

CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente
Facultad de Medicina, Universidad de Chile



Seminario N°11

Diagnóstico prenatal no invasivo

Dra. Beatriz Guendelman, Dr. Daniel
Martin, Dra. Daniela Cisternas Dr. Juan
Guillermo Rodriguez
Septiembre 2020



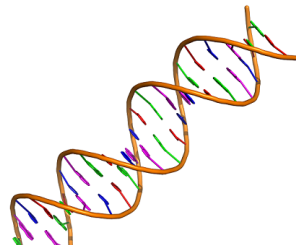
Definición

Procedimientos de diagnóstico fetal que no involucran instrumentos que rompen la piel o penetran físicamente en el cuerpo

Origen ccfDNA



- Detección de células nucleadas fetales en sangre materna:
 - A las 12 sem hay 1 célula fetal c/10.000-1.000.000 células maternas : +- 10 cél en 20 cc sangre materna
 - Inviabile por falta de técnica separación celular
- Elementos celulares del trofoblasto fetal desde el canal endocervical:
 - Marcada variación en la proporción de células fetales encontradas en el canal endocervical, entre un 4 y 80%
 - Operador dependiente
- El análisis de material genético del feto presente en el plasma materno (cffDNA)



- Tanto materno como unidad feto-placentaria
 - Fetal: apoptosis células placentarias
 - Materno: células hematopoyéticas
- Clearance:
 - Vida media 1 hora
 - Eliminación total 2 días desde el parto



DNA circulante

- Muy fragmentado, probablemente fragmentos mas largos derivan de la madre
- Fracción fetal:
 - Corresponde al 3-13% del DNA materno libre total después de las 10 semanas
 - Detectable en sangre materna desde 5ta semana y casi siempre a las 9 semanas
 - Aumenta
 - Entre 10-20 semanas: 0,1% x cada semana
 - 20 sem a término: 1% cada semana
 - Mientras mas alta la fracción, mayor detección aneuploidía, mientras mas baja puede resultar:
 - Sin resultado
 - Falso negativo

Métodos para la amplificación del DNA



- PCR:
 - Técnica de biología molecular usada para la síntesis in vitro de secuencias específicas de ADN
- FISH:
 - Técnica de citogenética molecular para detectar la localización de secuencias de ADN conocidas en determinados cromosomas
- Inmunoprecipitación de ADN metilado:
 - Permite distinguir los alelos fetales de los maternos identificando ADN materno metilado(silenciado) pero desmetilado(activo) en feto
- Espectrometría de masas
 - Técnica analítica basada en la posibilidad de separar especies moleculares según su masa

Posibles fuentes de error

- Edad gestacional temprana
 - Medir al menos desde 10 sem
 - 11-13% del total DNA libre en circulación materna
- Cariotipo fetal:
 - Fracción fetal promedio entre las 10 y 20 semanas es menor en trisomías: trisomía 18: 9% v/s 11-13% en feto euploide
 - Fracción fetal promedio en T21 13-15%
 - Turner y T13 menor fracción fetal
 - Triploides con fracción fetal extremadamente bajas: <4%

Posibles fuentes de error

- Muestra subóptima:
 - Evitar degradación de muestra por GB.
 - Recolectar muestra en tapa violeta y centrifugación en <6h, almacenar a -80 °C
 - Cantidad necesaria
- Obesidad:
 - Relación inversa entre peso y ADN libre fetal
 - Mayor dilución en plasma, menor cantidad de DNA materno, inflamación y muerte celular
 - Hasta un 10% con fracción fetal bajo (3,5%) en mujeres >110 kg, disminución desde 80 kg
- Otros factores:
 - Puede alterarse por: Uso HBPM >20 semanas, FIV, gemelar, mosaicismo placentario, cancer materno

Limitantes

-Concentración células libre de DNA son relativamente bajas

-Costo

- Falsos positivos:

- Contaminación
- Gemelo evanescente
- Mosaicismo confinado a placenta

- Falsos negativos:

- Mosaicismo
- Varantes genéticas

SCREENING

- cffDNA es la prueba mas sensible para T21,18 y 13
- Tasa de detección mas bajas en aneuploidías de cromosomas sexuales, más falsos positivos que autosómicas

ANEUPLOIDÍA	TASA DE DETECCIÓN	FALSOS POSITIVOS
T21	99.5	0.05%
T18	97.7	0.04%
T13	96.1	0.06%
XO	90.3	0.23%
47,XXX; 47,XXY; 47,XYY	93	0.14%

SCREENING

			Age 25 years	Age 40 years
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	PPV (%)
Trisomy 21	99.3	99.8	33	87
Trisomy 18	97.4	99.8	13	68
Trisomy 13	91.6	99.9	9	57
Sex chromosome aneuploidy	91.0	99.6	-- [†]	--

Abbreviation: PPV, positive predictive value.

