

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación de un nuevo protocolo de diagnóstico genético en  
la atención prenatal de las gestantes en riesgo de  
cromosomopatías**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María Carmen Cotarelo Pérez**

**Directores**

**Miguel Ángel Herráiz Martínez**  
**Pluvio Jesús Coronado Martín**

**Madrid**

**© María Carmen Cotarelo Pérez, 2019**



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**TESIS DOCTORAL**

**EVALUACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO DE  
DIAGNÓSTICO GENÉTICO EN LA ATENCIÓN PRENATAL DE  
LAS GESTANTES EN RIESGO DE CROMOSOMOPATÍAS**

**María Carmen Cotarelo Pérez**

**DIRECTORES**

Prof. Dr. MIGUEL ÁNGEL HERRÁIZ MARTÍNEZ

Dr. PLUVIO JESÚS CORONADO MARTÍN

**MADRID, 2019**









UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. MARÍA CARMEN COTARELO PÉREZ,  
estudiante en el Programa de Doctorado Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas,  
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

EVALUACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO EN LA ATENCIÓN PRENATAL DE LAS GESTANTES EN RIESGO DE CROMOSOMOPATÍAS

y dirigida por: Prof. Dr. Miguel Ángel Herráiz Martínez  
Dr. Pluvio Jesús Coronado Martín

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 5 de junio de 2019

Fdo.: \_\_\_\_\_

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



EVALUACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO  
GENÉTICO EN LA ATENCIÓN PRENATAL DE LAS GESTANTES EN  
RIESGO DE CROMOSOMOPATÍAS

**María Carmen Cotarelo Pérez**



## AGRADECIMIENTOS

Estoy segura de que la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Lautre Ecenarro (Susi), mi maestra y amiga, se alegra enormemente de que al fin presente la tesis que ella tanto insistió en que hiciera. Más vale tarde que nunca. Me enseñó toda la citogenética y la práctica clínica, y confió en mí. He aprendido muchas cosas buenas de ella y con ella. Por ello, siempre le estaré agradecida.

Mi más profundo agradecimiento a mis amigas y compañeras de Genética por ayudarme a continuar hasta el final y siempre por mi bien. La tenacidad, generosidad, paciencia y confianza en mí de María Fenollar Cortés están en la esencia de este trabajo. Imposible sin su ánimo y su apoyo incondicional. Raluca Oancea Ionescu ha sido capaz de asumir, con una infinita capacidad de comprensión, todo mi cansancio y mi irritación. Imprescindible su apoyo, su ánimo y su trabajo extra este último año. La dulzura de Clara Herrero Forte, que ha estado pendiente cada día, ha sido reconfortante. También agradezco el trabajo de todo el equipo de la sección, junto al cariño que Amparo y Paco me transmiten siempre, la cordialidad de Paqui, la serenidad de Laura y el buen humor de Mamen en el café.

No hubiera podido realizar este trabajo sin la generosidad y colaboración de Lola Ortega de Heredia que hace 20 años puso a punto el cribado combinado, ni sin la colaboración y el apoyo de la Unidad de Ecografía Prenatal, especialmente de Eloy Asenjo de la Fuente y Patricia Soler Ruíz. Su amistad y profesionalidad facilitan el trabajo en equipo cada día.

Quiero agradecer al Departamento de Obstetricia y Ginecología, y en especial al Prof. Dr. Miguel Ángel Herráiz Martínez y al Dr. Pluvio Coronado Martín, haberme permitido realizar este trabajo con ellos, confiando en mí y brindándome todo su apoyo.

Tengo buenos compañeros en el hospital a los que agradecer su constante ánimo y no puedo nombrarlos a todos, pero sí a M<sup>a</sup> Ángeles Cuadrado Cenzual y a los facultativos del Servicio de Análisis Clínicos, a Olga Pérez por escucharme, a Concha Sanabria por cuidarme y a Ángel Álvarez por ser un crack y una risa sanísima.

Quiero agradecer a los profesionales de la biblioteca del Hospital Clínico San Carlos, Manuel y Benito, conseguirme toda la bibliografía a alta velocidad, incluso en fin de semana. Siempre dispuestos a ayudar. A Irene Serrano, de la Unidad de Investigación, le agradezco la ayuda estadística para organizar los datos.

Raúl ha buscado un hueco extra en sus horas de descanso para recomponer y cuadrar este libro, dejándolo bonito y evitándome el estrés de la informática. Algo que no tiene precio... ¡Gracias!

Si el Prof. Dr. Domingo Espinós Pérez no me hubiese enviado a Genética del Ramón y Cajal, y si el Dr. Carlos San Román Cos-Gayón no me hubiese admitido, no hubiese iniciado allí mis primeros pasos con Patricia Vallcorba y con Pablo Cabello; ni Piluca Ferrando le hubiese hablado a Susi de mí. Pero sucedió, y al final, soy genetista. Gracias a todos ellos también.

No me olvido de Joaquín Montalvo Montes ni de Pilar Martínez Ten, maestros de la ecografía prenatal, y no puedo dejar de expresarles mi más cariñoso agradecimiento por todo lo que aprendí con ellos.

Finalmente, pero no por ello menos importante, quiero mostrar mi gratitud a la enorme y estupenda familia que tengo la suerte de tener, que me quiere y me apoya en todos los planos de mi vida. No ha sido pequeño su apoyo y su comprensión durante este trabajo; muy especialmente la de mi marido, José Manuel, que no sólo me ha sufrido con paciencia, sino que además me ha proporcionado calma y todo el tiempo que he necesitado. No he podido dar a mi hijo José todo el apoyo y la escucha que me hubiese gustado este último año, pero creo que me ha comprendido, sabe que confío en él, y estoy segura de que él mismo comprobará como tras el esfuerzo llega la recompensa y lo más importante, la satisfacción personal.

«Es de bien nacido ser agradecido» y tengo que decir que quien me acompañó todos y cada uno de los segundos en los que escribí este trabajo fue Fax. Y aguantó conmigo, hasta el final. Oso me hizo reír, algo nada sencillo.





A mis padres, M<sup>a</sup> Asunción y Ricardo, siempre presentes

A María, porque me transmite fuerza, confianza y serenidad



# Índice



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	17
<b>SUMMARY</b> .....	27
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	37
1.1. Diagnóstico prenatal.....	39
1.1.1. Cribado de aneuploidías en el ADN fetal (ADNf).....	42
1.1.1.1 ADNf libre: origen y metodologías para el cribado de las aneuploidías más frecuentes.....	45
1.1.1.2. ADNf: otras aplicaciones en el cribado de cromosomopatías.....	48
1.2. Indicaciones a Diagnóstico genético prenatal.....	50
1.2.1. Edad materna avanzada (EMA).....	50
1.2.2. Anomalías y marcadores ecográficos.....	50
1.2.2.1. Marcadores ecográficos de primer trimestre.....	51
1.2.3. Cribado combinado de primer trimestre (CC1T).....	52
1.2.4. Antecedentes personales y familiares.....	54
1.3. Asesoramiento genético prenatal.....	55
1.3.1. Asesoramiento genético pre-test.....	55
1.3.2. Asesoramiento genético post-test.....	58
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	61
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	65
<b>4. POBLACIÓN Y MÉTODOS</b> .....	69
4.1. Población.....	71
4.1.1. Fase 1: Estudio observacional de cohortes retrospectivo.....	71

4.1.1.1. Selección de la población a estudio.....	71
4.1.1.2. Datos registrados de las gestaciones seleccionadas.....	71
4.1.2. Fase 2: Estudio observacional de cohortes prospectivo.....	72
4.1.2.1. Selección de la población a estudio.....	72
4.1.2.2. Datos registrados de las gestaciones seleccionadas.....	73
4.1.3. Criterios éticos y legales.....	74
4.2. Métodos.....	75
4.2.1. Seguimiento clínico de las gestantes.....	75
4.2.1.1. El control clínico.....	75
4.2.1.2. Los seguimientos ecográficos.....	75
4.2.1.3. La consulta de cribado.....	75
4.2.1.4. El asesoramiento genético.....	74
4.2.2 Pruebas y estudios realizados.....	76
4.2.2.1. CC1T.....	76
4.2.2.2. Las técnicas invasivas.....	76
4.2.2.3. Los estudios genéticos.....	76
4.2.2.3.1. Estudios realizados en la Sección de Genética Clínica, Citogenética y Genética Molecular del HCSC.....	76
4.2.2.3.2. Estudios enviados a otras unidades o laboratorios de Genética distintos de la Sección de Genética Clínica del HCSC.....	79
4.2.2.3.3. Pruebas genéticas prenatales.....	80
4.2.3. Indicaciones a la consulta de Asesoramiento Prenatal.....	80
4.2.3.1. Indicaciones a prueba invasiva.....	80
4.2.3.2. Indicaciones a ADNf en el HCSC.....	82
4.2.4. Herramientas bioinformáticas en asesoramiento genético.....	83
4.2.5. Encuesta de calidad percibida.....	84

4.2.6. Análisis estadístico.....	84
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
5.1. Resultados del estudio observacional de cohortes retrospectivo realizado en la fase 1.....	87
5.1.1. Características de la población a estudiar.....	87
5.1.2. CC1T y resultados de cariotipo.....	89
5.1.3. Falsos negativos del CC1T para T21.....	92
5.1.4. TN en percentil $\geq 97,5$ ; riesgo en el CC1T para T21 y resultados de cariotipo.....	93
5.1.5 ADNf como test contingente de cribado.....	94
5.2. Resultados del estudio observacional de cohortes prospectivo realizado en la fase 2.....	94
5.2.1. Características de la población a estudio.....	94
5.2.2. Modelo contingente.....	99
5.2.2.1. CC1T, resultados de cariotipo y ADNf.....	101
5.2.2.2. Falsos negativos del CC1T para T21.....	104
5.2.2.3. TN en percentil $\geq 97,5$ ; riesgo en el CC1T para T21 y resultados de cariotipo.....	104
5.3. Valoración de la efectividad.....	105
5.3.1. Características de la población a estudio.....	106
5.3.2. CC1T, resultados de cariotipo y ADNf extraclínico.....	112
5.3.3. Comparación entre el período 2015-2016 y el período 2013-2014.....	114
5.3.3.1. Población a estudio.....	114
5.3.3.2. Efectividad.....	117
5.3.3.2.1. Gestantes atendidas en la consulta.....	117

5.3.3.2.2. Pruebas invasivas y estudios citogenéticos desequilibrados en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento.....	119
5.3.3.2.3. Pruebas invasivas y renunciadas en las gestantes con indicación a ADNf: modelo contingente.....	120
5.3.3.2.4. Pruebas genéticas prenatales en las gestantes con indicación a ADNf: pruebas invasivas, ADNf clínico (HCSC) y ADNf extraclínico.....	124
5.4. Encuesta de calidad percibida.....	126
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>129</b>
6.1. Fase 1: estudio observacional de cohortes retrospectivo.....	131
6.1.1. CC1T y anomalías cromosómicas.....	131
6.1.1.1. CC1T de alto riesgo.....	132
6.1.1.2. CC1T de riesgo intermedio.....	133
6.1.1.3. Otros puntos de corte en los CC1T de riesgo.....	137
6.1.1.4. CC1T de bajo riesgo.....	138
6.1.2. Falsos negativos para T21.....	140
6.1.3. TN en percentil $\geq 97,5$ ; riesgo en el CC1T para T21 y resultados de cariotipo.....	141
6.1.4. Modelo contingente.....	143
6.1.5. Limitaciones del estudio retrospectivo.....	147
6.2. Fase 2: estudio observacional de cohortes prospectivo.....	148
6.2.1. CC1T y anomalías cromosómicas.....	148
6.2.2. Falsos negativos del CC1T.....	149
6.2.3. ADNf y anomalías cromosómicas.....	149
6.2.3.1. ADNf no informativo.....	150
6.2.3.2. Fracción fetal.....	151
6.3. Valoración de la efectividad.....	153

6.3.1. Población a estudio.....	153
6.3.2. Efectividad.....	154
6.3.2.1. Gestantes atendidas en la consulta.....	154
6.3.2.2. Pruebas invasivas y estudios citogenéticos desequilibrados.....	155
6.3.2.3. Disminución de pruebas invasivas y renunciadas en las gestantes con indicación a ADNf .....	157
6.3.2.4. Pruebas genéticas prenatales en las gestantes con indicación a ADNf: pruebas invasivas, ADNf clínico (HCSC) y ADNf extraclínico.....	159
6.3.3. Limitaciones del estudio prospectivo.....	162
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>163</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>167</b>
<b>9. ABREVIATURAS.....</b>	<b>191</b>
<b>10. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....</b>	<b>195</b>
10.1. Índice de tablas.....	197
10.2 Índice de figuras.....	201
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>203</b>
11.1. Anexo 1: consentimientos informados.....	205
11.2 Anexo 2: aprobación del Comité de Investigación.....	219
11.3. Anexo 3: cuestionario de la encuesta de calidad percibida.....	223
<b>12. ACTIVIDAD CIENTÍFICA RELACIONADA CON LA TESIS DOCTORAL.....</b>	<b>227</b>



# Resumen



## RESUMEN

### Introducción

El diagnóstico prenatal es una actividad interdisciplinar encaminada a la detección de los defectos congénitos fetales, en muchas ocasiones de origen genético, donde la actividad coordinada de los diferentes especialistas y la información proporcionada a las gestantes les permiten optar por diferentes alternativas. El asesoramiento genético prenatal durante todo el proceso permite tanto la valoración individual en cada caso, como el establecimiento de los riesgos de recurrencia y opciones reproductivas para futuras gestaciones.

Existen distintos cribados, tanto de primer como de segundo trimestre, para detectar gestantes en riesgo a las que se les ofertará la realización de una prueba invasiva. En los últimos años, la incorporación del cribado de las aneuploidías fetales en el ADN libre circulante en sangre materna ha exigido una nueva revisión de estos protocolos en la atención a las gestantes. Este nuevo cribado, por su elevada sensibilidad y su baja tasa de falsos positivos, permite la detección de las aneuploidías más frecuentes evitando las pruebas invasivas en las gestantes de riesgo, y por tanto, evitando las pérdidas fetales. Su coste no permite introducirlo en toda la población obstétrica y ha dado lugar al desarrollo de diferentes modelos contingentes en las gestaciones de riesgo en función de los sistemas de salud.

### Hipótesis de trabajo

Las características del cribado del ADN fetal libre circulante en sangre materna para la detección de las aneuploidías más frecuentes, hacen que sea la prueba más idónea en las gestaciones que tienen un cribado combinado de primer trimestre con riesgo intermedio (1/51-1/300), y en aquellas que presentan algunos factores de riesgo más elevados de aneuploidía. Su introducción como prueba de cribado contingente en estos grupos de gestantes nos permitirá disminuir el número de pruebas invasivas, evitando por ello pérdidas fetales, y manteniendo la detección de las cromosomopatías con grave repercusión en el fenotipo fetal.

## Objetivos

El objetivo general del estudio es la evaluación de la efectividad de un nuevo protocolo de diagnóstico genético en la atención prenatal de las gestantes en riesgo de cromosomopatía, en el que se incluye el cribado de aneuploidías en el ADN fetal libre circulante en sangre materna como prueba contingente, comparándolo con el protocolo de atención anterior.

Entre los objetivos secundarios se encuentran el establecimiento de los puntos de corte en el cribado combinado y de otras indicaciones de riesgo para la introducción del cribado en el ADN fetal como test contingente, así como el análisis del efecto de su introducción en la reducción de las pruebas invasivas y en las pruebas genéticas totales.

## Población y métodos

### Población

El estudio consta de dos fases:

Durante la **fase 1** se realizó un estudio retrospectivo de los resultados del cribado combinado del primer trimestre y los resultados de cariotipo, sobre una población de 12.327 gestantes que acudieron al seguimiento de su embarazo al hospital Clínico San Carlos, durante el periodo 2009-2014. Los criterios de inclusión fueron las gestantes con cribado combinado y aquellas que sin cribado acudieron a la consulta de genética de octubre de 2013 a diciembre de 2014. Los criterios de exclusión fueron las gestantes sin cribado y sin asesoramiento, las infecciones y los abortos.

Durante la **fase 2** se realizó un estudio prospectivo sobre una población de 2.386 gestantes durante un periodo de 15 meses, de octubre de 2015 a diciembre de 2016. Los criterios de inclusión fueron las gestantes con cribado combinado y todas las que acudieron a la consulta de genética. Los criterios de exclusión fueron los mismos que en la fase 1.

### Métodos

El seguimiento clínico de las gestantes en ambas fases del estudio fue realizado por la Unidad Funcional Prenatal del hospital Clínico San Carlos. El cribado combinado proporcionó el riesgo individual de cada gestante para las trisomías 21 y 18 tras una ecografía de primer

trimestre (10-14 semanas) para medir la longitud cráneo caudal y la translucencia nucal, y un análisis bioquímico de la proteína plasmática A y la subunidad  $\beta$  de la hormona gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ -HCG) libre. Las gestantes con un riesgo  $\geq 1/300$  para estas trisomías fueron consideradas de riesgo. Las gestantes con cribado de riesgo, anomalías ecográficas, antecedentes familiares o personales de cromosomopatías, edad materna avanzada ( $\geq 35$  años) y ansiedad materna fueron remitidas a la consulta de genética. En ella se les ofreció una prueba invasiva mediante biopsia corial o amniocentesis y se realizó una prueba rápida para las aneuploidías más frecuentes (QF-PCR) y un cariotipo fetal. Las gestaciones con un riesgo en el cribado combinado  $\geq 1/50$  fueron consideradas de alto riesgo y aquellas con un riesgo entre  $1/51-1/300$  de riesgo intermedio. En las gestaciones con alto riesgo o con anomalía ecográfica se realizó un estudio mediante técnica de MLPA o array-CGH cuando el resultado de la prueba rápida fue normal. El cribado de aneuploidías fetales en el ADNf libre circulante en sangre materna, para las trisomías 21, 18 y 13 sólo se realizó durante la fase 2 del estudio y las muestras fueron enviadas a dos laboratorios externos con metodología de secuenciación masiva del genoma completo.

## Resultados y discusión

### 1. Fase 1. Estudio retrospectivo

De las 12.327 gestantes con cribado combinado de primer trimestre, 4.153 (34%) fueron remitidas a la consulta de genética, 3.423 (82%) de ellas únicamente por edad materna avanzada con cribado de bajo riesgo. El 88% de estas últimas gestantes renunciaban a una prueba invasiva, y no obstante seguían representando el 42% de las pruebas invasivas realizadas. En este mismo periodo un 4,3% (533/12327) de las gestantes tuvieron un cribado combinado de riesgo, representando tan sólo el 13% de las gestantes atendidas en la consulta.

Durante este periodo se realizaron 954 pruebas invasivas y se diagnosticaron 81 cariotipos desequilibrados. El 80% (65/81) de los cariotipos desequilibrados fueron trisomías 21, 18 y 13. En los 16 cariotipos desequilibrados restantes se encontraron un 8,65% (7/81) de aneuploidías de los cromosomas sexuales, incluida la monosomía del X, un 8,65% (7/81) de anomalías cromosómicas poco comunes o raras y un 2,5% (2/81) de triploidías.

Entre las gestaciones con un riesgo  $\geq 1/50$  en el cribado combinado, se encontraron el 74% (60) de las anomalías cromosómicas, incluidas 3 de las 4 raras con grave repercusión en el fenotipo fetal. Este porcentaje y los ratios de anomalías frente a las gestaciones en cada uno de

los grupos de riesgo en el cribado (1/1-1/4,5) apoyaron la recomendación de prueba invasiva en este grupo.

Entre las gestaciones con un riesgo 1/51-1/300 en el cribado combinado se encontraron el 11% (9) de las anomalías cromosómicas. En este grupo sólo el 2,3% de las gestaciones tenían un cariotipo desequilibrado. Los ratios de anomalías frente a las gestantes de cada grupo de riesgo en el cribado combinado fueron 1/28, 1/58 y 1/37 por lo que se recomendó el cribado de aneuploidías en el ADN fetal como opción alternativa a la prueba invasiva.

Entre las gestaciones con cribado de bajo riesgo hay un 15% (12) de anomalías cromosómicas: 7 falsos negativos para trisomía 21, 4 anomalías raras (sólo 1 con repercusión y detectada en ecografía) y 1 47,XXY. Tres de los 7 falsos negativos fueron también detectados en ecografía. El 71% de los falsos negativos fueron en gestantes <35 años. Dado que el 88% de las gestantes con edad materna avanzada y bajo riesgo renuncian a una prueba invasiva, y los falsos negativos para trisomía 21 del cribado son más frecuentes en gestantes menores de 35 años, se recomendó que las gestantes con bajo riesgo, independientemente de la edad, no fueran remitidas a la consulta de genética.

Entre los 7 falsos negativos para trisomía 21 del cribado combinado, dos de las gestaciones tenían una translucencia nucal en P97,5. En nuestra serie sólo hay 21 gestaciones con este percentil de translucencia nucal y bajo riesgo en el cribado. En el percentil 99 con cribado de bajo riesgo sólo hay 17 gestaciones, 14 de las cuales tienen una medida de translucencia menor de 3,5 mm y todas ellas tuvieron un cariotipo y resultados de MLPA normales. Por tanto, se recomendó dar la opción de un ADN fetal a las gestantes con translucencia nucal  $\geq$  a percentil 97,5 y cribado combinado de bajo riesgo siempre que la medida de la translucencia fuera < de 3,5 mm.

### 1.1. Modelo contingente

Tras los resultados de la fase 1 se recomendó el ADN fetal para las trisomías 21, 18 y 13 como prueba contingente en las gestaciones con:

1. riesgos en el CC1T para T21 y/o T18 entre 1/51-1/300 con independencia del percentil de la translucencia nucal pero siempre que fuera menor de 3,5 mm.
2. translucencia nucal  $\geq$  a p97,5 con resultado en el CC1T de riesgo bajo siempre que la medida fuera menor de 3,5 mm.

Además, siguiendo las recomendaciones de las sociedades internacionales, se añadió:

- antecedente personal de feto anterior aneuploide
- portadores de translocación robertsoniana de los cromosomas 21 y/o 13
- gestaciones únicas o múltiples con edad materna avanzada sin cribado
- contraindicación a prueba invasiva

## 2. Fase 2. Estudio prospectivo

Durante este periodo hubo 2.386 gestantes con cribado combinado. A la consulta de genética fueron remitidas 290 gestantes: 230 con cribado y 60 sin él. Sólo el 5% de las gestantes con cribado acudieron por edad materna avanzada con cribado de bajo riesgo. Se realizaron 108 pruebas invasivas y 136 cribados de ADN fetal, y se encontraron 29 cariotipos desequilibrados. El 79% de ellos fueron trisomías 21, 18 ó 13. No hubo aneuploidías de los cromosomas sexuales distintas de la monosomía del X aunque no es posible descartarlas a pesar de que los datos al nacimiento fueron normales. Tampoco hubo anomalías cromosómicas raras.

Entre las 160 gestaciones con opción al cribado de ADN fetal se detectaron 4 anomalías cromosómicas: 3 trisomías 21 en gestantes que tuvieron un riesgo intermedio, y 1 trisomía 13 en una gestante con TN en p97,5 y riesgo bajo en el CC1T. Todas ellas fueron comprobadas mediante técnica invasiva. Hubo 1 triploidía no detectada en el ADN fetal pero sí en ecografía. La sensibilidad del ADN fetal para las trisomías estudiadas fue del 100%. La tasa de no informativos (0,7%) fue acorde con la metodología elegida. Todas las aneuploidías más frecuentes, en las gestaciones con opción al ADN fetal, fueron detectadas.

## 3. Valoración de la efectividad

Para la valorar la efectividad del nuevo protocolo de atención prenatal se escogió el último periodo de 15 meses de la fase retrospectiva, de octubre de 2013 a diciembre de 2014.

Las características de la población atendida durante el periodo 2013-2014 y el periodo 2015-2016 no mostraron diferencias estadísticamente significativas salvo en las gestaciones con cribado de bajo riesgo, puesto que durante el primer periodo todas las gestantes con edad materna avanzada eran remitidas a la consulta.

### 3.1. Gestantes en la consulta

La eliminación de la edad materna avanzada con cribado de bajo riesgo como indicación a asesoramiento ha supuesto una mejor selección de las gestantes en riesgo de aneuploidía y una consulta más efectiva. Durante 2015-2016 hubo una disminución del 95% (del 75% al 4%) de las gestantes atendidas por esta indicación. Esto ha supuesto que durante este periodo las gestantes remitidas con cribado de bajo riesgo por alteraciones ecográficas, antecedentes personales/familiares o TN en p97,5 fueran el 29%, por cribado de riesgo el 47%, por edad materna avanzada sin cribado el 20% y por edad materna con cribado de bajo riesgo sólo el 4%, frente al 7%, 11%, 7% y 75%, respectivamente, del periodo anterior.

### 3.2. Pruebas invasivas en las gestantes atendidas

Al seleccionar mejor a las gestantes la proporción de pruebas invasivas en las gestantes atendidas aumentó. Sin embargo, el número total de ellas fue menor y de no haber implementado el ADN fetal el número de pruebas realizadas hubiese sido mayor que en el periodo anterior puesto que el 85% de las gestantes con opción a ADN fetal lo eligió como primera opción. Durante este periodo hubo un incremento del 187% en la realización de biopsia coriales, permitiendo un diagnóstico más temprano.

### 3.3. Pruebas invasivas y renunciadas en las gestantes con indicación a ADN fetal

La introducción del ADN fetal como test contingente ha permitido una disminución de un 63% (de 48% a 18%) de las pruebas invasivas en las gestantes con opción al mismo. Podría esperarse una disminución mayor, sin embargo, hay dos factores que influyen en este resultado. El primero es la percepción del mayor riesgo en las gestantes con cribados de riesgo o translucencia nucal elevada. El segundo es que las gestantes ya renunciaban a la prueba invasiva en el periodo anterior ante el riesgo de pérdida fetal, y se realizaban un ADN fetal fuera del centro o no se realizaban ningún test prenatal. Por tanto, la efectividad del protocolo no puede medirse únicamente en términos de disminución de pruebas invasivas, sino también en disminución de las renunciadas a realizarse algún test. Durante 2015-2016 tan sólo el 2% de las gestantes renunció a cualquier prueba lo que ha permitido mantener la detección de las aneuploidías más frecuentes.

### 3.4. Pruebas genéticas prenatales en las gestantes con indicación a ADN fetal

El incremento en la realización de pruebas en este grupo de gestantes fue del 70% (de 61% a 104%), principalmente a expensas de los grupos donde más renunciaban a una prueba invasiva. Al ofrecer una prueba alternativa no invasiva y sin coste con las características del cribado del ADN fetal, el 98% de las gestantes se realizó algún test. El 85% eligió un ADN fetal como primera opción y sólo el 18% se realizó una prueba invasiva, bien como primera opción bien como comprobación del resultado o ante la aparición de anomalía ecográfica en el segundo trimestre.



# Summary



## SUMMARY

### Introduction

Prenatal diagnosis is an interdisciplinary activity designed to detect congenital defects in the foetus. Often these defects are genetic and the coordinated actions of different specialists and the information given to pregnant women will help decide among different options. During the whole testing process, prenatal genetic counselling will allow for both individual assessment and determining the risk of recurrence and reproductive options for future pregnancies.

To detect patients at risk, different non-invasive screening procedures exist for both the first and second trimester of pregnancy. Women testing positive in a prenatal screen will be offered an invasive test for a definitive diagnosis of a chromosome abnormality in the foetus. The recent incorporation of screening tools able to detect aneuploidies in foetal cell-free DNA in the maternal circulation (cfDNA) has prompted a need to revise prenatal care protocols. Because of its high sensitivity and low rate of false positives, this new non-invasive approach enables the detection of the more common aneuploidies (mainly trisomy 21 (T21), trisomy 13 (T13), trisomy 18 (T18)) and often avoids the need for invasive tests associated with a risk of procedure-related miscarriage in high risk pregnancies. Owing to the costs of this screening test, it cannot be offered to the whole obstetrics population and this has given rise to different contingency models for high-risk pregnancies implemented by the different health systems.

### Hypothesis

The characteristics of cfDNA screening in the maternal circulation to detect the more common aneuploidies make it the most appropriate test in patients in whom the first-trimester combined screening (FTCS) indicates an intermediate risk (1/51-1/300) and in women with known risk factors for aneuploidy. Its introduction as a contingency screening tool in these women will enable us to reduce the number of invasive techniques needed, avoiding miscarriages while maintaining our capacity to detect chromosome abnormalities with serious effects on the foetal phenotype.

## Objectives

The objective of this study was to test the effectiveness of a new genetic testing protocol designed for prenatal care in pregnancies at risk of a foetal chromosome abnormality. The protocol proposed includes screening foetal cfDNA in the maternal circulation for aneuploidies as a contingent test. Results are compared with the previous standard of care protocol.

Secondary aims were to identify cut offs for combined screening and for other risk indications for the addition of cfDNA screening as a contingent test. Also examined was the effect of the new protocol on the number invasive tests and total genetic tests.

## Study Population and Design

The study was conducted in two stages:

In **Stage 1**, a retrospective study of the results of FTCS and karyotyping was conducted on a population of 12,327 women undergoing follow up of their pregnancy at the Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, over the period 2009-2014. Patients were included if they had undergone FTCS or lacked FTCS results but were referred for genetic counselling from October 2013 to December 2014. Candidates were excluded if they had not undergone FTCS and were not offered genetic counselling, or had suffered spontaneous miscarriage or infection.

**Stage 2** was a prospective study conducted in 2386 pregnant women over a 15-month period (October 2015 to December 2016). Inclusion criteria were FTCS results available and referral for counselling in the absence or presence of FTCS results. Exclusion criteria were as for Stage 1.

## Methods

In both study stages, clinical follow up of pregnancies was performed at the Prenatal Functional Unit of the Hospital Clínico San Carlos. Pregnant women underwent an ultrasound scan between 10 and 14 weeks' gestational for measuring crown-rump length and nuchal translucency following by a biochemical analysis of the  $\beta$  fraction of free human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein A at the same day. FTCS was

performed and provided the risk assessment for T21 and T18. An FTCS result  $\geq 1/300$  was considered at risk for foetal aneuploidies. Patients were referred for genetic counselling if they had a risk FTCS result, ultrasonographic anomalies, familial or personal history of chromosome abnormalities, were  $\geq 35$  years old or showed maternal anxiety. In this counselling, they were offered an invasive test – chorionic villus sampling or amniocentesis – and then subjected to a rapid test for the more common aneuploidies through quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) and foetal karyotyping. Pregnancies were considered high risk if the FTCS risk was  $\geq 1/50$  and intermediate risk if  $1/51-1/300$ . In pregnancies classified as high risk or those with ultrasonographic abnormalities, a high-resolution genetic analysis technique –MLPA or CGH-array–was employed when the rapid test result was normal. Foetal cfDNA screening for T21, T18 and T13 was only performed in Stage 2. For this purpose, samples were sent to two external laboratories with facilities for massively parallel shotgun sequencing (MPSS) of the whole genome.

## Results and Discussion

### 1. Stage 1. Retrospective Study

Of the 12,327 participants with FTCS results, 4,153 (34%) were referred to genetic counselling, 3,423 (82%) on the basis only of advanced maternal age as they were classified as low risk FTCS. Of these latter women, 88% rejected the offer of an invasive test yet these still represented 42% of the invasive tests performed. In the study period, 4.3% (533/12,327) of participants had a risk FTCS result, representing only 13% of patients seen at our counselling department.

Over the 6-year period examined, 954 invasive tests were performed and 81 unbalanced karyotypes were diagnosed. 80% (65/81) of the latter were T21, T18 and T13. Among the remaining 16 unbalanced karyotypes, 8.65% (7/81) were sex chromosome aneuploidies including X chromosome monosomy, 8.65% (7/81) infrequent or rare chromosome anomalies and 2.5% (2/81) triploidies.

Among pregnancies with a FTCS risk  $\geq 1/50$ , 74% (60) of chromosome abnormalities were found, including 3 of the 4 rare abnormalities with serious effects on the foetal phenotype. This percentage and ratios of abnormal to total pregnancies in each FTCS risk group (1/1-1/4.5) supported the recommendation for invasive testing in this risk group.

In the groups of pregnancies with a FTCS risk of 1/51-1/300, 11% (9) of chromosome abnormalities were detected. In these risk groups, only 2.3% of pregnancies showed an unbalanced karyotype. Abnormality to pregnancy ratios in each intermediate risk FTCS group ranged from 1/28 to 1/58 such that cfDNA screening for aneuploidies was recommended as an alternative to invasive testing.

Among the pregnancies with a low risk FTCS, chromosome abnormalities were recorded in 15% (12): 7 were false negatives for T21, 4 were rare abnormalities (only 1 with repercussions detected on ultrasonography) and one was 47,XXY. Three of the 7 false negatives were also detected on ultrasonography. 71% of the false negatives were produced in mothers aged 35 years or older. Given that 88% of participants of advanced maternal age and a low risk FTCS rejected the offer of an invasive test and that false negatives for T21 in the screen are more frequent in patients younger than 35 years, we would recommend not referring low risk patients for genetic counselling.

Among the 7 false negatives for T21 in the FTCS, nuchal translucency (NT) greater than or equal to the 97.5 percentile was observed in two patients. In our patient series, there were only 21 pregnancies with this percentile of NT and a low risk indicated in the combined screen. With a NT in the 99th percentile and a low risk FTCS there were only 17 pregnancies, 14 of which showed a NT of less than 3.5 mm, and normal karyotype and MLPA results. Accordingly, it is proposed that a foetal cfDNA test should be offered to patients with  $NT \geq p97.5$  and low-risk FTCS, provided the translucency measurement is  $< 3.5$  mm.

### 1.1. Contingency model

Based on the results of Stage 1, cfDNA screening for T21, T18 and T13 is recommended as a contingent test in patients showing:

1. FTCS risks of T21 and/or T18 in the range 1/51-1/300 regardless of the NT percentile when this measurement is under 3.5 mm.
2. A  $NT \geq p97.5$  and low risk FTCS provided the NT measurement is less than 3.5 mm.

Further, according to the recommendations of international associations we have added the following criteria prompting a contingency test:

- personal history of an aneuploid foetus
- carriers of Robertsonian translocations of chromosomes 21 and/or 13

- single or multiple pregnancies in advanced maternal age ( $\geq 35$  years) with no FTCS risk available
- invasive test contraindicated

## 2. Stage 2. Prospective Study

During the 15-month study period, 2,386 pregnant women had FTCS results, and 290 patients were referred to genetic counselling: 230 with FTCS data and 60 without. Only 5% of participants with FTCS results were referred for counselling because of advanced maternal age with a low risk FTCS. 108 invasive tests and 136 cfDNA screenings were performed. 29 unbalanced karyotypes were detected. 79% were T21, T18 or T13 trisomies. No sex chromosome aneuploidies other than X chromosome monosomy were detected, although these could not be ruled out. Data for the newborn period were, however, normal. Neither was any rare chromosome anomalies detected.

Among the 160 patients offered cfDNA screening, 4 chromosome abnormalities were detected: three T21 in patients classified by FTCS as intermediate risk, and one T13 in a patient with NT in the 97.5 percentile classified by FTCS as low risk. All 4 cases underwent invasive tests. One triploidy not detected in the cfDNA screen was confirmed by ultrasonography. The sensitivity of cfDNA for the trisomies examined was 100%. The rate of non informative results (0.7%) was consistent with the test selected. All common aneuploidies were detected in patients offered cfDNA prenatal testing.

## 3. Effectiveness Assessment

To examine the success of our new prenatal care protocol, the results of our prospective study were compared to those recorded in the last 15-month period of the retrospective stage of this study (October 2013 to December 2014).

The characteristics of the pregnant women managed over the periods 2013-2014 and 2015-2016 did not differ significantly with the exception of low risk FTCS pregnancies since during the first period examined all pregnancies with advanced maternal age were referred for genetic counselling.

### 3.1. Prenatal care

The preclusion of older maternal age plus a low risk FTCS result as an indication for counselling has determined the better selection of patients at risk of aneuploidy and thus resulted in more effective prenatal care. Over the period 2015-2016, a 95% reduction was produced (from 75% to 4%) in the number of patients seen because of this indication. This has meant that during this more recent period, the following patients were referred for counselling: 29% with a low risk FTCS because of ultrasonographic findings, personal/familial history of aneuploidies or NT p97.5, 47% because of a risk FTCS, 20% because of advanced maternal age and no FTCS results available, and only 4% with a low risk FTCS because of advanced maternal age. These rates contrast with 7%, 11%, 7% and 75%, respectively, recorded in the previous period.

### 3.2. Invasive tests

By better selecting patients, the proportion of invasive tests performed increased. However, absolute numbers of tests were lower. If the use of cfDNA had not been implemented, more invasive tests would have been needed than in the preceding period as 85% of women offered cfDNA chose this as their first choice option. Over this later period, chorionic villus sampling increased by 187% allowing for earlier diagnoses.

### 3.3. Invasive tests and their rejection in patients with an indication for cfDNA screening

The introduction in our prenatal care protocol of cfDNA screening as a contingency test has led to a 63% reduction (from 48% to 18%) in invasive tests in patients offered this option. While a greater reduction might have been expected, two factors influenced this finding. The first is a perception of greater risk than the real risk in patients with an intermediate risk FTCS or elevated NT. The second factor is that pregnant women had already rejected an invasive test in the previous period because of concerns about inducing miscarriage and either underwent a cfDNA test outside our centre or avoided all prenatal tests. This means that the effectiveness of our protocol cannot only be measured in terms of reduced numbers of invasive tests but also in terms of fewer patients rejecting all tests offered. From 2015 to 2016, only 2% of patients rejected some test offered. This has enabled the effective detection of the more common aneuploidies.

### 3.4. Prenatal genetic tests (invasive and cfDNA) in patients offered cfDNA screening

The increase recorded in the tests performed in patients offered cfDNA screening was 70% (from 61% to 104%), and is mainly attributable to the rejection of more invasive tests in the previous period. 98% of these women opted for some test (invasive or cfDNA) as they were offered an alternative non invasive test at no cost. 85% chose cfDNA as the first option and only in 18% was an invasive test, either as a first option either as a confirmatory test or in response to the appearance of an ultrasonographic anomaly in the second trimester.



# 1. Introducción



# INTRODUCCIÓN

## 1.1. Diagnóstico prenatal

El diagnóstico prenatal es la disciplina que engloba todas las acciones encaminadas a la detección, durante la gestación, de un defecto congénito fetal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define las anomalías congénitas como “*toda anomalía del desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente al nacimiento (aunque puede manifestarse más tarde), externa o interna, familiar o esporádica, hereditaria o no, única o múltiple*” (1,2)

Los defectos congénitos tienen una prevalencia del 4% en recién nacidos vivos y son responsables del 25% de muerte perinatal (3), del 10-12% de retraso mental y 10-12% de las minusvalías físicas. Entre las causas conocidas de los defectos congénitos se encuentran:

- Las anomalías cromosómicas, que presentan una prevalencia de un 0,7% de los recién nacidos vivos, son responsables del 12-14% de los defectos congénitos mayores y del 25% de las muertes perinatales por anomalías congénitas (4), siendo las más comunes la trisomía 21, 18 y 13 (5).
- Las enfermedades monogénicas, que aparecen en 1,5% de los recién nacidos vivos y son responsables de aproximadamente el 25% de los defectos congénitos.
- Las ambientales o adquiridas con efecto teratógeno, que son responsables de un 5% de los defectos congénitos y son debidas a distintos factores entre los que se encuentran las infecciones, los fármacos, los tóxicos, las radiaciones ionizantes, etc.
- Las multifactoriales/poligénicas, que son las más frecuentes, y probablemente debidas a la combinación de factores genéticos y ambientales.

El diagnóstico prenatal es una actividad interdisciplinar y coordinada que exige la selección de las gestantes, atendiendo a factores epidemiológicos, marcadores ecográficos y marcadores bioquímicos. Sus principales objetivos son:

- Diagnosticar un defecto específico.
- Reducir la ansiedad en los grupos de riesgo.
- Proporcionar opciones informadas.
- Informar y preparar para el nacimiento de un hijo con anomalías.

- Tomar, antes o tras el nacimiento, todas las medidas preventivas y de tratamiento necesarias.

Para cumplir con estos objetivos, el diagnóstico prenatal debe ser lo más precoz posible, puesto que en ocasiones conlleva tomar decisiones informadas por parte de las gestantes, con implicaciones sociales, éticas y legales, que en semanas tempranas tienen menos repercusión psicológica y menos morbilidad materna (6-8).

El diagnóstico prenatal genético se ocupa de la detección de síndromes y anomalías congénitas fetales de origen cromosómico y génico en gestantes en riesgo. Requiere de una técnica invasiva que presenta como complicación principal, la pérdida fetal. La rápida actuación por parte de los facultativos y servicios implicados y la información completa comunicada a la gestante, le permite a la misma optar por las distintas alternativas que se le ofertan, disminuyendo su ansiedad.

La Ley Orgánica 2/2010, de 3 de marzo, de salud sexual y reproductiva (BOE-A-2010-3514), y la Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre, que modifica el Real Decreto 1030/2006 (BOE-A-2014-11444) establecen el asesoramiento genético previo y posterior a las pruebas realizadas. Por ello se ha de realizar una consulta previa, de diagnóstico y asesoramiento genético prenatal, donde se haga una valoración individual para cada gestante de las diferentes alternativas diagnósticas, valorando el riesgo/beneficio de cada una de ellas, y sus limitaciones, y donde se obtenga el consentimiento informado.

En sus inicios, el diagnóstico prenatal genético estuvo dirigido principalmente a la detección de la trisomía 21 (T21), la más frecuente de las aneuploidías fetales. Durante los años 70, el principal método de cribado fue la edad materna avanzada (EMA), basándose en estudios poblacionales de la prevalencia de T21 al nacimiento en relación a la edad, y ofreciendo una prueba invasiva a todas las gestantes con edad superior o igual a 35 años. A esta edad el riesgo de pérdida fetal era equivalente al riesgo de tener un hijo afecto de T21. La baja sensibilidad de la edad materna (30% para una tasa de falsos positivos [TFP] del 5%) y la falta de utilidad para la detección de aneuploidías en las gestantes más jóvenes hicieron que se desarrollaran otros programas de cribado.

Durante los años 80 se empezaron a introducir los cribados ecográficos y bioquímicos de segundo trimestre. Estos primeros cribados modificaban el riesgo *a priori* de cada gestante por su edad y consiguieron aumentar la detección prenatal de T21. Permitieron, además, extender el cribado prenatal de cromosopatías a toda la población obstétrica dado su carácter no invasivo. En la siguiente década, los años 90, ante la evidencia de que se podían identificar los

fetos con aneuploidía a través de la medida de la translucencia nucal (TN) (9), los cribados ecográficos y bioquímicos en combinación con la edad materna empezaron a desarrollarse durante el primer trimestre de la gestación, mostrando un aumento en la detección de T21 frente a los cribados del segundo trimestre, y permitiendo un diagnóstico más precoz de las anomalías cromosómicas (5,10,11). Dentro del primer trimestre, el cribado más extendido es el cribado combinado de primer trimestre (CC1T), que presenta una elevada sensibilidad para la detección de T21 combinando la TN con marcadores bioquímicos y la edad materna. Tras la TN también se fueron describiendo otros marcadores ecográficos de primer trimestre para aumentar la detección de anomalías cromosómicas, como el ductus venoso alterado, la regurgitación tricuspídea, la arteria umbilical única, o el hueso nasal (12,13). La tabla 1.1 muestra los principales tipos de cribado bioquímicos y/o combinados con los datos ecográficos para T21 durante el primer y segundo trimestre de la gestación descritos por Nicolaidis (10) y Dashe (11) en sus revisiones de cribados prenatales.

Tipo de cribado	Sensibilidad (%) Corte de riesgo 1/270	TFP (%)
EM	30	5
<b>Primer trimestre</b>		
EM + TN	75-80	5
EM + f $\beta$ HCG + PAPP-A	60-70	5
EM +TN + f $\beta$ HCG + PAPP-A (CC1T)	80-95	5
CC1T + regurgitación tricuspídea o ductus venoso	93-96	2,5
<b>Segundo trimestre</b>		
EM + AFP+ HCG (doble test)	55-60	5
EM + AFP + f $\beta$ HCG (doble test)	60-65	5
EM + AFP + HCG + uE3 (triple test)	60-65	5
EM + AFP + f $\beta$ HCG + uE3 (triple test)	65-70	5
EM + AFP + HCG + uE3+ inhibina A (cuádruple test)	65-70	5
EM + AFP + f $\beta$ HCG + uE3+ inhibina A (cuádruple test)	70-82	5
<b>Primer y segundo trimestre</b>		
Test Integrado: EM + TN+ PAPP-A (11-13 semanas) + cuádruple test (15-21 semanas)	90-96	5
Test secuencial: CC1T + cuádruple test en las gestaciones con CC1T de bajo riesgo	92	5
Test secuencial contingente: CC1T + cuádruple test en las gestaciones con CC1T de riesgo intermedio	91	4,5

**Tabla 1.1. Cribados bioquímicos y/o combinados con datos ecográficos en el primer y segundo trimestre de gestación.** TFP: tasa de falsos positivos; EM: edad materna; TN: translucencia nucal; f $\beta$ HCG: fracción  $\beta$  libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; CC1T: cribado combinado de primer trimestre; AFP: alfa fetoproteína; uE3: estriol no conjugado. Modificado de Nicolaidis KH, 2011 (10) y Dashe JS, 2016 (11)

Durante todo su desarrollo, el diagnóstico prenatal genético ha ido buscando la mayor tasa de detección de alteraciones cromosómicas fetales realizando el menor número de pruebas invasivas posibles, para minimizar los riesgos de pérdida fetal. A partir del año 2011 comenzó a estar disponible en la práctica clínica el cribado no invasivo de aneuploidías fetales mediante el estudio del ADN fetal libre circulante en sangre materna (ADNf). Su rápida incorporación como cribado, en parte promovida por los laboratorios proveedores, supuso una revolución en el diagnóstico prenatal. Dicha rapidez hizo necesario que las sociedades internacionales emitieran recomendaciones para su uso en la práctica clínica ante las posibles implicaciones éticas, sociales y médicas que pudieran derivarse de su introducción (14-18).

La alta sensibilidad de este cribado para la detección de las aneuploidías más comunes junto a su carácter no invasivo, evitando por tanto pérdidas fetales, ha hecho que haya sido ampliamente aceptado por los profesionales y las gestantes. Sin embargo, al contrario de lo sucedido con los cribados bioquímicos, ecográficos y/o combinados desarrollados en décadas anteriores, el coste actual del ADNf no ha permitido su implementación en toda la población obstétrica. Ello ha hecho que se desarrollen distintos modelos para su introducción en la práctica clínica, que dependen principalmente de los distintos sistemas de salud. En general, en los sistemas públicos de salud como el nuestro, se ha propuesto su uso como test contingente, tras un CC1T de riesgo (19-21).

Entre estos modelos contingentes se encuentran aquellos que proponen su uso tras un CC1T con riesgo intermedio, y en otros grupos de riesgo como son las gestaciones con antecedentes personales de aneuploidía en feto anterior, los progenitores portadores de translocaciones robertsonianas que afectan a los cromosomas 21 y/o 13, y la EMA sin cribado (12,20).

Los nuevos avances en el diagnóstico genético prenatal hacen necesaria una reevaluación de los protocolos de atención a las gestantes en riesgo cumpliendo unos criterios de calidad y utilidad clínica que nos permitan realizar un diagnóstico más efectivo, y mediante la implementación del cribado no invasivo de aneuploidías siguiendo las recomendaciones nacionales e internacionales de las Sociedades de genética y de ginecología (16-18,21).

### **1.1.1. Cribado de aneuploidías en el ADN fetal (ADNf)**

El descubrimiento en 1997 por *Dennis Lo et al.* (22) de la presencia de ADN fetal circulante en el plasma materno junto al gran avance de las tecnologías, ha permitido el desarrollo del cribado de aneuploidías fetales en sangre materna. En 2008, dos grupos, mediante técnicas de secuenciación masiva de genoma completo, consiguieron detectar en el ADNf circulante en

sangre materna una T21 por la presencia de un feto afecto (23,24). El ADNf es un test de cribado y necesita de una prueba invasiva para la confirmación de los resultados, pero su elevada sensibilidad ha revolucionado el cribado de las aneuploidías del primer trimestre, cambiando de nuevo los protocolos de atención prenatal (tabla 1.2).

	Sensibilidad (%)	IC 95% (%)	TFP (%)	IC 95% (%)
Trisomía 21	99,7	99,1-99,9	0,04	0,02-0,07
Trisomía 18	97,9	94,9-99,1	0,04	0,03-0,07
Trisomía 13	99	65,8-100	0,04	0,02-0,07
Monosomía X	95,8	70,3-99,5	0,14	0,05-0,38
Otras aneuploidías de los cromosomas sexuales	100	83,6-100	0,004	0-0,08
Gemelares con trisomía 21	100	95,2-100	0	0-0,003

**Tabla 1.2. Sensibilidad y tasa de falsos positivos del test de ADNf.** Datos obtenidos del meta-análisis realizado por *Gil MM et al, 2017 (25)* con test de ADNf realizados con varias metodologías. TFP: tasa de falsos positivos. IC: intervalo de confianza.

La especificidad del test de ADNf y su valor predictivo negativo (VPN) son superiores al 99% para las aneuploidías más comunes (21, 18, 13, X, Y) (26,27). Sin embargo, el valor predictivo positivo (VPP) varía en función de la prevalencia de la aneuploidía estudiada y del tipo de población obstétrica en la que se aplica el test. La diferencia entre las poblaciones ha sido principalmente estudiada para las aneuploidías de los autosomas (tablas 1.3).

	Aneuploidía	VPP (%)
Población obstétrica de alto riesgo	Trisomía 21	91
	Trisomía 18	84
	Trisomía 13	87
Población obstétrica general	Trisomía 21	82
	Trisomía 18	37
	Trisomía 13	49

**Tabla 1.3. Valor predictivo positivo para las trisomías 21, 18 y 13 en población obstétrica de alto riesgo y general.** VPP: valor predictivo positivo. Datos tomados del meta-análisis realizado por *Taylor-Philips et al, 2016 (27)*.

El VPP de las aneuploidías de los cromosomas sexuales ha sido estudiado fundamentalmente en población general (con alto y bajo riesgo de aneuploidía), puesto que dichas anomalías suelen detectarse en el transcurso de los cribados destinados a la T21, T18 y T13 (tabla 1.4).

Aneuploidias de los cromosomas sexuales	VPP (%)
45,X	40-45
47,XXX	57-70
47,XXY	33-43
47,XYY	50-100

Tabla 1.4. Valor predictivo positivo del test de ADNf para las aneuploidias sexuales. VPP: valor predictivo positivo. Datos tomados de Porreco et al, 2014 (26) y Yao et al, 2014 (28).

Como todos los test de cribado, el ADNf puede tener resultados falsos positivos y negativos que pueden deberse no sólo a fallos metodológicos sino también a otros factores médicos y biológicos que se muestran en la tabla 1.5.

Causas		Falsos positivos	Falsos negativos
Precisión de la metodología		sí	sí
Baja fracción fetal	Edad gestacional temprana (<9 semanas)	no	sí
	Obesidad materna	no	sí
	Gestaciones múltiples	no	sí
	Gestaciones de TRA	no	sí
	Tratamientos que afectan la calidad del ADN circulante (ej: heparina)	no	sí
	Algunas cromosomopatías fetales (ej triploidía, T18, T13)	no	sí
Mosaicismo fetal verdadero		no	sí
Hallazgos incidentales maternos	mosaicismos del X ó 47,XXX	sí	no
	mosaicismos de autosomas	sí	no
	CNVs maternas	sí	No
	leiomioma	sí	no
	neoplasias maternas	sí	no
Gemelo evanescente		sí	no*
Mosaicismo confinado a la placenta		sí <sup>a</sup>	sí <sup>b</sup>
Transplante de médula ósea u órgano previo		sí	no
Condiciones médicas maternas y tratamientos que afectan a la calidad del ADN circulante (ej: enfermedades autoinmunes, deficiencia de B12, colestasis intrahepática)		sí	no

Tabla 1.5. Causas de falsos positivos y negativos en el test de ADNf. TRA: tratamiento de reproducción asistida. CNV: variación en el número de copias.\*En la mayoría de los casos el gemelo evanescente es causa de falsos positivos pero existe un caso descrito de falso negativo para T13 por Hartwing et al, 2018 (29). <sup>a</sup>Placenta aneuploide y feto euploide; <sup>b</sup>Placenta euploide y feto aneuploide o mosaico. Datos obtenidos de Bianchi et al, 2018 (30).

