

CERPO

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

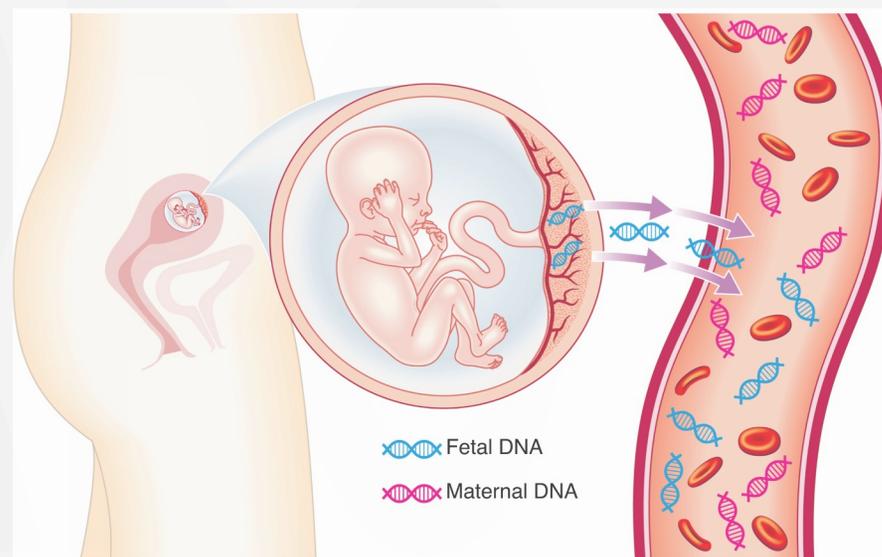


Cffdna. Técnica y aporte de su uso prenatal

Autora: Nicole Lama M.
Residente programa obstetricia y ginecología
Tutora: Dra. Catherine Díaz

Definición

- Test de screening prenatal no invasivo que evalúa DNA fetal en circulación materna
- Presencia de DNA fetal en circulación materna demostrado en 1997
- Comercializado desde el 2011



Y.M. Lo, N. Corbetta, P.F. Chamberlain, V. Rai, I.L. Sargent, C.W. Redman, *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350 (1997), pp. 485-487

CF-DNA



- Fragmentos de DNA < 200 pares de base
- Circulan libres en suero materno
- Es producido tanto por la madre como por la unidad feto placentaria
- Se elimina de la circulación materna poco después del parto (hasta 48 hrs)

CF-DNA



Fracción materna

- Refleja principalmente el sistema hematopoyético materno.
- Todos los órganos contribuyen al cf-DNA circulante, incluyendo tumores sólidos.

Fracción fetal

- Origen en el sincitiotrofoblasto.
- Menor proporción de los eritroblastos
- 10-20% del cf-DNA en plasma materno

Fracción fetal



- Es el porcentaje de todo el cf-DNA en sangre materna
 - Detectado en sangre materna desde las 5 semanas de gestación
 - Detectado en su mayoría a las 9 semanas
 - \uparrow 0.1% por semana desde la 10-20 semanas de gestación
 - \uparrow 1% por semana en >20 semanas



Fracción fetal

- Requerimiento $> 3,5-4\%$ para obtener un screening confiable
- Motivo \rightarrow A mayor fracción fetal habrá mayor sensibilidad (aún mayor si es población de alto riesgo)
 - Fracción fetal = $4\% \rightarrow$ Sensibilidad = $62,1\%$
 - Fracción fetal $> 9\% \rightarrow$ Sensibilidad = 100%
- Valores
 - Insuficiente $\rightarrow < 4\%$
 - Adecuada $\rightarrow 4-8\%$
 - Óptima $\rightarrow > 8\%$



Fracción fetal

- **Causas de una fracción fetal baja**
 - Edad gestacional temprana
 - Recolección muestra subóptima
 - Obesidad materna
 - Aneuploidías
- Menos comunes:
 - Uso materno de heparina de bajo peso molecular antes de las 20 semanas gestación
 - Concepción por fecundación in vitro
 - Embarazo gemelar

