



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ANÁLISIS DE CONCORDANCIA DE PRUEBAS NO
INVASIVAS PRENATALES EN SANGRE MATERNA
(NIPT) CON PRUEBAS INVASIVAS PARA EMBARAZOS
CON ALTO RIESGO DE ANEUPLOIDÍAS FETALES EN
UNA MUESTRA PILOTO**

Diana Carolina Grajales Ospina

Universidad Nacional de Colombia

Instituto de Genética

Bogotá, Colombia

2020

ANÁLISIS DE CONCORDANCIA DE PRUEBAS NO INVASIVAS PRENATALES EN SANGRE MATERNA (NIPT) CON PRUEBAS INVASIVAS PARA EMBARAZOS CON ALTO RIESGO DE ANEUPLOIDÍAS FETALES EN UNA MUESTRA PILOTO

Diana Carolina Grajales Ospina

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Genética Humana

Director:

MD, MSc. Juan José Yunis Londoño

Codirectora:

MD, MSc. Luz Karime Yunis Hazbun

Grupo de Investigación:

Patología Molecular

Universidad Nacional de Colombia

Instituto de Genética

Bogotá, Colombia

2020

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo.

Quiero agradecerle a Mauricio Quintero por apoyarme incondicionalmente en todo este proceso y a mis padres por ser el modelo a seguir en mi vida.

Al Doctor Juan José Yunis, director de tesis y a la Doctora Luz Karime Yunis, codirectora, al apoyar este proyecto, sin sus correcciones y experiencia no hubiera sido posible la elaboración de esta tesis. A Yolima Parrado por su colaboración y paciencia en el laboratorio, gracias a ella adquirí mi aprendizaje en el procesamiento de las muestras. También quiero agradecer a la IPS Servicios Médicos Yunis Turbay y Cia SAS por permitir el análisis de las muestras.

A los doctores Andrés Mauricio Camacho Montaña, Alejandro Antonio Bautista Charry y Reinaldo Niño Alba, co-investigadores de esta propuesta, por la captación de pacientes para el estudio y al Dr. Gustavo Giraldo Ospina por su colaboración en la captación de la paciente en Medellín.

A mis compañeros de Maestría y al personal administrativo por permitirme compartir y aprender de ellos durante este camino.

Y finalmente, a las pacientes que dieron su consentimiento informado para participar en el estudio.

Tabla de contenido

Agradecimientos	4
Resumen	8
Lista de abreviaturas	9
Introducción	10
Marco teórico	12
Historia	12
Epidemiología	13
Tamización durante el embarazo	13
Edad materna	14
Pruebas séricas.....	14
Ecografía.....	15
Tamización en Colombia	16
Pruebas invasivas	16
Amniocentesis	16
Toma de vellosidades coriales.....	17
Estudios genéticos	17
Pruebas prenatales no invasivas (NIPT)	18
Recomendaciones internacionales	20
Realización de NIPT	20
Realización de microarrays	21
NIPT en la actualidad	21
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivo	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
Materiales y métodos	24
Población	24
Tipo de estudio	25
Criterios de selección	25
Criterios de inclusión.....	25
Criterios de exclusión	25
Metodología	25
Muestras	25
Gráfica 1.	26

Pruebas invasivas	26
Pruebas no invasivas	27
Protocolo aislamiento de ADN fetal (QIAGEN®)	28
Protocolo NIPT- GeneSGKit	29
Análisis estadístico	30
Aspectos éticos	31
Resultados	31
Tabla 1. Descripción de las pacientes	32
Gráfica 2. Resultados pruebas invasivas y NIPT	34
Descripción de las pacientes	34
Paciente 1	34
Paciente 2	36
Paciente 3	37
Paciente 4	38
Paciente 5	39
Paciente 6	40
Paciente 7	41
Paciente 8	43
Paciente 9	44
Paciente 10	45
Paciente 11	46
Paciente 12	48
Paciente 13	49
Paciente 14	51
Paciente 15	52
Rendimiento de la prueba NIPT	54
Tabla 2. Rendimiento de la prueba NIPT con relación al cariotipo	54
Rendimiento de la prueba NIPT en la detección de las principales aneuploidías	54
Rendimiento de la NIPT en la detección de trisomía 21	54
Rendimiento de la NIPT en la detección de trisomía 18	55
Rendimiento de la NIPT en la detección de monosomía del cromosoma X	55
Rendimiento de la NIPT en la detección del sexo fetal	55
Tabla 3. Detección del sexo fetal por NIPT y cariotipo	55
Relación de la fracción fetal de ADN según el tubo de recolección de la muestra	55
Tabla 4. Tipo de tubo utilizado para el aislamiento de ADN fetal	56
Relación de IMC y fracción fetal de ADN	56
Tabla 5. Relación IMC y Fracción fetal ADN	57
Tamización estándar	57
Tabla 6. Riesgo de aneuploidías fetales según tamización sérica y NIPT	58
Seguimiento postnatal	58
Discusión	59
Conclusiones	64
Limitaciones	66

<i>Recomendaciones</i>	66
<i>Financiación</i>	66
<i>Anexo 1: NIPT disponibles comercialmente</i>	67
<i>Bibliografía</i>	68

Resumen

Cerca de un 3% de los recién nacidos presentan una anomalía congénita al nacimiento. Dentro de estas, las malformaciones estructurales fetales constituyen alrededor del 50% de las enfermedades congénitas, de las cuales, el 10% son causadas por anomalías cromosómicas. Aproximadamente el 80 al 85% de las anomalías cromosómicas corresponden a trisomías comunes, como la trisomía 13, 18 y 21, así como a las aneuploidías de los cromosomas sexuales. Las aneuploidías fetales son una de las principales causas de muerte perinatal y discapacidad cognitiva, la mayoría de estos fetos no son viables y resultan en aborto espontáneo temprano, sin embargo, una parte sobreviven hasta la adultez como es común en el síndrome Down. Esto a llevado al desarrollo de esquemas de tamización prenatal con el fin de detectar las anomalías cromosómicas tempranamente y mejorar el pronóstico fetal. La sospecha de aneuploidías fetales se realiza mediante pruebas de tamización como los hallazgos ecográficos, las pruebas séricas y en conjunto con la edad materna, permiten sospechar la presencia de alteraciones cromosómicas en el feto; si se encuentran alteradas, deben ser confirmadas mediante pruebas invasivas como la biopsia de vellosidades coriales entre la semana 10-12 de gestación o la amniocentesis después de la semana 15-16 de gestación. Desde el 2011 se han introducido las pruebas prenatales no invasivas (NIPT) que sirven como pruebas de tamización para la detección de aneuploidías fetales principalmente en los cromosomas 13, 18 y 21, y en los cromosomas sexuales. El objetivo de este estudio fue evaluar la concordancia de una de las pruebas NIPT disponible comercialmente contra las pruebas invasivas que se consideran el estándar de oro, en una población materna con criterios de alto riesgo para aneuploidías.

Palabras clave: NIPT, aneuploidías fetales, gestaciones de alto riesgo, trisomía 21, trisomía 18, trisomía 13, aneuploidías en cromosomas sexuales, cariotipo, microarray.

Lista de abreviaturas

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AEDP	Asociación Española de Diagnóstico Prenatal
AEGH	Asociación Española de Genética Humana
AV	Auriculoventricular
BhCG	B human chorionic gonadotropin
CIV	Comunicación interventricular
CNV	Copy number variations
IMC	Índice de Masa Corporal
IVE	Interrupción voluntaria del embarazo
LCC	Longitud craneocaudal
LOH	Loss Of Heterozygosity
MB	Megabase
NGS	Next-Generation Sequencing
NIPT	Noninvasive Prenatal Testing
NSGC	The National Society of Genetic Counselors
PAPP-A	Pregnancy associated plasma protein A
PCR	Polymerase Chain Reaction
QF-PCR	Quantitative fluorescence polymerase chain reaction
SOGC	Society of Obstetricians and Gynecologists of Canada
TN	Translucencia nugal
UDP	Uniparental Disomy
VPP	Valor predictivo positivo

Introducción

Los defectos congénitos son alteraciones estructurales o funcionales (malformación, desorganización, deformación o displasia) presentes al nacimiento(1). Estas afecciones tienen múltiples etiologías como alteración en un gen, alteración cromosómica, combinación de factores hereditarios, teratógenos presentes en el medio ambiente, agentes químicos ambientales o radiaciones, carencias nutricionales, infecciones maternas, uso de alcohol o tabaco(2). Estas anomalías son diagnosticadas en al menos el 3% de los recién nacidos(1). En Colombia, las malformaciones congénitas son la segunda causa de mortalidad en menores de un año de edad(3).

Según los datos, de 52 mil nacimientos estudiados en Colombia, la frecuencia de malformaciones congénitas es del 3,1%, similar a lo reportado a nivel mundial. De estas el 1,1% son incompatibles con la vida, 54% son malformaciones mayores que tienen un alto riesgo de mortalidad o discapacidad grave y 44,8% son malformaciones compatibles con una vida normal; en este último grupo, la intervención del equipo de salud cambia el pronóstico de vida del afectado en el 80,7% de los casos(3). El 73% de estas anomalías congénitas son detectadas por ecografía entre el primer y segundo trimestre(4).

Las malformaciones estructurales congénitas representan alrededor del 50% de las enfermedades congénitas. De estas, aproximadamente el 24% se debe a variaciones en el número de copias (CNV en inglés), el 15% a trastornos monogénicos, y el 10% restante a anomalías cromosómicas. De las alteraciones cromosómicas, aproximadamente el 80 al 85% corresponden a trisomías comunes como trisomía 13, 18 y 21, así como a las aneuploidías de los cromosomas sexuales(5).

El síndrome Down (trisomía 21) es la anomalía cromosómica más común en el mundo, con una incidencia de 1/400 a 1/1500 nacidos vivos dependiendo de la edad materna(1). Uno de cada 150 embarazos afectados con esta condición termina en aborto espontáneo en el primer trimestre de gestación. El síndrome Down es la principal causa de déficit cognitivo y de malformaciones mayores y menores como defectos cardíacos, desordenes hematopoyéticos y enfermedad de Alzheimer de inicio temprano(6). La principal causa de síndrome Down es la no disyunción en la meiosis, lo que lleva a que el embrión tenga 3 copias del cromosoma 21, a esto se le llama trisomía libre y representa alrededor del 95% de los casos. De este 95%, el 90% se debe a un error en la meiosis materna y el 10% restante ocurre por un error

en la meiosis paterna(7). Otras causas de trisomía 21 son las translocaciones heredadas de los progenitores, siendo las principales la t(14;21) y t(21;21) en el 3-4% de los casos. Este tipo de alteraciones tiene un alto riesgo de recurrencia en embarazos posteriores el cual se calcula del 3%(8). Otra causa, menos frecuente, es el mosaicismo gonadal el cuál ocurre en menos del 2% de los casos(7).

Las trisomías 13 y 18 son menos frecuentes que la trisomía 21(8), las cuales se caracterizan por presentar déficit cognitivo y problemas en el desarrollo. La trisomía 18 tiene una incidencia de 1/7500 nacidos vivos. Alrededor del 95% de los embriones terminan en abortos espontáneos y la supervivencia después del nacimiento es baja(9). La mayoría de los casos, al igual que en trisomía 21, es causada por una trisomía libre y el 20% restante se debe a translocaciones, o mosaicos en menor porcentaje. La trisomía 13 tiene una incidencia de 1/15000 a 1/25000 nacidos vivos y la mayoría fallecen alrededor del primer mes de vida. Esta trisomía se debe a una no disyunción en la meiosis materna, y al igual que las anteriores, la mayoría son trisomías libres y un 20% ocurre por una translocación balanceada. El riesgo de recurrencia es menor al 2% y la edad materna avanzada es considerada como un factor de riesgo(9).

Adicionalmente, las aneuploidías en los cromosomas sexuales son uno de los trastornos genéticos humanos más comunes con una incidencia global de 1:400-500 nacidos vivos. El síndrome Klinefelter 47,XXY, tiene una incidencia 1/1000 nacidos vivos y el 15% presentan cariotipo con mosaico. El síndrome 47,XYY tiene una incidencia de alrededor 1/1000 y el Síndrome de Turner (45,X), tiene una incidencia 1/4000, de los cuales, alrededor del 25% tiene mosaicos cromosómicos(9).

Aunque la mayoría de los fetos con aneuploidías cromosómicas no son viables y resultan en un aborto espontáneo temprano, una parte tiene el potencial de sobrevivir hasta la adultez como es el caso del síndrome Down. Por todas estas razones, se ha dedicado un esfuerzo considerable a lo largo de los años para identificar alteraciones al principio del embarazo con el fin de proporcionar a las parejas el tiempo suficiente para considerar sus opciones reproductivas(6).

Marco teórico

Historia

La detección prenatal de anomalías cromosómicas se ha ofrecido durante más de 40 años(6). El primer método introducido para la tamización de trisomía 21 fue a principios de los años setenta, en donde se tomaba la edad materna avanzada como factor de riesgo, detectando el 21% de los fetos con trisomía 21. Posteriormente, a finales de los ochenta se introdujeron las pruebas séricas como métodos de tamización incluyendo la alfa-fetoproteína, estriol no conjugado, hCG (gonadotropina coriónica) e inhibina A. Estos métodos de tamización en combinación con la edad materna tenían una tasa de detección del 50 al 70% de los fetos con trisomía 21. En los años noventa se implementó la tamización mediante la medición de la translucencia nucal alcanzando tasas de detección de alrededor del 75%, con tasas de falsos positivos del 5%. Posteriormente se combinó la edad materna, hallazgos ecográficos y pruebas séricas como tamización de aneuploidías durante el embarazo(10). Las pruebas invasivas para la confirmación de aneuploidías se implementaron en la década de los sesenta con la realización de amniocentesis y posteriormente, a principios de los años ochenta, se introdujo el muestreo de vellosidades coriónicas para confirmar estos casos sospechosos(10).

En la última década, se ha observado cambios en las indicaciones para el diagnóstico prenatal invasivo desde la implementación de las pruebas NIPT (Non Invasive Prenatal Testing) (11,12). Para la realización de estas pruebas se basaron en estudios de la detección de ADN tumoral en sangre periférica que se venían haciendo desde la década de los setenta(13). Posteriormente se planteó la hipótesis que la placenta actuaba con un tejido invasivo por lo cual se abrió la posibilidad de encontrar ADN fetal libre en sangre materna(14). Para comprobar lo anterior, se empleó una reacción de PCR para amplificar secuencias del cromosoma Y en sangre materna, en donde su presencia estaría justificada por ser de origen fetal(14). Fue así como surgió el primer test diagnóstico para determinar el sexo fetal en sangre materna. Posteriormente, se utilizó para la detección de factor RhD fetal para establecer el riesgo de desarrollar enfermedad hemolítica del recién nacido y para estudios de enfermedades monogénicas de herencia paterna. Este hallazgo generó grandes avances en la investigación al esbozar la posibilidad de realizar diagnósticos prenatales sin necesidad de utilizar pruebas invasivas(15). En agosto de 2011 en Hong Kong, se realizó por primera vez el análisis de pruebas

no invasivas (NIPT) para la detección de aneuploidías fetales mediante el procesamiento de ADN fetal circulante en sangre materna, y consecutivamente fueron comercializadas en octubre de 2011 en Estados Unidos. Estas pruebas detectan ADN fetal libre en el plasma materno, y se ha planteado que serían pruebas de tamización más efectivas que las realizadas hasta la fecha(16). En un estudio se determinó que la tamización con NIPT para trisomía 21 presenta mayor especificidad y valor predictivo positivo que la tamización estándar del primer trimestre, reduciendo el número de procedimientos invasivos en embarazos espontáneos y embarazos logrados mediante tecnología de reproducción asistida(17).

Epidemiología

Las anomalías cromosómicas presentan una incidencia de 1/150 a 1/160 nacidos vivos (0,7%)(9, 18). La tasa global de aborto espontáneo es de alrededor del 15% y en estos la anomalía cromosómica explica el 50% de los casos(19).

Las aneuploidías son el trastorno cromosómico humano más común y ocurre en al menos el 5% de las gestaciones detectadas(9). Las trisomías más frecuentes son la 21 con una incidencia aproximada de 1 en 400 a 1500 nacidos vivos, la trisomía 18 con 1 en 7500 nacidos vivos y la trisomía 13 con una prevalencia de 1 en 15000 a 25000(9).

En un estudio realizado en Europa entre los años 2000 y 2006 se analizaron 10323 casos de alteraciones cromosómicas de un total de 2,4 millones de niños y se encontró que las aneuploidías más frecuentes fueron: trisomía 21 en el 53% de los casos, trisomía 18 en 13%, trisomía 13 en 5%, alteraciones de los cromosomas sexuales 4% (47,XXX, 47,XXY, 47,XYY), 45,X en 8%, y otras causas 17% (duplicaciones, mosaicos, deleciones 4p, 5p, y anillo cromosómico)(20).

Tamización durante el embarazo

Las aneuploidías fetales son una de las principales causas de muerte perinatal y discapacidad cognitiva, lo que ha llevado al desarrollo de esquemas de tamización prenatal con el fin de detectarlas tempranamente(21) y así, preparar a la pareja para un recién nacido con una condición genética específica, tener un menor impacto psicológico y ofrecer a la gestante la opción para la terminación voluntaria del embarazo.

El punto de corte para establecer un embarazo como de “alto riesgo” es arbitrario y depende de cada sociedad; según las tasas de sensibilidad y de falsos positivos. El grupo de medicina materno fetal de Barcelona, propone como “alto riesgo” tener una incidencia de embarazos con aneuploidías por debajo de 1 en 250(22). La

ACOG no propone un punto de corte sobre el cuál la tamización debe ser considerada positiva(18). Si se tiene una clasificación de alto riesgo para aneuploidías la paciente debe ser llevada a realización de pruebas invasivas(10, 23) ya sea, mediante amniocentesis o biopsia de vellosidad corial(6).

Edad materna

El riesgo para aneuploidías fetales incrementa con la edad materna. Se estima que para trisomía 21, 18, y 13, en una mujer de 20 años, el riesgo es de 1 en 1000, 1 en 2500 y 1 en 8000 respectivamente, en comparación con una mujer de 35 años, donde el riesgo aumenta a 1 en 250, 1 en 600 y 1 en 1800(21). Adicionalmente, el riesgo se modifica si hay historia previa de aneuploidía, según el peso materno, la raza y si el embarazo es único o múltiple(18).

Pruebas séricas

Primer trimestre

Las pruebas de tamización para detección de posibles aneuploidías de los cromosomas 21, 18 y 13 se realizan entre las semanas 10 a 14 de gestación, con el análisis sérico de proteína A plasmática propia del embarazo (PAPP-A), y la gonadotropina coriónica humana B (BhCG)(18).

La SOGC propone que en el primer trimestre, los niveles bajos de PAPP-A y hCG se asocian con resultados adversos en la gestación(24). Para la trisomía 21, el valor de BhCG y la PAPP-A se encuentran elevados ofreciendo tasas de detección del 65% junto con la edad materna. Para las trisomías 13 y 18, los niveles séricos de la PAPP-A y BhCG son bajos(21). En el caso de aneuploidías en los cromosomas sexuales, la BhCG es normal y PAPP-A están levemente aumentadas(21).

Esta tamización en el primer trimestre tiene tasas de detección de aneuploidías entre el 85-90% y falsos positivos de un 5% para trisomía 21 al combinar edad materna, pruebas séricas y hallazgos ecográficos(18, 25).

Segundo trimestre

La tamización en el segundo trimestre se debe realizar entre las semanas 15 a 22+6 de gestación, este incluye la medición de hCG, alfa-fetoproteína y estriol no conjugado, en combinación con factores maternos como la edad, el peso, raza y presencia de diabetes, a esto se le conoce como prueba triple, la cuál tiene tasa de

detección entre 61 a 70%. Adicionalmente a los tres marcadores mencionados, al realizar la medición de inhibina A se le conoce como prueba cuádruple, la cuál tiene tasas de detección de trisomía 21 del 80%, con 5% de falsos positivos(18,19).

La SOGC propone que una elevación inexplicada de la alfa-fetoproteína y/o inhibina A, o niveles disminuidos de alfafetoproteína y/o estriol no conjugado, se asocian con una mayor frecuencia de resultados obstétricos adversos. Se sabe que hay una clara asociación entre la alteración de estos marcadores séricos con el riesgo de desarrollar preeclampsia y retraso en el crecimiento intrauterino(24); adicionalmente, la elevación de la alfa-fetoproteína se ha asociado con defectos en el tubo neural y defectos en la pared abdominal(11, 18).