En ocasiones el test de ADNf no da resultados, dando lugar a los llamados “test no informativos” (31). Estos varían en función de la metodología empleada, y es importante tenerlos en cuenta durante la implementación del test de ADNf puesto que un número elevado puede afectar a la detección de aneuploidías o aumentar el número de pruebas invasivas a realizar. Entre sus causas se encuentran:

- a) problemas de manejo de la muestra
- b) problemas metodológicos
- c) una baja fracción fetal
- d) hallazgos inesperados maternos, fetales o placentarios, como son las anomalías cromosómicas distintas a las comúnmente estudiadas (21, 18, 13, X e Y) que dificultan la interpretación en los algoritmos bioinformáticos.
- e) las alteraciones genómicas maternas como las neoplasias o las variaciones en el número de copias genómicas (CNVs).

#### **1.1.1.1. ADNf libre: origen y metodologías para el cribado de las aneuploidías más frecuentes**

El ADNf libre se origina principalmente del trofoblasto (32), comprende del 4-30% aproximadamente de la cantidad del ADN libre circulante en sangre materna entre las 11-20 semanas de gestación (33-36), normalmente está fragmentado y desaparece aproximadamente a las 48 horas del parto. Los fragmentos del ADN fetal se encuentran diluidos en el plasma materno en una proporción muy baja y tienen un tamaño medio de 146 bp (37), menor que los de origen materno, lo que permite la estimación de la fracción fetal para los estudios genéticos. La fracción fetal puede estar influida por diversos factores pero se correlaciona principalmente con la edad gestacional y con el peso materno, de modo que aumenta con la edad gestacional y disminuye a mayor peso materno (24,33,38,39). El porcentaje mínimo para que un test sea informativo evitando así falsos negativos es del 4% (40). Para la correcta interpretación del test es necesario disponer de la fracción fetal, no sólo como medida de calidad sino también por su relación con el riesgo de aneuploidía (41). Las fracciones fetales bajas están relacionadas con menor masa placentaria y con placentas insuficientes, las cuales están a su vez relacionadas con algunas aneuploidías como la T13 y la T18, y con las triploidías (38,40,42).

Dada la pequeña cantidad de ADNf libre circulante y que no es posible separarlo del ADN circulante de origen materno, para la detección de las aneuploidías se requiere de una amplificación con técnicas de PCR de todo el ADN circulante (fetal y materno) y su posterior análisis bioinformático. Esta amplificación se lleva a cabo mediante plataformas de secuenciación masiva (36). Actualmente hay distintas metodologías aunque están en desarrollo nuevas técnicas. Existen dos tipos principales de metodologías, las semicuantitativas y las cualitativas:

- a) Metodologías semicuantitativas, que pueden ser (**figura 1.1**):
1. la secuenciación masiva del genoma completo (*massively parallel sequencing*, MPS-S), que genera millones de lecturas de los fragmentos de ADN de todos los cromosomas y compara el número de lecturas del cromosoma de interés con el número de lecturas del resto de los cromosomas presumiblemente euploides (23,24).
  2. secuenciación masiva de regiones específicas del genoma (*targeted massively parallel sequencing*), donde se secuencian las regiones de los cromosomas más frecuentemente asociados a las aneuploidías fetales (21, 18, 13, X e Y) (43).

Además del análisis bioinformático estas tecnologías comparan sus resultados con series de gestaciones euploides y aneuploides que ya tienen analizadas previamente. Actualmente son las más utilizadas por su capacidad para dar resultados con fracciones fetales bajas y tener unas tasas de resultados no informativos del 1,58% y del 3,56% en la secuenciación masiva de genoma completo y en la de cromosomas específicos, respectivamente (25,44).

- b) Metodologías cualitativas (SNP *targeted sequencing*), que incluyen información genómica, a través de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de los cromosomas más frecuentemente asociados a aneuploidía (21, 18, 13, X e Y), permitiendo la identificación de regiones específicamente fetales o maternas en las lecturas realizadas. Estas metodologías han utilizado tanto métodos de secuenciación masiva de los SNPs (34) como técnica de array (45). Son capaces de detectar anomalías que con los métodos semicuantitativos no es posible detectar, como son las triploidías (36). Sin embargo, tienen dificultades para analizar las muestras en casos de ovodonación, de maternidad subrogada, de consanguinidad, de gestaciones múltiples y postransplante. Su tasa de no informativos es del 6,39% (44).

Las distintas metodologías se basan en la detección de un aumento de un 50% de un determinado cromosoma en la pequeña proporción del ADNf libre circulante mezclado con el

materno. A modo de ejemplo, para una fracción fetal del 10% en un feto afecto de aneuploidía se espera un aumento de un 5% de los marcadores de este cromosoma. Es decir, de 100 unidades de ADN libre circulante en sangre materna (10 fetales + 90 maternas), el aumento del cromosoma trisómico sería de 5 unidades y por lo tanto habría 105 unidades del mismo comparadas con sólo 100 en cualquier otro cromosoma (36,38). Como la proporción que el ADN del cromosoma 21 representa en nuestro genoma es del 1,5%, para una fracción fetal del 10% la proporción de cromosoma 21 en el total del ADN circulante en una gestación afecta de T21 sería del 1,6%, mientras que para una fracción fetal del 4% sería del 1,53%. Por tanto, la capacidad para detectar este incremento (trisomías) no sólo depende de la metodología sino también de la fracción fetal.

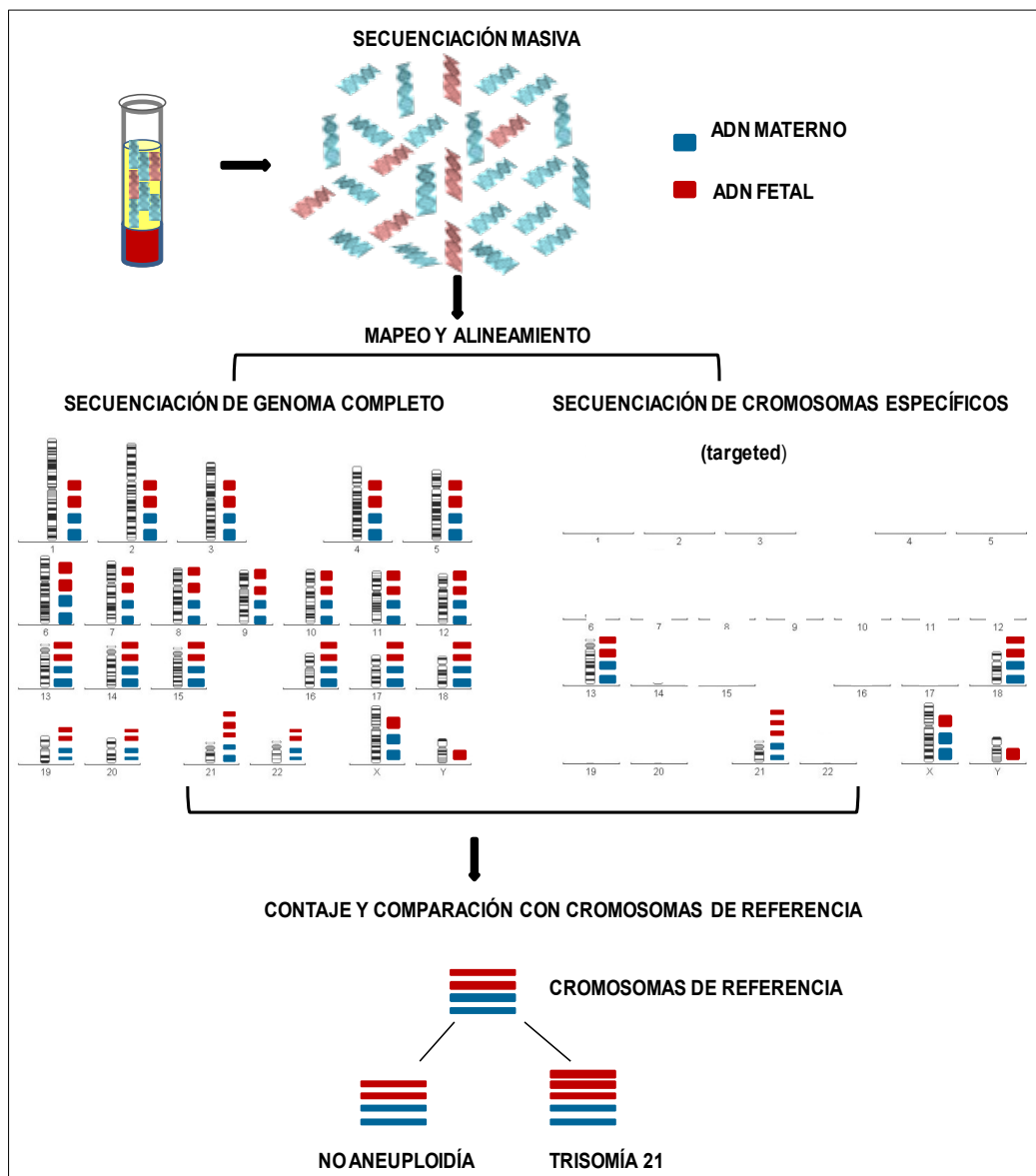


Figura 1.1. Esquema de las metodologías semicuantitativas para la detección de aneuploidías.

### 1.1.1.2. ADNf: otras aplicaciones en las cromosomopatías

Tras la introducción del ADNf para el cribado de las aneuploidías más frecuentes en el primer trimestre de gestación, diversos grupos de autores comenzaron a validar analíticamente su uso para la detección de síndromes de microdelección/microduplicación y otras aneuploidías menos frecuentes (46-49).

- a) Las microdeleciones/microduplicaciones son anomalías cromosómicas no visibles en cariotipo convencional, puesto que tienen un tamaño inferior a 5-10 Mb. Son generalmente diagnosticadas a través de técnicas de MLPA o array-CGH en el ADN de muestras prenatales o postnatales donde se detectan las CNVs o variaciones en el número de copias. Las tecnologías de secuenciación masiva del genoma han demostrado ser capaces de detectar estas alteraciones en el ADN circulante en sangre materna. La sensibilidad de estas metodologías para la detección de CNVs varía en función del tamaño de las CNVs, siendo del 41-72% para CNVs < 7-10 Mb (46,50,51) y del 85-97% para CNVs >7-10 Mb (46,52,53). El VPP para estas alteraciones es del 18-42% en población obstétrica general, dada la baja prevalencia de estas anomalías (54,55), y del 60-96% en población obstétrica de alto riesgo seleccionada entre la que se encuentran un número elevado de gestantes con alteraciones ecográficas (49,53). Puesto que el ADN circulante es mayoritariamente materno, estas CNVs también han sido detectadas en las gestantes, y en ocasiones, pueden tener repercusión sobre el feto cuando las ha heredado (56).

La prevalencia de estas alteraciones en recién nacidos vivos no está bien establecida pero se estima inferior a 1/1000 (3,57). Puesto que no tienen relación con la edad materna ni con los CC1T de riesgo (58), su prevalencia en población obstétrica general sin alteraciones ecográficas es la misma que en recién nacidos vivos como han demostrado Martin *et al.* (55). La prevalencia estimada en series prenatales en un 0,3-2,1%, es debida a que los estudios se realizaron en poblaciones de gestantes con alto riesgo de aneuploidías entre las que había un elevado número de ellas con alteraciones ecográficas (58,59).

- b) La secuenciación masiva del genoma completo en el ADN circulante también ha demostrado ser capaz de detectar anomalías cromosómicas raras como son las alteraciones estructurales fetales desequilibradas y los mosaicismos de aneuploidías fetales, maternas y/o placentarias, distintas de las comúnmente estudiadas (21, 18, 13, X e Y). Un estudio reciente detecta en población de riesgo de aneuploidías en las que se había realizado un ADNf para estudio de las aneuploidías más comunes, un 1,6% de alteraciones raras. De ellas el 25% eran de origen fetal, el 55% de origen placentario, y

el 2% de origen materno, dando una prevalencia del 0,3%, 0,9% y 0,04% respectivamente (60). Otros autores describen un 0,3-0,4% de trisomías autosómicas raras, en población obstétrica general, de origen fetal y/o placentario detectadas en ADNf libre circulante. Entre ellas destacan las trisomías de los pares 2, 7, 9, 15, 16 y 22, con frecuencia asociadas a mosaicismos placentarios (61,62). Estos autores encuentran la asociación de estas alteraciones detectadas no sólo con patología cromosómica fetal sino también con alteraciones placentarias que pueden dar lugar a placentas insuficientes y malformaciones fetales e indican que su análisis supondría un aumento de un 1,1% en pruebas invasivas (60).

Todas estas alteraciones cromosómicas pueden ser consideradas hallazgos inesperados en el contexto del cribado de las aneuploidías más frecuentes. No cumplen criterios de prevalencia para ser utilizadas como cribado en la población general y su VPP es bajo, con una tasa elevada de falsos positivos que podrían aumentar la tasa de pruebas invasivas a realizar en el contexto del cribados de aneuploidías. Hasta el momento, las sociedades internacionales de genetistas no han recomendado su uso puesto que se necesita la validación clínica en la detección de estas alteraciones. Sin embargo, han recomendado que las gestantes sean informadas de su existencia, puesto que están disponibles en muchos laboratorios proveedores. Tratan de preservar el principio de autonomía de las gestantes e insisten en la necesidad de asesoramiento, puesto que si las gestantes desean descartar estas alteraciones de baja prevalencia, actualmente es más eficiente hacerlo en una muestra obtenida tras prueba invasiva (18,17).

No obstante, no podemos evitar, si utilizamos secuenciación masiva de genoma completo para el cribado de las aneuploidías más frecuentes, la aparición de estos hallazgos inesperados. De ahí la importancia del asesoramiento genético pre-test, en el que se ha de informar de todos los posibles hallazgos inesperados y sus repercusiones clínicas tanto maternas como fetales.

El asesoramiento para la realización del test de ADNf como cribado de aneuploidías debe incluir:

- que la realización del test de ADNf es voluntaria, explicando las características clínicas de las alteraciones cromosómicas a estudiar. Se debe ofrecer también una prueba invasiva diagnóstica explicando las ventajas y las limitaciones de ambas en la detección de cromosopatías.

- que el ADNf es una prueba de cribado, y todos los test positivos han de ser confirmados en prueba invasiva.
- los falsos negativos, falsos positivos y valores predictivos del test de ADNf.
- las limitaciones del test de ADNf, entre las que se incluyen los casos no informativos y sus causas.
- la posibilidad de encontrar hallazgos inesperados maternos, fetales y placentarios.
- el consentimiento informado debe contemplar el derecho a “no saber”, por lo que se debería dar esa opción para el sexo fetal, las aneuploidías de los cromosomas sexuales y los hallazgos inesperados.

## **1.2. Indicaciones a Diagnóstico Genético Prenatal**

### **1.2.1. Edad materna avanzada (EMA)**

Las gestantes con una edad  $\geq$  a 35 años tienen más riesgo de tener hijos afectados de aneuploidía (63). Sin embargo, la edad materna tiene una sensibilidad muy baja como cribado y es sólo un factor de riesgo *a priori* que ya se tiene en cuenta al calcular los riesgos individuales para cada gestante en los diferentes cribados prenatales. En 2007, el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (64) recomendó no ofrecer pruebas invasivas sólo por EMA.

En 2017, la Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología (SEGO) sólo contempla esta indicación como estrategia de rescate ante una gestante cuyo riesgo *a priori* de aneuploidía por edad sea  $\geq 1/270$  (riesgo de T21 por edad materna al parto), y no disponga de ningún cribado (21). Estas recomendaciones también aclaran que la ansiedad materna, o petición propia de la gestante, no son una indicación a prueba invasiva, puesto que dichas pruebas diagnósticas sólo están recomendadas en las gestantes de riesgo identificadas por los diversos cribados existentes.

### **1.2.2. Anomalías y marcadores ecográficos**

Las anomalías estructurales fetales aparecen en un 2-3% de las gestaciones por lo que el control ecográfico a lo largo de toda la gestación es parte imprescindible del diagnóstico y el cuidado prenatal (65). La ecografía durante el primer y segundo trimestre de gestación es

particularmente importante para descartar tanto malformaciones estructurales fetales como para reevaluar el riesgo de cromosomopatía fetal (10,11,66,67). Los marcadores ecográficos son hallazgos que pueden representar variantes anatómicas normales y no tienen por qué constituir una malformación, pero están asociados a un mayor riesgo de alteración cromosómica fetal. La detección de estas anomalías y marcadores permiten seleccionar a las gestantes en riesgo de cromosomopatía, y dar a los progenitores la oportunidad de conocer su etiología, pronóstico, viabilidad y tomar decisiones informadas.

Las anomalías estructurales fetales son siempre una indicación a diagnóstico prenatal invasivo. Sin embargo, los marcadores no siempre lo son y se suelen utilizar en el contexto de los cribados de cromosomopatías.

### **1.2.2.1. Marcadores ecográficos de primer trimestre**

La incorporación de la medida de la TN como marcador principal de cromosomopatía fetal ha sido un factor fundamental en el desarrollo de la ecografía del primer trimestre, permitiendo el desarrollo del diagnóstico prenatal temprano. Ello, junto a los avances tecnológicos, ha potenciado el desarrollo de numerosos marcadores durante este trimestre de gestación, tanto para la detección de anomalías fetales como para el control de otras posibles complicaciones de la gestación.

El principal marcador ecográfico asociado a cromosomopatía, la TN, fue introducido en primer trimestre de gestación por *Kypros Nicolaides* en el año 1992 (9). La TN es la medida del grosor de la zona eco-negativa en la zona posterior de la nuca del feto debida a la acumulación de líquido en el tejido subcutáneo fetal (figura 1.2). Su medida se valora en función de la longitud céfalo caudal (LCC) fetal en cada semana de gestación, y se considera patológica cuando es superior al percentil 99 (p99). Cuando la colección de líquido es más elevada y se encuentra septada se denomina higroma quístico. Entre las causas de su elevación se barajan el fallo cardiaco, las alteraciones de la composición de la matriz extracelular, las alteraciones del desarrollo del sistema linfático, la anemia, las alteraciones neuromusculares y la hipoproteinemia (12, 68). Su medición óptima es en la 11-12 semana de gestación, y debe ser realizada por ecografistas expertos en medicina fetal siguiendo las pautas de la Fundación de Medicina Fetal del Reino Unido ([www.fetalmedicine.com](http://www.fetalmedicine.com)). Su elevación (mayor de 3,5 mm o en percentil 99) se relacionó fundamentalmente con la T21, pero también puede encontrarse en otras cromosomopatías como son la T18, la T13, la monosomía del X, la triploidía, otras anomalías cromosómicas raras y síndromes genéticos (10,12). Además, puede ser el primer signo de una posible malformación congénita, principalmente cardiopatía, y está también

relacionada con peor pronóstico perinatal (68-70). Su relación con la cardiopatía hace que ante una TN aumentada con cariotipo fetal normal se recomiende una ecografía morfológica precoz (16 semanas) para valoración cardíaca fetal.

En el 33-38% de las gestaciones con una TN en p99 o  $\geq$  a 3,5mm se detectan anomalías cromosómicas visibles en cariotipo convencional (71,72), por tanto, dada su asociación con cromosomopatías (12) este marcador se considera indicación a diagnóstico prenatal invasivo.



Figura 1.2. Imagen de la medida de una TN en p99 ( $\geq$  3,5 mm) durante el primer trimestre de gestación.

### 1.2.3. Cribado combinado de primer trimestre (CC1T)

Puesto que el diagnóstico prenatal ha de ser precoz, los marcadores bioquímicos más utilizados son los del primer trimestre. La proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) y la fracción  $\beta$  libre de la gonadotropina coriónica humana (f $\beta$ HGC) han demostrado ser eficaces en la detección de aneuploidías en el primer trimestre. La combinación de estos marcadores bioquímicos con la edad materna y la medida de la TN ajustada en función de la LCC, dan lugar al CC1T.

La combinación de todos estos parámetros a través de algoritmos matemáticos basados en funciones de distribución de Gauss, nos dan el riesgo individual de cada gestante para T21, T18 y T13 modificando su riesgo *a priori* por la edad (73). Los marcadores bioquímicos pueden verse afectados también por otros factores como son la gemelaridad, el peso materno, la etnia, la diabetes, el tabaquismo y las gestaciones conseguidas mediante reproducción asistida. Los algoritmos matemáticos contemplan correcciones para todas ellas.

Los puntos de corte de riesgo son en general, 1/250, 1/270 ó 1/300 que son los riesgos *a priori* de una gestante de 35 años para T21 en la semanas 12, 16 y 20 de gestación respectivamente (12). El punto de corte de riesgo más utilizado es el 1/270 pero existen variaciones entre los distintos centros. A las gestantes con un riesgo mayor o igual al punto de corte elegido se les considera en riesgo de aneuploidía. En general, un punto de corte de riesgo  $\geq 1/10$  ó  $1/50$  es considerado alto riesgo, mientras que los puntos de corte de  $1/11$  a  $1/270-1/300$ , y  $1/51$  a  $1/270-300$  son considerados riesgos intermedios.

Los distintos patrones de aumento o disminución de la concentración sérica de los marcadores bioquímicos del CC1T y de la TN en los casos de T21, T18, y T13, así como en otras anomalías cromosómicas, afectan a los riesgos proporcionados por el CC1T permitiendo la selección de las gestantes en riesgo de cromosomopatía. La adicción de otros marcadores ecográficos menores puede aumentar la sensibilidad de este cribado por encima del 93% (tabla 1.1). La tabla 1.6 muestra los patrones séricos y ecográficos en las gestaciones euploides y aquellas con T21, T18 y T13 (10).

	Euploidía	T21	T18	T13
Media de TN, mm	2	3,4	5,5	4
Media de fβHCG, MoM	1	2	0,2	0,5
Media de PAPP-A, MoM	1	0,5	0,2	0,3
Ausencia de hueso nasal, %	2,5	60	53	45
Regurgitación tricuspídea, %	1	55	33	30
Ductus venoso reverso, %	3	66	58	55

**Tabla 1.6. Patrones séricos y ecográficos en gestaciones euploides, T21, T18 y T13.** TN: translucencia nucal; fβHCG: fracción libre β de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; MoM: múltiplos de mediana. Modificado de Nicolaidis KH, 2011(10)

El CC1T se puede realizar entre la 9-13,6 semana de gestación, siendo óptimo en la 11 semana (11). Puede realizarse la medida de la TN y la extracción para la bioquímica en el mismo día o bien en días distintos. En este último caso la bioquímica se realiza entre la 9-11 semana y la medida de la TN entre la 11-12 semana de gestación, puesto que son los momentos de mayor sensibilidad para cada uno de los marcadores (10,21,74,75). Dado que este cribado se realiza en semanas tempranas de la gestación permite, en caso de riesgo en el mismo, la realización de una técnica invasiva temprana, como es la biopsia corial, para la realización de un estudio genético fetal (76).

Su sensibilidad global para la detección de T21 es del 80-95% para una TFP del 5% (tabla 1.1), siendo, dentro de este rango, más elevada en las gestaciones con EMA (74). En las

gestaciones múltiples su sensibilidad es menor (83-86%) con una TFP más elevada (7,4-10%) (77,78).

Hasta la introducción del ADNf como cribado de aneuploidías fetales, todas las gestantes con CC1T de riesgo tenían indicación de diagnóstico prenatal invasivo. Tras su introducción, es posible seleccionar las gestaciones donde la probabilidad de cromosopatía es menor para poder ofertar a las gestantes un test de ADNf como alternativa a la prueba invasiva

#### **1.2.4. Antecedentes personales y familiares**

Los progenitores con historia familiar o personal de alteraciones de origen cromosómico o génico tienen, al menos, indicación de asesoramiento genético prenatal. En función de la alteración genética, de la historia clínica y árbol genealógico personal y/o familiar, de los estudios genéticos familiares previos y de los resultados de los cribados prenatales, tendrán o no indicación a un diagnóstico prenatal invasivo.

Entre los antecedentes personales en las gestaciones en riesgo de cromosopatía se encuentran:

- a) Las parejas portadoras de reordenamientos cromosómicos, las cuales pueden dar lugar a la formación de gametos desequilibrados durante la segregación meiótica y por tanto, tienen más riesgo de abortos de repetición y/o hijos con cromosopatías (79). Por ello, a estas parejas se les debe estudiar para conocer el origen de *novo* o heredado de la alteración y poder realizar asesoramiento genético.
- b) Hijo o feto anterior con aneuploidía. Cuando la alteración es de *novo*, las gestantes tienen un riesgo de repetición que se estima el doble del correspondiente a su edad (80). Aunque el origen de las aneuploidías es principalmente la EMA, los progenitores también podrían ser portadores de mosaicismos en la línea germinal o de mosaicismos constitucionales de bajo grado, y requerir de estudio y asesoramiento genético.
- c) Hijo o feto anterior con cromosopatía estructural de *novo*, en los que es necesario descartar un mosaicismo de línea germinal en los progenitores y realizar estudio genético y asesoramiento ante una nueva gestación.

Los progenitores con enfermedades genéticas de origen génico no son objeto de este estudio, pero debemos señalar que deben ser enviados a la consulta de asesoramiento para valoración clínica y en caso necesario, poder ofrecerles un diagnóstico genético prenatal invasivo.

### 1.3. Asesoramiento genético prenatal

El asesoramiento o consejo genético es un proceso de comunicación que, tras una anamnesis y valoración clínica, incluye el diagnóstico, los riesgos asociados a la aparición de la enfermedad genética en un individuo y/o en una familia, la posibilidad de prevenirla y la posibilidad de tratarla o paliarla. Su objetivo es ayudar a comprender y a adaptarse a una condición genética determinada tratando durante el proceso cuestiones médicas, genéticas y psicológicas. Es una prestación del Sistema Nacional de Salud, que debe ser realizada por facultativos expertos y que está ligada al diagnóstico genético (Orden SSI/2065/2014).

El asesoramiento genético prenatal presenta características especiales, como son:

1. La ansiedad de las gestantes ante la posibilidad de un hijo afecto.
2. Los plazos legales a cumplir, puesto que la Ley Orgánica 2/2010, de 3 de marzo, de salud sexual y reproductiva (BOE-A-2010-3514), contempla la interrupción legal del embarazo (ILE) antes de la 22 semanas de gestación por defectos congénitos.
3. Las limitaciones de las exploraciones ecográficas en el seguimiento.
4. La necesidad, en ocasiones, de una prueba invasiva con riesgo de pérdida fetal para el diagnóstico.
5. Las limitaciones de los estudios genéticos.

El asesoramiento genético debe ser siempre “no directivo”, y la gestante debe disponer de toda la información que le permita elegir libremente entre las opciones disponibles dadas las implicaciones sociales, éticas y legales asociadas a este diagnóstico. Es un proceso que debe basarse en los principios bioéticos de Autonomía, Beneficencia, No Maleficencia y Justicia, para resolver los problemas que pudieran surgir en el manejo de las gestantes y dar una asistencia de calidad.

Este proceso de asesoramiento consta principalmente de dos fases:

#### 1.3.1. Asesoramiento genético pre-test

Durante la consulta de asesoramiento pre-test se realiza la valoración clínica individual, la anamnesis y un árbol genealógico que recoge todos los antecedentes personales y familiares de ambos progenitores. Se informa a la gestante de todas las opciones de diagnóstico y/o cribado con los beneficios, riesgos y limitaciones de cada una de ellas. Dada la ansiedad que

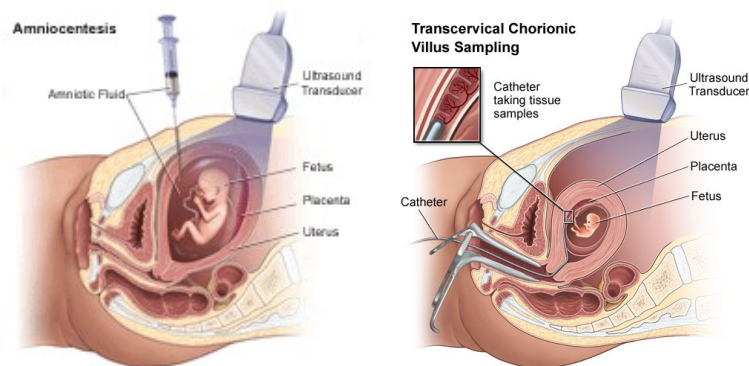
produce el diagnóstico prenatal en las gestantes en riesgo, se les informa del proceso completo que se seguirá hasta el diagnóstico incluyendo el tiempo que llevará cada estudio y los plazos en los que se les irá informando de los resultados.

Entre las opciones de las que se informa en esta consulta están:

- a) El seguimiento ecográfico, puesto que hay gestantes que no desean realizarse ningún tipo de test.
- b) El ADNf como opción no invasiva de cribado, esté o no disponible en el centro, puesto que hay gestantes que no desean realizarse ningún tipo de técnica invasiva con riesgo de pérdida fetal, y sólo desean otro cribado más sensible de las aneuploidías más frecuentes para prepararse para el posible nacimiento de un hijo afecto.
- c) Las técnicas invasivas obstétricas, que proporcionan la muestra fetal para realizar el diagnóstico genético. Estas técnicas tienen un riesgo de pérdida fetal del 0,1-1% (81,82) y, por tanto, han de ser llevadas a cabo por ecografistas expertos acreditados por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, la cual sigue los criterios de la Fundación de Medicina Fetal de Reino Unido ([www.fetalmedicine.com](http://www.fetalmedicine.com)). Las técnicas invasivas realizadas bajo control ecográfico son:
  - c1) La biopsia corial, realizada entre las 11-13,6 semanas de gestación, vía transcervical o transabdominal, para la obtención de muestra de vellosidad corial. Tiene como gran ventaja ser precoz permitiendo, por tanto, un diagnóstico temprano, además de proporcionar una elevada concentración de ADN fetal en la muestra para los estudios genéticos directos. Sin embargo, presenta como inconvenientes ser peor muestra para los cultivos celulares con más fallos de cultivo y obtención de cariotipos de baja resolución, la contaminación materna de la muestra, y que en un 2-3% de los casos da resultados de difícil interpretación debido a los mosaicismos placentarios que en ocasiones requieren de una segunda técnica invasiva para el diagnóstico final (83) (**figura 1.3**).
  - c2) La amniocentesis, realizada a partir de la 15 semana de gestación hasta el final del embarazo por punción transabdominal, para la obtención de muestra de líquido amniótico. Su desventaja es ser más tardía dando un resultado en el segundo trimestre de gestación, y tener una menor concentración de ADN fetal en la muestra para estudios genéticos directos. Su ventaja es ser mejor muestra para los cultivos celulares con muy pocos fallos de los mismos, presentar

contaminación materna en menos del 0,2% de los casos, y ser un reflejo más fiel del estado cromosómico fetal. Las células contenidas en el líquido amniótico son fundamentalmente fibroblastos fetales derivados de la piel, células epitelioides de la orina y amniocitos de la membranas ovulares y trofoblasto, lo que las convierte en la opción elegida para diagnóstico ante la aparición de un mosaicismo placentario tras biopsia corial (**figura 1.3**).

- c3) Cordocentesis o funiculocentesis, que se realiza a partir de la 20 semana de gestación. Esta técnica es actualmente muy poco utilizada puesto que tiene un riesgo de pérdida fetal y de complicaciones materno-fetales elevado (84). Se utilizó para la obtención de un cariotipo fetal rápido tras cultivo de 72 horas en sangre fetal ante los plazos legales de interrupción. En la actualidad sólo se utiliza para el estudio de algunos mosaicismos de líquido amniótico.



**Figura 1.3.** Esquema de amniocentesis y biopsia corial. Imágenes tomadas de: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/wellness-and-prevention/common-tests-during-pregnancy>

Durante la consulta de asesoramiento pre-test se explican los estudios a realizar con las muestras obtenidas:

- a) prueba rápida para el estudio de las aneuploidías más frecuentes de la que se informa en 24-48 horas.
- b) cariotipo fetal tras cultivo celular de la muestra, para confirmación del resultado de la prueba rápida o para diagnóstico de otras alteraciones menos comunes, con un tiempo medio para su obtención de 15-20 días.
- c) posibilidad de realización de otros estudios para descartar síndromes de microdelección como el MLPA y el array-CGH. Durante el periodo del estudio estas pruebas sólo se realizaban en las gestaciones con alto riesgo y en aquellas con

alteración ecográfica, siguiendo las recomendaciones de la Asociación Española de Diagnóstico Prenatal (AEDP), la Asociación Española de Genética Humana (AEGH) y la Sociedad Española de Genética Clínica y Dismorfología (SEGCD) (85). Sin embargo, actualmente, se realizan en todas las muestras obtenidas con independencia de sus riesgos e indicación, con el fin de descartar todos los síndromes posibles dado el tipo de muestra obtenida y la baja resolución de los cariotipos.

Tras toda la información recibida y contestadas todas las dudas a las gestantes se recoge el consentimiento informado de forma oral y escrita.

### **1.3.2. Asesoramiento genético post-test**

Tras la interpretación de los resultados y el diagnóstico, los progenitores deben ser informados de forma oral y escrita sobre el pronóstico fetal de forma objetiva y clara. Durante este proceso de comunicación se les dan todas las opciones informadas disponibles, así como el tiempo que necesiten para tomar su decisión, pero siempre teniendo en cuenta los plazos que marca la ley. La información debe ir siempre acompañada de una estimación de sus riesgos de recurrencia y, en caso necesario, de la necesidad de estudios familiares. Se les explica también de manera adaptada el origen de las anomalías cromosómicas intentando evitar el sentimiento de culpa que a veces surge y las indicaciones a seguir en futuros embarazos. En ocasiones, para la comprensión de la patología por la gestante y/o para el seguimiento del embarazo, se requiere de la intervención de varios especialistas en función de la cromosopatía y/o de las anomalías ecográficas. Por ello, los progenitores deben poder consultar sobre la posible evolución con cualquier otro especialista relacionado con la patología encontrada (ecografistas, obstetras, cardiólogos, pediatras, cirujanos, etc).

Ante un resultado de estudio genético normal, es importante que los progenitores entiendan que sólo han sido descartadas las cromosopatías estudiadas, no pudiéndose establecer el pronóstico para ninguna otra enfermedad, patología o defecto.

Las futuras opciones reproductivas de estas parejas dependen del tipo de cromosopatía encontrada aunque de forma general serían:

- a) En un embarazo en curso:
  - un ADNf para las aneuploidías más comunes
  - un diagnóstico prenatal invasivo.

- b) Técnicas de reproducción asistida:
  - Diagnóstico genético preimplantacional
  - Donación de gametos o embriones
- c) La adopción
- d) La asunción de un hijo afecto.



## 2. Hipótesis de trabajo



## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las características del cribado del ADN fetal libre circulante en sangre materna para la detección de las aneuploidías más frecuentes, hacen que sea la prueba más idónea en las gestaciones que tienen un cribado combinado de primer trimestre con riesgo intermedio ( $1/51-1/300$ ), y en aquellas que presentan algunos factores de riesgo más elevados de aneuploidía. Su introducción como prueba de cribado contingente en estos grupos de gestantes nos permitirá disminuir el número de pruebas invasivas, evitando por ello pérdidas fetales, y manteniendo la detección de las cromosopatías con grave repercusión en el fenotipo fetal.



## 3. Objetivos



### 3. OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluación de la efectividad de un nuevo protocolo de diagnóstico genético en la atención prenatal de las gestantes en riesgo de cromosomopatía, en el que se incluye el cribado de aneuploidías en el ADN fetal libre circulante en sangre materna como prueba contingente, comparándolo con el protocolo de atención anterior.

Objetivos Secundarios:

1. Establecer los grupos de riesgo de cromosomopatía dentro del cribado combinado de primer trimestre, para la introducción del cribado de aneuploidías en el ADN fetal circulante en sangre materna como prueba contingente.
2. Establecer otras indicaciones para la introducción del cribado de aneuploidías en el ADN fetal circulante en sangre materna como prueba contingente.
3. Analizar el efecto de la implementación del cribado de aneuploidías en el ADN fetal circulante en sangre materna como prueba contingente, en la reducción de pruebas invasivas.
4. Analizar el efecto de la introducción del cribado de aneuploidías en el ADN fetal circulante en sangre materna como test contingente, en las pruebas genéticas totales.
5. Analizar la satisfacción de la usuaria con el nuevo protocolo de atención prenatal.



## 4. Población y métodos



## 4. POBLACIÓN Y MÉTODOS

### 4.1. POBLACIÓN

El estudio consta de dos fases que corresponden a dos periodos diferentes.

#### 4.1.1. Fase 1: Estudio observacional retrospectivo

##### 4.1.1.1. Selección de la población a estudio

Se analizaron los resultados del CC1T y los resultados de los cariotipos prenatales y postnatales en una población de 12327 gestantes del Área Sanitaria 7 de la Comunidad de Madrid que acudieron al seguimiento de su embarazo al HCSC durante el periodo 2009-2014, ambos inclusive.

Los criterios de inclusión fueron:

- Las gestantes que se habían realizado ecografía y CC1T durante el periodo 2009-2014.
- Las gestantes que sin CC1T acudieron a la consulta de asesoramiento genético prenatal durante el periodo de octubre de 2013 a diciembre de 2014, ambos inclusive.

Los criterios de exclusión fueron:

- Las gestantes sin CC1T durante el periodo de 2009 a septiembre de 2013.
- Las gestantes que sin indicación de estudio genético habían presentado riesgo de alteración fetal por infección durante la gestación (toxoplasmosis, citomegalovirus, etc)
- Las pérdidas fetales espontáneas durante cualquier trimestre de la gestación.

##### 4.1.1.2. Datos registrados de las gestaciones seleccionadas

A1. Datos demográficos y clínicos relacionados con el CC1T:

- Edad materna al parto
- LCC en mm
- TN en milímetros (mm)

- Marcadores bioquímicos del CC1T
  - PAPP-A en múltiplos de la mediana (MoM)
  - F-βHCG en MoM
- Riesgo en el CC1T para T21
- Riesgo en el CC1T para T18

A2. Datos clínicos relacionados con las gestantes que acuden a la consulta de asesoramiento genético prenatal:

- Indicación clínica
- TN en percentiles 97,5 y 99 (p97,5, p99) ajustados a la edad gestacional siguiendo la escala de Borrell (87).
- Tipo de prueba invasiva
- Renuncia a prueba invasiva
- Resultados de prueba rápida con QF-PCR
- Resultados de cariotipo prenatal
- Resultados de MLPA y array-CGH
- Resultados de cariotipo postnatal
- Resultados de ADNf extraclínico (solicitado fuera del HCSC), del periodo de octubre de 2013 a diciembre de 2014

## **4.1.2. Fase 2: Estudio observacional prospectivo**

### **4.1.2.1. Selección de la población a estudio**

Se han seleccionado las 2386 gestantes del Área Sanitaria 7 de la Comunidad de Madrid que han acudido al seguimiento de su embarazo al HCSC desde octubre de 2015 hasta diciembre de 2016, ambos inclusive.

Los criterios de inclusión fueron:

- Las gestantes con ecografía y CC1T.

- Las gestantes que acudieron a la consulta de Genética

Los criterios de exclusión fueron:

- Las gestantes sin CC1T y sin indicación de estudio genético y/o asesoramiento.
- Las gestantes que, sin indicación de estudio genético, habían presentado riesgo de alteración fetal por infección durante la gestación (toxoplasmosis, citomegalovirus, etc)
- Las pérdidas fetales espontáneas durante cualquier trimestre de la gestación.

#### **4.1.2.2. Datos registrados de las gestaciones seleccionadas**

A1. Datos demográficos y clínicos relacionados con el CC1T:

- Edad materna al parto
- Origen
- LCC en mm
- TN en mm
- Marcadores bioquímicos del CC1T
  - PAPP-A en MoM
  - F- $\beta$ HCG en MoM
- Riesgo en el CC1T para T21
- Riesgo en el CC1T para T18

A2. Datos clínicos relacionados con las gestantes que acuden a la consulta de asesoramiento genético prenatal:

- Indicaciones clínicas.
- TN en percentiles 97,5 y 99 (p97,5, p99) ajustados a la edad gestacional siguiendo la escala de Borrell *et al.* (86).
- Tipo de prueba invasiva
- Renuncias a prueba invasiva y a ADNf

- Resultados de ADNf en el HCSC
- Resultados de ADNf extraclínico
- Resultados de prueba rápida con QF-PCR
- Resultados de cariotipo prenatal
- Resultados de MLPA y array-CGH
- Resultados de cariotipo postnatal
- Resultados al parto

Para valorar la efectividad del nuevo protocolo de atención prenatal y realizar la comparación entre este periodo con el anterior se eligió un periodo de 15 meses del retrospectivo y se comprobó que la muestra recogida para nuestra comparación era representativa de las 12327 gestantes con una confianza del 95% y una precisión absoluta del 3%.

#### **4.1.3. Criterios éticos y legales**

Todas las gestantes y/o progenitores o tutores legales fueron informadas de las características de las pruebas invasivas y de sus riesgos asociados, así como de todos los estudios genéticos que se podían realizar para su caso concreto, y se realizó el proceso de consentimiento informado oral y escrito tal y como lo requiere la Ley Básica que regula la Autonomía del Paciente y de Derecho y Obligaciones en materia de información y documentación clínica (Ley 41/2002, de 14 de noviembre, <https://www.boe.es/boe/dias/2002/11/15/>) y la ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007, <https://www.boe.es/boe/dias/2007/07/04/>). Todos los datos analizados han sido tratados de forma anonimizada. Todas las muestras obtenidas fueron eliminadas a los 3 meses de haber finalizado el embarazo.

Este trabajo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HCSC con el código interno 18/054-E\_Tesis. En el **anexo 1** se adjuntan los consentimientos y en el **anexo 2** la aprobación del Comité.

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Seguimiento clínico de las gestantes

El seguimiento clínico de las gestantes en ambas fases del estudio fue realizado por la Unidad Funcional Prenatal del HCSC que incluye al Servicio de Obstetricia y Ginecología, a la Sección de Cribado Prenatal y la Sección de Genética Clínica, Citogenética y Genética Molecular del Servicio de Análisis Clínicos.

**4.2.1.1. El Control Clínico** de la gestación fue llevado a cabo en las consultas de Obstetricia, desde donde todas las gestantes fueron remitidas para la realización de la ecografía de primer trimestre y CC1T en el mismo día, y en el caso de cumplir alguna indicación para asesoramiento genético, a la consulta de Diagnóstico Prenatal de la Sección de Genética Clínica.

**4.2.1.2. Los Seguimientos Ecográficos** fueron realizados en la Unidad de Ecografía Prenatal a lo largo de toda la gestación para el control y diagnóstico de patología fetal, y fueron realizados por ecografistas expertos acreditados siguiendo la guía de la Fundación de Medicina Fetal ([www.fetalmedicine.com](http://www.fetalmedicine.com)). Durante el primer trimestre la ecografía fue realizada entre las semanas 11-13,6 de gestación para medir la LCC y la TN, y descartar marcadores ecográficos mayores y menores de primer trimestre. Así mismo fueron realizados todos los controles ecográficos necesarios durante la gestación recomendados por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (21,66,67). Durante toda la gestación, cuando las gestantes cumplían criterios para asesoramiento genético, fueron remitidas a la consulta de Genética Clínica Prenatal.

**4.2.1.3. La Consulta de Cribado** se realizó en la sección de Cribado Prenatal donde las gestantes fueron informadas del CC1T antes de realizar dicha prueba. Aquellas gestantes con CC1T de riesgo para T21 y/o T18 fueron remitidas a la consulta de Genética Clínica Prenatal.

**4.2.1.4. El Asesoramiento Genético** fue realizado en la consulta de Diagnóstico Prenatal de la Sección de Genética Clínica mediante una consulta pre-test y otra post-test:

- A) Asesoramiento pre-test: en el que se realizó una historia clínica y árbol genealógico, se informó de los tipos de estudios prenatales, sus ventajas y sus limitaciones, y se valoró individualmente los riesgos/beneficios de las pruebas diagnósticas o de cribado

existentes en diagnóstico prenatal. Las gestantes aceptaron o rechazaron las pruebas mediante un proceso de consentimiento informado.

- B) Asesoramiento post-test: donde se informó a las gestantes de los resultados y se realizó asesoramiento reproductivo individual/familiar tanto oral como escrito.

#### **4.2.2. Pruebas y Estudios realizados**

**4.2.2.1.** Para el CC1T se extrajo una muestra de sangre periférica en la que se realizó un análisis bioquímico para medir los niveles en suero de la PAPP-A y de la f- $\beta$ HCG. El CC1T dio el riesgo individual para T21 y la T18 teniendo en cuenta la edad de la gestante en el momento del parto, y los marcadores bioquímicos y la TN ajustados a la edad gestacional. También se aplicaron otros datos demográficos de corrección que podían influir en el cálculo del riesgo como el peso, el hábito tabáquico y la diabetes. El programa informático utilizado para dicho cálculo fue el SsdwLab V. 5.0. © SBP Software CB. 33 (Gerona. España).

A las gestantes con embarazo múltiple durante el periodo prospectivo se les realizó la ecografía de primer trimestre pero no los marcadores bioquímicos ni el CC1T. A las gestantes que se encontraban de más de 14 semanas de gestación no se les realizó el CC1T.

**4.2.2.2. Las Técnicas Invasivas**, biopsia corial y amniocentesis, fueron realizadas en la Unidad de Ecografía Prenatal del HCSC por ecografistas expertos en Medicina Perinatal. Las biopsias coriales fueron realizadas vía transcervical entre las semanas 11-13,6 de gestación. Las amniocentesis fueron realizadas a partir de la 15 semana de gestación por punción transabdominal.

**4.2.2.3. Los Estudios Genéticos** se llevaron a cabo en muestras fetales de vellosidad corial y/o líquido amniótico obtenidas tras la prueba invasiva. En todos los estudios de vellosidad corial, y en aquellos de líquido amniótico en que fue necesario, se extrajo una muestra de sangre periférica de la gestante para descartar la contaminación materna de la muestra fetal. En aquellos casos en que se consideró necesario se obtuvo muestra de sangre periférica del padre y/o de los neonatos.

##### **4.2.2.3.1. Estudios realizados en la Sección de Genética Clínica, Citogenética y Genética Molecular del HCSC.**

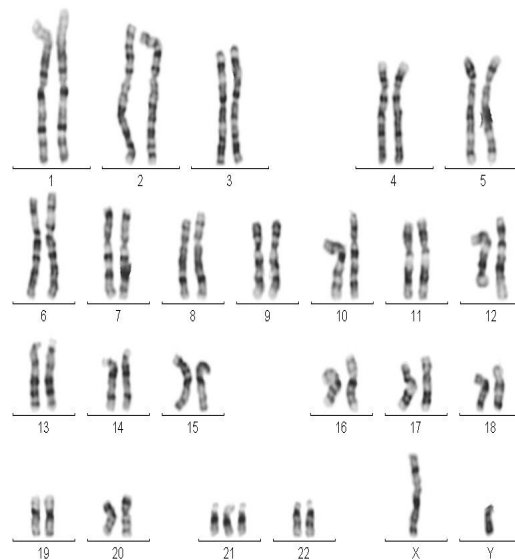
**A1. Estudios citogenéticos**, realizados tras cultivo celular de amniocitos/fibroblastos fetales del líquido amniótico, de las vellosidades coriales o de sangre periférica para la

obtención de cromosomas en metafase con los métodos, medios y sacrificios estándar para las diferentes muestras. Los estudios citogenéticos han sido:

a. Cariotipo, mediante técnica de bandeo cromosómico con bandas G para la identificación de los cromosomas metafásicos y estudio con microscopía óptica (*Nikon E-400, Izasa*) y captura de imágenes (*Ikaros, Izasa*). Este estudio fue realizado tanto en muestras fetales, como en muestras de sangre periférica bien de progenitores en riesgo de ser portadores de anomalías cromosómicas, bien de neonatos en los que la exploración clínica sugirió la presencia de un síndrome cromosómico.

Los neonatos sin fenotipo sindrómico u otro signo clínico en los que no fue necesario realizar un cariotipo fueron considerados normales.

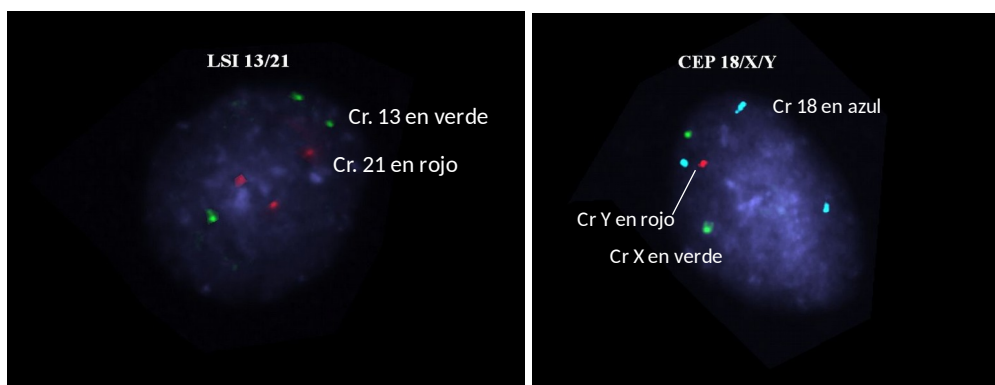
Las anomalías cromosómicas se clasificaron como desequilibradas y equilibradas. Se consideraron desequilibradas cuando podían tener repercusión sobre el fenotipo fetal e incluían tanto anomalías numéricas como estructurales. Las alteraciones desequilibradas consideradas comunes fueron la T21, T18, T13, ACSs y las triploidías. Las demás fueron consideradas poco comunes o raras. Las anomalías equilibradas heredadas de los progenitores y las variantes poblacionales sin repercusión en el fenotipo fetal no fueron consideradas en el estudio para la elaboración del protocolo y se han clasificado como cariotipo normal.



**Figura 4.1.** Cariotipo masculino con trisomía 21. Compatible con síndrome de Down

b. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH), realizada tras cultivo celular en cromosomas en metafase o en directo sobre núcleos interfásicos, mediante sondas de ADN marcadas con fluorocromos (Vysis, Abbot Molecular) que permitieron la identificación de regiones cromosómicas crípticas específicas en las muestras fetales en que fue necesario estudiar mosaicismos cromosómicos o reordenamientos crípticos.

Los cultivos celulares y los estudios fueron realizados siguiendo las recomendaciones y protocolos de la *European Cytogeneticists Association, Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance, ECA* (<https://www.e-c-a.eu/en/GUIDELINES.html>) (87) y las fórmulas cromosómicas han sido descritas de acuerdo al *International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2016)*.



**Figura 4.2.** FISH en interfases (núcleos) compatible con triploidía (69,XXY). 3 señales para las sondas de los cromosomas 21, 18 y 13; 2 señales para el cromosoma X y 1 para el cromosoma Y.