Fracción fetal baja



- **Edad gestacional temprana**
 - Más baja antes de las 10 semanas
 - Laboratorios exigen al menos 10 semanas de gestación
- **Recolección subóptima de la muestra**
 - Se requiere al menos 10 ml de muestra
 - Tubo con tapa morada (EDTA) y centrifugarse en máximo 6 hrs, plasma resultante se almacena a -80°C
 - Alternativa: tubo especial de cfDNA que estabiliza la muestra durante un máximo de 5 días a temperatura ambiente

Fracción fetal baja



- **Obesidad**
 - Disminuye a medida que aumenta el peso materno
 - Dilución de la fracción fetal por aumento del volumen de sangre materna
- **Aneuploidías**
 - Algunas aneuploidías están relacionadas con fracción fetal baja (trisomía 13 y 18).
 - Triploidías tienen fracciones fetales extremadamente bajas <4%
 - Trisomía 21 → mayor fracción fetal (13-15% vs 11-13% en fetos euploides)

Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 2013; 33:667.

Becking EC, Schuit E, van Baar de Knecht SME, et al. Association between low fetal fraction in cell-free DNA screening and fetal chromosomal aberrations: A systematic review and meta-analysis. *Prenat Diagn* 2023; 43:838.

Metodología



- Extracción de 10 ml de sangre materna
- Se asume que madre es euploide
- Métodos de secuenciación del genoma completo o dirigido a cromosomas de interés 21, 18, 13, X e Y.

Metodología



- **Secuenciación del genoma completo**
- **Metodologías dirigidas**
 - Microarray
 - Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)
 - Amplificación por círculo rodante (RCA)

Metodología



- **Secuenciación del genoma completo**
 - Método más común de screening de cf-DNA.
 - Secuenciación de todos los fragmentos de DNA libre (maternos y fetales)
 - Se identifica el origen de los fragmentos cromosómicos a través de alineamiento con la estructura del genoma
 - Esto luego se compara con el porcentaje esperado aportado por ese cromosoma en una paciente embarazada euploide que lleva un feto euploide

Metodología



- **Secuenciación del genoma completo**
 - Mujeres euploides no embarazadas, aproximadamente el 1,3% de los fragmentos de cfDNA se derivan del cromosoma 21.
 - En el embarazo permanece si el feto y la madre son euploides
 - Sin embargo, si el feto tiene tres copias del cromosoma 21, la proporción de fragmentos del cromosoma 21 será ligeramente superior al 1,3% esperado

Rendimiento



- **Aneuploidías**
 - Prueba de screening de mayor sensibilidad para trisomías 21, 18 y 13
 - Producen el 71% de las anomalías cromosómicas de detección prenatal
 - Sensibilidad → mayor S y E que screening sérico convencional, sin diferencias en las técnicas.



Rendimiento

- **Trisomía 21** → Sensibilidad = 99,5% + Falso (+) = 0,05%
- **Trisomía 18** → Sensibilidad = 97,7% + Falso (+) = 0,04%
- **Trisomía 13** → Sensibilidad = 96,1% + Falso (+) = 0,06%

Alteración	Screening	Población general		Población de alto riesgo	
		VPP	VPN	VPP	VPN
Trisomía 21	Combinado	5% (<u>1 : 20</u>)	99,8% (<u>600 : 1</u>)	15% (<u>1 : 6</u>)	> 99,9% (<u>2.200 : 1</u>)
Trisomía 21	<u>cfDNA</u>	85% (<u>6 : 1</u>)	> 99,9% (<u>20.000 : 1</u>)	95% (<u>21 : 1</u>)	> 99,9% (<u>> 30.000 : 1</u>)
Trisomía 18	<u>cfDNA</u>	69% (<u>2 : 1</u>)	> 99,9% (<u>12.000 : 1</u>)	89% (<u>8 : 1</u>)	> 99,9% (<u>> 30.000 : 1</u>)
Trisomía 13	<u>cfDNA</u>	33% (<u>1 : 2</u>)	> 99,9% (<u>20.000 : 1</u>)	68% (<u>2 : 1</u>)	> 99,9% (<u>> 30.000 : 1</u>)