Al realizar una tamización integrada, es decir, pruebas del primer trimestre y luego el test cuádruple, la tasa de detección aumenta al 96% con VPP 5%(18, 26).

Ecografía

La ecografía del primer trimestre se debe realizar entre las semanas 11 y 13+6. En pacientes con aneuploidías fetales se puede observar anomalías estructurales mayores y menores, así como alteraciones estructurales generadas por enfermedades monogénicas(27). Entre las anomalías mayores que se han relacionado con síndrome Down están: defectos cardíacos como alteraciones septales, tetralogía de Fallot, defectos auriculoventriculares y atresia duodenal(27). Los hallazgos de anomalías menores para aneuploidías no son específicos y pueden estar presentes en fetos no afectados. Algunos hallazgos son el engrosamiento del pliegue nuczal, dilatación de la pelvis renal, intestino ecogénico, huesos largos cortos e hipoplasia del hueso nasal (18, 27).

La translucencia nuczal por encima de 3,5 mm se encuentra en alrededor del 1% de los embarazos, esta medida tiene una tasa de falsos positivos del 5% y tiene la capacidad de detectar del 75 al 80% de fetos con trisomía 21 y otras aneuploidías (21). El 40 al 50% de los fetos afectados por síndrome Down tienen un pliegue nuczal engrosado de ≥ 6 mm en el segundo trimestre(7). Se ha evidenciado que valores de translucencia nuczal mayor a 3,5 mm o superior al percentil 99 incrementan el riesgo para aneuploidías fetales, lo cuál es proporcional al riesgo de alguna alteración fetal adversa(11, 18, 21). El riesgo de anomalías mayores como defectos cardíacos y otras malformaciones asociadas a síndromes genéticos aumenta aproximadamente en un 20% para una translucencia nuczal de 4 mm y en un 50% para translucencia nuczal mayor a 6 mm(10).

Existen otros marcadores ecográficos asociados con aneuploidías como la ausencia del hueso nasal, el cual está presente en el 60% de los fetos con trisomía 21; 50% en la trisomía 18 y 30% en la trisomía 13(28). El ángulo facial está sobre el percentil 95 en el 45% de los fetos con trisomía 21. La onda del ductus venoso reverso se asocia con aumento en el riesgo de defectos cromosómicos, cardíacos y muerte fetal. Estos hallazgos pueden estar presentes entre el 55 y 65% de los casos(21, 28).

Se debe tener en cuenta que con la tamización combinada del primer trimestre, permite la detección temprana de anomalías cromosómicas, ya que las alteraciones ecográficas suelen observarse en el segundo trimestre(29), lo que lleva a tomar decisión sobre la interrupción del embarazo en estadios tardíos.

Tamización en Colombia

Según la norma técnica del ministerio de salud, la tamización para la detección de aneuploidías fetales se debe basar en la edad materna y en la medición de la translucencia nuchal(30).

Pruebas invasivas

Las pruebas invasivas son recomendadas para todas las pacientes cuya tamización en el primer o segundo trimestre arroja “alto riesgo”(23), para las que tienen alteraciones en pruebas NIPT, anomalías cromosómicas en gestación previa o en uno de los progenitores, confirmación de una diagnóstico pre-implantacional, pérdida gestacional única o recurrente, edad materna avanzada(22, 26). Según la edad gestacional se ofrece amniocentesis o toma de vellosidades coriales(23).

Amniocentesis

La realización de la amniocentesis debe ser indicada después de la semana 15-16 de gestación. La amniocentesis temprana es aquella que se realiza antes de la semana 15 (10, 31) y se ha relacionado con riesgo de pérdida fetal (3,6%), aumento en la incidencia de pie equino varo (4,7%) y morbilidad respiratoria(31, 32).

La amniocentesis es operador dependiente por lo cuál las complicaciones de éste procedimiento pueden variar. Entre las complicaciones más frecuentes se encuentran: riesgo de pérdida fetal de 0,1 a 1,9%(33), corioamnionitis e infecciones uterinas del 1%, ruptura de membranas ovulares del 1 al 2%, los daños al feto son

complicaciones raras; también está la pérdida de la muestra por contaminación que ocurre en el 0,1% de los casos(34).

Toma de vellosidades coriales

La toma de vellosidades coriales se recomienda entre la semana 11 a 13+6 de gestación(23), la cuál se puede realizar a través de dos vías: la transabdominal o transcervical; la vía de elección depende de la localización de la placenta, peso materno, paridad o preferencia del operador(35).

Algunos de los riesgos y complicaciones de este procedimiento son: pérdidas fetales del 0,2 al 2%, sangrado vaginal en el 10% de los casos y la pérdida de líquido amniótico ocurre en menos del 0,5%(34).

Estudios genéticos

Durante décadas, el análisis cromosómico a través de cariotipo bandeado G o Q ha sido el estándar de oro para detectar anomalías citogenéticas en fetos. Esta permite detectar aneuploidías, reordenamientos equilibrados y grandes reordenamientos estructurales desequilibrados. Sin embargo, tiene algunas limitaciones como la resolución, en donde el cambio en el número de copias patogénicas menores a 5Mb no son detectadas(36). Además, para el análisis de los cromosomas se requiere previa preparación y cultivo de las células el cuál tarda de 7 a 10 días y su interpretación requiere personal experto. La precisión diagnóstica en muestra de líquido amniótico es entre 99,4 a 99.8% y toma de vellosidad corial entre 97,5 a 99,6%(9, 37).

Existe otro método citogenético que permiten la detección rápida de aneuploidías fetales como el FISH, esta metodología sólo detectan la presencia de las aneuploidías fetales de los cromosomas 13,18, 21, X y Y rutinariamente (9). También se pueden estudiar microdeleciones específicas como deleción 22q11.2. o el síndrome de Williams. El resultado se obtiene entre 1 a 2 días y no se requiere realizar cultivo celular para el análisis de la muestra. La tasa de detección de aneuploidías está entre 96,9%(38, 39).

La QF-PCR, permite la detección de aneuploidías solo en los cromosomas 13, 18, 21 y sexuales, tiene la ventaja de ser menos costosa y permite la automatización y el procesamiento simultáneo de un mayor número de muestras que el FISH y la obtención de los resultados en la mayoría de los casos está disponible en 24 horas.

La sensibilidad y especificidad de la QF-PCR para aneuploidías específicas es 95.65% y 99.97%(40).

El análisis de Microarray prenatal permite detectar todas las alteraciones que son identificadas mediante citogenética convencional con la excepción de rearrreglos cromosómicos balanceados. Presenta una gran ventaja, ya que permite detectar pequeñas ganancias o pérdidas de ADN que no pueden ser detectados mediante cariotipo(41). Adicionalmente, permite la detección de regiones de disomía uniparental (UPD), y regiones de pérdida de heterocigosidad (LOH). Para este estudio, no se necesita de cultivos celulares para el procesamiento de la muestra, obteniendo resultados rápidamente entre 7 a 10 días(42). Sin embargo, el costo de esta prueba es mayor en comparación con la citogenética convencional, requiere equipos costosos, y no es útil para detectar rearrreglos cromosómicos recíprocos y balanceados como anteriormente se dijo. En la literatura se ha reportado que hasta el 1,7% de los fetos ecográficamente normales con un cariotipo bandedo G normal, puede tener una variante en el número de copias clínicamente significativa, las cuáles son identificadas mediante los microarray(43).

En un estudio realizado en el 2012 se comparó la eficacia del análisis microarray con el cariotipo convencional en el diagnóstico prenatal. El estudio arrojó que el análisis de microarrays identificó información citogenética adicional clínicamente significativa en comparación con el cariotipo; detectando deleciones y duplicaciones en el 6% en fetos con alguna anomalía estructural y en el 1,7% sin anomalías estructurales; además, el microarray fue igualmente eficaz para identificar aneuploidías y reordenamientos desequilibrados, pero no identificó translocaciones y triploidías equilibradas(42). Estos datos son confirmados por un metanálisis realizado en el 2013 en donde encontraron que en fetos que tenían alguna anomalía estructural en la ecografía, el análisis con microarrays detectó un 7% adicional de anomalías citogenéticas (deleciones/duplicaciones) en comparación con el cariotipo convencional(44).

Pruebas prenatales no invasivas (NIPT)

Las pruebas prenatales no invasivas están disponibles en el mercado desde el 2011(16) las cuáles consisten en detectar ADN fetal libre en plasma materno(11), originado por la apoptosis del trofoblasto. Se calcula que aproximadamente el 3 al 13% de ADN fetal libre se encuentra en el plasma materno circulando en pequeños fragmentos de aproximadamente 50 a 200 pares de bases(5, 23). Este ADN fetal se puede detectar tempranamente desde la semana 5 a 7 de gestación, pero por recomendaciones internacionales las pruebas NIPT deben ser realizadas a partir de

la semana 10(16), ya que el porcentaje de ADN fetal en circulación materna va aumentando en este periodo y su utilidad clínica serviría para toma de decisiones de finalización del embarazo tempranamente(23). El tiempo promedio para entrega del resultado está entre 4 a 10 días y el resultado se expresa como positivo o negativo o como “riesgo alto” >99% o “riesgo bajo” menor a 1/10000(11).

El análisis de ADN fetal libre se realiza mediante secuenciación masiva paralela y análisis bioinformático avanzado(11). La secuenciación de ADN del plasma materno, que contiene una mezcla de ADN materno y fetal, permite una estimación de la cantidad de cromosomas, es decir, dos o tres copias contando los fragmentos que surgen de cada cromosoma(25). Por ejemplo, en el caso de la trisomía 21, se detecta un exceso de fragmentos de ADN del cromosoma 21 en el plasma materno. Un feto afectado con trisomía 21 liberará relativamente más fragmentos de ADN del cromosoma 21 en la circulación materna en comparación con otros cromosomas debido a la presencia de una tercera copia del cromosoma 21 en el trofoblasto(25). El número de fragmentos contados a partir del cromosoma 21 se comparará con una referencia derivada de otros cromosomas diploides, y se realiza un análisis estadístico para determinar si hay más conteos del cromosoma 21 de lo esperado(25).

Un factor importante que influye en el rendimiento de laboratorio de la NIPT es la fracción fetal, que es la proporción de ADN libre total en el plasma materno que se deriva de la unidad feto placentaria. Si la fracción fetal es baja, será más difícil realizar las pruebas NIPT y detectar un feto con aneuploidías(25). Se requiere de al menos 4% de fracción de ADN fetal para dar un resultado acertado(5, 23). Hay varios factores biológicos que influyen en la fracción fetal, como: la edad gestacional, el índice de masa corporal (IMC), el tipo de aneuploidía, el grupo étnico, mosaicismo, fecundaciones asistidas, uso de heparinas durante el embarazo(5), gemelo perdido durante la gestación(16, 23, 45), y neoplasias de la madre detectadas durante el embarazo(11).

Se recomienda que se realicen las pruebas después de la semana 10 de gestación ya que la fracción de ADN fetal libre aumenta a medida que transcurre el embarazo(11, 25). El índice de masa corporal (IMC) elevado disminuye el ADN fetal por un efecto dilucional(11, 45). En un estudio se identificó que la fracción fetal era menor del 4% en aproximadamente el 7% de las mujeres que pesaban 100 kg, mientras que las mujeres que pesaban más de 160 kg tenían un riesgo del 50% de tener una fracción fetal baja (46). En el caso de la trisomía 13, la fracción fetal es inferior en comparación con otras trisomías porque esos embarazos tienen un tamaño placentario menor(5). Respecto al grupo étnico, se ha detectado menor fracción de ADN en pacientes del sur de Asia en comparación con las

caucásicas(45). En el caso de las aneuploidías sexuales, es importante tener presente el antecedente personal de trasplantes de órganos ya que dependiendo del sexo del donante, la prueba puede verse alterada, dando falsos positivos (47). Por otra parte, la fracción de ADN fetal aumenta al tener mayores niveles en suero de PAPP A o BhCG (45).

Las NIPT tienen menores tasas de falsos positivos en comparación con la tamización prenatal para la detección de aneuploidías fetales, sin embargo no son pruebas diagnósticas(23). Estas tienen alta sensibilidad para a detección de trisomías 21 y 18 y detección del sexo fetal, pero tiene una menor sensibilidad para la detección de trisomía 13 y de anomalías cromosómicas sexuales(48, 49). Dentro de las limitaciones de estas pruebas está que no evalúan defectos en el tubo neural o defectos en la pared abdominal(23).

Recomendaciones internacionales

Realización de NIPT

Los criterios según la ACOG y la Sociedad de Medicina Materno-Fetal para la realización de NIPT son(16):

- Mujeres mayores de 35 años
- Hallazgos ecográficos en el feto sugestivos de aneuploidías
- Madres con historia de embarazo con trisomía
- Progenitor portador de una traslocación robertsoniana balanceada
- Mujeres con pruebas de tamización del primer y segundo trimestre positivas

La SOGC (49), ACOG, ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) (50), NSGC (The National Society of Genetic Counselors)(51), recomiendan las pruebas NIPT como prueba de tamización para mujeres clasificadas como “alto riesgo” por resultados en pruebas séricas y/o hallazgos ecográficos para trisomía 21,18 y 13. La ACOG recomienda también la realización de pruebas NIPT independiente del estatus de riesgo de la paciente(23). El grupo de Barcelona propone el uso de NIPT en población de “riesgo intermedio” para definir la necesidad de uso de pruebas de diagnóstico invasivo(22). Todas estas sociedades concuerdan en que sí la prueba NIPT es positiva, la paciente debe ser llevada a pruebas invasivas para confirmación del resultado, ya que la NIPT no se considera equivalente a las pruebas de diagnóstico invasivas actuales.

Realización de microarrays

En 2013, la ACOG y la Sociedad de Medicina Materno-Fetal recomendaron el uso de análisis de microarrays a toda mujer, sin importar la edad, con una o más anomalías estructurales fetales mayores identificadas por ecografía. También recomiendan la realización en fetos estructuralmente normales, en donde la madre será llevada a prueba invasiva (41) o por ansiedad materna(52).

Adicionalmente, la Asociación Española de Diagnóstico Prenatal (AEDP) y la Asociación Española de Genética Humana (AEGH) en el 2017 realizaron un consenso sobre el uso de microarray para madres con gestaciones previas con fetos con síndromes genéticos, gestación actual con translucencia nucal elevada, feto con cardiopatía o anomalías que no corresponde a un síndrome conocido(53).

NIPT en la actualidad

Actualmente se encuentran disponibles algunas pruebas que ofrecen la detección de otras alteraciones como aneuploidía en los cromosomas 22 y 16, microdeleciones (1p, 4p, 5p, 8q, 11q, 15p y 22q), adicional a la detección de aneuploidías de los cromosomas 13,18 y 21, y aneuploidías cromosómicas sexuales(16, 23).

El rendimiento de NIPT para la detección de aneuploidía es muy alto y mejor que los enfoques de detección prenatal estándar(25). Una revisión sistemática y metaanálisis publicados en 2016 encontraron que la sensibilidad combinada de NIPT para la trisomía 21 fue del 99,3%, para la trisomía 18 fue 97,4% y para la trisomía 13 del 97,4%(48). El cromosoma X en particular, es el que más contribuye al índice de falsos positivos debido a la pérdida relacionada con la edad materna y a los mosaicismos maternos no diagnosticados. La tasa global de falsos positivos para las pruebas que evalúan los cromosomas 13, 18, 21, y los cromosomas sexuales es del 0,72% o aproximadamente 1 en 140(25).

Sin embargo, los paneles de pruebas NIPT con detección de microdeleciones y microduplicaciones aún no tienen clara su utilidad clínica(42). El número limitado de trastornos incluidos en la prueba pueden dar falsos negativos como es el caso del Síndrome Prader-Willi, que representa solo el 65-75% de los casos con deleción cromosómica, mientras que el resto son causados por disomía uniparental o un solo gen afectado; o en el caso del síndrome de deleción 22q11.2, en el cual el 85% tiene una deleción del 3 Mb en el cromosoma 22, sin embargo, existen deleciones atípicas las cuales no serían detectadas por NIPT(5, 8). Para la detección de estos trastornos, las pruebas NIPT ofrecidas actualmente tienen valores predictivos

positivos que varían entre 21% para la detección de deleción 22q11 y 0% para otros tipos de deleciones encontradas como en el síndrome de Angelman/ Prader Willi o Cri-du-chat, según un estudio publicado en el 2017(54).

A pesar del buen rendimiento de las pruebas NIPT para la detección de aneuploidías fetales comunes, estas pruebas actualmente se consideran como de tamización y no como pruebas diagnósticas. Las NIPT no reemplazan la precisión obtenida con la toma de vellosidades coriónicas o la amniocentesis ya que las NIPT se puede afectar por factores biológicos como el origen del ADN fetal (trofoblasto) o por presencia de mosaicismos. Es por esto que el Gold standard sigue siendo el cariotipo.

Las pruebas NIPT para la detección de anomalías genéticas en gestaciones con ecografía prenatal alterada detecta el 10,4% de las aneuploidías fetales. A pesar de que su detección es más alta que con las pruebas de tamización del primer trimestre, no se debe recomendar NIPT para la evaluación genética de la etiología de las anomalías ecográficas, ya que tanto la resolución como la sensibilidad son inferiores a los del análisis convencionales de cariotipo y microarray(55). Por consiguiente, si se detecta un “riesgo alto” en la tamización inicial se debe ofrecer una prueba de diagnóstico invasivo en lugar de pruebas de detección de ADN libre; y la interrupción del embarazo no se debe basar solo en el resultado de la NIPT(23, 25). En cuanto al rendimiento de la NIPT como prueba de tamización en embarazos concebidos a través de tecnología de reproducción asistida, esta presenta un mejor rendimiento que la tamización estándar, disminuyendo el número de procedimientos invasivos(17).

La tamización combinada en el primer trimestre podría clasificar a la población en 3 grupos: “alto riesgo” que deberían ser llevadas a procedimientos invasivos; “riesgo intermedio” las cuales se beneficiarían de NIPT; y “bajo riesgo” que no requieren más estudios para evaluar aneuploidías(56). Según los likelihood ratios (razones de probabilidad) calculados por un metanálisis, el riesgo de trisomía 21, 18 y 13, se reduce por un factor de 333, 47 y 100, respectivamente, si la NIPT es negativa. Por ejemplo, si el riesgo pretest para trisomía 21 fue de 1 en 100 y la NIPT arroja un bajo riesgo, el riesgo postprueba será de 1 en 33300 de tener trisomía 21. En el caso de trisomía 18, si el riesgo pretest era de 1 en 2, con una NIPT negativa, el riesgo post-test será de 1 en 94(57).

El uso creciente de NIPT como una prueba de detección para la aneuploidías ha reducido hasta en un 50% la realización de pruebas invasivas(25). Las pacientes deben recibir una asesoría genética pre y post prueba, explicando las tasas de detección y las limitaciones de la prueba(16, 25).

En el anexo 1 se describen las pruebas NIPT disponibles actualmente y la descripción de las anomalías evaluadas por cada una de ellas. En nuestro medio, varias de estas pruebas son ofrecidas a las gestantes sin asesoría genética en la mayoría de los casos, sin tener claridad sobre los alcances y limitaciones de estas pruebas.

Justificación

La detección prenatal de anomalías cromosómicas se ha realizado durante más de 40 años, aunque la mayoría de los fetos con anomalías cromosómicas no son viables y resultan en aborto espontáneo temprano, una parte logran sobrevivir hasta el periodo neonatal como es el caso de la trisomía 18 y 13, y hasta la edad adulta como la trisomía 21 y algunas aneuploidías cromosómicas sexuales(6).

Las pruebas prenatales no invasivas tienen muy buen rendimiento como prueba de tamización para trisomía 21(48), y en menor medida para trisomía 18, 13 y aneuploidías cromosómicas sexuales(25). Por estas razones, se ha dedicado un esfuerzo considerable a lo largo de los años para identificar a estos fetos al principio del embarazo con el fin de proporcionar a las parejas el tiempo suficiente para considerar sus opciones reproductivas. Actualmente, se ofrecen pruebas NIPT de diferentes casas comerciales en donde se evalúan aneuploidías cromosómicas y microdeleciones(16), sin embargo, aún se desconoce con exactitud la sensibilidad y especificidad para detección de trastornos genómicos(16, 23).