**A2. Estudios moleculares**, realizados tras la extracción de ADN fetal en líquido amniótico (*Magnapure, Roche*) o en vellosidad corial (*EZ1BioRobot, Qiagen*). Dichos estudios fueron:

a. La prueba para la detección rápida de las aneuploidías fetales más frecuentes que incluye las que afectan a los cromosomas 21, 13, 18, X e Y. Esta prueba se realizó mediante técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente o QF-PCR (*Quantitative Fluorescence-Polymerase Chain Reaction, Devyser Compact v3*). Este estudio se realizó en las muestras fetales obtenidas de todas las gestantes en riesgo de cromosopatía (**figura 4.3**).

b. Estudio de las regiones subtelo méricas y síndromes de microdelección mediante técnica de MLPA (*multiplex ligation dependent probe amplification techniques, SALSA P036, P070, P245, MRC Holland*). Este estudio se realizó en las muestras fetales de todas las gestantes consideradas de alto riesgo en el CC1T (>1/50) para T21 y/o T18 y en aquellas con TN en p99

que se realizaron prueba invasiva, tras un resultado de QF-PCR para las aneuploidías fetales más frecuentes normal, con el fin de descartar reordenamientos cromosómicos crípticos.

Las técnicas utilizadas para los estudios moleculares, así como su capacidad para detectar alteraciones y los informes realizados, fueron validadas siguiendo el control de calidad externo EMQN (*European Molecular Genetics Quality Network*, <http://www.emqn.org>).

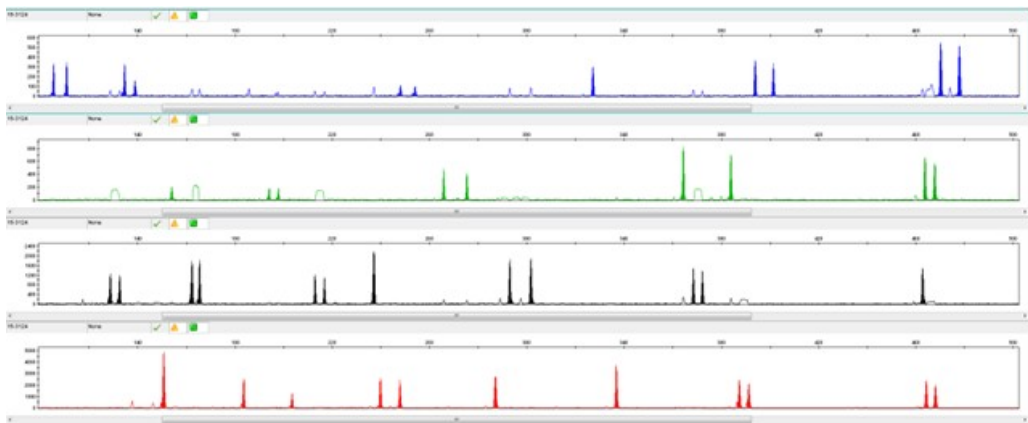


Figura 4.3. Resultado de QF-PCR de varón normal para los cromosomas 21, 18 y 13.

#### 4.2.2.3.2. Estudios enviados a otras unidades o laboratorios de Genética distintos de la Sección de Genética Clínica del HCSC.

**A1. Estudios de array-CGH**, para la detección de CNVs asociadas a síndromes clínicos, con una resolución de 60.000 oligonucleótidos (60K) distribuidos a lo largo del genoma con una resolución de 250Kb que es la recomendada para el estudio prenatal (KaryoNIM®60Kprenatal, *NimGenetics*). Se realizaron en la muestras fetales de todas aquellas gestantes que se realizaron prueba invasiva por alteraciones ecográficas de 2º trimestre ante la presencia de un resultado de QF-PCR para las aneuploidías fetales más frecuentes normal.

**A2. Cribado de aneuploidías fetales en el ADNf libre** circulante en sangre materna, para la T21, T18 y T13 se realizó en dos laboratorios externos a partir de muestra de plasma materno, mediante técnica de secuenciación masiva de genoma completo del ADNf circulante en sangre materna (test NACE, *Igenomix*; test TRISONIM, *NimGenetics*). Ambos laboratorios realizan los estudios en España mejorando así la estabilidad y trazabilidad de la muestra y utilizan algoritmos bioinformáticos patentados internacionalmente para el cálculo de riesgo de T13, T18 y T21 con tasas de sensibilidad y especificidad muy elevadas. Los estudios se han enviado alternando sucesivamente los laboratorios externos sin contemplar el tipo de indicación para el mismo. Las muestras de sangre periférica de las gestantes se extrajeron en

tubos especiales (tubos *Streck*) y se enviaron para su estudio el mismo día de la consulta de genética. Las gestantes en las que se indicó este estudio se encuentran en el apartado 3.3.3.

#### **4.2.2.3.3. Pruebas genéticas prenatales**

Como parte de la valoración del nuevo protocolo prenatal se consideraron como pruebas genéticas prenatales:

- El ADNf, solicitado en el HCSC o fuera del mismo (extraclínico).
- La pruebas invasivas, incluyendo en ellas la realización de la técnica invasiva y todos los estudios genéticos de las muestras obtenidas.

### **4.2.3. Indicaciones a la consulta de Asesoramiento Prenatal**

#### **4.2.3.1. Indicaciones a prueba invasiva**

En ambas fases del estudio las gestantes que cumplían alguna de las indicaciones que se enumeran a continuación fueron remitidas a la consulta de Genética Prenatal y se les dio asesoramiento ofreciéndose una prueba invasiva en función de la semana de gestación y las características clínicas de cada gestante.

##### A. Cribado Combinado de Primer Trimestre (CC1T) de riesgo

Las gestantes con un riesgo en el CC1T mayor o igual a 1/300 para T21 y/o T18 fueron consideradas en riesgo de aneuploidía:

- Las gestantes con un riesgo mayor o igual a 1/50 fueron consideradas de alto riesgo.
- Las gestantes con un riesgo entre 1/51-1/300 fueron consideradas de riesgo intermedio.

Las gestantes con un riesgo en el CC1T menor de 1/300 para T21 y T18 fueron consideradas con bajo riesgo de aneuploidía.

##### B. Edad Materna Avanzada (EMA)

Durante la fase 1 retrospectiva del estudio todas las gestantes con edad mayor o igual a 35 años fueron remitidas a la consulta de asesoramiento tuvieron o no CC1T y con independencia del resultado del mismo.

Durante la fase 2 prospectiva del estudio se realizó un cambio en el protocolo de atención prenatal y sólo fueron remitidas a la consulta las gestantes con edad mayor o igual a 35 años en las que no se realizó CC1T, lo que incluye las gestantes con embarazo gemelar con ovocitos propios. Las gestantes con esta edad, que a pesar de tener un CC1T de bajo riesgo solicitaron acudir a la consulta, fueron consideradas en la indicación a petición propia.

#### C. Anomalías Ecográficas

Todas las anomalías ecográficas, en cualquier trimestre de la gestación, fueron remitidas a consulta, y se clasificaron, en alteraciones del primero, segundo o tercer trimestre, según la etapa de la gestación en la que se diagnosticaron. La TN, principal marcador de riesgo de cromosopatía en el primer trimestre de gestación, fue tratada en los diferentes grupos de riesgo del CC1T en percentiles según la escala de Borrell (88). Se consideró criterio de técnica invasiva aquellas gestantes que presentaban una TN mayor o igual a p99 con una medida de 3,5 mm o superior, independientemente del resultado del CC1T. Las gestantes que tuvieron una TN mayor o igual a p99 sin otra anomalía ecográfica fueron clasificadas en los distintos grupos de riesgo en el CC1T, y aquellas sin cribado se clasificaron como anomalías ecográficas del primer trimestre. La TN en p97,5 no se consideró anomalía ecográfica de primer trimestre y se clasificó en los distintos grupos del CC1T o entre las gestantes sin cribado. Todas las demás alteraciones ecográficas mayores, acompañadas o no de una TN patológica, o la presencia de dos o más marcadores menores que sugirieran riesgo de alteración cromosómica o genética fetal fueron consideradas indicación de prueba invasiva en cualquier trimestre de la gestación con independencia del resultado en el CC1T y clasificadas como alteración ecográfica.

#### D. Antecedentes personales y/o familiares de cromosopatía o enfermedad de origen genético

Todas las gestantes con antecedentes personales o familiares de cromosopatía, así como aquellas que tenían una enfermedad genética familiar conocida, fueron derivadas a la consulta de Genética Clínica Prenatal.

#### E. A petición propia / Ansiedad Materna

Fueron consideradas dentro de este grupo las gestantes que, sin indicación clínica, solicitaron acudir a la consulta de asesoramiento.

#### **4.2.3.2. Indicaciones a ADNf en el HCSC**

Durante la fase 2 o estudio prospectivo se introdujo de manera gradual el ADNf en diferentes grupos de gestantes en riesgo de cromosomopatía como consecuencia de los resultados obtenidos en la fase 1 o estudio retrospectivo. Además, se incluyeron otras indicaciones al ADNf basadas en criterios clínicos.

Por tanto a las gestantes que cumplieron alguna de las siguientes indicaciones, se les ofreció durante la fase 2 o estudio prospectivo, el ADNf como alternativa al diagnóstico prenatal invasivo, siempre que no existiese una alteración ecográfica mayor o una TN >3,5 mm:

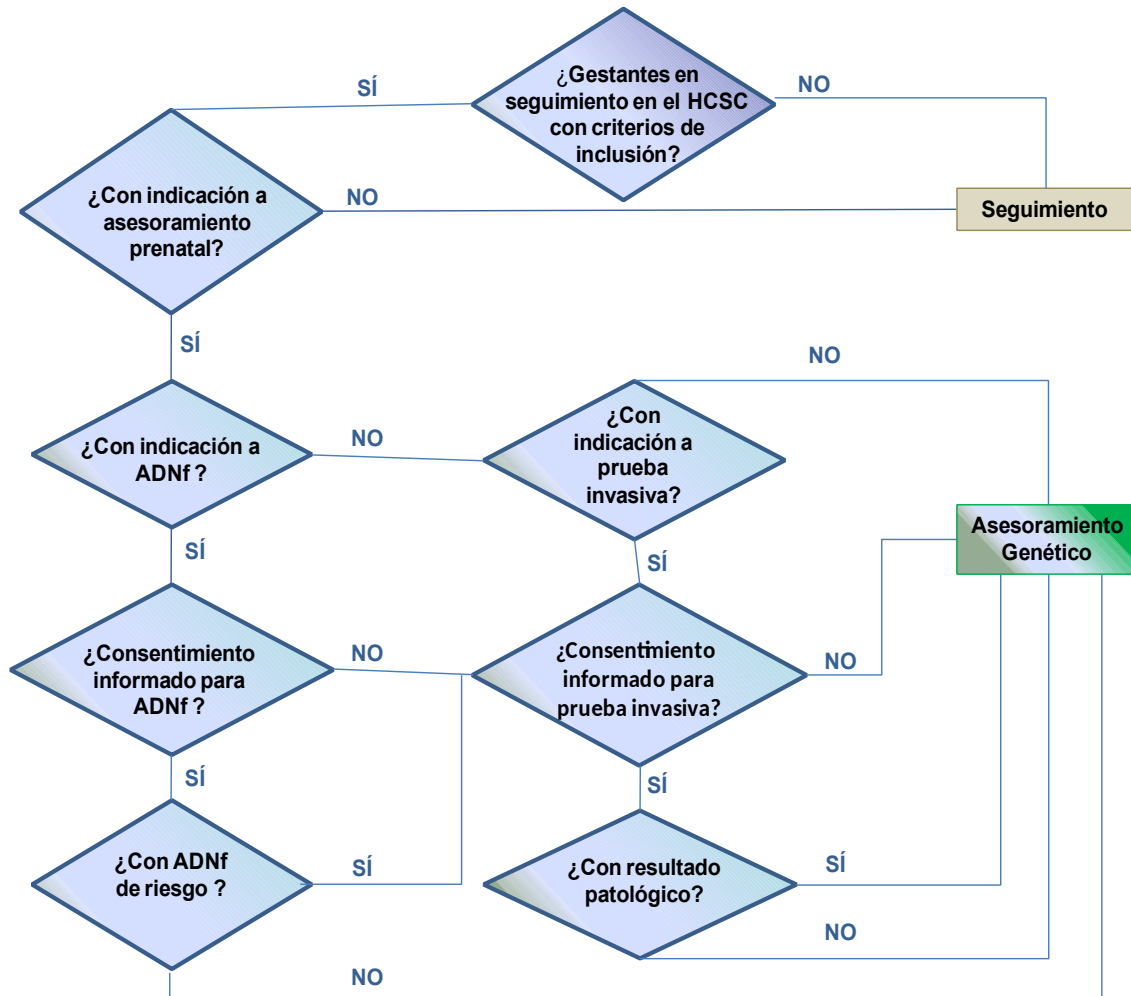
- a) Riesgo intermedio (1/51-1/300) para T21 y/o T18 en el CC1T.
- b) Antecedente personal de feto anterior con aneuploidía.
- c) Progenitores portadores de una translocación robertsoniana que afectara a los cromosomas 13 y/o 21.
- d) Embarazos múltiples (gemelares) en gestantes con EMA ( $\geq 35$  años) en las que la gestación se ha producido con ovocitos propios y en ausencia de gemelo evanescente.
- e) Contraindicación a prueba prenatal invasiva.
- f) TN mayor o igual a p97,5 (pero  $< 3,5$  mm) con CC1T de bajo riesgo para T21 y/o T18 ( $< 1/300$ ).
- g) Embarazos únicos con EMA ( $\geq 35$  años) sin CC1T.

Las dos últimas indicaciones (f, g) fueron incluidas en el protocolo a partir de enero de 2016.

A todas las gestantes con un resultado de ADNf de riesgo alto de aneuploidía se les ofreció una prueba invasiva para confirmación y diagnóstico fetal.

Las gestantes candidatas al ADNf en las que posteriormente se evidenció una anomalía ecográfica del segundo o tercer trimestre fueron clasificadas por su indicación al ADNf en el primer trimestre.

La **figura 4.4** muestra el protocolo prenatal durante la fase prospectiva del estudio.



**Figura 4.4.** Diagrama de flujo del protocolo de atención prenatal en la fase 2 o estudio prospectivo.

#### 4.2.4. Herramientas bioinformáticas en asesoramiento genético

ECA: <https://www.e-c-a.eu/en/GUIDELINES.html>

EMQN: <http://www.emqn.org>

ECARUCA: <http://ecaruca.radboudumc.nl:8080/ecaruca/>

DECIPHER: <https://decipher.sanger.ac.uk/>

DGV: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>

ClinVar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

GeneReviews: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Orphanet: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>

MRC-Holland: <http://www.mlpa.com>

HGMD professional: <https://portal.biobase-international.com>

#### **4.2.5. Encuesta de calidad percibida**

La encuesta fue diseñada por la Unidad de Calidad del HCSC con el fin de evaluar la satisfacción de las gestantes con el nuevo protocolo y la atención recibida. Se adjunta la encuesta en el **anexo 3**.

Fue realizada en la Sección de Genética Clínica y ofrecida a todas las gestantes que se atendieron con el nuevo protocolo de atención prenatal. La encuesta fue entregada al finalizar todos los estudios y las gestantes la realizaron de manera anónima y voluntaria.

#### **4.2.6. Análisis estadístico**

El análisis descriptivo de los datos se realizó mediante frecuencias absolutas y porcentajes en el caso de que las variables fueran cualitativas. En el caso de variables cuantitativas, se expresaron los resultados en forma de media y desviación estándar en el caso de que se distribuyeran con normalidad; y en caso contrario se expresaron con mediana y rango intercuartílico. Se calcularon los intervalos de confianza del 95% en las proporciones que se quieren comparar. Se utilizaron los test estadísticos Chi cuadrado o Fisher para la comparación de muestras independientes con variables cualitativas. Se usó el test T-Student o ANOVA en el caso de variables cuantitativas distribuidas con normalidad cuando se quería comparar entre dos grupos o entre más de dos grupos respectivamente. Si la variable cuantitativa no se distribuyó de manera normal, se usó el test de Mann-Whitney o el de Kruskal-Wallis en función del número de grupos como el caso anterior. En todos los test estadísticos se consideró un nivel de significación de 0,05. El análisis se ha realizado mediante el software estadístico IBM SPSS Statistics v21 y el programa R.

# 5. Resultados



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Resultados del estudio observacional retrospectivo realizado en la fase 1.

Este estudio se llevó a cabo con el fin de establecer las bases de un nuevo protocolo de atención prenatal e introducir en el mismo el cribado no invasivo de aneuploidías fetales o ADNf libre mediante el estudio del ADN fetal circulante en sangre materna como test contingente.

#### 5.1.1. Características de la población a estudio

Durante el periodo 2009-2014 acudieron al HCSC un total de 12327 gestantes a las que se les realizó un CC1T durante el control de su embarazo. Los datos demográficos de las gestantes atendidas y los datos clínicos relacionados con la gestación para la realización del CC1T se encuentran en la **tabla 5.1**. Dichos datos han sido estratificados por riesgos de de aneuploidía, de manera que se pueda observar la influencia de la edad materna, la medida de la TN y la concentración de PAPP-A en los resultados del CC1T. En aquellas gestantes en las que existía riesgo para ambas trisomías (T21, T18) se ha utilizado el mayor de ellos para la estratificación.

Gestantes con *CC1T N = 12327	Riesgo $\geq$ 1/50 N = 147	Riesgo 1/51-1/300 N = 386	Riesgo < 1/300 N = 11794	p valor inter- grupos
<b>Demográficos</b>				
Edad materna al parto	36,3 $\pm$ 4,7	36,9 $\pm$ 4,4	31,1 $\pm$ 5,4	<0,001
<b>Origen</b>				
Caucásicas	108 (73,5)	275 (71,2)	7587 (64,3)	
Afrocaribeñas	2 (1,4)	5 (1,3)	516 (4,4)	
Asiáticas	1 (0,7)	9 (2,3)	410 (3,5)	
Árabes	4 (2,7)	9 (2,3)	304 (2,6)	
Sudamericanas	30 (20,4)	79 (20,5)	2769 (23,5)	
Otras	2 (1,4)	9 (2,3)	208 (1,8)	
<b>Clínicos</b>				
<sup>‡</sup> LCC (mm)	57,6 $\pm$ 8,8	61,6 $\pm$ 8,3	60,4 $\pm$ 8,1	<0,001
<sup>†</sup> TN (mm)	3,5 $\pm$ 2	1,5 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,3	<0,001
<sup>‡</sup> f- $\beta$ HCG (MoM)	1,4 $\pm$ 1,3	1,3 $\pm$ 1,2	1,2 $\pm$ 0,9	0,061
<sup>§</sup> PAPP-A (MoM)	0,6 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,7	<0,001

**Tabla 5.1. Datos demográficos y clínicos de las gestantes estratificados por riesgos en el cribado combinado.** Los datos se dan en frecuencias y porcentajes (%) para las variables cualitativas, y en media y desviación estandar para las variables cuantitativas con distribución simétrica. \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; <sup>‡</sup>LCC (mm): longitud cráneo caudal en milímetros; <sup>†</sup>TN (mm): translucencia nucal en milímetros; <sup>‡</sup>f- $\beta$ HCG (MoM): fracción  $\beta$  libre de la gonadotropina coriónica humana en múltiplos de la mediana; <sup>§</sup>PAPP-A (MoM): proteína plasmática A en múltiplos de la mediana.

Durante este periodo, 4153 (34%) gestantes con CC1T fueron atendidas en la consulta de asesoramiento genético prenatal, y en 3423 (82%) de ellas la indicación fue solamente la EMA y representan el 28% de las gestantes que se hicieron un CC1T en este periodo. El 12% (401/3423) de estas gestantes se realizó una prueba invasiva, mientras que el 88% (3022/3423) de ellas renunció a dichas pruebas. El 42% (401/954) de las pruebas invasivas realizadas en este periodo fueron en gestantes con EMA y CC1T de bajo riesgo.

Un 4,3 % de todas las gestantes con CC1T (533/12327) tuvieron un riesgo  $\geq 1/300$  en el CC1T y representan el 13% de las gestantes remitidas a la consulta de asesoramiento genético. El 67% (356) de ellas se realizó una prueba invasiva, mientras que el 33% (177) renunció a las misma. El 37% (356/954) de las pruebas invasivas realizadas fueron en gestantes con riesgo en el CC1T.

El porcentaje global de renuncias a prueba invasiva de las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento prenatal fue del 77% (3199 gestantes).

La **figura 5.1** muestra la distribución de las gestantes que fueron atendidas en la consulta de asesoramiento genético prenatal.

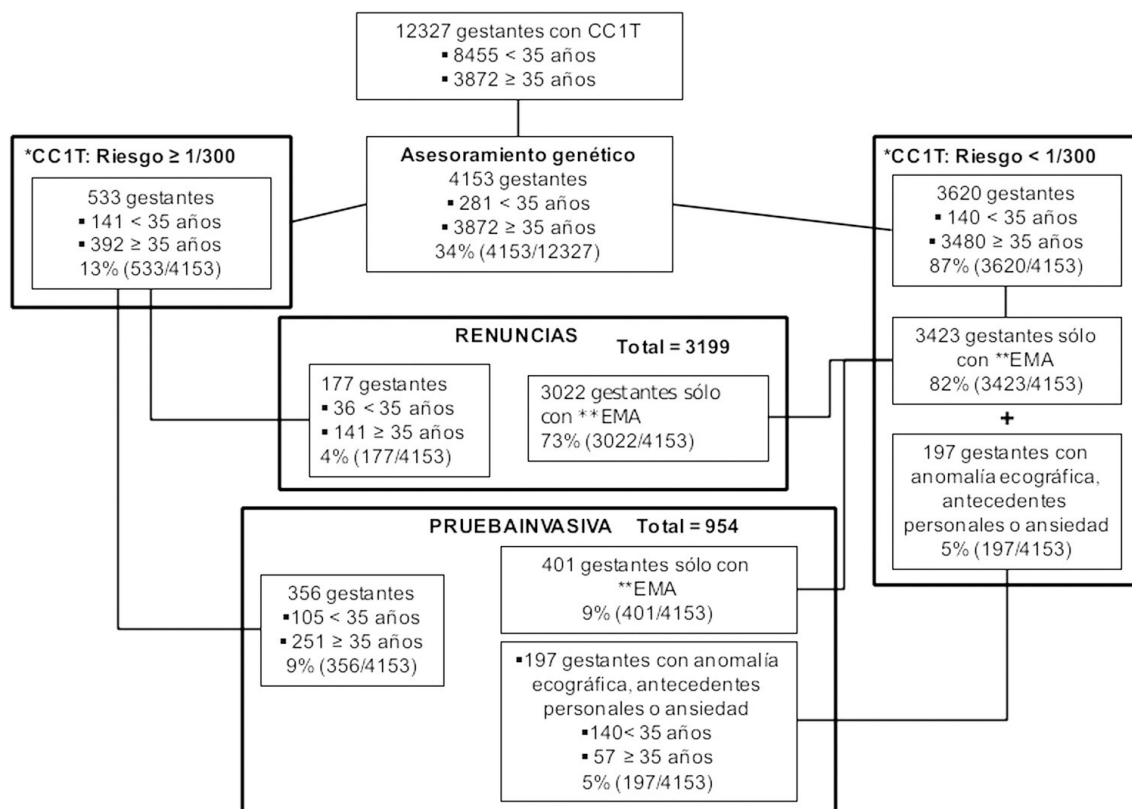


Figura 5.1. Distribución de las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento prenatal. \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre. \*\*EMA: edad materna avanzada.

### 5.1.2. CC1T y resultados de cariotipo

Durante este periodo se realizaron 954 pruebas invasivas, 124 biopsias coriales y 830 amniocentesis. El resultado de los cariotipos fue normal o equilibrado en 878 (92%) de los estudios citogenéticos prenatales realizados. Hubo un total de 81 cariotipos desequilibrados, 76 prenatales y 5 postnatales, lo que supone una prevalencia de anomalías cromosómicas en nuestra cohorte del 0,7%. El 12,9% de las 533 gestaciones con un CC1T de riesgo tuvieron un cariotipo desequilibrado.

Para decidir qué puntos de corte de riesgo en el CC1T eran los más adecuados para la implementación del ADNf para la detección de T21, T18 y trisomía 13 (T13) como opción alternativa a un diagnóstico prenatal invasivo, se analizaron los resultados de los cariotipos prenatales y postnatales clasificándolos en tres grupos:

- Gestantes con riesgo en el CC1T sólo para T21.
- Gestantes con riesgo en el CC1T sólo para T18.
- Gestantes con riesgo en el CC1T para ambas trisomías (T21-T18).

Y a su vez, subclasificándolos en riesgo alto ( $\geq 1/50$ ), intermedio ( $1/51-1/300$ ) y bajo ( $< 1/300$ ) en el CC1T. Los resultados se muestran en la **tabla 5.2**.

En nuestra cohorte de 12327 gestantes, el 1,2% tuvieron un CC1T de riesgo alto, el 3,1% tuvieron un riesgo intermedio y el 95,7% un CC1T de riesgo bajo.

La sensibilidad del CC1T para T21 y T18 fue del 88,5% con una tasa de falsos positivos del 4%. La sensibilidad sólo para T21 fue del 83,3% con una tasa de falsos positivos del 2,3%. El VPP fue del 10,1% para ambas trisomías y del 10,9% sólo para T21. El VPN fue el 99,9% tanto para ambas trisomías como para solamente la T21.

El 80,2% (65 de 81) de los cariotipos desequilibrados de nuestra cohorte son T21, T18 y T13. Los 19 casos de T18 y los 4 de T13 tuvieron un CC1T de riesgo ( $R \geq 1/300$ ). De los 42 casos de T21, 39 se detectaron prenatalmente, 35 de ellos por CC1T de riesgo, 3 por anomalías ecográficas y 1 por EMA.

En los 16 cariotipos patológicos restantes se encontraron un 8,65% (7/81) de aneuploidías de los cromosomas sexuales (ACSs) incluida la monosomía del X, un 8,65% (7/81) de anomalías cromosómicas poco comunes o raras y un 2,5% (2/81) de triploidías.

†CC1T										
Grupos de riesgo en el CC1T	Riesgo para ambas T21-T18				Riesgo sólo para T21		Riesgo sólo para T18		Riesgo bajo	Total
	‡RA-T21		§RI-T21		RA-T21	RI-T21	¶RB-T21		RB-T21	
	††RA-T18	††RI-T18	RA-T18	RI-T18	§§RB-T18		RA-T18	RI-T18	RB-T18	
Gestantes en cada grupo de riesgo	6	20	2	28	92	173	27	185	11794	12327
Pruebas invasivas	6	20	1	19	81	108	18	103	598	954
Cariotipos equilibrados	0	5	1	18	49	105	12	99	589	878
Cariotipos desequilibrados	6	15	0	1	33	3	6	5	12	81
Trisomía 21	-	6	-	1	<sup>a</sup> 26	2	-	-	<sup>g</sup> 7	42
Trisomía 18	6	6	-	-	-	-	6	<sup>e</sup> 1	-	19
Trisomía 13	-	3	-	-	-	-	-	1	-	4
Monosomía X	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
Triploidía	-	-	-	-	1	-	-	1	-	2
Aneuploidías sexuales	-	-	-	-	<sup>b</sup> 1	<sup>d</sup> 1	-	<sup>f</sup> 2	<sup>h</sup> 1	5
Anomalías cromosómicas poco comunes	-	-	-	-	<sup>c</sup> 3	-	-	-	<sup>i</sup> 4	7
Ratio cariotipos desequilibrados /gestantes en cada grupo de riesgo	<b>1:1</b>	<b>1:1,3</b>	<b>0:2</b>	<b>1:28</b>	<b>1:3</b>	<b>1:58</b>	<b>1:4.5</b>	<b>1:37</b>	<b>1:983</b>	<b>1:152</b>

**Tabla 5.2. Resultados de los cariotipos realizados durante el periodo 2009-2014 clasificados por grupos de riesgo en el CC1T.**†CC1T: Cribado combinado de primer trimestre. ‡ RA-T21: Riesgo Alto para T21 ( $\geq 1/50$ ); §RI-T21: Riesgo intermedio para T21 ( $1/51-1/300$ ); ¶RB-T21: Riesgo Bajo para T21 ( $< 1/300$ ); ††RA-T18: Riesgo Alto para T18 ( $\geq 1/50$ ); ††RI-T18: Riesgo Intermedio para T18 ( $1/51-1/300$ ); §§RB-T18: Riesgo Bajo para T18 ( $< 1/300$ ). <sup>a</sup>25 cariotipos prenatales y 1 postnatal; <sup>b</sup>1 mosaico de trisomía XXY/XY; <sup>c</sup>1 mosaico de Trisomía 22, 1 duplicación parcial de 5q; 1 trisomía parcial 14q con monosomía parcial 17q; <sup>d</sup>1 trisomía XXX; <sup>e</sup>Cariotipo postnatal; <sup>f</sup>1 trisomía XYY y 1 monosomía X en mosaico; <sup>g</sup>4 Cariotipos prenatales y 3 postnatales; <sup>h</sup>1 trisomía XXY; <sup>i</sup>1 Tetraploidía en mosaico, 1 mosaicismo de trisomía 20, 1 delección 13q en mosaico y 1 cromosoma marcador derivado del 15.

De los 81 cariotipos patológicos, 73 tenían grave repercusión sobre el fenotipo fetal: 42 T21, 19 T18, 4 T13, 2 45,X, 2 triploidías y 4 anomalías autosómicas raras que incluyen un mosaico de trisomía 22, una duplicación 5q, una trisomía parcial 14q con monosomía parcial 17q y una delección de 13q en mosaico. Todas las anomalías cromosómicas distintas de la T21, T18 y T13 con grave repercusión sobre el fenotipo fetal tuvieron un riesgo alto ( $R \geq 1/50$ ) en el CC1T, con excepción de una triploidía y la delección en mosaico del 13q que fueron detectadas ecográficamente en el 2º trimestre de gestación.

El ratio de cariotipos desequilibrados fue de 1/28 en las gestaciones con riesgo intermedio (1/51-1/300) para ambas trisomías, 1/58 en las gestaciones con riesgo intermedio sólo para T21 y 1/37 en las gestaciones con riesgo intermedio sólo para T18.

Los estudios complementarios realizados mediante técnica de MLPA o array-CGH, tras QF-PCR con resultado normal, en todas las gestaciones que tuvieron un riesgo alto ( $R \geq 1/50$ ) en el CC1T y en aquellas con anomalías ecográficas, fueron normales.

Con el fin de valorar otros puntos de corte en el CC1T, diferentes a los que estaban establecidos en el protocolo de atención prenatal retrospectivo, para la implementación del ADNf, se analizaron los resultados de los cariotipos prenatales y postnatales en varios tramos de riesgo. En aquellos casos en que las gestantes tenían riesgo alto o intermedio en el CC1T para ambas trisomías se utilizó el mayor de los riesgos para estratificar los resultados de los cariotipos. La **tabla 5.3** muestra dichos resultados.

Riesgos en el <sup>†</sup> CC1T	Trisomía 21 N = 42 (%)	Trisomía 18 N = 19 (%)	Otros cariotipos desequilibrados N = 20 (%)	Total desequilibrados/ Total gestantes en cada grupo
R $\geq 1/10$	27 (64,3)	13 (68,4)	9 (45)	49/86
R $\geq 1/50$	32 (76,2)	18 (94,7)	10 (50)	60/147
R 1/11-1/50	5 (11,9)	5 (26,3)	*1 (5)	11/150
R 1/11-1/300	8 (19)	6 (31,6)	6 (30)	20/447
R 1/51-1/300	3 (7,1)	1 (5,3)	5 (25)	9/386
R 1/301-1/1000	2 (4,8)	-	2 (10)	4/1048
R 1/1001-1/2000	3 (7,1)	-	1 (5)	4/1215
R 1/2001-1/3000	1 (2,4)	-	-	1/926
R 1/3001-1/6000	1 (2,4)	-	1 (5)	2/2130
R < 1/6000	-	-	1 (5)	1/6475

**Tabla 5.3. Distribución de los 81 cariotipos desequilibrados prenatales y postnatales en función de los riesgos en el CC1T.** <sup>†</sup>CC1T: cribado combinado de primer trimestre. \*Trisomía 13.

En la **tabla 5.3** se observa que de los 81 cariotipos desequilibrados, el 60% (49/81) se detectaron con un riesgo en el CC1T mayor o igual a 1/10 y el 74% (60/81) de ellos cuando el riesgo en el CC1T era mayor o igual a 1/50. En nuestra cohorte el 11,6% (1434/12327) de las gestantes tienen un riesgo en el CC1T entre 1/51- 1/1000 y el 12,1% entre 1/11-1/1000.

El 97,7% de los cariotipos de nuestro grupo de riesgo intermedio (1/51-1/300) fueron normales. En este grupo de riesgo intermedio hay 9 cariotipos desequilibrados (9/386): 3 T21, 1 T18, 1 T13, 1 triploidía y 3 aneuploidías de los cromosomas sexuales.

El 25% (5/20) de las anomalías cromosómicas distintas de la T21 y T18 se encontraron en el grupo de riesgo bajo en el CC1T. Estas anomalías pueden verse en la **tabla 5.2**. El marcador cromosómico derivado del cromosoma 15 fue de origen materno y no tenía repercusión clínica. El mosaicismo de trisomía 20 hallado en amniocentesis fue un recién nacido normal. El mosaicismo de tetraploidía fue diagnosticado en muestra de vellosidad corial y la gestante rechazó la amniocentesis para descartar la anomalía cromosómica a pesar de la ecografía normal y fue a interrupción de embarazo. La delección 13q en mosaico se diagnosticó, tras amniocentesis, por malformación Dandy-Walker en la ecografía del segundo trimestre. La última anomalía cromosómica de este grupo es una aneuploidía de los cromosomas sexuales (47,XXY). El resto de los cariotipos desequilibrados del grupo de riesgo bajo son los 7 falsos negativos para T21 en el CC1T.

### 5.1.3. Falsos negativos del CC1T para T21

Durante el periodo 2009-2014 hubo 7 casos que fueron falsos negativos para T21 en el CC1T y que se muestran en la **tabla 5.4**.

Caso	Riesgo para trisomía 21 <sup>1</sup> CC1T	Edad materna al parto	<sup>2</sup> TN mm (percentil)	Indicación para asesoramiento
1	1/445	28	3,1 (p97,5)	TN > 3 mm
2	1/1167	39	1,5 (p5)	Cardiopatía 2º trimestre
3	1/1273	28	1,8 (p75)	Cardiopatía 2º trimestre
4	1/1626	38	1 (p10)	<sup>3</sup> EMA
5	1/882	30	2,9 (p97,5)	*
6	1/2687	24	1,9 (p75)	*
7	1/5116	30	1 (p10)	*

**Tabla 5.4. Falsos negativos en el CC1T para T21.** <sup>1</sup>CC1T: Cribado combinado de primer trimestre; <sup>2</sup>TN en milímetros (percentiles) en función de la LCC (Borrell et al., 2006) (88); <sup>3</sup>EMA: Edad materna avanzada; \*Neonatos.

De los 7 casos, cuatro fueron diagnosticados prenatalmente, mientras que los tres restantes se diagnosticaron al nacimiento. Sólo dos de las gestantes tenían más de 35 años.

Hay dos casos (números 1 y 5) que tenían un riesgo en el CC1T entre 1/301-1/1000, y ambos, tenían una medida de TN en el p 97,5.

#### 5.1.4. TN en percentil $\geq 97,5$ , riesgo en el CC1T para T21 y resultados de cariotipo.

Hay un total de 177 gestaciones con una TN mayor o igual al p 97,5, y de ellas, 38 tenían riesgo bajo para T21 en el CC1T (21 casos, grupo A + 17 casos, grupo B; **tabla 5.5**). En 33 de estas gestantes la edad materna era menor de 35 años. En las 35 gestaciones con TN entre los percentiles 97,5 y 99 solamente se detectaron 3 casos de T21 (3/35, 8,5%) y 2 de ellos son falsos negativos del CC1T (casos 1 y 5 de la **tabla 5.4**). En las gestaciones con TN mayor o igual al p97,5 y riesgo intermedio en el CC1T para T21 no se detectaron otras anomalías cromosómicas diferentes a la T21. De los 142 fetos con TN mayor o igual al p99 (Grupo B, **tabla 5.5**), 17 tuvieron riesgo bajo para T21 en el CC1T y cariotipos normales, y en 14 de ellas la medida de la TN fue menor de 3,5 mm.

<sup>†</sup> TN	<sup>‡</sup> CC1T	Edad	Trisomía 21	Otros cariotipos desequilibrados	Cariotipo normal	Total
Grupo A P97,5-p99 n = 35	<sup>§</sup> RA-T21	<35	-	-	-	1
		$\geq 35$	1	-	-	
	<sup>¶</sup> RI-T21	<35	-	-	5	13
		$\geq 35$	-	-	8	
	<sup>**</sup> RB-T21	<35	<sup>a</sup> 2	-	14	21
		$\geq 35$	-	-	5	
Grupo B TN $\geq$ p99 n = 142	RA-T21	<35	8	4	27	102
		$\geq 35$	21	17	25	
	RI-T21	<35	1	-	12	23
		$\geq 35$	-	-	10	
	RB-T21	<35	-	-	<sup>b</sup> 17	17
		$\geq 35$	-	-	-	
<b>Total</b>			<b>33</b>	<b>21</b>	<b>123</b>	<b>177</b>

**Tabla 5.5. Translucencia nucal  $\geq$  al percentil 97,5, riesgo en el cribado combinado y resultados de cariotipo.** <sup>†</sup>TN: Translucencia nucal en percentiles (Borrell et al, 2006) (88); <sup>‡</sup>CC1T: Cribado combinado de primer trimestre; <sup>§</sup>RA-T21: Riesgo alto para T21 ( $\geq 1/50$ ); <sup>¶</sup>RI-T21: Riesgo intermedio para T21 (1/51-1/300); <sup>\*\*</sup>RB-T21: Riesgo bajo para T21 ( $< 1/300$ ); <sup>a</sup>falsos negativos para T21; <sup>b</sup>14 casos con TN  $< 3,5$ mm.

### **5.1.5. ADNf como test contingente de cribado.**

La introducción del ADNf para la detección de T21, T18 y T13 como modelo contingente en función de los resultados del CC1T se recomendó en:

- a) Gestantes con riesgos en el CC1T para T21 y/o T18 entre 1/51-1/300 con independencia del percentil de la TN pero siempre que fuera menor de 3,5 mm.
- b) Gestaciones con TN mayor o igual a p97,5 con resultado en el CC1T de riesgo bajo siempre que la medida fuera menor de 3,5 mm.

## **5.2. Resultados del estudio observacional prospectivo realizado en la fase 2.**

Este estudio se ha realizado tras modificar el protocolo de atención prenatal a las gestantes en riesgo de cromosomopatías, con la implementación del cribado no invasivo de aneuploidías fetales o ADNf mediante el estudio del ADN fetal circulante en sangre materna como test contingente.

### **5.2.1. Características de la población a estudio**

Durante el periodo comprendido entre octubre de 2015 a diciembre de 2016, ambos inclusive, han acudido al HCSC un total de 2386 gestantes a las que se les ha realizado un CC1T durante el control de su embarazo. Los datos demográficos de las gestantes y los datos clínicos relacionados con la gestación para la realización del CC1T se encuentran en la **tabla 5.6**. Dichos datos han sido estratificados por riesgos de de aneuploidía, y en aquellas gestantes en las que existía riesgo para ambas trisomías (T21 y T18) se ha utilizado el mayor de ellos para la estratificación.

Gestantes con *CC1T N = 2386	Riesgo ≥ 1/50 N = 36	Riesgo 1/51-1/300 N = 99	Riesgo < 1/300 N = 2251	p valor inter-grupos
<b>Demográficos</b>				
Edad materna al parto	36,5 ± 5,5	37,1 ± 4,2	32,1 ± 5,3	<0,001
<b>Origen</b>				
Caucásicas	22 (61,1)	71 (71,8)	1324 (58,8)	
Afrocaribeñas	-	1 (1)	18 (0,8)	
Asiáticas	-	2 (2)	59 (2,6)	
Árabes	2 (5,5)	1 (1)	44 (2)	
Sudamericanas	12 (33,4)	20 (20,2)	654 (29)	
Otras	-	4 (4)	152 (6,8)	
<b>Clínicos</b>				
*LCC (mm)	57,6 ± 7,7	61,8 ± 8,1	60,2 ± 7,7	0,014
†TN (mm)	3,7 ± 3,2	1,7 ± 0,6	1,4 ± 0,4	<0,001
‡f-βHCG (MoM)	1,4 ± 1,6	1,6 ± 1,5	1,2 ± 0,8	0,005
*PAPP-A (MoM)	0,6 ± 0,5	0,6 ± 0,5	1,4 ± 0,8	<0,001

Tabla 5.6. Datos demográficos y clínicos de las gestantes estratificados por riesgos en el cribado combinado durante el periodo 2015-2016. Los datos se dan en frecuencias y porcentajes (%) para las variables cualitativas, y en media y desviación estándar para las variables cuantitativas con distribución simétrica. \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; †LCC (mm): longitud cráneo caudal en milímetros; ‡TN (mm): translucencia nucal en milímetros; ‡f-βHCG (MoM): fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana en múltiplos de la mediana; \*PAPP-A (MoM): proteína plasmática A en múltiplos de la mediana.

Un total de 290 gestantes fueron atendidas en la consulta de asesoramiento genético prenatal en este periodo. La edad materna al parto y la distribución de las gestantes remitidas a asesoramiento se encuentran en la figura 5.2.

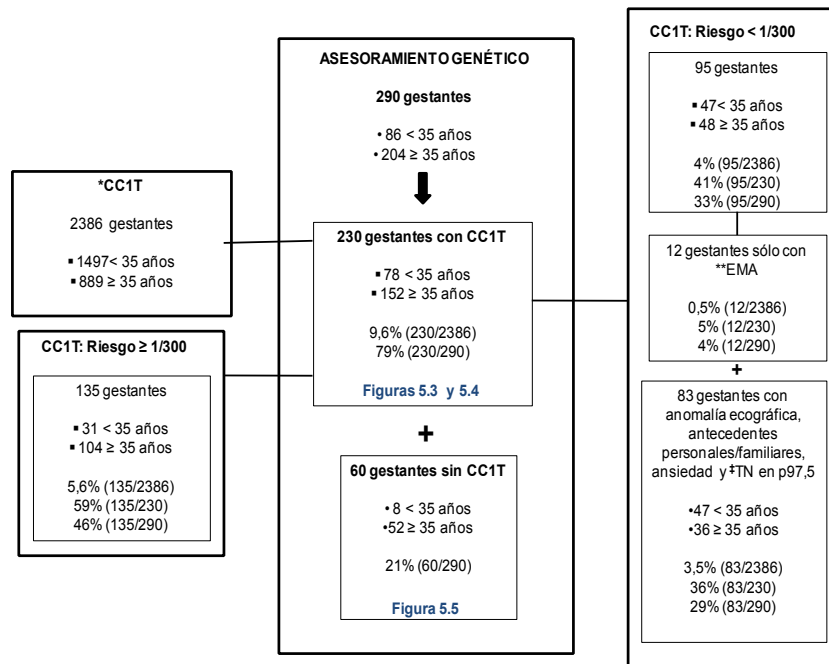


Figura 5.2. Edad y distribución de las gestantes remitidas asesoramiento genético prenatal durante el periodo 2015-2016. \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; \*\*EMA: edad materna avanzada; †TN: translucencia nucal.

De las 290 gestantes que acudieron a asesoramiento, 230 (79%) se habían realizado el CC1T y representan el 9,6% (230/2386) de todas las gestantes con un CC1T realizado en el HCSC durante este periodo. Un total de 135 gestantes (59% de las 230) tuvieron un CC1T de riesgo ( $R \geq 1/300$ ) mientras que 95 (41%) tuvieron un CC1T de bajo riesgo ( $R < 1/300$ ).

Las figuras 5.3 y 5.4 muestran la distribución y las pruebas elegidas como primera opción por las gestantes con CC1T de riesgo bajo ( $R < 1/300$ ) y las gestantes con CC1T de riesgo ( $R \geq 1/300$ ), respectivamente.

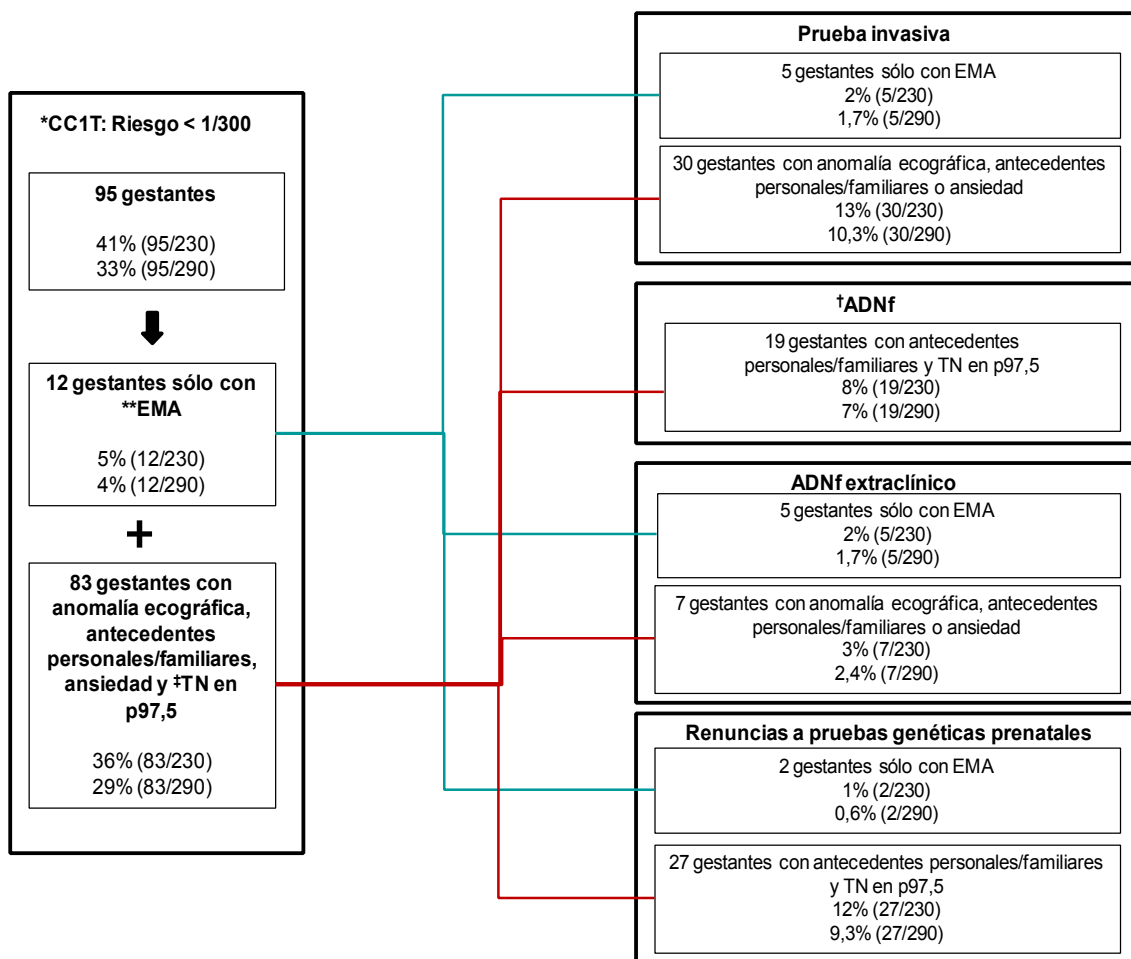


Figura 5.3. Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes con CC1T de riesgo bajo ( $R < 1/300$ ) remitidas a asesoramiento genético prenatal sobre el total de las gestantes atendidas ( $n=290$ ) y sobre el total de gestantes que se realizaron el CC1T ( $n=230$ ). \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; \*\*EMA: edad materna avanzada; †TN: translucencia nucal; †ADNF: ADN fetal libre.

De las 230 gestantes remitidas a la consulta con CC1T, 12 (5%) acudieron a la consulta solamente por EMA, a petición propia de las mismas, y representan el 0,5% (12/2386) de las gestantes que se hicieron un CC1T en este periodo. De ellas el 42% (5/12) se realizó una prueba invasiva, mientras que el 58% (7/12) renunciaron a la misma y se realizaron bien un ADNF

fuera de nuestro hospital (ADNf extraclínico; 41% [5/12]), o bien no se realizaron ninguna prueba prenatal (17%, 2/12).

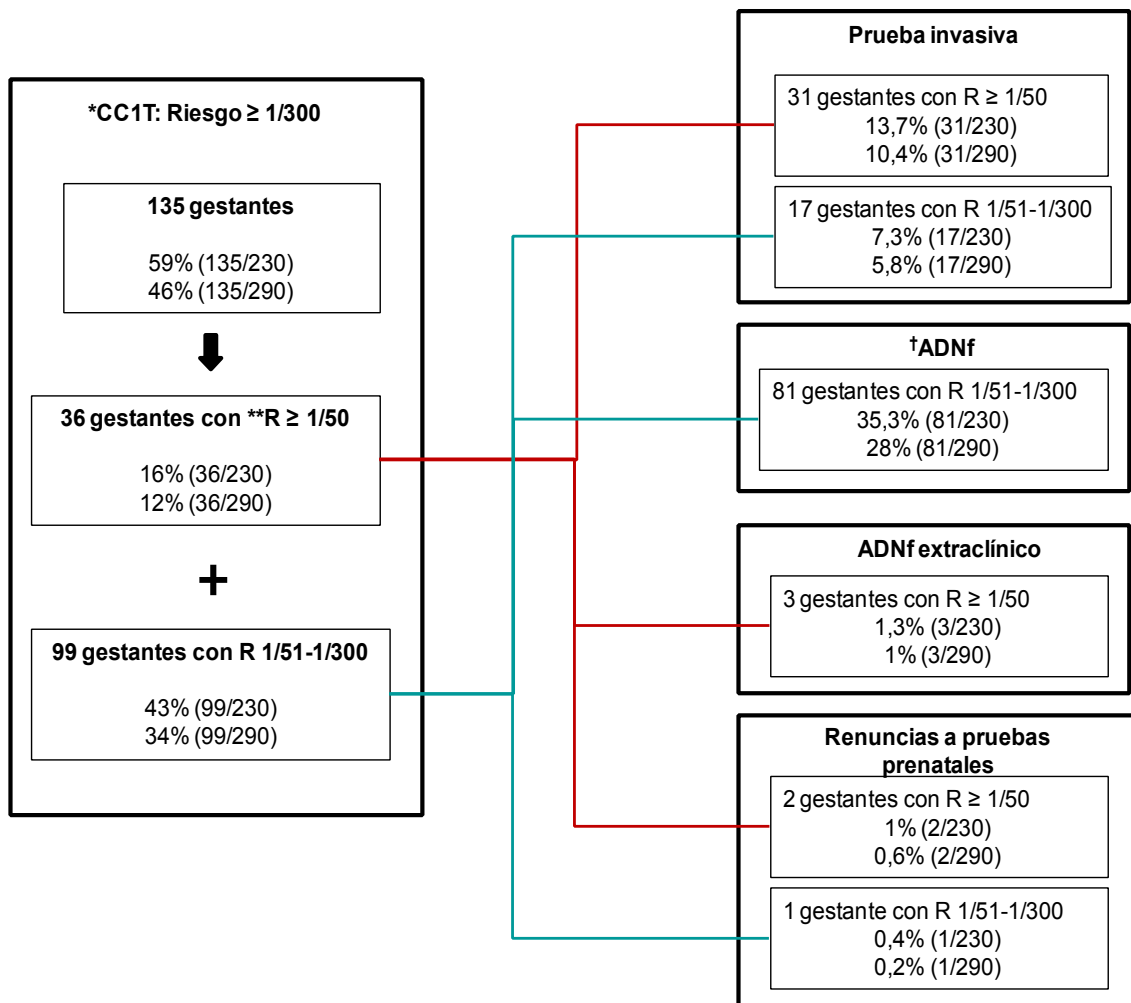


Figura 5.4. Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes con CC1T de riesgo remitidas a asesoramiento genético prenatal sobre el total de las gestantes atendidas (n=290) y sobre el total de gestantes que se realizaron el CC1T (n=230).\*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; \*\*R: riesgo; †ADNf: ADN fetal libre.

