF-PCR: aneuploidías poco comunes y reordenamientos estructurales no equilibrados.
 - Anomalías de pronóstico incierto: marcadores de origen cromosómico incierto, reordenamientos estructurales equilibrados *de novo* y mosaicismos de bajo riesgo.

Se detectaron mediante cariotipo 235 anomalías comunes con mal pronóstico, 3 anomalías poco comunes con mal pronóstico y 5 anomalías de pronóstico incierto. Todas las anomalías comunes de mal pronóstico fueron detectadas mediante QF-PCR, mientras que las 3 anomalías poco comunes con repercusión clínica y las 5 anomalías de pronóstico incierto no fueron detectadas (8 falsos negativos). No refieren resultados falsos positivos.

QF-PCR se realizó en el 95 % de las muestras. El estudio no mostró en qué categoría de riesgo se encontraban estas muestras no analizadas por QF-PCR, por lo que los resultados negativos no se han podido extraer del total de la población estudiada.

A continuación se muestran los resultados aportados por el estudio:

Tabla 2. Resultados de QF-PCR en estudio de Speevak 2011.

| | Anomalía fetal | No anomalía fetal | |
|----------|----------------|-------------------|-----------------|
| QF-PCR + | 235 | 0 | Positivos = 235 |
| QF-PCR - | 8 | Sin datos | |
| Total | 243 | | |

Basado en los datos aportados, fue posible el cálculo de la sensibilidad, valor predictivo positivo y tasa de falsos negativos:

S = 96 %; VPP = 100 %; TFN = 4 %;

El riesgo residual de anomalías cromosómicas poco comunes clínicamente significativas sería de 0,063 % si se realizaba cariotipo en la categoría 2 y 3 y de 0,083 % si se realizaba solamente en la categoría 3.

Los autores sugirieron que la realización de QF-PCR como técnica de detección única de anomalías cromosómicas estaría indicada en embarazos de bajo riesgo o con riesgo exclusivamente de trisomías 13, 18 y 21.

Los datos de fallo de la técnica no se presentaron de forma desagregada, no pudiendo, por tanto, extraerse los resultados relativos a la población de alto riesgo.

La principal limitación de este estudio fue la ausencia de enmascaramiento y la probabilidad de sesgos alta. Su evaluación se adjunta en el Anexo 2.

A este estudio se le ha asignado un nivel de evidencia III.

Estudios que analizan muestras de vellosidades coriales

A continuación se muestran los resultados del estudio localizado que ha evaluado solamente muestras de vellosidades coriales.

➤ **Christopoulou, 2009.** El objetivo de este estudio fue evaluar si QF-PCR podría reemplazar la técnica corta o directa (TD) de las células del citotrofoblasto.

Se analizaron 4.020 muestras de vellosidades coriales de manera prospectiva. En 2.770 muestras se realizó cariotipo mediante TD y otras 1.250 muestras fueron analizadas mediante QF-PCR. Las muestras de los dos grupos se analizaron, además, mediante técnica larga (TL) de células del mesénquima.

Los autores refirieron una ausencia de resultados falsos positivos y negativos con los métodos evaluados, al considerar los resultados obtenidos con TD más TL frente a los resultados de QF-PCR más TL. Sin embargo, en el análisis de los resultados se observó la presencia de un falso negativo para QF-PCR con diagnóstico de mosaicismo de trisomía 21, que fue identificado mediante TL y confirmado con cariotipo en muestras de piel fetal.

Como resultados a favor de la QF-PCR se obtuvo un falso negativo para cultivo largo en una muestra con diagnóstico de trisomía 21 detectada por QF-PCR. Además se detectó una microduplicación de uno de los marcadores STR del cromosoma 13 (D13S634) con herencia por vía materna, aunque en el TL presentó un resultado normal.

En un grupo de 20 muestras que fueron analizadas con TD no se obtuvo resultado ya que no fueron adecuadas para el análisis

citogenético con este método (0,7 %) y 5 muestras no pudieron ser analizadas con QF-PCR (0,4 %) debido a contaminación por células maternas.

De las 1245 muestras con resultado a las que se les realizó QF-PCR y cariotipo, se incluyeron para el cálculo de sensibilidad, especificidad, TFP, TFN, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo los resultados de 1242, excluyéndose 3 muestras que podían añadir un sesgo en la interpretación de resultados, debido a que se realizó QF-PCR pero no se incluyó el diseño para la detección de anomalías cromosómicas sexuales, obteniéndose un resultado de cromosopatía sexual mediante cariotipo.

Los datos se muestran en la siguiente tabla:

| Tabla 3. Resultados de QF-PCR en estudio de Christopoulou 2009. | | | |
|--|-----------------------|--------------------------|------------------|
| | Anomalía fetal | No anomalía fetal | |
| QF-PCR + | 49 | 0 | Positivos = 49 |
| QF-PCR - | 2 | 1191 | Negativos = 1193 |
| Total | 51 | 1191 | Total = 1242 |

Se calcularon los siguientes parámetros de validez diagnóstica:

S = 96 %; E = 100 %; TFP = 0; TFN = 4 %; VPP = 100 %; VPN = 99%

En este estudio se ha detectado como limitación principal la ausencia de enmascaramiento y una probabilidad de sesgos alta. Su evaluación se adjunta en el Anexo 2.

A este estudio se le ha asignado un nivel de evidencia III

Estudios en muestras de vellosidades coriales y líquido amniótico

A continuación se muestran los resultados de 3 estudios localizados que han analizado muestras de líquido amniótico y vellosidades coriales:

- **Armengol, 2012:** en este estudio prospectivo se han evaluado tres métodos de diagnóstico de muestras prenatales invasivas, cariotipo junto a QF-PCR, MLPA (amplificación de sondas dependientes de ligación múltiple) y CMA (análisis cromosómico por *microarray*).

