

DetECCIÓN DE ADN FETAL LIBRE EN SANGRE MATERNA PARA DIAGNÓSTICO PRENATAL DE ANEUPLOIDÍAS

Revisión sistemática

Informe de síntesis
de tecnologías emergentes

Prenatal screening for
aneuploidy using free fetal DNA
in maternal blood. Systematic
Review of the Literature.

Executive summary

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA 2011 / 2-7

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Ministerio de Economía y Competitividad
Asociación Española de
Instituto de Salud
Carlos III



MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD

Plan de Calidad
del Sistema Nacional
de Salud



JUNTA DE ANDALUCÍA
PROCESO DE CALIDAD Y SERVICIO 2008

Detección de ADN fetal libre en sangre materna para diagnóstico prenatal de aneuploidías

Revisión sistemática

Informe de síntesis de tecnologías emergentes

Prenatal screening for aneuploidy using free fetal DNA in maternal blood. Systematic Review of the Literature.

Executive summary

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA 2011 / 2-7

Baños Álvarez, Elena

Detección de ADN fetal libre en sangre materna para diagnóstico prenatal de aneuploidías. Elena Baños Álvarez y Aurora Llanos Méndez — Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía, 2012.

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

1. Enfermedades fetales / diagnóstico 2. Enfermedades fetales / genética. I. Llanos Méndez, Aurora II. Andalucía. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias III. España. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad IV. España. Ministerio de Economía y Competitividad

Este documento se ha realizado en el marco de colaboración previsto en el Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud elaborado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, al amparo del convenio de colaboración suscrito por el Instituto de Salud Carlos III, organismo autónomo del Ministerio de Economía y Competitividad y la Fundación Progreso y Salud de Andalucía

Autores: Elena Baños Álvarez y Aurora Llanos Méndez

Revisores: Estrella Carrillo Cruz. Facultativo Especialista de Área de Hematología Clínica y Laboratorio de Citogenética / FISH

Edita: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía
Avda. de la Innovación. Edificio ARENA 1
41020 Sevilla
España – Spain

ISBN: 978-84-15600-08-4

NIPO: 725-12-058-7 (MINECO). 680-12-115-7 (MSSSI)

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

Detección de ADN fetal libre en sangre materna para diagnóstico prenatal de aneuploidías

Revisión sistemática

Informe de síntesis de tecnologías emergentes

Prenatal screening for aneuploidy using free fetal DNA in maternal blood. Systematic Review of the Literature.
Executive summary

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA 2011 / 2-7

Conflicto de Interés

Las autoras 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.

Índice

Puntos clave.....	11
Key points.....	13
Descripción de la tecnología	15
Características clínicas	25
Justificación.....	29
Objetivos	31
Metodología	33
Resultados	35
Aspectos económicos.....	51
Discusión.....	53
Referencias	57
Anexos.....	61
Anexo 1. Estrategias de búsqueda.	61
Anexo 2. Resultados de la búsqueda.	62
Anexo 3. Calidad de los estudios (QUADAS)	63

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad del cff ADN en la determinación del sexo.....	21
Tabla 2. Trisomías más prevalentes.	26
Tabla 3. Características principales de los estudios de pruebas diagnósticas incluidos en la revisión.	39
Tabla 4. Principales datos demográficos del estudio caso-control.....	40
Tabla 5. Principal indicación para ser incluidas en el estudio caso-control	41
Tabla 6. Principales resultados de los estudios diagnósticos.	47

Puntos clave

- Los métodos de diagnóstico de aneuploidías mediante ADN fetal libre en sangre materna, en embarazos de riesgo, podrían evitar la realización de pruebas invasivas como amniocentesis o biopsia de corion, disminuyendo las molestias y ansiedad que generan, así como posibles complicaciones en el parto causadas por la instrumentalización e incluso el riesgo de pérdida fetal.
- Los objetivos específicos de esta revisión se centraron en valorar la eficacia, efectividad y seguridad de las técnicas de diagnóstico de aneuploidías usando ADN fetal libre en sangre materna.
- Se recuperaron 3 documentos para su análisis, 2 estudios de pruebas diagnósticas y 1 estudio de casos y controles.
- Los estudios de pruebas diagnósticas verificaron la validez diagnóstica de la secuenciación masiva en paralelo (MPSS) como método de identificación y cuantificación de ADN fetal, con sensibilidad entre 79,1% y 100% y especificidad entre 97,9% y 99,7%. Estas pruebas mostraron mayor capacidad para descartar la enfermedad que para detectarla.
- Se obtuvieron valores similares al estimar la eficacia diagnóstica (curvas ROC de 1 y 0,98) de los dos protocolos de multiplicación empleados (2-plex y 8-plex). Sólo presentaron diferencias en los valores de z, significativamente mayores en el protocolo 2-plex ($p < 0,001$) y en el mayor porcentaje de cromosoma 21 identificado con el 8-plex ($p < 0,001$).
- Existió una fuerte asociación negativa entre peso materno y fracción fetal, así como entre peso materno y valores z, una fuerte asociación positiva entre valores z y fracción fetal en los casos ($p < 0,001$) y una pequeña asociación positiva entre edad gestacional y valores z. Con el resto de variables las asociaciones fueron insignificantes.
- No se encontró ningún estudio de evaluación económica pero uno de los trabajos incluidos calculó el coste del diagnóstico prenatal en embarazos de alto riesgo de aneuploidías, incluyendo la MPSS en el proceso antes de realizar amniocentesis o biopsia corial, mostrando una importante reducción de pérdidas fetales causadas por la instrumentalización de las técnicas invasivas y un posible gran ahorro económico.

Key points

- Prenatal screening for aneuploidy using free fetal DNA in maternal blood, in pregnancies at high risk, could avoid invasive diagnostic testing such as amniocentesis or chorionic villus sampling, reducing the discomfort and the anxiety they generate, and the possible birth complications caused by instrumentation and even the risk of fetal loss.
- The specific objectives of this review focused on evaluating the efficiency, effectiveness and safety of prenatal diagnosis for aneuploidy using free fetal DNA in maternal blood.
- 3 documents were retrieved for their analysis, 2 diagnostic tests studies and 1 case-control study.
- The diagnostic tests studies verified the validity of massively parallel shotgun sequencing like the identification and quantification DNA method, with sensitivity between 79,1% and 100% and specificity between 97,9% and 99,7%. These tests showed greater ability to rule out the infection than to detect it.
- Similar values were obtained estimating the diagnostic efficacy (ROC curves were 1,0 and 0,98) from the two sequencing protocols used (2-plex and 8-plex). They only presented differences in the z-score, significantly higher in 2-plex protocol ($p < 0,001$) and in the higher identification of percentage chromosome 21 in 8-plex sequencing ($p < 0,001$).
- There was a strong negative association between maternal weight and percentage fetal DNA and also between maternal weight and z-score values, an strong positive association between z-score and percentage fetal DNA only in cases and just a little positive association between gestational age and z-score values. The rest of the variables associations were insignificant.
- There was not economic evaluation study found but one of the selected studies calculated the prenatal screening costs in high risk pregnancies, including the MPSS in the process before the amniocentesis or the chorionic villus sampling and showed an important reduction of fetal loss caused by the invasive techniques and a possible great economic saving.

Descripción de la tecnología

Nombre de la tecnología

Diagnóstico prenatal de aneuploidías mediante la detección de ADN fetal libre en sangre materna.

Descripción de la tecnología

El aislamiento y procesado del ADN fetal libre (*cell free fetal DNA*, *cff DNA*) en sangre materna es una técnica no invasiva que permite el diagnóstico de aneuploidías y enfermedades monogénicas, así como identificación del sexo y Rh del feto. Mediante el enriquecimiento del *cff DNA* y/o selección de secuencias genéticas o epigenéticas específicas¹, se están desarrollando técnicas que permitan su correcta identificación y tratamiento.

Según la literatura, es posible aislar ADN fetal libre en sangre materna a partir de la 5ª semana de embarazo².

La fuente principal de ADN fetal libre en sangre materna es la apoptosis de células placentarias (sincitiotrofoblastos) aunque existe cierta evidencia de que la apoptosis de eritroblastos fetales también puede generar *cff DNA* que podría cruzar la placenta y entrar en la circulación materna^{4,3}.

Metodología de procesamiento y extracción del *cff DNA* de la sangre materna.

Existe cierta variabilidad para el procesado inicial y extracción o aislamiento del *cff DNA* desde el plasma materno de la muestra.

1. Procesamiento de la muestra.

La muestra de sangre materna es extraída de forma periférica, en tubos enriquecidos con anticoagulante^{5,6}, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), o bien sin enriquecimiento en el tubo^{7,8}. No existe consenso a la hora de especificar qué volumen de sangre es necesario extraer. Las cantidades oscilan desde 1,6-4,2 mililitros (mL)⁸ hasta 50 mL⁹.

Posteriormente, los métodos descritos para el procesado de la muestra tienen en común la centrifugación de la misma, medida como aceleración de la gravedad (g) a 1.600 g^{5,7,8}, 1.200g⁶ e incluso en algunos casos a 2.500g¹. Este proceso es llevado a cabo a 4°C de temperatura durante 10 minutos. Con este paso se consigue separar el plasma (sobrenadante que queda en la parte superior del tubo), de los restos celulares (precipitado).

Por último, el plasma se vuelve a centrifugar siguiendo el mismo proceso anteriormente descrito y a la misma temperatura^{5,7,8}, salvo en algunos casos en los que varía la velocidad del centrifugado (2.400g⁶ o 1.500g¹) y su duración (20 minutos⁶).

Tras estos pasos el plasma se almacena. Para su conservación existen diferencias a la hora de establecer la temperatura de congelación, con un rango que oscila entre los -80°C⁵ y -30°C⁶.

2. Extracción o aislamiento del ADN.

Una vez obtenido el plasma, es necesario el aislamiento del ADN. Para llevar a cabo esta tarea existen diversos kits^{10,11}:

QIAamp DNA Mini Kit y Blood Mini Kit (Qiagen): ambos test están diseñados para la purificación rápida de un media de 6 microgramos (µg) de ADN total (ya sea genómico, viral, mitocondrial) procedentes de 200 microlitros (µL) de sangre humana total, y hasta 50 µg de ADN de 200 µL de la capa leucocitaria, 5 x 10⁷ linfocitos, o células cultivadas que tienen un número normal de cromosomas (46 en el caso de seres humanos). El procedimiento es posible realizarlo con sangre completa (no necesariamente ha de ser plasma) tratada con citrato, heparina, o EDTA. Las muestras pueden ser frescas o congeladas. El QIAamp DNA Mini Kit realiza todas las funciones del ADN QIAamp Blood Mini Kit, y además permite la purificación de ADN procedente de tejido sólido.

QIAamp DNA Maxi Kit (Qiagen): Metodología similar a los anteriores pero recomendada cuando se va a trabajar con volúmenes mayores de sangre (>200 µL) y/o células cultivadas.

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen): Método para la purificación de ADN tras la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Limpia tamaños de ADN de entre 100 pares de bases (pb) y 1000 pb. Contiene membranas de silicio para la fijación del ADN con un tampón rico en sal y una elución (método por el cual se extrae una sustancia del medio sólido que la ha absorbido) con tampón bajo en sal o agua. El proceso de purificación es capaz de eliminar cebadores, nucleótidos, enzimas, aceite mineral, sal, agarosa, bromuro de etidio y otras impurezas.