Un 5.6% de las gestantes con CC1T atendidas en el HCSC (135/2386) tuvieron un riesgo  $\geq$  1/300 en el CC1T y representan el 46% de las gestantes remitidas a la consulta de asesoramiento genético prenatal. De estas 135 gestantes, 36 (27%) tuvieron un CC1T de alto riesgo ( $R \geq 1/50$ ), y 99 (73%) tuvieron un riesgo intermedio (R 1/51-1/300). Entre estas 135 gestantes con riesgo, 3 de riesgo alto y 2 de riesgo intermedio tuvieron alteraciones ecográficas mayores distintas de la TN y fueron clasificadas como alteraciones ecográficas del primer trimestre (**tabla 5.8**). El 35,5% (48/135) de las gestantes con riesgo en el CC1T se realizó una prueba invasiva, mientras que el 64,5% (87/135) renunció a las mismas, bien en

favor del ADNf realizado en nuestro hospital (60%, 81/135), bien realizándose un ADNf extraclínico (2,2%, 3/135), o bien renunciando a cualquier prueba (2,2%, 3/135).

La **figura 5.5** muestra la distribución de las gestantes sin CC1T y las pruebas que eligieron como primera opción tras asesoramiento genético prenatal.

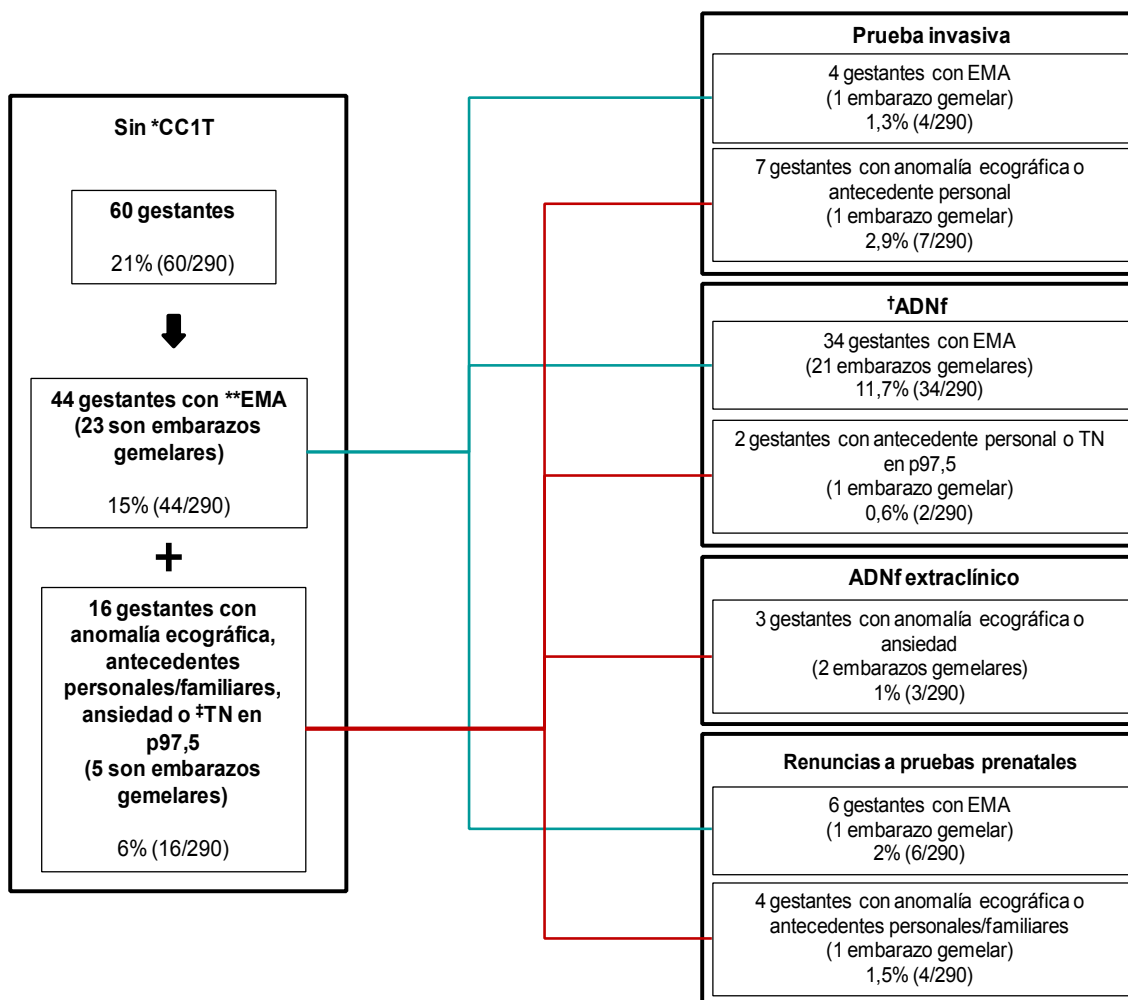


Figura 5.5. Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes sin CC1T remitidas a asesoramiento genético prenatal sobre el total de las gestantes atendidas (n=290).\*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; \*\*EMA: edad materna avanzada; †TN: translucencia nucal; †ADNf:ADN fetal libre.

Del total de las 290 gestantes remitidas a la consulta, 60 (21%) no se habían realizado CC1T. A 44 de estas gestantes (73% de 60) se les consideró en riesgo de cromosopatía por tener EMA sin un CC1T que permitiese comparar el riesgo individual para T21 y T18 de cada una de ellas con su riesgo por edad. Dentro de este grupo de gestantes, el 9% (4/44) se realizó una prueba invasiva, mientras que el 91% (40/44) renunció a la misma bien en favor del ADNf realizado en nuestro hospital (77%, 34/44), bien renunciando a cualquier prueba (14%, 6/44).

### 5.2.2. Modelo Contingente

Durante este periodo, en las 290 gestantes que acudieron a asesoramiento se realizaron un total de 262 pruebas genéticas prenatales:

- 244 de ellas realizadas o solicitadas por el HCSC: 108 invasivas y 136 ADNfs.
- 18 ADNfs extraclínicos aportados por las gestantes.

De estas 290 gestantes que acudieron a consulta, 160 tuvieron la opción de elegir un ADNf en nuestro hospital, como test contingente, por cumplir alguno de los criterios clínicos establecidos. El 85% de ellas eligieron el ADNf como primera opción. En estas gestantes se realizaron un total de 166 pruebas genéticas prenatales: 136 ADNfs y 30 invasivas.

Las indicaciones a la consulta de asesoramiento y las pruebas genéticas prenatales realizadas en las 160 gestantes que podían beneficiarse del ADNf como test contingente se muestran en la **tabla 5.7**. No hubo gestantes con contraindicación a prueba invasiva ni progenitores portadores de translocación robertsoniana que afectase a los cromosomas 21 y/o 13 en este periodo.

Indicación asesoramiento	Pruebas genéticas prenatales			Renuncias	Total gestantes N= 160	Total pruebas N= 166
	Cribado no invasivo	Diagnóstico Invasivo				
	<sup>a</sup> ADNf	<sup>β</sup> Amnio	<sup>γ</sup> BC			
Riesgo intermedio en *CC1T (R= 1/51-1/300)	<sup>§</sup> 81	17	6	1	97	104
<sup>†</sup> TN ≥ p97,5 con CC1T de bajo riesgo (R<1/300) y TN en 97,5 sin CC1T	<sup>‡</sup> 7	4	0	1	11	11
Antecedente personal: feto anterior con aneuploidía	14	0	0	0	14	14
Gestantes sin CC1T sólo con <sup>¶</sup> EMA (≥ 35 años)	Gemelares	21	1	0	1	22
	Únicos	13	2	0	0	15
<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>24</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>160</b>	<b>166</b>

Tabla 5.7. Indicaciones a la consulta de asesoramiento y pruebas genéticas prenatales realizadas en las 160 gestantes con indicación al test contingente. \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; <sup>†</sup>TN: translucencia nucal (≥ p97,5 y < 3,5 mm); <sup>¶</sup>EMA: edad materna avanzada; <sup>a</sup>ADNf : ADN fetal libre; <sup>β</sup>Amnio: amniocentesis; <sup>γ</sup>BC: biopsia corial; <sup>§</sup>8 gestantes con ADNf y prueba invasiva; <sup>‡</sup>1 gestante con ADNf y prueba invasiva.

En la **tabla 5.8** se muestran las indicaciones y las pruebas genéticas prenatales de las 130 gestantes a las que no se les ofreció un ADNf. Entre ellas hay 9 gestantes, 3 con TN  $\geq$  a p97,5 y 6 sólo con EMA sin cribado, que no entraron en el protocolo del ADNf como test contingente dado que estas dos indicaciones se introdujeron en enero de 2016.

Indicación asesoramiento	Pruebas genéticas prenatales			Renuncias	Total gestantes N= 130	Total pruebas N= 96	
	Cribado no invasivo	Diagnóstico Invasivo					
	<sup>a</sup> ADNf extraclínico	<sup>β</sup> Amnio	<sup>μ</sup> BC				
Riesgo alto en *CC1T ( $\geq$ 1/50)	3	3	25	2	33	31	
Alteración ecográfica	1º T	<sup>§</sup> 1	2	5	1	**8	8
	2º T	2	15	0	2	19	17
	3º T	0	1	0	0	1	1
<sup>†</sup> TN $\geq$ p97,5 con CC1T de bajo riesgo (<1/300)	0	2	0	1	3	2	
ADNf extraclínico de riesgo	<sup>€</sup> 3	2	1	0	3	6	
Gestantes sin cribado sólo con <sup>¶</sup> EMA	0	1	0	5	6	1	
A petición propia con CC1T de bajo riesgo (R <1/300)	Con EMA	<sup>¶</sup> 5	6	0	2	12	11
	Sin EMA	1	0	1	0	2	2
Antecedente	Familiar	3	0	1	15	19	4
	Personal	0	2	11	11	24	13
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>34</b>	<b>44</b>	<b>39</b>	<b>130</b>	<b>96</b>	

**Tabla 5.8. Indicaciones a la consulta de asesoramiento y pruebas genéticas prenatales realizadas en las 130 gestantes sin indicación al test contingente.** \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; <sup>†</sup>TN: translucencia nucal ( $\geq$  p97,5 y < 3,5 mm); <sup>¶</sup>EMA: edad materna avanzada; <sup>a</sup>ADNf: ADN fetal libre; <sup>β</sup>Amnio: amniocentesis; <sup>μ</sup>BC: biopsia corial; <sup>§</sup>1 gestante con ADNf extraclínico y prueba invasiva ;\*\*3 con CC1T  $\geq$  50 (riesgo alto) y 2 con CC1T 1/51-1/300 (riesgo intermedio); <sup>€</sup>3 gestantes con ADNf extraclínico y prueba invasiva; <sup>†</sup>1 gestante con ADNf extraclínico y prueba invasiva.

Entre las 290 gestantes que acudieron a asesoramiento genético, 14 se realizaron prueba invasiva tras un ADNf:

- a) 9 gestantes tras un ADNf indicado como test contingente en nuestro hospital:

- 4 por ADNf de riesgo alto de aneuploidía: 3 con riesgo de T21 y 1 con riesgo de T13.
- 1 por un ADNf no informativo por baja fracción fetal.
- 3 por la aparición de una alteración ecográfica en el 2º trimestre.
- 1 a petición propia tras ADNf de riesgo bajo.

b) 5 gestantes tras un ADNf extraclínico que aportaron el día que acudieron a la consulta:

- 3 por ADNf extraclínico de riesgo alto de aneuploidía para T21, 2 de ellas fueron falsos negativos de nuestro CC1T, y la tercera fue un embarazo con gemelo evanescente.
- 1 por ADNf extraclínico discrepante con la ecografía en cuanto al sexo fetal en un embarazo gemelar.
- 1 a petición propia tras ADNf extraclínico de riesgo bajo.

De las 290 gestantes que acudieron a asesoramiento, 108 (37%) se realizaron una prueba invasiva, incluidas 14 gestantes que como primera opción se habían realizado un ADNf en nuestro hospital o extraclínico. De las 108 pruebas invasivas, 30 (28%) se realizaron en gestantes que tuvieron opción al ADNf y 78 (72%) en gestantes sin dicha opción. De las pruebas invasivas, 50 (46%) fueron biopsias coriales y 58 (54%) fueron amniocentesis. El 63% (182/290) de las gestantes renunciaron a prueba invasiva. De las 290 gestantes, 42 (14%) renunciaron a todo tipo de prueba. (Tablas 5.7 y 5.8).

#### 5.2.2.1. CC1T, resultados de cariotipo y ADNf

El resultado de los cariotipos fue normal o equilibrado en 81 (75%) de los 108 cariotipos prenatales realizados. Hubo un total de 29 cariotipos desequilibrados, 27 prenatales y 2 postnatales, lo que supone una prevalencia de anomalías cromosómicas en nuestra cohorte (29/2446) del 1,2%, y entre las 290 gestantes que acudieron a asesoramiento prenatal del 9,3% (27/290). De las 135 gestaciones con un CC1T de riesgo, 21 (15,5%) tuvieron un cariotipo desequilibrado como se muestra en la **tabla 5.9**.

Sólo 4 de los 136 ADNfs realizados en el HCSC fueron de riesgo, 3 para T21 en gestantes que tuvieron un riesgo intermedio sólo para dicha trisomía, y 1 para T13 en una gestante con TN en p97,5 y riesgo bajo en el CC1T. Los 4 casos de riesgo fueron confirmados como desequilibrados mediante prueba invasiva al igual que 1 caso no informativo que resultó ser

un cariotipo normal. De las 3 T21, 2 fueron confirmadas mediante biopsia corial y 1 mediante amniocentesis en una gestante que estaba de 14,4 semanas al recibir el resultado del ADNf. En la T13 y en el caso no informativo se realizó amniocentesis. De las 97 gestantes con riesgo intermedio en el CC1T (**tabla 5.7**) a las que se les ofreció un ADNf como alternativa a la prueba invasiva, sólo 4 (4,1%) tuvieron un cariotipo desequilibrado: las 3 gestantes con riesgo en el ADNf para T21 y 1 gestante con resultado de riesgo bajo en el ADNf pero con alteración ecográfica en el segundo trimestre que resultó ser una triploidía. No hubo falsos positivos ni negativos en los ADNfs y el porcentaje de no informativos fue del 0.7%.

Los resultados de los estudios citogenéticos realizados y los ADNf en las gestantes atendidas en este periodo se encuentran en la **tabla 5.9**. De las 50 biopsias coriales, 36 fueron realizadas en gestantes con CC1T de riesgo y 14 en gestantes con CC1T de bajo riesgo. Entre estas 14 gestantes, 12 tuvieron un antecedente personal o familiar de enfermedad de origen genético, 1 fue un ADNf extraclínico de riesgo para T21 y 1 fue una petición propia en una gestante menor de 35 años.

Entre las 290 gestantes atendidas en asesoramiento genético prenatal hubo 252 gestaciones que llegaron a término. De los neonatos, 6 presentaron malformaciones ya diagnosticadas en la ecografía del 2º trimestre, donde todos los estudios citogenéticos prenatales incluido el array-CGH fueron normales. Los 246 recién nacidos restantes fueron normales en el momento del parto.

El 79,3% de los cariotipos desequilibrados de nuestra cohorte son T21, T18 y T13. Todas las T18 tuvieron un CC1T de riesgo ( $R \geq 1/300$ ) mientras que la T13, sin riesgo en el cribado, presentó una TN en p97,5 y fue detectada en el ADNf. De los 15 casos de T21, 13 se detectaron prenatalmente, 9 de ellos por CC1T de riesgo, 3 por ADNf extra-clínico de riesgo (2 falsos negativos del CC1T y un embarazo con gemelo evanescente sin CC1T) y 1 por EMA sin cribado (gemelar >35 años que renunció a ADNf). El resto de los cariotipos patológicos fueron 3 monosomías del X (10,3%) y 3 triploidías (10,3%). De las monosomías del X, 2 tuvieron un riesgo alto ( $RD \geq 1/50$ ) en el CC1T y la otra, sin cribado, fue detectada ecográficamente por malformación ecográfica tipo Dandy Walker en el segundo trimestre. De las 3 triploidías, 1 presentó un riesgo alto para T21 en el CC1T ( $R \geq 1/50$ ), y de las 2 restantes, ambas con riesgo intermedio para T18 en el CC1T, una se diagnosticó por anomalía ecográfica del primer trimestre y otra por anomalía ecográfica del segundo trimestre tras ADNf de bajo riesgo. No hubo otras anomalías cromosómicas en este periodo.

†CCIT											Gestantes sin CCIT	Total
Grupos de riesgo en el CCIT	Riesgo para ambas T21-T18				Riesgo sólo para T21		Riesgo sólo para T18		Riesgo bajo			
	‡RA-T21		§RI-T21		RA-T21	RI-T21	¶RB-T21		RB-T21			
	††RA-T18	††RI-T18	RA-T18	RI-T18	§§RB-T18		RA-T18	RI-T18	RB-T18			
Gestantes con asesoramiento	*2	-	1	*7	26	55	**7	*37	95	60	290	
Pruebas genéticas	ªVC	2	-	1	1	19	4	6	3	¶14	-	50
	ªLA	-	-	-	-	3	12	-	5	25	13	58
	ªADNf	-	-	-	6	-	43	-	32	19	36	136
	ADNf extracl	-	-	-	-	3	-	-	-	12	3	18
	ªR	-	-	-	-	1	-	1	1	29	10	42
Cariotipos equilibrados	-	-	1	-	13	13	2	6	36	10	81	
Cariotipos desequilibrados	2	-	-	1	9	3	4	2	5	3	29	
ADNf riesgo alto	Clínico	-	-	-	-	-	3	-	-	1	-	4
	Extracl	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	3
ADNf riesgo bajo	Clínico	-	-	-	6	-	40	-	31	18	36	131
	Extracl	-	-	-	-	3	-	-	-	10	2	15
ADNf clínico no informativo	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Trisomía 21	-	-	-	-	6	3	-	-	ª4	2	15	
Trisomía 18	2	-	-	1	-	-	4	-	-	-	-	7
Trisomía 13	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Monosomía X	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	3	
Triploidía	-	-	-	-	1	-	-	2	-	-	-	3ª

Tabla 5.9. Resultados de los cariotipos y ADNfrealizados durante el periodo 2015-2016 clasificados por grupos de riesgo en el CCIT y en las gestantes sin CCIT. †CCIT: Cribado combinado de primer trimestre. ‡ RA-T21: Riesgo Alto para T21 ( $\geq 1/50$ ); §RI-T21: Riesgo intermedio para T21 ( $1/51-1/300$ ); ¶RB-T21: Riesgo Bajo para T21 ( $< 1/300$ ); ††RA-T18: Riesgo Alto para T18 ( $\geq 1/50$ ); ††RI-T18: Riesgo Intermedio para T18 ( $1/51-1/300$ ); §§RB-T18: Riesgo Bajo para T18 ( $< 1/300$ ); ªADNf: ADN fetal libre; ªVC: vellosidad corial; ªLA: líquido amniótico; ªR: renunciadas; \*1 gestante con alteración ecográfica mayor de primer trimestre distinta de TN; \*\*2 gestantes con alteración ecográfica mayor de primer trimestre distinta de TN; ¶12 gestantes con antecedente personal o familiar de enfermedad de origen genético, 1 gestante con ADNf extraclínico de riesgo y 1 gestante a petición propia; ª2 cariotipos prenatales y 2 postnatales.

Todos los estudios complementarios realizados mediante técnica de MLPA o array-CGH, en todas las gestaciones que tuvieron un riesgo alto ( $R \geq 1/50$ ) en el CCIT y en aquellas con

anomalías ecográficas que tuvieron resultados normales en la QF-PCR, fueron también normales.

### 5.2.2.2. Falsos negativos del CC1T para T21

Durante este periodo hay 4 casos que fueron falsos negativos para T21 en el CC1T y que se muestran en la **tabla 5.10**.

Caso	Riesgo para trisomía 21	Edad materna al parto	↑TN mm (percentil)	Indicación a asesoramiento
1	1/1900	37	1,3 (p25)	ADNf extraclínico de riesgo
2	1/22415	33	1,2 (p25)	*
3	1/379	39	1,8 (p50)	ADNf extraclínico de riesgo
4	1/1149	27	1,1 (p10)	*

**Tabla 5.10. Falsos negativos en el CC1T para T21 durante el periodo 2015-2016.**<sup>a</sup>CC1T: Cribado combinado de primer trimestre; <sup>b</sup>TN en milímetros (percentiles) en función de la LCC (Borrell *et al*, 2006) (88); ADNf: ADN fetal libre; \*Neonatos.

De los 4 casos, dos fueron diagnosticados prenatalmente tras ADNf extraclínico de riesgo y dos al nacimiento. No hubo TN en p97,5 durante este periodo entre los falsos negativos para T21 aunque sí se detectó a través de este percentil de la TN una T13 en una gestante con CC1T de bajo riesgo.

### 5.2.2.3. TN en percentil $\geq 97,5$ , riesgo en el CC1T para T21 y resultados de cariotipo.

Durante este periodo, hubo 46 gestaciones con una TN mayor o igual al p97,5. De las 13 gestaciones que tuvieron un riesgo bajo para T21 en el CC1T (8 casos, grupo A + 5 casos, grupo B; **tabla 5.11**), 10 tuvieron una edad materna menor de 35 años.

Hubo 13 gestaciones con una TN entre los percentiles 97,5-99 y se detectaron 2 (15%, 2/13) casos con cariotipo desequilibrado, una T21 y una T13, ambas mediante ADNf. En las gestaciones con TN mayor o igual al p99 y riesgo intermedio en el CC1T para T21 la única anomalía cromosómica detectada es una T18. De los 33 fetos con TN mayor o igual al p99 (Grupo B, **tabla 5.11**), 5 tuvieron riesgo bajo para T21 en el CC1T y resultados normales, y en las 5 la medida de la TN fue menor de 3,5 mm y se les ofreció un ADNf. Las 2 gestaciones sin CC1T de este grupo fueron tratadas como anomalía ecográfica del primer trimestre y sólo se

les ofreció prueba invasiva a pesar de que la TN fuera menor de 3,5 mm por carecer de CC1T que orientara sus riesgos.

<sup>†</sup> TN	<sup>‡</sup> CC1T	Edad	Trisomía 21	Otros cariotipos desequilibrados	Cariotipo o ADNf normal	Total
Grupo A p97,5-p99 n = 13	<sup>§</sup> RA-T21	<35	-	-	-	0
		≥35	-	-	-	
	<sup>¶</sup> RI-T21	<35	1	-	2	4
		≥35	-	-	1	
	<sup>**</sup> RB-T21	<35	-	-	6	8
		≥35	-	<sup>a</sup> 1	1	
Sin CC1T	<35	-	-	-	1	
	≥35	-	-	1		
Grupo B TN ≥ p99 n = 33	RA-T21	<35	-	2	6	21
		≥35	6	3	4	
	RI-T21	<35	-	<sup>b</sup> 1	2	5
		≥35	-	-	2	
	RB-T21	<35	-	-	4	5
		≥35	-	-	1	
Sin CC1T	<35	-	-	1	2	
	≥35	-	-	1		
Total			7	7	32	46

Tabla 5.11. Translucencia nucal ≥ al percentil 97,5, riesgo en el cribado combinado y resultados de cariotipo durante el periodo 2015-2016. <sup>†</sup>TN: Translucencia nucal en percentiles (Borrell et al, 2006) (88); <sup>‡</sup>CC1T: Cribado combinado de primer trimestre; <sup>§</sup>RA-T21: Riesgo alto para T21 (≥1/50); <sup>¶</sup>RI-T21: Riesgo intermedio para T21 (1/51-1/300); <sup>\*\*</sup>RB-T21: Riesgo bajo para T21 (<1/300); ADNf: ADN fetal libre; <sup>a</sup>1 T13; <sup>b</sup> 1T18; <sup>c</sup>12 casos con TN< 3,5mm.

### 5.3. Valoración de la efectividad

Con el fin de evaluar la efectividad del nuevo protocolo de diagnóstico genético en la atención prenatal de las gestantes en riesgo de cromosopatía, con la introducción del ADNf de aneuploidías mediante el estudio del ADN fetal circulante en sangre materna, se escogió un periodo de 15 meses del periodo retrospectivo para su comparación, comprendido entre octubre de 2013 y diciembre de 2014. Se eligió dicho periodo por tener una duración en tiempo igual al del estudio prospectivo y por ser el más próximo al mismo, y se añadió en la recogida de datos los resultados de los ADNfs extraclínicos que las gestantes se realizaron fuera del ámbito del HCSC. Se comprobó que la muestra recogida para nuestra comparación es representativa de las 12327 gestantes con una confianza del 95% y una precisión absoluta del 3%.

### 5.3.1. Características de la población a estudio

Durante el periodo comprendido entre octubre de 2013 a diciembre de 2014, ambos inclusive, acudieron al HCSC un total de 2208 gestantes a las que se realizó un CC1T durante el control de su embarazo. Los datos demográficos de las gestantes y los datos clínicos relacionados con la gestación para la realización del CC1T se encuentran en la **tabla 5.12**. Dichos datos han sido estratificados por riesgos de de aneuploidía, y en aquellas gestantes en las que existía riesgo para ambas trisomías (T21 y T18) se ha utilizado el mayor de ellos para la estratificación.

Gestantes con *CC1T N = 2208	Riesgo $\geq 1/50$ N = 20	Riesgo 1/51-1/300 N = 75	Riesgo $< 1/300$ N = 2113	p valor inter-grupos
<b>Demográficos</b>				
Edad materna al parto	35,6 $\pm$ 6	37,1 $\pm$ 4	31,6 $\pm$ 5,4	<0,001
<b>Origen</b>				
Caucásicas	17 (85)	52 (69,4)	1246 (59)	
Afrocaribeñas	-	-	80 (3,8)	
Asiáticas	-	3 (4)	86 (4)	
Árabes	-	-	42 (2)	
Sudamericanas	2 (10)	13 (17,3)	488 (23,1)	
Otras	1 (5)	7 (9,3)	171 (8,1)	
<b>Clínicos</b>				
<sup>‡</sup> LCC (mm)	60,3 $\pm$ 9,9	60,7 $\pm$ 7,5	60,3 $\pm$ 7,9	0,903
<sup>†</sup> TN (mm)	3,8 $\pm$ 2,4	1,5 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,3	<0,001
<sup>‡</sup> f- $\beta$ HCG (MoM)	1,4 $\pm$ 1,6	1,4 $\pm$ 1,2	1,2 $\pm$ 1,2	0,307
<sup>§</sup> PAPP-A (MoM)	0,6 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,7	<0,001

**Tabla 5.12. Datos demográficos y clínicos de las gestantes estratificados por riesgos en el cribado combinado durante el periodo 2013-2014.** Los datos se dan en frecuencias y porcentajes (%) para las variables cualitativas, y en media y desviación estandar para las variables cuantitativas con distribución simétrica. \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; <sup>‡</sup>LCC (mm): longitud cráneo caudal en milímetros; <sup>†</sup>TN (mm): translucencia nucal en milímetros; <sup>‡</sup>f- $\beta$ HCG (MoM): fracción  $\beta$  libre de la gonadotropina coriónica humana en múltiplos de la mediana; <sup>§</sup>PAPP-A (MoM): proteína plasmática A en múltiplos de la mediana.

Durante este periodo se atendieron en la consulta de asesoramiento prenatal un total de 890 gestantes. La **figura 5.6** muestra la distribución de las gestantes remitidas a asesoramiento y su edad materna al parto.

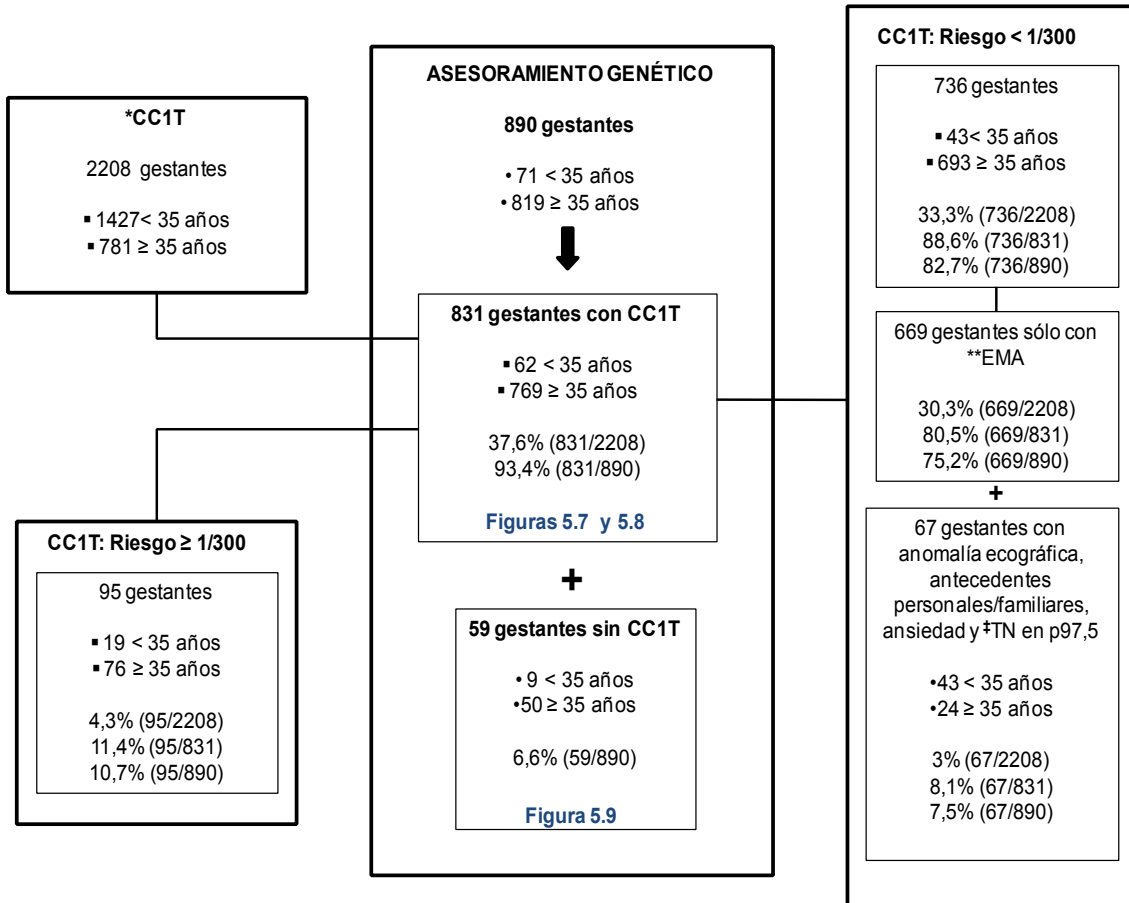


Figura 5.6. Edad y distribución de las gestantes remitidas asesoramiento genético prenatal durante el periodo 2013-2014. \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; \*\*EMA: edad materna avanzada; †TN: translucencia nucal.

De las 890 gestantes que acudieron a asesoramiento, 831 (93%) se habían realizado el CC1T y representan el 37,6% (831/2208) de las gestantes con un CC1T realizado en el HCSC durante este periodo. Un total de 95 gestantes (11% de las 831) tuvieron un CC1T de riesgo ( $R \geq 1/300$ ) mientras que 736 (89%) tuvieron un CC1T de bajo riesgo ( $R < 1/300$ ).

La distribución y las pruebas elegidas como primera opción por las gestantes con CC1T de riesgo bajo ( $R < 1/300$ ) y las gestantes con CC1T de riesgo ( $R \geq 1/300$ ) se muestran en las figuras 5.7 y 5.8, respectivamente.

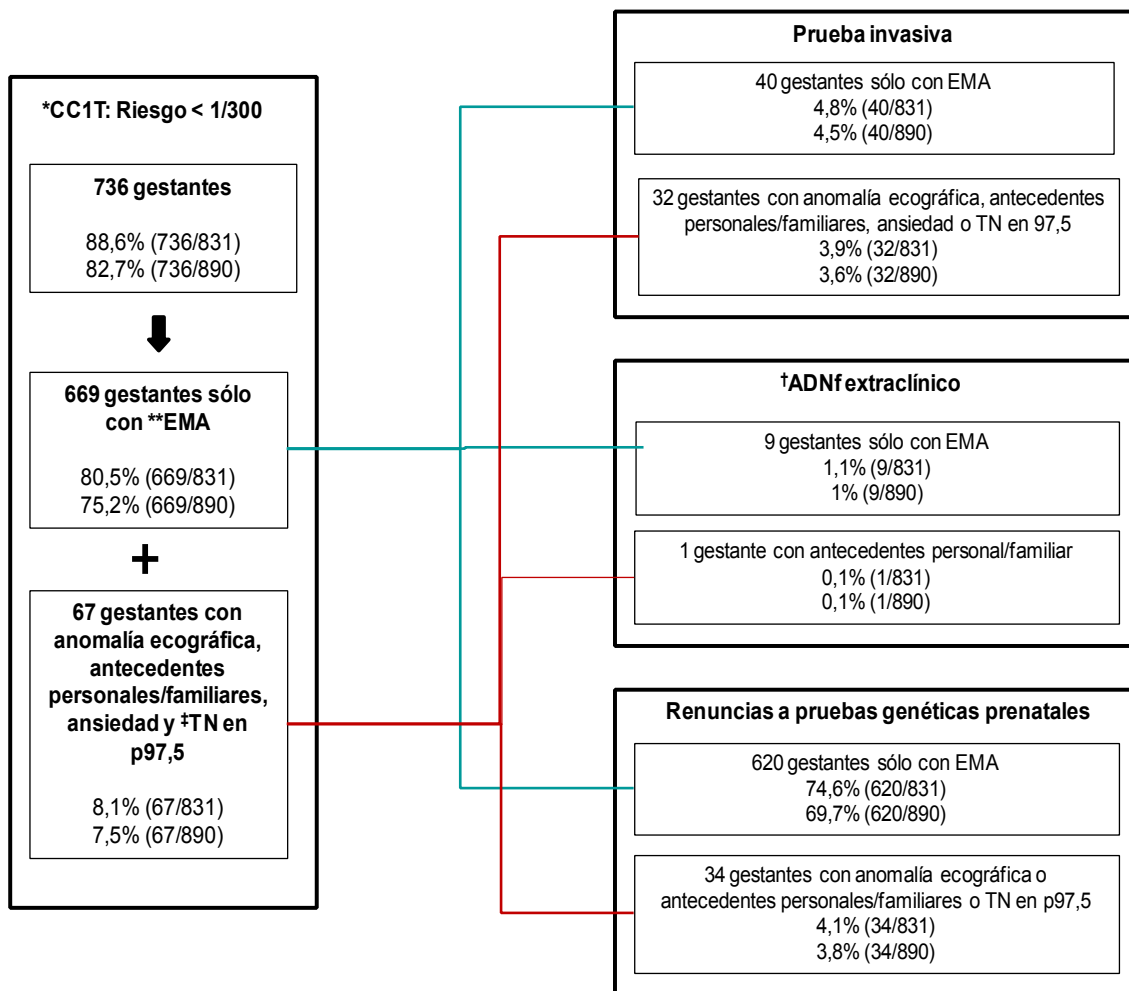


Figura 5.7. Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes con CC1T de riesgo bajo ( $R < 1/300$ ) remitidas a asesoramiento genético prenatal sobre el total de las gestantes atendidas ( $n=890$ ) y sobre el total de gestantes que se realizaron el CC1T ( $n=831$ ). \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; \*\*EMA: edad materna avanzada; †TN: translucencia nucal; †ADNf: ADN fetal libre.

De las 831 gestantes remitidas a la consulta con CC1T, 669 (80,5%) acudieron sólo por EMA y representan el 30% (669/2208) de las gestantes que se hicieron un CC1T en este periodo. De ellas el 6% (40/669) se realizó una prueba invasiva, mientras que el 94% (629/669) renunciaron a la misma y se realizaron bien un ADNf fuera de nuestro hospital (ADNf extraclínico; 1% [9/669]), o bien no se realizaron ninguna prueba prenatal (93%, 620/669).

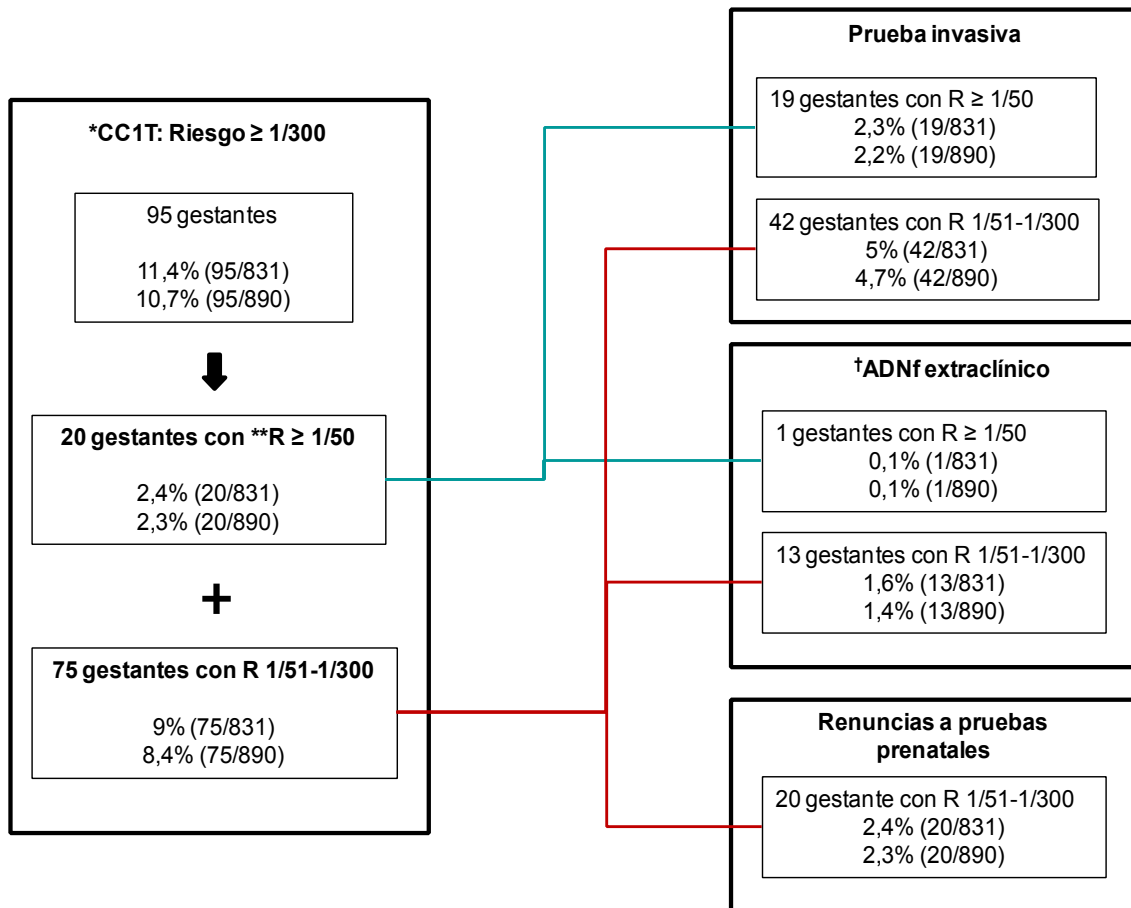


Figura 5.8. Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes con CC1T de riesgo remitidas a asesoramiento genético prenatal sobre el total de las gestantes atendidas (n=890) y sobre el total de gestantes que se realizaron el CC1T (n=831). \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; \*\*R: riesgo; †ADNf: ADN fetal libre.

Un 4,3% de las gestantes con CC1T atendidas en este periodo en el HCSC (95/2208) tuvieron un riesgo  $\geq 1/300$  en el CC1T y representan el 10,7% de las gestantes remitidas a la consulta de asesoramiento. De estas 95 gestantes, 20 (21%) tuvieron un CC1T de alto riesgo ( $R \geq 1/50$ ), y 75 (79%) tuvieron un riesgo intermedio ( $R 1/51-1/300$ ). Entre estas 95 gestantes, 3 con riesgo alto tuvieron alteraciones ecográficas mayores distintas de la TN y fueron clasificadas como alteraciones ecográficas del primer trimestre (tabla 5.13). El 64% (61/95) de las gestantes con riesgo en el CC1T se realizó una prueba invasiva, mientras que el 36% (34/95) renunció a las mismas, bien a favor de un ADNf extraclínico (15%, 14/95) o bien renunciando a cualquier prueba prenatal (21%, 20/95).

La distribución de las gestantes sin CC1T y las pruebas que eligieron como primera opción se muestran en la figura 5.9.

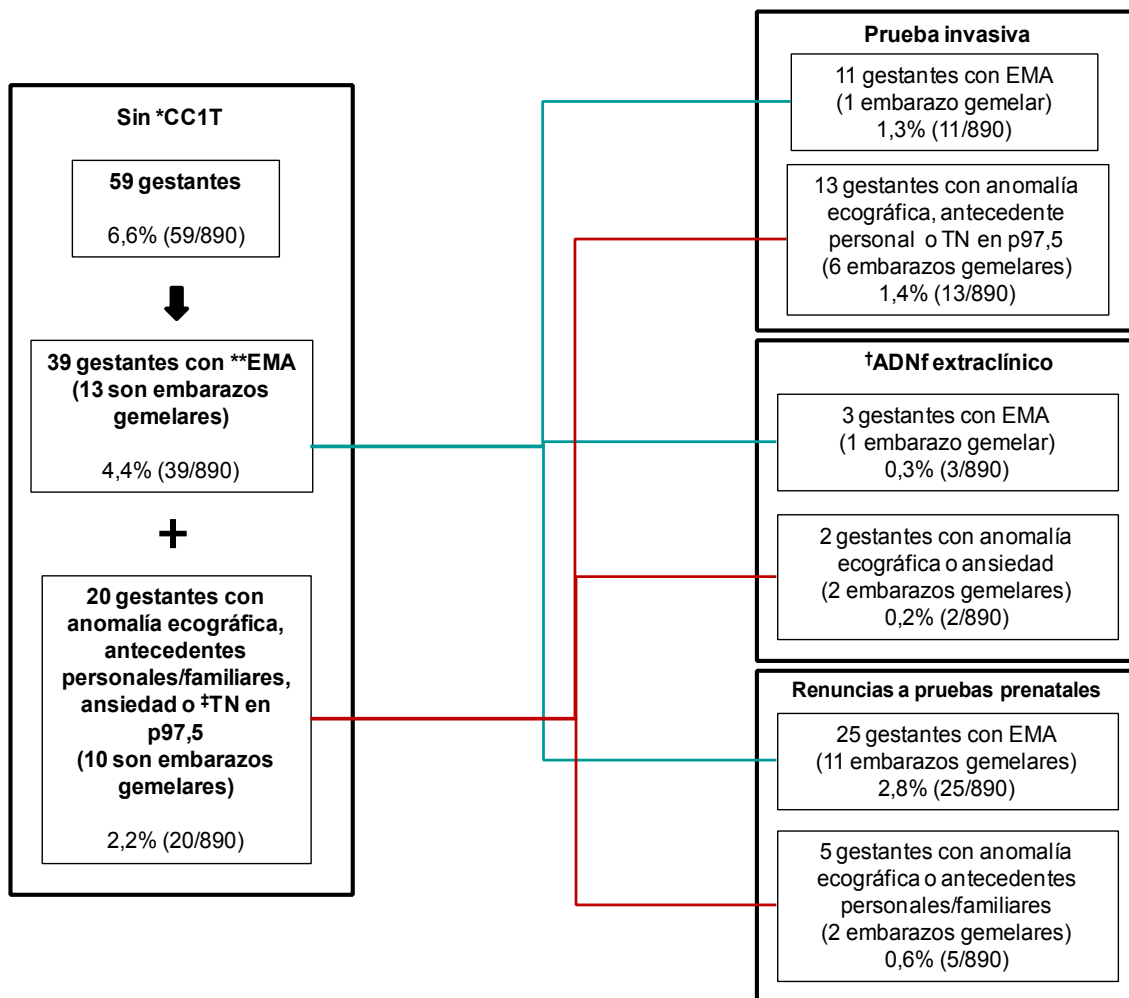


Figura 5.9. Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes sin CC1T remitidas a asesoramiento genético prenatal sobre el total de las gestantes atendidas (n=890). \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; \*\*EMA: edad materna avanzada; †TN: translucencia nucal; †ADNf: ADN fetal libre.

De las 890 gestantes remitidas a asesoramiento, 59 (6,6%) no tenían CC1T. De ellas, a 39 (66% de 59) se les consideró en riesgo de cromosopatía por tener EMA sin un CC1T que permitiese comparar su riesgo individual para T21 y T18 con su riesgo por edad. En este grupo de gestantes el 28% (11/39) se realizó una prueba invasiva, mientras que el 72% (28/39) renunció a la misma bien en favor de un ADNf extraclínico (8%, 3/39) o bien renunciando a cualquier prueba (64%, 25/39).

En la **tabla 5.13** se muestran las indicaciones a la consulta de asesoramiento y las pruebas genéticas realizadas en las 890 gestantes atendidas en este periodo. No hubo gestantes con contraindicación para una prueba invasiva ni progenitores portadores de translocación robertsoniana que afectara a los cromosomas 21 y/o 13.

Indicación asesoramiento		Pruebas genéticas prenatales			Renuncias	Total gestantes N= 890	Total pruebas N= 187
		Cribado no invasivo	Diagnóstico Invasivo				
		<sup>a</sup> ADNf extraclínico	<sup>b</sup> Amnio	<sup>c</sup> BC			
Riesgo en *CC1T	Alto ( $\geq 1/50$ )	1	2	14	0	17	17
	Intermedio (1/51-1/300)	13	41	1	20	75	55
Alteración ecográfica	1º T	1	7	6	3	**17	14
	2º T	0	12	0	3	15	12
	3º T	0	1	0	0	1	1
<sup>†</sup> TN $\geq$ p97,5 con CC1T de bajo riesgo (<1/300) y TN en 97,5 sin CC1T		0	4	1	1	6	5
ADNfextraclínico de riesgo		1	1	0	0	***1	2
Antecedente de feto anterior con aneuploidía		1	3	2	5	11	6
Gestantes sin cribado sólo con <sup>¶</sup> EMA ( $\geq 35$ años)	Gemelares	1	1	0	11	13	2
	Únicos	2	10	0	14	26	12
CC1T de bajo riesgo (R <1/300)	Con EMA	9	40	0	620	669	49
	Sin EMA	0	3	0	0	3	3
Antecedente	Familiar	0	1	0	12	13	1
	Personal	0	6	2	15	23	8
Total		29	132	26	704	890	187

Tabla 5.13. Indicaciones a la consulta de asesoramiento y pruebas genéticas prenatales realizadas en las 890 gestantes del periodo 2013-2014. \*CC1T: cribado combinado de primer trimestre; <sup>†</sup>TN: translucencia nucal ( $\geq$  p97,5 y < 3,5 mm); <sup>¶</sup>EMA: edad materna avanzada; <sup>a</sup>ADNf : ADN fetal libre; <sup>b</sup>Amnio: amniocentesis; <sup>c</sup>BC: biopsia corial;\*\*\*3 gestantes con riesgo alto (R $\geq$  1/50) en el CC1T. \*\*\*1 gestante gemelar con prueba invasiva y ADNf extraclínico

En las 890 gestantes que acudieron a asesoramiento se realizaron un total de 187 pruebas genéticas prenatales:

- 158 invasivas realizadas en el HCSC.
- 29 ADNf extraclínicos aportados por las gestantes.

En este periodo sólo 1 de las 890 gestantes se realizó una prueba invasiva tras un ADNf extraclínico de riesgo para T21. Hubo 3 gestantes con un CC1T de riesgo alto ( $R \geq 1/50$ ) que fueron clasificadas como anomalía ecográfica mayor del primer trimestre distinta de la TN.

De las 890 gestantes que acudieron a asesoramiento, 158 (18%) se realizaron una prueba invasiva, incluida la gestante con ADNf extraclínico de riesgo, y de ellas 132 (84%) fueron amniocentesis y 26 (16%) fueron biopsias coriales. El 82% (733/890) de las gestantes renunciaron a prueba invasiva. De las 890 gestantes, el 79% (704/890) renunció a cualquier tipo de prueba.

### **5.3.2. CC1T, resultados de cariotipo y ADNf extraclínico**

El resultado de los cariotipos fue normal o equilibrado en 145 (92%) de los 158 cariotipos prenatales realizados. Hubo en total 13 cariotipos desequilibrados, todos ellos prenatales, lo que supone una prevalencia en nuestra cohorte (2267 gestantes) del 0,6%, y entre las 890 gestantes en asesoramiento del 1.5%. De las 95 gestaciones con un CC1T de riesgo, 5 (5%) tuvieron un cariotipo desequilibrado.

Sólo 1 ADNf extraclínico fue de riesgo para T21, en una gestante gemelar sin CC1T y fue confirmado mediante amniocentesis.

Ninguna de las 75 gestantes con riesgo intermedio en el CC1T tuvo un cariotipo desequilibrado.

Los resultados de los estudios citogenéticos realizados y los ADNf extraclínicos aportados por las gestantes se encuentran en la **tabla 5.14**.

El 85% de los cariotipos desequilibrados de nuestra cohorte son T21 y T18. No hubo T13 durante este periodo. De las T18, 2 tuvieron un CC1T de alto riesgo ( $R \geq 1/50$ ) mientras que la tercera fue detectada en un embarazo gemelar sin CC1T por alteración ecográfica mayor de primer trimestre. Los 8 casos de T21 se detectaron prenatalmente: 2 por CC1T de alto riesgo, 2 en gestantes con riesgo bajo en el CC1T por hallazgos ecográficos (1 con TN 97,5 en el primer trimestre y otra con cardiopatía en el segundo trimestre), y 4 en gestantes sin CC1T (1 gemelar con ADNf extraclínico de riesgo, 1 gemelar con TN en p97,5 y 2 gestantes con TN en p99).

El resto de los cariotipos patológicos fueron 1 triploidía (7,5%) en una gestante gemelar sin CC1T detectada en ecografía y 1 anomalía poco común con un derivado de una translocación entre un cromosoma del par 14 y otro del par 17 (7,5%). No hubo monosomías del X ni otras aneuploidías de los cromosomas sexuales en este periodo.

†CCIT											Gestantes sin CCIT	Total
Grupos de riesgo en el CCIT		Riesgo para ambas T21-T18				Riesgo sólo para T21		Riesgo sólo para T18		Riesgo bajo		
		‡RA-T21		§RI-T21		RA-T21	RI-T21	¶RB-T21		RB-T21		
		‡‡RA-T18	‡‡RI-T18	RA-T18	RI-T18	§§RB-T18		RA-T18	RI-T18	RB-T18		
Gestantes con asesoramiento		*3	-	-	5	**12	37	5	33	736	59	890
Pruebas genéticas	ªVC	3	-	-	-	11	1	2	-	6	3	26
	ªLA	-	-	-	3	1	18	2	20	66	22	132
	ªADNf extracl	-	-	-	-	-	9	1	4	10	5	29
	ªR	-	-	-	2	-	9	-	9	654	30	704
Cariotipos equilibrados		1	-	-	3	9	19	4	20	70	19	145
Cariotipos desequilibrados		2	-	-	-	3	-	-	-	2	6	13
ADNf extracl	Riesgo alto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
	Riesgo bajo	-	-	-	-	-	9	1	4	10	4	28
Trisomía 21		-	-	-	-	2	-	-	-	ª2	4	8
Trisomía 18		2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3
Trisomía 13		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Momosomía X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Triploidía		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Aneuploidías sexuales		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Anomalías cromosómicas poco comunes		-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1

Tabla 5.14. Resultados de los cariotipos realizados y los ADNf extraclínicos aportados durante el período 2013-2014 clasificados por grupos de riesgo en el CCIT y en las gestantes sin CCIT. †CCIT: Cribado combinado de primer trimestre. \* RA-T21: Riesgo Alto para T21 ( $\geq 1/50$ ); §RI-T21: Riesgo intermedio para T21 ( $1/51-1/300$ ); ¶RB-T21: Riesgo Bajo para T21 ( $< 1/300$ ); ‡‡RA-T18: Riesgo Alto para T18 ( $\geq 1/50$ ); ‡‡RI-T18: Riesgo Intermedio para T18 ( $1/51-1/300$ ); §§RB-T18: Riesgo Bajo para T18 ( $< 1/300$ ); ªADNf: ADN fetal libre; ªVC: vellosidad corial; ªLA: líquido amniótico. ªR: renuncia; \*1 gestante con alteración ecográfica mayor de primer trimestre distinta de TN; \*\*2gestantes con alteración ecográfica mayor de primer trimestre distinta de TN. ª2 falsos negativos de CCIT diagnosticados prenatalmente.