Se analizaron 906 muestras de líquido amniótico, vellosidades coriales y sangre fetal, recogidas durante un periodo de un año en 900 embarazadas con alto riesgo de anomalías cromosómicas, de las que 6 presentaban embarazos múltiples. Se extrajeron los resultados correspondientes a las muestras de líquido amniótico y vellosidades coriales (excluyendo las 14 muestras de sangre fetal) a las que se realizó cariotipo y QF-PCR y que correspondían a embarazos de riesgo (edad materna avanzada, embarazadas con cribado de riesgo bioquímico $> 1/200$, historia familiar de cromosomopatías, otras enfermedades monogénicas o abortos espontáneos y anomalías ecográficas).

En las 812 muestras evaluadas, se detectaron 39 alteraciones cromosómicas con consecuencias fenotípicas mediante cariotipo. 7 anomalías no fueron detectadas mediante QF-PCR, de las cuales 3 correspondían a casos de trisomía 9, una trisomía 15 y 3 cromosomas marcador/derivado.

Todas las aneuploidías que afectaban a los cromosomas sexuales y que se detectaron por cariotipo, fueron diagnosticadas con QF-PCR.

El tiempo medio de diagnóstico para el análisis citogenético fue de 25 días, frente a los 2 días para QF-PCR.

Los datos de fallo de la técnica no se presentaron de forma desagregada, no pudiendo, por tanto, extraerse los resultados relativos a la población de alto riesgo. Por este motivo, los resultados negativos de la técnica no han podido ser calculados.

Se han calculado los parámetros de validez diagnóstica a partir de los datos desagregados de embarazos de riesgo.

A continuación se muestran los datos obtenidos:

Tabla 4. Resultados de QF-PCR en estudio de Armengol 2012.

| | Anomalia fetal | No anomalia fetal | |
|----------|----------------|-------------------|----------------|
| QF-PCR + | 32 | 0 | Positivos = 32 |
| QF-PCR - | 7 | Sin datos | |
| Total | 39 | | |

S = 82 %; TFP = 0; TFN = 18 %; VPP = 100 %;

La principal limitación de este estudio fue la ausencia de enmascaramiento. La probabilidad de sesgos fue moderada. Su evaluación se adjunta en el Anexo 2.

A este estudio se le ha asignado un nivel de evidencia III

- **Baig, 2010:** este estudio evaluó la técnica QF-PCR en 1.000 muestras fetales procedentes de embarazadas con riesgo de anomalías cromosómicas. Se realizó cariotipo a todas las muestras para comprobar la validez de los resultados obtenidos con QF-PCR. 978 muestras procedían de amniocentesis, 14 de vellosidades coriales y 8 eran muestras de sangre fetal. Se informaron 955 muestras de líquido amniótico y 11 muestras de vellosidades coriales, con un 100 % de sensibilidad (límite inferior del IC 95 % de 92,8 %) y 100 % de especificidad (límite inferior del IC 95 % de 99,5 %). No se detectaron resultados falsos positivos ni falsos negativos.

La tasa de fallo de QF-PCR fue de un 2,6 %, correspondiendo a 18 muestras que no fueron informadas debido a un resultado de menos de 2 STR heterocigóticos por cromosoma y 8 resultados no concluyentes por contaminación celular materna.

De las 1.000 muestras analizadas, se archivaron 523 para analizarlas posteriormente. El tiempo de respuesta para las 477 muestras que se analizaron directamente sin ser archivadas fue de menos de 48 horas desde la recepción de la muestra.

Se trata de un estudio con una buena calidad metodológica. Se ha realizado enmascaramiento de resultados para las dos técnicas empleadas.

En la tabla 6 se resumen los resultados más importantes de este estudio.

A este estudio se le ha asignado un nivel de evidencia Ib

- **Hills, 2010:** estudio donde se evaluaron los resultados obtenidos en los dos primeros años de experiencia tras la incorporación de un nuevo protocolo de diagnóstico de anomalías cromosómicas implantado en la región de Londres (Great London) desde mayo de 2007. Se les indicó la realización de un tipo determinado de prueba diagnóstica en función del riesgo de anomalías cromosómicas.

Así, la realización de QF-PCR estaba indicada como única técnica en mujeres embarazadas con cribado positivo para el síndrome de Down (medida de la translucencia nucal, cribado en suero de β HCG y PAPP-A).

La realización de QF-PCR mas cariotipo estaba indicada en:

- Embarazadas con datos ecográficos patológicos.

- Historia familiar o personal de reordenamientos cromosómicos.
- Confirmación diagnóstica de un resultado positivo mediante QF-PCR como medida de seguridad para evitar falsos positivos.

A las muestras procedentes de mujeres embarazadas con anomalías ecográficas indicativas de síndrome de Turner, historia de aneuploidías cromosómicas sexuales o enfermedad ligada al sexo, se les realizó, adicionalmente una QF-PCR multiplex que incluyó marcadores de cromosomas sexuales.

Se analizaron un total de 9.737 muestras, de ellas, 5.878 eran muestras de líquido amniótico y 3.859 correspondieron a muestras de vellosidades coriales.

Se incluyeron 7.284 muestras en un grupo al que exclusivamente se les realizó QF-PCR sin indicación de cariotipo. En 351 muestras se obtuvo un resultado de cromosomopatía con QF-PCR. Uno de los resultados positivos correspondía a un falso positivo, diagnosticado como trisomía 13 mediante QF-PCR y cariotipo normal, resultando ser un mosaicismo confinado a placenta, siendo el resto de las muestras positivas concordantes con el resultado del cariotipo. En 6.774 muestras se obtuvo un resultado normal con QF-PCR. Sin embargo, se detectaron 6 recién nacidos con un cariotipo postnatal anómalo que procedían de embarazos de riesgo detectados mediante prueba combinada (β -HCG y PAPP-A y translucencia nucal). Los 6 casos se diagnosticaron como una inversión, una delección del cromosoma 13, una duplicación del cromosoma 11, una delección del cromosoma 18, un mosaicismo de cromosoma Y isodicétrico y monosomía X y un caso de disomía del cromosoma 14. Además de estos 6 casos, hubo dos mujeres embarazadas con muestras diagnosticadas como normales (sin cromosomopatías) con QF-PCR a las que se realizó una segunda prueba invasiva por detección de anomalías en la ecografía. Una de ellas se diagnosticó de translocación robertsoniana aparentemente equilibrada mediante cariotipo y otra presentó un mosaicismo en líquido amniótico no comprobado en sangre fetal.