NucleoSpin Plasma Kit (laboratorios Macherey-Nagel): Diseñado para el aislamiento de fragmentos de ADN mayores de 50 pb y de hasta 1000 pb, procedentes de plasma tratado con EDTA. Permite volúmenes de elución de entre 5-30 µL, resultando un ADN altamente concentrado.

MagnaPure LC System y High Pure PCR Template Preparation Kit (Laboratorios Roche): Métodos basados en una aproximación química-enzimática a la lisis celular, junto a inactivación de la nucleasa y cromatografía de absorción para la purificación del ácido nucleico. El origen de las muestras puede ser sangre completa, células cultivadas, 200 µL de capa leucocitaria, tejido sólido, etc.

CST Genomic DNA Purification Kit (laboratorios Invitrogen): Tecnología GeneCatcher fundamentada en una cobertura ionizable que puede unirse covalentemente a la superficie de una “perla magnética”, una membrana o tubos y placas de plástico. Cuando esa cobertura está cargada positivamente, funciona como una superficie capaz de unir eficientemente los ácidos nucleicos. Alterando posteriormente el pH de los *buffers*, se cambia la carga de la superficie de forma que los ácidos nucleicos sean liberados y recuperados en la solución. Las muestras posibles son sangre fresca completa, sangre almacenada con EDTA, heparina o citrato, muestras congeladas e incluso muestras antiguas y degradadas. Los volúmenes de sangre requeridos pueden estar entre 0,3-1 mL o 3-10 mL.

Métodos para la amplificación, detección e identificación de secuencias específicas de *cff DNA*.

Una vez purificados los fragmentos de ADN, hay que aumentar las diferencias existentes entre el ADN fetal y materno.

Enriquecimiento de la muestra.

Una limitación técnica para aislar *cff DNA* en sangre materna es que su proporción es de tan solo el 3-6 %⁴, aunque algún estudio lo eleva al 19%¹. Este porcentaje ha de ser aumentado, ya sea a expensas del numerador (ADN fetal), o disminuyendo parte del denominador (ADN materno).

Para llevar a cabo la primera posibilidad se han desarrollado métodos de enriquecimiento del ADN. Algunos están basados en la demostración de que las moléculas de ADN fetal circulantes en sangre materna, con una longitud media inferior a 313 pares de bases (pb), son más cortas que las maternas. Por tanto, al usar un fraccionamiento de tamaño estándar que seleccione exclusivamente moléculas de ADN con una longitud inferior a 300 pb, se enriquece el *cff DNA* de tal manera que llegue a ser el 70% del ADN total de la muestra. Este procedimiento presenta tendencia a la contaminación del ADN al usar técnicas de fragmentación del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa.

La disminución o supresión de ADN materno consiste en la adición de formaldehído al plasma, estabilizando las células e inhibiendo la liberación de ADN. De esta manera, reduciendo la presencia de ADN libre materno, aumenta la proporción de *cff DNA*⁴.

Amplificación y detección de ADN fetal.

El método más común existente hoy día para la amplificación de ADN es la PCR¹²⁻¹⁴ en cualquiera de sus variantes. Consiste en una técnica de biología molecular usada para la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN y que se basa en la repetición de un ciclo formado por 3 etapas:

1. Desnaturalización de la doble cadena de ADN.
2. Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras que se acaban de separar.
3. Elongación del cebador por actuación de la ADN polimerasa, creándose dos cadenas complementarias (una por hebra).

Con ella se consigue la replicación del ADN que se realiza en los organismos eucariotas por parte de la enzima ADN polimerasa. Dicha enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5'→3', usando un molde de cadena sencilla. Necesita iniciar el proceso con los cebadores (*primers*), que son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desee amplificar.

Otros métodos que no tienen como base la PCR.

1. **Hibridación in situ fluorescente¹¹ (FISH):** Técnica de citogenética molecular para detectar la localización de secuencias de ADN conocidas en determinados cromosomas, empleando sondas (*probes*) fluorescentes que se unen a determinadas partes del cromosoma con las que muestran un alto grado de similitud. El número de señales fluorescentes observadas mediante microscopía fluorescente indica el número de cromosomas presentes. Los resultados se obtienen entre 24-48 horas.
2. **Inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP)^{1,12}:** Su base asienta en que ciertos genes del ADN materno están metilados (silenciados) pero desmetilados en el feto (activos), por lo que es posible distinguir los alelos fetales de los maternos identificando estas regiones. Actúa sobre el ADN enriqueciendo las regiones altamente metiladas mediante uso de anticuerpos específicos para 5-metil-citosina o proteínas de unión a metilo. Posteriormente hibrida el ADN genómico y el anticuerpo.
3. **Espectrometría de masas (MS)^{1,12}:** Técnica experimental analítica basada en la posibilidad de separar especies moleculares según su masa. Es capaz de convertir las moléculas en iones a los que se les pueda dirigir y manipular por aplicación de campos eléctricos y magnéticos. La identificación de *cff DNA* siguiendo este método consiste en el análisis de la masa exacta de cada fragmento de ADN para determinar su secuencia genética y, por tanto, detectar alelos específicos fetales que se distinguen de las secuencias maternas por una diferencia tan mínima como una única base.

4. **Secuenciación masiva en paralelo (massive parallel sequencing, MPS)^{1,12}:** Puede basarse en:
 - a. **Pirosecuenciación del ADN:** Mide la liberación de pirofosfato en una reacción de polimerización mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido. Producen una imagen que se analiza para proporcionar flujogramas que, interpretados por ordenador, devuelven la secuencia exacta de los nucleótidos.
 - b. **Secuenciación por un finalizador químico reversible:** Método basado en la polimerización del ADN donde la incorporación de un nucleótido, marcado con fluorescencia, impide que ésta siga creciendo. Tras detectar la señal fluorescente se puede incorporar otro nucleótido marcado comenzando un nuevo ciclo.
 - c. **Secuenciación por enzimas ligasas:** Consigue secuenciar mediante unión de octámeros marcados que emiten una señal fluorescente.
 - d. **Inmunoprecipitación de la proteína de alta movilidad grupo N (HMGN5-IP-seq)^{1,12}:** En esta técnica los nucleosomas constituyen la diana. El tamaño medio más grande de *cff DNA* es de 169 pb, longitud que corresponde a la del ADN envuelto en un cromatosoma, que conforma un nucleosoma unido a una histona H1. Las proteínas de alta movilidad del grupo N (HBGN) son las únicas proteínas del núcleo que reconocen específicamente la estructura genética del core nucleosomal. Una de estas proteínas, la HMGN5, tiene una estructura molecular y un patrón de expresión únicos y parecen estar restringidas a la placenta y al sistema reproductivo. Esto significa que la inmunoprecipitación de la HMGN5 de ADN circulante puede enriquecer nucleosomas trofoblásticos específicos y que, analizados posteriormente mediante MPS, es la técnica conocida como HMGN5-ChIP-seq.
5. **Chips de ADN de polimorfismos de un solo nucleótido (DNA-SNP-array)^{1,12}:** un chip de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) es un conjunto de fragmentos de ADN unidos a una superficie sólida. Esta técnica se basa en la convergencia de hibridación del ADN, microscopía de fluorescencia y captura del ADN en una superficie sólida.

Identificación de secuencias específicas de *cff DNA*.

Existen ácidos nucleicos expresados exclusivamente por el feto, cuya detección en sangre materna permite la selección específica de una parte del ADN y por tanto, un análisis selectivo⁴. Además, su presencia significa que pueden ser usados para cuantificar la cantidad de *cff DNA* en sangre materna, independientemente del sexo. Este último dato es relevante ya que, hasta ahora, no ha sido posible discriminar directamente entre ADN materno y fetal para la cuantificación de cromosomas, a parte del cromosoma sexual y presente exclusivamente en fetos varones.

Entre los métodos que están siendo desarrollados para detectar marcadores fetales universales, destacan:

- Métodos para la detección de secuencias específicas de ADN localizadas en cromosomas autosómicos (no sexuales), y que pueden ser demostrados como herencia paterna:
 - **Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)¹:** Son puntos que difieren entre el genoma paterno y materno sin implicar que se trate de una enfermedad. Esta técnica requiere un enriquecimiento previo de la muestra y análisis por MS.
 - **Polimorfismo de repeticiones cortas en tándem (STR)⁷:** Son segmentos polimórficos que pueden variar entre el genoma paterno y materno. Al amplificarlos, teniendo en cuenta que el feto tendrá dos diferentes, uno por alelo de herencia paterna y otro por herencia materna diferentes entre si, se obtendrán dos productos de mayor entidad (los propios maternos y el heredado por el feto) y uno más pequeño correspondiente a la herencia paterna.
- Métodos epigenéticos^{1,8,14,15}:
 - **Metilación^{1,15}:** Existen perfiles de metilación diferentes entre el ADN materno y el fetal. Se ha demostrado la posibilidad de detección del gen SERPINB5, hipometilado en la placenta pero hipermetilado en ADN materno, y la factibilidad de este método mediante la alta correlación existente entre las concentraciones halladas de SERPINB5 hipometilado y el gen *sex-determining region Y* (SRY), presente en el brazo corto del cromosoma Y. La especial localización de este gen SERPINB5 (cromosoma 18) permite una aproximación diagnóstica de aneuploidías debidas a sobreexpresión de este cromosoma. Posteriormente se han descrito otros marcadores fetales epigenéticos^{1,8} como el gen RASSF1A, presente en el cromosoma 3 y numerosos marcadores existentes en el 21. Para llevar a cabo esta técnica es necesario el uso de bisulfito, que puede originar la degradación del ADN. Recientemente se han descubierto patrones de metilación inversos, hipermetilados en el ADN fetal e hipometilados en ADN materno, que resolverían el problema del bisulfito. Con ellos podrían usarse enzimas de restricción sensibles a la metilación, lisando la secuencias hipometiladas pero dejando intactas las hipermetiladas.
 - **Análisis del ratio alélico¹⁵:** Se basa en la diferencia existente entre el ratio alélico de un sujeto sano que es 1:1, y el de un feto afectado por alguna aneuploidía que será 2:1, 1:2 o incluso 1:1:1. Este método solo es posible utilizarlo si el feto es heterocigoto en el locus diana.

- **Métodos proteómicos¹:** Tecnología muy reciente fundamentada en la detección en sangre materna de proteínas codificadas por genes que se expresan exclusivamente en la placenta y/o en el feto.

Aplicaciones clínicas.

Determinación del sexo del feto¹⁶:

Aplicación más directa basada en la determinación del cromosoma Y. Su uso es importante para descartar enfermedades hereditarias ligadas al sexo (hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, desarrollo ambiguo de genitales, alteraciones endocrinas, etc.) En la tabla 1 pueden verse los datos de sensibilidad y especificidad obtenidos por diferentes estudios en este aspecto.

Se han descrito casos de falsos positivos en esta técnica debido a la presencia de un mellizo muerto. Para resolver esta limitación, se ha propuesto la realización de una ecografía de confirmación.

Edad gestacional	Sensibilidad	Especificidad
< 7º semana	74,5%	99,1%
7º-12º semana	94,8%	98,9%
13º-20º semana	95,5%	98,1%
> 20º semana	99,0%	99,6%

<: menor de; >: mayor de.