En una encuesta realizada en Estados Unidos a 278 especialistas materno fetales, 94% utilizaban NIPT en su práctica diaria, de los cuales 13% ofrecían NIPT como prueba diagnóstica, 5% ofrecían NIPT a todos los pacientes y solo el 59% de las pacientes cumplían con criterios para realización de NIPT, lo que indica que hay una brecha entre las prácticas actuales realizadas por los especialistas y lo recomendado por las sociedades científicas(58). En Colombia, desconocemos si las pruebas NIPT que son ofrecidas, funcionan adecuadamente para nuestra población.

Por lo anterior, en el presente estudio se pretende evaluar en una muestra piloto la concordancia que existe entre una prueba NIPT para la detección de aneuploidías cromosómicas y/o microdeleciones/microduplicaciones, con el Gold standard que es el cariotipo o el microarray prenatal, en embarazos con criterios de alto riesgo para aneuploidías fetales mediante tamización de primer o segundo trimestre bioquímico y ecográfico, para correlacionar los hallazgos y evaluar rendimiento diagnóstico de dichas pruebas. Además, estos estudios han sido realizados en

población diferente a la colombiana y es importante conocer el rendimiento operativo en nuestro país.

Hipótesis

Existe buena concordancia entre las pruebas prenatales no invasivas con las pruebas diagnósticas invasivas en maternas con alto riesgo para aneuploidías fetales

Objetivo

Objetivo general

Evaluar la concordancia de una prueba no invasivas prenatal (NIPT) contra pruebas invasivas prenatales (cariotipo o microarray prenatal) en una muestra piloto de embarazos de alto riesgo de aneuploidías fetales.

Objetivos específicos

- Describir las características demográficas, clínicas y hallazgos ecográficos de las pacientes enviadas para estudio de anomalías cromosómicas.
- Evaluar la concordancia de pruebas invasivas prenatales confirmatorias con los resultados de una prueba prenatal no invasiva (NIPT) en una muestra piloto de embarazos de alto riesgo detectados mediante tamización prenatal de primer/segundo trimestre.
- Evaluar la concordancia entre una prueba prenatal no invasivas (NIPT) y las pruebas de tamización prenatal de primer/ segundo trimestre en embarazos de alto riesgo para aneuploidías fetales.
- Realizar seguimiento postnatal para correlacionar los hallazgos moleculares con los hallazgos clínicos.

Materiales y métodos

Población

Mujeres con embarazos menores a 20 semanas de gestación clasificadas como alto riesgo para aneuploidías fetales con un riesgo de 1 en 100, en quienes su médico tratante decida que requiere test invasivos para el diagnóstico.

Tipo de estudio

Estudio de pruebas diagnósticas en una serie de casos con muestreo no probabilístico por conveniencia.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Pacientes con embarazo de alto riesgo para aneuploidías fetales con menos de 20 semanas de gestación con pruebas de tamización alteradas (ecográficas y/o séricas).

Criterios de exclusión

- Embarazo gemelar.
- Neoplasia detectada en la madre.
- Trasplante de cualquier órgano.
- Estar recibiendo manejo con heparinas durante el embarazo
- Embarazo previo con trisomía sin pruebas de tamización alteradas (ecográficas y/o séricas).

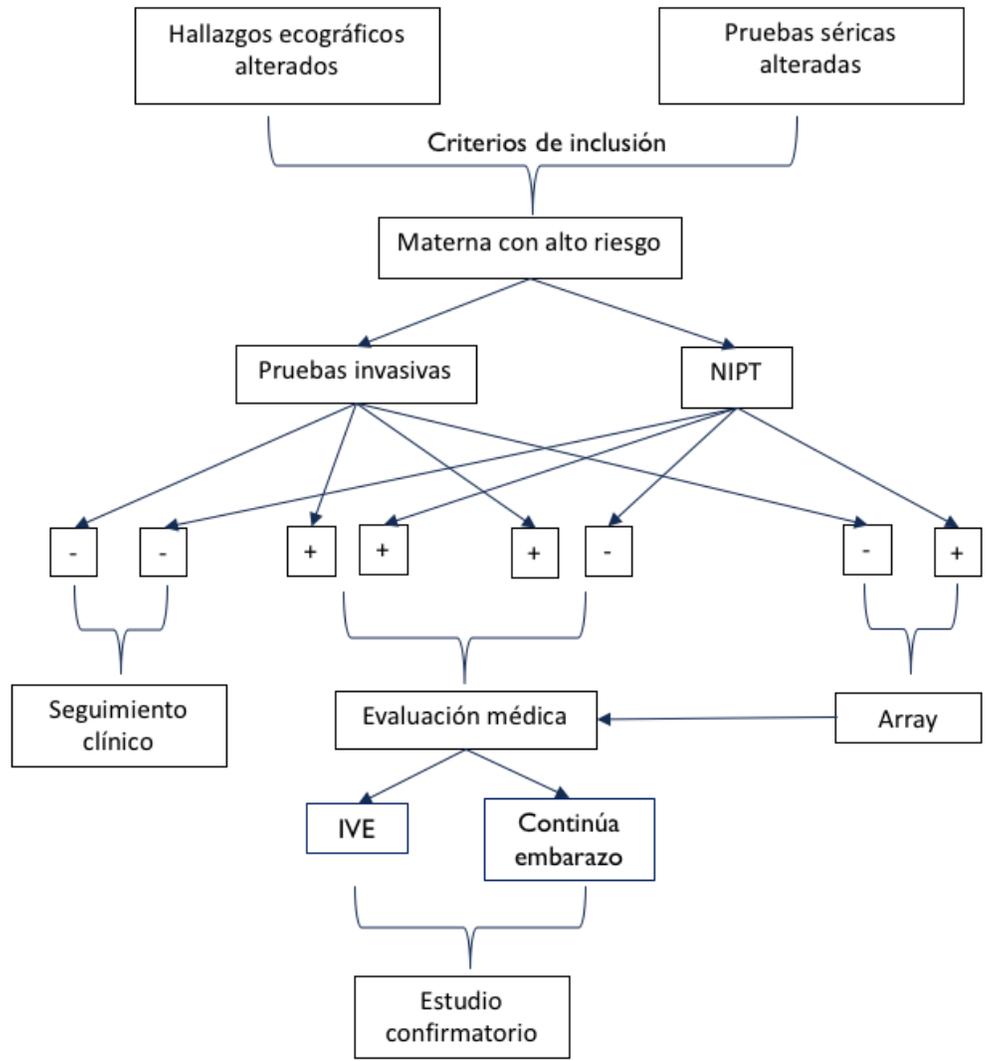
Metodología

Muestras

Con el aval del comité de ética de la Universidad Nacional, se presentó el proyecto al grupo de ginecobstetras de las instituciones con las que existía convenio vigente.

Se tomaron muestras a 15 gestantes que cumplían los criterios de alto riesgo para aneuploidías fetales previo consentimiento informado.

A continuación, se detalla el flujograma de trabajo y evaluación.



Gráfica 1. Flujograma de trabajo para la evaluación de embarazos de alto riesgo en el presente estudio.

Pruebas invasivas

La toma de la muestra de líquido amniótico o biopsia de vellosidad corial fueron realizadas por el obstetra tratante. Se obtuvieron entre 10-20 cc de líquido amniótico, o la biopsia de vellosidad corial (Ver Tabla # 1). A todas las muestras se les realizó estudio cromosómico convencional. Una vez obtenido el resultado del cariotipo se informó a su médico tratante.

Estudio citogenético

Se realizó el estudio citogenético prenatal confirmatorio (estudio cromosómico de líquido amniótico o de biopsia de vellosidad corial) a las 15 muestras obtenidas. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones de la IPS Servicios Médicos Yunis Turbay y Cia SAS, Instituto de Genética en la ciudad de Bogotá, entidad habilitada por la Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, y Certificado bajo norma ISO 9001:2015 de Icontec. La institución está clasificada como Laboratorio Clínico de Alta Complejidad y los procesos de citogenéticas están cobijados bajo el alcance de la certificación ISO 9001:2015 de ICONTEC.

Los protocolos Institucionales de Servicios Médicos Yunis Turbay y Cia están amparados bajo el régimen de propiedad industrial, razón por la cual no se detallan en la presente propuesta.

Brevemente, las muestras de líquido amniótico una vez ingresadas y codificadas, son centrifugadas y el botón celular se incuba por duplicado en medios de cultivo especiales para el crecimiento de amniocitos. Una vez se obtiene el crecimiento de colonias (7-12 días), se procede a realizar tratamientos estándar para visualización de los cromosomas utilizando colchicina, solución hipotónica y posterior tinción mediante bandeado G o Q, de acuerdo con los protocolos institucionales y análisis citogenético con el Sistema Case Data Manager de Applied Spectral Imaging V.8.0 (Tel Aviv, Israel).

Para el caso de biopsia de vellosidad corial, una vez se inspecciona el material mediante estereoscopio y se selecciona el fragmento a cultivar, este es disgregado en medios de cultivo especiales por duplicado. Una vez se obtiene el crecimiento de colonias (7-12 días), se procede a realizar tratamientos estándar para visualización de los cromosomas utilizando colchicina, solución hipotónica y posterior tinción mediante bandeado G o Q, de acuerdo con los protocolos institucionales. El análisis se realizó mediante el Sistema Case Data Manager de Applied Spectral Imaging V.8.0 (Tel Aviv, Israel).

El análisis citogenético se lleva a cabo en por lo menos 25 metafases, y los resultados son validados por un médico genetista con experiencia mínima de 5 años para su emisión.

Pruebas no invasivas

Pruebas séricas

Se realizaron estudios de tamización sérica del primer trimestre (Proteína A específica del Embarazo y BhCG) y del segundo trimestre (hCG, alfa-fetoproteína y estriol conjugado) en plasma sanguíneo obtenido de sangre periférica con EDTA. Estas muestras fueron remitidas a un laboratorio de referencia para su procesamiento.

Pruebas NIPT

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones de la IPS Servicios Médicos Yunis Turbay y Cia SAS, Instituto de Genética en la ciudad de Bogotá.

Al ingresar al laboratorio estas muestras se manipularon en cabina de flujo laminar, uso de guantes, mascarilla y limpieza de áreas antes del procesamiento para garantizar una condición estéril.

Se analizaron las muestras de sangre de las pacientes enroladas previa firma del consentimiento informado. Se tomaron entre 10-20 cc de sangre materna en tubos BCT y EDTA. El procedimiento para el análisis del ADN fetal circulante se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Protocolo aislamiento de ADN fetal (QIAGEN ®)

Separación de plasma materno:

1. Centrifugar la muestra a 1.600g durante 15 min a 4°C
2. Tomar el sobrenadante y repartirlo en varios tubos Eppendorf de 1,5-2,0 mL, previamente etiquetados.
3. Centrifugar sobrenadante a 1.600g durante 10 min a 4°C
4. Tomar el sobrenadante y colocarlos en nuevos tubos Eppendorf de 1,5-2,0 mL previamente etiquetados dejando el botón celular y los últimos 100 uL remanentes para no tocar el pellet de restos celulares
5. El plasma extraído puede ser almacenado a -20°C en este punto o continuar el proceso de extracción.

Para el aislamiento del ADN fetal circulante en sangre materna se utilizó el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid (QIAGEN®):

1. Descongelar o procesar 4 mL de muestra por cada paciente
2. Marcar los tubos falcon de 50 ml de acuerdo con el número de muestras a procesar y añadir: proteinasa K, plasma materno y buffer ACL conteniendo Carrier RNA

3. Cierre el tubo y realice vortex por 30 segundos
4. Incube las muestras a 60°C por 30 minutos en baño maría.
5. Añada 7.2 ml de Buffer ACB.
6. Cierre los tubos y de vortex por 30 segundos
7. Incube el lisado en Hielo por 5 minutos
8. Añada contenido de los tubos falcon en columna QIAamp, aplicar vacío
9. Añada a cada columna buffer ACw1, luego buffer ACW2 y finalmente etanol absoluto
10. Colocar la Columna QIAamp minicolumn en un tubo colector de 2 ml.
11. Centrifugar 3 minutos a 14000 RPM (20.000g)
12. Colocar la columna en un nuevo colector de 2 ml
13. Incubar en bloque térmico durante 10 minutos
14. Pasar la columna a cada tubo eppendorf
15. Añadir cuidadosamente buffer AVE al fondo de la columna sin tocar el filtro.
16. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente
17. Centrifugar por 1 minuto a 14000 RPM (20000 g)
18. Congelar muestra hasta secuenciación a -20°C

Protocolo NIPT- GeneSGKit

1. Cuantificar muestras de ADN fetal
2. En cada tubo de PCR añadir 5ng en 10 mL de ADN fetal mas el master mix de la preparación de plantilla
3. Llevar muestras al termociclador
4. Luego adicionar master mix de síntesis de librería
5. Llevar muestras al termociclador
6. Luego adicionar master mix de amplificación de librería (contiene los índices de identificación asignados)
7. Llevar al termociclador
8. Pasar muestra a nuevos tubos eppendorf
9. Añadir a cada tubo 70uL de Ampure XP beads y colocar en el stand magnético
10. Transferir el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf
11. Añadir 187 uL de Ampure XP beads y colocar nuevamente en el stand magnético
12. Descartar el sobrenadante
13. A cada tubo añadir 400 uL de etanol al 80% durante 1 minutos y luego descartar el sobrenadante, realizar este paso 2 veces

14. Luego dejar secar las perlas durante 5 minutos
15. Añadir 20uL de buffer TE, incubar durante 2 minutos
16. Luego transferir el sobrenadante a nuevos tubos
17. Cuantificación del ADN fetal por Qubit y Fragment Analyzer
18. Realizar cálculos para a preparación del Pool de la librería a 4nM con la siguiente fórmula:

Volumen de la librería indexada: $\text{Volumen final} * \text{concentración final} / \text{número de librerías} * \text{concentración inicial de la librería}$

19. Al pool de la librería añadirle 2 N NaOH y HT1
20. Luego preparar el pool de carga con 594 uL de la mezcla anterior y añadir 6uL de PhiX
21. Para la secuenciación se utiliza celdas MySeq estándar de 300 ciclos en equipo MySeq de Illumina
22. Los archivos FastQ obtenidos, se suben a la plataforma NIPT de Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia España) para el análisis bioinformático y la generación de reporte. El fundamento de la prueba es que las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva paralela para todos los cromosomas son alineadas con el genoma de referencia y se determina si existe variación en número de copia para cada cromosoma (sea secuencia completa del cromosoma o secuencias parciales del cromosoma). Se evalúa la ganancia o pérdida de material genético en cada muestra la cual, es comparada con valores obtenidos del procesamiento previo de múltiples muestras, con las cuales se establecieron valores Z score para número euploide mediante secuencia de nueva generación. Aquellas muestras que presenten valores por encima (ganancia) o por debajo (pérdida) de los límites Z score determinados, serán indicativas de tener Aneuploidías o CNV (copy number variation) para el caso de microdeleciones o microduplicaciones. El programa bioinformático arrojará el riesgo para aneuploidía o el riesgo para CNV en el reporte.

Análisis estadístico

Se realizó análisis epidemiológico para obtener el rendimiento operativo de la prueba en cuanto a sensibilidad, especificidad, valores predictivos, precisión e índice de Youden(59).

A la par, se realizó un análisis estadístico de correlación con índice Kappa para las variables dicotómicas y pruebas de contraste de hipótesis bivariadas según la

naturaleza de la variable y el tipo de distribución. Se empleó la corrección necesaria para tamaños de muestras pequeñas.

Aspectos éticos

Este estudio fue clasificado como riesgo mayor que el mínimo según la Resolución número 8430 de 1993 (octubre 4), Capítulo IV. Las mujeres en embarazo que participaron en el estudio fueron valoradas por su ginecobstetra tratante quien determinó el riesgo de la paciente para aneuploidías fetales y definió la realización de pruebas invasivas. La toma de estas muestras sanguíneas no acarreó un riesgo adicional al feto.

La investigación se llevó a cabo con la firma el consentimiento informado de las pacientes y la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética de cada institución. Este estudio cumplió con lo descrito en la declaración de Helsinki.

Resultados

En este estudio se incluyeron 15 pacientes gestantes clasificadas como embarazos de alto riesgo por hallazgos ecográficos y/o bioquímicos por el ginecobstetra tratante. Las pacientes fueron captadas en el Hospital Materno Infantil de la ciudad de Bogotá y solo una paciente fue reclutada de la ciudad de Medellín. Ninguna de las pacientes tenía antecedentes de enfermedad genética, hijos con enfermedad genética conocida y sus parejas eran sanas. Todas las gestaciones fueron únicas y espontáneas. La edad promedio de las pacientes fue de 30 años, y la edad gestacional para la realización de la prueba NIPT fue 14+3 semanas. El 60% de las pacientes tenían un IMC normal, el 33,3% se encontraban en sobrepeso y el 6,6% en obesidad.

Por tratarse de embarazos con alto riesgo para aneuploidía, el estudio citogenético invasivo debía realizarse a todas las pacientes.

La tabla 1 contiene la descripción demográfica y los hallazgos citogenéticos y de las pruebas prenatales no invasivas (NIPT) en las pacientes analizadas.

Tabla 1. Descripción de las pacientes

Paciente	Edad	IMC	Hallazgos ecográficos	Edad gestacional prueba NIPT	% ADN fetal	Método invasivo	Resultado citogenética	Resultado NIPT	Conducta
1	39	24	Hipoplasia hueso nasal, TN aumentada	14+4	16	Amniocentesis	47,XX,+21	Alto riesgo para T21, sexo femenino	IVE
2	42	26	TN aumentada	12+4	15,4	Amniocentesis	46,XY	Bajo riesgo, sexo masculino	Sexo masculino, sano
3	31	29	TN aumentada	12+6	13	Amniocentesis	46,XX	Bajo riesgo, sexo femenino	Sexo femenino, sana
4	21	20	Onfalocele	14+4	23,8	Ninguno	No disponible	Bajo riesgo, sexo masculino	Sexo masculino, sano
5	31	21	Higroma quístico, cardiopatía compleja, hidrops fetal, hidronefrosis izquierda, arteria umbilical única	14+3	8,1	Amniocentesis	45,X	Riesgo alto para Monosomía del cromosoma X	IVE
6	30	25	TN aumentada	12+1	16,3	Amniocentesis	46,XY	Bajo riesgo, sexo masculino	Sexo masculino, prematuro, sano
7	37	22	SNC con ventriculomegalia severa, canal AV, RCIU severo	16	8,3	Amniocentesis	46,XY	Bajo riesgo, sexo masculino	IVE
8	25	22	Bradiarritmia supraventricular, cardiopatía fetal compleja CIV y dilatación auricular derecha, ectopia gástrica	16+4	<4	Amniocentesis	46,XX	NIPT fallida	Sexo femenino, en estudios de ectopia gástrica
9	28	26	TN aumentada	11+6	12	Amniocentesis	46,XX	Bajo riesgo, sexo femenino	IVE

10	29	24	Obstrucción de la vía urinaria , aumento de la vejiga	15	6	Toma de vellosidades coriales	46,XY	Bajo riesgo , sexo masculino	IVE
11	37	30	Canal AV y micrognatia	16+6	7	Amniocentesis	46,XY	Bajo riesgo , sexo masculino	31 semanas, masculino, ecografías sin reporte de canal AV.
12	27	21	Hidrocefalia severa , quiste interhemisferico occipital	16+6	14	Amniocentesis	46,XY	Bajo riesgo , sexo masculino	IVE
13	17	25	TN aumentada	16	11	Amniocentesis	46,XY	Bajo riesgo , sexo masculino	Paciente continúa en seguimiento ecográfico
14	29	23	Quiste de plexo coroideo bilateral microcefalia, comunicación IV	20	9,4	Amniocentesis	47,XY,+18	Bajo riesgo , sexo masculino	IVE
15	27	22	RCIU, quiste coroideo izquierdo , mega vejiga severa, sospecha de displasia renal bilateral	16	14	Amniocentesis	46,XY	Bajo riesgo , sexo masculino	IVE

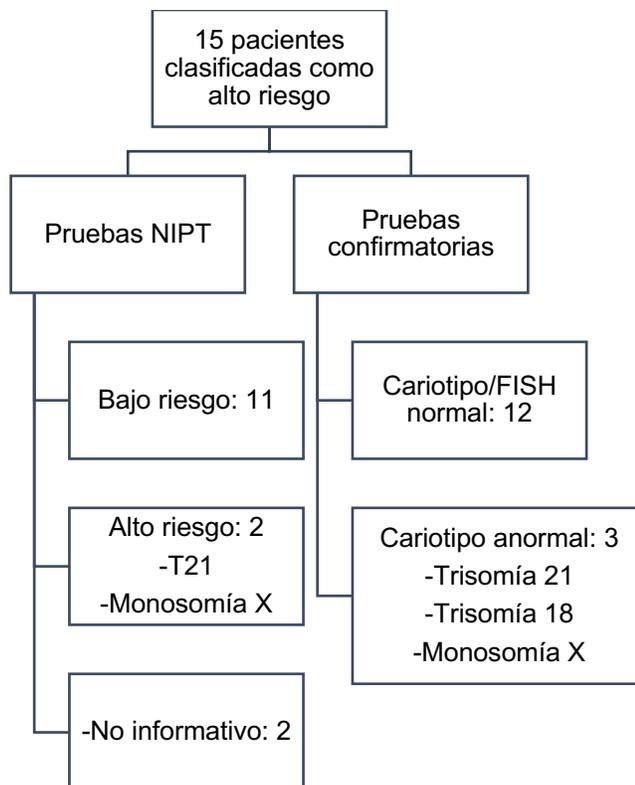
Tabla 1. Descripción de las pacientes, hallazgos ecográficos, resultados de citogenética, resultados pruebas NIPT y conducta sobre la gestación. TN: translucencia nucal, CIV: comunicación interventricular , AV: auriculoventricular , IVE: interrupción voluntaria del embarazo, T21: trisomía 21

De las 15 pacientes estudiadas, 3 gestaciones presentaron aneuploidías detectadas por estudio citogenético invasivo (20%), las cuales correspondían a: una trisomía 21, una trisomía 18 y una monosomía del X. Las 12 gestaciones restantes no presentaron hallazgos citogenéticos anormales (gráfica 2).