- Trisomy 21 – DR 99.5 percent, FPR 0.05 percent
- Trisomy 18 – DR 97.7 percent, FPR 0.04 percent
- Trisomy 13 – DR 96.1 percent, FPR 0.06 percent



Table 3. The Effect of Maternal Age on the Positive Predictive Value of Cell-Free DNA Screening for Trisomy 21, 18, and 13 at 10 Weeks Gestation*

	Maternal Age	Age Related Risk [†]	Positive Predictive Value [‡]
Trisomy 21	20	1:804 or 12 per 10,000	38–80%
	35	1:187 or 53 per 10,000	73–95%
	40	1:51 or 196 per 10,000	91–99%
Trisomy 18	20	1:1,993 or 5 per 10,000	11–41%
	35	1:465 or 22 per 10,000	34–75%
	40	1:126 or 79 per 10,000	66–92%
Trisomy 13	20	1:6,347 or 1.6 per 10,000	5–13%
	35	1:1,481 or 7 per 10,000	17–40%
	40	1:401 or 24 per 10,000	43–71%

*Sensitivity and specificity approximately 99%

[†]Age related risk of aneuploidy per 10,000 pregnancies at 10 weeks gestation based on maternal age at term

[‡]Percent varies by laboratory

Aspectos prácticos



- En población general:
 - Menor VPN por menor prevalencia aneuploidía, mas falsos positivos
- Limitación en resultado de gemelos: único resultado, no se recomienda screening
- Si se detecta anomalía ecográfica se debe ofrecer prueba diagnóstica, igualmente en caso de cffDNA alterado
- Puede ser útil en quienes el screening habitual se presenta alterado y quieren evitar una prueba diagnóstica

Aplicación clínica



Screening primario:

- Variabilidad en grupo según edad
 - T21 VPP a 21 años 48% v/s a 40 años 93%
- Screening de aneuploidias cromosomas sexuales son controversiales ya que tienen menos anomalías severas
- Sin protocolo de seguimiento en caso de positividad en grupo de bajo riesgo

Aplicación clínica



- Screening secundario:
 - A quienes con screening habitual se determinan de alto riesgo
- Recomendación ACOG 2012:
 1. Edad materna mayor a 35 años
 2. Riesgo aumentado de aneuploidía por ultrasonido
 3. Embarazo previo con trisomía
 4. Test de screening positivo o traslocación parental balanceada que signifique un riesgo aumentado de trisomía fetal.
- Utilizar la alta tasa de detección con baja falsos positivos para disminuir el número de procedimientos invasivos en grupo de alto riesgo (40-76%)
- Considerar costo

Modelos de detección

- Contingente:

- Grupo alto riesgo(3-5%)
>1:100 o 1:150: ofrecer cffDNA
- Grupo riesgo intermedio(10-15%)
1:151 a 1:1000: asesorar y ofrecer cffDNA .Pocos falsos positivos que den prueba invasiva innecesaria.
- Resultado positivo: estudio invasivo

- Reflexivo

- Mismos niveles de riesgo
- Grupo riesgo intermedio: se toma muestra al mismo momento, que se analiza a posterior si paciente desea
- Disminuye costos, aumenta levemente la detección

Predicción Fenotipo Rh fetal



Table 1| Prediction of fetal RhD status by fetal RHD genotyping of cell-free DNA in maternal plasma compared with results of cord blood typing of RhD

	Gestational age in completed weeks*					Total samples
	<11	11-13	14-17	18-23	>24	
Correct RhD negative	337	341	225	321	696	1920
Correct RhD positive	400	535	272	492	864	2563
False RhD negative	16	1	1	1	0	19
False RhD positive	1	4	1	5	7	18
Inconclusive confirmed RhD negative	19	13	10	19	24	85
Inconclusive confirmed RhD positive	92	62	33	50	71	308
Total	865	956	542	888	1662	4913
Sensitivity RhD positive (95% CI)†	96.85 (94.95 to 98.05)	99.83 (99.06 to 99.97)	99.67 (98.17 to 99.94)	99.82 (9.96 to 99.97)	100.00 (99.59 to 100.00)	99.34 (98.98 to 99.58)
Specificity RhD positive (95% CI)†	94.40 (91.51 to 96.34)	95.25 (92.53 to 97.01)	95.34 (91.85 to 97.38)	93.04 (89.86 to 95.28)	95.74 (94.01 to 96.98)	94.91 (93.86 to 95.78)

*Gestational ages shown are in completed postmenstrual weeks (for example, 11 weeks=11 weeks 0 days to 11 weeks + 6 days).

†Assuming all inconclusive results are treated as RhD positive.