Enfermedades relacionadas con el embarazo¹⁷:

Esta aplicación puede dividirse en dos grandes grupos:

- **Antígeno Rhesus (Rh):** Antígeno situado en la superficie de los glóbulos rojos. El más conocido de estos es el D (RhD) y es el indicado para diagnosticar como ‘positiva’ o ‘negativa’ a una persona mediante el sistema de identificación sanguínea AB0. En caso de Rh fetal positivo, con herencia paterna positiva y materna negativa, se puede producir una eritroblastosis fetal. Esta enfermedad no es un problema durante el primer embarazo, ya que la madre aún no está sensibilizada, pero sí lo será en futuros embarazos. Como medida de profilaxis se administran anticuerpos anti-D en el tercer trimestre del embarazo por lo que la detección temprana del Rh fetal reduciría el número de profilaxis innecesarias hasta en el 40% de la población blanca-caucásica.

- **Anormalidades placentarias:** Diversas alteraciones relacionadas con la placenta han mostrado aumentar la concentración de *cff DNA* en sangre materna. Es el caso de eclampsia y preeclampsia, habiendo demostrado elevaciones de entre 2-3 y hasta 14 veces, respectivamente. Esto ha sugerido que el *cff DNA* podría ser útil como método de cribado para predecir preeclampsias en embarazadas asintomáticas y de bajo riesgo.

Trastornos de un solo gen¹⁸:

Enfermedad dominante

- Presente en el padre con madre sana: Más fácil de detectar y, una vez aislada la secuencia en ADN, se asumirá que es herencia paterna y pertenece al feto.
- Presente en la madre: No será posible el diagnóstico ya que no se puede distinguir si la secuencia en cuestión es herencia materna o ADN propio materno.

Hasta la fecha, se han publicado estudios con diagnóstico no invasivos sobre: Corea de Huntington, acondroplasia, distrofia miotónica.

Enfermedades recesivas

Son más difíciles de detectar. Aún no es posible distinguir la procedencia, paterna o materna, entre dos secuencias iguales de ADN.

Las enfermedades que han podido ser diagnosticadas, en al menos una mujer embarazada, mediante estudio de *cff DNA* obtenido por técnicas no invasivas son: Fibrosis quística, hemoglobinopatías e hiperplasia adrenal congénita.

Aneuploidías¹⁹⁻²¹:

Condición que hace referencia al cambio en el número de cromosomas presentes en el interior de la célula (ya sea por defecto o por exceso). Algunas de estas aneuploidías no son compatibles con la vida y conllevan el fallecimiento intrauterino del feto. Sin embargo, otras sí permiten llevar a término el embarazo.

En ellas aumentan o disminuyen la cantidad de *cff DNA* en sangre materna, aunque de la misma manera que otras enfermedades relacionadas con el embarazo. Por tanto, para su diagnóstico no basta con solo la detección, sino también la cuantificación de la cantidad de ADN derivado de un cromosoma específico.

Estado de desarrollo de la tecnología

Actualmente las técnicas diagnósticas no invasivas, disponibles para la clínica, que cuentan con reconocimiento de la FDA se basan en la detección de alelos paternos debido a su ausencia en el ADN genómico materno, con aplicación para determinación sexual del feto y de su Rh.

Difusión

Varía según la aplicación clínica:

- 1. Determinación del sexo del feto:** amplia difusión en EEUU y países de Europa, aunque se desconoce en España. Debido a que es la aplicación más directa de la detección de *cff DNA* en sangre materna, han surgido kits que se venden directamente a las personas que lo soliciten por internet.
- 2. Determinación del Rh:** Ampliamente desarrollado en Europa y Estados Unidos.
- 3. Trastornos de un solo gen:** Se desconoce.
- 4. Aneuploidías:** durante el año 2011 salió al mercado el primer kit con licencia en EEUU por laboratorios Sequenom, Inc. (San Diego, CA, USA). Otras compañías como Fluidigm, Verinata, Ravgen y/o Lenetix están desarrollando la misma tecnología pero aún existen dudas sobre si la patente obtenida por Sequenom es tan amplia como para evitar la salida al mercado de otros kits de diagnóstico prenatal no invasivo en sangre materna usando *cff DNA*.

Tecnologías alternativas

El gold estándar para el diagnóstico de anomalías cromosómicas es el establecimiento del cariotipo fetal², obteniéndolo a través de procedimientos invasivos tales como:

Amniocentesis

Toma de líquido amniótico de la cavidad uterina usando una aguja por vía transabdominal y cultivo posterior de las células obtenidas. La detección de las anomalías suele identificarse mediante cariotipo, aunque últimamente empieza a utilizarse hibridación fluorescente in situ. Los resultados están disponibles entre 7 y 10 días después del cultivo celular.

Las indicaciones diagnósticas más comunes son los estudios genéticos prenatales y la evaluación de la madurez pulmonar. Para el diagnóstico prenatal se considera que las semanas más óptimas son entre la 15 y la 17, siendo posible hacerla desde la semana 11. Sin embargo, la amniocentesis temprana está más asociada a pérdidas fetales y otras complicaciones del embarazo.

La complicación más grave es la muerte fetal, con un ratio de pérdida fetal^{4,22} que oscila entre 1/100 y 1/1000 procedimientos.

Biopsia corial

Se basa en la toma de muestras de la placenta y posterior análisis del ADN en ellas. Hay dos maneras de llevar a cabo esta técnica, por vía transcervical o transabdominal. Según se proceda con una u otra, serán diferentes los materiales requeridos, la posición de la madre, complicaciones, etc.

El momento de realización de la biopsia de corion es después de la semana 10, pero siempre durante el primer trimestre. Los resultados de esta técnica se pueden obtener a las horas de haberla realizado. La tasa estimada de muerte fetal^{4,22} por biopsia de corion se encuentra entre el 0,7-2%.

Características clínicas

Tipo de tecnología

Diagnóstico y cribado.

Ámbito de aplicación de la tecnología

Hospitalario.

Indicaciones

El diagnóstico prenatal de aneuploidías a través de ADN fetal libre en sangre materna estaría indicado como método de diagnóstico en mujeres con embarazos de riesgo para el desarrollo de estas alteraciones en el feto.

El ser humano tiene en su ADN 46 cromosomas, 22 pares de autosomas y una pareja de cromosomas sexuales. La aneuploidía es la condición por la cual la dotación cromosómica de una célula difiere de la normalidad. Esta malformación puede darse en dos circunstancias: retraso en la meiosis de un cromosoma o ausencia de disyunción meiótica.

En la especie humana hay 3 tipos diferenciados de aneuploidías: monosomías, trisomías autosómicas y trisomías sexuales.

Monosomías:

Presencia de 45 cromosomas en lugar de 46. En el ser humano esta condición no es compatible con la vida salvo el síndrome de Turner, exclusivo de la mujer. Consiste en la ausencia de uno de los dos cromosomas sexuales (45X0). No es hereditaria debido a la esterilidad de las mujeres afectadas.

Trisomías:

Triplicación de un cromosoma autosómico o bien duplicación de uno de los cromosomas sexuales. La mayor parte de estas enfermedades sí son compatibles con la vida. En la tabla 2 se muestran las trisomías autosómicas y sexuales más prevalentes en el ser humano.

El primer paso para el diagnóstico de una aneuploidía es la identificación de los grupos de riesgo.

Los factores de riesgo más importantes descritos en la literatura^{3,7,13} son los asociados a los padres.

Entre ellos cabe destacar:

- **Edad materna:** Los errores durante la división meiótica son en su mayoría de origen materno (sólo en un 5% de los casos se produce el error durante la espermatogénesis) y su probabilidad de aparición aumenta con la edad. Por ello se considera como factor de riesgo la edad materna y no la paterna, con aumento del mismo a partir de los 35 años²³.
- **Translucencia nucal (TN):** Medición del grosor mediante ecografía de la zona translucida observada entre la piel y los tejidos blandos en la nuca fetal. El periodo óptimo de identificación se encuentra en el primer trimestre, entre las semanas 11-12 de gestación.
- **Valores alterados de marcadores bioquímicos en suero materno²⁴:** Se miden en múltiplos de la mediana (MoM), de forma que se debe disponer de las medianas de cada marcador, calculadas a partir de una muestra suficiente (mínimo 100 muestras) de gestantes no portadoras de fetos aneuploides para cada momento de la gestación. Estos valores son calculados y periódicamente actualizados por cada laboratorio para cada semana de gestación, para cada marcador y, de manera específica, para la población a la que suelen atender. Estos marcadores son:
 1. Primer trimestre:
 - Proteína plasmática A del embarazo (PAPP-A).
 - Hormona gonadotropina coriónica humana (HGC).
 2. Segundo trimestre:
 - Alfafetoproteína (AFP).
 - HGC.
 - Estriol no conjugado.
 - Inhibina A.

Tabla 2. Trisomías más prevalentes²².

AUTOSÓMICAS	SEXUALES
Síndrome de Down: - Trisomía del cromosoma 21 (47,+21) - Translocación Robertsoniana del cromosoma 21 - Mosaicismo (47,+21/46)	Síndrome de Klinefelter: Duplicación del cromosoma sexual X 47,XXY
Síndrome de Edwards: Trisomía del cromosoma 18 (47,+18)	Síndrome de la triple X: 47,XXX
Síndrome de Patau: - Trisomía del cromosoma 13 (47,+13) - Translocación Robertsoniana del cromosoma 13 - Mosaicismo (47,+13/46)	Síndrome del XYY: 47,XYY

Otros factores de riesgo que se han identificado^{14,24} son:

- Condición de aneuploides de alguno de los padres o portador/es de una traslocación inversa cromosómica.
- Edad gestacional: Empleando la datación ecográfica y siendo la medición de la longitud cráneo-nalga (*crown-rump-length, CRL*) el parámetro biométrico de elección.
- Antecedentes de aborto en el primer trimestre de embarazo.
- Historia familiar: Después de una gestación con aneuploidía, el riesgo de recurrencia es un 0,6% mayor que el riesgo de base (calculado mediante la edad materna, la edad gestacional y la historia familiar).
- Peso materno: Los niveles de los parámetros analíticos en suero materno dependen de la cantidad producida en origen y también del volumen de suero en el cual se diluyen, el cual es proporcional al peso materno.
- Número de fetos²⁵:
 - Gestaciones únicas: La medición de TN, BHCG y PAPP-A en el primer trimestre identifica un 90% de casos de aneuploidías.
 - Gestaciones gemelares: TN y bioquímica tienen una tasa de detección del 80% y debe modificarse el valor de los MoM de los parámetros bioquímicos por un factor de corrección propio de cada marcador.
- Otras covariables por las que debe hacerse corrección de los MoM bioquímicos, ya que afectan su concentración sérica pero con una menor influencia²⁴:
 - Raza.
 - Consumo de tabaco.
 - Diabetes Mellitus Insulinodependiente.
 - Metrorragias en el transcurso de la gestación.
 - Paridad de la gestante.
 - Método de concepción (técnicas de reproducción asistida).
 - Sexo fetal.

Una vez clasificado el embarazo como de riesgo, se procede a la práctica de una técnica invasiva confirmatoria de diagnóstico a través de la toma de muestras por amniocentesis o biopsia corial para poder obtener el cariotipo del feto.

Número de pacientes

Las aneuploidías fetales tienen una incidencia en la población general de 9 por cada 1.000 nacidos vivos².