Hubo un grupo de 909 muestras con QF-PCR normal en el que, aunque no tenía indicación de cariotipo por protocolo, se realizó el cariotipo completo debido a acuerdos de servicios de los hospitales con los laboratorios de referencia o por financiación privada.

Diecisiete de las 909 muestras (1,8 %) obtuvieron resultados anómalos en el cariotipo. Estas muestras se clasificaron en tres categorías, de acuerdo a la severidad del pronóstico asociado al cariotipo anómalo:

- Buen pronóstico: 4 inversiones heredadas, dos translocaciones robertsonianas, un síndrome XXX, un mosaicismo de XXX y un mosaicismo para una translocación equilibrada con puntos de rotura pericentros (próximos al centrómero).
- Pronóstico incierto: una translocación equilibrada de novo, dos casos de translocación equilibrada con puntos de rotura en región eucromática en mosaico, una trisomía 21 en mosaico en un bajo porcentaje, una monosomía X en mosaico y un reordenamiento complejo aparentemente equilibrado.
- Mal pronóstico: un caso de trisomía 5 y un caso de delección intersticial *de novo* de cromosoma 12 (microdelección de 12q14).
- Por tanto, en el grupo de muestras que no tenía indicación clínica de cariotipo, se detectaron 25 con QF-PCR normal (sin cromosopatía) que posteriormente fueron diagnosticadas como cariotipo anómalo, representando el 0,3 % de las muestras de este grupo (falsos negativos).

En el grupo de muestras que tenían indicación de cariotipo se analizaron 2.453 muestras tanto con QF-PCR como con cariotipo convencional. En 1.802 muestras se obtuvieron resultados normales con QF-PCR y de ellas, 107 (6 %) presentaron un cariotipo con alguna anomalía cromosómica (falsos negativos). Todos los resultados anómalos obtenidos con QF-PCR en este grupo de muestras fueron concordantes con el cariotipo.

QF-PCR detectó un total de 1001 anomalías, correspondiendo al 10,3 % del total de los análisis realizados. Las tasas de anomalías difieren dependiendo del tipo de muestra, de tal manera que el 16,6 % de las muestras de vellosidades coriales recibidas obtuvieron un resultado de QF-PCR anómalo, comparado con el 6% de las muestras de líquido amniótico.

En la población de estudio se ha incluido una categoría de muestras definida como “otros” que incluye un grupo heterogéneo de embarazadas que presentaban edad materna avanzada, ansiedad materna o TN > 2,5 y < de 3mm.

Para el cálculo de los parámetros de validez diagnóstica de la técnica se han incluido un total de 9578 muestras, de las que se

disponían los datos de las técnicas de diagnóstico realizadas y el resultado.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 5. Resultados de QF-PCR en estudio de Hills 2010.

| | Anomalía fetal | No anomalía fetal | |
|----------|----------------|-------------------|------------------|
| QF-PCR + | 1001 | 1 | Positivos = 1002 |
| QF-PCR - | 132 | 8444 | Negativos = 8576 |
| Total | 1133 | 8445 | Total = 9578 |

Se han obtenido los siguientes valores:

S = 88 %; E = 99 %; TFP = 1 %; TFN = 12 %: VPP = 99 %; VPN = 98 %

Los autores de este estudio señalaron que durante los dos años de implantación del procedimiento de diagnóstico con QF-PCR como estrategia única en la región de Londres en las indicaciones antes descritas, se ha reducido en un 75 % el número de cariotipos, sin considerar los cariotipos realizados fuera de protocolo.

La tasa de fallo de amplificación de la QF-PCR fue de 0,06 %.

Como limitación de este informe se ha detectado la ausencia de enmascaramiento. Al no haberse realizado el cariotipo al total de la población incluida en el estudio, existe un grupo de muestras en el que no es posible realizar la comparación del patrón de referencia con los resultados obtenidos con QF-PCR pudiendo dar lugar a un sesgo de verificación que limitaría la extrapolación de los resultados. La probabilidad de sesgos fue moderada, existiendo un sesgo de selección debido a la heterogeneidad en el riesgo de anomalías cromosómicas de las muestras incluidas en la categoría “otros”. La evaluación del estudio se adjunta en el Anexo 2.

A este estudio se le ha asignado un nivel de evidencia III

A continuación se resumen los resultados de los parámetros de validez diagnóstica que han podido ser calculados en todos los estudios incorporados para la elaboración de este informe.

Tabla 6. Parámetros de validez diagnóstica de los estudios seleccionados.

| Autor/año | S (%) | E (%) | VPP | VPN | Tasa de Falsos negativos | Tasa de Falsos positivos |
|--------------------|--------------|--------------|------------|------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Speevak 2011 | 96 % | Sin datos | 100% | Sin datos | 4 % | 0 |
| Armengol 2012 | 82 % | Sin datos | 100% | Sin datos | 18 % | 0 |
| Baig 2010 | 100 % | 100 % | Sin datos | Sin datos | 0 | 0 |
| Hills 2010 | 88 % | 99 % | 99 % | 98 % | 12 % | 1 % |
| Christopoulou 2009 | 96 % | 100 % | 100 % | 99 % | 4 % | 0 |

Resultados de seguridad

Los estudios incluidos no aportaron resultados sobre la seguridad de la técnica ni sobre los eventos adversos relacionados con la obtención de la muestra necesaria para el análisis mediante QF-PCR.

No se han detectado eventos adversos derivados de un error diagnóstico, como una interrupción voluntaria de embarazo innecesaria. Para minimizar los efectos adversos derivados de falsos positivos obtenidos por QF-PCR, en el estudio de Hills (2010) todos los resultados positivos fueron confirmados mediante cariotipo.

Discusión

El diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas es un proceso complejo en el que intervienen, además de la precisión de la prueba utilizada, otros factores como el tipo de muestra fetal, riesgo de anomalías cromosómicas, hallazgos ecográficos compatibles con anomalía cromosómica y el riesgo de cribado prenatal.

Actualmente el cariotipo, es el patrón de referencia en el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas. Sin embargo, es una técnica laboriosa, con un coste superior al de otros procedimientos diagnósticos y un tiempo de respuesta mayor que la QF-PCR.