(*) Población de alto riesgo: edad materna >35 años

Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert 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

Mackie FL, Hemming K, Allen S, et al. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. BJOG 2017

Iwarsson E, Jacobsson B, Dagerhamn J, et al. Analysis of cell-free fetal DNA in maternal blood for detection of trisomy 21, 18 and 13 in a general pregnant population and in a high risk population - a systematic review and meta-analysis. Acta Obstet Gynecol Scand 2017;

Falsos positivos



- **Mosaicismo placentario**
 - Principal fuente de DNA fetal es la placenta
 - Puede ser discordante con el tejido fetal
 - Prueba analíticamente correcta pero clínicamente incorrecta
 - 1-2% de los embarazos
 - Más frecuente en monosomía X y trisomía 13

Kalousek DK, Howard-Peebles PN, Olson SB, et al. Confirmation of CVS mosaicism in term placentae and high frequency of intrauterine growth retardation association with confined placental mosaicism. Prenat Diagn 1991; 11:743.

Falsos positivos



- **Gemelo fallecido**
 - Si feto fallecido presenta aneuploidía
 - La placenta continúa desprendiendo DNA fetal
 - Pérdida de 1er trimestre: DNA fetal detectado 8-13 semanas posterior
 - Pérdida de 2do trimestre: DNA fetal detectado hasta 16 semanas posterior

Falsos positivos



- **Mosaicismo materno**
 - Se asume que la madre tiene un cariotipo euploide
 - A medida que avanza la edad materna, un % pequeño de células pueden perder un cromosoma X llevando a un FP por aneuploidía de cromosoma X

Falsos positivos



- **Cáncer materno y miomas**
 - Las personas con una enfermedad maligna pueden liberar DNA tumoral libre de células a la circulación.
 - El cf-DNA fetal, materno y tumoral contribuyen al total de cfDNA

Falsos positivos



- Otros:
 - Madre trasplantada
 - Transfusión sanguínea
 - Aspectos técnicos de la muestra

Falsos negativos



- **Mosaicismo placentario**
 - Feto aneuploide-placenta euploide
 - Detecta células placentarias euploides
 - Resultado analíticamente correcto pero clínicamente incorrecto

Falsos negativos



- **Fracción fetal límite baja**
- **Variante en el número de copias**
 - Delección materna
- **Aspectos técnicos**

Screening



- 2 modelos utilizados
 1. Modelo reflexivo
 2. Modelo contingente

Sainz JA, Torres MR, Peral I, et al. Clinical and Economic Evaluation after Adopting Contingent Cell-Free DNA Screening for Fetal Trisomies in South Spain. *Fetal Diagn Ther* 2020; :1.