La más común es la trisomía 21, con una incidencia de 1 por cada 800 nacidos vivos²⁶. Dicho riesgo aumenta a 1 de cada 35 nacimientos en madres con más de 45 años¹¹. Si además existe historia familiar de trisomía 21, anomalías en las pruebas de ultrasonidos fetales u otros resultados que puedan orientar a su diagnóstico, el riesgo de padecerla asciende a 1 de cada 9 embarazos.

La segunda aneuploidía más común es el Síndrome de Edwards²⁷ (trisomía del cromosoma 18) con una incidencia de 1 por cada 5.500 nacidos vivos.

Dentro de las aneuploidías sexuales, las frecuencias de aparición del Síndrome de Turner, Klinefelter, 47,XYY y 47,XXX son 1/5000 para el primero y de 1/1000 para los otros tres.

Justificación

El Observatorio de Tecnologías Emergentes de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA) detecta y evalúa las tecnologías nuevas y emergentes, proporcionando herramientas que anticipan el impacto de éstas y ayudan a la toma de decisiones por parte de la Administración Sanitaria y el personal sanitario.

Las técnicas no invasivas para la detección de aneuploidías usando ADN fetal libre en sangre materna podrían aportar una serie de ventajas importantes frente a la obtención del cariotipo a través de amniocentesis o biopsia del corion, como menor número de complicaciones del parto, riesgo de pérdida fetal y molestias físicas y psíquicas a las embarazadas.

Evitar la realización de pruebas invasivas en los casos en que la existencia de aneuploidías fetales fuese descartable a través de la extracción de sangre materna, supondría una ganancia en términos personales, temporales y económicos, motivos para evaluar la posibilidad de inclusión de esta nueva técnica diagnóstica dentro del protocolo de diagnóstico prenatal.

En dicho contexto se justifica la necesidad de revisar la evidencia disponible sobre la seguridad, eficacia y efectividad de las nuevas técnicas de diagnóstico de aneuploidías usando ADN fetal libre en sangre materna, que hagan posible un diagnóstico acertado, disminución de la ansiedad materna por el procedimiento invasivo y posibilidad de daño fetal.

Objetivos

Los objetivos generales de los informes de síntesis de tecnologías emergentes son:

- Detectar precozmente nuevas tecnologías o cambios en las existentes con impacto potencial sobre el Sistema Sanitario.
- Sintetizar la información disponible sobre las tecnologías detectadas.
- Aportar información actualizada que ayude a la toma de decisiones en los distintos niveles del Sistema Sanitario.

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

¿Es eficaz –en términos de validez diagnóstica y precisión– y efectiva en términos de diagnóstico de aneuploidías– las técnicas de detección de ADN fetal libre en embarazadas?

Los objetivos específicos se centran en valorar la eficacia, efectividad y seguridad de las técnicas de diagnóstico de aneuploidías usando ADN fetal libre en sangre materna.

Metodología

Búsqueda

La metodología se basó en una búsqueda estructurada en bases prefijadas, lectura crítica de la literatura localizada, síntesis de los resultados y valoración de los mismos en relación al contexto del Sistema Nacional de Salud.

Las siguientes bases de datos referenciadas fueron consultadas hasta octubre de 2011: MedLine, EMBASE, *Current Contents*, *Web of Science* y el registro de ensayos clínicos de la *Cochrane Library*. También se buscó en la Red Internacional de Agencias de Evaluación de Tecnologías (INAHTA), en la base de datos del *Center for Reviews and Dissemination* (CRD), en el *International Information Network on New and Emerging Health Technologies* (EuroScan), en la *Food and Drug Administration* (FDA) y en el registro de ensayos clínicos norteamericano *ClinicalTrials.gov* (<http://clinicaltrial.gov/>). Además se buscó en el *Metaregister of Controlled Trials* (<http://www.controlled-trials.com/mrct/>) y en el *International Clinical Trials Registry Platform* de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (<http://www.who.int/trialsearch/Default.aspx>).

Se realizó una revisión manual en los sitios WEB de agencias no incluidas en INAHTA y de instituciones nacionales e internacionales como el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, la OMS, *Center for Disease and Prevention Control* (CDC), *The Emergency Care Research Institute* (ECRI), *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE), *Conformité Européenne* (marca CE: www.CE-marking.com), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII: www.Isciii.es), así como una revisión secundaria a partir de las referencias bibliográficas de los artículos recuperados.

La estrategia de búsqueda se muestra en el Anexo 1.

Se realizó un análisis crítico utilizando las recomendaciones de la *Critical appraisal Skills Programme* (CASP) para estudios de casos y controles adaptadas por CASP España (CASPe)²⁸ así como la herramienta QUADAS²⁹ para análisis crítico de pruebas diagnósticas.

Criterios de selección de los artículos recuperados

Criterios de inclusión:

Para la selección de los estudios se definieron los siguientes criterios de inclusión:

- Población: Mujeres embarazadas.
- Intervención: Test sanguíneo para el diagnóstico de aneuploidías usando ADN fetal libre en sangre materna.
- Comparación: Amniocentesis y biopsia de corion.
- Resultados: Seguridad, eficacia de la prueba -en términos de validez diagnóstica (sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo y cociente de probabilidad) y precisión de la prueba, así como efectividad en relación al diagnóstico de aneuploidías.

Criterios de exclusión:

- Estudios no originales: cartas al director, editoriales, comentarios, revisiones de tipo narrativo.
- Resúmenes, comunicaciones a congresos, encuestas, protocolos.
- Estudios experimentales “ex vivo” o “in vitro”.

Resultados

Resultado de la búsqueda

Entre un total de 410 referencias se localizaron 204 documentos sin duplicados procedentes de todas las bases de datos empleadas (Anexo 2). Se realizó una primera selección sobre título y resumen, descartándose inicialmente 191 documentos por no cumplir con los criterios de inclusión o por cumplir alguno de los criterios de exclusión. De los 13 documentos que fueron leídos a texto completo, finalmente se seleccionaron 3 de ellos para su análisis.

Descripción y calidad de los artículos

De 3 documentos analizados, 2 fueron estudios de pruebas diagnósticas^{11,30} y 1 estudio caso-control³¹.

Estudios de pruebas diagnósticas para cribado

Se incluyeron en la presente revisión 2 estudios¹¹⁻³⁰ de pruebas diagnósticas para el diagnóstico de aneuploidías a través de ADN fetal libre en sangre materna. Ambos artículos corresponden a estudios fase III según Sackett²¹ (realizados de forma prospectiva).

El objetivo de los dos fue valorar la validez de la detección de ADN fetal libre en sangre materna mediante secuenciación masiva en paralelo (MPSS), comparándola con la obtención del cariotipo a través de pruebas invasivas como toma de muestras de vellosidades coriónicas o amniocentesis.

Uno de ellos¹⁹ tuvo como objetivo secundario el desarrollo de un protocolo de laboratorio que pudiese mejorar la MPSS en estudios que empleasen un número de muestras muy amplio.

Descripción de la población

La población de los estudios estuvo formada por muestras de sangre materna (449¹¹ y 753³⁰) tomadas de pacientes cuyos criterios de inclusión fueron: ser mujer embarazada con riesgo fetal de padecer trisomía 21 y presentar criterios clínicos para realizarles un diagnóstico definitivo mediante cariotipo fetal.

Elrich *et al*¹¹ especificaron los criterios para ser considerado embarazo con riesgo fetal de padecer Síndrome de Down. Entre ellos indicaron positividad de marcadores fetales en suero materno, edad maternal avanzada

(mayores de 35 años) y hallazgos sugestivos de trisomía 21 en ecografía. También proporcionaron datos del porcentaje de muestras que se incluyeron por cada tipo de indicación:

- Diagnóstico de marcadores fetales positivos (sin especificar cuáles de ellos): 30,2% (133/441).
- Edad materna avanzada (mayor de 35 años): 68,3% (306/448).
- Anormalidad en la ecografía (no se especifica el tipo de hallazgos): 12,9% (57/441).
- Historia familiar positiva: 5,2% (23/441).
- Sin especificar: 10,2% (45/441).

Ambos estudios^{11,30} establecieron los criterios de exclusión, determinando que las muestras serían eliminadas si no se disponía del cariotipo completo o las muestras al ser procesadas no cumplían con los criterios de calidad previamente establecidos. Elrich *et al.*¹¹ identificaron los siguientes criterios de calidad para las muestras una vez procesadas:

- Fracción fetal mínima de 3,9%.
- ADN total mínimo por muestra estimado en 556 copias.
- Concentración de genes (volumen de la genoteca) mínima de 32,2 nanomoles (nmol).

La edad materna se expresó en medianas con valores entre los 35,4³⁰ y 37 años (rango entre 18-47)¹¹ y la edad gestacional en el momento de la toma de muestras fue de 13+1 semanas³⁰ y 16 (rango entre 8-36)¹¹. Chiu *et al.*³⁰ no aportaron los rangos correspondientes a esas medianas pero sí especificaron los porcentajes de población analizada correspondientes a los siguientes grupos:

1. Grupos de riesgo:

- a. **Alto:** embarazos con riesgo de trisomía 21 superior a 1 de cada 300 embarazos estimado por diagnóstico prenatal: 77% (582 casos).
- b. **Medio:** embarazos con riesgo de trisomía 21 entre 1 de cada 300 y 1 de cada 1.000 embarazos: 5% (39 casos).
- c. **Embarazos con otras indicaciones de riesgo:** anomalías detectadas a través de ultrasonidos, riesgo de enfermedad monogénica, etc: 18% (132 casos).

2. Edad materna:

- a. Menores de 35 años: 42% (319 casos).
- b. Con 35 años o más: 58% (434 casos).

3. Edad gestacional:

- a. Con 13+6 semanas o menos: 74% (557 casos).
- b. Entre 14+0 semanas a 14+6 semanas: 14% (102 casos).
- c. Con más de 15+0 semanas: 12% (94 casos).

Descripción de la intervención

En ambos estudios^{11,30} las muestras de sangre materna se obtuvieron de forma periférica antes de la realización de la prueba invasiva y al menos 6 horas después de haberles realizado una punción venosa. Todas fueron recogidas de forma prospectiva, entre mayo y agosto de 2009¹¹ y entre octubre 2008 y mayo 2009³⁰. Chiu *et al.*³⁰ además incluyeron muestras que habían sido tomadas previamente (entre octubre de 2003 y septiembre de 2008) y que estaban almacenadas de forma correcta para su conservación.

1. Detección de ADN fetal libre en sangre materna

Ambos estudios analizados^{11,30} utilizaron como prueba de referencia la secuenciación masiva en paralelo de moléculas de ADN en sangre materna para la detección de aneuploidías fetales, siguiendo el mismo proceso pero con algunas modificaciones:

- Recogida y procesamiento de la muestra:
 - Extracción de forma periférica de sangre materna en tubos enriquecidos con EDTA. Hubo discrepancia entre los volúmenes necesarios para ser considerados adecuados. Chiu *et al.*³⁰ establecieron un volumen de al menos 2 mL mientras que Elrich *et al.*¹¹ recogieron 10 mL.
 - Almacenaje y transporte de las muestras en hielo seco, hasta el centro de referencia en cada uno de los estudios.
 - Todas fueron analizadas como muestras congeladas, ninguna fresca.
 - Centrifugación y recogida del plasma.
- Extracción y secuenciación del ADN: Volvieron a existir diferencias a la hora de establecer el volumen de muestra de plasma materno necesario para extraer el ADN. Osciló entre 2,0-4,8 mL en Chiu *et al.*¹⁹, mientras que Elrich *et al.*¹¹ emplearon 4mL de plasma.