En estos últimos años, con el desarrollo y disponibilidad de métodos moleculares, como QF-PCR, se está debatiendo si las técnicas moleculares pueden reemplazar al análisis citogenético convencional para el diagnóstico de algunas anomalías cromosómicas. La realización de una prueba molecular rápida completada con la realización del cariotipo es un procedimiento eficaz pero difícilmente sostenible desde el punto de vista económico.

En los documentos localizados se observó que QF-PCR se recomienda como técnica única en la región de Londres (*Great London*), en casos de embarazadas con un riesgo superior a 1/150 en el cribado prenatal de primer y segundo trimestre y sin anomalías ecográficas. El servicio nacional de salud del Reino Unido (NHS UK) ha adoptado la medida de realizar cariotipo solo en determinadas circunstancias. En otros países europeos como Suecia y Holanda, se les ofrece a las embarazadas la posibilidad de elegir entre pruebas rápidas y cariotipo tradicional. (SBU, 2006; Hills, 2010; Mann, 2012a; Putzova, 2008; Cirigliano, 2009). En Suecia, más del 70 % eligen la opción de técnica rápida QF-PCR frente al análisis citogenético completo (Comas, 2010). Por el contrario, en América del Norte QF-PCR no ha emergido como una prueba de primera elección o como una alternativa al cariotipo. En España, en concreto en la Comunidad de Asturias, se ha comenzado a recomendar como técnica única, aunque señalan la conveniencia de ser prudente y solicitar ambas pruebas por el momento.

Los parámetros de validez diagnóstica obtenidos en todos los estudios muestran una sensibilidad entre 82 % y el 100 % y una especificidad entre 99 % y 100 %.

Los datos aportados por Hills (2010) dentro del protocolo que se está llevando a cabo en la actualidad en la región de Londres, muestran un 0,34 %

de falsos negativos de QF-PCR (casos no detectados por la prueba) en embarazos con riesgo de cromosomopatías sin indicación de cariotipo y de un 6% de falsos negativos en el grupo de muestras con indicación de cariotipo.

Cuando se analizan sólo las cromosomopatías de mal pronóstico, el estudio de *Hills* presenta el 0,069 % de falsos negativos. Los autores refieren que esta cifra podría ser inferior a la real ya que en algunas ocasiones se produce el diagnóstico después del nacimiento. La tasa de falsos negativos obtenida en el total de las muestras de este estudio es del 12 %.

Los resultados aportados en el estudio de Speevak (2011) muestran 7 casos de falsos negativos de QF-PCR que se detectaron posteriormente con cariotipo. En base a los resultados obtenidos, el estudio de Speevak (2011) recomienda, la realización de QF-PCR exclusivamente en embarazos de bajo riesgo de anomalías cromosómicas o con incremento de riesgo por una trisomía común.

La tasa falsos negativos calculada en todos los estudios muestra unos valores comprendidos entre 0 y 18 %. Esta tasa se utiliza con frecuencia en lugar de la sensibilidad. Otros estudios han documentado la conveniencia de uso de QF-PCR como prueba única en embarazos no complicados que son referidos por un incremento del riesgo de aneuploidías más comunes (Badenas, 2010; Langlois, 2011), basándose en la mayor especificidad de la técnica para este tipo de anomalías. Entre las anomalías no detectadas mediante QF-PCR, se encuentran las anomalías estructurales como translocaciones, deleciones, inversiones, marcadores supernumerarios, los mosaicismos con presencia de la línea celular anómala en menos del 15 % de la muestra y otras aneuploidías distintas a 13, 18 y 21.

Solo en un estudio de los 5 incorporados a esta revisión se expone un caso falso positivo en una muestra de vellosidades coriales, informado como trisomía 13 mediante QF-PCR y en el que se obtuvo un resultado normal en el cariotipo, Este resultado fue debido a mosaicismo confinado a placenta. La tasa de falsos positivos calculada para este estudio fue del 1 %. (Hills, 2010). La revisión de este y otros casos similares documentados previamente (Mann, 2007; Waters, 2007) determinó la modificación de la técnica de preparación de las muestras de vellosidades coriales y una mejora en los informes de este tipo de resultados, con la finalidad de evitar un diagnóstico erróneo mediante QF-PCR debido a mosaicismo cromosómico confinado a placenta y no presente en el feto. Los resultados obtenidos por Mann (2012a), mostraron que desde la modificación del procesamiento de las muestras de vellosidades coriales en 2006, solo se detectó un caso de mosaicismo placentario discrepante entre cariotipo y QF-PCR de un total de 10.222 muestras de vellosidades coriales analizadas, lo que supone una frecuencia de 0,009 %.

Se ha localizado un estudio que evalúa la realización de QF-PCR como alternativa al cultivo corto o directo, complementando el análisis con la realización de cultivo largo en muestras de vellosidades coriales (*Christopoulou*, 2009). Con respecto al mosaicismo fetal verdadero, si se comparan los resultados discordantes en el diagnóstico de mosaicismo fetal, QF-PCR presenta mayor discordancia con el cultivo largo (0,24 %) que si se compara el cultivo largo con el cultivo corto (0,14 %). Actualmente, se considera como patrón de referencia para el diagnóstico de anomalías cromosómicas en muestras de vellosidades coriales la realización de un cultivo directo del citotrofoblasto junto a un cultivo largo del mesénquima, aunque en el estudio de Hills (2010) no se considera la procedencia de las muestras, ya sea líquido amniótico o vellosidad corial, para decidir el tipo de análisis, y la realización de cariotipo o no.

En relación con el estudio del mosaicismo, Hsu (1992), estimó el riesgo de un fenotipo anómalo asociado con mosaicismo de cromosomas sexuales en un 10 %. La utilización de QF-PCR como técnica de diagnóstico de cromosopatías sexuales sin detección previa de anomalías ecográficas se ha incorporado en algunos centros, como los pertenecientes a la Comunidad Asturiana. En el estudio de Hills (2010) se muestra una concordancia completa en todos los casos diagnosticados de cromosopatías sexuales con QF-PCR y cariotipo.