Todos los estudios complementarios realizados mediante técnica de MLPA o array-CGH, en todas las gestaciones que tuvieron un riesgo alto ( $R \geq 1/50$ ) en el CCIT y en aquellas con anomalías ecográficas que tuvieron resultados normales en la QF-PCR, fueron también normales.

Hubo dos falsos negativos para T21 en el CC1T en este periodo, que se corresponden con los casos 1 y 2 de la **tabla 5.4** del retrospectivo.

De las 6 gestantes con TN  $\geq$  a p97,5 con CC1T de bajo riesgo y TN en p97,5 sin CC1T (**tabla 5.13**):

- 3 tuvieron un percentil de TN en 97,5: 2 de ellas con un CC1T de bajo riesgo, una con resultado normal y la segunda con T21 (caso 1, falso negativo de la **tabla 5.4**), y la tercera fue una gestante gemelar sin CC1T en la que se diagnosticó, como en el caso 1, una T21.
- Las otras 3 gestantes tuvieron una TN en p99 y el resultado del cariotipo fue normal.

### 5.3.3. Comparación entre el periodo 2015-2016 y el periodo 2013-2014

#### 5.3.3.1. Población a estudio

##### a) Edad materna

**Tabla 5.15:** gestantes con **edad mayor o igual a 35 años con CC1T** en el total de gestantes que se realizaron el CC1T en cada periodo.

Periodo	$\geq 35$ años	Total con CC1T	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	1497	2386	0,6274099	0,6078105-0,646582	0,1942
2013-2014	1427	2208	0,6462862	0,6260935-0,665949	

**Tabla 5.16:** gestantes con **edad mayor o igual a 35 años sin CC1T** en el total de gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	$\geq 35$ años	Total sin cribado	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	52	60	0,8666667	0,754794-0,932706	0,9701
2013-2014	50	59	0,8474576	0,7316546-0,919139	

### b) Gestantes con CC1T de riesgo

**Tabla 5.17:** gestantes con **CC1T de riesgo** atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes que se realizaron el CC1T en cada periodo.

Periodo	CC1T de riesgo	Total con CC1T	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	135	2386	0,05658005	0,0480026-0,0666416	0,04164
2013-2014	95	2208	0,04302536	0,0353185-0,0523849	

**Tabla 5.18:** gestantes con **CC1T de alto riesgo** ( $R \geq 1/50$ ) en el total de gestantes que tuvieron un riesgo en el CC1T en cada periodo.

Periodo	CC1T de alto riesgo	Total con CC1T de riesgo	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	36	135	0,2666667	0,1992881-0,3474745	0,4118
2013-2014	20	95	0,2105263	0,1403282-0,3041162	

**Tabla 5.19:** gestantes con **CC1T de riesgo intermedio** ( $R 1/51-1/300$ ) en el total de gestantes que tuvieron un riesgo en el CC1T en cada periodo.

Periodo	CC1T de riesgo intermedio	Total con CC1T de riesgo	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	99	135	0,7333333	0,6525255-0,8007119	0,4118
2013-2014	75	95	0,7894737	0,6958838-0,8596718	

### c) Gestantes con CC1T de bajo riesgo

**Tabla 5.20:** gestantes con **CC1T de bajo riesgo** atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes que se realizaron un CC1T en cada periodo.

Periodo	CC1T de riesgo bajo	Total con CC1T	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	95	2386	0,0398155	0,0326746-0,0484969	$< 2,2 \cdot 10^{-16}$
2013-2014	736	2208	0,3333333	0,3139854-0,3532840	

**Tabla 5.21:** gestantes con EMA y CC1T de bajo riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes que se realizaron un CC1T en cada periodo.

Periodo	EMA con CC1T bajo riesgo	Total con CC1T	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	12	2386	0,005029338	0,002798-0,0089171	<2,2 * 10 <sup>-16</sup>
2013-2014	669	2208	0,302989130	0,284188-0,322502	

**Tabla 5.22:** gestantes con otras indicaciones con CC1T de bajo riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes que se realizaron un CC1T en cada periodo.

Periodo	Otras indicaciones en riesgo bajo	Total con CC1T	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	83	2386	0,0347862	0,0281398-0,0429898	0,4453
2013-2014	67	2208	0,0303442	0,0239490-0,0384379	

#### d) Gestantes sin CC1T

**Tabla 5.23:** gestantes sin CC1T que acudieron a la consulta de asesoramiento en el total de gestantes atendidas en dicha consulta en cada periodo.

Periodo	Sin CC1T	Gestantes en asesoramiento	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	60	290	0,20689655	0,1642542-0,2575145	1,096 * 10 <sup>-11</sup>
2013-2014	59	890	0,06629213	0,0517043-0,0847610	

En las tablas se observa que la población de gestantes con edad  $\geq$  a 35 años, las gestantes con CC1T de riesgo y las que tuvieron CC1T de bajo riesgo e indicaciones distintas a la EMA fueron similares en ambos periodos. Durante el periodo 2013-2014 las gestantes que fueron atendidas en la consulta de asesoramiento genético prenatal con CC1T de bajo riesgo representan el 33% de todas las gestantes con CC1T. En el 90% de ellas la indicación fue sólo la EMA. El número de gestantes atendidas sin CC1T en cada periodo fue el mismo.

### 5.3.3.2. Efectividad

#### 5.3.3.2.1. Gestantes atendidas en la consulta

**Tabla 5.24:** gestantes con EMA y CC1T de riesgo bajo que acudieron a la consulta de asesoramiento en el total de gestantes con CC1T de riesgo bajo atendidas en dicha consulta en cada periodo.

Periodo	EMA con CC1T bajo riesgo	CC1T de riesgo bajo en asesoramiento	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	12	95	0,1263158	0,0727754-0,2100528	<2,2 * 10 <sup>-16</sup>
2013-2014	669	736	0,9089674	0,8858066-0,9277069	

**Tabla 5.25:** gestantes con EMA y CC1T de riesgo bajo que acudieron a la consulta de asesoramiento en el total de gestantes atendidas en dicha consulta en cada periodo.

Periodo	EMA con CC1T bajo riesgo	Gestantes en asesoramiento	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	12	290	0,0413793	0,0232762-0,0719618	< 2,2 * 10 <sup>-16</sup>
2013-2014	669	890	0,751685	0,7221961-0,7789225	

**Tabla 5.26:** gestantes con otras indicaciones y CC1T de bajo riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes con CC1T de bajo riesgo atendidas en dicha consulta en cada periodo.

Periodo	Otras indicaciones en riesgo bajo	CC1T de riesgo bajo en asesoramiento	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	83	95	0,8736842	0,7899472-0,9272245	< 2,2*10 <sup>-16</sup>
2013-2014	67	736	0,0910326	0,0722931-0,1141933	

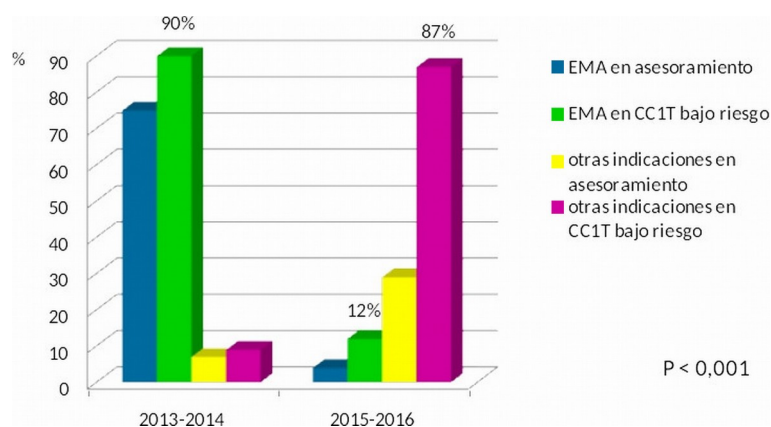
**Tabla 5.27:** gestantes con otras indicaciones con CC1T de bajo riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes atendidas en dicha consulta en cada periodo.

Periodo	Otras indicaciones en riesgo bajo	Gestantes en asesoramiento	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	83	290	0,2862069	0,2372942-0,3409371	< 2,2*10 <sup>-16</sup>
2013-2014	67	890	0,0752809	0,0596870-0,0946753	

**Tabla 5.28:** gestantes con CC1T de riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes atendidas en dicha consulta en cada periodo.

Periodo	CC1T de riesgo	Gestantes en asesoramiento	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	135	290	0,4655172	0,4089651-0,5230077	< 2,2 * 10 <sup>-16</sup>
2013-2014	95	890	0,1067416	0,0881139-0,1288882	

Durante el periodo 2015-2016 hubo un 78% menos de gestantes atendidas en asesoramiento por EMA con CC1T de bajo riesgo sobre el total de las gestantes atendidas con CC1T de bajo riesgo, y un 71% menos de estas mismas gestantes en el total de las atendidas en consulta de asesoramiento. Durante este mismo periodo, el 87% de las gestantes con CC1T de bajo riesgo que son atendidas en la consulta lo fueron por otras indicaciones distintas a la EMA y representan el 29% del total de las gestantes en asesoramiento. Durante el periodo prospectivo 2015-2016 el 47% de las gestantes atendidas en consulta lo fueron por CC1T de riesgo.



**Figura 5.10.** Gráfico: gestantes atendidas por EMA y otras indicaciones en ambos periodos

### 5.3.3.2.2. Pruebas invasivas y estudios citogenéticos desequilibrados en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento

#### a) Pruebas invasivas

**Tabla 5.29:** total de las **pruebas invasivas** realizadas en el total de las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Pruebas invasivas	Gestantes en asesoramiento	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	108	290	0,3724138	0,3188360-0,4294633	9,313 * 10 <sup>-12</sup>
2013-2014	158	890	0,1775281	0,1538434-0,2040984	

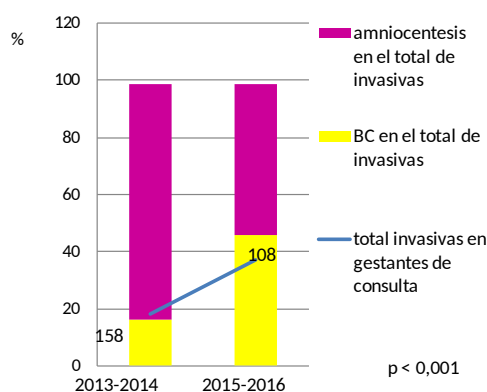
**Tabla 5.30:** **amniocentesis** realizadas en el total de las pruebas invasivas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Amniocentesis	Total invasivas	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	58	108	0,537037	0,4433512-0,6280774	2,572 * 10 <sup>-7</sup>
2013-2014	132	158	0,835443	0,7689358-0,8853852	

**Tabla 5.31:** **biopsias coriales** realizadas en el total de las pruebas invasivas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Biopsia corial	Total invasivas	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	50	108	0,462963	0,3719226-0,5566488	2,572 * 10 <sup>-7</sup>
2013-2014	26	158	0,164557	0,1146148-0,2310642	

Durante el periodo 2015-2016, el 37% de las gestantes que acudieron a asesoramiento se hicieron una prueba invasiva, frente al 18% del periodo retrospectivo. En este mismo periodo se hicieron un 30% más de biopsias coriales lo que supone un aumento del 187,5%.



**Figura 5.11.** Gráfico: Pruebas invasivas realizadas en ambos periodos

### b) Estudios citogenéticos prenatales desequilibrados

**Tabla 5.32: estudios citogenéticos prenatales desequilibrados** detectados en el total de las pruebas invasivas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Cariotipos	Total invasivas	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	27	108	0,25000000	0,1778028-0,3400544	0,0003389
2013-2014	13	158	0,08227848	0,0479571-0,1372280	

La proporción de cariotipos desequilibrados frente al total de las pruebas invasivas realizadas en cada periodo muestra ser superior en un 17% durante el periodo prospectivo.

### 5.3.3.2.3. Pruebas invasivas y renunciadas en las gestantes con indicación a ADNf: modelo contingente

#### a) Gestantes con CC1T de riesgo intermedio

**Tabla 5.33: pruebas invasivas** realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por **riesgo intermedio** en cada periodo.

Periodo	Invasivas	Riesgo intermedio	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	23	97	0,2371134	0,1633576-0,3316919	0,00003014
2013-2014	42	75	0,5600000	0,4474233-0,6665008	

**Tabla 5.34: renunciadas** a cualquier prueba genética en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por **riesgo intermedio** en cada periodo.

Periodo	Renunciadas	Riesgo intermedio	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	1	97	0,01030928	0,000000-0,06281148	1,188 * 10 <sup>-6</sup>
2013-2014	20	75	0,26666667	0,1796357-0,3773264	

**b) Gestantes con TN  $\geq$  p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo riesgo y TN en p97,5 sin CC1T**

**Tabla 5.35: pruebas invasivas** realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por TN  $\geq$  p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo riesgo y TN en p97,5 sin CC1T en cada periodo.

Periodo	Invasivas	TN $\geq$ p97,5 (<3,5 mm)	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	4	11	0,3636364	0,152082-0,647918	0,1784
2013-2014	5	6	0,8333333	0,4159742-0,9840258	

**Tabla 5.36: renunciaciones** a cualquier prueba genética en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por TN  $\geq$  p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo riesgo y TN en p97,5 sin CC1T en cada periodo.

Periodo	Renuncias	TN $\geq$ p97,5 (<3,5 mm)	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	1	11	0,09090909	0,0000000-0,4024242	1,000
2013-2014	1	6	0,16666667	0,0159742-0,5840257	

**c) Otras indicaciones**

**Tabla 5.37: pruebas invasivas** realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por antecedente de **feto anterior con aneuploidía** en cada periodo.

Periodo	Invasivas	Antecedente personal	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	0	14	0,000000	0,0000000-0,2562936	0,02052
2013-2014	5	11	0,4545455	0,2141993-0,7191340	

**Tabla 5.38: renunciaciones** a cualquier prueba genética en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por antecedente de **feto anterior con aneuploidía** en cada periodo.

Periodo	Renuncias	Antecedente personal	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	0	14	0,000000	0,0000000-0,2562936	0,02052
2013-2014	5	11	0,4545455	0,2141993-0,7191340	

**Tabla 5.39: pruebas invasivas** realizadas en las gestantes **gemelares** mayores de 35 años atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Invasivas	Gemelares	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	1	23	0,04347826	0,0000000-0,2296521	1
2013-2014	1	13	0,07692308	0,0000000-0,3576878	

**Tabla 5.40: renunciias** a cualquier prueba genética en las gestantes **gemelares** mayores de 35 años atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Renuncias	Gemelares	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	1	23	0,04347826	0,0000000-0,2296521	5,649 * 10 <sup>-6</sup>
2013-2014	11	13	0,84615385	0,5630660-0,9663457	

**Tabla 5.41: pruebas invasivas** realizadas en las gestantes con **EMA sin CC1T** atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Invasivas	EMA sin CC1T	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	2	15	0,1333333	0,0272132-0,3938393	0,178
2013-2014	10	26	0,3846154	0,2246955-0,5753045	

**Tabla 5.42: renunciias** a cualquier prueba genética en las gestantes con **EMA sin CC1T** atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Renuncias	EMA sin CC1T	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	0	15	0,0000000	0,0000000-0,2432562	0,001576
2013-2014	14	26	0,5384615	0,354812-0,711854	

d) Total de pruebas invasivas y total de renuncias en las gestantes con indicación a ADNf

Tabla 5.43: total de pruebas invasivas realizadas en el total de las gestantes con indicación a ADNf atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Total Invasivas	Total gestantes	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	30	160	0,187500	0,1344701-0,2557738	1,85 * 10 <sup>-7</sup>
2013-2014	63	131	0,480916	0,3971959-0,5657670	

Tabla 5.44: total de renuncias a cualquier prueba genética en el total de las gestantes con indicación a ADNf atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Total Renuncias	Total gestantes	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	3	160	0,018750	0,0041750-0,0568005	2,052 * 10 <sup>-15</sup>
2013-2014	51	131	0,389313	0,3102182-0,4749670	

En las gestantes con indicación a ADNf de nuestro protocolo, en el periodo 2015-2016, se hicieron un 30% menos de pruebas invasivas que en 2013-2014, lo que supone una disminución del 63% en las mismas. Las tablas muestran la disminución en cada una de las indicaciones. La disminución fue de un 57% en las gestantes con CC1T de riesgo intermedio así como en las gestantes con TN  $\geq$  p97,5 ( $<$ 3,5 mm), del 100% en antecedentes de feto anterior aneuploide, del 43% en embarazo gemelar con EMA, y del 66% en EMA sin CC1T.

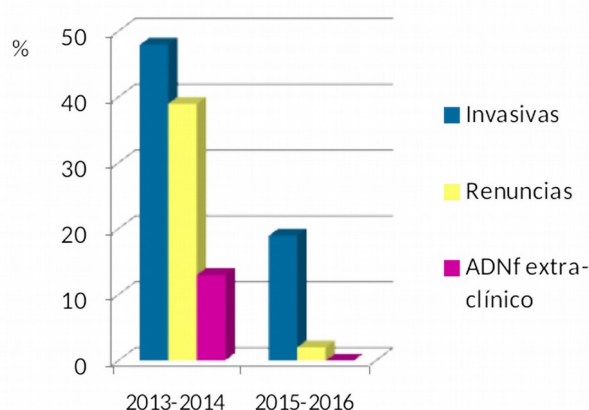


Figura 5.12. Gráfico: Pruebas invasivas, renuncias a todos los test y ADNf extraclínico en las gestantes con indicación a ADNf en ambos periodos

### 5.3.3.2.4. Pruebas genéticas prenatales en las gestantes con indicación a ADNf: pruebas invasivas, ADNf clínico (HCSC) y ADNf extraclínico

#### a) Gestantes con CC1T de riesgo intermedio

Tabla 5.45: pruebas genéticas realizadas en las gestantes con riesgo intermedio atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Pruebas genéticas	*Riesgo intermedio	*Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	104	97	0,53608	0,465883-0,6048235	0,002559
2013-2014	55	75	0,36667	0,2938710-0,4463887	

\*El total cogido para los cálculos es el total de las posibles pruebas (gestantesx2)

#### b) Gestantes con TN $\geq$ p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo riesgo y TN en p97,5 sin CC1T

Tabla 5.46: pruebas genéticas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por TN  $\geq$  p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo riesgo y TN en p97,5 sin CC1T en cada periodo.

Periodo	Pruebas genéticas	TN $\geq$ p97,5 (<3,5 mm)	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	11	11	1,000000	0,6946392-1,000000	0,7511
2013-2014	5	6	0,833333	0,415974-0,984025	

#### c) Otras indicaciones

Tabla 5.47: pruebas genéticas realizadas en las gestantes con antecedente de feto anterior con aneuploidía atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Pruebas genéticas	Antecedente personal	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	14	14	1,000000	0,743706-1,000000	0,02052
2013-2014	6	11	0,545454	0,280866-0,785800	

Tabla 5.48: pruebas genéticas realizadas en las gestantes gemelares mayores de 35 años atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Pruebas genéticas	Gemelares	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	22	23	0,9565217	0,7703479-1,000000	5,649* 10 <sup>-6</sup>
2013-2014	2	13	0,1538462	0,033654-0,4369339	

**Tabla 5.49: pruebas genéticas** realizadas en las gestantes con **EMA sin CC1T** atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Pruebas genéticas	EMA sin CC1T	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	15	15	1,0000000	0,7567438-1,00000	0,001576
2013-2014	12	26	0,4615385	0,2881453-0,645188	

#### d) Total de pruebas genéticas en las gestantes con indicación a ADNf

**Tabla 5.50: total de pruebas genéticas** realizadas en el **total** de las **gestantes con indicación a ADNf** atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Total pruebas genéticas	*Total gestantes	*Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	166	160	0,5187500	0,4641124-0,5729246	3,383*10 <sup>-7</sup>
2013-2014	80	131	0,3053435	0,2527773-0,3637641	

\*El total cogido para los cálculos es el total de las posibles pruebas (gestantesx2)

**Tabla 5.51: total de pruebas genéticas** realizadas en las **gestantes con otras indicaciones a ADNf** distintas a CC1T de riesgo intermedio y TN  $\geq$  p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo riesgo y TN en p97,5 sin CC1T, atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.

Periodo	Pruebas genéticas	Otras indicaciones	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	51	52	0,9807692	0,8874 -1,0000	7.289*10 <sup>-10</sup>
2013-2014	20	50	0,4000000	0,2763 - 0,5384	

#### e) Total de pruebas genéticas en las gestantes atendidas en asesoramiento

**Tabla 5.52: total de las pruebas genéticas** prenatales, **invasivas y ADNf**, realizadas en el total de las **gestantes** atendidas en la consulta de **asesoramiento** en cada periodo.

Periodo	Pruebas genéticas	Gestantes en asesoramiento	Proporción	IC 95%	p-valor
2015-2016	262	290	0,9034483	0,8633581-0,9325603	<2,2 * 10 <sup>-16</sup>
2013-2014	187	890	0,2101124	0,1846444-0,2381744	

Durante 2015-2016 el 90% de las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento se realizó algún tipo de prueba genética prenatal frente al 21% en el periodo 2013-2014.

## 5.4. Encuesta de calidad percibida

**Tabla 5.53:** Resultados más relevantes de la encuesta de calidad percibida que se adjunta en el **anexo 3**.

Cuestionario realizado en 166 gestantes	Muy satisfecho n (%) 5 puntos	Satisfecho n (%) 4 puntos	Ni satisfecho ni insatisfecho n (%) 3 puntos	Insatisfecho n (%) 2 puntos	Muy insatisfecho n (%) 1 punto	Sin dato n (%)	Media y desviación típica de la puntuación
Facilidad para conseguir una cita en genética	130 (78,3)	28 (16,9)	2 (1,2)	-	6 (3,6)	-	4,66 ± 0,82
Tiempo de espera desde la hora de la cita hasta ser atendido	93 (56)	55 (33,1)	7 (4,2)	7 (4,2)	4 (2,4)	-	4,36 ± 0,92
Tiempo de espera de resultados	104 (62,7)	43 (25,9)	10 (6)	3 (1,8)	5 (3)	1 (0,6)	4,44 ± 0,92
Información del cribado bioquímico prenatal (enfermería)	100 (60,2)	46 (27,7)	9 (5,4)	1 (0,6)	7 (4,2)	3 (1,8)	4,42 ± 0,95
Claridad de la información facilitada por el médico	122 (73,5)	34 (20,5)	4 (2,4)	-	6 (3,6)	-	4,60 ± 0,85
Asesoramiento médico	120 (72,3)	37 (22,3)	-	2 (1,2)	5 (3)	2 (1,2)	4,62 ± 0,82
Confidencialidad de la información	134 (80,7)	22 (13,3)	2 (1,2)	-	6 (3,6)	2 (1,2)	4,70 ± 0,82
Médico							
Eficacia	122 (73,5)	36 (21,7)	2 (1,2)	2 (1,2)	4 (1,4)	-	4,63 ± 0,78
Trato	122 (73,5)	30 (18,1)	5 (3)	3 (1,8)	5 (3)	1 (0,6)	4,58 ± 0,88
Tiempo dedicación	125 (75,3)	33 (19,9)	2 (1,2)	1 (0,6)	5 (3)	-	4,64 ± 0,81
Enfermera							
Eficacia	126 (75,9)	31 (18,7)	3 (1,8)	-	5 (3)	1 (0,6)	4,65 ± 0,79
Trato	131 (78,9)	27 (16,3)	2 (1,2)	1 (0,6)	4 (2,4)	1 (0,6)	4,70 ± 0,75
Tiempo dedicación	125 (75,3)	30 (18,1)	4 (2,4)	1 (0,6)	4 (2,4)	2 (1,2)	4,65 ± 0,78

Las **figuras 5.13; 5.14; 5.15; 5.16 y 5.17** muestran el grado de satisfacción y las características de las 166 gestantes que realizaron la encuesta.

Figura 5.13: Grado de satisfacción global

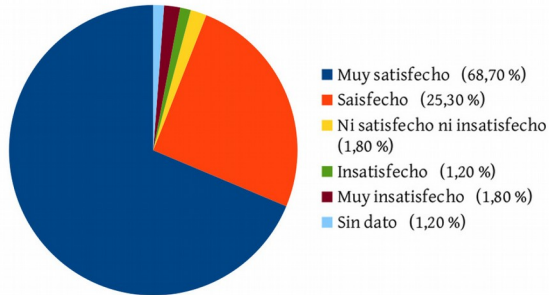


Figura 5.14: ¿Recomendaría la unidad de genética?

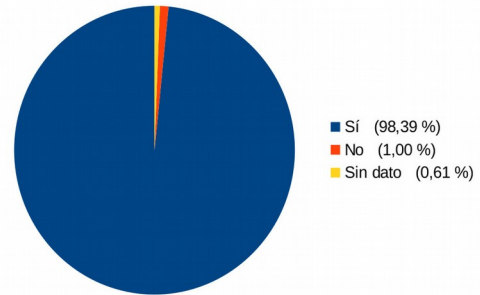


Figura 5.15: Lugar de nacimiento

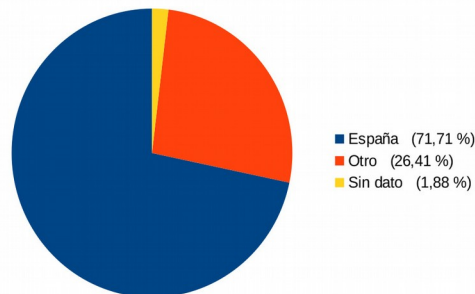


Figura 5.16: Estudios

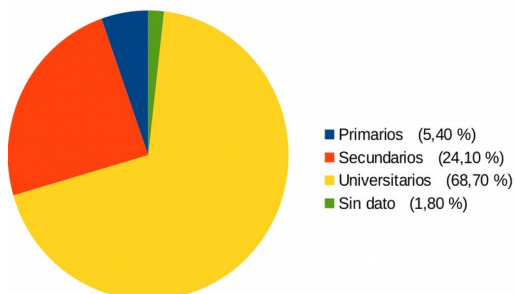


Figura 5.17: Ocupación





## 6. Discusión



## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Fase 1: estudio observacional de cohortes retrospectivo.

#### 6.1.1. CC1T y anomalías cromosómicas

Para la implementación de un nuevo protocolo de atención prenatal con la introducción del ADNf como test contingente en las gestantes con un CC1T de riesgo, resulta imprescindible conocer las anomalías cromosómicas más frecuentes en nuestra población y cómo se distribuyen en los distintos grupos de riesgo en el CC1T.

En el estudio retrospectivo de las 12327 gestantes que acudieron al HCSC durante el periodo 2009-2014 se detectaron 81 anomalías cromosómicas dando una prevalencia en nuestra cohorte del 0,7%, concordante con la bibliografía (0,8%), (89). Como era de esperar, las anomalías cromosómicas más frecuentes son las comúnmente detectadas en diagnóstico prenatal: T21, T18, T13, ACSs (incluido el 45X) y las triploidías, que constituyen el 91,4% en total. La T21, T18 y T13 representan el 80,2% de todas las anomalías cromosómicas de nuestra serie y son las más frecuentes dentro de este grupo. De la misma manera, y como también esperábamos, las anomalías cromosómicas raras o poco comunes están presentes en nuestra serie en una proporción más baja (8,6%). Todos estos resultados son concordantes con los ya descritos en la bibliografía (3,12,89,90).

Para calcular el riesgo individual de T21 de cada gestante en el CC1T es necesario establecer un riesgo *a priori* con el que poder comparar. Este riesgo *a priori* depende de la edad materna y las semanas de gestación, ya que la supervivencia de los fetos con T21 disminuye a lo largo de la misma. Los riesgos de T21 asociados sólo a la edad materna vienen dados por estudios poblacionales de la prevalencia de T21 al nacimiento en relación a la edad materna, considerando a partir de 35 años la edad de riesgo (12,63,91,92). El riesgo de T21 asociado a la edad materna en diferentes semanas de gestación fue calculado por varios autores mediante estudios en series de gestantes que se habían realizado pruebas invasivas (12,93,94). De esta manera, se han utilizado como puntos de corte de riesgo para T21, los riesgos *a priori* correspondientes a una gestante de 35 años en las semanas 12, 16 y 20 de gestación que son 1/250, 1/270 y 1/300 respectivamente (12,95). En ellos, además, el riesgo de pérdida fetal por la prueba invasiva es prácticamente equivalente al riesgo de feto afecto de T21 en una gestante de 35 años (11). Algunos autores comenzaron a utilizar el corte de 1/300 porque en

este punto se detectaba el 74% de las T21 de su población para una TFP del 5%. Esta TFP es la considerada válida para una prueba de cribado bien diseñado(94,96,97).

En nuestro estudio hemos adoptado, como otros autores (95,98) un punto de corte de riesgo en el CC1T tanto para T21 como T18 de 1/300, de forma que cualquier gestante con un riesgo en el CC1T  $\geq 1/300$  es considerada en riesgo de aneuploidía. Estos autores, Alamillo *et al.* (95) y Petersen *et al.* (98), detectan con este punto de corte un 6,3% y un 5,3% respectivamente, de gestantes con riesgo en el CC1T, que es ligeramente superior al porcentaje de gestantes de nuestra serie (4,3%). Sin embargo, el porcentaje de alteraciones cromosómicas desequilibradas totales en las gestaciones con un CC1T de riesgo en nuestra serie (12,9%) es ligeramente superior al descrito por ellos, que es de un 6,6% en Alamillo *et al.* y de un 11% en el estudio de Petersen *et al.* Un posible factor influyente es la edad materna en las distintas series, que afecta tanto al cálculo de riesgo del CC1T como a la prevalencia de las anomalías cromosómicas desequilibradas en la población. En el estudio de Alamillo *et al.*, con el que más diferencia tenemos, la edad media de sus gestantes era de 33 años frente a los 36 años en nuestra cohorte. Otro factor sería las diferencias analíticas (PAPP-A y  $\beta$ HCG libre) inherentes a cada laboratorio.

#### **6.1.1.1. CC1T de alto riesgo**

El punto de corte de alto riesgo en  $R \geq 1/50$  fue uno de los puntos de corte definidos por varios autores durante la implementación del CC1T para T21, en el que detectaban de un 79-83% de las T21 con una TFP de 1,2-1,4% (74,99).

De las anomalías cromosómicas desequilibradas con grave repercusión en el fenotipo fetal detectadas en nuestro estudio, el 74% (60/81), incluidas las poco comunes, tienen un alto riesgo en el CC1T( $R \geq 1/50$ ). En este punto de corte de alto riesgo se detectan el 76% de las T21 (32/42), el 95% de las T18 (18/19) y el 50% (10/20) de otros cariotipos desequilibrados: 3 T13; 2 45,X; 1 mosaicismo de XXY; 1 triploidía y 3 de las anomalías poco comunes o raras (1 mosaicismo de trisomía 22, 1 duplicación parcial del 5q y 1 trisomía parcial 14q con monosomía parcial 17q). Estas anomalías cromosómicas raras detectadas con cariotipo convencional representan, además, un porcentaje alto de todas las anomalías raras detectadas (43% 3/7). Estos resultados son semejantes a los ya descritos por otros autores (12,89,98,100).

La detección de alteraciones cromosómicas distintas de la T21 y T18 suele ser debido a que también presentan malformaciones fetales, fundamentalmente cardíacas (101), que se reflejan en la medida de la TN (68,71,100) y, por lo tanto, dan resultados de alto riesgo para T21 en el CC1T (95). De hecho, en este grupo de riesgo en el CC1T, la media de la medida de la

TN (3,5 mm) es estadísticamente superior (tabla 5.1) a la de las gestantes en riesgo intermedio (1,5 mm) o a las de bajo riesgo (1,3 mm). De la misma forma, las anomalías cromosómicas también pueden afectar a los valores bioquímicos del CC1T, fundamentalmente a la PAPP-A, tal y como han descrito varios autores (10,95,98,100). En nuestras gestantes con CC1T de riesgo alto e intermedio, el valor de la PAPP-A en MoM (0,6 MoM) es estadísticamente inferior que en las gestantes sin riesgo en el CC1T (1,3 MoM) (tabla 5.1).

El porcentaje de anomalías cromosómicas desequilibradas que podemos detectar con el punto de corte de riesgo  $\geq 1/50$  y, los ratios de anomalías frente a gestaciones en cada uno de los grupos de alto riesgo (1/1-1/4,5; tabla 5.2), apoyan la recomendación de ofrecer prueba invasiva en este grupo. Como en nuestras 147 gestaciones con CC1T de alto riesgo diagnosticamos T21, T18 ó T13 en 1 de cada 3 gestantes, de aplicar el ADNf retrasaríamos el diagnóstico y duplicaríamos las pruebas genéticas en un 30% de los casos, puesto que su resultado ha de comprobarse mediante prueba invasiva (72). Además, en nuestro caso perderíamos 2 45,X; 1 triploidía; 1 mosaicismo XXY y el 43% de las anomalías cromosómicas raras. Por lo tanto, consideramos que a las gestantes con un alto riesgo en el CC1T sólo se les debe ofrecer en nuestro hospital prueba invasiva.

#### **6.1.1.2. CC1T de riesgo intermedio**

Hemos considerado que las gestantes con riesgos 1/51-1/300 se encuentran en un riesgo intermedio porque el porcentaje de anomalías desequilibradas que se detectan en este grupo es bajo (2,3%).

De hecho, los ratios de las anomalías frente a las gestantes en cada uno de los grupos de riesgo intermedio (1/28-1/58; tabla 5.2) sugieren la posibilidad de ofrecer a estas gestantes un ADNf como alternativa a la prueba invasiva.

De las 9 anomalías cromosómicas diagnosticadas en estas gestaciones, 5 son T21, T18 ó T13 y las otras 4 no podrían ser detectadas por el método de ADNf elegido para nuestro protocolo:

A. 1 triploidía que en nuestra serie fue detectada por ecografía en el 2º trimestre de la gestación. De hecho el 53% de las triploidías se diagnostican entre las 14-20 semanas de gestación (3). La triploidía es una anomalía cromosómica grave que ocurre en aproximadamente un 1% de las concepciones pero suele ser letal y tiene una incidencia en los abortos espontáneos del 10-20%. Se estima una incidencia durante el primer trimestre de gestación de 1/3500 y entre la 16-20 semanas en 1/5000 (102,103) con sólo un 3% de casos

descritos al nacimiento (3). Más del 92% de los casos son detectados prenatalmente (3). Se caracteriza por una dotación haploide completa ( $3n$ : 69 cromosomas) y se clasifica en dos tipos dependiendo de su origen paterno (dispermia) o materno (diginia) que suelen tener fenotipos diferentes. Mientras que las de origen paterno suelen dar TN elevada, placenta molar con feto menos malformado y aumento de la  $\beta$ HCG libre con disminución de la PAPP-A, las de origen materno suelen presentar placenta no molar con CIR precoz y disminución de la PAPP-A y la  $\beta$ HCG libre (102,104). Por ello, las primeras suelen dar riesgos altos para T21 en el CC1T, y las segundas suelen dar riesgos altos o intermedios para T18. Se estima que el 83,3-85% dan un CC1T de riesgo (104,105). Presentan, además de alteraciones de la bioquímica placentaria (PAPP-A y  $\beta$ HCG libre), malformaciones ecográficas mayores que se detectan en la ecografía del 1º o 2º trimestre (102,103,106), por lo que es poco probable que perdiéramos su diagnóstico al implementar el ADNf, a pesar de que la secuenciación de genoma completo no permita descartar dotaciones cromosómicas euploides (múltiplos de número haploide,  $n$ ) (105).

**B.** 3 ACSs: 1 47,YYY; 1 47,XXX y 1 mosaicismo 45,X. Las ACSs tienen una prevalencia prenatal de 1/463 (107), y suelen presentar un fenotipo más leve-moderado sin anomalías ecográficas. Su diagnóstico habitualmente es un hallazgo casual en las gestaciones en las que se realiza una prueba invasiva por EMA o CC1T de riesgo para T21 y/o T18 (95,108). Los casos 45,X puros o completos son detectables en el primer trimestre de gestación por presentar generalmente un higroma quístico por lo que no sería esperable perder su diagnóstico (109-111). Sin embargo, los mosaicismos de esta anomalía (45,X) pueden presentar fenotipos muy leves sin alteración ecográfica. Dentro de las ACSs, el cariotipo 47,YYY, que es de origen paterno, presenta un fenotipo muy leve, y el cariotipo 47,XXX ha sido asociado a EMA (107). Probablemente la mayoría de los casos estén sin diagnosticar en nuestra serie porque el 88% (3022/3423) de las gestantes con EMA y CC1T de bajo riesgo renuncian a prueba invasiva.

Nuestro protocolo con ADNf no incluye la determinación del sexo fetal y asumimos que no vamos a poder diagnosticar estas 3 ACSs. En el momento de la implementación de este protocolo los datos indicaban una sensibilidad alta (90-100%) (26,112,113) para las ACSs pero con más falsos positivos que para la T21, debidos fundamentalmente a los mosaicismos confinados a la placenta o a los mosaicismos maternos, lo que podría afectar al número de pruebas invasivas en este grupo de gestantes (114,115). Los datos de sensibilidad del 90-93% de alguno de estos estudios estaban calculados basándose en la prevalencia de estas anomalías en la población (113), puesto que dichas anomalías no suelen dar signos al nacimiento que permitan detectar los falsos negativos, y los autores que dan el 100% no habían excluido la

presencia de estas anomalías en los recién nacidos (26,112). Por otro lado, las sociedades de genetistas americanos y europeos no recomendaron su determinación considerando no sólo su falta de validación clínica sino también motivos ético-legales por un posible uso para la selección de sexo (17).

Trabajos más recientes describen un 1,1 % de casos con ADNf de riesgo a las ACSs (116,117), lo que dobla los casos de riesgo positivo en ADNf aumentando sus falsos positivos, pues el VPP para las ACSs en sus trabajos es del 34-37%, inferior al que había sido descrito anteriormente del 48-54% (26,112). Bevilacqua *et al.* (117) indica que un 62% de las gestantes desean tener información de las ACSs. Sin embargo, Reiss *et al.* (118) discuten que las gestantes con ADNf de riesgo para estas anomalías lamentan haber decidido optar a esta información ya que dificultó su decisión posterior, aunque sin especificar qué porcentaje de ellas. De hecho, varios trabajos ponen de manifiesto que las gestantes con ADNf de riesgo para ACSs renuncian a la prueba invasiva más que en los ADNf de riesgo para otras aneuploidías, con porcentajes que varían desde el 26-66% (117,119-121). Ello nos indica la importancia del asesoramiento genético pre-test, que debe informar acerca de la clínica de estos síndromes y de las limitaciones de la técnica para evitar la ansiedad en caso de resultado adverso en el ADNf.

En revisiones posteriores de nuestro protocolo, no incluidas en este estudio, y tras la validación clínica de estas anomalías en el ADNf, la determinación de las ACSs ha sido incluida en nuestro protocolo por respeto al principio de autonomía de las gestantes a pesar del incremento de falsos positivos que pudiéramos tener.

En este grupo de riesgo intermedio no se detectaron anomalías cromosómicas raras mediante cariotipo convencional, y no puede descartarse completamente la existencia de alteraciones cromosómicas crípticas o microdeleciones, aunque los datos al nacimiento fueron normales, salvo en aquellas gestaciones en las que se realizó array-CGH y/o MLPA por alteraciones ecográficas del primer o segundo trimestre. Hay muy pocos autores que aporten información acerca de la prevalencia prenatal de estas anomalías crípticas en las gestantes con riesgo en el CC1T. Estos autores dan una incidencia en global que va desde un 0,3%-2,1%, pero en sus series las indicaciones son muy diversas e incluyen ansiedad materna, EMA, antecedentes personales y familiares y principalmente, anomalías ecográficas (58,59,122-127). Es más, algunos de ellos no detectan ninguna de estas anomalías en cribados de riesgo y sí en gestantes con ansiedad (0,5-0,7%) (123,125) o con EMA (0,5%) (125). Y entre los que detectan anomalías crípticas, Van Opstal *et al.* (126) (0,7% en EMA y 0,4% en CC1T de riesgo), Grati *et al.* (58) (0,2% en EMA, 0,13% en ansiedad y 0,3% en CC1T de riesgo) y Scott *et al.* (123) (0,6% en EMA y 0,6% en CCIT de riesgo) no encuentran diferencias estadísticamente significativas en la

aparición de estas anomalías entre las gestantes con EMA, ansiedad o CC1T de riesgo. En el caso de Van Opstal *et al.* (126) las alteraciones que detecta en gestantes con CC1T de riesgo son clasificadas como hallazgos casuales e inesperados. No hay evidencia en el momento actual de que estas alteraciones crípticas estén relacionadas con CC1T de riesgo, ni con la edad materna (3,58,107), aunque sí con algunas alteraciones ecográficas, como el CIR y las cardiopatías congénitas (128–130). En este último caso serían detectadas en nuestro protocolo con indicación a prueba invasiva por alteración ecográfica.

Vogel *et al.* más reciente analiza una población de gestantes con riesgo  $>1/300$  en el CC1T, y argumenta que al disminuir las pruebas invasivas a un punto de corte  $\geq 1/50$  perderíamos el 100% de las anomalías crípticas en las gestantes con riesgo en el CC1T (131). Sin embargo, de las 13 alteraciones que describe este autor en las gestantes con riesgo entre  $1/51$  y  $1/300$ , 3 alteraciones patogénicas se detectan en cariotipo convencional, 6 alteraciones son de susceptibilidad, y 1 alteración es una deleción probablemente patogénica que incluye 2 genes: uno asociado a retinitis pigmentaria autosómica recesiva, y otro a anomalías congénitas del riñón y tracto urinario (CAKUT), con patrón autosómico dominante, que en su forma grave podría detectarse en ecografía. Los 3 últimos síndromes de microdeleción que detecta son patogénicos, y dan una prevalencia del 0,7% en su cohorte de riesgo intermedio ( $1/51$ - $1/300$ ), muy similar a la descrita por otros autores antes mencionados en gestantes con EMA o ansiedad. Además, 2 de ellos son síndromes de microdeleción 22q11.2 (DiGeorge/Velocardiofacial) y no describe si tenían alteraciones ecográficas cardíacas que permitieran su detección, presentes en el 77% de los pacientes con este síndrome y por tanto, potencialmente detectables en ecografía (132).

Por último, Grati *et al.* (58) que en su serie de 9327 gestantes con diferentes indicaciones detecta síndromes de microdeleción en el 0,7% de los casos, refiere que el 71% de ellas afectan a la región crítica 22q11.2 y que las demás alteraciones crípticas muestran una incidencia  $< 1/1000$ , lo que concuerda con los datos de prevalencia de un 0,004-0,06% en recién nacidos vivos (3,57). Por tanto el hallazgo de estas alteraciones crípticas en gestantes con CC1T de riesgo parece fortuito y probablemente también estén presentes en todas las gestaciones de bajo riesgo sin indicación a prueba invasiva y permanezcan sin diagnosticar.

Nuestro protocolo ofrece, por tanto, un ADNf como alternativa a la prueba invasiva a las gestantes con un riesgo intermedio en el CC1T.

### 6.1.1.3. Otros puntos de corte en los CC1T de riesgo

Hemos analizado en nuestra cohorte la distribución de los 81 cariotipos desequilibrados en puntos de corte de riesgo en el CC1T diferentes a los utilizados en nuestro protocolo, con el fin de determinar la posibilidad de ampliar la implementación del ADNf a otras gestantes en riesgo (tabla 5.3). En el punto de corte  $\geq 1/10$  detectamos un porcentaje de T21 del 64,3% y de T18 del 68,4%, semejante al que describen Gil *et al.* para T21 (63,8%) y un poco inferior al que describen para la T18 (79,2%) (19). En el punto de corte  $\geq 1/50$  nuestra detección de T21 (76,2%) y T18 (94,7%), es similar a la de estos mismos autores para T21 (80,9%) y superior para T18 (87,5%). Teniendo en cuenta la variabilidad en el fenotipo que presentan estas anomalías podemos considerar que nuestros datos son concordantes.

En cuanto a los demás cariotipos desequilibrados, en nuestra cohorte se detectan:

- en el punto de corte  $R \geq 1/10$ , el 50% de las T13, el 50% de las triploidías, el 100% de los 45,X, el 20% de ACSs y el 43% de las anomalías raras.
- en el punto de corte  $R \geq 1/50$ , el 75% de las T13, el 50% de las triploidías, el 100% de los 45,X, el 20% de ACSs y el 43% de las anomalías raras.

Estos datos son similares a los de Syngelaki *et al.* que detectan en  $R \geq 1/10$  el 28% de las triploidías, el 84% de las 45,X; el 27% de ACSs y el 30% de las anomalías raras. Y en el  $R \geq 1/50$ , el 64% de las triploidías, el 95% de los 45,X; el 61% de ACSs y el 55% de las anomalías raras (89). Estos autores no dan datos para la T13 de manera aislada sino en conjunto con la T18. Las diferencias con nuestros datos se deben no sólo a la variabilidad fenotípica de estas anomalías cromosómicas, sino también a que su serie de gestantes es mayor (74651) y, dada la baja prevalencia de las anomalías cromosómicas, ese número de gestantes permite describir un número mayor anomalías, lo que podría influir en los porcentajes.

El 66% de nuestras 73 anomalías cromosómicas con fenotipo grave, entre las que se encuentran las T21; T18; T13; 45,X; triploidías y otras aneuploidías totales o parciales raras no detectables por ADNf, se encuentran en riesgos superiores al 1/10. Este dato concuerda con el de Syngelaki *et al.* en el que el 70% de sus 564 anomalías fenotípicamente graves se encuentran en dicho riesgo (89). En nuestra serie, la única diferencia entre el punto de corte en 1/10 y 1/50 en la detección de anomalías cromosómicas severas con grave repercusión distintas de la T21 y T18, es una T13 (tabla 5.3) que es detectable por ADNf. Es más, también podría detectarse mediante ecografía en caso de un falso negativo en este test, dado que la sensibilidad del ADNf para esta trisomía puede ser menor (84.5-100%) (20,25,27,133).

Con nuestros datos podemos considerar como alto riesgo y ofrecer sólo prueba invasiva a las gestantes en el punto de corte 1/10, y ampliar el ADNf a las gestantes que se encuentran entre el 1/11-1/300. Sin embargo, con un riesgo  $\geq$  1/50 nuestra detección de anomalías desequilibradas total (74%, 60/81) es superior que con un riesgo  $\geq$  1/10 (60%, 49/81) lo que nos inclina a elegir como corte el 1/50. Puesto que todas las anomalías cromosómicas detectadas por ADNf han de ser confirmadas mediante una prueba invasiva (única prueba diagnóstica) y entre 1/11-1/50 hay 11 anomalías cromosómicas, duplicaríamos los test genéticos prenatales en el 7% de las gestantes de este grupo y retrasaríamos su diagnóstico. Además, la baja prevalencia de anomalías cromosómicas raras no detectables mediante ADNf nos obliga a mantener cierta prudencia y obtener más evidencias antes de implementar el punto de corte de riesgo en 1/10. A ello hay que añadir la necesaria validación clínica del ADNf al iniciar el protocolo para evitar los falsos negativos de este cribado.

Algunos autores han estimado el porcentaje de población obstétrica que se encuentra entre los riesgos 1/11-1/1000 y 1/51-1/1000 para T21 con cifras del 12,8% y 11,8% respectivamente (89), lo que coincide casi exactamente con los datos de nuestra cohorte del 12,1% y 11,6% para esos mismos tramos. La tasa de detección para T21 en el punto de corte de 1/1000 es del 96%-98% en sus estudios (19,89,134), pero nosotros sólo tenemos una tasa de detección en ese punto de corte del 88% porque entre 1/301-1/1000 hay 1048 gestantes y sólo 2 casos de T21. Con el coste actual del ADNf se incrementarían mucho los costes de implementación de nuestro protocolo si utilizásemos el punto de corte de 1/51-1/1000.

#### **6.1.1.4. CC1T de bajo riesgo**

En nuestras gestantes de riesgo bajo en el CC1T ( $<1/300$ ) hay 12 alteraciones cromosómicas: los 7 falsos negativos para la T21, 1 ACSs y 4 anomalías poco comunes: 1 tetraploidía; 1 mosaico de trisomía 20; 1 cromosoma marcador derivado del 15 sin eucromatina (sin genes activos) y 1 delección 13q en mosaico. El porcentaje de las anomalías raras en estas gestaciones es elevado (57%, 4/7 tabla 5.2), y es concordante con el de otros autores [55%, (98)]. La única que tiene relevancia clínica es la delección 13q en mosaico que fue detectada en ecografía del 2º trimestre por malformación Dandy-Walker.

Es importante destacar el papel imprescindible de los seguimientos ecográficos en la detección de gestaciones en riesgo de cualquier tipo de anomalía cromosómica, incluidas las raras, las triploidías (que el ADNf no puede detectar con técnica de secuenciación masiva), y los falsos negativos tanto del CC1T como del ADNf. De hecho en nuestra serie, el 33% (4/12) de las alteraciones con CC1T de riesgo bajo (3 falsos negativos para T21 y la delección parcial del

13q en mosaico) y 1 triploidía con riesgo intermedio, fueron detectadas por alteraciones ecográficas.

Su papel es imprescindible también en el momento de decidir, dentro de un equipo prenatal multidisciplinar, qué opciones diagnósticas o de cribado son las mejores que podemos ofrecer a cada gestante individualmente. La ecografía determina la viabilidad fetal, la edad gestacional, la gestación múltiple, el gemelo evanescente y la patología fetal, materna y placentaria que pueden cambiar las estrategias diagnósticas o de cribado en cada gestante (135,136).

Reiff *et al.* encuentran un 3,5% de hallazgos inesperados en la ecografía del primer trimestre realizada en gestantes con EMA y ADNf de bajo riesgo (137), y Vora *et al.* describe un 16,1% de estos hallazgos en gestantes con EMA que acuden al cribado ecográfico de primer trimestre (136). Entre estos hallazgos se encuentran las pérdidas fetales, los errores en la edad gestacional, los embarazos múltiples y las malformaciones fetales. Estas últimas no sólo son importantes para la detección de anomalías cromosómicas, sino también para realizar un diagnóstico temprano de las mismas que permitiría informar a los progenitores para su toma de decisiones en la gestación en curso (138). De nuevo, no podemos olvidar que la ecografía tiene una sensibilidad para detectar malformaciones de un 32-60% y que el 75% de ellas aparecen en población de bajo riesgo (8,139-141). De hecho, el 90% de los recién nacidos con anomalías congénitas son de mujeres sin factores de riesgo (8). Por lo tanto, la ecografía a lo largo de la gestación es una oportunidad para la detección de alteraciones genéticas con la búsqueda no sólo de malformaciones sino también de marcadores ecográficos menores (11,65).

Durante este periodo retrospectivo las gestantes con EMA independientemente del resultado del CC1T eran remitidas a la consulta de asesoramiento genético. La EMA dejó de ser una indicación con el desarrollo de los cribados bioquímicos y ecográficos, y no es un parámetro eficiente por sí sólo para la detección de anomalías cromosómicas por su alta TFP (10,64).