La cuantificación fetal se realizó mediante uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación y eliminación del material perteneciente a las regiones genómicas metiladas en el ADN fetal y no metiladas en el materno.

- Amplificación, detección e identificación de secuencias específicas de ADN fetal libre: El ADN fetal no digerido se amplificó en presencia de una cantidad conocida de oligonucleótido sintético como marcador de identificación.

Elrich *et al.*¹¹ emplearon la secuenciación masiva en paralelo utilizando un único nivel de multiplicación, “tetraplex” o “4-plex”, basado en el análisis de 4 muestras de forma simultánea. En cambio, Chiu *et al.*³⁰ emplearon dos niveles de multiplicación distintos 2-plex y 8-plex, según analizaran simultáneamente 2 u 8 muestras diferentes. Todas las muestras (753) se analizaron con el protocolo 8-plex mientras que sólo 314 lo hicieron con el 2-plex.

- Análisis de datos: En ambos estudios los resultados estuvieron cegados para los investigadores. Para la representación fraccional genómica del cromosoma 21 se empleó como medida de representación los valores de z (z -score). Dicha medida es como se conoce a la representación mediante fracciones genómicas estandarizadas y su fórmula es la siguiente:

Valor de Z del porcentaje de cromosoma 21 en trisomía 21 = ((porcentaje de cromosoma 21 en trisomía 21) – (media de porcentaje de cromosoma 21 en embarazos euploides)) / desviación estándar del porcentaje de cromosoma 21 en embarazos euploides.

Antes de la realización de los estudios se calculó la media y la desviación estándar de la representación del cromosoma 21 en un conjunto de muestras euploides de referencia. En el estudio de Elrich *et al.*¹¹ se emplearon 24 muestras euploides procedentes de un experimento previo para su cálculo y, basándose en los valores obtenidos, establecieron el punto de corte en $z=2,5$. En el caso de Chiu *et al.*³⁰ se utilizaron 96 muestras euploides y el punto de corte se estableció en z mayor de 3. Posteriormente, a cada muestra de análisis se le calculó su valor de z para determinar el porcentaje de cromosoma 21 existente en ellas. Así, aquellas que obtuviesen valores superiores al punto de corte serían diagnosticadas como trisomías 21.

2. Prueba referencia

En ambos estudios se utilizó como “gold estándar” para confirmación del diagnóstico una prueba que necesitó toma de muestras de forma invasiva a través de biopsia coriónica (19%¹¹ y 82%³⁰) o por amniocentesis (81%¹¹ y 18%³⁰).

En Chiu *et al.*³⁰ se utilizó como “gold estándar” el cariotipo del 100% de las muestras, mientras que en Elrich *et al.*¹¹ se emplearon diferentes métodos diagnósticos: cariotipo en el 59,9%, FISH en el 2,9%, combinando ambos métodos para el 35,6% y mediante PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) en el 1,6% de las muestras que se analizaron.

En ninguno de los estudios se especifica el tiempo de notificación empleado, para la realización de la prueba a estudio ni para la de confirmación.

Las características de los estudios incluidos en la presente revisión se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Características principales de los estudios de pruebas diagnósticas incluidos en la revisión

Autor y año	Centros participantes		Población			Intervención				
	País	N	N	Edad materna (t)	Edad gestacional (t)	MPSS		Prueba de referencia		Tipo de prueba
						Nivel de multiplicación	z-score	Vellosidades coriónicas	Amniocentesis	
Eilich 2011 ¹¹	ND	ND	449e	37a (18-47)	16s (18-36)	4-plex: 100%	2,5	19%	81%	Cariotipo 59,9% Hibridación 2,9% Ambos 35,6% qPCR 1,6%
Chiu 2011 ³⁰	China, Reino Unido, Holanda	10 centros (8 en China, 1 RU, 1 Holanda)	753e	35,4a <35a: 42% ≥35: 58%	13s+1d ≤13s+6d: 74% >14s a 14s+6d: 14% >15s+0d: 12%	2-plex: 41,7% 8-plex: 100%	>3	82%	18%	Cariotipo 100%

N: número; ND: No descrito; e: embarazadas; a: años; <: menor de; >: mayor de; ≤: menor o igual; ≥: mayor o igual; s: semanas; d: días; r: rango; MPSS: secuenciación masiva en paralelo.

Estudio caso-control

El estudio caso-control³¹ incluido en la presente revisión tuvo como objetivo el diagnóstico prenatal de Síndrome de Down mediante secuenciación masiva en paralelo de ADN fetal libre en sangre materna periférica.

Descripción de la población

Palomaki *et al.*³¹ elaboraron un estudio caso-control anidado en el que incluyeron una muestra formada por 1696 mujeres embarazadas. Por cada embarazo con trisomía 21 se incluyeron 7 embarazos euploides, basándose en la edad gestacional (semanas cercanas dentro de un mismo trimestre), lugar donde fueron atendidas, raza autodeclarada y tiempo de conservación de la muestra (un mes de diferencia como máximo). En total, 212 embarazos con Síndrome de Down y 1484 embarazos euploides. Entre los embarazos con Síndrome de Down, 105 embarazos con trisomía 21 (49,5% de los casos) correspondieron a diagnósticos en el primer trimestre y 107 (50,5% de los casos) en el segundo.

No existieron diferencias demográficas entre grupo caso y grupo control. La edad media para los casos fue de 37 años, con una desviación estándar (DE) de 5,0 y para los controles de 36,6 años (DE 5,1). Entre los casos, el 75% tenía 35 años o más, porcentaje similar al de los controles en dicho rango de edad (70%). La edad gestacional media en ambos grupos fue de 15 semanas, con rangos que oscilaron entre 8,1 y 21,5. Ambos grupos presentaron el 50% de sus muestras con edad gestacional dentro del primer trimestre de embarazo y el otro 50% dentro del segundo trimestre. En relación a la raza materna, ambos tuvieron los mismos porcentajes de cada una de las identificadas durante el estudio: 89% caucásica, 2% negra, 7% asiática y 2% desconocida.

A continuación, en la tabla 4, se muestran los datos demográficos de ambos grupos y la existencia o no de significación estadística entre ellos.

Tabla 4. Principales datos demográficos del estudio caso-control³¹

Característica	Casos	Controles	p
N	212	1.484	ND
Edad gestacional (media, rango)	15,3 (9,2-21,3)	15,0 (8,1-21,5)	0,21
Edad gestacional en 1º trimestre/2º trimestre	50% / 50%	50% / 50%	1,0
Edad materna (a), (media, DE)	37,0 (5,0)	36,6 (5,1)	3,6
Edad materna de 35a o más	160 (75%)	1.036 (70%)	0,12
Peso materno (kg), (media, DE)	67,59 (30)	68,95 (33)	0,33
Metrorragias vaginales (%)	17%	15%	0,44

N: número; a: años; DE: desviación estándar, ND: no descrito; kg: kilogramos.

Para ser incluidos en este estudio, todas las participantes debían ser mujeres embarazadas con alto riesgo de Síndrome de Down. Se definió el Síndrome de Down como 47,XX+21 y como 47,XY+21. Se excluyeron del estudio embarazos gemelares y mosaicismos. El riesgo de trisomía 21 se basó en edad materna avanzada (>35 años), historia familiar de aneuploidía o en medición alterada de marcadores fetales en suero materno. No fue criterio de inclusión el hecho de cumplir los tres factores de riesgo anteriormente mencionados simultáneamente, sino que fueron considerados embarazos de riesgo con el hallazgo de uno. Esto llevó a la existencia de diferentes indicaciones de inclusión en el estudio, que sí presentaron diferencias entre casos y controles.

Estas indicaciones están detalladas en la siguiente tabla (tabla 5).

Tabla 5. Principal indicación para ser incluidas en el estudio caso-control³¹		
Indicación	CASOS	CONTROLES
Test + en 1 ^a trimestre.	48 (23%)	327 (22%)
Test + en 2 ^o trimestre .	11 (5%)	118 (8%)
Test integrado positivo	38 (18%)	192 (13%)
Ecografía	51 (24%)	130 (9%)
Edad materna avanzada	24 (12%)	543 (37%)
Historia familiar	0 (0%)	44 (3%)
Dos o más indicaciones	39 (18%)	112 (8%)
Otras indicaciones o no indicado.	1 (<1%)	0 (0%)

Descripción de la intervención

Las muestras de sangre materna se tomaron de forma periférica antes de realizar la prueba invasiva. Fueron recogidas entre abril 2009 y septiembre de 2010, en 27 centros de diagnóstico prenatal pertenecientes a Canadá, Italia, España, República Checa, Argentina, Irlanda, Hungría, Estados Unidos, Israel y Australia. El análisis completo de los resultados fue realizado en 9 semanas, entre enero y marzo de 2011, por 30 científicos y técnicos moleculares con entrenamiento en el desarrollo de este tipo de procedimientos.

1. Detección de ADN fetal libre en sangre materna

En el estudio caso-control se empleó también como prueba de referencia la secuenciación masiva en paralelo de moléculas de ADN en sangre materna para la detección de aneuploidías fetales, siguiendo el mismo proceso anteriormente descrito y en este caso trabajando con 4 muestras simultáneamente (tetraplex o 4-plex).

Las muestras fueron almacenadas a -80°C y transportadas en hielo seco hasta el centro coordinador, que fue independiente del resto del estudio. Se procesaron durante las 6 horas siguientes a la extracción, con una media de tiempo de procesamiento de 1,1 horas para los casos y 1,2 horas para los controles, presentando un rango entre 0,1 y 6 horas.

Para su análisis, las muestras se enviaron al laboratorio Sequenom Center for Molecular Medicine (SCMM, San Diego, CA). Simultáneamente se enviaron dos subgrupos menores de muestras (605 y 56 muestras) a otro laboratorio independiente con experiencia en la secuenciación del ADN, Orphan Disease Testing Center de la Universidad de Los Ángeles (UCLA; Los Ángeles, CA), con el objetivo de realizar estudios de confirmación de los datos y los protocolos desarrollados. Ambos laboratorios aportaron sus interpretaciones clínicas empleando los mismos protocolos. La principal diferencia entre ellos fue que en el laboratorio SCMM existió la posibilidad de pedir una segunda muestra en caso de que alguna no contara con todos los requisitos de calidad establecidos y en el laboratorio de UCLA no. Cada uno de los laboratorios sólo tuvo acceso a sus propios resultados.

Antes de realizar la MPSS, se extrajo el ADN y se analizó para determinar la proporción de ADN fetal libre en plasma materno, a lo que se le llamó fracción fetal. Se consiguió una fracción fetal dentro de los límites aceptables (entre el 4-50%) en el 99,5% de las muestras, con una media de fracción fetal del 13,4%, sin especificar su pertenencia a grupo caso o control (1.687/1.696)

Finalmente, con todos los datos informáticos aportados a través de la MPSS, se estimó el punto de corte para diagnóstico de trisomía 21 (*z-score*) en valores superiores a 3.