Los resultados obtenidos de las pruebas no invasivas mediante el análisis del ADN fetal circulante en sangre materna permitieron obtener resultados en 14 de las 15 muestras procesadas (gráfica 2). En una de las muestras, la fracción de ADN fetal fue inferior al porcentaje mínimo requerido para poder llevar a cabo el análisis correspondiente (paciente 8). Ninguna de las muestras analizadas arrojó resultado con riesgo elevado para microdelección o microduplicación. Para las muestras con

hallazgo citogenético de aneuploidía (3 muestras), los resultados obtenidos mediante las pruebas NIPT detectaron la trisomía 21 y la monosomía del cromosoma X, mientras que para la gestación con trisomía 18, la NIPT arrojó un resultado no concluyente. De esta manera, las pruebas NIPT utilizadas detectaron 2/3 (67%) de las aneuploidías detectadas mediante estudio citogenético.

Gráfica 2. Resultados pruebas invasivas y NIPT



Resultados de las pruebas invasivas y pruebas NIPT.

Descripción de las pacientes

A continuación, se hace una descripción de cada una de las 15 gestaciones analizadas.

Paciente 1

Paciente de 39 años con tamización del primer trimestre alterada dada por edad materna y hallazgos ecográficos de hipoplasia hueso nasal, TN aumentada, alto riesgo para trisomía 21. El reporte del cariotipo fue 47,XX,+21 y el reporte de la

prueba NIPT fue alto riesgo para trisomía 21. Por decisión de los padres se realiza interrupción voluntaria del embarazo a la semana 18 de gestación.

Imagen 1.1. Resultado prueba NIPT

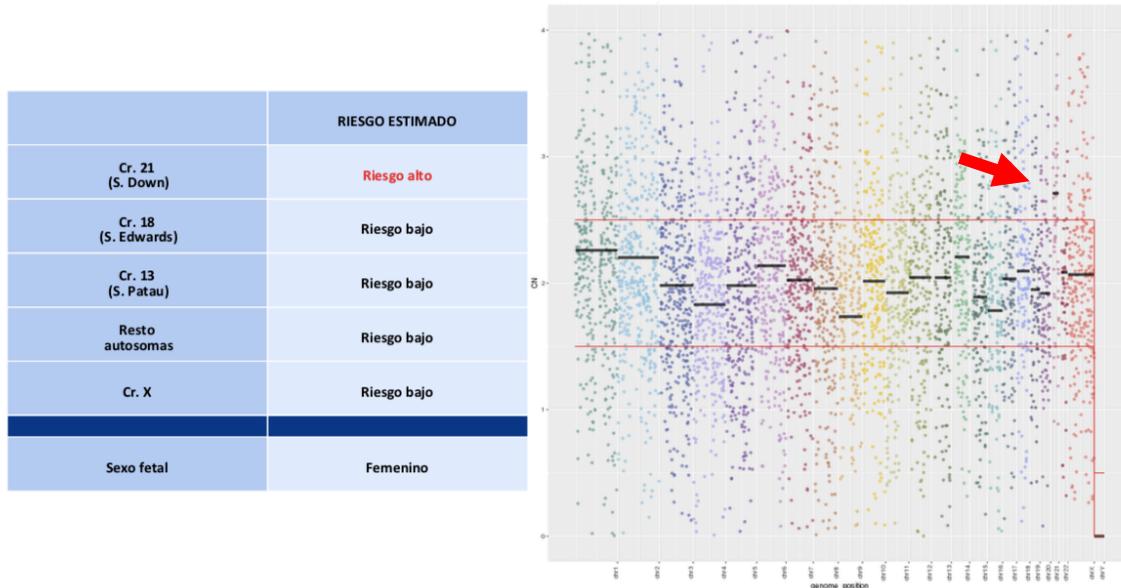
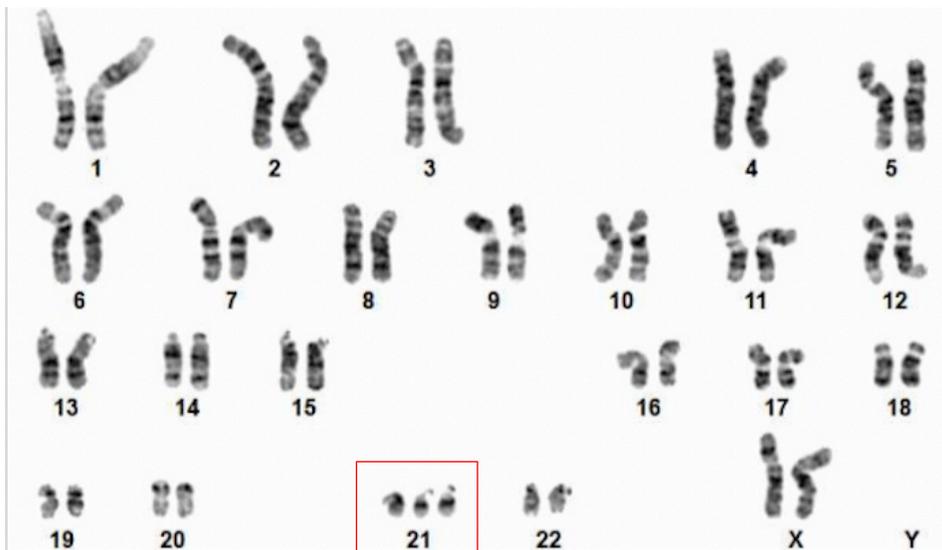


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, sexo fetal femenino. La flecha indica ganancia en la información genética en el cromosoma 21, por encima del promedio calculado como normal, indicando alto riesgo para trisomía 21.

Imagen 1.2. Cariotipo



Cariotipo Bando G, resolución de 350 bandas, con resultado 47,XX,+21 indicando individuo de sexo femenino con trisomía del cromosoma 21.

Paciente 2

Paciente de 42 años con tamización del primer trimestre alterada dada por edad materna y TN aumentada. Reporte de cariotipo 46,XY y reporte de la prueba NIPT bajo riesgo para aneuploidía, sexo masculino. Durante el seguimiento posnatal, recién nacido a término, sexo masculino con adecuado neurodesarrollo.

Imagen 2.1. Resultado prueba NIPT

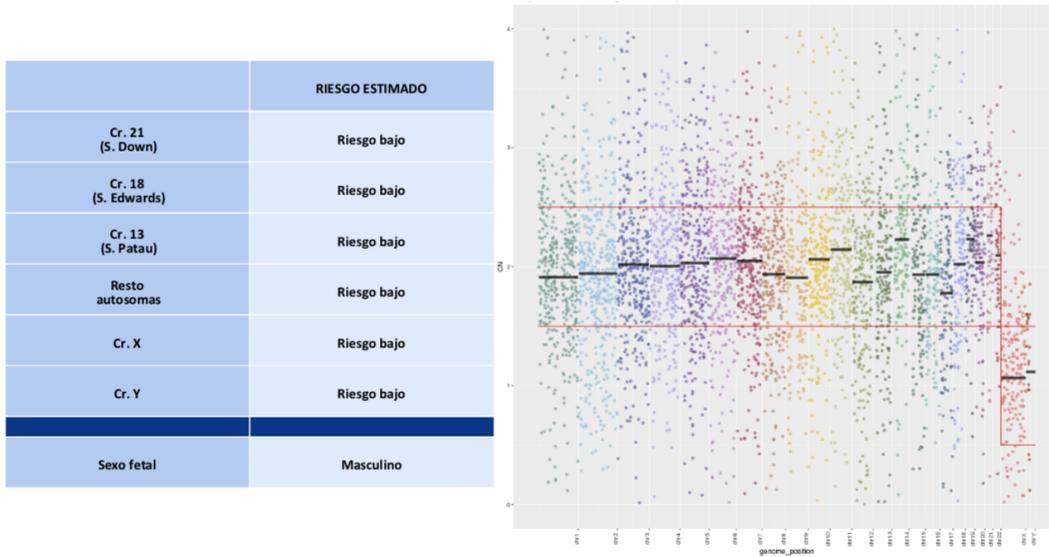
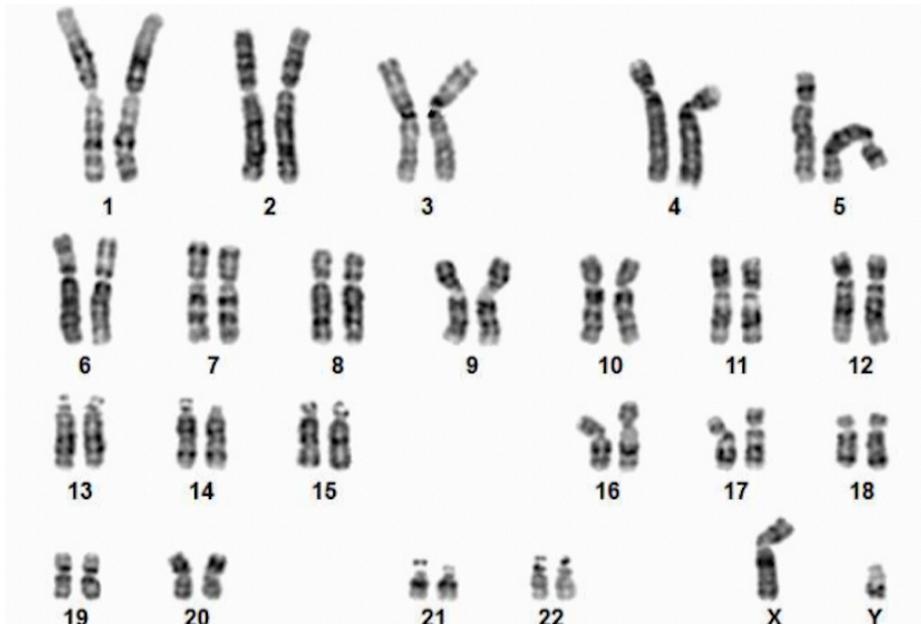


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal masculino.

Imagen 2.2. Cariotipo



Cariotipo Bando G, resolución de 400 bandas, con resultado 46,XY indicando individuo de sexo masculino sin alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Paciente 3

Paciente de 31 años con tamización del primer trimestre alterada dada por hallazgos ecográficos con TN aumentada. Reporte de cariotipo 46,XX y reporte de la prueba NIPT bajo riesgo para aneuploidía, sexo femenino. Durante el seguimiento posnatal, recién nacido a término, sexo femenino con adecuado neurodesarrollo.

Imagen 3.1. Resultado prueba NIPT

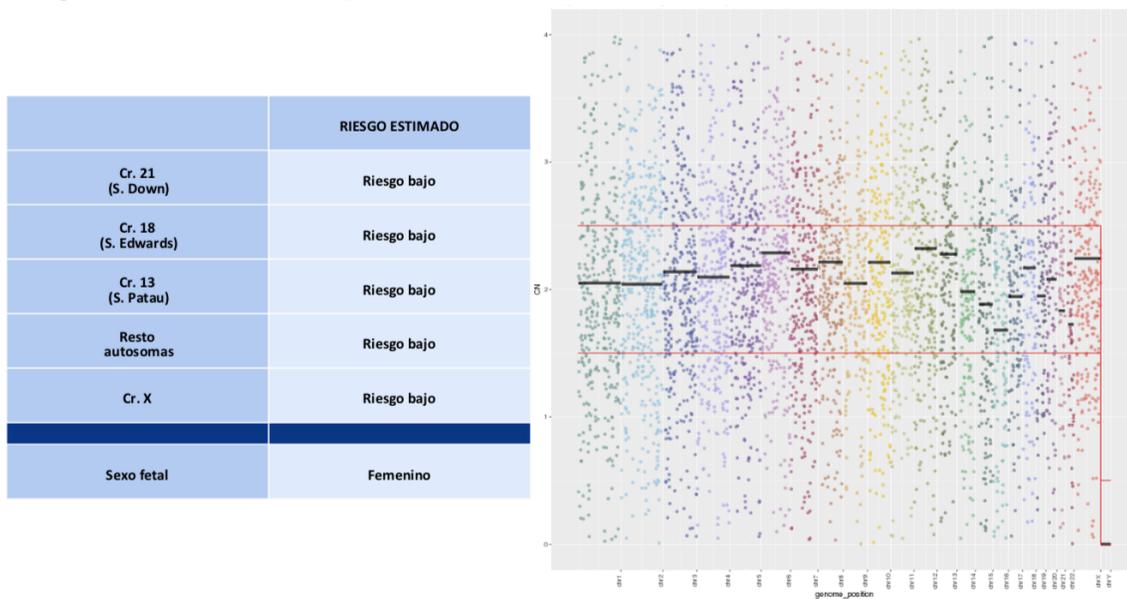
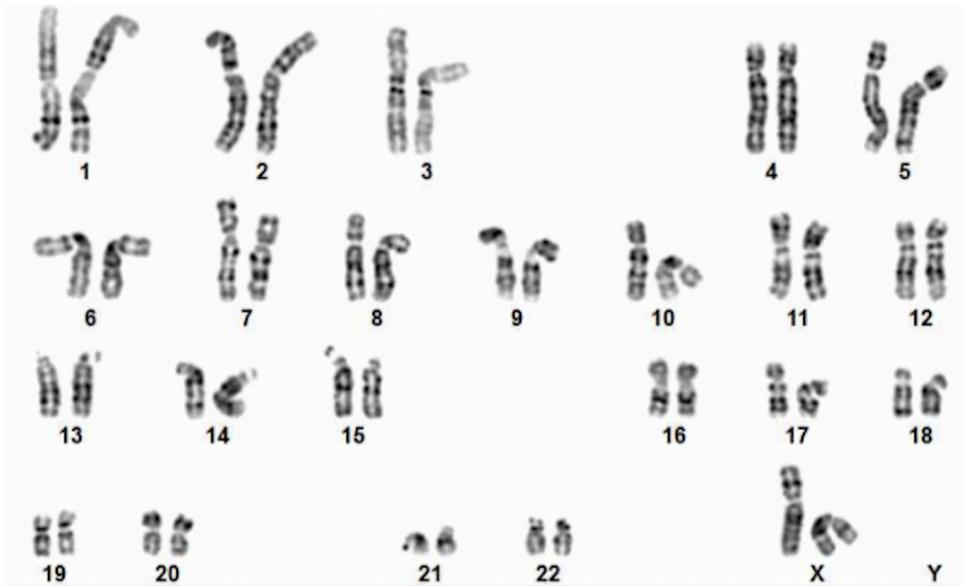


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal femenino.

Imagen 3.2. Cariotipo

Cariotipo Bando G, resolución de 425 bandas, con resultado 46,XX indicando individuo de sexo femenino sin alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Paciente 4

Paciente de 21 años, con tamización del primer trimestre alterada por hallazgos ecográficos de onfalocelo, se toma muestra para estudio NIPT que arroja bajo riesgo para aneuploidías fetales, sexo masculino. En ecografía de segundo trimestre hallazgo ecográfico correspondiente a quiste en cordón umbilical por lo cual en junta se decidió por riesgo beneficio no se realiza prueba invasiva. En el seguimiento postnatal recién nacido a termino, sexo masculino, sin hallazgos físicos anormales, con adecuado neurodesarrollo. A pesar de que no se realizó prueba invasiva se le hizo imputación como normal en el cariotipo, basados en el examen de recién nacido sano y desarrollo normal.

Imagen 4.1. Resultado prueba NIPT

	RIESGO ESTIMADO
Cr. 21 (S. Down)	Riesgo bajo
Cr. 18 (S. Edwards)	Riesgo bajo
Cr. 13 (S. Patau)	Riesgo bajo
Resto autosomas	Riesgo bajo
Cr. X	Riesgo bajo
Cr. Y	Riesgo bajo
Sexo fetal	Masculino

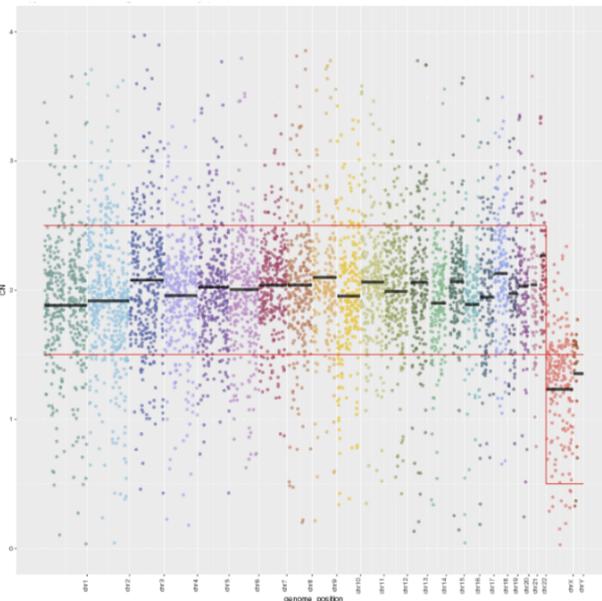


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal masculino.

Paciente 5

Paciente de 31 años con tamización del primer trimestre alterada por hallazgos ecográficos de higroma quístico, cardiopatía compleja, hidrops fetal, hidronefrosis izquierda, arteria umbilical única. Resultado citogenético mostró monosomía del X (45,X). Reporte de NIPT riesgo alto para monosomía del cromosoma X. La madre decide interrupción voluntaria del embarazo.