Puesto que los falsos negativos de nuestra serie son más frecuentes en mujeres < 35 años que no son remitidas a la consulta y que el 88% de las gestantes con EMA y CC1T de bajo riesgo renuncian a una prueba invasiva, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (21,142), consideramos que las gestantes cuya única indicación sea la EMA y su CC1T sea de riesgo bajo no deben ser enviadas a la consulta de asesoramiento genético, y deben ser asesoradas por los obstetras en sus consultas.

### **6.1.2. Falsos negativos para T21**

De los 7 falsos negativos para T21, 4 se detectaron prenatalmente (tabla 5.4), 3 de ellos por alteración ecográfica. El 71% (5/7) de estos falsos negativos fue en gestantes menores de 35 años. La edad materna tiene un peso específico en el algoritmo para el cálculo de los riesgos de modo que el porcentaje de CC1T con riesgo aumenta con la edad materna (143). Hay trabajos que describen que para un punto de corte en el CC1T de 1/100 el rango de detección de T21 aumenta con la edad materna del 72%, 77% y 92% para los 20, 30 y 40 años respectivamente (74). Otros autores dan una sensibilidad para las gestantes menores del 35 años de un 75% para una TFP del 5% lo que parece apoyar que los falsos negativos sean más frecuentes en este grupo (11,144).

Nuestra sensibilidad del 83% con una TFP del 2,3% para T21 es similar a la de algunos autores que dan una sensibilidad del 83,3% con una TFP de 3,2% (145), manteniéndose dentro de los rangos recomendados por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, que son del 80-90% para una TFP no superior al 5% (21). Sin embargo, está en los rangos bajos que tienen otros grupos, que para una TFP del 5% van del 80-95% (10,11,99,100,134,146). Solamente mejorando nuestra sensibilidad para T21 en el CC1T podemos aumentar su detección, aumentando también nuestra TFP. No obstante, la T21 tiene una clínica variable y no todos ellos presentan signos que los hagan detectables en un CC1T por lo que siempre habrá falsos negativos para esta trisomía que están estimados en un 10-15% (21).

Los estudios realizados para evaluar la efectividad del ADNf demuestran un VPP para T21 en población de bajo riesgo que va del 45,5% (147) al 80% (41), y en población de alto riesgo del 92% (133) al 94% (148), con una sensibilidad y especificidad superiores al 99% (41,133,148). Algunos de estos autores también describen el VPP de los cribados bioquímicos de primer y segundo trimestre en conjunto, dando valores que van de 3,4% (41) al 4,2% (147), inferiores al de nuestro estudio (10,9%) que sólo se refiere al CC1T. Probablemente nuestra TFP más baja cree estas diferencias. De todas formas, es evidente que el VPP del CC1T es muy inferior al del ADNf, y si tenemos en cuenta este hecho, y que los falsos negativos para T21 son más frecuentes en las gestantes menores de 35 años, sería necesario introducir el ADNf en toda la población obstétrica para disminuir los falsos positivos del CC1T y detectar la gran mayoría de los falsos negativos. Todo ello sin dejar de utilizar el CC1T puesto que la ecografía del primer trimestre permite la detección de anomalías ecográficas que nos ayudan a diagnosticar otras alteraciones cromosómicas distintas de la T21, y los valores bioquímicos (PAPP-A) ayudan al seguimiento de la preeclampsia, el parto pretérmino y el bajo peso al nacimiento (149-152).

Actualmente el coste del ADNf no permite implementar esta estrategia en nuestro sistema público de salud.

### **6.1.3. TN en percentil $\geq 97,5$ , riesgo en el CC1T para T21 y resultados de cariotipo.**

#### **a) TN en p97,5**

Actualmente, una TN en p97,5 no está considerada una indicación de prueba invasiva, pero es una medida elevada, y de hecho, los primeros trabajos que valoraban el punto de corte para los percentiles de la TN ajustados a la edad gestacional para la detección de anomalías cromosómicas utilizaban un percentil de TN  $\geq 95$  (96,97). Usando estos percentiles las TFP eran muy elevadas lo que obligaba a muchas gestantes a realizarse una prueba invasiva con riesgo de pérdida fetal. Souka *et al.* describe una prevalencia de anomalías cromosómicas entre las gestaciones con percentil de TN entre 95-99 de un 3,7% (68), sin embargo, en nuestra serie la prevalencia es superior (8,5%) teniendo en cuenta solamente el rango de 97,5-99. Es posible que esta diferencia se deba a que en la escala de Borrell *et al.* (88) los valores de TN en relación a la LCC son superiores en todos los percentiles comparados con los de otros autores (96). Nosotros consideramos más adecuada la escala de Borrell para valorar los percentiles puesto que está diseñada con población española y en el p99 da una escala en función de la LCC de 2,27-3,78 mm y no un valor fijo de 3,5 mm para dicho percentil como define la Fundación de Medicina Fetal (153). No obstante, otros autores describen, con escala de la Fundación de Medicina Fetal ([www.fetalmedicine.com](http://www.fetalmedicine.com)), hasta un 15% de anomalías cromosómicas en el rango de TN de p95-99, por lo que las diferencias también podrían estar en el observador (71).

Las únicas anomalías cromosómicas que se detectaron en nuestra serie en este grupo de gestaciones con TN en p97,5 fueron 3 T21: dos de ellas falsos negativos de nuestro CC1T y ambas en gestantes < de 35 años, probablemente porque la edad modificó sus riesgos a pesar de la medida de la TN (casos 1 y 5, tabla 5.4). La tercera T21 fue en una gestante mayor de 35 años con alto riesgo. Dado que sólo tenemos 21 gestantes con una medida de TN en p97,5 con CC1T de bajo riesgo (Grupo A, tabla 5.5), y que podríamos detectar los 2 casos falsos negativos a través del percentil de la TN, es asumible un ADNf en este grupo de gestantes

#### **b) TN en p99**

En nuestra serie el porcentaje de gestaciones con TN en p99 ( $\geq 3,5$  mm) (1,2% 142/12.327) es concordante con el 0,9-1,8% descrito en la bibliografía (72,138,154,155). La bibliografía describe de un 33-38% de anomalías cromosómicas visibles en cariotipo en este percentil

(71,72), además de otros síndromes o malformaciones, fundamentalmente cardíacas (68,69). Los datos de nuestra serie son también concordantes con los de Srebniak *et al.* (72) puesto que en nuestra serie se detectan cromosopatías en el 36% (51/142) de los casos, al igual que en su serie.

Las anomalías cromosómicas más frecuentemente detectadas en nuestra cohorte (34%, 48/142) son las más comunes descritas en la literatura (T21, T18, T13, triploidía y 45,X) (12,68,72,110), mientras que las anomalías raras representan tan sólo el 2% de los casos (3/142). Estos datos son concordantes con los descritos por otros autores que detectan un 1,4% de anomalías raras (72) por cariotipo convencional. Por tanto, una TN elevada en p99 ( $\geq 3,5$  mm) está asociada a alto riesgo de anomalías cromosómicas y es indicación de prueba invasiva (21).

La bibliografía describe diferentes porcentajes de anomalías cromosómicas raras en las gestaciones que presentan una TN en p99 con medida  $\geq 3,5$  mm. Con técnicas de array-CGH describen anomalías crípticas en estas gestaciones, que presentan únicamente TN en p99, en porcentajes que van desde el 0% al 5,3% (72,122,127,130,154-162),

En el meta-análisis realizado por Grande *et al.* (153), en el que se incluyen varios de los autores antes referenciados, se concluye que cuando hay TN en p99 ( $\geq 3,5$  mm) sin otras malformaciones ecográficas, el array-CGH detecta un 4-5% de alteraciones más que el cariotipo convencional. Sin embargo, en nuestra serie hay un 0% de anomalías cromosómicas crípticas, como ya han descrito otros autores (157-159), pues todos los estudios mediante MLPA y array-CGH realizados en nuestras gestantes fueron normales. Estudios recientes muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las alteraciones cromosómicas detectadas mediante cariotipo convencional o array-CGH en las gestaciones con TN elevada, y que utilizar la TN con el único propósito de detectar anomalías crípticas raras no es útil (135,163). No obstante, como este cribado ecográfico de primer trimestre ha de ser realizado y se han de descartar mediante prueba invasiva las aneuploidías en todas las gestantes con TN en p99 ( $\geq 3,5$  mm), al ya disponer de la muestra, tras un riesgo de pérdida fetal, parece conveniente descartar las anomalías crípticas en este grupo de gestaciones, dado que algunos autores sí las detectan y además representan un porcentaje bajo de la población obstétrica.

La necesidad de medir la TN para la detección de gestaciones en riesgo de aneuploidías comunes o raras, para la monitorización de posibles malformaciones fetales de aparición en el segundo trimestre y para el seguimiento de la evolución perinatal fetal es indudable (68-

70,137,164-166). No obstante, creemos como otros autores (161) que es mejor esperar al resultado del CC1T antes de ofrecer dicha prueba porque puede ayudar a las gestantes en su toma de decisión. Esto es particularmente importante cuando tenemos una medida de la TN < 3,5 mm pero en p99. En nuestra serie el 82% (14/17) de las gestaciones con TN en p99 y CC1T de riesgo bajo tenían una medida < de 3,5 mm, y en todas ellas se realizó una prueba invasiva con resultado normal.

Como en las gestantes con TN en p99 de nuestra serie sólo hay 1 cariotipo patológico en el riesgo intermedio (T21) y ninguno en el riesgo bajo, y los resultados de los MLPA y los array-CGH son normales, podemos ofrecer un ADNf como alternativa a la prueba invasiva a estos grupos siempre que la medida de la TN sea < de 3,5 mm.

#### **6.1.4. Modelo contingente**

Basándonos en los resultados de nuestra cohorte, el ADNf para T21, T18 y T13 como test contingente de cribado, se recomendó en dos grupos de gestantes:

- a) En las gestantes con riesgo intermedio (1/51-1/300) para T21 y/o T18 con independencia del percentil de la TN pero siempre que fuera menor de 3,5 mm.
- b) En las gestaciones con TN mayor o igual al p97,5 y CC1T de riesgo bajo siempre que la medida fuera menor de 3,5 mm.

Con estas dos indicaciones consideramos que podemos seguir detectando las mismas anomalías cromosómicas comunes, disminuyendo el número de pruebas invasivas y, por tanto, evitando pérdidas fetales. Nuestros datos también sugieren que las anomalías cromosómicas raras con grave repercusión sobre el fenotipo fetal no deberían perderse puesto que todas tuvieron CC1T de riesgo alto o anomalía ecográfica. Estas dos indicaciones suponen realizar un ADNf a un 3,1% y un 0,3% (21+17, tabla 5.5) de nuestras 12327 gestantes lo que parece un coste asumible por el sistema público de salud.

Las gestantes con TN en p97,5 sin CC1T, en las que no existe indicación de prueba invasiva, han sido consideradas candidatas al ADNf, puesto que el estudio retrospectivo ha demostrado que existe más riesgo para las aneuploidías más frecuentes y el ADNf podría detectarlas.

En el momento de la implementación del ADNf, a parte de las dos indicaciones principales, se tuvieron en cuenta otras situaciones clínicas en las que el ADNf como test contingente podía beneficiar a otras gestantes en riesgo:

a) Antecedente personal de feto anterior con aneuploidía: estas gestantes tienen un riesgo aumentado de repetición que se considera, en general, como el doble del correspondiente a su edad (80). El riesgo de recurrencia en estas gestantes puede estar incrementado para cualquier tipo de aneuploidía pero la mayoría de ellas terminan en un aborto espontáneo incluidas las más comunes (T21, T18, T13 y 45,X) (167). Warburton *et al.* da un riesgo de recurrencia de trisomías 1,6-8,2 veces superior en las gestantes con antecedentes (80). Cuando estratifica por edad, en las mujeres menores de 30 años el riesgo es 8 veces superior al que se espera por su edad, y en las mayores de 30 años el doble del esperado en su edad. La mayor parte de las aneuploidías son de origen materno y entre los factores de riesgo de recurrencia se encuentran: la edad de las gestantes, los mosaicismos de línea germinal, los factores que incrementan los errores meióticos y los factores ambientales. La edad materna avanzada como factor de recurrencia parece estar más relacionada con los errores meióticos de no disyunción (80,168). Sin embargo, los mosaicismos de línea germinal podrían explicar la recurrencia de alteraciones cromosómicas en gestantes jóvenes. Algunos autores que han analizado ovocitos donados por mujeres de reproducción asistida, con una media de edad materna de 35 años, describen una incidencia de un 9,8% de este tipo de mosaicismo (169), mientras que otros dan porcentajes del 0,54% en ovocitos de fetos normales (170). Hay autores que indican que un 5% de las parejas jóvenes con un antecedente de T21 pueden tener un mosaicismo de línea germinal (171).

Dado su riesgo de recurrencia incrementado, este grupo de gestantes puede tener indicación a diagnóstico prenatal mediante prueba invasiva. Sin embargo, teniendo en cuenta que los desequilibrios cromosómicos suelen ser un aborto espontáneo, ante una ecografía normal y un CC1T de bajo riesgo en una nueva gestación la probabilidad de que el feto esté afecto es baja. Por tanto, consideramos que pueden beneficiarse del ADNf y evitar el riesgo de pérdida fetal. Además, este segundo test de cribado permitiría disminuir la ansiedad materna ante el riesgo de repetición, dada la alta sensibilidad para la detección de las aneuploidías más comunes.

b) Progenitores portadores equilibrados de translocación robertsoniana que afecte a los cromosomas 21 y/o 13.

Las translocaciones robertsonianas se dan entre los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21, y 22) y pueden producirse entre cromosomas homólogos (del mismo par) y más frecuentemente entre no homólogos (de distinto par). Mientras que las que se dan entre homólogos son en general de *novo*, las que se dan entre no homólogos son un reordenamiento constitucional, generalmente heredado, con una prevalencia en la población general del 0,1% (79,172). Entre estas

translocaciones, las más frecuentes son las que se dan entre los cromosomas 13/14 y los cromosomas 14/21 (173). Los portadores de translocación robertsoniana tienen más riesgo de abortos de repetición y/o de tener hijos afectados de alguna anomalía cromosómica, bien por monosomía bien por trisomía (79). Las monosomías no suelen ser viables. En caso de trisomías, los riesgos de hijo afecto o de abortos dependen de los cromosomas implicados en la translocación. Cuando el desequilibrio se produce por los cromosomas del par 14, 15 ó 22 suele dar lugar a un aborto espontáneo (167,174). Sin embargo, cuando el desequilibrio afecta a los cromosomas 21 y 13 existe la posibilidad de tener un hijo afecto de síndrome de Down (T21) o de Patau (T13), a pesar de que estas trisomías también son una causa frecuente de aborto espontáneo (167). Los portadores de estas translocaciones tienen teóricamente un 66% de riesgo de tener descendencia desequilibrada teniendo en cuenta sólo las diferentes posibilidades de segregación de los gametos, sin embargo, la proporción de gametos desequilibrados que se produce realmente durante la meiosis es baja. De hecho, estudios en espermatozoides de portadores han puesto de manifiesto que el 82-87% de los gametos que se producen son normales o equilibrados (175). Se estima que si es la mujer la portadora de translocación, el riesgo de descendencia desequilibrada es de un 16%, mientras que si es el varón el portador el riesgo es del 3,6% (174). Por tanto, la proporción de gestaciones con feto afecto viable es dependiente del sexo del progenitor portador y de la viabilidad del embrión. Por ello, la probabilidad de un feto afecto viable de T21, en progenitores portadores de translocación que afecte a dicho cromosoma, es del 10-15% si la mujer es portadora y del 0,5-1% si el varón es portador (79,172,176). Sin embargo, si la translocación afecta al cromosoma 13, aunque la probabilidad de transmitir el desequilibrio vía materna sea mayor (174), la posibilidad de que el feto sea viable es del 0,4-1% de forma global puesto que la mayoría son abortos (79,167,172).

Hemos considerado que cuando alguno de los progenitores es portador de translocación robertsoniana que afecta a los cromosomas 21 y/o 13, ante una ecografía y un CC1T normales, lo más probable es que el feto sea no afecto. Dado que el ADNf permite la detección de estas trisomías, podríamos evitar la prueba invasiva a una pareja que tiene una posibilidad de tener descendencia no afecto del 60-70% (174) puesto que tienen mayor riesgo de aborto.

Otro de los riesgos genéticos asociados a estas gestaciones es la aparición de una disomía uniparental, producida fundamentalmente por rescate en un cigoto trisómico o monosómico (177). La disomía uniparental es una alteración genética en la que ambos cromosomas de un par se heredan de un sólo progenitor. La incidencia de disomía uniparental en recién nacidos se calcula en 1/5000 (177). Cuando afecta a los cromosomas 21, 22 ó 13 está asociada a un

fenotipo aparentemente normal (178). Sin embargo, si se da con los cromosomas 14 ó 15 puede dar lugar a síndromes cromosómicos sujetos a impronta genética en los que según sea el origen de la disomía, paterno o materno, tendrán clínica grave aunque diferente. La frecuencia de este evento en diagnóstico prenatal está estimada en un 0,4-0,6% de los casos cuando la translocación es entre pares no homólogos (172,174,179) y en un 66% cuando lo es entre homólogos (172). Por ello, en el caso de que los progenitores sean portadores de una translocación robertsoniana de los cromosomas 21 y/o 13 con los cromosomas 14 y/o 15, existe no sólo riesgo de feto afecto de T21 o T13 sino también de disomía uniparental en un 0,6% de los casos aunque el cariotipo fetal sea normal. Es importante un asesoramiento genético adecuado por el riesgo de disomía uniparental y la valoración ha de realizarse individualmente en función de los cromosomas implicados en estas translocaciones.

Estas dos indicaciones anteriores ya fueron propuestas por los ginecólogos americanos de la Sociedad de Medicina Materno Fetal (14) y otros autores (11) haciendo hincapié en la necesidad de un asesoramiento genético pre-test realizado por genetistas expertos.

C. Gestantes con EMA sin CC1T, incluidas las gestaciones gemelares en las que no se realizaba CC1T en nuestro hospital.

Las gestantes con edad igual o superior a los 35 años tienen un riesgo elevado de aneuploidías fetales, principalmente trisomías (63). Es conocido que la mayor parte de las aneuploidías fetales se producen por errores en la meiosis materna y que, en edades avanzadas, hasta el 50% de los embriones pueden ser aneuploides, y la mayoría son abortos espontáneos (180). La edad materna es un factor de riesgo, pero como cribado sólo tiene una sensibilidad del 30% (12) al 57,5% (181) para una TFP del 5% y del 21,6% respectivamente. Consideramos que al no disponer de un CC1T que nos aporte un riesgo individual para asesorar a cada gestante, y la edad materna no ser válida como cribado, podemos ofrecer un ADNf, siempre y cuando las ecografías sean normales. Esto podría disminuir el número de pruebas invasivas en este grupo. Además, en nuestro caso, a las gestantes gemelares, que pueden tener más riesgo de pérdida fetal (182), no se les ofrecía el CC1T.

La sensibilidad del CC1T parece más baja en gestaciones gemelares. Ello es probablemente porque al no disponer de muchos embarazos gemelares afectados de T21 y T18 con los que establecer las medianas de los marcadores bioquímicos y comparar con gemelares no afectados, se ha asumido que los niveles de los marcadores son el doble que en los embarazos únicos para el cálculo de las medianas (77,183). Además los niveles de los marcadores bioquímicos parecen ser diferentes en las gestaciones monocoriales que en las bicoriales, con

discrepancias entre los estudios (146,184). A pesar de que algunos autores intentaron establecer factores de corrección en función de la corionicidad (146), trabajos recientes estiman una sensibilidad del 83-86% con una TFP del 7,4-10% (77,78). Una TFP elevada no es aceptable para un buen cribado, y probablemente nos llevaría a ofrecer y realizar un número más elevado de pruebas invasivas en gestantes gemelares con un riesgo de pérdida fetal superior al de una gestación única (81). Si tenemos en cuenta que muchos de los embarazos gemelares son conseguidos con técnicas de reproducción asistida donde los niveles de PAPP-A son un 10-25% inferiores, la TFP podría incrementarse aún más (78,185-187). En estos casos podría ser más recomendable un ADNf que un CC1T (78,188), puesto que su sensibilidad está estimada en el 100% para T21 y el 60-100% para T18 y T13 con TFP del 0,25-1,2% (78,182,189-194), aunque con casos no informativos de un 0,9-13% (182,188,190,195). No obstante, los resultados de estos estudios han de interpretarse con precaución, pues el número de casos gemelares con feto afecto analizados es aún bajo.

A pesar de nuestras recomendaciones, todas las mujeres deben ser informadas en una consulta de asesoramiento genético pre-test de todas las anomalías cromosómicas que no pueden ser detectadas mediante ADNf o ecografía, incluidas las ACSs que no serán detectadas con nuestro protocolo. Las gestantes deben conocer todas las posibles pruebas diagnósticas, invasivas y no invasivas, disponibles con sus beneficios-riesgos y elegir libremente su opción a través de un asesoramiento no directivo. En la **tabla 6.1** se recogen todas las indicaciones a ADNf como test contingente.

INDICACIONES A ADNf COMO TEST CONTINGENTE
Riesgo intermedio (1/51-1/300) para T21 y/o T18 en el CC1T
TN $\geq$ p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo riesgo (<1/300) para T21 y/o T18; TN en p97,5 sin CC1T
Antecedente personal de feto anterior aneuploide
Progenitores portadores de translocación robertsoniana que afecte a los cromosomas 21 y/o 13
Gestaciones gemelares con EMA (con ovocitos propios y ausencia de gemelo evanescente)
Gestaciones únicas con EMA sin CC1T
Contraindicación a prueba invasiva

**Tabla 6.1.** Indicaciones a ADNf como test contingente en el Hospital Clínico San Carlos

### 6.1.5. Limitaciones del estudio retrospectivo

Entre las limitaciones de este estudio retrospectivo se encuentra el hecho de que la cohorte de gestantes pertenece sólo a nuestro hospital, y por tanto las variaciones en el tipo

de población y en el programa de CC1T que utilizamos pueden no ser aplicables al resto de la población. Otra limitación es el hecho de no disponer de estudios de MLPA o array-CGH en todas las gestaciones con riesgo intermedio que nos permitieran descartar con seguridad las anomalías raras y crípticas en este grupo, aunque los datos al nacimiento fueran normales. Otra limitación es la necesidad de grandes series de gestaciones para obtener datos fiables de anomalías cromosómicas raras, dada su prevalencia.

## **6.2. Fase 2: estudio observacional de cohortes prospectivo.**

### **6.2.1. CC1T y anomalías cromosómicas**

En el estudio prospectivo de las 2446 gestantes, 2386 con CC1T y 60 sin él, atendidas durante el periodo 2015-2016, se detectaron 29 anomalías cromosómicas dando una prevalencia en nuestra cohorte del 1,2%, superior a la descrita por la literatura en recién nacidos vivos del 0,4% (3,11). Los factores que pueden influir en ello son: que la estimación de las anomalías cromosómicas necesita un periodo mayor de tiempo y un número mayor de gestantes, que las anomalías graves no llegan a término, y que la edad de las gestantes en nuestra población esté aumentando. Las anomalías detectadas en este periodo fueron las más comunes: T21, T18, T13, 45,X y triploidías. Todas se diagnosticaron prenatalmente, salvo 2 T21. No se detectó ninguna anomalía cromosómica rara puesto que son de muy baja prevalencia como ya se ha comentado y el periodo estudiado es corto. Tampoco ninguna ACSs distinta del 45,X. Sin embargo, no podemos descartar su existencia completamente puesto que el ADNf en nuestro protocolo no analizó el sexo fetal. Además, a pesar de disponer de los datos al nacimiento de la serie, las ACSs no presentan, en general, un fenotipo clínico específico al nacimiento que permita su diagnóstico.

De las 2386 gestantes con CC1T sólo 230 (9,6%) fueron atendidas en la consulta de asesoramiento dado el cambio de protocolo de atención prenatal, donde la EMA con CC1T de bajo riesgo dejó de ser una indicación para esta consulta.

Un 5,6% de las gestantes que se realizaron CC1T tuvieron un riesgo  $\geq 1/300$ , porcentaje similar a lo descrito en la literatura y ya discutido anteriormente (95,98). El porcentaje de alteraciones cromosómicas desequilibradas en las gestantes con CC1T de riesgo de este periodo (15,5%) vuelve a ser superior que al descrito en la literatura (95,98), probablemente debido a los mismos factores.

De las alteraciones cromosómicas diagnosticadas, el 52% (15/29) tuvieron alto riesgo en el CC1T. En este riesgo se detectaron el 40% (6/15) de las T21, el 86% (6/7) de las T18, el 67% (2/3) de las 45,X y el 33% (1/3) de las triploidías. A diferencia del estudio retrospectivo, el porcentaje de T21 detectado en este grupo fue menor, probablemente debido a la variabilidad de su fenotipo y a que hay un menor número de alteraciones cromosómicas puesto que el periodo de tiempo recogido es menor.

Todas las alteraciones cromosómicas en las gestantes con riesgo intermedio: 3 T21, 1 T18 y 2 triploidías fueron detectadas a través del ADNf o de ecografía.

### **6.2.2. Falsos negativos del CC1T**

Durante este periodo hubo 4 falsos negativos del CC1T (tabla 5.10), dos de ellos diagnosticados prenatalmente por ADNfs extraclínicos de riesgo aportados por las gestantes. No se ha calculado la sensibilidad del CC1T para este periodo por ser corto en el tiempo. De hecho, en los dos años posteriores no incluidos ya en este estudio no hubo ningún falso negativo.

Ninguno de los falsos negativos para T21 tuvo una TN en p97,5 que permitiera su detección. Sin embargo, el 15,3% de las gestantes con TN en este percentil tuvieron un cariotipo desequilibrado: 1 T21 con CC1T de riesgo intermedio y una T13 sin riesgo en CC1T, ambos detectados mediante ADNf. De nuevo nuestro porcentaje de anomalías detectadas en el p97,5 es superior al descrito (68,71), aunque el número de gestantes evaluadas en este grupo durante este periodo es bajo.

### **6.2.3. ADNf y anomalías cromosómicas**

Entre los 136 ADNf solicitados por el HCSC siguiendo el nuevo protocolo de atención prenatal, no hubo falsos negativos ni falsos positivos para T21, T18 y T13. La sensibilidad para estas trisomías en nuestra serie es acorde a lo descrito para la metodología utilizada (25). Los 4 casos de riesgo fueron confirmados mediante prueba invasiva (3T21 y 1 T13) tal y como recomiendan las sociedades internacionales (14,17,18,196).

Ante un ADNf de riesgo y ecografía normal, algunos autores recomiendan confirmar mediante biopsia corial cuando el riesgo es de T21, y mediante amniocentesis si el riesgo es para T18, T13 o 45,X ya que de esta forma se evitan los resultados de cariotipo discrepantes debidos a mosaicismos placentarios (21,25). En nuestro caso, 2 de las T21 fueron confirmadas

mediante biopsia corial, que ofrece un diagnóstico más temprano. Sin embargo, la tercera T21 fue confirmada en amniocentesis porque la gestante se encontraba por encima de la 14 semana al recibir el resultado del ADNf. La T13 se confirmó mediante amniocentesis en la semana 15, ya que sólo tenía una TN en p97,5 con CC1T de bajo riesgo y no tenía alteración ecográfica en esas semanas de gestación.

Durante la ecografía del segundo trimestre de gestación se detectó 1 triploidía, entre las gestantes de riesgo intermedio en el CC1T para T18, con ADNf de riesgo bajo, puesto que la metodología elegida para el mismo no permite detectar esta alteración tal y como se ha comentado anteriormente.

La bibliografía describe que el 91% de las gestantes con riesgo intermedio en el CC1T eligen realizarse un ADNf (19,197). En nuestra cohorte el 85% (136/160, tabla 5.7) de las gestantes con alguna de nuestras indicaciones eligió el ADNf como primera opción: el 84% de las que tuvieron un CC1T de riesgo intermedio, el 64% de las que tenían TN  $\geq$  a p97,5 con CC1T de bajo riesgo o sin CC1T, el 100% de las gestantes con antecedente de feto aneuploide, el 91% de los gemelares y el 87% de las gestantes con EMA sin CC1T.

#### **6.2.3.1. ADNf no informativo**

Hubo un caso no informativo tras dos muestras extraídas en momentos diferentes en una gestante con riesgo para T18 por baja fracción fetal, lo que representa un 0,7% de casos no informativos en nuestra serie. En esta gestante se realizó una amniocentesis y el resultado del cariotipo fetal fue normal.

Los fallos o resultados no informativos en el ADNf pueden deberse a diversas causas. En ocasiones son debidos al manejo y tratamiento de la muestra previo al estudio o a problemas metodológicos por la complejidad del mismo, con un rango descrito en la bibliografía que va del 0,03-12,2% de los casos no informativos (25). En otros casos es debido a baja fracción fetal (<4%), principalmente por problemas feto-placentarios o maternos (25,198). Y por último, los hallazgos inesperados como las alteraciones cromosómicas maternas, fetales o placentarias distintas a las comunmente estudiadas en el ADNf, y las alteraciones genómicas maternas (CNVs, neoplasias), dificultan la interpretación de los resultados en los algoritmos bioinformáticos dando lugar tanto a falsos positivos como test no informativos (30,31,199,200). El porcentaje de casos no informativos varía también con la metodología utilizada, estimándose en un 1,58% con técnica de secuenciación masiva de genoma completo, en un 3,56% con técnica de secuenciación de cromosomas específicos, y en un 6,39% con técnicas de análisis de polimorfismos de nucleótido único (25,44).

Se estima que sólo el 1-3% de las gestantes tienen una fracción fetal baja, por tanto, el porcentaje de casos no informativos no debe superar estos límites (33,34). Un porcentaje alto supondría que hay muchos fallos en la metodología, por lo que es importante elegirla cuidadosamente. La secuenciación masiva de genoma completo parece ser la mejor opción en el momento actual (44).

Sólo el 60-68% de las muestras son informativas tras un primer fallo del test en los embarazos únicos (25,31,190,195,201) y en un 51% en los embarazos gemelares (190,195). Dichos fallos parecen estar relacionados con una baja fracción fetal.

El porcentaje de no informativos en nuestra serie (0,7%) se encuentra dentro de lo esperado para la metodología de secuenciación de genoma completo elegida en nuestro estudio y acorde con la literatura (39).

### 6.2.3.2. Fracción fetal

La fracción fetal es un factor importante en la calidad, precisión y sensibilidad del ADNf. Se considera que el 4% es el mínimo porcentaje para que el test sea informativo y evitar los falsos negativos (39,40,202). No obstante, hay algoritmos en alguna metodología de secuenciación masiva que permiten estimar el riesgo de aneuploidía con fracciones fetales menores del 4%, lo que debe tenerse en cuenta al interpretar los resultados para tomar las medidas adecuadas de seguimiento en cada caso.

Lo *et al.* (22) estimaron que el ADN fetal circulante en sangre materna era del 3-6%, pero posteriormente otros autores han estimado, basándose en las diferencias de tamaño y genómicas entre el ADN fetal y el materno, una media de un 10-15% con un rango que va desde menor del 4% hasta mayor del 30% entre las 11 a 20 semanas de gestación (33-35). En las gestaciones gemelares, los estudios describen en el primer trimestre una media de fracción fetal del 8%, menor que en las gestaciones únicas donde la media es de un 11-13% (78,182,190,195). Por ello, los embarazos gemelares muestran mayores tasas de no informativos dando porcentajes de fallos que van desde el 0,9% al 13% (31,78,188,195) frente al 1-3% en las gestaciones únicas (44,190). Un factor que puede influir en estas tasas de no informativos en los embarazos gemelares, es el hecho de que si la metodología utilizada no puede distinguir la contribución de cada gemelo a la fracción fetal, es necesaria una fracción mínima del 8% para realizar el estudio suponiendo que cada gemelo aporta la mitad (78).

La fracción fetal baja está fundamentalmente relacionada con el índice de masa corporal materna (201) y con mayor riesgo de aneuploidía (25,31):

### **a) Índice de masa corporal materno**

La media de la fracción fetal puede caer de un 12-15% en mujeres de 60 Kg a un 3,9-6% en mujeres de más de 110 Kg (39,202,203), probablemente por un efecto de dilución ya que en las mujeres obesas hay más ADN materno circulante por apoptosis de los adipocitos (202). La proporción de casos no informativos por fracción fetal menor del 4% aumenta con el peso materno, estimándose en el 0,7% en las gestantes de 60 Kg, el 7,1% en las de 100 Kg y del 51,1% en las de 160 Kg en la 12 semana de gestación (39).

### **b) Riesgo de aneuploidía**

Algunos autores estiman una prevalencia de aneuploidía del 4,7% en las gestantes con fracción fetal < 4% (41). La fracción fetal en la T21 es parecida o algo más elevada que la de los fetos euploides (42,203) y no parece haber diferencias estadísticamente significativas entre los casos no informativos del ADNf entre los fetos con T21 y los euploides (40,198). Sin embargo, en las gestaciones afectas de T18, T13 y triploidía las fracciones fetales son significativamente más bajas, dando lugar tanto a un mayor número de casos no informativos (40,42,203) como a una mayor probabilidad de falsos negativos en el ADNf (44). Algunos autores postulan que puede ser debido a que estas alteraciones cromosómicas producen placentas más pequeñas e insuficientes (203). De hecho en estas alteraciones se observan valores disminuidos de los marcadores bioquímicos placentarios (PAPP-A y  $\beta$ HCG libre) lo que les hace tener riesgo en el CCIT para T18. Además hay trabajos que demuestran una correlación entre los marcadores bioquímicos y la fracción fetal, de manera que a mayores niveles de PAPP-A y  $\beta$ HCG libre, mayor fracción de ADN fetal circulante hay (39). Puesto que el ADN fetal deriva del trofoblasto parece que la correlación entre los marcadores bioquímicos y la fracción fetal está relacionada con la masa placentaria. Niveles más bajos de marcadores bioquímicos se correlacionan con niveles más bajos de fracción fetal y menor masa placentaria (39,40). Por tanto, cuando un ADNf es no informativo por baja fracción fetal en gestantes sin obesidad podemos considerar que hay mayor riesgo de T18, T13 o triploidía, pero no de T21.

Ante un ADNf no informativo por baja fracción fetal o de riesgo bajo pero con fracción fetal inferior al 4% es recomendable ofrecer una ecografía de segundo trimestre temprana (16 semanas) y/o prueba invasiva en todas las gestantes en riesgo de aneuploidía (11). Además, a las gestantes con marcadores bioquímicos disminuidos que hagan sospechar de T18, T13 y triploidía, con independencia del resultado del ADNf, se les ha de realizar una ecografía de segundo trimestre temprana para descartar falsos negativos de estas cromosopatías, puesto que estas alteraciones suelen mostrar malformaciones detectables (25,42). De hecho, en nuestra serie 1

triploidía fue detectada tras ecografía de 16 semanas por marcadores bioquímicos bajos en una gestante con riesgo intermedio para T18 y ADNf de bajo riesgo. De la misma manera, a la gestante con ADNf no informativo de nuestra cohorte se le ofreció amniocentesis a pesar de la ecografía normal puesto que tenía riesgo intermedio en el CC1T para T18.

Es imprescindible que los laboratorios proveedores aporten la fracción fetal, para la correcta interpretación del test (30). Conocer los datos demográficos de la gestante, los datos ecográficos, su resultado de CC1T, el origen o no espontáneo de la gestación y algunos tratamientos junto a la fracción fetal permitirán un asesoramiento genético correcto e individualizado.

## **6.3. Valoración de la efectividad**

### **6.3.1. Población a estudio**

Durante los periodos elegidos para valorar la efectividad del protocolo de atención prenatal, el número de gestantes atendidas en 2013-2014 (2208 gestantes) y 2015-2016 (2386 gestantes) no presenta diferencias significativas. Entre las gestantes atendidas en cada periodo, con CC1T y sin él, la edad materna no mostró diferencias estadísticamente significativas, lo que resulta importante si tenemos en cuenta su influencia en el CC1T y en el riesgo de aneuploidías (tabla 5.15). Tampoco hay diferencias estadísticamente significativas en las gestantes atendidas por CC1T de riesgo ni en la proporción de ellas con CC1T de riesgo alto o intermedio en cada periodo, lo que muestra que el rendimiento del CC1T fue similar (tablas 5.17, 5.18, 5.19). Las gestantes atendidas en la consulta con CC1T de bajo riesgo que acudieron por alguna otra indicación distinta a la EMA, entre las que se encuentran las alteraciones ecográficas, los antecedentes personales/familiares, la ansiedad y la TN en p97,5, muestran una proporción similar sin diferencias significativas entre ambos periodos (tabla 5.22). Sin embargo, durante el periodo 2013-2014 acudieron a la consulta un 33% de las gestantes con CC1T, y de ellas el 90% fueron remitidas sólo por EMA, lo que crea una diferencia estadísticamente significativa en las gestantes atendidas con CC1T de bajo riesgo y sin cribado en ambos periodos (tablas 5.20 y 5.23). Esta diferencia entre ambos periodos se debe a que durante el periodo retrospectivo no se habían modificado las indicaciones a la consulta de asesoramiento, permaneciendo la EMA a pesar del CC1T de bajo riesgo como indicación. Con excepción de estas gestantes, que además serán tratadas al valorar la efectividad, el resto de la población obstétrica atendida parece homogénea.

## **6.3.2. Efectividad**

### **6.3.2.1. Gestantes atendidas en la consulta**

Durante el periodo prospectivo 2015-2016 sólo el 12% de las gestantes con CC1T de bajo riesgo que fueron atendidas en la consulta de asesoramiento, lo fueron por EMA. El cambio en las indicaciones para acudir a la consulta de asesoramiento genético produjo una disminución de esta indicación entre las gestantes con CC1T de riesgo bajo del 87% frente al periodo 2013-2014 (de 90% a 12%, tabla 5.24).

A partir de octubre de 2015 sólo fueron atendidas en esta consulta aquellas gestantes que lo solicitaron a petición propia de las mismas. La edad materna es sólo un factor de riesgo que ya se tiene en cuenta a la hora de calcular el riesgo individual para cada gestante en el CC1T. No parecía adecuado mantenerla como indicación a consulta de asesoramiento genético, donde además, las gestantes tenían la opción de realizarse una prueba invasiva sin indicación. Las preferencias de las gestantes ante un CC1T de bajo riesgo ya han sido descritas en la literatura, con renuncias a prueba invasiva del 93-97% cuando los CC1T son de bajo riesgo (204-206) para evitar el riesgo de pérdida fetal tras la prueba. De hecho, durante el periodo 2013-2014, el 94% de las gestantes con EMA y CC1T de bajo riesgo de nuestra serie renunciaron a una prueba invasiva como describe la bibliografía.

Eliminar la EMA con CC1T de bajo riesgo como indicación a la consulta de asesoramiento ha supuesto:

- Una disminución del 95% de las gestantes atendidas por esta indicación en el periodo 2015-2016 (de 75% a 4%, tabla 5.25).
- Y que el 87% de las gestantes con bajo riesgo atendidas, durante el periodo 2015-2016, sea por indicaciones diferentes a la EMA. Durante este periodo el 29% de las gestantes que fueron remitidas con CC1T de bajo riesgo a la consulta fue por alteraciones ecográficas, antecedentes personales/familiares o TN en p97,5. El 47% acudió por CC1T de riesgo, el 20% sin CC1T y sólo el 4% a petición propia por EMA a pesar de un CC1T de bajo riesgo.

Por tanto, la consulta de genética fue más efectiva gracias al nuevo protocolo de atención prenatal puesto que las gestantes atendidas estaban mejor seleccionadas.

### 6.3.2.2. Pruebas invasivas y estudios citogenéticos desequilibrados

#### a) Pruebas invasivas

Durante el periodo 2015-2016, la proporción de gestantes atendidas en asesoramiento que se realizaron un diagnóstico prenatal invasivo fue del 37% mientras que durante el periodo 2013-2014 fue del 18%. Esto refleja que las gestantes remitidas durante 2015-2016 estaban mejor seleccionadas al eliminar la EMA con CC1T de bajo riesgo como indicación a consulta. Al seleccionar mejor a las gestantes y por tanto disminuir el número de las mismas atendidas en consulta, la proporción de gestantes con diagnóstico prenatal invasivo realizado en este periodo aumentó. Durante el periodo 2015-2016, el 14% de las gestantes remitidas a asesoramiento renunciaron a cualquier tipo de prueba y, durante el periodo 2013-2014, estas renunciaciones fueron del 79%, lo que supone una disminución del 82% en las mismas. Este hecho apoya la mejor selección de las gestantes durante 2015-2016 e indica que las gestantes de este periodo tuvieron, en la mayoría de los casos, indicación de asesoramiento genético prenatal y prueba invasiva o ADNf. A pesar de que la proporción de gestantes con prueba invasiva durante 2015-2016 sea más elevada que durante 2013-2014, el número total de diagnósticos invasivos disminuyó de 158 invasivas en 2013-2014 a 108 en 2015-2016. Este hecho se explica por la introducción del ADNf como test contingente durante 2015-2016. De no haber implementado el ADNf, la proporción de gestantes con prueba invasiva en este periodo hubiera sido más elevada dada la mejor selección de las gestantes. De las 108 pruebas invasivas realizadas en 2015-2016, el 72% se realizó en gestantes sin opción a ADNf mientras que el 28% se realizó en gestantes con dicha opción. Como el 85% de las gestantes en riesgo de aneuploidía con opción a ADNf lo eligió como primera opción, el número de pruebas invasivas con las indicaciones del periodo 2015-2016 disminuyó.

En este mismo periodo se hicieron un 30% más de biopsias coriales que en 2013-2014 lo que supone un aumento del 187,5% (de 16% a 46%, tabla 5.31). La biopsia corial permite un diagnóstico más temprano de las anomalías fetales lo que disminuye la ansiedad de las gestantes y les permite tomar decisiones informadas con menos repercusión psicológica y menos morbilidad materna en caso de interrupción legal de embarazo, dado que las complicaciones se incrementan con la edad gestacional (6). Desde la implementación de los cribados en el primer trimestre de gestación, la realización de biopsias coriales ha ido en aumento, si bien son las gestantes con mayor riesgo de anomalías las que suelen elegir esta prueba invasiva más temprana en vez de la amniocentesis (76). El factor que ha favorecido este aumento en la realización de biopsia corial es probablemente una mejor selección de las

gestantes en riesgo de aneuploidía durante el periodo 2015-2016. No obstante, la información proporcionada a las gestantes durante el asesoramiento es otro factor a tener en cuenta. Durante esta consulta se informó a las gestantes, entre otras cuestiones, de los beneficios-riesgos de cada prueba. El riesgo de pérdida fetal tanto de la amniocentesis como de la biopsia corial se estima en un 0,1-1% (81,82), pero dentro de este rango es algo más elevado para la biopsia corial. En un 1-2% de las muestras de vellosidad obtenida mediante biopsia corial se identifican mosaicismos placentarios, que pueden llevar a las gestantes a una posterior amniocentesis para descartar o confirmar un verdadero mosaicismo fetal (83). A las gestantes con un CC1T de alto riesgo o una malformación ecográfica del primer trimestre se les informó de que tenían un riesgo elevado de alteración cromosómica y la biopsia corial permitiría el diagnóstico temprano de la misma. En los casos con alta probabilidad de cromosopatía fetal el riesgo de aborto por la técnica invasiva o de los posibles problemas metodológicos de la muestra, pudieron quedar minimizados por el deseo de un diagnóstico temprano y la ansiedad materna. Sin embargo, las gestantes con menos riesgo de cromosopatía fetal y, por tanto, con menos ansiedad, eligieron la amniocentesis, que con el mismo riesgo de aborto proporciona una información del cariotipo fetal más precisa, a pesar de que se les ofrecieron ambas opciones. De hecho, durante el periodo retrospectivo (2013-2014) el 75% de las gestantes atendidas en asesoramiento fue por EMA y CC1T de bajo riesgo con ecografías normales, y probablemente no tuvieron percepción de riesgo de aneuploidía. Por ello, el 94% renunciaron a prueba invasiva. Entre las que decidieron realizarse la prueba invasiva, el 100% eligió la amniocentesis

#### **b) Estudios citogenéticos prenatales desequilibrados**

Durante el periodo 2015-2016, el 25% de las gestantes que se hicieron una prueba invasiva tuvieron un cariotipo desequilibrado, frente al 8% de las mismas durante 2013-2014. Este hecho refleja de nuevo una mejor selección de las gestantes en riesgo de aneuploidía influido principalmente por dos factores:

- a) El primero, que durante el periodo prospectivo disminuyó el número de gestantes con riesgo bajo de aneuploidía atendidas en la consulta al cambiar el protocolo de atención prenatal y, por tanto, su opción a realizarse una amniocentesis.
- b) El segundo, que durante este mismo periodo prospectivo se introdujo el ADNf como test contingente, por lo que se realizaron también menos pruebas invasivas en las gestantes de riesgo intermedio como se verá en el punto siguiente.

Al disminuir el número de pruebas invasivas en las que se espera un cariotipo normal, la proporción de cariotipos desequilibrados frente a las invasivas realizadas es superior. El aumento en la proporción de cariotipos desequilibrados debe ser interpretado únicamente en el contexto de una mejor selección de las gestantes. Durante 2015-2016, el número total de cariotipos desequilibrados (27) fue superior al del periodo 2013-2014 (13). Su número total, al igual que el número de pruebas invasivas realizadas en cada periodo, influye en este resultado. La baja prevalencia de anomalías cromosómicas necesita periodos de tiempo más largos para su valoración.

### **6.3.2.3. Disminución de pruebas invasivas y renunciadas en las gestantes con indicación a ADNf**

Durante el periodo 2015-2016, con la implementación del ADNf en nuestro protocolo, hubo una disminución total en la realización de pruebas invasivas de un 63% (de 48% a 18%, tabla 5.38). En la revisión realizada por Warsof *et al.* (207) los rangos de disminución en la realización de pruebas invasivas tras la introducción del ADNf son del 17-88% en los diferentes estudios analizados (208-211). Trabajos más recientes dan rangos parecidos, del 20-82% (142,212). Esta diferencia tan amplia entre los estudios podría deberse a varios factores. El primero podría ser la diferencia en las indicaciones clínicas para su aplicación en la población obstétrica. El segundo, la diferencia entre los distintos modelos en su aplicación: como primera opción de cribado o como test contingente tras cribados bioquímicos de riesgo y/o en gestaciones de riesgo por alguna otra indicación. En los estudios donde se realiza como test contingente tras CC1T de riesgo hay además diferencias entre los puntos de corte del mismo en los que se aplica el ADNf. Por último, las diferencias entre los distintos sistemas de salud, públicos o privados, también podrían contribuir a estas diferencias. El coste del test podría limitar el acceso al mismo de las gestantes, tanto en los sistemas sanitarios privados como en los sistemas públicos en los que no se haya incluido en su cartera de prestaciones.

Teniendo en cuenta sólo los trabajos que utilizan el ADNf como test contingente sin coste, tras un CC1T de riesgo, la disminución de pruebas invasivas está estimada entre un 31-73% (19,145,213). En nuestro estudio la disminución de pruebas invasivas en este grupo de gestantes fue del 57% (de 56% a 24%, tabla 5.33), acorde a lo descrito por estos autores.

Podría esperarse que tras la introducción de un test como el ADNf, con una sensibilidad y especificidad tan elevada, la disminución en la realización de pruebas invasivas hubiera sido mayor. Sin embargo, esta disminución parece relacionada con dos factores que podrían modularla:

- a) El primero es la indicación clínica de la gestante. La percepción de riesgo en las gestantes con un CC1T de riesgo intermedio o con una TN  $\geq$  a p97,5 con CC1T de bajo riesgo, podría ser mayor que en aquellas cuya indicación para ADNf es un antecedente de feto aneuploide en gestación anterior o EMA sin CC1T. Hay autores que describen una mayor tendencia de las gestantes a elegir prueba invasiva en lugar de ADNf cuando los cribados son de riesgo o la TN está elevada. Estos autores dan porcentajes de invasivas del 51-57% en riesgos intermedios y del 61% en gestaciones con TN entre 3-3,4 mm, a pesar de ofrecer un ADNf (211). Entre nuestras gestantes, durante 2015-2016, el 24% con CC1T de riesgo intermedio y el 36% con TN  $\geq$  a p97,5 y CC1T de bajo riesgo eligieron prueba invasiva, a pesar de tener disponible el ADNf, mientras que entre las gestantes con EMA sin CC1T sólo la eligieron un 13%, entre las gemelares con EMA sin CC1T un 4%, y entre aquellas con antecedente de feto anterior aneuploide no la eligió ninguna. Ello explicaría que la disminución de pruebas invasivas en las gestantes con CC1T de riesgo intermedio y en aquellas con TN  $\geq$  a p97,5 y CC1T de bajo riesgo (de 56% a 24% tabla 5.33 y de 83% a 36%, tabla 5.34), sean del 57% en ambos grupos, y que sin embargo, en las gestantes con antecedente de feto anterior aneuploide y en aquellas con EMA y CC1T de bajo riesgo, la disminución de las pruebas sea del 100% (de 45% a 0%, tabla 5.35) y el 66% (de 38% a 13%, tabla 5.37), respectivamente. Sin embargo no explicaría la disminución del 43% (de 7% a 4%, tabla 5.36) en las gestantes gemelares sin CC1T y EMA.
- b) El segundo son las renunciadas de las gestantes a la prueba invasiva en el periodo anterior a la introducción del ADNf en nuestro hospital (2013-2014), dado el riesgo de pérdida fetal que conlleva la prueba. De hecho, durante este periodo sólo el 48% de las gestantes en riesgo que podrían haber tenido indicación a ADNf se realizaron prueba invasiva, mientras que el 13% se hicieron un ADNf extraclínico y el 39% renunciaron a cualquier prueba. En nuestra serie, estas renunciadas son especialmente elevadas entre las gestaciones gemelares con EMA en las que no se realizó CC1T, donde el 85% de las gestantes renunció a cualquier prueba y el 8% se realizó un ADNf extraclínico. Entre las gestaciones con CC1T de riesgo intermedio, TN  $\geq$  a p97,5 y CC1T de bajo riesgo, antecedente de feto anterior aneuploide y EMA sin CC1T, las renunciadas a cualquier prueba durante 2013-2014 fueron del 27%, 17%, 45% y 54% respectivamente; y los ADNf extraclínicos en estas mismas gestaciones fueron del 17%, 0%, 9% y 8% respectivamente.

Algunos autores ya han descrito que con la introducción del CC1T, las pruebas invasivas disminuyeron (207), es más, las tasas de prueba invasiva tras un CC1T de riesgo son del 53-78% (25,205,206,214-216). Es decir, las gestantes ya renunciaban a la prueba invasiva a pesar de los CC1T de riesgo antes de estar disponible el ADNf, y estas renunciaciones han ido aumentando cuando el ADNf ha estado disponible. Por tanto, la disminución de las pruebas invasivas no resulta tan elevada como cabría esperar.

Dado que las gestantes durante 2013-2014 ya renunciaban a realizarse una prueba invasiva, el grado de aceptación del ADNf por las mismas y la efectividad del nuevo protocolo prenatal no puede medirse solamente con la disminución de dichas pruebas sino también con la disminución de las renunciaciones a realizarse cualquier tipo de test durante el nuevo periodo (2015-2016). La disminución de las renunciaciones ya ha sido estimada por otros autores en modelos contingentes, sin coste o con coste para la gestante, con rangos del 82-93% (19,145,213) y del 13-45% (211,217), respectivamente. En nuestro estudio hemos pasado de un porcentaje de renunciaciones a todos los test del 39% (2013-2014) al 2% (2015-2016) lo que supone una disminución del 95% en las mismas, acorde con lo descrito en los modelos contingentes sin coste para la gestante. Esta disminución en las renunciaciones en nuestro estudio refleja el grado de aceptación del ADNf por las gestantes. El 98% de nuestras gestantes con opción a ADNf se hizo, al menos, algún test prenatal: el 85% eligió un ADNf y el 18% se hizo una prueba invasiva (principalmente como 1ª opción, y en pocos casos para comprobar un ADNf con riesgo o un fallo del mismo).