Como limitaciones del procedimiento de diagnóstico mediante QF-PCR, en los estudios incluidos en esta revisión se muestran los datos referidos a diferentes fallos de la técnica, considerando como tal el fallo de extracción de ADN, resultado equívoco o no concluyente o muestra insuficiente. De los 5 estudios incluidos, solo en uno de ellos se presentaron resultados sobre fallos de la técnica, mostrando una tasa de 0,4 % para QF-PCR (*Christopoulou*, 2009).

Además, la QF-PCR presentó un riesgo de limitación de la detección de cromosopatías derivado del diseño de la técnica, previo a su ejecución, al estar dirigida a determinadas cromosopatías diana, en concreto trisomía 13, 18, 21 y cromosopatías sexuales. La incapacidad de QF-PCR para detectar anomalías estructurales con repercusión clínica o aneuploidías de cromosomas que no han sido examinados, son aspectos limitantes que hay que valorar.

Como limitaciones de esta revisión se encuentra la heterogeneidad de los estudios incluidos en relación a la población analizada (clasificación de riesgo en embarazadas), en los STR de la QF-PCR (en dos de los estudios seleccionados para la síntesis de resultados de precisión se han utilizado técnicas comerciales y en tres se ha utilizado una prueba fabricada “in house”) y diferentes marcadores derivados de la evolución

de la técnica. Dentro de las diferentes técnicas disponibles, el número de marcadores puede oscilar entre 26 y 42 marcadores. En algunas técnicas se han incorporado incluso marcadores para los cromosomas 15, 16 y 22.

Otra limitación está relacionada con la calidad de los estudios incluidos y la ausencia de los resultados sobre la seguridad de la técnica y sobre los eventos adversos relacionados con la obtención de la muestra necesaria para el análisis mediante QF-PCR. A pesar de necesitar la realización de una prueba invasiva para la obtención de la muestra, y que *a priori*, conllevaría la aparición de eventos adversos relacionados con la técnica, no se han localizado resultados sobre este aspecto. Estas circunstancias hacen que la generalización de resultados deba ser tomada con cautela.

Conclusiones

- La QF-PCR es una técnica menos precisa que el cariotipo y no permite estudiar la dotación cromosómica completa fetal. Frente a los estudios citogenéticos clásicos, presenta ventajas como un menor coste, posibilidad de automatización y rapidez en el diagnóstico, no siendo necesario el cultivo de la muestra. Como desventajas se presentan los fallos de detección de aneuploidías de otros cromosomas diferentes al 13, 18, 21, no detección de pequeños mosaicismos de estos cromosomas y no detección de anomalías estructurales.
- La tasa de falsos negativos de la QF-PCR fue mayor que la detectada en los análisis citogenéticos y se obtuvo principalmente en mosaicismos y anomalías estructurales. Las trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21 fueron las patologías con menor número de falsos negativos, siendo, por tanto, de mayor rentabilidad diagnóstica. Sólo un estudio presentó un resultado falso positivo, debido a mosaicismo confinado en la placenta.
- En los estudios localizados no se describieron resultados referidos a la seguridad. Al ser una técnica invasiva no exenta de riesgo, sería relevante conocer los datos obtenidos sobre posibles eventos adversos relacionados con la recogida de la muestra mediante registro de eventos adversos.
- Se ha localizado una única experiencia en el Reino Unido que recomienda la realización de QF-PCR para el diagnóstico prenatal de síndrome de Down en embarazos con un riesgo superior a 1/150 en el cribado prenatal de síndrome de Down. Para el resto de las indicaciones, la técnica diagnóstica elegida es el cariotipo. En otros países, como Suecia y Holanda, se ofrece a las embarazadas la posibilidad de elegir entre cariotipo o QF-PCR.
- En España, en concreto en la Comunidad de Asturias, se ha comenzado a recomendar como técnica única la QF-PCR, aunque señalan la conveniencia de ser prudente y solicitar ambas pruebas por el momento. Indican que la QF-PCR es admisible para gestaciones con prueba de cribado positivo, pero el cariotipo debe realizarse de forma simultánea si hay antecedentes familiares o

personales de anomalías cromosómicas o datos ecográficos positivos.

Recomendaciones

En caso de decidir la incorporación de la QF-PCR como prueba de confirmación diagnóstica de diagnóstico prenatal en mujeres que presenten un riesgo de anomalías cromosómicas en el cribado prenatal, debería ir acompañada de un seguimiento y evaluación de los resultados mediante estudios de implantación y un registro continuo de pacientes.

Referencias

Alfirevic, Z., Sundberg, K., & Brigham, S. (2003). Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *The Cochrane database of systematic reviews*, (3), CD003252.

Andreasen E & Kristoffersen K. (1989). Incidence of spontaneous abortion after amniocentesis: influence of placental localization and past obstetric and gynaecologic history. *American Journal of Perinatology*, 6(2), 268-673.

Antsaklis A, Papantoniou N, Xygakis A, Mesogitis S, Tzortzis E & Michalas S. (2000) Genetic amniocentesis in women 20-34 years old: associated risks. *Prenatal diagnosis*, 20(3),247-250.

Armengol, L., Nevado, J., Serra-Juhe, C., Plaja, A., Mediano, C., Amalia Garcia-Santiago, F.,... Alberto Perez-Jurado, L. (2012). Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Human Genetics*, 131(3), 513–523.

Association for Clinical Cytogenetics and Clinical Molecular Genetics Society (ACC-CMGS). (2012). QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy best practice guidelines (2012) V3.01. Recuperado de http://www.cmgs.org/BPGs/QFPCR_bp_jan2012_3.01.pdf

Badenas, C., Rodriguez-Reventa, L., Morales, C., Mediano, C., Plaja, A., Perez-Iribarne, M. M.,... Soler, A. (2010). Assessment of QF-PCR as the first approach in prenatal diagnosis. *The Journal of molecular diagnostics*, 12(6), 828-834.

Baig, S., Ho, S. S. Y., Ng, B. L., Chiu, L., Koay, E. S. C., Leow, G. H., ... Choolani, M. (2010). Development of quantitative-fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal diagnosis of common chromosomal aneuploidies in 1,000 samples in Singapore. *Singapore medical journal*, 51(4), 343-348.