Imagen 5.1. Resultado prueba NIPT

	RIESGO ESTIMADO
Cr. 21 (S. Down)	Riesgo bajo
Cr. 18 (S. Edwards)	Riesgo bajo
Cr. 13 (S. Patau)	Riesgo bajo
Resto autosomas	Riesgo bajo
Cr. X	Riesgo alto
Sexo fetal	Femenino

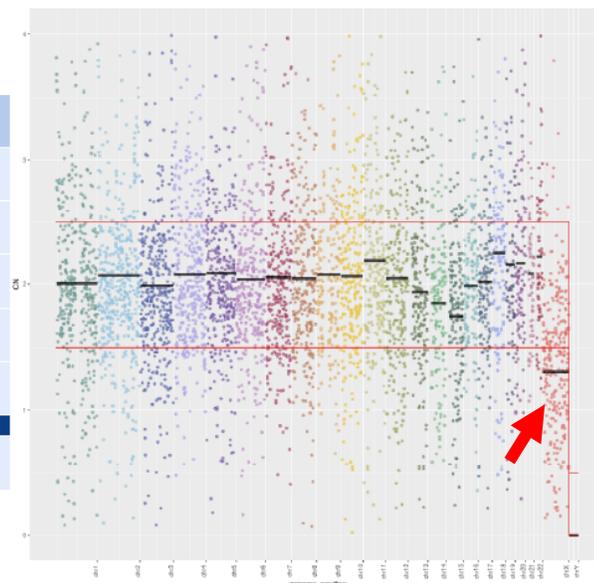
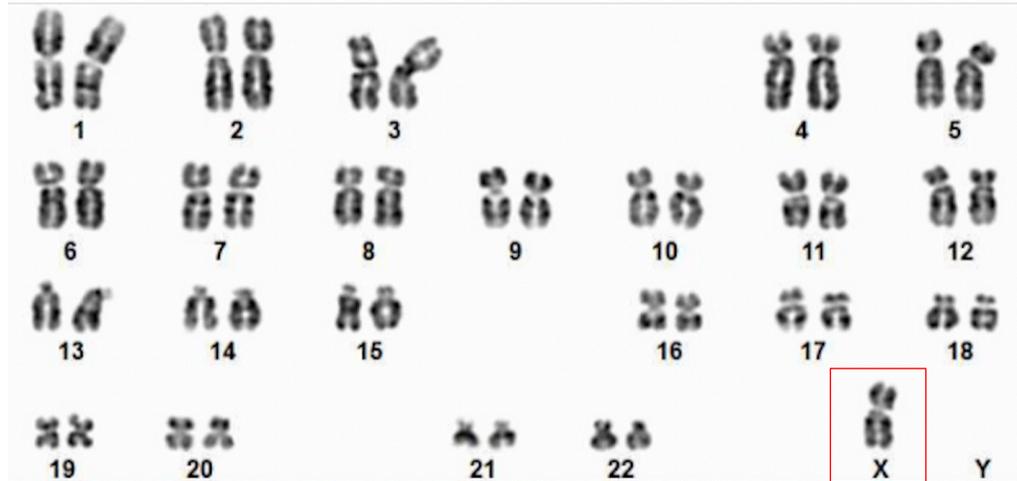


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, sexo fetal femenino por ausencia del cromosoma Y. La flecha indica pérdida en la información genética en el cromosoma X por debajo de promedio esperado para clasificar la prueba como normal, esto indica alto riesgo para monosomía del cromosoma X.

Imagen 5.2. Cariotipo



Cariotipo Bandeo G, resolución de 250 bandas, con resultado 45,X indicando individuo de sexo femenino con monosomía del cromosoma X, característico del Síndrome Turner.

Paciente 6

Paciente de 30 años con tamización del primer trimestre alterada dada por hallazgos ecográficos con translucencia nuchal aumentada. Reporte de cariotipo 46,XY y reporte de la prueba NIPT bajo riesgo para aneuploidía, sexo masculino. Al nacimiento sexo masculino, pretermino de 35 semanas secundario a infección urinaria en la madre. Actualmente en seguimiento por plan canguro, con adecuado neurodesarrollo, sin anomalías físicas.

Imagen 6.1. Resultado prueba NIPT

	RIESGO ESTIMADO
Cr. 21 (S. Down)	Riesgo bajo
Cr. 18 (S. Edwards)	Riesgo bajo
Cr. 13 (S. Patau)	Riesgo bajo
Resto autosomas	Riesgo bajo
Cr. X	Riesgo bajo
Cr. Y	Riesgo bajo
Sexo fetal	Masculino

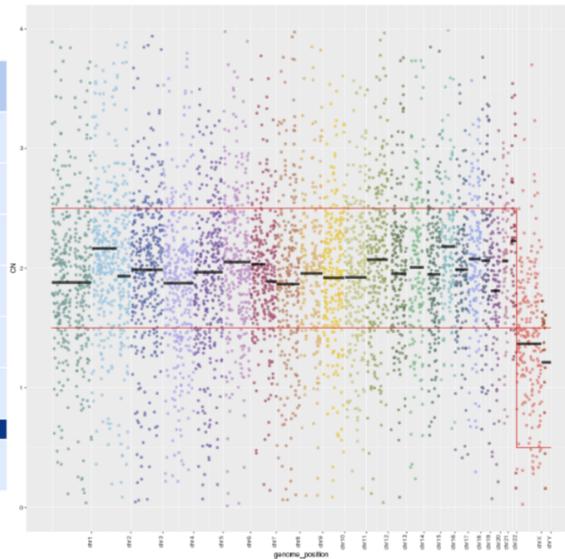
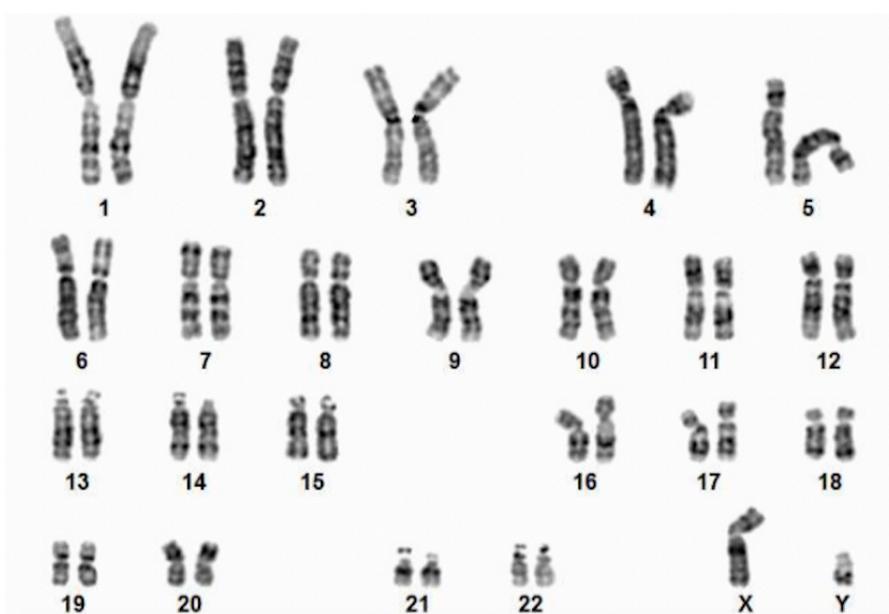


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal masculino.

Imagen 6.2. Cariotipo



Cariotipo Bando G, resolución de 400 bandas, con resultado 46,XY indicando individuo de sexo masculino sin alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Paciente 7

Paciente de 37 años con tamización del segundo trimestre alterada dada por edad materna y hallazgos ecográficos con evidencia de ventriculomegalia severa en SNC, canal AV, RCIU severo. Reporte de cariotipo 46,XY y reporte de NIPT bajo riesgo para aneuploidía, sexo masculino. Adicionalmente, la prueba NIPT arrojó bajo riesgo para microdelección/microduplicación. Los padres deciden interrupción voluntaria de la gestación, sin poder llevar a cabo estudio de microarray prenatal o postnatal.

Imagen 7.1. Resultado prueba NIPT

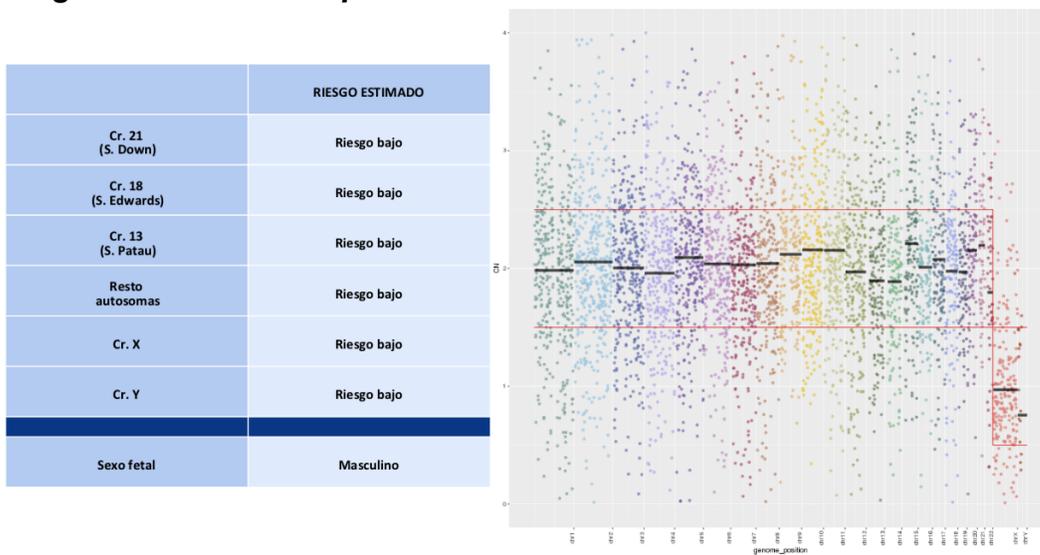
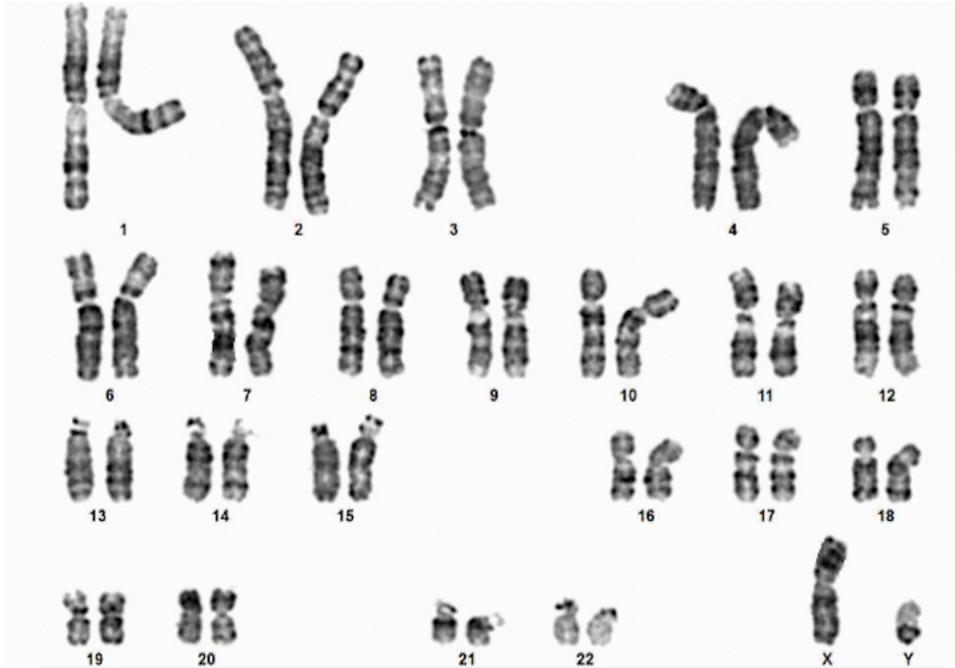


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal masculino.

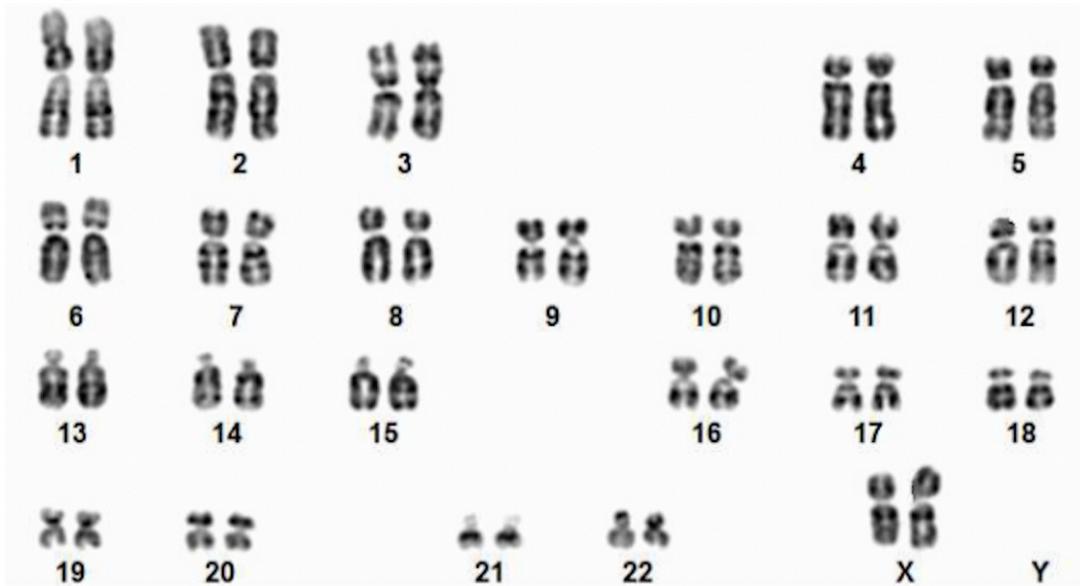
Imagen 7.2. Cariotipo

Cariotipo Bando G, resolución de 400 bandas, con resultado 46,XY indicando individuo de sexo masculino sin alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Paciente 8

Paciente de 25 años con tamización del segundo trimestre alterada por bradiarritmia supraventricular, cardiopatía fetal compleja CIV y dilatación auricular derecha, ectopia gástrica, con cariotipo 46,XX. La prueba NIPT no arrojó ningún resultado por fracción de ADN fetal por debajo del mínimo requerido (4%), esta muestra se analizó en dos oportunidades, con aislamiento de ADN fetal tanto en tubo BCT como en tubo EDTA, obteniendo el mismo resultado. En el seguimiento posnatal paciente de sexo femenino en estudios por ectopia gástrica, sin anomalías en su fenotipo.

Imagen 8.1. Cariotipo



Cariotipo Bando G, resolución de 250 bandas, con resultado 46,XX indicando individuo de sexo femenino sin alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Paciente 9

Paciente de 28 años, con ecografía de primer trimestre alterada por aumento de la translucencia nuchal, cariotipo con reporte de 46,XX y reporte de la prueba NIPT bajo riesgo para aneuploidía, sexo femenino. La paciente y su pareja deciden interrupción voluntaria de la gestación.

Imagen 9.1. Resultado prueba NIPT

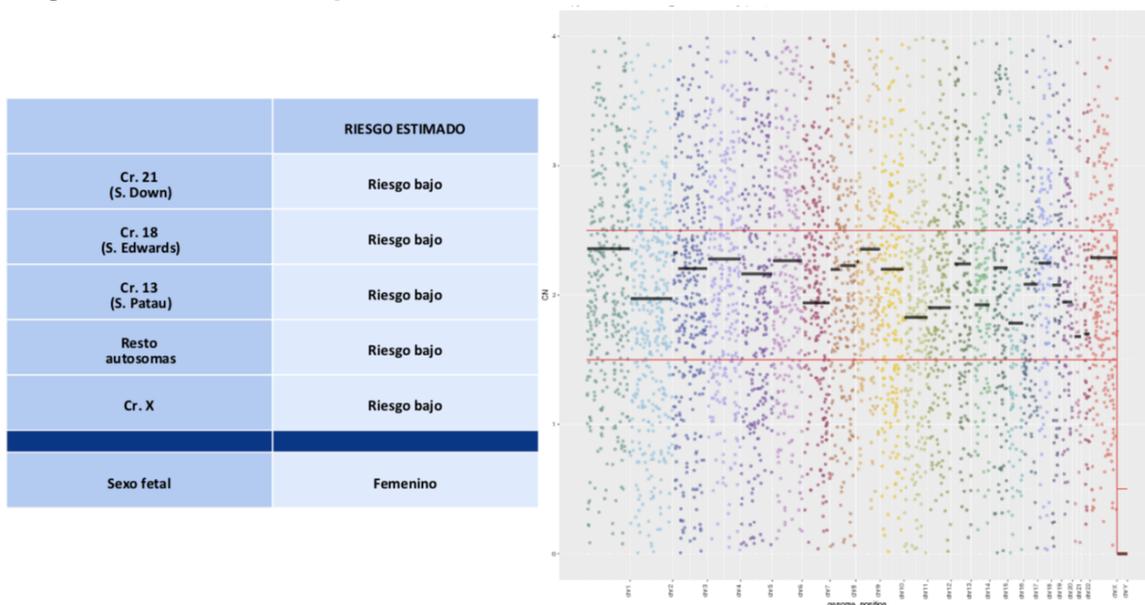
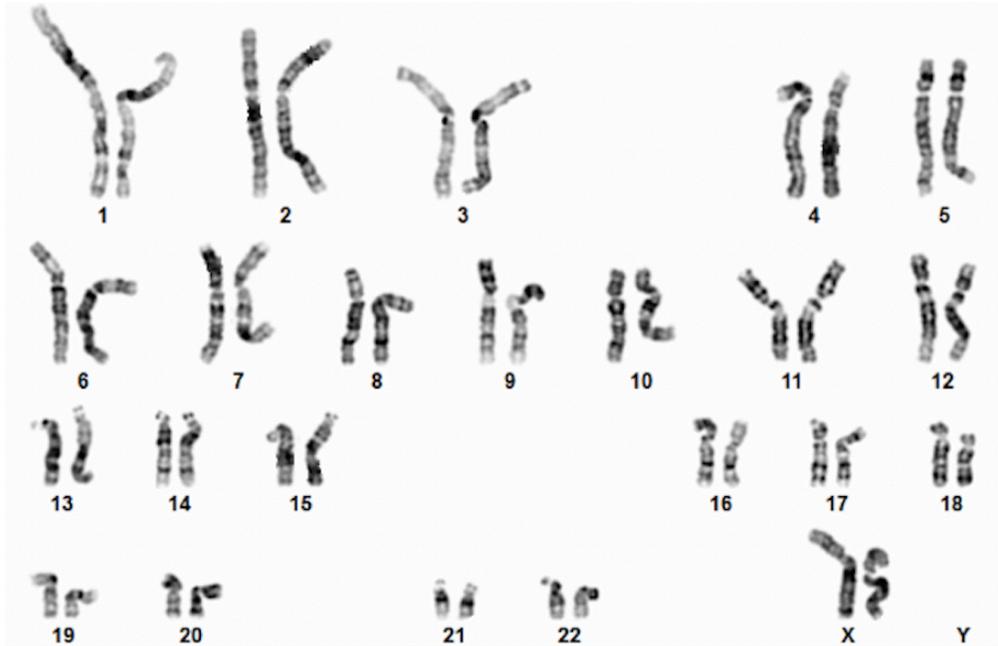


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal femenino.

Imagen 9.2. Cariotipo



Cariotipo Bando G, resolución de 550 bandas, con resultado 46,XX indicando individuo de sexo femenino sin alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Paciente 10

Paciente de 29 años, con tamización del primer trimestre con ecografía que reporta obstrucción de la vía urinaria, aumento de la vejiga, se realiza toma de vellosidades coriales con reporte de FISH 46,XY y reporte de la prueba NIPT bajo riesgo, sexo masculino. La madre decide interrupción voluntaria del embarazo.

Imagen 10.1. Resultado prueba NIPT

	RIESGO ESTIMADO
Cr. 21 (S. Down)	Riesgo bajo
Cr. 18 (S. Edwards)	Riesgo bajo
Cr. 13 (S. Patau)	Riesgo bajo
Resto autosomas	Riesgo bajo
Cr. X	Riesgo bajo
Cr. Y	Riesgo bajo
Sexo fetal	Masculino

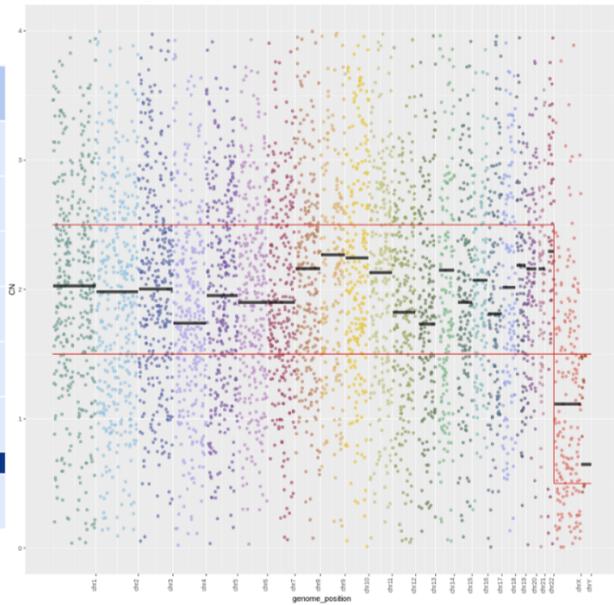


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal masculino.