2. Prueba referencia

Para confirmación del diagnóstico se tomaron muestras de forma invasiva a través de biopsias coriónicas en el 46% de los casos y en el 47% de los controles, amniocentesis en el 54% y 53% respectivamente y tan sólo en menos del 1% de los casos las muestras procedieron de productos de la concepción tras muerte fetal. Como *gold estándar* se empleó el cariotipo (99% de casos y 100% de controles) salvo en dos casos que correspondieron a las muestras procedentes de productos de concepción tras muerte fetal. En uno de estos casos se utilizó qPCR y en el otro FISH.

Descripción de las medidas de resultado

Validez diagnóstica

- Tasa de detección
- Tasa de falsos positivos.

Se examinó la existencia de diferencias y asociaciones entre los grupos caso y control de 16 variantes:

- Tiempo de procesamiento de las muestras.
- Hemólisis.
- Región geográfica donde se llevó a cabo la recogida de muestra y el estudio.
- Indicación para la realización del diagnóstico invasivo.
- Lugar de reclutamiento para el estudio.
- Edad gestacional.
- Edad materna.
- Peso materno.
- Sangrado vaginal.
- Raza materna.
- Etnia caucásica.
- Sexo fetal
- Tiempo de almacenaje de la muestra congelada.
- Efecto de la cantidad de fracción fetal en la concentración de genoteca obtenida.
- Número de secuencias coincidentes.
- Resultados fetales.

Utilidad clínica

Monitorización de los tiempos empleados en la realización de las pruebas en el laboratorio.

Validez analítica

Fiabilidad de la prueba.

Estudios de confirmación de resultados entre ambos laboratorios (SCMM y UCLA) para ver la reproducibilidad del proceso.

Calidad de los artículos

Estudios de pruebas diagnósticas

Según los criterios de la herramienta QUADAS, los artículos de pruebas diagnósticas fueron clasificados de alta calidad. Sólo uno de ellos pudo presentar un posible sesgo de verificación diferencial¹¹, ocasionando una sobreestimación de los resultados de sensibilidad y/o especificidad.

Validez interna

Aspectos relacionados con la prueba de referencia:

- Todos los individuos se sometieron a la misma prueba de referencia en uno de los estudios³⁰, siendo ésta la considerada correcta como *gold estándar*. En el estudio de Elrich *et al.*¹¹ no sucedió lo mismo, sino que las participantes fueron sometidas a 4 pruebas de referencia diferentes y en proporciones diferentes. Esto pudo llevar a clasificar erróneamente algunos falsos negativos como verdaderos negativos y sobreestimar así tanto los valores de sensibilidad como los de especificidad.
- La prueba de referencia fue independiente de la prueba a estudio en ambos artículos, de forma que los resultados no se vieron condicionados.
- La lectura de la prueba a estudio se realizó de forma cegada en los dos trabajos. Los miembros participantes en la secuenciación del ADN y los bioinformáticos encargados del análisis no tuvieron accesos a los resultados de la prueba de referencia durante todo el proceso^{11,30}. En el estudio de Elrich *et al.*¹¹ incluso se señala la participación de un laboratorio independiente contratado para el procesamiento y almacenaje de las muestras, otro para guardar toda la información de manera confidencial, otro para el análisis del ADN y finalmente un bioestadístico independiente encargado de agrupar los datos estadísticos, ver su concordancia e informar de los resultados.
- Ambas pruebas, de referencia y a estudio, se realizaron de forma simultánea en los dos estudios, asegurando además que la toma de muestra para la prueba a estudio se realizase previamente a la toma de muestra para la prueba de referencia, intentando no alterar los resultados por el intervencionalismo de la última.

Aspectos relacionados con el espectro de pacientes:

- El espectro de pacientes fue representativo en los dos estudios.^{11,30} En ambos participaron pacientes representativos del grupo de riesgo diana para la prueba diagnóstica a estudio y para la de referencia, cumpliendo los criterios demográficos y clínicos necesarios.

- Los datos intermedios o no-interpretables fueron recogidos de forma adecuada sin provocar ningún sesgo en ambos estudios.
- No hubo pérdidas en ninguno de los estudios sobre pruebas diagnósticas. Cualquier caso que no cumpliera con los requisitos de los criterios de inclusión fue eliminado del estudio. Existieron protocolos de calidad para cada paso del desarrollo en ambos estudios de forma que, si una muestra no cumplía los requisitos era eliminada y no se contaba con sus resultados en el análisis desde el comienzo del estudio.

Aspectos relacionados con la reproducibilidad:

- La ejecución de la prueba de referencia y de la prueba de estudio se describió con suficiente claridad como para permitir su replicación, así como su interpretación y resultados en ambos estudios^{11,30}.

Validez externa

- Todos los estudios evaluaron la validez de la secuenciación masiva en paralelo con diferentes niveles de multiplicación, como método de diagnóstico prenatal no invasivo de trisomía 21 a partir de ADN fetal libre en sangre materna. Proporcionaron la información necesaria para determinar si la prueba afectó a la toma de decisiones en cuanto a diagnóstico y por lo tanto a tratamiento.
- En todos los estudios estuvieron disponibles los mismos datos clínicos de los que se dispondría en la práctica clínica habitual.
- Los resultados obtenidos fueron muy similares en ambos estudios y podrían ser aplicados a otros entornos más amplios con el objetivo de aumentar el número de patologías a diagnosticar.
- Los criterios de inclusión de la población en ambos estudios incluyeron numerosos factores de riesgo que no se ajustan a los que debe de cumplir la población de riesgo de nuestro entorno, sino que la amplían mucho más, de forma que aumenta su validez externa.

Estudio caso-control

Según la herramienta de calidad CASPe²⁸, el estudio caso-control incluido en la revisión se catalogó de buena³¹ calidad metodológica.

Validez interna

- La asignación de los pacientes a cada grupo se hizo en una proporción de 1:7 para tener en cuenta la prevalencia de Síndrome de Down, estableciendo una definición exacta de dicha aneuploidía y definiendo claramente los criterios de inclusión y exclusión en cada grupo.

- Se ofrecieron datos de edad materna, gestacional y otras variables, no obteniendo resultados significativos entre casos y controles. Así se aseguró que los grupos fuesen homogéneos y comparables entre sí.
- Los resultados fueron cegados en múltiples niveles. Se emplearon códigos para identificación de todos los resultados y sólo se transfirieron dichos registros al centro coordinador junto con sus correspondientes interpretaciones.

Validez externa

- Los estudios se llevaron a cabo en 27 centros de 10 países diferentes, todos ellos en unidades de diagnóstico prenatal siguiendo los mismos criterios de inclusión y el mismo protocolo.
- Se tomó un amplio número de muestras. Todas ellas muestras de sangre materna periférica, recogidas y procesadas del mismo modo.
- Los resultados que se obtuvieron en ambos estudios podrían ser extrapolados a otro entorno hospitalario debido a la similitud entre pacientes. Además, el gran número de factores de riesgo que incluye dicho estudio, convierte los resultados en datos comparables no sólo con población de riesgo en nuestro ámbito sanitario sino también con población embarazada de forma general.

Principales resultados

Estudios de pruebas diagnósticas

En relación a la validez diagnóstica, los resultados obtenidos fueron (tabla 6):

- **Sensibilidad:** con valores entre 79,1% y 100%.
- **Especificidad:** valores entre 97,9% y 99,7%.
- **Valores predictivos:** positivo (VPP) entre 91,9% y 97,5% y negativo (VPN) entre 96,9% y 100%, dándose los valores más bajos en el estudio que realizó el análisis de las muestras siguiendo el protocolo 8-plex³⁰ y aumentando en el estudio tetraplex¹¹.
- **Cocientes de probabilidad:**
 - Positivo (CP+) entre 48,67 y 100 ofreciendo datos de excelente evidencia diagnóstica para detectar la enfermedad.
 - Negativo (CP-) entre 0 y 0,21 proporcionando alta evidencia diagnóstica para descartar la trisomía 21 fetal.

Tabla 6. Principales resultados de los estudios diagnósticos.

Autor y año	MPSS	Sensibilidad (IC95%)*	Especificidad (IC95%)*	VPP (IC95%)*	VPN (IC95%)*	CP+* (IC95%)*	CP-* (IC95%)*
Eirich 2011 ¹¹	4-plex	100% (89-100)	99,7% (98,5-99,9)	98% (93-100)	100% (100-100)	100 (14,22-702,9)	0
Chiu 2011 ³⁰	2-plex	100% (100-100)	97,9% (96-100)	96,6% (93-100)	100% (100-100)	48,67 (15,88-149,1)	0
	8-plex	79,1% (70-88)	98,8% (98-100)	91,9% (86-98)	96,9% (96-98)	75,25 (33,7-168,1)	0,21 (0,14-0,32)

*: Valores calculados para la presente revisión utilizando los datos aportados por los autores.

MPSS: Secuenciación masiva en paralelo con diferentes niveles de multiplicación (*multiplexed massively parallel sequencing*).

El estudio de Chiu *et al.*³⁰ aportó otros datos que se describen a continuación:

- Curvas ROC para estimar la eficacia diagnóstica de los dos protocolos empleados, obteniendo valores similares, de 1 (95% IC, 0,98-1) para 2-plex y de 0,98 (95% IC, 0,97-0,99) para 8-plex.
- Significación estadística entre falsos negativos y verdaderos positivos en relación a: tipo de toma de muestra (prospectiva o retrospectiva), edad gestacional, nivel de riesgo. En ninguno de estos análisis se obtuvo un resultado estadísticamente significativo con valores de p de 0,258, 0,538 y 0,466 respectivamente.
- Significación estadística entre los valores de z obtenidos en cada protocolo. Se observó un mayor desarrollo del protocolo 2-plex con valores significativamente superiores y $p < 0,001$.
- Cálculo del coeficiente de variación de la medición del porcentaje de cromosoma 21. Se obtuvieron valores superiores y estadísticamente significativos ($p < 0,001$) para el protocolo 8-plex con un coeficiente de variación del 1,59% y una desviación estándar (DE) de 0,36, frente al 0,66% (DE 0,25) del 2-plex.
- Determinación de probabilidades post-test de mujeres con diferente edad y por tanto, con diferente prevalencia de trisomía 21, con el fin de investigar si este método podría resultar útil como cribado poblacional. Los datos obtenidos sugirieron que el uso de la secuenciación, especialmente con protocolo 2-plex, podría alterar las probabilidades de tener una trisomía 21 por su alto poder para descartarla.

Estudio caso-control

Validez diagnóstica

- El índice de detección de Síndrome de Down fue del 98,6% (209/212 casos) con un intervalo de confianza al 95% de 95,9 a 99,7.
- Existió un 0,2% de falsos positivos (3/1471 controles con 95% IC: <0,1-0,6).
- Análisis de la asociación

1. *Existente entre las variables recogidas y la fracción fetal hallada:* Fuerte asociación negativa entre el peso materno en casos y controles, con pesos de 100, 150 y 250 libras (45, 68 y 113 kilogramos) asociados a fracciones fetales de 17,8%, 13,2% y 7,3% respectivamente. Fuerte asociación positiva con los valores de z obtenidos en los casos ($p < 0,001$) pero no en los controles ($p = 0,5$). No existió asociación con edad gestacional, raza materna o indicación para la realización del diagnóstico invasivo. Con el resto de variables la asociación fue muy pequeña y normalmente insignificante.

2. *Existente entre los valores de z y las variables recogidas:* Fuerte asociación negativa con el peso materno en los casos y más débil en los controles (no se aportan datos numéricos en el artículo). Pequeña asociación positiva con la edad gestacional en los casos, con valores de 7,2 y 9,9 de z para las semanas de gestación 11 y 19, respectivamente.