La introducción del ADNf como alternativa a la prueba invasiva en las gestantes de nuestro protocolo nos ha permitido no sólo la disminución de un 63% de las pruebas invasivas, evitando pérdidas fetales, sino también que sólo el 2% de las gestantes renuncien a cualquier test genético, invasivo (diagnóstico) o no invasivo (de cribado). Todo ello ha permitido mantener la detección de las anomalías cromosómicas más frecuentes en este grupo disminuyendo la ansiedad de las gestantes y, por tanto, mejorar la calidad de la asistencia.

#### **6.3.2.4. Pruebas genéticas prenatales en las gestantes con indicación a ADNf: pruebas invasivas, ADNf clínico (HCSC) y ADNf extraclínico**

Durante el periodo 2015-2016 el 90% de las gestantes que fueron remitidas a asesoramiento genético se hicieron algún tipo de prueba genética prenatal (ADNf y/o invasiva), frente a sólo el 21% durante el periodo 2013-2014 (tabla 5.52). De nuevo, esto probablemente es un reflejo de la mejor selección de las gestantes durante el periodo prospectivo, ya que dejaron de remitirse las gestantes con EMA y CC1T de bajo riesgo. Por ello,

al disminuir el número total de gestantes remitidas a asesoramiento de 890 a 290, el porcentaje de pruebas realizadas en las mismas es mayor.

En el total de las gestantes con indicación a ADNf hubo un aumento en la realización de pruebas genéticas del 70% (de 61% a 104%, tabla 5.50). Para calcular este incremento en pruebas hemos incluido también los ADNf extraclínicos que se realizaron las gestantes en el periodo 2013-2014. A pesar de no estar disponible este test en el sistema público durante este periodo, sí lo estaba en centros privados y las gestantes acudían a consulta con dicho test realizado. Hemos considerado, a pesar de no ser una prueba solicitada por nosotros, que no incluirla en los cálculos del incremento de pruebas crearía un sesgo, dando un incremento superior al real. El incremento en la realización de pruebas prenatales se ha producido sobre todo a expensas de los grupos de gestantes en las que había un mayor número de renunciadas: las gestantes gemelares sin CC1T y EMA, aquellas con feto anterior aneuploide y aquellas con EMA sin CC1T. En estos 3 grupos el incremento en pruebas realizadas es del 145% (de 40% a 98%, tabla 5.51). Sin embargo, en las gestaciones con CC1T de riesgo intermedio y en las gestaciones con TN  $\geq$  a p97,5 y CC1T de bajo riesgo, donde las renunciadas son menores, el incremento fue del 47% y del 20% respectivamente. No hay muchos trabajos que estimen el incremento en test genéticos prenatales al introducir el ADNf. Algunos estudios han estimado un aumento de un 11% en CC1T de riesgo intermedio (1/51-1/300) (218) y de un 29% en gestantes con CC1T de riesgo >1/1000 (217). En nuestra serie, el incremento tras un CC1T de riesgo intermedio es mayor, probablemente porque en nuestro hospital se ofrece el ADNf sin coste para las gestantes, mientras que en estos dos estudios el coste del test lo tenían que asumir las mismas.

No es el propósito de este trabajo realizar un estudio de costes, pero queremos señalar que para introducir el ADNf en un nuevo protocolo estos datos deberían tenerse en cuenta. Al ofrecer un test no invasivo con gran sensibilidad y sin coste, el 98% de las gestantes de nuestra serie se realizó al menos 1 prueba genética prenatal.

Debido a las diferencias entre los distintos sistemas de salud, no hay actualmente una única estrategia internacional recomendada para la implementación del ADNf. Su introducción como test de cribado contingente tras un CC1T de riesgo ya ha sido desarrollado por otros autores, fundamentalmente para la detección de T21, T18 y T13 (19,145,219-222). El modelo contingente no sólo garantiza el mantenimiento del resto de las estrategias de cribado prenatal ya probadas durante el primer trimestre de la gestación, como son la ecografía y el CC1T, sino que además parece una manera prudente de introducir este test en un sistema público de salud, pues su coste sigue siendo elevado (20). En una revisión de varios meta-

análisis, *Cuckle* analiza diferentes estrategias de implementación del ADNf. Las principales estrategias actualmente son su uso como test contingente en todas las gestantes con un CC1T de riesgo, como test contingente sólo en gestantes de riesgo intermedio y como test único sustituyendo al CC1T. Las tasas de detección estimadas para T21, T18, T13 y ACSs en los distintos modelos son del 85% (FP 0,02%), el 94% (FP 0,5%) y el 98% (FP 0,4%) respectivamente (20).

Otros autores han analizado diferentes estrategias de cribado de anomalías cromosómicas, incluidas las raras, durante el primer trimestre de la gestación. Ofreciendo solamente CC1T y prueba invasiva en caso de riesgo en el mismo, la detección de anomalías cromosómicas sería del 81% para un punto de corte de 1/50 y del 91% para un corte de 1/250. Eliminando el CC1T y ofreciendo solamente ADNf la tasa de detección de anomalías sería del 88%, puesto que se perderían las anomalías raras. Y por último, ofreciendo prueba invasiva en riesgos  $> 1/50$  ó  $1/150$ , y el ADNf como test contingente en riesgos intermedios de  $1/51-1/1000$  ó de  $1/150-1/500$ , las tasas de detección de anomalías serían del 94% y el 93%, respectivamente (100).

El coste del ADNf hace difícil actualmente su uso como cribado en lugar del CC1T en toda la población obstétrica en un sistema público. Además, los marcadores bioquímicos del primer trimestre son necesarios para el control de la preeclampsia y el retraso del crecimiento, y el CC1T permite la detección anomalías cromosómicas que el ADNf no puede detectar. Las sociedades científicas recomiendan mantener el cribado de primer trimestre actual puesto que su tasa de detección de alteraciones cromosómicas es alta y existe evidencia de su utilidad clínica (18,21).

El uso del ADNf como test contingente en todas las gestaciones tras un CC1T de riesgo (alto e intermedios) tiene una tasa de detección más baja de aneuploidías comunes (85%), probablemente debido a los falsos negativos para T18, T13 y 45,X (y sus mosaicismos), se podrían perder otras alteraciones raras y retrasaría el diagnóstico en las gestantes con alto riesgo.

Sin embargo, su uso como test de cribado, en un modelo contingente en los riesgos intermedios, reduce el coste de su implementación, mantiene los marcadores bioquímicos del primer trimestre, no retrasa el diagnóstico en las gestantes con CC1T de riesgo alto y tiene una tasa de detección de alteraciones cromosómicas elevada en todas las gestantes con CC1T de riesgo.

La aplicación del ADNf como test contingente en los riesgos intermedios, podría mantener la experiencia y la formación de los profesionales que han de realizar las pruebas invasivas en los riesgos más elevados. Dado que las pruebas invasivas son actualmente las

únicas pruebas diagnósticas, es imprescindible que los profesionales mantengan su experiencia. De lo contrario, estaríamos evitando el riesgo de pérdida fetal en un amplio grupo de gestaciones, pero estaríamos aumentándolo en aquellas que necesitan un diagnóstico fetal, no sólo de aneuploidías sino también de otras patologías, entre ellas las infecciones y las enfermedades genéticas. La introducción del CC1T para el cribado de aneuploidías ya produjo una disminución en el número de pruebas invasivas realizadas en las gestantes en riesgo, y la introducción del ADNf las ha disminuido aún más y muy rápidamente (210,223). Existe cierta preocupación entre los profesionales del diagnóstico prenatal que reclaman la búsqueda de una solución para este problema. No todas las sociedades de obstetricia y ginecología recomiendan el número de procedimientos que son necesarios para adquirir y/o mantenerla competencia. Las recomendaciones son variables, y van de 30 procedimientos invasivos anuales a 100 amniocentesis y 50-100 biopsias coriales cada 3 años (224). Hay estudios que muestran, en algunos centros, una disminución de realización de biopsia corial por los alumnos o residentes de 40 procedimientos a 10 tras la introducción del ADNf (225) durante su periodo de formación. Entre las posibles soluciones se encuentran la formación con gestaciones ya interrumpidas, el uso de simuladores y la centralización. La primera de las posibilidades no es ética, y podría poner en riesgo a la gestante. Los simuladores elevan el coste de la formación y no parece fácil su acceso por todos los centros. Y la centralización podría crear inequidad en el acceso de las gestantes, además de no ser bien aceptada por los profesionales puesto que disminuiría sus competencias (224). Quizás la aplicación de un modelo contingente en los riesgos intermedios permita mantener el grado de competencia y formación tan necesario en la realización de las pruebas invasivas.

### **6.3.3. Limitaciones del estudio prospectivo**

Entre las limitaciones del estudio prospectivo y la valoración de su efectividad se encuentra el hecho de que la cohorte de gestantes no es suficiente para el cálculo de la sensibilidad en la detección de aneuploidías de los diferentes cribados (ADNf y CC1T). Sin embargo, el periodo parece suficiente para evaluar la efectividad del nuevo protocolo de atención prenatal en su conjunto. Tampoco durante este periodo se disponen de estudios de MLPA o array-CGH en todas las gestaciones con riesgo intermedio que nos permitieran descartar con seguridad las anomalías raras y crípticas en este grupo aunque los datos al nacimiento fueron normales.

# 7. Conclusiones



## 7. CONCLUSIONES

La implementación del cribado de aneuploidías en el ADN fetal ha permitido la disminución de pruebas invasivas en las gestantes en riesgo de aneuploidía que tuvieron opción al mismo. Este cribado junto al cambio en las indicaciones a asesoramiento genético, eliminando la edad materna avanzada con cribado combinado de bajo riesgo como indicación, nos ha permitido realizar un diagnóstico prenatal más efectivo, optimizando el asesoramiento, mejorando la selección de las gestantes en riesgo y manteniendo la detección de las aneuploidías más frecuentes.

1. Las pruebas invasivas se recomiendan en las gestaciones con un riesgo en el cribado combinado mayor o igual a 1/50 con el fin de realizar un diagnóstico precoz de las cromosopatías con grave repercusión fetal, puesto que el 74% de las mismas se encuentran en este grupo.
2. Un punto de corte mayor o igual a 1/10 en el cribado combinado es posible aplicarlo como límite del alto riesgo en el que recomendar una prueba invasiva, aunque es necesaria su validación clínica y tener en cuenta el retraso en el diagnóstico de las aneuploidías más frecuentes.
3. El cribado en el ADN fetal circulante para las trisomías 21, 18 y 13 es aplicable como prueba contingente en:
  - las gestaciones con riesgo en el cribado combinado de 1/51-1/300,
  - y en aquellas con translucencia nucal mayor o igual al percentil 97,5 y medida inferior a 3,5 mm con cribado combinado de bajo riesgo.
4. El cribado en el ADN fetal para las trisomías 21, 18 y 13 como prueba contingente ha permitido la disminución de las pruebas invasivas en un 63% en las gestantes:
  - con riesgo en el cribado combinado de 1/51-1/300,
  - con translucencia nucal mayor o igual al percentil 97,5 y medida inferior a 3,5 mm con cribado combinado de bajo riesgo,
  - con antecedente personal de aneuploidía,
  - y en gestaciones únicas o múltiples con edad materna avanzada sin cribado.

5. El carácter no invasivo del cribado de aneuploidías en el ADN fetal ha producido un incremento del 70% en las pruebas genéticas prenatales realizadas en este grupo de gestantes, disminuyendo la ansiedad y mejorando la calidad de la asistencia.
6. En este mismo grupo de gestantes sólo el 2% de las mismas renunció a realizarse algún tipo de test genético permitiendo mantener la detección de aneuploidías.
7. Las gestantes que acudieron tras el cambio de protocolo prenatal han mostrado un elevado grado de satisfacción con la atención y el asesoramiento recibido por los profesionales que les atendieron en la Unidad de Diagnóstico Prenatal.

## 8. Bibliografía



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Defectos Congénitos. Organización Mundial de la Salud. 63ª Asamblea. Documento A63/10, 2010.
2. Management of birth defects and haemoglobin disorders: report of a joint WHO-March of Dimes meeting, Ginebra (Suiza). Organización Mundial de la Salud, 2006.
3. 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.
4. Zeitlin J, Mohangoo A, Cuttini M, Alexander S, Barros H, Blondel B, et al. The European Perinatal Health Report: Comparing the health and care of pregnant women and newborn babies in Europe. *J Epidemiol Community Health.* 2009;63(9):681-2.
5. Driscoll DA, Gross S. Prenatal Screening for Aneuploidy. *N Engl J Med.* 2009;360(24):2556-62.
6. Bartlett LA, Berg CJ, Shulman HB, Zane SB, Green CA, Whitehead S, et al. Risk factors for legal induced abortion-related mortality in the United States. *Obstet Gynecol.* 2004;103(4):729-37.
7. Zane s, Creanga AA, Berg CJ, Pazol K, Suchdev DB, Jamieson DJ et al. Abortion-Related Mortality in the United States 1998-2010. *Obstet gynecol.* 2015;126(2):258-265.
8. Rao R, Platt LD. Ultrasound screening: Status of markers and efficacy of screening for structural abnormalities. *Semin Perinatol.* 2016;40(1):67-78.
9. Nicolaides K, Azar G, Snijders RJM, Gosden CM. Fetal nuchal oedema: Associated malformations and chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther.* 1992;7(2):123-31.
10. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011;31:7-15.
11. Dashe JS. Aneuploidy screening in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2016;128(1):181-94.
12. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(1):45-67.
13. Orlandi F, Rossi C, Orlandi E, Jakil MC, Hallahan TW, Macri VJ, et al. First-trimester screening for trisomy-21 using a simplified method to assess the presence or absence of the fetal nasal bone. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(4):1107-11.

14. The American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee on Opinion No: 545: Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2012;120(6):1532-4.
15. The American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee on Opinion No: 640: Cell-free DNA Screening for Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2015;126(3):e31-7.
16. Di Renzo GC. Best practice in maternal-fetal medicine. *Int J Gynecol Obstet.* 2015;128(1):80-2.
17. Dondorp W, De Wert G, Bombard Y, Bianchi DW, Bergmann C, Borry P, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: Challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(11):1438-50.
18. 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.
19. Gil MM, Revello R, Poon LC, Akolekar R, Nicolaidis KH. Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: Cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;47(1):45-52.
20. Cuckle H. Strategies for Implementing Cell-Free DNA Testing. *Clin Lab Med.* 2016;36(2):213-26.
21. Grupo de expertos SESEGO y SEMEPE consensuado con AEDP. Cribado y Diagnóstico precoz de Anomalías Genéticas. 2017; *Ecografía / Medicina Perinatal*:1-43.
22. Lo Y. D, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman, Christopher W.G. Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350:485-7.
23. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(51):20458-63.
24. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(42):16266-71.

25. 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.
26. Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, Marusiak B, Ehrich M, Van Den Boom D, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;211(4):365.e1-12.
27. Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbebiyi A, Uthman OA, Madan J, et al. Open 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).
28. Yao H, Jiang F, Hu H, Gao Y, Zhu Z, Zhang H, et al. Detection of fetal sex chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: Initial experience in a Chinese hospital. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;44(1):17–24.
29. Hartwig TS, Ambye L, Werge L, Weiergang MK, Nørgaard P, Sørensen S, et al. Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) in pregnancies with trisomy 21, 18 and 13 performed in a public setting – factors of importance for correct interpretation of results. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018;226(2018):35–9.
30. Bianchi DW, Chiu RWK. Sequencing of Circulating Cell-free DNA During Pregnancy. *N Engl J Med.* 2018;379:464–73.
31. Suzumori N, Sekizawa A, Takeda E, Samura O, Sasaki A, Akaishi R, et al. Classification of factors involved in nonreportable results of noninvasive prenatal testing (NIPT) and prediction of success rate of second NIPT. *Prenat Diagn.* 2019;39(2):100–6.
32. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Avent N and Soothill PW. Free Fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn.* 2007;27:415–18.
33. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genet Med.* 2011;13(11):913–20.

34. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: Evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(4):319.e1-9.
35. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J et al. Non-invasive prenatal aneuploidy testing at chromosomes 13, 21, 18, X and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn.* 2012;32(13):1233-41.
36. Levy B, Norwitz E. Non-invasive prenatal aneuploidy testing: technologies and clinical implications. *Med Lab Obs.* 2013;45(6):8-16.
37. Yu SCY, Chan KCA, Zheng YWL, Jiang P, Liao GJW, Sun H, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(23):8583-8.
38. Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, Mosimann B, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: Effect of maternal and fetal factors. *Fetal Diagn Ther.* 2012;31(4):237-43.
39. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY, 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.
40. Scott FP, Menezes M, Palma-Dias R, Nisbet D, Schluter P, da Silva Costa F, et al. Factors affecting cell-free DNA fetal fraction and the consequences for test accuracy. *J Matern Neonatal Med.* 2018;31(14):1865-72.
41. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, et al. Cell-Free DNA Analysis for Noninvasive Examination of Trisomy. *Obstet Gynecol Surv.* 2015;70(8):483-4.
42. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, van den Boom D, Ehrich M, Deciu C, et al. Circulating cell free DNA testing: Are some test failures informative? *Prenat Diagn.* 2015;35(3):289-93.
43. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, McBride C, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn.* 2012;32(1):3-9.
44. Yaron Y. The implications of non-invasive prenatal testing failures: A review of an under-discussed phenomenon. *Prenat Diagn.* 2016;36(5):391-6.

45. Stokowski R, Wang E, White K, Batey A, Jacobsson B, Brar H, et al. Clinical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies. *Prenat Diagn.* 2015;35(12):1243–6.
46. Liu H, Gao Y, Hu Z, Lin L, Yin X, Wang J, et al. Performance evaluation of NIPT in detection of chromosomal copy number variants using Low-Coverage whole-genome sequencing of plasma DNA. *PLoS One.* 2016;11(7):1–11.
47. Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H, Sehnert AJ, Rava RP. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 2013;92(2):167–76.
48. Zhao C, Tynan J, Ehrich M, Hannum G, McCullough R, Saldivar JS, et al. Detection of fetal subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Clin Chem.* 2015;61(4):608–16.
49. Helgeson J, Wardrop J, Boomer T, Almasri E, Paxton WB, Saldivar JS, et al. Clinical outcome of subchromosomal events detected by whole-genome noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn.* 2015;35(10):999–1004.
50. Lo KK, Karampetsou E, Boustred C, McKay F, Mason S, Hill M, et al. Limited Clinical Utility of Non-invasive Prenatal Testing for Subchromosomal Abnormalities. *Am J Hum Genet.* 2016;98(1):34–44.
51. Yin A, Peng C, Zhao X, Caughey BA, Yang J, Liu J, et al. Noninvasive detection of fetal subchromosomal abnormalities by semiconductor sequencing of maternal plasma DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(47):14670–5.
52. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: Clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(5):530–8.
53. Lefkowitz RB, Tynan JA, Liu T, Wu Y, Mazloom AR, Almasri E, et al. Clinical validation of a noninvasive prenatal test for genomewide detection of fetal copy number variants. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(2):227.e1–227.e16.

54. Rose NC, Benn P, Milunsky A. Current controversies in prenatal diagnosis 1: Should NIPT routinely include microdeletions/microduplications? *Prenat Diagn.* 2016;36(1):10–4.
55. Martin K, Iyengar S, Kalyan A, Lan C, Simon AL, Stosic M, et al. Clinical experience with a single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal test for five clinically significant microdeletions. *Clin Genet.* 2018;93(2):293–300.
56. Brison N, Van Den Bogaert K, Dehaspe L, Van Den Oever JME, Janssens K, Blaumeiser B, et al. Accuracy and clinical value of maternal incidental findings during noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Genet Med.* 2017;19(3):306–13.
57. Gillentine MA, Lupo PJ, Stankiewicz P, Schaaf CP. An estimation of the prevalence of genomic disorders using chromosomal microarray data. *J Hum Genet.* 2018;63(7):795–801.
58. Grati FR, Molina Gomes D, Ferreira JCPB, Dupont C, Alesi V, Gouas L, et al. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenat Diagn.* 2015;35(8):801–9.
59. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol Surv.* 2013;68(4):276–8.
60. Van Opstal D, Van Maarle MC, Lichtenbelt K, Weiss MM, Schuring-Blom H, Bhola SL, et al. Origin and clinical relevance of chromosomal aberrations other than the common trisomies detected by genome-wide NIPS: Results of the TRIDENT study. *Genet Med.* 2018;20(5):480–5.
61. Pertile MD, Halks-Miller M, Flowers N, Barbaciuoru C, Kinnings SS, Vavrek D et al. Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of feto-placental disease. *Sci Transl Med.* 2017;30;9(405):eaan1240.
62. Brison N, Neofytou M, Dehaspe L, Bayindir B, Van Den Bogaert K, Dardour L, et al. Predicting fetoplacental chromosomal mosaicism during non-invasive prenatal testing. *Prenat Diagn.* 2018;38(4):258–66.
63. Mai CT, Kucik JE, Isenburg J, Feldcamp ML, Marengo LK, Bugenske EM et al. Selected Birth Defects Data from Population-Based Birth Defects Surveillance Programs in the

- United States, 2006 to 2010: featuring Trisomy Conditions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2013;97(11):709-725.
64. The American College of Obstetricians and Gynecologist Practice Bulletin No 88: Invasive prenatal testing for Aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2007;110(6):1459-67.
  65. Edwards L, Hui L. First and second trimester screening for fetal structural anomalies. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2018;23(2):102-11.
  66. Segó. Exploración ecográfica del primer trimestre. *Progresos Obstet y Ginecol.* 2015;1-13.
  67. Segó. Guía de la sistemática de la exploración ecográfica del segundo trimestre. *Progresos Obstet y Ginecol.* 2015;1-18.
  68. Souka AP, Von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(4):1005-21.
  69. Bilardo CM, Timmerman EP, Pajkrt E and van Maarle M. Increased nuchal translucency in euploid fetuses-what should we be telling the parents. *Prenat Diagn.* 2010;30:93-102.
  70. Shakoor S, Dileep D, Tirmizi S, Rashid S, Amin Y, Munim S. Increased nuchal translucency and adverse pregnancy outcomes. *J Matern Neonatal Med.* 2017;30(14):1760-3.
  71. Bilardo CM, Müller MA, Pajkrt E, Clur SA, Van Zalen MM, Bijlsma EK. Increased nuchal translucency thickness and normal karyotype: Time for parental reassurance. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;30(1):11-8.
  72. Srebniak MI, de Wit MC, Diderich KEM, Govaerts LCP, Joosten M, Knapen MFCM, et al. Enlarged NT ( $\geq 3.5$  mm) in the first trimester – not all chromosome aberrations can be detected by NIPT. *Mol Cytogenet.* 2016;9(1):69.
  73. Spencer K, Spencer CE, Power M, Moakes A, Nicolaides KH. One stop clinic for assessment of risk for fetal anomalies: A report of the first year of prospective screening for chromosomal anomalies in the first trimester. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2000;107(10):1271-5.
  74. Kagan KO, Wright D, Baker A, Sahota D, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic

- gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;31(6):618-24.
75. Wright D, Spencer K, Kagan K, Tørring N, Petersen OB, Christou A, et al. First-trimester combined screening for trisomy 21 at 7-14 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010;36(4):404-11.
76. Hume H, Chasen ST. Trends in timing of prenatal diagnosis and abortion for fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(4):545.e1-4.
77. Wald NJ, Bestwick JP, Huttly WJ, Aldis J, Borrell A, Goodburn S, et al. Prenatal screening for Down syndrome in twin pregnancies: Estimates of screening performance based on 61 affected and 7302 unaffected twin pregnancies. *Prenat Diagn.* 2018;38(13):1079-85.
78. Le Conte G, Letourneau A, Jani J, Kleinfinger P, Lohmann L, Costa JM, et al. Cell-free fetal DNA analysis in maternal plasma as screening test for trisomies 21, 18 and 13 in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;52(3):318-24.
79. Morin SJ, Eccles J, Iturriaga A, Zimmerman RS. Translocations, inversions and other chromosome rearrangements. *Fertil Steril.* 2017;107(1):19-26.
80. Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, Ross L, Levin B, Kline J. Trisomy Recurrence: A Reconsideration Based on North American Data. *Am J Hum Genet.* 2004;75(3):376-85.
81. Tabor A, Alfirovic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther.* 2010;27(1):1-7.
82. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):16-26.
83. Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Pompili E, Izzi C, Martinoni L, et al. Interpreting mosaicism in chorionic villi: Results of a monocentric series of 1001 mosaics in chorionic villi with follow-up amniocentesis. *Prenat Diagn.* 2015;35(11):1117-27.
84. Tongsong T, Wanapirak C, Piyamongkol W, Sirirhotiyakul S, Tongprasert F, Srisupundit K, et al. Second-trimester cordocentesis and the risk of small for gestational age and preterm birth. *Obstet Gynecol.* 2014;124(5):919-25.

85. Suela J, López-Expósito I, Querejeta ME, Martorell R, Cuatrecasas E, Armengol L, et al. Recomendaciones para el uso de microarrays en el diagnóstico prenatal. *Med Clin (Barc)*. 2017;148(7):328.e1-328.e8.
86. Borrell A, Fortuny A, Borobio V, Vanrell JA. Translucencia nuchal y ductus venoso: valores de referencia en el primer trimestre de la gestación. *Progresos en Obstet y Ginecol*. 2006;49(8):434-40.
87. European Cytogeneticists Association. General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics. *E c Assoc*. 2012;29(29):19.
88. Borrell A, Quintó L, Fortuny A, Boroblo V, Mercadé I, Goncé A, et al. Translucencia nuchal y ductus venoso: Valores de referencia en el primer trimestre de la gestación. *Progresos en Obstet y Ginecol*. 2006;49(8):434-40.
89. Syngelaki A, Pergament E, Homfray T, Akolekar R, Nicolaides KH. Replacing the combined test by cell-free DNA testing in screening for trisomies 21, 18 and 13: Impact on the diagnosis of other chromosomal abnormalities. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35(3):174-84.
90. Santorum M, Wright D, Syngelaki A, Karagiotti N, Nicolaides KH. Accuracy of first-trimester combined test in screening for trisomies 21, 18 and 13. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;49(6):714-20.
91. Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 1987;94(5):387-402.
92. Hecht CA, Hook EB. The imprecision in rates of down syndrome by 1-year maternal age intervals: A critical analysis of rates used in biochemical screening. *Prenat Diagn*. 1994;14(8):729-38.
93. Snijders RJM, Sundberg K, Holzgreve W, Henry G, Nicolaides KH. Maternal age and gestation-specific risk for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1999;13:167-70.
94. Pandya PP, Snijders RJM, Johnson SP, de Lourdes Brizot M, Nicolaids KH. Screening for fetal trisomies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10 to 14 weeks of gestation. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 1995;102(12):957-62.

95. Alamillo CML, Krantz D, Evans M, Fiddler M, Pergament E. Nearly a third of abnormalities found after first-trimester screening are different than expected: 10-year experience from a single center. *Prenat Diagn.* 2013;33(3):251–6.
96. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. *Lancet.* 1998;352(9125):343–6.
97. Borrell A, Costa D, Martinez JM, Delgado RD, Farguell T, Fortuny A. Criteria for fetal nuchal thickness cut-off: A re-evaluation. *Prenat Diagn.* 1997;17(1):23–9.
98. Petersen OB, Vogel I, Ekelund C, Hyett J, Tabor A. Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: Population-based study from a country with existing first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(3):265–71.
99. Kagan KO, Etchegaray A, Zhou Y, Wright D, Nicolaides KH. Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;34(1):14–8.
100. Kagan K, Hoopmann M, Hammer R, Stressig R, Kozlowski P. Screening for Chromosomal Abnormalities by First Trimester Combined Screening and Noninvasive Prenatal Testing. *Eur J Ultrasound.* 2014;36(01):40–6.
101. Burger NB, Bekker MN, de Groot CJM, Christoffels VM, Haak MC. Why increased nuchal translucency is associated with congenital heart disease: A systematic review on genetic mechanisms. *Prenat Diagn.* 2015;35(6):517–28.
102. Zalel Y, Shapiro I, Weissmann-Brenner A, Berkenstadt M, Leibovitz Z, Bronshtein M. Prenatal sonographic features of triploidy at 12–16 weeks. *Prenat Diagn.* 2016;36(7):650–5.
103. Hassan Toufaily M, Roberts DJ, Westgate MN, Holmes LB. Triploidy variation of phenotype. *Am J Clin Pathol.* 2016;145(1):86–95.
104. Engelbrechtsen L, Brondum-Nielsen K, Ekelund C, Tabor A, Skibsted L. Detection of triploidy at 11–14 weeks' gestation: A cohort study of 198 000 pregnant women. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;42(5):530–5.

105. Nicolaides KH, Syngelaki A, Gil MDM, Quezada MS, Zinevich Y. Prenatal detection of fetal triploidy from cell-free DNA testing in maternal blood. *Fetal Diagn Ther.* 2014;35(3):212–7.
106. Massalska D, Bijok J, Ilnicka A, Jakiel G and Roszkowski T. Triploidy – variability of sonographic phenotypes. *Prenat Diagn.* 2017;37(8):774–80.
107. Forabosco A, Percesepe A, Santucci S. Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: A population-based study on 88965 amniocenteses. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(7):897–903.
108. Gruchy N, Blondeel E, Le Meur N, Joly-Hélas G, Chambon P, Till M, et al. Pregnancy outcomes in prenatally diagnosed 47, XXX and 47, XYY syndromes: A 30-year French, retrospective, multicentre study. *Prenat Diagn.* 2016;36(6):523–9.
109. Malone FD, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Saade GR, Berkowitz RL, et al. First-Trimester Septated Cystic Hygroma: prevalence, natural history and pediatric outcome. *Obstet Gynecol.* 2005;106(2):288–94.
110. Beke A, Joó JG, Csaba A, Lázár L, Bán Z, Papp C, et al. Incidence of chromosomal abnormalities in the presence of fetal subcutaneous oedema, such as nuchal oedema, cystic hygroma and non-immune hydrops. *Fetal Diagn Ther.* 2009;25(1):83–92.
111. Papp C, Beke A, Mezei G, Szigeti Z, Bán Z and Papp Z. Prenatal Diagnosis of Turner Syndrome. *J Ultrasound Med.* 2006;25:711–7.
112. Yao H, Jiang F, Hu H, Gao Y, Zhu Z, Zhang H, et al. Detection of fetal sex chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: initial experience in a Chinese hospital. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;44(1):17–24.
113. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: Updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(3):249–66.
114. Grati FR, Malvestiti F, Ferreira JCPB, Bajaj K, Gaetani E, Agrati C, et al. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genet Med.* 2014;16(8):620–4.
115. Wang Y, Chen Y, Tian F, Zhang J, Song Z, Wu Y, et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clin Chem.* 2014;60(1):251–9.

116. Kornman L, Palma-Dias R, Nisbet D, Scott F, Menezes M, Da Silva Costa F, et al. Non-Invasive Prenatal Testing for Sex Chromosome Aneuploidy in Routine Clinical Practice. *Fetal Diagn Ther.* 2018;44(2):85–90.
117. Bevilacqua E, Ordóñez E, Hurtado I, Rueda L, Mazzone E, Cirigliano V, et al. Screening for Sex Chromosome Aneuploidy by Cell-Free DNA Testing: Patient Choice and Performance. *Fetal Diagn Ther.* 2018;44(2):98–104.
118. Reiss RE, Discenza M, Foster J, Dobson L, Wilkins-Haug L. Sex chromosome aneuploidy detection by noninvasive prenatal testing: helpful or hazardous? *Prenat Diagn.* 2017;37(5):515–20.
119. Scibetta EW, Gaw SL, Rao RR, Silverman NS, Han CS, Platt LD. Clinical accuracy of abnormal cell-free fetal DNA results for the sex chromosomes. *Prenat Diagn.* 2017;37(13):1291–7.
120. Kornman L, Palma-Dias R, Nisbet D, Scott F, Menezes M, Da Silva Costa F, et al. Non-Invasive Prenatal Testing for Sex Chromosome Aneuploidy in Routine Clinical Practice. *Fetal Diagn Ther.* 2018;44(2):85–90.
121. Ramdaney A, Hoskovec J, Harkenrider J, Soto E, Murphy L. Clinical experience with sex chromosome aneuploidies detected by noninvasive prenatal testing (NIPT): Accuracy and patient decision-making. *Prenat Diagn.* 2018;38(11):841–8.
122. Scott F, Murphy K, Carey L, Greville W, Mansfield N, Barahona P, et al. Prenatal diagnosis using combined quantitative fluorescent polymerase chain reaction and array comparative genomic hybridization analysis as a first-line test: Results from over 1000 consecutive cases. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(5):500–7.
123. Lee CN, Lin SY, Lin CH, Shih JC, Lin TH, Su YN. Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: A cohort study of 3171 pregnancies. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2012;119(5):614–25.
124. Breman A, Pursley AN, Hixson P, Bi W, Ward P, Bacino CA, et al. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. *Prenat Diagn.* 2012;32(4):351–61.
125. Fiorentino F, Napoletano S, Caiazzo F, Sessa M, Bono S, Spizzichino L, et al. Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low

- risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(7):725–30.
126. Van Opstal D, de Vries F, Govaerts L, Boter M, Lont D, van Veen S, et al. Benefits and burdens of using a SNP Array in pregnancies at increased risk for the common aneuploidies. *Hum Mutat.* 2015;36(3):319–26.
127. Bornstein E, Berger S, Cheung SW, MaliszewskiKT, Patel A, Pursley AN et al. Universal Prenatal Chromosomal Microarray Analysis: Additive Value and Clinical Dilemmas in Fetuses with a Normal Karyotype. *Am J Perinatol.* 2017;34(4):340–8.
128. Fu F, Deng Q, Lei T ying, Li R, Jing X yi, Yang X, et al. Clinical application of SNP array analysis in fetuses with ventricular septal defects and normal karyotypes. *Arch Gynecol Obstet.* 2017;296(5):929–40.
129. Borrell A, Grande M, Pauta M, Rodriguez-Revenga L, Figueras F. Chromosomal Microarray Analysis in Fetuses with Growth Restriction and Normal Karyotype: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fetal Diagn Ther.* 2018;44(1):1–9.
130. Donnelly JC, Platt LD, Rebarber A, Zachary J, Grobman WA and Wapner RJ. Association of copy number variants with specific ultrasonographically detected fetal anomalies. *Obstet Gynecol.* 2014;124(1):83–90.
131. Vogel I, Petersen OB, Christensen R, Hyett J, Lou S, Vestergaard EM. Chromosomal microarray as primary diagnostic genomic tool for pregnancies at increased risk within a population-based combined first-trimester screening program. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;51(4):480–6.
132. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Medicine (Baltimore).* 2011;90(1):1–18.
133. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: Clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(5):530–8.
134. Santorum M, Wright D, Syngelaki A, Karagioti N, Nicolaides KH. Accuracy of first trimester combined test in screening for trisomies 21, 18 and 13. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;49(6):714–20.

135. O'Brien BM, Halliday J, Lambert-Messerlian G, Eklund EE, Kloza E, Palomaki GE. Nuchal translucency measurement in the era of prenatal screening for aneuploidy using cell free (cf)DNA. *Prenat Diagn.* 2017;37(3):303–5.
136. Vora NL, Robinson S, Hardisty EE, Stamilio DM. Utility of ultrasound examination at 10–14 weeks prior to cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;49(4):465–9.
137. Reiff ES, Little SE, Dobson L, Wilkins-Haug L, Bromley B. What is the role of the 11- to 14-week ultrasound in women with negative cell-free DNA screening for aneuploidy? *Prenat Diagn.* 2016;36(3):260–5.
138. Zalel Y, Zemet R, Kivilevitch Z. The added value of detailed early anomaly scan in fetuses with increased nuchal translucency. *Prenat Diagn.* 2017;37(3):235–43.
139. Karim JN, Roberts NW, Salomon LJ, Papageorghiou AT. Systematic review of first-trimester ultrasound screening for detection of fetal structural anomalies and factors that affect screening performance. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;50(4):429–41.
140. Rao RR, Valderramos SG, Silverman NS, Han CS, Platt LD. The value of the first trimester ultrasound in the era of cell free DNA screening. *Prenat Diagn.* 2016;36(13):1192–8.
141. Levi S. Ultrasound in prenatal diagnosis: Polemics around routine ultrasound screening for second trimester fetal malformations. *Prenat Diagn.* 2002;22(4):285–95.
142. Kim SM, Kim HH, Han YJ, Choi JS, Ryu HM, Yang S, et al. Change in rates of prenatal tests for chromosomal abnormality over a 12-year period in women of advanced maternal age. *Obstet Gynecol Sci.* 2018;61(4):453.
143. Lau GW, Feldman DS, Morales CM, Smith D, Edwards R, Williams III J. First-trimester aneuploidy screening: Is there a maternal age at which it loses effectiveness? *J Reprod Med.* 2014;59(5):443–7.
144. Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, et al. First-Trimester or Second-Trimester Screening, or Both, for Down's Syndrome. *N Engl J Med.* 2005;353(19):2001–11.
145. Gil MM, Brik M, Casanova C, Martin-Alonso R, Verdejo M, Ramírez E, et al. Screening for trisomies 21 and 18 in a Spanish public hospital: from the combined test to the cell-free DNA test. *J Matern Neonatal Med.* 2017;30(20):2476–82.

146. Spencer K, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twins using first trimester ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: A review of three years experience. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2003;110(3):276–80.
147. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799–808.
148. Manotaya S, Xu H, Uerpairojkit B, Chen F, Charoenvidhya D, Liu H, et al. Clinical experience from Thailand: Noninvasive prenatal testing as screening tests for trisomies 21, 18 and 13 in 4736 pregnancies. *Prenat Diagn.* 2016;36(3):224–31.
149. Kirkegaard I, Uldbjerg N, Oxvig C. Biology of pregnancy-associated plasma protein-A in relation to prenatal diagnostics: An overview. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(9):1118–25.
150. Pummara P, Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Luewan S. Association of first-trimester pregnancy-associated plasma protein A levels and idiopathic preterm delivery: A population-based screening study. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2016;55(1):72–5.
151. Pornwattanakrileert W, Sekararithi R, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Tongprasert F, Srisupundit K, et al. First-trimester serum biomarker screening for fetal Down syndrome as a predictor of preterm delivery: a population-based study. *J Matern Neonatal Med.* 2018;7058.
152. Spencer K, Cowans NJ, Avgidou K, Molina F, Nicolaides KH. First-trimester biochemical markers of aneuploidy and the prediction of small-for-gestational age fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;31(1):15–9.
153. Grande M, Jansen FAR, Blumenfeld YJ, Fisher A, Odibo AO, Haak MC, et al. Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;46(6):650–8.
154. Senat MV, Bussièrès L, Couderc S, Roume J, Rozenberg P, Bouyer J, et al. Long-term outcome of children born after a first-trimester measurement of nuchal translucency at the 99th percentile or greater with normal karyotype: A prospective study. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(1):53.e1–e6.

155. Lichtenbelt KD, Diemel BDM, Koster MPH, Manten GTR, Siljee J, Schuring-Blom GH, et al. Detection of fetal chromosomal anomalies: Does nuchal translucency measurement have added value in the era of non-invasive prenatal testing? *Prenat Diagn.* 2015;35(7):663–8.
156. Lund ICB, Christensen R, Petersen OB, Vogel I, Vestergaard EM. Chromosomal microarray in fetuses with increased nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):95–100.
157. Schou K V., Kirchhoff M, Nygaard U, Jørgensen C, Sundberg K. Increased nuchal translucency with normal karyotype: A follow-up study of 100 cases supplemented with CGH and MLPA analyses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;34(6):618–22.
158. Faas BH, Feenstra I, Eggink AJ, Kooper AJ, Pfundt R, Van Vugt JM, et al. Non-targeted whole genome 250K SNP array analysis as replacement for karyotyping in fetuses with structural ultrasound anomalies: Evaluation of a one-year experience. *Prenat Diagn.* 2012;32(4):362–70.
159. Huang J, Poon LC, Akolekar R, Choy KW, Leung TY, Nicolaides KH. Is high fetal nuchal translucency associated with submicroscopic chromosomal abnormalities on array CGH? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(6):620–4.
160. Shaffer LG, Rosenfeld JA, Dabell MP, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW, et al. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. *Prenat Diagn.* 2012;32(10):986–95.
161. Yang X, Li R, Fu F, Zhang Y, Li D, Liao C. Submicroscopic chromosomal abnormalities in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *J Matern Neonatal Med.* 2017;30(2):194–8.
162. Leung TY, Vogel I, Lau TK, Chong W, Hyett JA, Petersen OB, et al. Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;38(3):314–9.
163. Huang LY, Pan M, Han J, Zhen L, Yang X, Li DZ. What would be missed in the first trimester if nuchal translucency measurement is replaced by cell free DNA foetal aneuploidy screening? *J Obstet Gynaecol (Lahore).* 2018;38(4):498–501.

164. Sotiriadis A, Papatheodorou S, Eleftheriades M, Makrydimas G. Nuchal translucency and major congenital heart defects in fetuses with normal karyotype: A meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;42(4):383–9.
165. Westin M, Saltvedt S, Almström H, Grunewald C, Valentin L. By how much does increased nuchal translucency increase the risk of adverse pregnancy outcome in chromosomally normal fetuses? A study of 16 260 fetuses derived from an unselected pregnant population. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;29(2):150–8.
166. Iuculano A, Pagani G, Stagnati V, Floris M, Ibba RM, Monni G. Pregnancy outcome and long-term follow-up of fetuses with isolated increased NT: A retrospective cohort study. *J Perinat Med.* 2016;44(2):237–42.
167. Pylyp LY, Spynenko LO, Verhoglyad N V., Mishenko AO, Mykytenko DO, Zukin VD. Chromosomal abnormalities in products of conception of first-trimester miscarriages detected by conventional cytogenetic analysis: a review of 1000 cases. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(2):265–71.
168. Warburton D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3–4):266–72.
169. Ghevaria H, Sengupta S, Sarna U, Sargeant S, Serhal P, Delhanty J. The contribution of germinal mosaicism to human aneuploidy. *Cytogenet Genome Res.* 2014;144(4):264–74.
170. Hultén MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson A, et al. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet.* 2008;1(1):21.
171. Delhanty JDA. Inherited aneuploidy: Germline mosaicism. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133(2–4):136–40.
172. Berend SA, Horwitz J, McCaskill C, Shaffer LG. Identification of Uniparental Disomy Following Prenatal Detection of Robertsonian Translocations and Isochromosomes. *Am J Hum Genet.* 2002;66(6):1787–93.
173. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: Role of genetic background. *Reprod Biomed Online.* 2007;14(6):734–45.
174. Keymolen K, Van Berkel K, Vorsselmans A, Staessen C, Liebaers I. Pregnancy outcome in carriers of Robertsonian translocations. *Am J Med Genet Part A.* 2011;155(10):2381–5.

175. Nishikawa N, Sato T, Suzumori N, Sonta S, Suzumori K. Meiotic segregation analysis in male translocation carriers by using fluorescent in situ hybridization. *Int J Androl.* 2008;31(1):60–6.
176. Wilch ES, Morton CC. Historical and clinical perspectives on chromosomal translocations. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1044:1–14.
177. Li X, Liu Y, Yue S, Wang L, Zhang T, Guo C, et al. Uniparental disomy and prenatal phenotype: Two case reports and review. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(45):e8474.
178. Eggermann T, Soellner L, Buiting K, Kotzot D. Mosaicism and uniparental disomy in prenatal diagnosis. *Trends Mol Med.* 2015;21(2):77–87.
179. Kotzot D. Review and meta-analysis of systematic searches for uniparental disomy (UPD) other than UPD 15. *Am J Med Genet.* 2002;111(4):366–75.
180. Nagaoka SI, Hassold TJ and Hunt PA. Human aneuploidy: Mechanism and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* 2013;13(7):493–504.
181. Hörmandörsfer C, Corral A, Scharf A, Vaske B, Hillemanns P and Schmidt P. *Rev Esp Salud Pública.* 2010;84:43–51.
182. Gil MM, Quezada MS, Bregant B, Syngelaki A, Nicolaidis KH. Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first-trimester twin pregnancies. *Fetal Diagn Ther.* 2014;35(3):204–11.
183. Gonc e A, Borrell A, Fortuny A, Casals E, Martínez MA, Mercad e I, et al. First-trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: Does the addition of biochemistry make an improvement? *Prenat Diagn.* 2005;25(12):1156–61.
184. Prats P, Rodríguez I, Nicolau J, Comas C. Early first-trimester free- $\beta$ -hCG and PAPP-A serum distributions in monochorionic and dichorionic twins. *Prenat Diagn.* 2012;32(1):64–9.
185. Amor DJ, Xu JX, Halliday JL, Francis I, Healy DL, Breheny S, et al. Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART) have low levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) leading to a high rate of false-positive results in first trimester screening for Down syndrome. *Hum Reprod.* 2009;24(6):1330–8.

186. Engels MAJ, Pajkrt E, Groot DT, Schats R, Twisk JWR, Van Vugt JMG. Validation of correction factors for serum markers for first-trimester down syndrome screening in singleton pregnancies conceived with assisted reproduction. *Fetal Diagn Ther.* 2013;34(4):217–24.
187. Lanes A, Huang T, Sprague AE, Leader A, Potter B, Walker M. Maternal serum screening markers and nuchal translucency measurements in in vitro fertilization pregnancies: a systematic review. *Fertil Steril.* 2016;106(6):1463–9.e2.
188. Tan Y, Gao Y, Lin G, Fu M, Li X, Yin X, et al. Noninvasive prenatal testing (NIPT) in twin pregnancies with treatment of assisted reproductive techniques (ART) in a single center. *Prenat Diagn.* 2016;36(7):672–9.
189. Huang X, Zheng J, Chen M, Zhao Y, Zhang C, Liu L, et al. Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies. *Prenat Diagn.* 2014;34(4):335–40.
190. Sarno L, Revello R, Hanson E, Akolekar R, Nicolaides KH. Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;47(6):705–11.
191. Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Ehrich M, van den Boom D, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn.* 2012;32(8):730–4.
192. Yang J, Hou Y, Wang Y, Peng H, Qi Y, Haoxin OY, et al. Performance of non-invasive prenatal testing for trisomies 21 and 18 in twin pregnancies. *Mol Cytogenet.* 2018;11(1):4–9.
193. Takeda E, Suzumori N, Kumagai K, Inuzuka S, Oseto K, Ohigashi Y, et al. Performance and outcomes of noninvasive prenatal testing for twin pregnancies in Japan. *J Obstet Gynaecol Res.* 2018;44(10):1909–14.
194. Galeva S, Konstantinidou L, Gil MM, Akolekar R, Nicolaides KH. Routine first-trimester screening for fetal trisomies in twin pregnancy: cell-free DNA test contingent on results from combined test. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019;53(2):208–13.
195. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierickx H, et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):61–6.

196. Cherry AM, Akkari YM, Barr KM, Kearney HM, Rose NC, South ST, et al. Diagnostic cytogenetic testing following positive noninvasive prenatal screening results: A clinical laboratory practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2017;19(8):845–50.
197. Lo TK, Chan KYK, Kan ASY, So PL, Kong CW, Mak SL, et al. Informed choice and decision making in women offered cell-free DNA prenatal genetic screening. *Prenat Diagn.* 2017;37(3):299–302.
198. Palomaki GE, Kloza EM. Prenatal cell-free DNA screening test failures: a systematic review of failure rates, risks of Down syndrome, and impact of repeat testing. *Genet Med.* 2018;20(11):1312–23.
199. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ, Bhatt S, Murray K, Prosen TL, et al. Noninvasive prenatal testing and incidental detection of occult maternal malignancies. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2015;314(2):162–9.
200. Dharajiya NG, Grosu DS, Farkas DH, McCullough RM, Almasri E, Sun Y, et al. Incidental detection of maternal neoplasia in noninvasive prenatal testing. *Clin Chem.* 2018;64(2):329–35.
201. Benn P, Valenti E, Shah S, Martin K, Demko Z. Factors associated with informative redraw after an initial NO result in noninvasive prenatal testing. *Obstet Gynecol.* 2018;132(2):428–35.
202. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2013;33(7):667–74.
203. Suzumori N, Ebara T, Yamada T, Samura O, Yotsumoto J, Nishiyama M, et al. Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy. *J Hum Genet.* 2016;61(7):647–52.
204. Wray AM, Ghidini A, Alvis C, Hodor J, Landy HJ, Poggi SH. The impact of first-trimester screening on AMA patients' uptake of invasive testing. *Prenat Diagn.* 2005;25(5):350–3.
205. Nicolaides KH, Chervenak FA, McCullough LB, Avgidou K, Papageorghiou A. Evidence-based obstetric ethics and informed decision-making by pregnant women about invasive diagnosis after first-trimester assessment of risk for trisomy 21. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193(2):322–6.

206. Jaques AM, Collins VR, Muggli EE, Amor DJ, Francis I, Sheffield LJ et al. Uptake of prenatal diagnostic testing and the effectiveness of prenatal screening for Down syndrome. 2010;30:522-30.
207. Warsof SL, Larion S, Abuhamad AZ. Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. *Prenat Diagn.* 2015;35(10):972-9.
208. Chetty S, Garabedian MJ, Norton ME. Uptake of noninvasive prenatal testing (NIPT) in women following positive aneuploidy screening. *Prenat Diagn.* 2013;33(6):542-6.
209. Pettit KE, Hull AD, Korty L, Jones MC, Pretorius DH. The utilization of circulating cell-free fetal DNA testing and decrease in invasive diagnostic procedures: An institutional experience. *J Perinatol.* 2014;34(10):750-3.
210. Larion S, Warsof SL, Romary L, Mlynarczyk M, Peleg D, Abuhamad AZ. Association of combined first-trimester screen and noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. *Obstet Gynecol.* 2014;123(6):1303-10.
211. Chan YM, Leung WC, Chan WP, Leung TY, Cheng YKY, Sahota DS. Women's uptake of non-invasive DNA testing following a high-risk screening test for trisomy 21 within a publicly funded healthcare system: Findings from a retrospective review. *Prenat Diagn.* 2015;35(4):342-7.
212. Johnson K, Kelley J, Saxton V, Walker SP, Hui L. Declining invasive prenatal diagnostic procedures: A comparison of tertiary hospital and national data from 2012 to 2015. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol.* 2017;57(2):152-6.
213. Bjerregaard L, Stenbakken AB, Andersen CS, Kristensen L, Jensen CV, Skovbo P, et al. The rate of invasive testing for trisomy 21 is reduced after implementation of NIPT. *Dan Med J.* 2017;64(4):2-5.
214. Alberman E, Huttly W, Hennessy E, McIntosh A. The use of record linkage for auditing the uptake and outcome of prenatal serum screening and prenatal diagnostic tests for Down syndrome. *Prenat Diagn.* 2003;23(10):801-6.
215. Mueller VM, Huang T, Summers AM, Winsor SHM. The influence of risk estimates obtained from maternal serum screening on amniocentesis rates. *Prenat Diagn.* 2005;25(13):1253-7.