Imagen 10.2. FISH

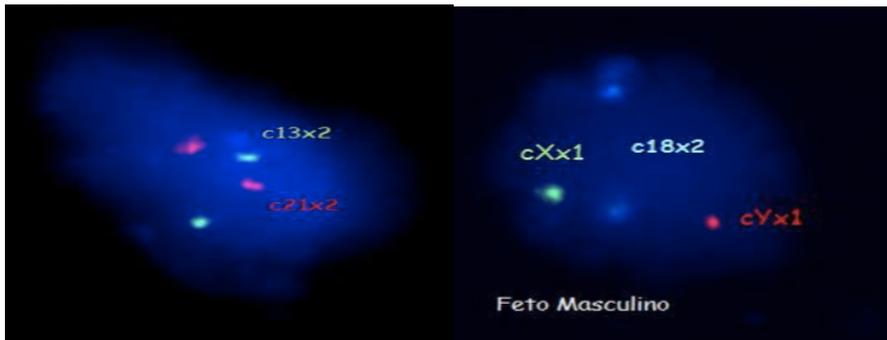


Imagen que muestra análisis por FISH. Se observa dos señales para los cromosomas 13, 18, 21, y una señal para los cromosomas X y Y, consistente con un paciente sexo masculino, sin aneuploidías en los 5 cromosomas mencionados.

Paciente 11

Paciente de 37 años, con tamización del segundo trimestre con alteración en ecografía con canal AV y micrognatia. Reporte de cariotipo 46,XY y reporte de la prueba NIPT bajo riesgo para aneuploidía, sexo masculino. En seguimiento ecográfico, feto sin cardiopatía, continúa con micrognatia.

Imagen 11.1. Resultado prueba NIPT

	RIESGO ESTIMADO
Cr. 21 (S. Down)	Riesgo bajo
Cr. 18 (S. Edwards)	Riesgo bajo
Cr. 13 (S. Patau)	Riesgo bajo
Resto autosomas	Riesgo bajo
Cr. X	Riesgo bajo
Cr. Y	Riesgo bajo
Sexo fetal	Masculino

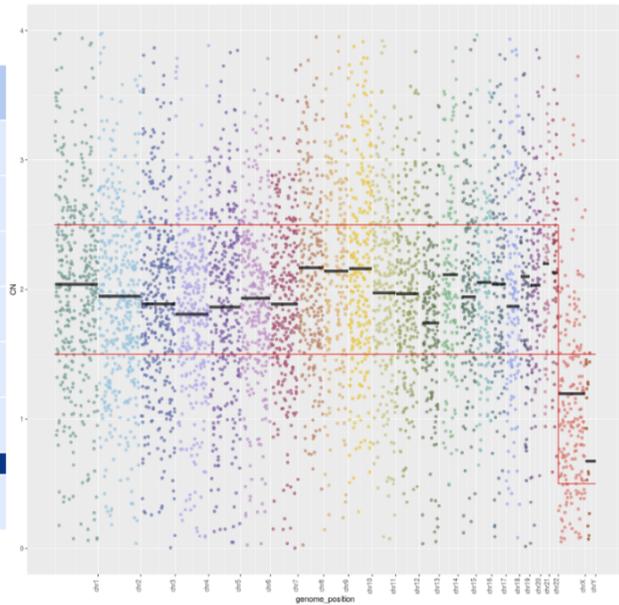
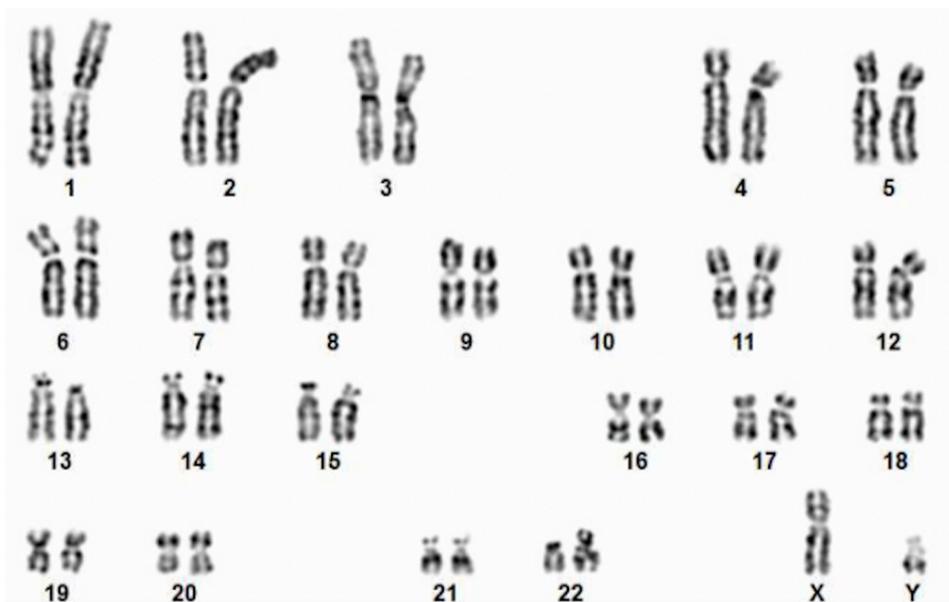


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal masculino.

Imagen 11.2. Cariotipo



Cariotipo Bando G, resolución de 400 bandas, con resultado 46,XY indicando individuo de sexo masculino sin alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Paciente 12

Paciente de 27 años, con tamización del segundo trimestre con alteración en ecografía de hidrocefalia severa, quiste interhemisférico occipital. Reporte de cariotipo 46,XY y reporte de la prueba NIPT bajo riesgo para aneuploidía, sexo masculino. Padres deciden interrupción voluntaria del embarazo.

Imagen 12.1. Resultado prueba NIPT

	RIESGO ESTIMADO
Cr. 21 (S. Down)	Riesgo bajo
Cr. 18 (S. Edwards)	Riesgo bajo
Cr. 13 (S. Patau)	Riesgo bajo
Resto autosomas	Riesgo bajo
Cr. X	Riesgo bajo
Cr. Y	Riesgo bajo
Sexo fetal	Masculino

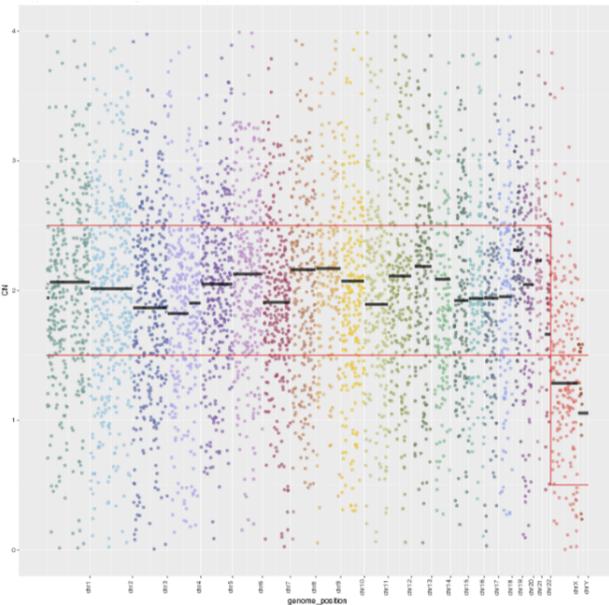
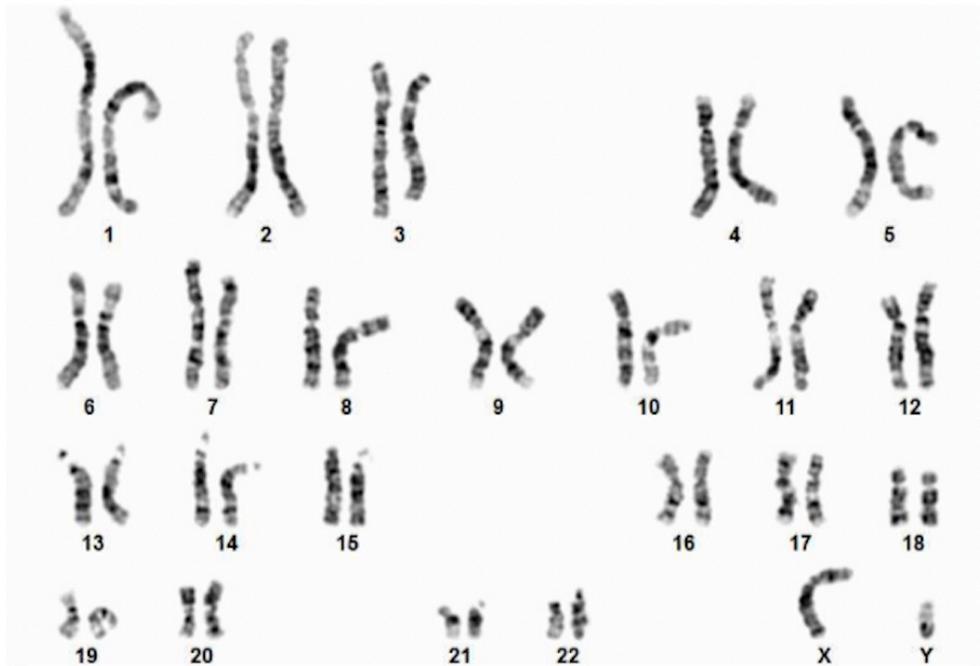


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal masculino.

Imagen 12.2. Cariotipo

Cariotipo Bando G, resolución de 475 bandas, con resultado 46,XY indicando individuo de sexo masculino sin alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Paciente 13

Paciente de 17 años, con tamización del primer trimestre alterada con translucencia nual aumentada. Reporte de cariotipo 46,XY y reporte de la prueba NIPT bajo riesgo para aneuploidía, sexo masculino. Paciente continúa en seguimientos ecográficos.

Imagen 13.1. Resultado prueba NIPT

	RIESGO ESTIMADO
Cr. 21 (S. Down)	Riesgo bajo
Cr. 18 (S. Edwards)	Riesgo bajo
Cr. 13 (S. Patau)	Riesgo bajo
Resto autosomas	Riesgo bajo
Cr. X	Riesgo bajo
Cr. Y	Riesgo bajo
Sexo fetal	Masculino

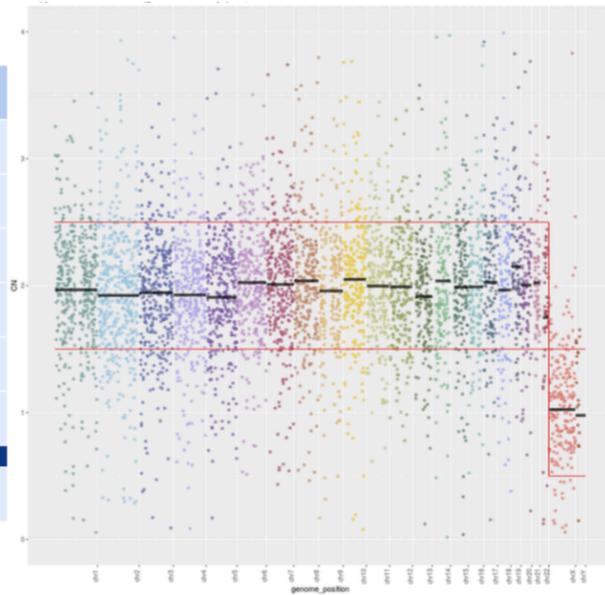
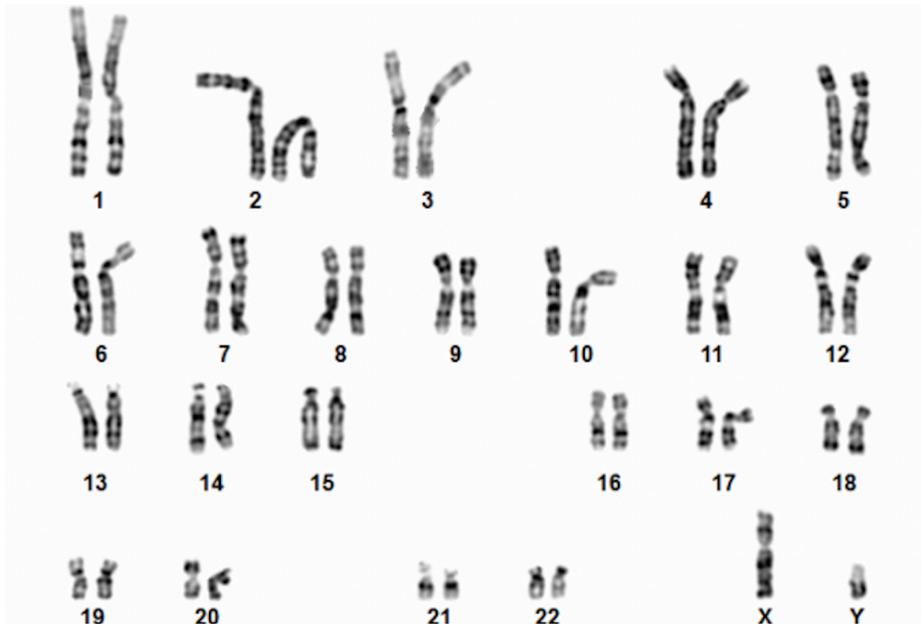


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal masculino.

Imagen 13.2. Cariotipo



Cariotipo Bando G, resolución de 425 bandas, con resultado 46,XY indicando individuo de sexo masculino sin alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Paciente 14

Paciente de 29 años, con tamización del segundo trimestre con alteración en ecografía con quiste de plexo coroideo bilateral microcefalia, comunicación IV. Reporte de cariotipo 47,XY,+18, trisomía 18 universal. Reporte de la prueba NIPT sexo masculino, bajo riesgo para aneuploidías en los cromosomas sexuales, cromosomas 21 y 13, sin embargo arroja resultado no informativo para aneuploidía del cromosoma 18. Padres realizan interrupción voluntaria del embarazo.

Imagen 14.1. Resultado prueba NIPT

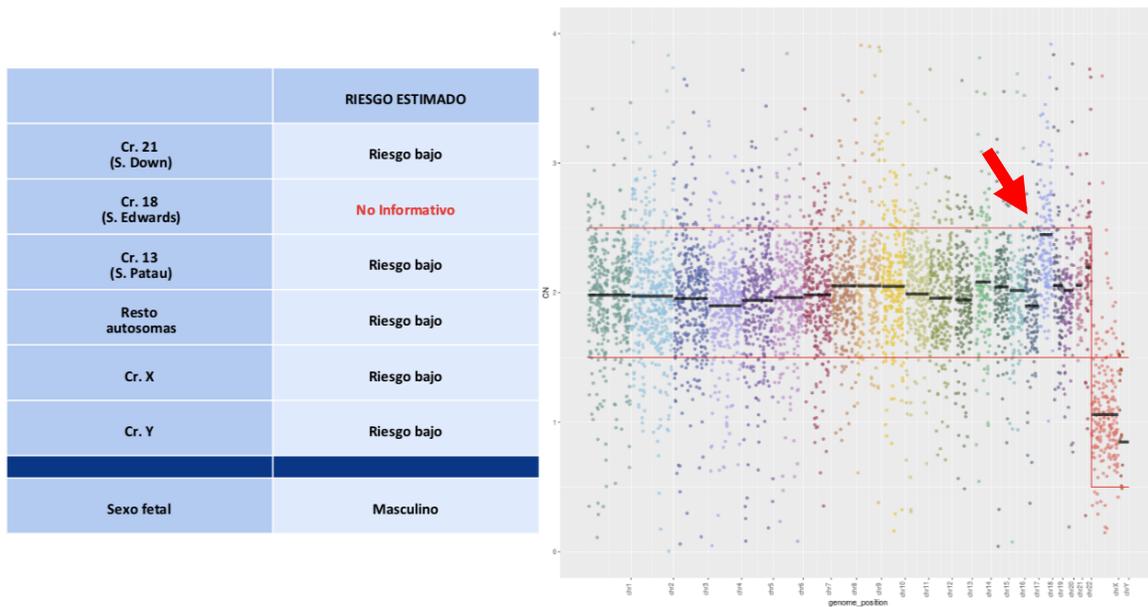


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, sexo fetal masculino. La flecha indica ganancia en la información genética en el cromosoma 18 en el limite superior de normalidad, sin sobrepasar el promedio calculado como normal.

Imagen 14.2. Cariotipo

Cariotipo Bando G, resolución de 400 bandas, con resultado 47,XY,+18 indicando individuo de sexo masculino con trisomía del cromosoma 18, característico del Síndrome Edwards.

Paciente 15

Paciente de 27 años, con tamización del segundo trimestre con alteración en ecografía con RCIU, quiste coroideo izquierdo, mega vejiga severa, sospecha de displasia renal bilateral. Reporte de cariotipo 46,XY, incremento de la heterocromatina de uno de los cromosomas del par 16, lo cual constituye una variante sin repercusión fenotípica descrita hasta la fecha y reporte de la prueba NIPT bajo riesgo, sexo masculino. Padres realizan interrupción voluntaria del embarazo.

Imagen 15.1. Resultado prueba NIPT

	RIESGO ESTIMADO
Cr. 21 (S. Down)	Riesgo bajo
Cr. 18 (S. Edwards)	Riesgo bajo
Cr. 13 (S. Patau)	Riesgo bajo
Resto autosomas	Riesgo bajo
Cr. X	Riesgo bajo
Cr. Y	Riesgo bajo
Sexo fetal	Masculino

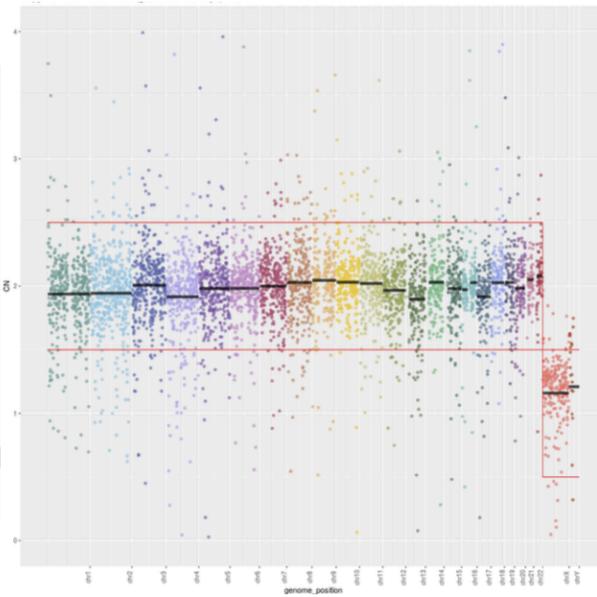
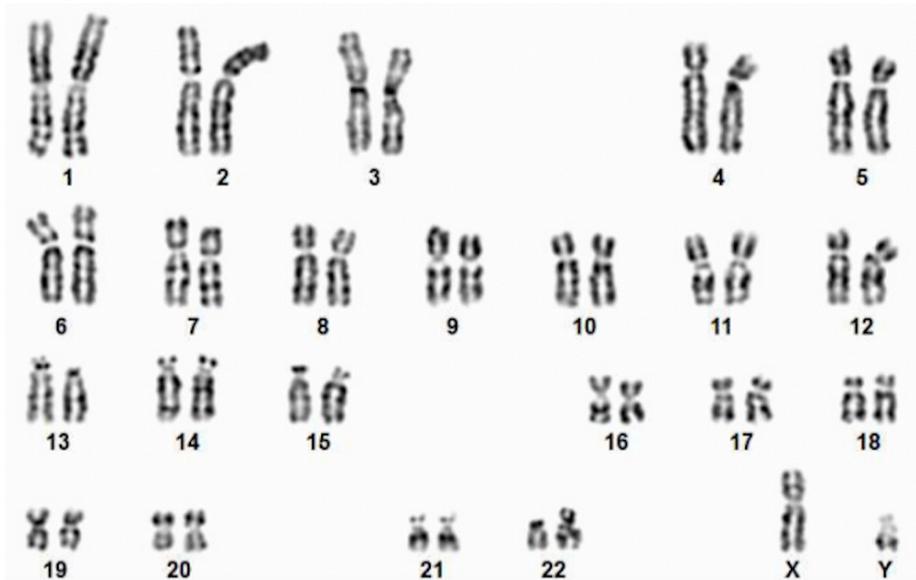


Imagen que muestra el resultado de la prueba NIPT, bajo riesgo para aneuploidías, sexo fetal masculino.