Modelo contingente

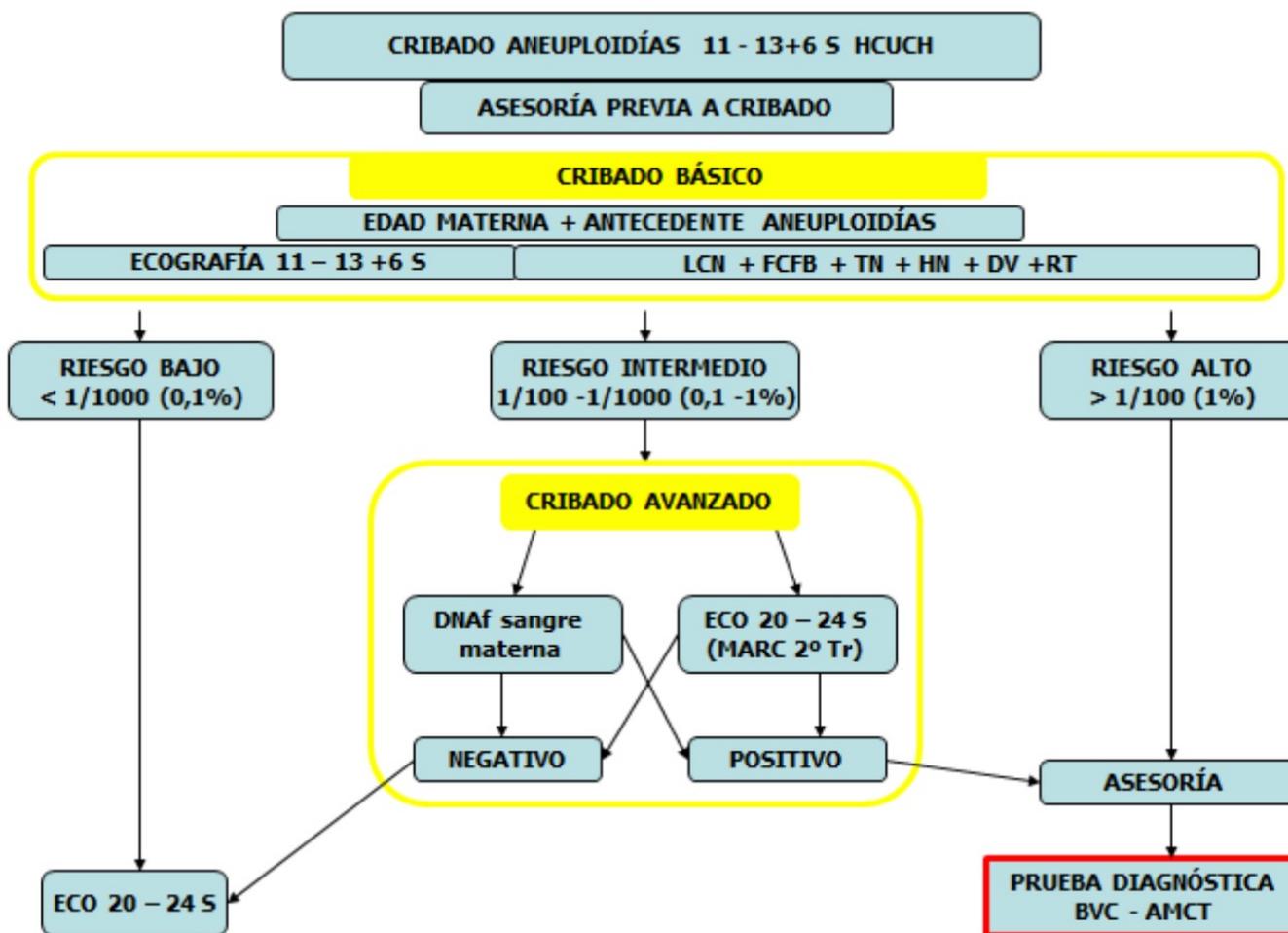


- Screening combinado (marcadores ecográficos + bioquímica)
 - Alto riesgo (>1:150) → test invasivo o cf-DNA
 - Bajo riesgo (<1:1000) → control rutinario
 - Riesgo intermedio (1:151 a 1:1000) → cf-DNA



Modelo reflexivo

- Toma de muestra de cf-DNA en primer trimestre a toda paciente embarazada
 - Alto riesgo → test invasivo o cf-DNA
 - Bajo riesgo → control rutinario
 - Riesgo intermedio → se analiza cf-DNA tomado en 1er trimestre
- Ventaja: ahorra tiempo y recursos
- Desventaja: costo elevado



Seguimiento post test



- Resultado positivo → debe ser confirmado con un procedimiento invasivo (amniocentesis/BVC)
- Resultado negativo → bajo riesgo de aneuploidía pero **no la descarta**, seguimiento rutinario
- Prueba fallida → repetir toma de muestra, procedimiento invasivo

Conclusión



- El screening de aneuploidías se puede realizar mediante el cf-DNA en sangre materna, el cual deriva de origen materno y placentario
- Alta tasa de detección de aneuploidías y baja tasa de falsos positivos.
- En gestaciones tempranas
- Resultados positivos deben ser confirmados con estudios invasivos
- Resultados negativos no descarta alteraciones en un 100%

CERPO

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



Cffdna. Técnica y aporte de su uso prenatal

Autora: Nicole Lama M.
Residente programa obstetricia y ginecología
Tutora: Dra. Catherine Díaz