Utilidad clínica

- De las 1.696 muestras totales se consiguió un análisis de 235 por semana.
- El tiempo de respuesta mejoró de 9 semanas al comienzo del estudio, hasta 10 días para las 18 últimas muestras analizadas, sin incluir aquellas que necesitaron una 2ª recogida y procesamiento. En estas últimas, el tiempo de respuesta no se duplicó debido a una precoz indentificación de los fallos durante el proceso diagnóstico.

Validez analítica. Fiabilidad

1. *Estudio con 605 muestras:* Las 605 muestras enviadas al laboratorio independiente para confirmación de los resultados tuvieron un porcentaje de finalización completo del análisis del 96% con pérdida de 27 muestras que fallaron en cualquiera de los dos laboratorios (tanto SCMM como UCLA) y que fueron eliminadas de los resultados finales.

El grado de correlación entre ambos laboratorios se calculó a través del coeficiente de correlación r de Pearson, mostrando una alta correlación positiva entre ambos laboratorios, tanto en los casos como en los controles ($r = 0,80$ y $r = 0,82$, respectivamente).

El índice de detección de Síndrome de Down fue del 98,7% en ambos laboratorios, con un 0,0% de falsos positivos en SCMM y un 0,2% en UCLA. El índice de fallo fue de 4,4% en SCMM y de 3,9% en UCLA.

2. *Estudio con 56 muestras:* En dicho análisis se perdieron 3 muestras, una por fallos en ambos laboratorios debido a la presencia de baja fracción fetal y las otras dos en el laboratorio de UCLA. Todas ellas procedentes de embarazos euploides. El índice de fallos en este caso para SCMM y UCLA fue de 1,8% y 5,3% respectivamente.

De las 53 muestras restantes, en ambos laboratorios la detección de trisomía 21 fue del 100% y el índice de falsos positivos del 0%.

Riegos y Seguridad

Los test de diagnóstico de aneuploidías, mediante ADN fetal libre en sangre materna, no suponen ningún riesgo para la paciente ya que sólo requieren una toma de muestra sanguínea periférica, que después será procesada¹.

Estudios en marcha

En el registro de ensayos clínicos clinicaltrials.gov se han podido encontrar los siguientes estudios en marcha:

1. Determinación de aneuploidías fetales en mujeres embarazadas con alto riesgo.

Collection from pregnant women at increased risk for fetal aneuploidy. (NCT014293989).

Estudio de prueba diagnóstica de aneuploidías fetales, basado en la determinación del ADN fetal libre en sangre materna y posterior comparación con análisis cromosómico obtenido a través de pruebas invasivas como amniocentesis o biopsia de vellosidades coriónicas

2. Cribado no invasivo de aneuploidías fetales: Ensayo, desarrollo y optimización en embarazos afectados

Noninvasive screening for fetal aneuploidy: Assy development & optimization in affected pregnancies (CHARMM-AP) (NCT01052688).

Estudio de prueba diagnóstica basado en la recogida de muestras sanguíneas maternas periféricas para desarrollar y optimizar el diagnóstico no invasivo de aneuploidías fetales en mujeres embarazadas con riesgo. Los resultados obtenidos del análisis de ADN fetal libre en sangre materna serán comparados con los del análisis cromosómico estándar, tales como cariotipo, hibridación fluorescente in situ y/o qPCR.

Aspectos económicos

Coste por unidad y precio

Sequenon, Inc (San Diego, CA, USA) es el único laboratorio que ya ha establecido un precio aproximado para este tipo de kit diagnóstico en su versión comercial (para mediados del año 2013), valorado en unos 700 dólares (¹573,8 €).

Estudios de evaluación económica

No se han encontrado estudios de evaluación económica sobre el tema.

Sólo en el estudio de Palomaki *et al.*³¹ se comparó el protocolo de diagnóstico invasivo de trisomía 21 con el mismo protocolo pero insertando la MPSS entre la identificación de embarazo de alto riesgo de Síndrome de Down mediante criterios clínicos y la realización de amniocentesis o biopsia coriónica.

Asumieron que de 100.000 mujeres embarazadas, existiría un embarazo con riesgo de trisomía 21 por cada 32 embarazos euploides (1/32), y que el diagnóstico por paciente costaría unos 1.000 dólares (¹819.7€), con un índice de pérdida fetal de 1 por cada 200 procedimientos invasivos realizados. Con estos datos calcularon el coste completo y las pérdidas fetales producidas con ambos protocolos:

- Diagnóstico invasivo completo sin MPSS en embarazos de alto riesgo: Detectaría 3.000 casos de trisomía 21, con un coste de 100 millones de dólares (¹81.967.213,1€) y causaría 500 pérdidas fetales.
- Diagnóstico invasivo completo incluyendo MPSS antes de realizar amniocentesis o biopsia corial en embarazadas con MPSS positiva: Detectaría 2.958 casos de trisomía 21, con un coste total de 3,9 millones de dólares (¹3.278.688,5€) y originaría 20 pérdidas fetales causadas por la instrumentalización.

¹ Datos calculados según valores obtenidos a través del Banco Central Europeo.

Discusión

Hasta la fecha, el diagnóstico de anomalías cromosómicas fetales se ha establecido a través de la determinación del cariotipo fetal, obtenido mediante procedimientos invasivos. Las técnicas de detección de ADN fetal libre en sangre materna podrían permitir, además de la identificación del sexo del feto y de su Rh, la determinación de trastornos de un solo gen y aneuploidías. Para su realización se requiere únicamente la extracción de sangre materna periférica y su procesamiento mediante amplificación e identificación del ADN fetal libre, a través de diferentes técnicas como PCR, espectometría de masas o ampliación de secuencias en paralelo².

Actualmente, tener un alto riesgo de trisomía 21 se está convirtiendo en un problema relevante para un grupo de mujeres cada vez mayor. Estas mujeres tienen que hacer frente a la decisión de someterse a procedimientos invasivos que añaden riesgo al embarazo. La posibilidad de sustituir técnicas diagnósticas como la amniocentesis y/o la biopsia corial por esta prueba no invasiva, justificó la necesidad de evaluar su efectividad y seguridad, con el fin de tratar de disminuir el número de complicaciones durante el embarazo, acortar el tiempo de notificación de los resultados y ver la posible incorporación de esta prueba al cribado en mujeres con embarazos de riesgo para las trisomías 18, 21 y 13³¹.

Los estudios que fueron analizados en la presente revisión verificaron la validez diagnóstica de la MPSS de moléculas de ADN en sangre materna para la detección de un solo tipo de aneuploidía fetal, la trisomía 21^{11,30,31}. Aportaron altos valores de sensibilidad, especificidad y mostraron gran capacidad, tanto para descartarla como para detectarla. Las diferencias encontradas en los resultados de validez diagnóstica entre los estudios se debieron al nivel de multiplicación empleado en la secuenciación masiva en paralelo, 2-plex³⁰, 4-plex^{11,31} y 8-plex³⁰, de modo que los valores eran mayores con el aumento del número de moléculas de ADN fetal por muestra, resultando el 8-plex el peor de los tres niveles de multiplicación.

El análisis de la asociación³¹ entre variables mostró una fuerte asociación negativa del peso materno con la fracción fetal y la fracción genómica del cromosoma 21 representada por la *z-score* (valores *z*) y una fuerte asociación positiva entre fracción fetal y valores *z*. El resto de variables no presentaron ningún tipo de asociación o fueron insignificantes, mostrando nuevamente, como una de las variables más importantes, al número de moléculas de ADN fetal presente en la muestra.

En relación con la calidad metodológica de los trabajos, cabe destacar la buena calidad de los artículos, tanto en relación a su validez interna como externa, con claras especificaciones de todos los aspectos relacionados

con la prueba de referencia, el espectro de pacientes y la reproducibilidad del estudio. Tan sólo uno de ellos pudo ver comprometida su validez interna por presentar un posible sesgo de verificación diferencial¹¹. En él, los participantes no fueron sometidos a la misma prueba de referencia, sino a 4 diferentes. Esto pudo ocasionar una sobreestimación de los valores de sensibilidad y especificidad por clasificación errónea de falsos negativos como verdaderos negativos.

En cuanto a la validez analítica o fiabilidad de la prueba, sólo Palomaki *et al.*³¹ realizaron este análisis mediante la repetición del estudio en dos ocasiones más, con la colaboración de dos laboratorios independientes y con números de muestras distintos para cada estudio. El grado de correlación positiva entre ambos fue elevado y mostraron mayor índice de fallos cuanto mayor fuese el número de muestras y sobretodo debido a la presencia de baja fracción fetal en ellas.

Con estos resultados, los estudios^{11,30,31} concluyeron que la MPSS no puede considerarse diagnóstica pero su incorporación al cribado en mujeres con alto riesgo de Down podría disminuir las pérdidas fetales por procedimientos invasivos en un 96%, a pesar de que la confirmación por test invasivos siga siendo necesaria. Su utilización en combinación con otras pruebas clínicas, como ultrasonidos, se convertiría en una opción mejor para identificar a las mujeres embarazadas que se beneficiarían o no de una prueba diagnóstica invasiva confirmatoria.

Otras alternativas de estudio.

Son pocos los autores que sugirieron la posibilidad de investigar métodos alternativos. Palomaki *et al.*³¹ trataron de interpretar los resultados de la MPSS mediante el ajuste del porcentaje de cromosoma 21 obtenido por el contenido de pares guanina-citosina. Esta modificación en el protocolo pareció tener cierto impacto positivo en la mejora de su desarrollo pero su realización fue posterior a la obtención de los resultados y por lo tanto no pudo ser valorado.

Implicaciones éticas

Algunos autores^{11,30,31} expresaron su preocupación sobre las nuevas cuestiones éticas que los test de ADN fetal pueden generar. Emplearon numerosas muestras para simular la práctica clínica, en un amplio rango de embarazos con edades diferentes, entre razas y grupos étnicos muy variables y con indicaciones diagnósticas distintas, pero siempre en mujeres con embarazos de riesgo para Síndrome de Down. Por ello, todos concluyeron que dichas cuestiones no se consideraban relevantes en sus estudios, puesto que se habían empleado sólo en grupos de riesgo.

Implicaciones prácticas y aspectos organizativos.

A pesar de obtener evidencia de la validez clínica de los test para Síndrome de Down basados en secuenciación masiva en paralelo, Palomaki *et al.*³¹ mostraron la necesidad de aprendizaje debido a la complejidad de la técnica, aunque consiguieron una mejora en los tiempos de respuesta de hasta 10 días menos. Señalaron la existencia de otros temas importantes como la necesidad de inversión económica, de creación de guías de uso y de materiales educativos, tanto para pacientes como para profesionales, destinados a asegurar una toma de decisiones informada y compartida.

En el resto de estudios^{11,30} no se especificó el tiempo de notificación, empleado en la realización de la prueba a estudio, ni el de confirmación, de forma que no sabemos si se consiguió acortar o no. Lo que sí señalaron fue la necesidad de obtener menores índices de fallo y tiempos de respuestas más cortos para concordar con las expectativas de los pacientes en relación al diagnóstico prenatal¹¹.