Imagen 15.2. Cariotipo



Cariotipo Bando G, resolución de 400 bandas, con resultado 46,XY indicando individuo de sexo masculino sin alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Rendimiento de la prueba NIPT

Se realizó una prueba de contraste de hipótesis por medio del estadístico χ^2 con corrección de Fisher, para evaluar el rendimiento diagnóstico de la prueba NIPT con relación al Gold standard (cariotipo) en la detección de aneuploidías mediante pruebas invasivas en pacientes de alto riesgo (Tabla 2).

Tabla 2. Rendimiento de la prueba NIPT con relación al cariotipo

Rendimiento NIPT	Detección de aneuploidías fetales	Detección trisomía 21	Detección trisomía 18*	Detección monosomía del X
Sensibilidad	66%	100%	ND	100%
Especificidad	100%	100%	100%	100%
VPP	100%	100%	ND	100%
VPN	91%	100%	100%	100%
Precisión	92%	100%	92%	100%
I. de Youden	0,66	1	ND	1
p Valor	0,033	0,071	ND	0,071
Índice Kappa	0,75	1	0	1

Rendimiento diagnóstico de las pruebas NIPT al compararlo con el cariotipo que es el Gold standard para la detección de aneuploidías fetales. *ND. No determinado. Error epidemiológico por falta de verdaderos y falsos positivos

Rendimiento de la prueba NIPT en la detección de las principales aneuploidías

El rendimiento de las pruebas prenatales no invasivas para la detección de aneuploidías tuvo una sensibilidad del 66% con una especificidad del 100% con VPP del 100% y VPN del 91%. El índice kappa mostró concordancia de 0,75 con un valor p 0,033.

Rendimiento de la NIPT en la detección de trisomía 21

El rendimiento de la pruebas prenatal no invasivas utilizada en el presente estudio para la detección de trisomía 21 tuvo una sensibilidad y especificidad del 100% con VPP 100% y VPN 100%. El índice kappa mostró una concordancia del 100% con un p 0,071.

Rendimiento de la NIPT en la detección de trisomía 18

Como se mencionó previamente, en la citogenética de la paciente número 14, se evidenció una trisomía del cromosoma 18. El reporte de la prueba NIPT arrojó sexo masculino con bajo riesgo para aneuploidías en los cromosomas 21 y 13 y en los cromosomas sexuales; sin embargo, arrojó un resultado no informativo para el cromosoma 18.

El rendimiento de las pruebas prenatales no invasivas para la detección de trisomía 18 tuvo una sensibilidad del 0% y una especificidad del 100%, con un VPP 0% y VPN 100%. El índice kappa mostró una concordancia de 0%.

Rendimiento de la NIPT en la detección de monosomía del cromosoma X.

El rendimiento de las pruebas prenatales no invasivas para la detección de monosomía del X tuvo una sensibilidad y especificidad del 100% con VPP 100% y VPN 100%. El índice kappa mostró concordancia del 100% con $p = 0,071$.

Rendimiento de la NIPT en la detección del sexo fetal

La prueba NIPT tuvo una sensibilidad y especificidad del 100% para la detección del sexo fetal, con VPP y VPN del 100%. El índice Kappa mostró concordancia del 100% con un $p = 0,0003$ (Tabla 3).

Tabla 3. Detección del sexo fetal por NIPT y cariotipo

Sexo fetal	NIPT	Cariotipo
Masculino	10	10
Femenino	4	4
Sensibilidad	100%	100%
Especificidad	100%	100%
VPP	100%	100%
VPN	100%	100%

Detección del sexo fetal por NIPT y cariotipo.

Relación de la fracción fetal de ADN según el tubo de recolección de la muestra

Para la recolección de la sangre materna, se utilizaron dos tipos de tubos: los BCT y los tubos con EDTA. Para el aislamiento del ADN fetal, se utilizaron 10 muestras tomadas en tubos BCT y 6 muestras en tubos con EDTA (Tabla 4). El promedio de la fracción fetal de ADN fue 12,45% para las muestras analizadas (rango 6-23.8%). La muestra de ADN fetal NIPT 8, no mostró fracción fetal con ninguno de los dos tubos analizados (BCT, EDTA).

Para establecer la relación de la fracción fetal de ADN y el tubo de recolección, se empleó una prueba T-student. Los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas con un p 0,88 (IC 95% -5,36-6,17). Sin embargo, se observa que el promedio de la fracción de ADN fetal fue más bajo en las muestras tomadas en tubos con EDTA (promedio 8.02%) que aquellas tomadas con tubos BCT (promedio 13.9%)

Tabla 4. Tipo de tubo utilizado para el aislamiento de ADN fetal

Paciente	Fracción ADN fetal %	Tubo BCT	Tubo EDTA
1	16	X	
2	15,4	X	
3	13	X	
4	23,8	X	
5	8,1		X
6	16,3	X	
7	8,3	X	
8	<4%*	X	X
9	12	X	
10	6	X	
11	7		X
12	14	X	
13	11		X
14	9,4		X
15	14		X

Tabla 2. Tubos utilizados para el aislamiento de ADN fetal. *En la paciente número 8, se aisló el ADN fetal del tubo BCT y tubo con EDTA, obteniendo en ambos casos una fracción de ADN fetal inferior a la requerida para la prueba NIPT.

Relación de IMC y fracción fetal de ADN

Para evaluar la relación entre IMC y la fracción fetal obtenida, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman, la cuál arrojó un valor p 0,54, lo que indica que no

existe una asociación estadísticamente significativa de correlación entre el IMC y la fracción fetal de ADN obtenida (Tabla 5).

Tabla 5. Relación IMC y Fracción fetal ADN

	IMC	Fracción de ADN fetal promedio
Normal	60%	12,45
Sobrepeso	33,33%	13,45
Obesidad	6,6%	7

Tamización estándar

Según la edad gestacional de la paciente, se realizó tamización del primer trimestre con edad materna, hallazgos ecográficos y medición de BhCG y PAPP, este cálculo fue realizado en la página web Fetal Medicine Foundation(60) y para la tamización del segundo trimestre se realizó medición de Estriol, BhCG y alfafetoproteína. Para este análisis se empleó el software lifecycle de Perkin Elmer.

Todas las pacientes incluidas en el estudio tenían alto riesgo de aneuploidías fetales por hallazgos ecográficos, es decir, todas requerían pruebas invasivas confirmatorias. Sin embargo, se realizó la tamización propuesta por organizaciones internacionales para evaluar el rendimiento de la tamización estándar contra las pruebas NIPT.

De la tamización estándar realizada en el primer trimestre, el 87,5% (7/8 casos) de las gestaciones fueron clasificadas como alto riesgo y al realizar las pruebas NIPT, el 25% (2/7 casos) fueron clasificadas como de alto riesgo. Al realizar las pruebas confirmatorias, la prueba NIPT detectó correctamente las dos gestaciones con alto riesgo de aneuploidías fetales (trisomía 21 y Monosomía del X).

En la tamización del segundo trimestre, el 33,3% (2/6 casos) de las gestaciones fueron clasificadas como alto riesgo, el 16% (1/6 casos) como riesgo intermedio y el 50% (3/6 casos) como bajo riesgo. Al realizar las pruebas NIPT, todas estas pacientes fueron clasificadas como bajo riesgo, estos hallazgos fueron concordantes con la citogenética en todos los fetos. Sin embargo, en la tamización estándar de la paciente número 14 no fue posible realizar el cálculo de riesgo del segundo trimestre por estar fuera del rango, ya que el software analiza los datos

hasta la semana 20 y según los cálculos realizados por el sistema, la paciente se encontraba en la semana 21 de gestación, a pesar que en las guías, recomiendan ésta tamización hasta la semana 22 de gestación(18).

Al evaluar la correlación entre las pruebas de tamización estándar y las pruebas NIPT en el primer trimestre se obtuvo una baja correlación con índices Kappa de 0,091. En el segundo trimestre no se pudo calcular por falta de los datos de la paciente número 14.

Tabla 6. Riesgo de aneuploidías fetales según tamización sérica y NIPT

Paciente	Tamización sérica		NIPT
1	Primer trimestre	Alto riesgo	Alto riesgo
2	Primer trimestre	Alto riesgo	Bajo riesgo
3	Primer trimestre	Alto riesgo	Bajo riesgo
4	Primer trimestre	Bajo riesgo	Bajo riesgo
5	Primer trimestre	Alto riesgo	Alto riesgo
6	Primer trimestre	Alto riesgo	Bajo riesgo
7	Segundo trimestre	Alto riesgo	Bajo riesgo
8	Segundo trimestre	Bajo riesgo	Fallida
9	Primer trimestre	Alto riesgo	Bajo riesgo
10	Primer trimestre	Alto riesgo	Bajo riesgo
11	Segundo trimestre	Bajo riesgo	Bajo riesgo
12	Segundo trimestre	Riesgo intermedio	Bajo riesgo
13	Segundo trimestre	Alto riesgo	Bajo riesgo
14	Segundo trimestre	ND	Bajo riesgo
15	Segundo trimestre	Bajo riesgo	Bajo riesgo

*ND: no determinado, no fue posible realizar el cálculo de riesgo del segundo trimestre por estar fuera del rango, ya que el software analiza los datos hasta la semana 20 y según los cálculos realizados por el sistema, la paciente se encontraba en la semana 21 de gestación.

Seguimiento postnatal

Para el seguimiento de los casos, 53.3% (8/15 casos) de las gestaciones fueron intervenidos (IVE) por decisión de las parejas con base en los hallazgos ecográficos y citogenéticos. En los 7 casos restantes (46.7%), se llevó a cabo seguimiento postnatal. Los hijos de las pacientes 2, 3 y 4 no presentaron ninguna anomalía al nacimiento y hasta el momento tienen adecuado neurodesarrollo. El hijo de la paciente 6 fue un bebé pretérmino de 35 semanas debido a infección urinaria en la madre, actualmente está en seguimiento por plan canguro, con adecuado

neurodesarrollo para la edad y sin anomalías físicas. La hija de la paciente 8, no presenta anomalías físicas ni retraso en el neurodesarrollo, sin embargo, esta en estudio por ectopia gástrica. Las pacientes 11 y 13 continúan en seguimiento por medicina materno fetal y hasta el momento no han tenido nuevas alteraciones ecográficas, estos dos últimos casos tienen resultado de citogenética diploide.

Discusión

Durante la gestación, las madres experimentan altos grados de estrés y ansiedad asociados al riesgo de eventos adversos como muerte o anomalías fetales; esto es una de las razones por las que se emplean programas de tamización para detectar tempranamente estas alteraciones. Actualmente, la tamización se realiza en función de la edad materna, hallazgos ecográficos y pruebas séricas; y según los resultados, se clasifica el riesgo de presentar alteraciones cromosómicas. Sí la paciente es clasificada como de alto riesgo, será candidata a la realización de pruebas invasivas confirmatorias. En los últimos años se vienen utilizando las pruebas prenatales no invasivas (NIPT) como pruebas de tamización para aneuploidías fetales(61). El rendimiento de éstas es muy alto y mejor que los enfoques de detección prenatal estándar, lo cual ha reducido la realización de pruebas invasivas(25).

Guy y cols encontraron en un estudio realizado en 69749 pacientes que la sensibilidad de la NIPT para la detección de las principales aneuploidías fue de 97,9% con una especificidad de 99,9% y un VPP global de 87,2%. El VPP para trisomía 21, 18 y 13 fue de 98.1%, 88.2%, y 59.3% respectivamente y para aneuploidías en los cromosomas sexuales y microdeleciones fue de 69% y 75%(62).

Gil MM y cols en el 2017 realizaron un metanálisis encontrando que para la trisomía 21 la tasa de detección fue de 99,7% (95% IC 99,1-99,9%) con una tasa de falsos positivos de 0,04% (95% CI, 0.02-0.07%); para la trisomía 18 la tasa de detección fue 97.9% (95% CI, 94.9-99.1%) y falsos positivos de 0.04% (95% CI, 0.03-0.07%); para la trisomía 13 la detección fue del 99.0% (95% CI, 65.8-100%) con 0,04% de falsos positivos (95% CI, 0.02-0.07%) y para la monosomía del X, la detección fue del 95.8% (95% CI, 70.3-99.5%) con 0.14% de falsos positivos (95% CI, 0.05-0.38%) (57).

En nuestro estudio piloto, el cual representa el primer estudio de correlación de pruebas NIPT y citogenética confirmatoria realizado completamente en el país, incluyó 15 pacientes clasificadas como alto riesgo para aneuploidías fetales. Tres de las gestaciones tenían alguna aneuploidía detectada por cariotipo (trisomía 21,

trisomía 18 y monosomía X). Los resultados obtenidos con la prueba NIPT en estas pacientes, detectó la trisomía 21 y la monosomía del X. Sin embargo, en la paciente número 14, se obtuvo un resultado discordante entre la prueba NIPT y el resultado citogenético para la trisomía 18, en donde el resultado de la prueba NIPT arrojó un resultado no informativo (ver imagen 14) y como se puede observar en la gráfica del resultado, la señal para cromosoma 18 se encuentra en el límite superior sin pasar el umbral de anormalidad. Por esta razón, el algoritmo bioinformático no detectó esta aneuploidía, arrojando un resultado como no informativo para trisomía 18.

Al calcular el rendimiento de la prueba NIPT, se encontró que ésta prueba tuvo una sensibilidad del 66% para detección de aneuploidía comunes, con una especificidad del 100%; el VPP fue del 100% y VPN del 91%. Al evaluar el rendimiento de la NIPT según cada aneuploidía, se encontró que para la trisomía 21 y la monosomía del X, la sensibilidad y especificidad fue de 100%. Sin embargo, para la detección de la trisomía 18, la prueba NIPT falló en detectar la alteración en la única muestra que tenía tanto hallazgos ecográficos como citogenéticos para dicha trisomía universal. Por consiguiente, los valores de sensibilidad y VPP no se pudieron determinar. Para la detección del sexo fetal, la prueba NIPT tuvo una sensibilidad y especificidad del 100%, con VPP y VPN del 100%, este hallazgo fue estadísticamente significativo con un $p < 0,0003$.

En cuanto a la correlación entre la NIPT y el cariotipo se encontró una concordancia de 0,75 en el índice Kappa, lo cuál indica una buena correlación, con un valor $p < 0,033$. Al realizar la correlación según cada trisomía detectada, se obtuvo una correlación de 1 para la trisomía 21 y monosomía X, es decir, excelente, pero no se pudo calcular para trisomía 18 por la discordancia entre ambas pruebas. Respecto al rendimiento diagnóstico de la NIPT global fue de 0,66, es decir, regular; debido a la falta de detección de la trisomía 18 mencionada previamente. Estos datos deben ser evaluados con cautela debido a la limitación del tamaño de la muestra.

En general, el rendimiento de detección de las pruebas NIPT van a depender de varios factores. Gil MM (57) y cols encontraron tres razones para tener un bajo rendimiento de detección de éstas pruebas: 1. Problemas con la recolección y transporte de la muestra como volumen de la muestra inadecuado, hemólisis o errores en la identificación. 2. Fracción fetal baja, generalmente inferior a 4%. 3. Fallas en el procesamiento de la muestra durante la extracción, amplificación o secuenciación del ADN (57). La principal razón para un resultado fallido es la obtención de baja fracción fetal lo cuál puede ser explicado por obesidad en la madre y tamaño placentario. En las trisomías 18 y 13, la fracción fetal es menor, pero no para la trisomía 21, por lo cual se puede considerar que hay mayor riesgo para prueba fallida en las trisomías 18 y 13(45).

Ante estos casos de NIPT fallida por baja fracción de ADN fetal, se recomienda que se tome una nueva muestra y con esto se aumentará la fracción fetal por el aumento en la edad gestacional(63). Se sabe que entre la semana 10 y 21 de gestación aumenta en 0,1% por semana y luego de la semana 21, el porcentaje de ADN fetal aumenta 1% por semana(64). Sin embargo, este procedimiento retrasaría la detección de aneuploidías fetales y por ende poder definir si es necesario la realización de pruebas adicionales. Esto explica porqué se debe realizar una estimación del riesgo personalizada según la edad gestacional y las indicaciones clínicas de la NIPT(63). En nuestro protocolo de trabajo, optamos por tomar muestra de sangre periférica materna tanto en tubos BCT como en tubos con EDTA. Para el caso de la paciente número 8, una vez se obtuvo el primer resultado fallido de la prueba NIPT (tubo BCT), se decidió secuenciar nuevamente la muestra aislando el ADN del tubo con EDTA, con igual resultado (baja concentración de fracción fetal). Se ha reportado que las NIPT pueden no arrojar resultado entre el 1 y 8 % de los casos(23). En otros estudios reportan tasas de no detección para trisomías en los autosomas del 5,9% y del 11,7% para aneuploidías en los cromosomas sexuales(57).

Adicionalmente, hay otros factores biológicos que pueden afectar la tasa de detección de las pruebas NIPT como son el origen del ADN fetal (citotrofoblasto) y el mosaicismo cromosómico (<30% no es detectado por NIPT), por lo cual nunca se podrá alcanzar una sensibilidad y especificidad del 100%(65). Van D y cols reportan que la probabilidad estimada de un falso negativo de NIPT varía entre 0,02 y 0,26%(65). En este estudio se encontró que la tasa de falsos negativos fue de 33,3%, sin embargo, estos datos deben tomarse con cautela por el tamaño de la muestra analizada. En el caso de la paciente número 14, el resultado de citogenética fue una trisomía 18 universal y su fracción de ADN fetal fue superior a 4% (9,4%), razón por la cual es importante que los resultados de las pruebas NIPT sean interpretados en conjunto con un médico genetista que tenga conocimiento acerca de las limitaciones biológicas de la prueba para así, brindar un mejor asesoramiento a la paciente con el resultado.

Otros de los factores que pueden influir en el porcentaje de fracción fetal de ADN es el peso materno(46), ya que es inversamente proporcional al peso de la madre por un efecto dilucional (64). En nuestro estudio se encontró que el 60% de las pacientes tenían un IMC normal, el 33,3% estaban en sobrepeso y el 6,6% en obesidad. El promedio de fracción fetal de ADN fue 12,45%. Al realizar el análisis estadístico se encontró un p 0,54, es decir, no se observó una asociación estadísticamente significativa entre el IMC y la fracción fetal de ADN. Nuestros

resultados no concuerdan con lo reportado en la literatura, pero esto puede estar relacionado al tamaño de la muestra analizada.

En cuanto a la recolección de la muestra, es importante tener en cuenta que se debe evitar tener un aumento del ADN materno, previniendo la degradación de células blancas maternas que contienen ADN, ya que esto disminuirá relativamente la fracción de ADN fetal. Estas muestras se pueden tomar en tubos EDTA o en tubos BCT, garantizando así concentraciones similares de fracción fetal de ADN utilizando ambos tubos. Al tomar la muestras en tubo EDTA, la separación del plasma debe realizarse en las primeras 6 horas; en cambio, la recolección de la muestra en los tubos BCT ofrece una mayor estabilidad del ADN materno hasta por 7 días, lo que da un mayor tiempo en el procesamiento de la muestra(66). En este estudio se emplearon ambos tubos para la recolección de la muestra. Posteriormente, se aisló el ADN fetal a partir de tubo con EDTA en 36% de las muestras y a partir de los tubos BCT en el 64%. La separación del plasma fue realizada en las primeras 6 horas después de recolectadas las muestras. Como se indicó previamente (Tabla 2), no se observó una diferencia estadísticamente significativa para la fracción fetal obtenida entre las muestras procesadas a partir de tubos BCT y las muestras procesadas a partir de tubos con EDTA (p 0,88, IC 95% -5,36-6,17). Sin embargo, se observó que el promedio de la fracción de ADN fetal fue menor en las muestras tomadas en tubos EDTA (promedio 8.02%) que aquellas tomadas con tubos BCT (promedio 13.9%), datos concordantes con lo reportado en la literatura.