Bandyopadhyay, R., McCaskill, C., Knox-Du Bois, C., Zhou, Y., Berend, S. A., Bijlsma, E., & Shaffer, L. G. (2003). Mosaicism in a patient with Down syndrome reveals postfertilization formation of a Robertsonian

translocation and isochromosome. *American journal of medical genetics*. Part A. 116A(2), 159–163.

Barranco, L., Cirigliano, V., Lloveras, E., Ordonez, E., Herrero, M., Fernandez, D., ... Plaja, A. (2011). Quantitative Polymerase Chain Reaction and long term culture: The best method for cytogenetic study of chorionic villus sampling? *Diagnostico Prenatal*, 22(3), 86–91.

Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C., & Modest, E. J. (1970). Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma*, 30(2), 215–227.

Christopoulou, S., Christopoulou, G., Hatzaki, A., Hatzipouliou, A., Donoghue, J., Karkaletsis, M., ... Velissariou, V. (2009). The replacement of cytogenetic analysis by direct chorionic villi sampling preparation with quantitative fluorescence PCR. *Gynecologic and obstetric investigation*. 68(4), 255-61.

Cirigliano, V., Voglino, G., Ordonez, E., Marongiu, A., Paz Canadas, M., Ejarque, M., ... Adinolfi, M. (2009). Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenatal diagnosis*, 29(1), 40-49.

Comas, C., Echevarria, M., Carrera, M., & Serra, B. (2010). Rapid aneuploidy testing versus traditional karyotyping in amniocentesis for certain referral indications. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine*. 23(9), 949-955.

Driscoll, D. A., & Gross, S. (2009). Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy. *The New England journal of medicine*, 360(24), 2556–62.

Giorlandino C, Bilancioni E, D'Alessio & P, Muzii L. (1994). Risk of iatrogenic fetal infection at prenatal diagnosis. *Lancet*. 343(8902), 922-923.

Ghidini, A., Sepulveda, W., Lockwood, C. J., & Romero, R. (1993). Complications of fetal blood sampling. *American journal of obstetrics and gynecology*, 168(5), 1339–44.

Hartway, S. (2009). A parent's guide to the genetics of Down syndrome. *Advances in neonatal care*, 9(1), 27–30.

Hills, A., Donaghue, C., Waters, J., Waters, K., Sullivan, C., Kulkarni, A., ... Ogilvie, C. M. (2010). QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region. *Prenatal diagnosis*, 30(6), 509–517.

Hsu, L. Y., Kaffe, S., Jenkins, E. C., Alonso, L., Benn, P. A., David, K... Hirschhorn, K. (1992). Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. *Prenatal diagnosis*, 12(7), 555–573.

Langlois S & Duncan A. (2011). Use of a DNA method, QF-PCR, in the prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada*, 33(9), 955-960.

Mann, K., Kabba, M., Donaghue, C., Hills, A., & Ogilvie, C. M. (2007). Analysis of a chromosomally mosaic placenta to assess the cell populations in dissociated chorionic villi: implications for QF-PCR aneuploidy testing. *Prenatal diagnosis*, 27(3), 287–289.

Mann, K., Hills, A., Donaghue, C., Thomas, H., & Ogilvie, C. M. (2012)a. Quantitative fluorescence PCR analysis of >40,000 prenatal samples for the rapid diagnosis of trisomies 13, 18 and 21 and monosomy X. *Prenatal diagnosis*, 32(12), 1197–1204.

Mann, K., & Ogilvie, C. M. (2012)b. QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenatal diagnosis*, 32(4), 309-314.

Mansfield, E. S. (1993). Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Human molecular genetics*, 2(1), 43–50.

Martín Andrés, A. & Luna del Castillo J.D. (2004). Bioestadística para las ciencias de la salud. Madrid: Norma –Capitel.

Matthews, A. L. (1999). Chromosomal abnormalities: trisomy 18, trisomy 13, deletions, and microdeletions. *The Journal of perinatal & neonatal nursing*, 13(2), 59–75.

Mujezinovic, F., & Alfirevic, Z. (2007). Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstetrics and gynecology*, 110(3), 687–694.

NHS Fetal Anomaly Screening Programme. (2011). Screening for Down's syndrome: UK NSC Policy recommendations 2011–2014 Model of Best Practice. Exeter, NHS Fetal Anomaly Screening Programme. Recuperado de <http://fetalanomaly.screening.nhs.uk/getdata.php?id=11393>.

NHS Fetal Anomaly Screening Programme. (2013). Trisomy 18 (also called Edward's syndrome or T18). NHS Fetal Anomaly Screening Programme. Recuperado de <http://fetalanomaly.screening.nhs.uk/getdata.php?id=11583>.

NHS Fetal Anomaly Screening Programme. (2013). Trisomy 13 (also called Patau's syndrome or T13). NHS Fetal Anomaly Screening Programme. Recuperado de <http://fetalanomaly.screening.nhs.uk/getdata.php?id=11577>.

Nicolaides, K. H. (2011). Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenatal diagnosis*, 31(1), 7–15.

Ogilvie, Caroline Mackie, Lashwood, A., Chitty, L., Waters, J. J., Scriven, P. N., & Flinter, F. (2005). The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing. *British journal of obstetrics and gynaecology*, 112(10), 1369–1375.

Osakidetza. (2013). Programa de cribado prenatal de síndrome de Down y otras anomalías cromosómicas (PCP). Vitoria, Osakidetza. Recuperado de http://www.osakidetza.euskadi.net/r85cksalu05/es/contenidos/informacion/programa_down/es_down/programa.html.

Putzova, M., Soldatova, I., Pecnova, L., Dvorakova, L., Jencikova, N., Goetz, P., & Stejskal, D. (2008). QF-PCR-based prenatal detection of common aneuploidies in the Czech population: five years of experience. *European journal of medical genetics*, 51(3), 209–218.

Saller, D. N., & Canick, J. A. (2008). Current methods of prenatal screening for Down syndrome and other fetal abnormalities. *Clinical obstetrics and gynecology*, 51(1), 24–36.