Hay que tener en cuenta que estos trabajos no han estudiado otras anormalidades cromosómicas y han excluido embarazos gemelares. Para poder evaluar los verdaderos beneficios y riesgos de esta técnica como cribado poblacional para aneuploidías, harían falta estudios con poblaciones mayores y sin riesgo elevado (población general). Además se requiere una mayor investigación³⁰ para poder desarrollar protocolos que mejoren la precisión de la medida de la cantidad de moléculas de ADN que deben estimarse para los cromosomas 18 y 13.

Referencias

1. Go A, Van Vugt J, Oudejans C. Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities. *Hum Reprod Update*. 2011;17(3):372-82.
2. Honda H, Miharu N, Ohasi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using convencional PCR análisis of maternal serum. *Clin Chem*. 2006;52:313-8.
3. Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O *et al*. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *Am J Pathol*. 2006;169:400-3.
4. Guibert J, Benachi A, Grebille AG. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod*. 2003;18:1733-6.
5. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:16266-71.
6. Rijnders RJP, Christiaens GC, Bossers B, Van der Smagt JJ, Van der Schoot E, De Haas M. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet Gynecol*. 2004;103(1):157-64.
7. Tang D, Li Y, Zhou X, Li X, Zeng F. Multiplex fluorescent PCR for noninvasive prenatal detection of fetal-derived paternally inherited diseases using circulatory fetal DNA in maternal plasma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;144(1):35-9.
8. Tong YK, Ding C, Chiu RWK, Gerovassili A, Chim SSC, Leung TY *et al*. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. *Clin Chem*. 2006;52(12):2194-202.
9. Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M *et al*. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet*. 2007;369(9560):474-81.
10. Tsui NBY, Wong BCK, Leung TY, Lau TK, Chiu RWK, Lo YMD. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERP1NB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat Diagn*. 2009;29:1031-7.

11. Elrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204:205,e1-11.
12. Wright CF, Burton H. The use of cell-free nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human Reprod Update.* 2009;15:139-51.
13. Norbury G, Norbury CJ. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: How close are we? *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13(2):76-83.
14. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:20458-63.
15. Lo YM, Chiu RW. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem.* 2008;54(3):461-6,
16. Stanghellini I, Bertorelli R, Capone L. Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of DAZ repetitive probe. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(9):587-91.
17. Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:666-9.
18. Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutatuion dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(50):19920-5.
19. Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AMZ, Hjelm NM et al. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem.* 1999;45(10):1747-51.
20. Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn.* 2000;20(10):795-8.
21. Wataganara T, LesShane ES, Farina A. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum Genet.* 2003;112(2):204-8.

22. American College of Obstetricians and Gynecologists. Invasive prenatal testing for aneuploidy. Washington (DC): American College of Obstetricians and Gynecologists. 2007;88.
23. Verlinsky Y, Kuliev A. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in assisted reproduction. *Minerva Ginecol.* 2004;56:197-203.
24. Comas C, Echevarria M, Rodríguez MA, Rodríguez I, Sabriá J. Control de calidad en el cribado prenatal de aneuploidías. *Diagn Prenat.* 2011;23(1):15-24.
25. Spencer K. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimestre using free β -HCG and PAPP-A combined with fetal nuchal translucency thickness. *Prenat Diagn.* 2000;20:91-5.
26. Weijerman ME, Van Furth AM, Vonk Noordegraaf A. Prevalence, neonatal characteristics and first-year mortality of Down syndrome: a national study. *J Pediatr.* 2008;152:15-7.
27. Breathnach FM, Malone FD, Lambert-Messerlian G. First- and second-trimester screening: detection of aneuploidies other than Down syndrome. *Obstet Gynecol.* 2007;110:651.
28. Guías CASPe de Lectura Crítica de la Literatura [Internet]. Alicante: CASPe España, Coordinación General, 2005. URL: <http://www.redcaspe.org/que-hacemos/herramientas/>. Acceso: 16-06-2012. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/5z5bKFU0r>).
29. Latour J. El diagnóstico. Quaderns 21 de salut pública i administració de serveis de salut. Valencia (España): Eves.
30. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ.* 2011;342:c7401.
31. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Elrich M. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An interational clinical validation study. *Genet Med.* 2011;13(11):913-20.

Anexos

Anexo 1. Estrategias de búsqueda.

ESTRATEGIA MEDLINE (OVID)

- #1. Exp *Pregnancy/or*Prenatal Diagnosis/.
- #2. (Pregnan* or maternal or fetal or fetus or prenatal).ti.
- #3. 1 or 2.
- #4. *DNA/ and (Cell-Free System/ or Maternal-Fetal Exchange/) and bl.fs.
- #5. (((Free adj2 dna) or noninvasive or "non invasive") and (blood or plasma)).ti.
- #6. 4 or 5.
- #7. "Reproducibility of results"/ or "Diagnosis Differential"/ or "Sensitivity and Specificity"/ or "Predictive Value of Tests"/ or (sensitive* or specific* or (predictive adj2 value*) or likelihood or ((false or true) adj2 (positive* or negative*))).ti,ab.
- #8. 3 and 6 and 7

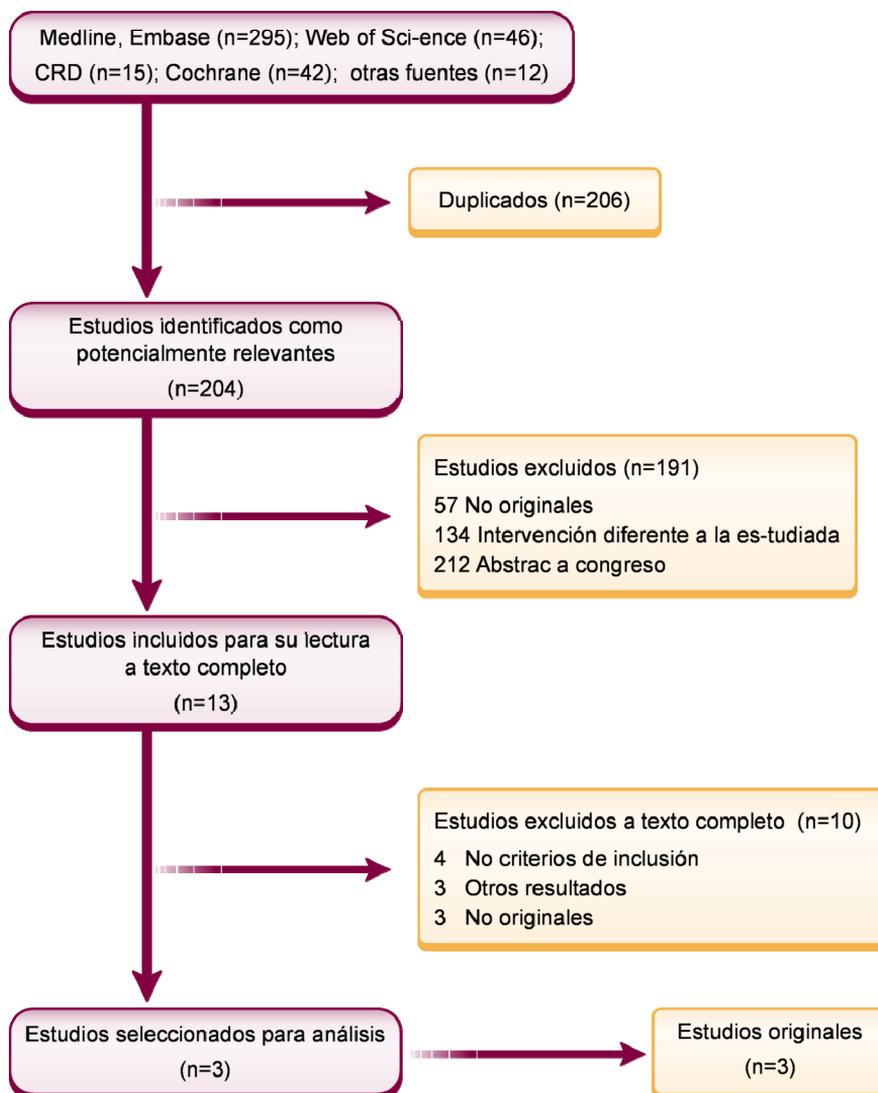
ESTRATEGIA EMBASE

- #1 `prenatal diagnosis`/mj.
- #2 pregnan*:ti OR maternal:ti OR fetal:ti OR fetus:ti OR prenatal:ti.
- #3 #1 OR #2.
- #4 `dna`/de AND (`maternal blood`/mj OR `fetus blood`/mj OR `maternal plasma`/mj).
- #5 (free NEAR/3 dna):ti OR noninvasive:ti OR `non invasive`:ti AND (blood:ti OR plasma`/mj).
- #6 #4 OR #5.
- #7 `sensitivity and specificity`/de OR `sensitivity analysis`/de OR `diagnostic accuracy`/de OR `diagnostic error`/exp OR `diagnostic procedure`/exp OR sensitivity*:ab,ti OR specificit*:ab,ti OR (predictive:ab,ti AND value*:ab,ti) OR likelihood:ab,ti OR (false:ab,ti OR true:ab,ti AND (positive*:ab,ti OR negative*:ab,ti))
- #8 #3 AND #6 AND #7 AND [embase]/lim.

ESTRATEGIA WOS

- Title=((pregnan* or maternal or fetal or fetus or prenatal)) AND.
Title((((free and dna) or noninvasive or "non invasive") and (blood or plasma))).
Timespan=2010-2011. Databases=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSH.
Lemmatization=On.

Anexo 2. Resultados de la búsqueda.



Anexo 3. Calidad de los estudios (QUADAS)

Items	Erich 2011 ¹¹	Chiu 2011 ³⁰
¿El espectro de pacientes fue representativo de los pacientes que se someterán a la prueba a estudio en la práctica clínica habitual?	Incierto	Incierto
¿Los criterios de selección estuvieron claramente descritos?	Sí	Sí
¿La prueba de referencia es la correcta para detectar la condición estudiada?	Sí	Sí
¿El periodo de tiempo transcurrido entre la prueba de referencia y la prueba a estudio es suficientemente corto para asegurar razonablemente que la condición estudiada no cambia entre la realización de las dos pruebas?	Sí	Sí
¿Todos los individuos del estudio se sometieron a la prueba de referencia para la confirmación del diagnóstico?	Sí	Sí
¿Los pacientes recibieron la misma prueba de referencia a pesar de los resultados de la prueba a estudio?	No	Sí
¿La prueba de referencia fue independiente de la prueba a estudio (la prueba a estudio no formó parte de la prueba de referencia)?	Sí	Sí
¿La ejecución de la prueba a estudio se describió con suficiente detalle como para permitir su replicación?	Sí	Sí
¿La ejecución de la prueba de referencia se describió con suficiente detalle como para permitir su replicación?	Sí	Sí
¿Los resultados de la prueba a estudio se interpretaron sin conocimiento de los resultados obtenidos en la prueba de referencia?	Sí	Sí
¿Los resultados de la prueba de referencia se interpretaron sin conocimiento de los resultados obtenidos en la prueba a estudio?	Sí	Sí
¿Cuándo se interpretaron los resultados de la prueba a estudio, estuvieron disponibles los mismos datos clínicos de los que se dispondría en la práctica clínica habitual?	Sí	Sí
¿Se recogieron los resultados no-interpretables/intermedios de la prueba a estudio?	Sí	Sí
¿Se explicaron las pérdidas del estudio?	No procede	No procede