Predicción sexo fetal



- Secuencia específica cromosoma Y → SRY ó DYS14
- Evalúa: Presencia/Ausencia
- Desde 7^a semana
- 10^o semana → Sensibilidad cercana a 100%
- Indicaciones:
 - Riesgo de anomalías ligadas al cromosoma X
 - Historia familiar asociada a genitales ambiguos
 - Hallazgos US con discrepancia entre sexo genético y apariencia de genitales externos a US

Enfermedades monogenéticas



- Herencia Dominante
 - Padre portador herencia dominante:
 - Búsqueda del alelo mutante paterno en sangre materna confirma o descarta afección
 - Ej: distrofia miotónica, enf. Huntington, acondroplasia
- Herencia Recesiva:
 - Mutación portada en ambos progenitores debe ser distinta para poder identificar origen
 - Ej: HSRC, B-talasemia, Fibrosis quística

First-Trimester Contingent Screening for Trisomies 21, 18 and 13 by Biomarkers and Maternal Blood Cell-Free DNA Testing

K.H. Nicolaides^{a,b} A. Syngelaki^a L.C. Poon^a M. Gil^a D. Wright^c

Resultados:	cffDNA	Cribado actual
Tasa detección T21	99%	98%
Tasa de detección T13 y 18	96%	96%
Procedimientos invasivos	1%	0.7%

- El cribado para aneuploidías de primer trimestre es bueno, pero puede ser mejorado si se agregan biomarcadores y el cfDNA.



The American College of
Obstetricians and Gynecologists
WOMEN'S HEALTH CARE PHYSICIANS



Society for
Maternal-Fetal
Medicine



CERPO

COMMITTEE OPINION

Number 640 • September 2015

(This Committee Opinion Replaces Committee Opinion Number 545)

Committee on Genetics Society for Maternal-Fetal Medicine

This document reflects emerging clinical and scientific advances as of the date issued and is subject to change. The information should not be construed as dictating an exclusive course of treatment or procedure to be followed.

Cell-free DNA Screening for Fetal Aneuploidy

- Debe ser discutido los beneficios, riesgos y alternativas con cada paciente
- Utilizado en aneuploidías mas comunes, análisis de cromosomas sexuales si se solciita
- No debe ser utilizada en embarazo múltiple
- Decisiones como término de embarazo no deben ser tomadas basados en resultados de ccfDNA

- En caso de detección de anomalía en ecografía se debe solicitar prueba diagnóstica por sobre cffDNA
- Pacientes con resultado negativo no significa que no tengan un embarazo sin afección
- No se debe solicitar pruebas de cffDNA de rutina para síndromes de microdelección



ACOG PRACTICE BULLETIN

Clinical Management Guidelines for Obstetrician–Gynecologists

NUMBER 226

(Replaces Practice Bulletin 163, May 2016, Reaffirmed 2018)

Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, Committee on Genetics, and Society for Maternal-Fetal Medicine. This Practice Bulletin was developed by the American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics and Committee on Genetics, and the Society for Maternal-Fetal Medicine in collaboration with Nancy C. Rose, MD, and Anjali J. Kaimal, MD, MAS, with the assistance of Lorraine Dugoff, MD, and Mary E. Norton, MD, on behalf of the Society for Maternal-Fetal Medicine.

Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities

Screening Approach	Approximate Gestational Age Range for Screening (Weeks)	Detection Rate (DR) for Trisomy 21 (%)	Screen Positive Rate* (%)	Advantages	Disadvantages	Method
Cell-free DNA [†]	9–10 to term	99	2–4% Includes inability to obtain results, which is associated with increased risk [†]	<ol style="list-style-type: none"> 1. Highest DR 2. Can be performed at any gestational age after 9–10 weeks 3. Lowest false-positive rate 	Results may reflect underlying maternal aneuploidy or maternal disease	Several molecular methods



- Otras detecciones:

- Trisomía 16, Trisomía 22,
- Pruebas de microdelección (deben ser confirmadas con prueba diagnóstica por alto falso positivos)

En Chile



Ariosa[®]
DIAGNOSTICS

Harmony[™]
PRENATAL TEST

illumina[®]

verifi[®]
prenatal test

natera[™]

panorama[™]
prenatal screen

Conclusiones



- Test screening, no diagnóstico
- No debe ser usado como screening en población general
- Un test positivo debe ser confirmado con test diagnóstico
- Costo alto para screening a nivel público

Bibliografía



- Prenatal screening for common aneuploidies using cell-free DNA, Up to Date, 2020
- Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities, ACOG, 2018
- Cell-free DNA Screening for Fetal Aneuploidy, ACOG, 2015
- Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects, 2013, Ultrasound Obstetric Gynecology
- First-Trimester Contingent Screening for Trisomies 21, 18 and 13 by Biomarkers and Maternal Blood Cell-Free DNA Testing, Fetal Diagnosis and therapy, 2013
- Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. BMJ, 2014