Servicio Andaluz de Salud (SAS). Consejería de Salud (2009). Programa Andaluz de Cribado de Anomalías Congénitas (PACAC). Sevilla, SAS.

Servicio de Salud del Principado de Asturias (AsturSalud). Consejería de Salud y Servicios Sanitarios. (2011). Programa de Detección de Anomalías Cromosómicas Fetales del Principado de Asturias. Oviedo, AsturSalud.

Simoni, G., & Rossella, F. (1986). First trimester fetal karyotyping using chorionic villi: technical development and diagnostic application. *Experientia*, 42(10), 1097-1101.

Sparkes, R., Johnson, J.A., Langlois, S., Wilson, R.D., Allen, V., Blight, C.,... Wyatt, P. (2008). New molecular techniques for the prenatal detection of chromosomal aneuploidy. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada*, 30(7), 617-621, 622-627.

Speevak, M. D., McGowan-Jordan, J., & Chun, K. (2011). The detection of chromosome anomalies by QF-PCR and residual risks as compared to G-banded analysis. *Prenatal diagnosis*, 31(5), 454-458.

Tabor A, Philip J, Madsen M, Bang J, Obel EB & Nørgaard-Pedersen B. (1986). Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet*, 1(8493), 1287-1293.

The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care (SBU). (2006). Methods of Early Prenatal Diagnosis. Stockholm, SBU, 2006.

Vejerslev LO & Mikkelsen M. (1989). The European collaborative study on mosaicism in chorionic villus sampling: data from 1986 to 1987. *Prenatal diagnosis*, 9(8), 575-588.

Waters, J. J., Mann, K., Grimsley, L., Ogilvie, C. M., Donaghue, C., Staples, L., ... Wilson, C. (2007). Complete discrepancy between QF-PCR analysis of uncultured villi and karyotyping of cultured cells in the prenatal diagnosis of trisomy 21 in three CVS. *Prenatal diagnosis*, 27(4), 332–339.

Zeinali, S., Tavakol, Z. K., Kianfar, S., Kariminejad, A., Mahdieh, N., Hashemi, M., & Zeinali, Z. (2012). Detection of numerical aneuploidy of chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 in 100 blood and fetals samples by QF-PCR method. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*, 5(6), 147–151.

Anexos

Anexo 1

Estrategia de búsqueda bibliográfica

Las estrategias de búsqueda fueron ejecutadas en las bases de datos referenciales MEDLINE y EMBASE mediante interfaz Ovid. En el caso de *Science Citation Index expanded*, fueron ejecutadas a través de Web of Science (WOS). Se realizaron búsquedas complementarias para evitar la pérdida de documentos relevantes, realizando estrategias muy sensibles y complementándose posteriormente con búsquedas muy específicas.

Los criterios específicos utilizados para cada búsqueda se muestran a continuación:

BÚSQUEDA MEDLINE

Estrategia de búsqueda

Límites: Medline (1996-Agosto semana 2, 2013) (Revisiones)

1. Prenatal Diagnosis/ (13801)
2. Pregnancy/ (287247)
3. 1 or 2 (289551)
4. exp chromosome aberrations/ (61395)
5. exp chromosome disorders/ (25261)
6. 4 or 5 (79474)
7. 3 and 6 (9708)
8. exp Polymerase Chain Reaction/ (304246)
9. qf pcr.ti.ab. (196)
10. 8 and 9 (159)
(límites / resultados)
11. limit 10 to "reviews (best balance of sensitivity and specificity)" (12)
12. limit 10 to evaluation studies (23)
13. 11 or 12 (35)

Límites: Medline (1996-Agosto semana 4, 2013) (Revisiones)

1. Prenatal Diagnosis/ (13835)
2. Pregnancy/ (288237)
3. 1 or 2 (290548)

4. exp chromosome aberrations/ (61525)
5. exp chromosome disorders/ (25336)
6. 4 or 5 (79664)
7. 3 and 6 (9736)
8. exp Polymerase Chain Reaction/ (305371)
9. pcr.ti,ab. (285785)
10. 8 or 9 (449734)
11. 7 and 10 (711)
(límites / resultados)
- 12 limit 11 to "reviews (best balance of sensitivity and specificity)" (99)

Límites: Medline (1996-Agosto semana 4, 2013) (Revisiones)

1. Prenatal Diagnosis/ (13835)
2. Pregnancy/ (288313)
3. 1 or 2 (290624)
4. exp chromosome aberrations/ (61536)
5. exp chromosome disorders/ (25338)
6. 4 or 5 (79677)
7. 3 and 6 (9737)
8. exp Polymerase Chain Reaction/ (305473)
9. pcr.ti,ab. (285975)
10. 8 or 9 (449984)
11. 7 and 10 (711)
(límites / resultados)
12. limit 11 to "reviews (best balance of sensitivity and specificity)" (99)
13. limit 11 to evaluation studies (40)
14. 12 or 13 (138)

Límites: Medline (1996-Agosto semana 2, 2013)(Pruebas diagnósticas)
Prenatal Diagnosis/ (13802)

1. Pregnancy/ (287301)
2. 1 or 2 (289605)
3. exp chromosome aberrations/ (61405)
4. exp chromosome disorders/ (25263)
5. 4 or 5 (79486)
6. 3 and 6 (9708)
7. exp Polymerase Chain Reaction/ (304324)
8. qf pcr.ti,ab. (196)
9. 8 and 9 (159)

10. "sensitivity and specificity"/ or "limit of detection"/ or roc curve/ or "predictive value of tests"/ (345503)
11. Area Under Curve/ (23725)
12. "Reproducibility of Results"/ (230545)
13. Diagnostic Errors/ (14395)
14. False Negative Reactions/ or False Positive Reactions/ (16936)
15. (Sensitivity or Specificity or (predictive adj2 value) or reproductibility or "ROC" or (area adj2 curve)).ab. (473193)
16. or/11-16 (874639)
17. 10 and 17 (44)
(límites / resultados)
18. limit 18 to "reviews (best balance of sensitivity and specificity)" (4)
19. limit 18 to evaluation studies (10)
20. 19 or 20 (14)
21. 18 not 21 (30)