Las NIPT además de detectar las principales aneuploidías, también pueden detectar pequeñas deleciones o duplicaciones. Estos trastornos genómicos están presentes en el 1,7% de los fetos estructuralmente normales y el método de detección es la realización de microarray, sin embargo se requiere de pruebas invasivas(42) las cuales tienen algún riesgo como aborto, muerte fetal, infecciones (67). Es por esto que las NIPT podrían llegar a hacer una prueba de tamización para estos trastornos. En nuestro estudio, la NIPT no logró detectar ninguna deleción o duplicación. Chen y cols realizaron un estudio en donde clasificaron las CNV detectadas por una prueba prenatal no invasiva en tres grupos: CNVs \leq 5 Mb (VPP 20,8%), CNVs 5–10 Mb (VPP 50%) y CNVs $>$ 10 Mb (VPP 27,27%). El VPP total fue de 28,99% (68). Por lo anterior, La NIPT sigue siendo una prueba de tamización para la detección de las principales aneuploidías y aún no está validada para la detección de deleciones y/o duplicaciones, por lo que faltan más estudios de validación clínica para la detección de estas otras alteraciones(67).

Respecto a las pruebas de tamización convencional de primer trimestre (edad materna, TN, PAPP A y hCG) tiene una tasa de detección de trisomía 21 del 82 al 87% con VPP 5% y con la tamización triple del segundo trimestre (hCG, AFP y

estriol) tiene una tasa de detección del 69% con VPP 5%(18, 26). Sin embargo, las pruebas NIPT continúan teniendo mejores tasas de detección como se mencionó anteriormente. En este estudio, todas las pacientes incluidas tenían alto riesgo de aneuploidías fetales por hallazgos ecográficos, es decir, todas requerían pruebas invasivas confirmatorias. Sin embargo, se realizó la tamización propuesta por organizaciones internacionales(18), para evaluar el rendimiento de la tamización estándar contra las pruebas NIPT. Se encontró que el 87,5% de las pacientes fueron clasificadas como alto riesgo con la tamización estándar del primer trimestre, mientras que con la prueba NIPT fueron el 25%. Al realizar las pruebas confirmatorias, la prueba NIPT detectó correctamente las dos gestaciones con alto riesgo de aneuploidías fetales (trisomía 21 y Monosomía del X). No obstante, en la tamización del segundo trimestre, la NIPT detectó correctamente todas las gestaciones con citogenética diploide, pero el resultado fue no informativo para la trisomía 18 y al no tener los datos de la tamización convencional de la paciente número 14 (trisomía 18) no se puede valorar la tasa de detección.

En un estudio en Cali, Colombia, Fandiño-Losada y cols encontraron que la ecografía era la principal herramienta para sospechar alteraciones cromosómicas y la principal indicación de pruebas invasivas(29). En nuestro estudio, todas las pacientes fueron clasificadas como de “alto riesgo” por los hallazgos en la ecografía, ninguna de las pacientes tenía previamente tamización con pruebas séricas. Estos hallazgos son debido a que en la norma técnica del ministerio de salud de Colombia la tamización para la detección de aneuploidías fetales se debe basar en la edad materna y en la medición de la translucencia nuchal(30).

En cuanto a los costos de las NIPT, un estudio realizado en Estados Unidos demostró que era pruebas costo-efectivas en comparación con los test de tamización de primer trimestre con pruebas séricas y ecografía, ya que permitían detectar 15% más de los casos con trisomías; reducen en un 88% el uso de procedimientos invasivos; disminuye en un 94% las pérdidas fetales de gestaciones no afectadas y el valor por test es de 453 dólares (69). En otro estudio realizado en Bélgica demostró que la prueba NIPT era un método de tamización eficiente y efectivo porque reducía en un 92,8% los procedimientos invasivos, aumenta la tasa de detección de trisomías comparando la tamización estándar en un 88% a 99% de detección. El costo por NIPT fue de 260 euros en comparación con el costo por trisomía diagnosticada de 3617 euros(70). En Colombia, los costos de tamización en el primer trimestre (pruebas séricas y ecografía), varían dependiendo de la institución que la realiza, estando entre 250.000 y un millón de pesos. Sin embargo, los costos de las pruebas NIPT son elevados en comparación con la tamización estándar, en parte porque todas estas pruebas son procesadas en el exterior. Este es el primer estudio de pruebas NIPT realizadas completamente en el país. Podrían

obtenerse precios competitivos, si el gobierno nacional eliminará los aranceles para los insumos de este tipo de pruebas (algunos del 5% y otros del 20%) con lo cual podría plantearse la sustitución del tamizaje bioquímico por tamización con pruebas NIPT.

Por último, los resultados obtenidos demuestran la necesidad de establecer equipos de trabajo multidisciplinarios cuando se utilizan las pruebas NIPT, integrando genetistas que permitan correlacionar los hallazgos de las pruebas no invasivas como invasivas, con los hallazgos obtenidos por ginecobstetricia. De la misma manera, los resultados obtenidos enfatizan el concepto que las pruebas NIPT deben utilizarse como pruebas de tamización, y que no deben utilizarse como pruebas diagnósticas, más aún, en embarazos de alto riesgo de aneuploidía, como fue el caso de la muestra analizada en el presente estudio.

Conclusiones

- Este es el primer estudio de comparación entre pruebas NIPT y pruebas confirmatorias realizado en pacientes de alto riesgo para aneuploidía en el país. Todos los estudios fueron realizados en la ciudad de Bogotá, D.C.
- La concordancia para trisomía 21, monosomía X y sexo fetal fue del 100%. La prueba NIPT falló en detectar un caso de trisomía 18 confirmado por citogenética. Sin embargo, se debe tener en cuenta las limitaciones del número bajo de casos en la muestra piloto evaluada para adelantar los estudios de concordancia.
- En el estudio se encontró que la NIPT tiene un buen rendimiento operativo global (0,75) para la detección de las aneuploidías encontradas en la muestra piloto analizada.
- Las pruebas NIPT pueden ser tomadas en tubos EDTA o BCT, sin interferir en el rendimiento de la prueba. Pero se deben acatar las indicaciones de procesamiento rápido. Se recomienda la toma en tubos BCT, si la muestra no podrá ser procesada en las primeras 6 horas de la toma.
- Las pruebas NIPT tienen mayor tasa de detección de aneuploidías fetales en comparación con las pruebas de tamización convencional del primer trimestre
- El resultado de las pruebas NIPT deben ser interpretadas en conjunto con un médico genetista, porque se debe tener claro los factores asociados a la detección de la prueba
- Las pruebas NIPT deben utilizarse como pruebas de tamización, y no como pruebas diagnósticas

Limitaciones

Se debe recalcar la dificultad para la consecución de pacientes de alto riesgo de aneuploidía para realizar este estudio a pesar de haber enviado cartas de invitación a más de 29 grupos y ginecobstetras de alto riesgo, sin que se tuviera respuesta positiva para participar en este estudio.

Recomendaciones

Se recomienda ampliar la muestra objeto de estudio para tener una mejor valoración de la correlación de detección de las pruebas NIPT con las pruebas confirmatorias.

Financiación

El presente estudio fue financiado en parte por la Universidad Nacional de Colombia, Proyecto Hermes # 47848 “Análisis de concordancia de pruebas no invasivas prenatales en sangre materna (NIPT) con pruebas invasivas para embarazos con alto riesgo de aneuploidías fetales en una muestra piloto” bajo la dirección del Dr. Juan J. Yunis y en parte por Servicios Médicos Yunis Turbay y Cia SAS Instituto de Genética.

Todos los estudios fueron realizados en Servicios Médicos Yunis Turbay y Cia SAS Instituto de Genética en Bogotá, D.C. Colombia, tanto para los estudios citogenéticos confirmatorios, como para las pruebas NIPT por Secuencia de Nueva Generación (NGS).

Anexo 1: NIPT disponibles comercialmente

Detección	Baby test Plus	NeoBona	NACE	Verifi Plus	Nifty	Panorama	MaterniT 21 Plus	Harmony
T21,18,13	X	X	X	X	X	X	X	X
Turner/ Klinefelter/ XXX/XY	X	X	X	X	X	X	X	X
Sexo fetal	X	X	X	X	X	X	X	X
Microdelección	22q11DiGeorge, 10p14 DiGeorge II, 1p36, Angelman/ Prader Willi (15q11.2), Cri du Chat 5p, Wolf Hirschhorn (4p16.3), 11q23 Jacobsen 16p11 deletion 8q24.1 Langer-Giedion 22q13.33 Phelan McDermid		DiGeorge, 1p36, Angelman, Prader Willi (15q11.2), Cri du Chat (5p), Wolf Hirschhorn (4p)	DiGeorge (22q11), 1p36, Angelman, Prader Willi, Cri du Chat (5p), Wolf Hirschhorn (4p)	DiGeorge, 1p36, Angelman, Prader Willi, Cri du Chat (5p),2q33.1, 16p12,11q23 (Jacobsen), VanderWoude (11q32.2)	Angelman, Prader Willi, Cri-du- Chat, 1p36	22q11, 5p, 1p36. 15q (Prader Willi; Angelman), 11q (Jacobsen), 4p (Wolf Hirschhorn), 8q (Langer- Giedion)	
Microduplicación	X							
Trisomía cromosomas específicos			9/16		9/16/22		16/22	
Trisomía todos los cromosomas	X	X						
Mosaicismo cromosómico	X							

Bibliografía

1. Botero FR, Araujo YA. Supervivencia durante el primer año de recién nacidos con defectos congénitos Survival during the first year of life of children with birth defects.
2. WHO. Birth defects. Report by the Secretariat. 1 April 2010.
3. Zarante I, Franco L, López C, Fernández N. Frecuencia de malformaciones congénitas: evaluación y pronóstico de 52.744 nacimientos en tres ciudades colombianas. *Biomédica*. 2010;30(1).
4. García MA, Imbachí L, Hurtado PM, Gracia G, Zarante I. Detección ecográfica de anomalías congénitas en 76.155 nacimientos en Bogotá y Cali, 2011-2012. *Biomédica*. 2014;34(3):379-86.
5. Shaffer BL, Norton ME. Cell-Free DNA Screening for Aneuploidy and Microdeletion Syndromes. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2018;45(1):13-26.
6. Norwitz ER, Levy B. Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Rev Obstet Gynecol*. 2013;6(2):48-62.
7. Kazemi M, Salehi M, Kheirollahi M. Down Syndrome: Current Status, Challenges and Future Perspectives. *Int J Mol Cell Med*. 2016;5(3):125-33.
8. Bianchi DW, Rava RP, Sehnert AJ. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med*. 2014;371(6):578.
9. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2015.
10. Nicolaidis KH, Falcón O. La ecografía de las 11-13+ 6 semanas. *Fetal Medicine Foundation*, Londres. 2004:17-9.
11. Audibert F, De Bie I, Johnson JA, Okun N, Wilson RD, Armour C, et al. No. 348-Joint SOGC-CCMG Guideline: Update on Prenatal Screening for Fetal Aneuploidy, Fetal Anomalies, and Adverse Pregnancy Outcomes. *J Obstet Gynaecol Can*. 2017;39(9):805-17.

12. Chai H, DiAdamo A, Grommisch B, Boyle J, Amato K, Wang D, et al. Integrated FISH, Karyotyping and aCGH Analyses for Effective Prenatal Diagnosis of Common Aneuploidies and Other Cytogenomic Abnormalities. *Med Sci (Basel)*. 2019;7(2).
13. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977;37(3):646-50.
14. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350(9076):485-7.
15. de Alba MR, Bustamante-Aragonés A, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Díaz-Recasens J, Plaza-Arranz J, et al. Diagnóstico prenatal no invasivo: presente y futuro de mano de las nuevas tecnologías. 2012;23(2):67-75.
16. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, et al. Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *Int J Womens Health*. 2015;7:113-26.
17. Costa J-M, Letourneau A, Favre R, Bidat L, Belaisch-Allart J, Jouannic J-M, et al. Cell-free fetal DNA versus maternal serum screening for trisomy 21 in pregnant women with and without assisted reproduction technology: a prospective interventional study. *Genetics in Medicine*. 2018.
18. Committee on Practice Bulletins—Obstetrics CmoG, and the Society for Maternal-Fetal Medicine. Practice Bulletin No. 163: Screening for Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2016;127(5):e123-37.
19. Cunningham F, Leveno K, Bloom S, Spong CY, Dashe J. Williams obstetrics, 24e: Mcgraw-hill; 2014.
20. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, Greenlees R, Haeusler M, Nelen V, et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(5):521-6.
21. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn*. 2011;31(1):7-15.
22. Borrell A BV, Bennassar M. Guía de práctica clínica: Diagnóstico prenatal de los defectos congénitos. Cribado de anomalías cromosómicas. *Diagnóstico Prenatal*. 2013;24(2):57-72.
23. Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2015;126(3):e31-7.
24. Gagnon A, Wilson RD, COMMITTEE SOOAGOCG. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. *J Obstet Gynaecol Can*. 2008;30(10):918-32.
25. Skrzypek H, Hui L. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy and single gene disorders. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;42:26-38.

26. Carlson LM, Vora NL. Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2017;44(2):245-56.
27. Park SY, Jang IA, Lee MA, Kim YJ, Chun SH, Park MH. Screening for chromosomal abnormalities using combined test in the first trimester of pregnancy. *Obstet Gynecol Sci.* 2016;59(5):357-66.
28. Perea Cuesta R, Rodríguez Merchán DM. Texto guía en ecografía obstétrica, para el desarrollo de programas de educación médica continuada en ultrasonido obstétrico de la Unidad de Medicina Maternofetal del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Nacional: Universidad Nacional de Colombia.
29. Fandiño-Losada A, Lucumí-Villegas B, Ramírez-Cheyne J, Isaza-de, Lourido C, Saldarriaga C. Valor predictivo positivo del diagnóstico prenatal invasivo para alteraciones cromosómicas *Rev. Fac. Med.* 2018
30. Colciencias MdSyPnS-. Guía de Práctica Clínica para la prevención, detección temprana y tratamiento del embarazo, parto o puerperio. 2013.
31. Gynaecologists RCoOa. Amniocentesis and chorionic villus sampling: RCOG; 2010.
32. Alfirevic Z, Navaratnam K, Mujezinovic F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;9:CD003252.
33. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2007;110(3):687-94.
34. Ghi T, Sotiriadis A, Calda P, Da Silva Costa F, Raine-Fenning N, Alfirevic Z, et al. ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis. 2016;48(2):256-68.
35. García-Posada R, Borobio V, Bennasar M, Illa M, Mula R, Serés A, et al. Biopsia corial transcervical: guía práctica. *Diagnóstico Prenatal.* 2012;23(1):2-10.
36. Aypar U, Thorland EC, Hoppman N. Prenatal diagnosis of chromosome abnormalities: past, present, and future. *Clin Chem.* 2013;59(10):1432-4.
37. Faas BH, Cirigliano V, Bui TH. Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2011;16(2):81-7.
38. Fauzdar A, Chowdhry M, Makroo RN, Mishra M, Srivastava P, Tyagi R, et al. Rapid-prenatal diagnosis through fluorescence in situ hybridization for preventing aneuploidy related birth defects. *Indian J Hum Genet.* 2013;19(1):32-42.
39. Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, Lese CM, Rita D, Wyandt H, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn.* 2001;21(4):293-301.
40. Dey M, Sharma S, Aggarwal S. Prenatal screening methods for aneuploidies. *N Am J Med Sci.* 2013;5(3):182-90.

41. Medicine CoGatSfM-F. Committee Opinion No.682: Microarrays and Next-Generation Sequencing Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic Tools in Obstetrics and Gynecology. *Obstet Gynecol.* 2016;128(6):e262-e8.
42. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2175-84.
43. Brady PD, Delle Chiaie B, Christenhusz G, Dierickx K, Van Den Bogaert K, Menten B, et al. A prospective study of the clinical utility of prenatal chromosomal microarray analysis in fetuses with ultrasound abnormalities and an exploration of a framework for reporting unclassified variants and risk factors. *Genet Med.* 2014;16(6):469-76.
44. Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, Togneri FS, James N, Maher EJ, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(6):610-20.
45. Revello R, Sarno L, Ispas A, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;47(6):698-704.
46. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(1):26-32.
47. Bianchi DW, Parsa S, Bhatt S, Halks-Miller M, Kurtzman K, Sehnert AJ, et al. Fetal sex chromosome testing by maternal plasma DNA sequencing: clinical laboratory experience and biology. *Obstet Gynecol.* 2015;125(2):375-82.
48. Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbebiyi A, Uthman OA, Madan J, et al. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2016;6(1):e010002.
49. Langlois S, Brock JA, COMMITTEE G. Current status in non-invasive prenatal detection of Down syndrome, trisomy 18, and trisomy 13 using cell-free DNA in maternal plasma. *J Obstet Gynaecol Can.* 2013;35(2):177-81.
50. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016;18(10):1056-65.
51. Devers PL, Cronister A, Ormond KE, Facio F, Brasington CK, Flodman P. Noninvasive prenatal testing/noninvasive prenatal diagnosis: the position of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2013;22(3):291-5.
52. Wou K, Levy B, Wapner RJ. Chromosomal Microarrays for the Prenatal Detection of Microdeletions and Microduplications. *Clin Lab Med.* 2016;36(2):261-76.

53. Suela J, López-Expósito I, Querejeta ME, Martorell R, Cuatrecasas E, Armengol L, et al. Recommendations for the use of microarrays in prenatal diagnosis. *Med Clin (Barc)*. 2017;148(7):328.e1-.e8.
54. Petersen AK, Cheung SW, Smith JL, Bi W, Ward PA, Peacock S, et al. Positive predictive value estimates for cell-free noninvasive prenatal screening from data of a large referral genetic diagnostic laboratory. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;217(6):691.e1-.e6.
55. Beulen L, Faas BH, Feenstra I, van Vugt JM, Bekker MN. Clinical utility of non-invasive prenatal testing in pregnancies with ultrasound anomalies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2017;49(6):721-8.
56. Nicolaides KH, Syngelaki A, Poon LC, Gil MM, Wright D. First-trimester contingent screening for trisomies 21, 18 and 13 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35(3):185-92.
57. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;50(3):302-14.
58. Haymon L, Simi E, Moyer K, Aufox S, Ouyang DW. Clinical implementation of noninvasive prenatal testing among maternal fetal medicine specialists. *Prenat Diagn*. 2014;34(5):416-23.
59. Programa para análisis epidemiológico de datos. Versión 4.2, julio 2016. Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España; Organización Panamericana de la salud (OPS-OMS); Universidad CES, Colombia.
60. Foundation FM. <https://fetalmedicine.org/research/assess/trisomies> 2020 [
61. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207(5):374.e1-6.
62. Guy C, Haji-Sheikhi F, Rowland CM, Anderson B, Owen R, Lacbawan FL, et al. Prenatal cell-free DNA screening for fetal aneuploidy in pregnant women at average or high risk: Results from a large US clinical laboratory. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(3):e545.
63. Luo Y, Hu H, Zhang R, Pan Y, Ma Y, Long Y, et al. [Factors affecting the failure of non-invasive prenatal testing and the feasibility analysis of retesting]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2020;37(6):603-8.
64. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2013;33(7):662-6.
65. Van Opstal D, Srebniak MI, Polak J, de Vries F, Govaerts LC, Joosten M, et al. False Negative NIPT Results: Risk Figures for Chromosomes 13, 18 and 21 Based on Chorionic Villi Results in 5967 Cases and Literature Review. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146794.

66. Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, Mueller R, DeSantis G, van den Boom D, et al. Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem*. 2013;46(12):1099-104.
67. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther*. 2010;27(1):1-7.
68. Chen Y, Yu Q, Mao X, Lei W, He M, Lu W. Noninvasive prenatal testing for chromosome aneuploidies and subchromosomal microdeletions/microduplications in a cohort of 42,910 single pregnancies with different clinical features. *Hum Genomics*. 2019;13(1):60.
69. Fairbrother G, Burigo J, Sharon T, Song K. Prenatal screening for fetal aneuploidies with cell-free DNA in the general pregnancy population: a cost-effectiveness analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016;29(7):1160-4.
70. Kostenko E, Chantraine F, Vandeweyer K, Schmid M, Lefevre A, Hertz D, et al. Clinical and Economic Impact of Adopting Noninvasive Prenatal Testing as a Primary Screening Method for Fetal Aneuploidies in the General Pregnancy Population. *Fetal Diagn Ther*. 2019;45(6):413-23.