Límites: Medline (1996-Agosto semana 4, 2013)(Pruebas diagnósticas)

1. Prenatal Diagnosis/ (13835)
2. Pregnancy/ (288313)
3. 1 or 2 (290624)
4. exp chromosome aberrations/di, ge (8709)
5. exp chromosome disorders/di, ge (13341)
6. 4 or 5 (21136)
7. 3 and 6 (4569)
8. exp Polymerase Chain Reaction/ (305473)
9. (pcr or "Polymerase Chain Reaction").ti. (38590)
10. 8 or 9 (308367)
11. 7 and 10 (290)
12. "sensitivity and specificity"/ or "limit of detection"/ or roc curve/ or "predictive value of tests"/ (346797)
13. Area Under Curve/ or "auroc".ab. (24418)
14. "Reproducibility of Results"/ (231452)
15. Diagnostic Errors/ (14450)
16. False Negative Reactions/ or False Positive Reactions/ (16996)
17. (Sensitivity or Specificity or (predictive adj2 value) or reproductibility or "ROC" or (area adj2 curve)).ab. (475232)
18. or/12-17 (878227)
19. 11 and 18 (67)

BÚSQUEDA EMBASE
 Estrategia de búsqueda
 Límites: Embase Resultados (2 Sep 2013)
 No. Query
 Results
 #14 #13 AND [embase]/lim
 84
 #13 #11 NOT #12
 98
 #12 #11 AND ('conference abstract'/it OR 'conference paper'/it
 OR 'editorial'/it OR 'letter'/it OR 'note'/it)
 30
 #11 #7 AND #10
 128
 #10 #8 OR #9
 1120427
 #9 sensitivity:ab OR specificity:ab OR (predictive NEAR/2 value):ab
 OR
 reproductibility:ab OR 'roc':ab OR (area NEAR/2 curve):ab OR
 'auroc':ab 813412
 #8 'sensitivity and specificity'/de OR 'limit of detection'/de
 OR 'receiver operating characteristic'/de OR 'area under the
 curve'/de
 OR 'predictive value'/de OR 'diagnostic error'/exp
 OR 'measurement precision'/exp
 455556
 #7 #3 AND #6
 774
 #6 #4 OR #5
 254490
 #5 'qf pcr':ab,ti
 310
 #4 'polymerase chain reaction'/de
 254389
 #3 #1 AND #2
 15260
 #2 'chromosome aberration'/exp OR 'chromosome disorder'/de
 156324
 #1 'prenatal diagnosis'/de OR 'pregnancy'/de
 OR 'first trimester pregnancy'/de OR 'pregnant woman'/de
 615795

BÚSQUEDA WEB OF SCIENCE

Estrategia de búsqueda

Límites: WOS (2012-2013)

4 38 #3 Databases=SCI-EXPANDED Timespan=2012-2013

3 225 #2 AND #1

2 42,501 Topic=(prenatal diagnosis) OR Topic=(chromosome aberrations) OR

Title=(prenatal diagnosis)

1 321 Title=("quantitative fluorescent polymerase chain reaction"

OR

"qf pcr") OR Topic=("quantitative fluorescent polymerase chain reaction" OR "qf pcr")

Anexo 2: Valoración de la calidad de los estudios de pruebas diagnósticas

| ARTÍCULO | PACIENTES | | | PRUEBA | | | | RESULTADOS | | | PÉRDIDAS | |
|--------------------|-----------|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------|--|----------------------------|---|----------|--|
| | Tipo | Pacientes representativos | Criterios selección descritos | Gold Standard es la óptima | Tiempo corto entre ambas pruebas | Todos los pacientes hicieron GS | Todos la misma GS | Nueva prueba bien descrita para reproducción | Interpretación GS a ciegas | Nueva prueba, mismos datos que en la practica | | Se recogieron resultados no interpretables |
| Autores | | | | | | | | | | | | |
| Armengol 2012 | PD | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Si | Sí | Sí |
| Speevak 2011 | PD | Sí | Sí | Sí | Sí | No* | Sí | No | No | Si | Sí | Sí |
| Baig 2010 | PD | Sí | Sí | Sí | Sí (48) | Sí | Sí | Sí | Si | Si | Sí | Sí |
| Hillis 2010 | PD | No | Sí | Sí | Sí | No | Sí | Sí | No | Si | Sí | Sí |
| Christopoulou 2009 | PD | Sí | Sí | Parcial | Si | No | No | Si | No | Si | Si | Sí |

*: La prueba nueva no se hizo a todos los pacientes, PD: Pruebas diagnósticas, GS: Gold estándar o prueba de referencia

Anexo 3: Escala de nivel de evidencia

Tabla 11: niveles de evidencia para estudios de exactitud diagnóstica (NICE 2006)

| Niveles de evidencia | Tipo de evidencia | Probabilidad de sesgo |
|----------------------|---|-----------------------|
| Ia | Revisión sistemática con homogeneidad (a) de estudios nivel 1 (b) | Baja |
| Ib | Estudios nivel 1(b) | Baja |
| II | Estudios nivel 2 (c) Revisión sistemática de estudios nivel 2 | Moderada |
| III | Estudios nivel 3 (d) Revisión sistemática de estudios nivel 3 | Alta |
| IV | Consenso de expertos o recomendaciones basadas en fisiología y estudios básicos | Alta |

(a) Homogeneidad significa que no hay o solo son menores variaciones en la dirección y grado de los resultados entre los estudios incluidos

(b) Estudios nivel 1:

- Usan comparación enmascarada de la prueba con un patrón de referencia validado.
- En una muestra de pacientes que reflejan la población a la que se aplicará el test.

(c) Estudios nivel 2 son aquellos que tiene solo uno de los siguientes:

- Población restringida (la muestra no refleja la población a la que se aplicará el test).
- Utilizan un patrón de referencia de baja calidad (definido como aquel en que el test está incluido en la referencia o donde el test afecta a la referencia.
 - La comparación entre el test y la referencia no es enmascarada
 - Estudios de casos y controles.

(d) Estudios nivel 3 son aquellos que tienen dos o más de las características especificadas para los estudios de nivel 2.