216. Lichtenbelt KD, Schuring-Blom GH, van der Burg N, Page-Christiaens GCML, Knoers N V, Schielen PCJI, et al. Factors determining uptake of invasive testing following first-trimester combined testing. *Prenat Diagn.* 2013;33(4):328–33.
217. Manegold-Brauer G, Berg C, Flöck A, Rüländ A, Gembruch U, Geipel A. Uptake of non-invasive prenatal testing (NIPT) and impact on invasive procedures in a tertiary referral center. *Arch Gynecol Obstet.* 2015;292(3):543–8.
218. Manegold-Brauer G, Bellin AK, Hahn S, De Geyter C, Buechel J, Hoesli I, et al. A new era in prenatal care: Non-invasive prenatal testing in Switzerland. *Swiss Med Wkly.* 2014;144(February):1–5.
219. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Obstet Gynecol Surv.* 2013;68(3):173–5.
220. Hill M, Wright D, Daley R, Lewis C, McKay F, Mason S, et al. Evaluation of non-invasive prenatal testing (NIPT) for aneuploidy in an NHS setting: A reliable accurate prenatal non-invasive diagnosis (RAPID) protocol. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014;14(1):1–10.
221. Gil MM, Quezada MS, Bregant B, Ferraro M, Nicolaides KH. Implementation of maternal blood cell-free DNA testing in early screening for aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;42(1):34–40.
222. Quezada MS, Gil MM, Francisco C, Oròsz G, Nicolaides KH. Screening for trisomies 21, 18 and 13 by cell-free DNA analysis of maternal blood at 10–11 weeks' gestation and the combined test at 11–13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):36–41.
223. Robson SJ, Hui L. National decline in invasive prenatal diagnostic procedures in association with uptake of combined first trimester and cell-free DNA aneuploidy screening. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol.* 2015;55(5):507–10.
224. Hui L, Tabor A, Walker SP, Kilby MD. How to safeguard competency and training in invasive prenatal diagnosis: “The elephant in the room.” *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;47(1):8–13.
225. Suskin BG, Sciscione AM, Teigen N, Jenkins TC, Wapner RJ, Gregg AR, et al. Revisiting the challenges of training Maternal Fetal Medicine fellows in chorionic villus sampling. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(6):777.e1–e4.

## 9. Abreviaturas



## 9. ABREVIATURAS

ACSs: Aneuploidías de los cromosomas sexuales.

ADNf: ADN fetal libre.

Array-CGH: Array con hibridación genómica comparada.

bp: *base pairs*; pares de bases.

CAKUT: *congenital anomalies of the Kidney and the urinary tract*.

CC1T: Cribado combinado de primer trimestre.

CIR: crecimiento intrauterino retrasado.

CNVs: Variaciones en el número de copia o *copy number variations*.

LCC: Longitud cráneo caudal.

EMA: Edad materna avanzada.

f- $\beta$ HCG: Fracción  $\beta$  libre de la gonadotropina coriónica humana.

FP: falsos positivos.

HCSC: Hospital Clínico San Carlos.

MLPA: *Multiplex ligation dependent probe amplification*.

MoM: Múltiplos de mediana.

PAPP-A: Proteína plasmática A asociada a la gestación.

p99: percentil 99.

p97,5: percentil 97,5.

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

T13: Trisomía 13.

T18: Trisomía 18.

T21: Trisomía 21.

TFP: tasa de falsos positivos.

TN: Translucencia nual.

TRA: tratamiento de reproducción asistida.

VPP: Valor predictivo positivo.

VPN: Valor predictivo negativo.

# 10. Índice de tablas y figuras



## 10.1. Índice de tablas

<b>Tabla 1.1.</b> Cribados bioquímicos y/o combinados con datos ecográficos en el primer y segundo trimestre de gestación.....	41
<b>Tabla 1.2.</b> Sensibilidad y tasa de falsos positivos del test de ADNf.....	43
<b>Tabla 1.3.</b> Valor predictivo positivo para las trisomías 21, 18 y 13 en población obstétrica de alto riesgo y general.....	43
<b>Tabla 1.4.</b> Valor predictivo positivo del test de ADNf para las aneuploidías sexuales .....	44
<b>Tabla 1.5.</b> Causas de falsos positivos y negativos en el test de ADNf.....	44
<b>Tabla 1.6.</b> Patrones séricos y ecográficos en gestaciones euploides, T21, T18 y T13.....	53
<b>Tabla 5.1.</b> Datos demográficos y clínicos de las gestantes estratificados por riesgos en el cribado combinado.....	87
<b>Tabla 5.2.</b> Resultados de los cariotipos realizados durante el periodo 2009-2014 clasificados por grupos de riesgo en el CC1T.....	90
<b>Tabla 5.3.</b> Distribución de los 81 cariotipos desequilibrados prenatales y postnatales en función de los riesgos en el CC1T.....	91
<b>Tabla 5.4.</b> Falsos negativos en el CC1T para T21.....	92
<b>Tabla 5.5.</b> Translucencia nucal $\geq$ al percentil 97,5, riesgo en el cribado combinado y resultados de cariotipo.....	93
<b>Tabla 5.6.</b> Datos demográficos y clínicos de las gestantes estratificados por riesgos en el cribado combinado durante el periodo 2015-2016.....	95
<b>Tabla 5.7.</b> Indicaciones a la consulta de asesoramiento y pruebas genéticas prenatales realizadas en las 160 gestantes con indicación al test contingente.....	99
<b>Tabla 5.8.</b> Indicaciones a la consulta de asesoramiento y pruebas genéticas prenatales realizadas en las 130 gestantes sin indicación al test contingente.....	100
<b>Tabla 5.9.</b> Resultados de los cariotipos y ADNf realizados durante el periodo 2015-2016 clasificados por grupos de riesgo en el CC1T y en las gestantes sin CC1T.....	103
<b>Tabla 5.10.</b> Falsos negativos en el CC1T para T21 durante el periodo 2015-2016.....	104
<b>Tabla 5.11.</b> Translucencia nucal $\geq$ al percentil 97,5, riesgo en el cribado combinado y resultados de cariotipo durante el periodo 2015-2016.....	105
<b>Tabla 5.12.</b> Datos demográficos y clínicos de las gestantes estratificados por riesgos en el cribado combinado durante el periodo 2013-2014.....	106

<b>Tabla 5.13.</b> Indicaciones a la consulta de asesoramiento y pruebas genéticas prenatales realizadas en las 890 gestantes del periodo 2013-2014.....	111
<b>Tabla 5.14.</b> Resultados de los cariotipos realizados y los ADNf extraclínicos aportados durante el periodo 2013-2014 clasificados por grupos de riesgo en el CC1T y en las gestantes sin CC1T.....	113
<b>Tabla 5.15.</b> Gestantes con edad mayor o igual a 35 años con CC1T en el total de gestantes que se realizaron el CC1T en cada periodo.....	114
<b>Tabla 5.16.</b> Gestantes con edad mayor o igual a 35 años sin CC1T en el total de gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	114
<b>Tabla 5.17.</b> Gestantes con CC1T de riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes que se realizaron el CC1T en cada periodo.....	115
<b>Tabla 5.18.</b> Gestantes con CC1T de alto riesgo ( $R \geq 1/50$ ) en el total de gestantes que tuvieron un riesgo en el CC1T en cada periodo.....	115
<b>Tabla 5.19.</b> Gestantes con CC1T de riesgo intermedio ( $R 1/51-1/300$ ) en el total de gestantes que tuvieron un riesgo en el CC1T en cada periodo.....	115
<b>Tabla 5.20.</b> Gestantes con CC1T de bajo riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes que se realizaron un CC1T en cada periodo.....	115
<b>Tabla 5.21.</b> Gestantes con EMA y CC1T de bajo riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes que se realizaron un CC1T en cada periodo.....	116
<b>Tabla 5.22.</b> Gestantes con otras indicaciones con CC1T de bajo riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes que se realizaron un CC1T en cada periodo.....	116
<b>Tabla 5.23.</b> Gestantes sin CC1T que acudieron a la consulta de asesoramiento en el total de gestantes atendidas en dicha consulta en cada periodo.....	116
<b>Tabla 5.24.</b> Gestantes de EMA con CC1T de riesgo bajo que acudieron a la consulta de asesoramiento en el total de gestantes con CC1T de riesgo bajo atendidas en dicha consulta en cada periodo.....	117
<b>Tabla 5.25.</b> Gestantes de EMA con CC1T de riesgo bajo que acudieron a la consulta de asesoramiento en el total de gestantes atendidas en dicha consulta en cada periodo.....	117
<b>Tabla 5.26.</b> Gestantes con otras indicaciones con CC1T de bajo riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes con CC1T de bajo riesgo atendidas en dicha consulta en cada periodo.....	117
<b>Tabla 5.27.</b> Gestantes con otras indicaciones con CC1T de bajo riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes atendidas en dicha consulta en cada periodo.....	118

<b>Tabla 5.28.</b> Gestantes con CC1T de riesgo atendidas en la consulta de asesoramiento en el total de gestantes atendidas en dicha consulta en cada periodo.....	118
<b>Tabla 5.29.</b> Total de las pruebas invasivas realizadas en el total de las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo. ....	119
<b>Tabla 5.30.</b> Amniocentesis realizadas en el total de las pruebas invasivas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo. ....	119
<b>Tabla 5.31.</b> Biopsias coriales realizadas en el total de las pruebas invasivas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo. ....	119
<b>Tabla 5.32.</b> Estudios citogenéticos prenatales desequilibrados detectados en el total de las pruebas invasivas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo. ....	120
<b>Tabla 5.33.</b> Pruebas invasivas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por riesgo intermedio en cada periodo. ....	120
<b>Tabla 5.34.</b> Renuncias a cualquier prueba genética en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por riesgo intermedio en cada periodo.....	120
<b>Tabla 5.35.</b> Pruebas invasivas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por TN $\geq$ p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo TN en p97,5 sin CC1T en cada periodo.....	121
<b>Tabla 5.36.</b> Renuncias a cualquier prueba genética en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por TN $\geq$ p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo riesgo y TN en p97,5 sin CC1T en cada periodo.....	121
<b>Tabla 5.37.</b> Pruebas invasivas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por antecedente de feto anterior con aneuploidía en cada periodo.....	121
<b>Tabla 5.38.</b> Renuncias a cualquier prueba genética en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por antecedente de feto anterior con aneuploidía en cada periodo.....	121
<b>Tabla 5.39.</b> Pruebas invasivas realizadas en las gestantes gemelares mayores de 35 años atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	122
<b>Tabla 5.40.</b> Renuncias a cualquier prueba genética en las gestantes gemelares mayores de 35 años atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	122
<b>Tabla 5.41.</b> Pruebas invasivas realizadas en las gestantes con EMA sin CC1T atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	122
<b>Tabla 5.42.</b> Renuncias a cualquier prueba genética en las gestantes con EMA sin CC1T atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	122
<b>Tabla 5.43.</b> Total de pruebas invasivas realizadas en el total de las gestantes con indicación a ADNf atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	123

<b>Tabla 5.44.</b> Total de renunciaciones a cualquier prueba genética en el total de las gestantes con indicación a ADNf atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	123
<b>Tabla 5.45.</b> Pruebas genéticas realizadas en las gestantes con riesgo intermedio atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	124
<b>Tabla 5.46.</b> Pruebas genéticas realizadas en las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento por TN $\geq$ p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo riesgo y TN en p97,5 sin CC1T en cada periodo.....	124
<b>Tabla 5.47.</b> Pruebas genéticas realizadas en las gestantes con antecedente de feto anterior con aneuploidía atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	124
<b>Tabla 5.48.</b> Pruebas genéticas realizadas en las gestantes gemelares mayores de 35 años atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	124
<b>Tabla 5.49.</b> Pruebas genéticas realizadas en las gestantes con EMA sin CC1T atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	125
<b>Tabla 5.50.</b> Total de pruebas genéticas realizadas en el total de las gestantes con indicación a ADNf atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	125
<b>Tabla 5.51.</b> Total de pruebas genéticas realizadas en las gestantes con otras indicaciones a ADNf distintas a CC1T de riesgo intermedio y TN $\geq$ p97,5 (<3,5 mm) con CC1T de bajo riesgo y TN en p97,5 sin CC1T, atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	125
<b>Tabla 5.52.</b> Total de las pruebas genéticas prenatales, Invasivas y ADNf, realizadas en el total de las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento en cada periodo.....	125
<b>Tabla 5.53.</b> Resultados más relevantes de la encuesta de calidad percibida que se adjunta en el anexo 3.....	126
<b>Tabla 6.1.</b> Indicaciones a ADNf como test contingente en el Hospital Clínico San Carlos.....	147

## 10.2. Índice de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Esquema de las metodologías semicuantitativas para la detección de aneuploidías.....	47
<b>Figura 1.2.</b> Imagen de la medida de una TN en p99 ( $\geq 3,5$ mm) durante el primer trimestre de gestación. ....	52
<b>Figura 1.3.</b> Esquema de amniocentesis y biopsia corial.....	57
<b>Figura 4.1.</b> Cariotipo masculino con trisomía 21.....	77
<b>Figura 4.2.</b> FISH en interfases (núcleos) compatible con triploidía (69,XXY).....	78
<b>Figura 4.3.</b> Resultado de QF-PCR de varón normal para los cromosomas 21, 18 y 13.....	79
<b>Figura 4.4.</b> Diagrama de flujo del protocolo de atención prenatal en la fase 2 o estudio prospectivo.....	83
<b>Figura 5.1.</b> Distribución de las gestantes atendidas en la consulta de asesoramiento prenatal.....	88
<b>Figura 5.2.</b> Edad y distribución de las gestantes remitidas asesoramiento genético prenatal durante el periodo 2015-2016.....	95
<b>Figura 5.3.</b> Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes con CC1T de riesgo bajo (2015-2016).....	96
<b>Figura 5.4.</b> Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes con CC1T de riesgo (2015-2016).....	97
<b>Figura 5.5.</b> Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes sin CC1T (2015-2016).....	98
<b>Figura 5.6.</b> Edad y distribución de las gestantes remitidas asesoramiento genético prenatal durante el periodo 2013-2014.....	107
<b>Figura 5.7.</b> Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes con CC1T de riesgo (2013-2014).....	108
<b>Figura 5.8.</b> Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes con CC1T de riesgo (2013-2014).....	109
<b>Figura 5.9.</b> Distribución y pruebas elegidas como primera opción por las gestantes sin CC1T (2013-2014).....	110
<b>Figura 5.10.</b> Gráfico: gestantes atendidas por EMA y otras indicaciones en ambos periodos.....	118
<b>Figura 5.11.</b> Gráfico: Pruebas invasivas realizadas en ambos periodos.....	119

**Figura 5.12.** Gráfico: Pruebas invasivas, renuncias a todos los test y ADNf extraclínico en las gestantes con indicación a ADNf en ambos periodos.....123

**Figura 5.13.** Grado de satisfacción global.....127

**Figura 5.14.** ¿Recomendaría la Unidad de Genética?.....127

**Figura 5.15.** Lugar de nacimiento.....127

**Figura 5.16.** Estudios.....127

**Figura 5.17.** Ocupación.....127

# 11. Anexos



## **11.1. Anexo 1: Consentimientos informados**



## OBTENCIÓN DE MUESTRA FETAL MEDIANTE AMNIOCENTESIS/BIOPSIA CORIAL/CORDOCENTESIS PARA ESTUDIO GENÉTICO

### INFORMACIÓN

#### ¿QUÉ ES Y CÓMO SE REALIZA?

La prueba consiste en obtener una muestra fetal por medio de:

- Amniocentesis (a partir de la semana 15 de gestación): para obtener líquido amniótico por introducción de una aguja a través de la pared abdominal materna, bajo control ecográfico, hasta llegar al líquido que rodea al feto (líquido amniótico).
- Biopsia corial (a partir de la semana 11 de gestación): para obtener una muestra de tejido placentario a través de la pared abdominal o a través del cuello del útero.
- Cordocentesis: para obtener una muestra de sangre fetal por punción del cordón umbilical.

#### ¿PARA QUÉ SIRVE?

El motivo que hace necesaria la realización de esta prueba en mi caso particular es para:

.....  
Y dadas las características del proceso en el que estoy se me recomienda la realización de la técnica invasiva en las semanas de gestación: .....

#### ¿QUÉ CONSECUENCIAS IMPORTANTES PRODUCIRÁ LA INTERVENCIÓN?

La muestra obtenida se utilizará para darme la información de esta patología en el feto. En función de mi caso, este resultado me servirá para tomar una decisión sobre mi embarazo. Con el fin de prevenir posibles complicaciones se me recomienda permanecer en reposo relativo y con medicación en las siguientes 48h tras la prueba.

#### ¿QUÉ RIESGOS PUEDE HABER?

##### • Riesgos poco frecuentes:

**Principales:** pérdida fetal estimada en un 0.75-1% para aquellas pruebas invasivas (amniocentesis y biopsia corial) realizadas en Unidades de Diagnóstico Prenatal reconocidas. Necesidad de una 2ª extracción para una 2ª muestra debido a que no se haya obtenido suficiente material, se produzca fallo de cultivo, mosaicismo placentario o contaminación materna (todo más frecuente en vellosidad) o porque existan dudas de los resultados que convenga aclarar. Pueden existir falsos positivos o negativos.

**Secundarios:** rotura de bolsa, hematomas, hemorragias internas, punción fetal.

- Riesgos específicamente relacionados con el paciente: .....
- .....
- .....

#### ¿HAY OTRAS ALTERNATIVAS AL PROCEDIMIENTO?

Para determinados estudios genéticos, existen pruebas alternativas que proporcionan una información parcial y que requieren de este tipo de pruebas invasivas para confirmar la información obtenida.

#### ¿QUÉ CONSECUENCIAS SON PREVISIBLES DE LA NO REALIZACIÓN?

Si no se realiza este estudio no es posible confirmar/descartar la patología fetal.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

**DECLARACIONES Y FIRMAS**

**PACIENTE**

D./ D<sup>a</sup> .....con DNI..... declaro que el/la facultativo, Dr/Dra....., me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta prueba genética. También me ha explicado los riesgos existentes, que éste es el procedimiento más adecuado en la actualidad para establecer el diagnóstico genético de mi interés, y las consecuencias previsibles de su no realización. He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas, **y voluntariamente, doy mi consentimiento** para que me realicen dicha prueba. Puedo solicitar copia del presente documento. Sé que puedo retirar este consentimiento cuando lo desee.

En Madrid a .....de.....de 20...

Firmado el/la paciente

**REPRESENTANTE LEGAL**

D. / D<sup>a</sup>..... con DNI..... y domicilio en ..... calle ..... n<sup>o</sup>.... declaro que el/la facultativo, Dr/Dra..... me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta prueba diagnóstica. También me ha explicado los riesgos existentes, que éste es el procedimiento más adecuado en la actualidad para establecer el diagnóstico genético de mi interés, y las consecuencias previsibles de su no realización. He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas, **y voluntariamente, doy mi consentimiento** para que realicen al paciente D./D<sup>a</sup>.....con DNI....., dicha exploración/intervención. Puedo solicitar copia del presente documento. Sé que puedo retirar este consentimiento cuando lo desee.

En Madrid a.....de .....de 20...

Firmado el/la representante

**FACULTATIVO**

Dr/Dra..... He informado a este/a paciente, y/o a su representante legal, del propósito y naturaleza del procedimiento descrito, de sus riesgos y alternativas, y de las consecuencias previsibles de su no realización, dejando constancia en la historia clínica. Asimismo, la existencia de otras enfermedades o cualquier otra circunstancia patológica personal que pudiera condicionar la realización de la prueba. Se incorpora este documento a la historia clínica del paciente.

En Madrid a .....de.....de 20...

Firma, n<sup>o</sup> de colegiado/n<sup>o</sup> del hospital

**NEGATIVA DEL PACIENTE A LA REALIZACIÓN**

Si usted no acepta la realización de la prueba diagnóstica haga constar el motivo:.....

Firmado el/la paciente

**REVOCACIÓN DE LA DECISIÓN POR EL PACIENTE**

En Madrid a .....de.....de 20...

Firmas: (Paciente) El/la facultativo Dr/Dra..... n<sup>o</sup> de colegiado/n<sup>o</sup> del hospital

## ESTUDIO DE GENÉTICA MOLECULAR

### INFORMACIÓN

#### ¿QUÉ ES Y CÓMO SE REALIZA?

La prueba consiste en la obtención de ADN a partir de una muestra de:

- Sangre periférica extraída por punción venosa.
- Células bucales extraídas mediante fricción de mucosa bucal
- Vellosidad corial directa o de su cultivo, extraída por biopsia corial (firmar CI prenatal)
- Amniocitos directos o de su cultivo, extraídos por amniocentesis (firmar CI prenatal)
- Otros: .....

#### ¿PARA QUÉ SIRVE?

Con esta muestra de ADN se pretende estudiar mi información genética en relación a la enfermedad/síndrome/patología: .....  
Y así conocer si soy persona afectada de este trastorno genético.

#### ¿QUÉ RIESGOS PUEDE HABER?

Los riesgos y complicaciones más relevantes que pueden presentarse son:

- Los riesgos generales de la obtención de la muestra para la extracción de ADN. En el caso de las muestras prenatales (vellosidad y amniocentesis) he recibido información y he firmado un consentimiento aparte.
- El conocimiento de esta información genética puede tener implicaciones graves en mi vida y en la de mis familiares directos, a los cuales se me aconseja informar, si estos datos son relevantes para su salud.
- A lo largo del estudio se pueden obtener resultados no buscados, fundamentalmente las falsas paternidades, cuando se obtiene muestra de los progenitores, que no tienen efecto legal aunque pueden explicar los resultados hallados. Según la ley 14/2007 los profesionales no están obligados a informar de estos resultados.
- Según la técnica genética utilizada puede haber resultados de significado incierto.
- Pueden existir falsos negativos y falsos positivos, según los conocimientos actuales.

Autorizo a que se me informe del resultado vía telefónica tras mi identificación completa con una clave que se me proporciona en esta consulta. La prueba que se me realiza sólo detecta determinadas anomalías por lo que un resultado normal no garantiza el nacimiento de un niño/a sano/a.

• **Riesgos específicamente relacionados con el paciente:** .....  
.....

#### ¿HAY OTRAS ALTERNATIVAS AL PROCEDIMIENTO?

No existen pruebas alternativas que proporcionen una información similar.

#### ¿QUÉ CONSECUENCIAS SON PREVISIBLES DE LA NO REALIZACIÓN?

Si no se realiza este estudio no es posible confirmar/descartar el diagnóstico clínico del paciente ni la realización de un adecuado consejo genético tanto familiar como reproductivo.

#### ¿CUÁL SERÁ EL DESTINO FINAL DE LA MUESTRA?

Mi voluntad, una vez terminada la misma, es que la muestra de ADN sobrante sea:

- Destruída una vez realizado el informe final
- Utilizada como control ya sea negativo o positivo de forma totalmente anónima
- Guardada durante un máximo de 5 años para ampliar posibles estudios relacionados con mi patología
- Almacenada en el Biobanco del HCSC (se requiere CI específico) para posibles investigaciones todas ellas aprobadas por el Comité Ético de Investigación del HCSC.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

**DECLARACIONES Y FIRMAS**

**PACIENTE**

D./ D<sup>a</sup> .....con DNI..... declaro que el/la facultativo, Dr/Dra....., me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta prueba genética. También me ha explicado los riesgos existentes, que éste es el procedimiento más adecuado en la actualidad para establecer el diagnóstico genético de mi interés, y las consecuencias previsibles de su no realización. He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas, **y voluntariamente, doy mi consentimiento** para que me realicen dicha prueba. Puedo solicitar copia del presente documento. Sé que puedo retirar este consentimiento cuando lo desee.

En Madrid a .....de.....de 20...

Firmado el/la paciente

**REPRESENTANTE LEGAL**

D. / D<sup>a</sup>..... con DNI..... y domicilio en ..... calle ..... n<sup>o</sup>..... declaro que el/la facultativo, Dr/Dra..... me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta prueba diagnóstica. También me ha explicado los riesgos existentes, que éste es el procedimiento más adecuado en la actualidad para establecer el diagnóstico genético de mi interés, y las consecuencias previsibles de su no realización. He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas, **y voluntariamente, doy mi consentimiento** para que realicen al paciente D./D<sup>a</sup>.....con DNI....., dicha exploración/intervención. Puedo solicitar copia del presente documento. Sé que puedo retirar este consentimiento cuando lo desee.

En Madrid a.....de .....de 20...

Firmado el/la representante

**FACULTATIVO**

Dr/Dra..... He informado a este/a paciente, y/o a su representante legal, del propósito y naturaleza del procedimiento descrito, de sus riesgos y alternativas, y de las consecuencias previsibles de su no realización, dejando constancia en la historia clínica. Asimismo, la existencia de otras enfermedades o cualquier otra circunstancia patológica personal que pudiera condicionar la realización de la prueba. Se incorpora este documento a la historia clínica del paciente.

En Madrid a .....de.....de 20...

Firma, n<sup>o</sup> de colegiado/n<sup>o</sup> del hospital

**NEGATIVA DEL PACIENTE A LA REALIZACIÓN**

Si usted no acepta la realización de la prueba diagnóstica haga constar el motivo:.....

Firmado el/la paciente

**REVOCACIÓN DE LA DECISIÓN POR EL PACIENTE**

En Madrid a .....de.....de 20...

Firmas: (Paciente) El/la facultativo Dr/Dra..... n<sup>o</sup> de colegiado/n<sup>o</sup> del hospital

# Formulario de solicitud test prenatal

ESPAÑA

Por favor, rellene todos los campos, **excepto 1A**, para evitar retrasos en la entrega de resultados.

<b>1A Referencia muestra</b>	A rellenar en Igenomix
------------------------------	------------------------

<b>2. Información del paciente</b> (rellenar o adjuntar etiqueta)	<b>3. Información de la muestra</b>
---	-------------------------------------

<b>Nombre completo</b>	<b>Edad gestacional</b>
<b>NHC (nº historia clínica)</b>	<b>Fecha Nacimiento</b>
<b>Fecha toma de la muestra</b>	
<b>Información del test</b> <input type="checkbox"/> <b>Test NACE* (válido para gestaciones únicas o gemelares)</b> <b>Detección de aneuploidías fetales de cromosomas 21, 18, 13, X/Y</b> <b>Entrega de resultados en 3 días laborables.*</b> <input type="checkbox"/> Gestación única <input type="checkbox"/> Gestación gemelar	<input type="checkbox"/> <b>Si usted NO desea conocer el sexo del feto, marque esta casilla</b>  <b>Indicación (opcional)</b> <input type="checkbox"/> Edad materna avanzada <input type="checkbox"/> Ecografía anormal <input type="checkbox"/> Historia familiar o personal de aneuploidía <input type="checkbox"/> Cribado bioquímico positivo <input type="checkbox"/> Petición materna
<input type="checkbox"/> <b>Test NACE Ampliado (válido solo para gestaciones únicas). Detección de aneuploidías fetales de cromosomas 21, 18, 13, X/Y Detección trisomía 9, 16 y seis microdeleciones</b> <b>Recomendado sólo en caso de determinadas anomalías ecográficas<sup>1</sup>. Entrega de resultados en 10 días laborables.*</b>  <small>*Desde la recepción de la muestra</small>	

<b>Otros datos sobre la paciente</b>			
Peso _____	Tipo de embarazo <input type="checkbox"/> Embarazo natural <input type="checkbox"/> FIV <input type="checkbox"/> Ovodonación	Hijos previos <input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO	Abortos previos <input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> NO
Altura _____			

<b>02 Firma del paciente</b>	<b>03 Autorización del médico / asesor genético</b>
------------------------------	---

Con la firma de este formulario de solicitud, voluntariamente solicito a IGENOMIX, S.L. que realice el test NACE*. He leído y he recibido una copia del consentimiento. Así mismo me han explicado adecuadamente los riesgos, beneficios y limitaciones de este test.  <b>Véase el Consentimiento informado</b>	Certifico que la información del paciente y del médico prescriptor en esta solicitud es correcta según mi conocimiento y que he solicitado el test NACE* en base a mi criterio profesional de indicación clínica. He explicado las limitaciones de este test y he respondido a cualquier pregunta con criterio médico. Entiendo que IGENOMIX, S.L. como compañía afiliada pueda necesitar información adicional y acepto proporcionarle esta información si es necesario.  <b>Autorizo el test NACE para este paciente</b>										
<table border="1"> <tr> <td><b>Firma</b></td> <td><b>Tel.</b></td> <td><b>Fecha</b></td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>	<b>Firma</b>	<b>Tel.</b>	<b>Fecha</b>				<table border="1"> <tr> <td><b>Firma</b></td> <td><b>Fecha</b></td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>	<b>Firma</b>	<b>Fecha</b>		
<b>Firma</b>	<b>Tel.</b>	<b>Fecha</b>									
<b>Firma</b>	<b>Fecha</b>										
<b>Email paciente para recibir el informe</b>	<b>Email médico para recibir el informe</b>										

<sup>1</sup>ESHG y ASHG piden "innovación responsable" en los test prenatales no invasivos.

El estudio adicional de microdeleciones se debe indicar sólo en casos de determinadas anomalías ecográficas, ya que según recomendaciones de la ESHG (European Society of Human Genetics) y ASHG (American Society of Human Genetics), en algunos casos las manifestaciones pueden ser leves o moderadas lo que dificulta el asesoramiento genético.

## Consentimiento Informado

### Prueba para detectar trisomías fetales y microdeleciones clínicamente significativas

#### Información común para las pruebas NACE® y NACE® ampliado:

1. El objetivo principal de estas **pruebas de cribado genético** es detectar trisomías fetales con gran exactitud, así como, en gestaciones únicas, detectar alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales. Su principal característica es que **evita realizar procedimientos invasivos innecesarios**.
2. Las pruebas están validadas para **gestaciones a partir de 10 semanas de embarazo**.
3. Estas pruebas tienen un índice de detección próximo al 100% pero **no son una prueba diagnóstica**. Para tener un diagnóstico definitivo se requiere prenatal invasivo con realización de un cariotipo (análisis de todos los cromosomas) o análisis rápido para los cromosomas/microdeleciones analizados en el test NACE/NACE ampliado (técnicas QF-PCR o FISH).
4. La especificidad y sensibilidad de la técnica son muy elevadas, con el índice de **falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN)** para la trisomía 21 inferior al 1%, con especificidad también superior al 99% y sensibilidad entre 87.5-100% para el resto de cromosomas y microdeleciones analizadas.
5. Para **gestaciones únicas**, la precisión respecto a la determinación del sexo fetal (XX o XY) es del 99%. En los casos de gestaciones únicas, que comenzaron siendo gemelares pero se produjo pérdida temprana de uno de los fetos, la fiabilidad en la determinación del sexo fetal puede verse disminuida.
6. Estas pruebas, para las trisomías analizadas, son más precisas que el cribado de primer trimestre actual. No obstante se pueden dar resultados erróneos. Un **resultado positivo (anormalidad cromosómica detectada)** debe confirmarse en el procedimiento invasivo para ser definitivo (ver punto 3). Un **resultado negativo (normalidad cromosómica)** debe ir en consonancia con otros hallazgos clínicos (ecografías, etc.) y no excluye por completo una trisomía fetal (ver punto 7, limitaciones). **El sexo fetal debe ir en consonancia con hallazgos ecográficos**.
7. **Limitaciones.** La precisión de estas pruebas puede verse comprometida si existe (i) aneuploidía cromosómica materna; (ii) mosaicismo (fetal o confinado a la placenta). Hay una pequeña posibilidad de que los resultados de la prueba pudieran no reflejar el estado cromosómico del feto (falsos positivos), reflejando los cambios subcromosómicos de la placenta o de la madre.; (iii) transfusiones de sangre alogénica, trasplante o terapia con células madre; (iv) síndrome del gemelo evanescente; (v) gestación múltiple; (vi) ADN libre circulante en plasma limitante: **menos de un 0.1% de las muestras requerirán** nueva extracción de sangre, sin coste extra para la paciente; en esos casos el plazo de entrega de resultados comenzará de nuevo con la segunda toma de muestra. (vii) un resultado negativo (normal) para las microdeleciones especificadas no eliminan la posibilidad de que éste embarazo puede asociarse con aneuploidías para otros cromosomas o anomalías subcromosómicas, defectos de nacimiento y otras condiciones. (viii) Un resultado negativo no elimina al 100% la posibilidad de síndrome de Angelman, síndrome de Prader-Willi, 5p-/ síndrome del Maullido de Gato, síndrome de delección 22q11.2, síndrome de la delección 1p36, o Síndrome 4p-/Wolf-Hirschhorn.
8. La muestra no se procesará si los campos requeridos en el Formulario de Solicitud y CI no están debidamente cumplimentados. El plazo para que la paciente aporte la información adicional requerida será de 24 h, desde la recepción de la muestra. Una vez transcurrido ese plazo, la muestra se desechará.

#### Información acerca del test NACE® (cromosomas 13, 18, 21 y cromosomas sexuales).

La trisomía 13, la trisomía 18 y la trisomía 21 son tres anomalías cromosómicas comunes que se deben normalmente a la presencia adicional de una copia completa del cromosoma 13, 18 y 21 respectivamente. Los individuos afectados se caracterizan por tener retraso mental, rasgos faciales característicos y generalmente acompañado de otras malformaciones. En la actualidad no hay tratamiento curativo para estos trastornos

##### Objetivo de la prueba y método de detección

El objetivo de esta prueba de **cribado genético** es detectar trisomías fetales de los cromosomas 13, 18, 21 en **gestaciones únicas y gemelares**. Además, en gestaciones únicas también informa del sexo fetal y analiza posibles alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales. La prueba NACE® se basa en un **método no invasivo** para el feto que evalúa el riesgo de «aneuploidía cromosómica» fetal a través de la detección de ADN libre circulante en el plasma materno mediante tecnología de secuenciación de nueva generación y análisis bioinformáticos avanzados. Las tasas de detección son muy elevadas y esto permite reducir significativamente el número de procedimientos invasivos (amniocentesis o biopsia vellosidad corial) evitando pérdidas fetales innecesarias o situaciones de riesgo de aborto espontáneo y/o de infección intrauterina.

#### Información acerca del test NACE® ampliado (cromosomas 9, 13, 16, 18, 21, cromosomas sexuales y microdeleciones).

Los síndromes debido a **microdeleciones** son trastornos causados por la ausencia de pequeñas piezas de material cromosómico. Aunque pueden ocurrir en cualquiera de los 23 pares de cromosomas se presentan con mayor frecuencia en áreas específicas de ciertos cromosomas y se han relacionado con síndromes genéticos conocidos. La mayoría de estas microdeleciones ocurren espontáneamente o *de novo*, en lugar de ser heredado de uno de los progenitores. Ocurren por tanto sin antecedentes familiares la mayoría de veces y además tampoco influyen otros factores como la edad avanzada. En la actualidad no hay tratamiento curativo para estos trastornos. Las **trisomías del cromosoma 9 y del 16** están asociadas a un alto riesgo de aborto involuntario. La capacidad de identificar estas importantes causas cromosómicas de aborto espontáneo puede ayudar a evaluar futuros riesgos, así como en el seguimiento y la gestión de embarazos posteriores.

##### Objetivo de la prueba y método de detección

El estudio adicional de microdeleciones se debe indicar sólo en casos de determinadas anomalías ecográficas, ya que según recomendaciones de la ESHG (European Society of Human Genetics) y ASHG (American Society of Human Genetics), en algunos casos las manifestaciones pueden ser leves o moderadas lo que dificulta el asesoramiento genético.

Incluyendo la cobertura descrita para el test NACE® (trisomía 13, 18, 21 y cromosomas sexuales), el objetivo de la versión NACE® ampliado es la detección adicional de **trisomía de los cromosomas 9 y 16** y es capaz de identificar seis síndromes genéticos importantes causados por **microdeleciones** en las regiones cromosómicas 15q11.2, 5p15.2, 22q11.2, 1p36 y 4p16.3. NACE® ampliado proporciona una valiosa información que, en determinadas situaciones clínicas, ayudarán en la gestión del embarazo y/o la preparación para la atención del recién nacido. El algoritmo optimizado para el panel de microdeleciones proporciona resultados muy fiables acerca de la pérdida de pequeños fragmentos de material genético. NACE® ampliado ofrece resultados muy fiables, incluyendo una tasa de falsos positivos baja en comparación con otros test y la tasa de repeticiones del test más baja del ensayo en el sector. NACE® ampliado está validado **sólo para gestaciones únicas**.

## Consentimiento informado de la embarazada

1. Comprendo que estas pruebas de cribado genético son no invasivas para el feto. En concreto, NACE® está indicado tanto para gestaciones gemelares como únicas. NACE®ampliado está indicado **sólo** para gestaciones únicas.
2. Comprendo que NACE® tiene como principal **objetivo** detectar trisomías fetales 21, 18, 13. En caso de gestación única, NACE® informa del sexo fetal y analiza posibles aneuploidías de los cromosomas sexuales. NACE®ampliado suma a este objetivo principal la detección de 6 síndromes de microdeleciones y la detección de trisomías del 9 y 16.
3. Comprendo que en caso de **gestación gemelar (sólo test NACE®) no se informa sobre los cromosomas sexuales**. Comprendo también que en caso de detección de aneuploidía en los cromosomas 21,18 y 13, el test NACE® **no reporta información sobre si están afectados uno o los dos fetos y cuál de ellos**.
4. Ambas pruebas, para su objetivo principal, tienen **sensibilidad** superior al 99% pero no del 100%.
5. Entiendo que la alta sensibilidad y especificidad de estas pruebas se han obtenido a partir de estudios de validación clínica en gestaciones espontáneas, únicas y embarazos de alto riesgo. La evaluación del rendimiento final en población de bajo riesgo, gestaciones mediante reproducción asistida, en gestaciones gemelares y en gestaciones con microdeleciones está aún en progreso y los datos clínicos son limitados; no obstante los datos ya disponibles indican que son equivalentes a los obtenidos en los estudios de validación mencionados anteriormente.
6. Comprendo perfectamente el fin previsto, las características, los beneficios y los posibles riesgos de cada prueba. **Mi médico ha respondido a todas mis preguntas**.
7. Comprendo que en el caso de NACE®, el informe estará disponible dentro del plazo de 3 días laborables tras la recepción de la muestra, en el 90% de los casos. Este período de entrega será de 10 días laborables en el caso del NACE®ampliado. En ambos casos, los períodos de entrega establecidos no incluyen los casos de ADN libre circulante en plasma limitante o por debajo del límite de detección (ver siguiente punto).
8. Comprendo que, en algunos casos el resultado puede ser no informativo en un primer análisis de secuenciación, por lo que puede ser necesario una segunda secuenciación, lo que retrasaría la entrega de los resultados. Muy raramente, debido a un porcentaje de ADN fetal circulante por debajo del nivel de detección de la técnica, será necesario solicitar una nueva muestra de sangre materna.
9. Comprendo que el resultado de estas pruebas no puede servir como único criterio para una conclusión diagnóstica. **Un resultado positivo requiere de un procedimiento invasivo para obtener un diagnóstico definitivo. Un resultado negativo requiere seguimiento** para confirmar consonancia con hallazgos de otras analíticas y pruebas de control del embarazo.
10. Estoy de acuerdo en facilitar la información necesaria sobre este embarazo, en concreto si se comprueba posteriormente que el bebé tiene una enfermedad cromosómica o genética. Comprendo y estoy de acuerdo en que mi médico se ponga en contacto conmigo para obtener esa información.
11. Estoy de acuerdo en que mi médico o el laboratorio utilice mi información clínica para realizar auditorías, controles de calidad e investigaciones, siempre y cuando yo permanezca en el anonimato y no se me identifique durante el análisis de los datos y que toda mi información personal se elimine de cualquier informe o publicación.
12. Mi médico me proporcionará una copia del presente Consentimiento Informado.
13. Declaro que la información personal que he facilitado es veraz y fidedigna.

**Estoy de acuerdo en realizar la prueba (marcar con una X la opción elegida) recomendada por mi médico, que me ha proporcionado una copia del presente Consentimiento Informado:**

NACE (gestaciones únicas o gemelares)

NACE ampliado (gestaciones únicas)

**Paciente (\*indica campos obligatorios a rellenar para poder procesar la muestra)**

Nombre\*: \_\_\_\_\_ Firma\*: \_\_\_\_\_ Fecha\*: \_\_\_\_\_

**Médico/clínico (\*campos obligatorios a rellenar, o estampar sello y firma)**

Nombre Dr\*.: \_\_\_\_\_ Clínica/Hospital: \_\_\_\_\_ Firma\*: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Conforme a la Ley 41/2002 Reguladora de la Autonomía del Paciente y a la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, el peticionario debe disponer del consentimiento del paciente para llevar a cabo las pruebas diagnósticas solicitadas y para el tratamiento de sus datos. De este modo, y como información a facilitar al paciente, hemos de comunicarles que los datos recogidos en el presente formulario serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley 15/1999, cuya titularidad corresponde a iGenomix S.L, con la finalidad de gestionar el estudio de diagnóstico en el formulario descrito, pudiendo ejercer el paciente en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal, dirigiéndose a la siguiente dirección: iGenomix S.L, Parc Científic Universitat de València, C/ Catedrático Agustín Escardino nº9, Edificio 3, 46980 Paterna, Valencia.



Test de Cribado Prenatal **No Invasivo**  
 en **sangre materna**

COD.

Cumplimentar por el laboratorio

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre y Apellidos:	Código Clínica/Hospital/Laboratorio
Semanas de Gestación:	Fecha de nacimiento:
Motivo de consulta:	Nº de fetos:
Nombre del Especialista:	Correo del Especialista:
Número de Teléfono:	Clínica/Hospital/Laboratorio

1. He recibido la información de mi especialista sobre la indicación, propósito, características y riesgos potenciales de **TrisoNIM**<sup>®</sup>. Asimismo, he tenido la oportunidad de leer la información facilitada sobre el test y mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente.
2. Comprendo que este test tiene el propósito de establecer, con un alta probabilidad, el riesgo fetal de presentar trisomías de los cromosomas 21, 18 y 13. Adicionalmente, el test informará del resultado del estudio de detección del cromosoma Y en sangre materna.
3. Comprendo que en el 0,1% de los casos no se obtienen resultados concluyentes. Entiendo que se me puede solicitar una nueva extracción de sangre para repetir la prueba, lo que ocurre en el 1% de los casos. Esta situación supondrá un incremento en el tiempo de respuesta establecido.
4. Comprendo que los resultados de este test son valores de referencia y no suponen, por sí solos, un elemento de diagnóstico clínico. Los resultados obtenidos de este cribado deben evaluarse junto con otros criterios clínicos, por lo que se recomienda que dichos resultados sean comunicados en consulta médica.
5. Comprendo que mediante la realización de esta prueba se puede obtener información genética del feto o de la madre no relacionada con la preocupación médica para la cual esta prueba ha sido solicitada. Acepto que estos hallazgos que podrían requerir la realización de pruebas adicionales sean incluidos como nota informativa en el informe de resultados.

En caso de **EMBARAZO GEMELAR**, señalo en esta casilla  que comprendo las limitaciones del test para este tipo de análisis.

Adicionalmente, marco esta casilla  para indicar que deseo que **NO SE ME COMUNIQUE** el resultado del estudio de detección de cromosoma Y fetal en sangre materna.

Por todo ello, doy mi consentimiento para realizar el test **TrisoNIM**<sup>®</sup>. Firma

Paciente :

Firma Especialista:

Fecha:

### AUTORIZACIÓN PARA EL USO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos pueden contribuir a incrementar la capacidad analítica del test y el estado del conocimiento actual, con el consiguiente beneficio para nuevos estudios. Por ello, doy mi consentimiento para que NIMGenetics use mi información clínica y los resultados obtenidos para publicaciones científicas, estudios de calidad, ó bases de datos, en el ámbito sanitario. NIMGenetics garantizará la confidencialidad de la información. Esta autorización puede ser anulada mediante notificación a [info@nimgenetics.com](mailto:info@nimgenetics.com).

Si usted **NO DESEA** que los datos obtenidos sean utilizados de esta manera, indíquelo colocando sus iniciales aquí: \_\_\_\_\_

## TrisoNIM® INFORMACIÓN

**TrisoNIM®** es un test de cribado prenatal que se realiza a partir del análisis del ADN fetal presente en la sangre materna. Este test evalúa el riesgo de que el feto presente las trisomías 21, 18 ó 13. Este test se puede realizar a partir de la semana 10 de embarazo.

**TrisoNIM®** no tiene riesgos para el feto y es extremadamente sensible, con una precisión de detección de aproximadamente el 99% y cercana al 100% para el síndrome de Down. Para su realización sólo es necesaria la obtención de 10 ml de sangre materna.

## Acerca de la enfermedad y del método de detección

El síndrome de Down es una de las anomalías cromosómicas más frecuentes. Este síndrome, debido a la presencia de una trisomía 21, presenta una incidencia, de aproximadamente, 1 por cada 800 nacimientos. Los individuos afectados presentan un fenotipo facial característico, asociado a diversos grados de retraso mental y ocasionalmente a malformaciones de órganos. Actualmente, no se conoce ninguna cura para dicho síndrome.

El Síndrome de Edwards, debido a la trisomía del cromosoma 18, y el síndrome de Patau, debido a la trisomía del cromosoma 13, cursan con un cuadro clínico severo con múltiples malformaciones, que se asocian a una alta tasa de muerte perinatal. Estos síndromes se presentan con una frecuencia, de aproximadamente, 1 por cada 5000 y 16000 nacimientos, respectivamente.

Este test no es considerado en la actualidad como un test diagnóstico de la presencia de trisomías.

Adicionalmente, el test permite detectar la presencia de secuencias genómicas de los cromosomas sexuales X e Y provenientes del feto y presentes en la sangre materna. Por ello se incluye, en este mismo consentimiento, un apartado donde la paciente acepta o declina que se le informe de la detección de material del cromosoma Y en sangre materna.

Los resultados del test de cribado serán informados como de riesgo alto en aquellos casos en los que se detecte alguna de las alteraciones genómicas incluidas en este test. El resultado de riesgo alto para cualquier hallazgo debe ser validado sobre una muestra obtenida por una técnica de diagnóstico invasiva mediante citogenética convencional ó molecular (cariotipo, FISH ó array CGH).

Los resultados de este test de cribado serán informados como de riesgo bajo en aquellos casos en los que no se detecte ninguna de las alteraciones analizadas. Un resultado de bajo riesgo/no detección no excluye absolutamente la posibilidad de una alteración, debido a que deben tenerse en consideración las limitaciones propias del test que se especifican a continuación.

El test TrisoNIM® analiza otras regiones del genoma, no incluidas en los cromosomas y microdeleciones indicadas. Es importante entender que en ocasiones excepcionales podemos identificar alteraciones genéticas en el feto ó en la madre en estas regiones. Este hallazgo incidental se incluirá en el informe de resultados como nota informativa debido a que el análisis de estas regiones no puede ser realizado con la misma rotundidad estadística que las regiones genéticas objeto de este estudio. La aparición de estos hallazgos podría requerir la realización de pruebas invasivas ó de imagen adicionales.

Los excedentes de muestra serán almacenados durante un máximo de 3 meses, para poder ser utilizados en aquellos casos en los que sea necesaria una repetición del estudio para confirmación diagnóstica. El material generado a partir del DNA obtenido de las muestras, denominado librerías genómicas, serán destruidos después de un año (ley 14/2007).

El informe estará disponible en un periodo medio de 7 días laborables desde el momento en que el laboratorio recibe la muestra. En ocasiones excepcionales (menos del 1%) este periodo puede alargarse debido a diferentes causas metodológicas.

Los resultados del informe serán no informativos cuando se obtenga un resultado no concluyente, esta situación ocurre en menos del 0,1% de los estudios realización.

Los excedentes de muestra serán almacenados durante un máximo de 3 meses, para poder ser utilizados en aquellos casos en los que sea necesaria una repetición del estudio para confirmación diagnóstica. El material generado a partir del DNA obtenido de las muestras, denominado librerías genómicas, serán destruidos después de un año (ley 14/2007).

## Limitaciones del test

- 1.** Las siguientes situaciones no permiten obtener un resultado fiable en el test: madre portadora de las trisomías analizadas, mosaicismo fetal de las trisomías analizadas y alteración cromosómica en regiones no analizadas.
- 2.** Si la embarazada que se somete al test ha recibido recientemente una transfusión sanguínea alogénica, trasplante, terapia inmunitaria o terapia de células madre, es posible que el resultado sea falso debido a la interferencia por ADN exógeno. Por favor, indique en el consentimiento ó directamente a su médico si este es su caso.
- 3.** En el caso de embarazos gemelares no es posible ajustar un porcentaje de eficacia similar al de la prueba para embarazos unitarios, por ello se informará a la paciente del riesgo (bajo o alto) sin dar un valor numérico. **NO OLVIDE** indicar en el consentimiento si se trata de un embarazo gemelar.

## INSTRUCCIONES PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA

### 1. Cumplimentar el Consentimiento Informado

#### Datos Personales:

- Se deben incluir los datos personales del paciente y la razón por la cual acude a consulta médica.
- El código será asignado por NIMGenetics.

#### Datos para el envío del Informe:

- Se debe especificar el nombre y correo electrónico del facultativo al que se enviará el informe.
- El Consentimiento informado deberá estar firmado por el paciente una vez haya respondido el Facultativo a todas las dudas existentes, actuando como testigo.

### 2. Seguir las instrucciones de Extracción, Conservación y Transporte de las muestras.

Se realizará por parte del Centro Hospitalario. Las instrucciones están en el interior del Kit de Extracción.

### 3. Envío de la muestra

La recogida de la muestra se tramitará previo aviso desde el Centro Hospitalario. Enviar la muestra junto con el documento de Consentimiento Informado y los Datos de Facturación a la dirección:

C/ Faraday nº 7. 28049 Madrid (España)

Ante cualquier duda, puede llamar al teléfono +34 918 047 760

## Protección de datos y confidencialidad

Conforme a la Ley 41/2002 Reguladora de la Autonomía del Paciente y a la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, el peticionario debe disponer del consentimiento del paciente para llevar a cabo las pruebas diagnósticas solicitadas y para el tratamiento de sus datos. De este modo, y como información a facilitar al paciente, hemos de comunicarles que los datos recogidos en el presente formulario serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley 15/1999, cuya titularidad corresponde a NIMGenetics, S.L, con la finalidad de gestionar el estudio de diagnóstico en el formulario descrito, pudiendo ejercer el paciente en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal, dirigiéndose a la siguiente dirección : NIMGENETICS, S.L, Genómica y Medicina, C/ Faraday, 7 28049 Madrid.



## **11.2. Anexo 2: Aprobación del Comité de Investigación**



**CEIC Hospital Clínico San Carlos**

Dra. Mar García Arenillas  
Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

**CERTIFICA**

Que el CEIC Hospital Clínico San Carlos en su reunión del día 07/02/2018, acta 2.1/18 ha evaluado la propuesta de Tesis:

**Título: "Evaluación de un nuevo protocolo de diagnóstico genético en la atención prenatal de las gestantes en riesgo de cromosopatías".**

**Código Interno:** 18/054-E\_Tesis

**Autora:** Dra. María Carmen Cotarelo Pérez

**Directores de Tesis:** Dr. Herráiz Martínez y Dr. Coronado Martín.

Que en este estudio:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto de los postulados éticos.
- Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa legal aplicable en función de las características del estudio.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicha Tesis.

Lo que firmo en Madrid, a 08 de febrero de 2018



Dra. Mar García Arenillas  
Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos



### **11.3. Anexo 3: Cuestionario de la encuesta de calidad percibida**



## CUESTIONARIO DE SATISFACCIÓN CON LA ATENCIÓN PRESTADA POR LA SECCIÓN DE GENÉTICA CLÍNICA PRENATAL del Servicio de ANÁLISIS CLÍNICOS

El Hospital **CLINICO SAN CARLOS** quiere conocer la opinión de las gestantes sobre la atención que han recibido en la Sección de Genética Clínica Prenatal del Servicio de Análisis Clínicos. Para ello hemos elaborado esta encuesta con el objetivo de que nos ayude a saber cómo podemos mejorar la calidad de los servicios que prestamos.

Los datos que le solicitamos se tratarán informáticamente para realizar análisis estadísticos de forma ANÓNIMA, sin grabar sus datos personales y respetando siempre la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de datos de carácter personal y sus modificaciones posteriores.

**Muchas Gracias por su colaboración.**

Las preguntas que se plantean a continuación tienen como finalidad conocer mejor su opinión sobre diferentes aspectos relacionados con la atención que usted ha recibido. Por favor señale con una **X** su nivel de satisfacción con la atención teniendo en cuenta que **1 significa muy insatisfecho y 5 muy satisfecho**.

	Muy Insatisfecho	Insatisfecho	Ni Insatisfecho Ni Satisfecho	Satisfecho	Muy Satisfecho	No Sabe/ No Contesta
La facilidad para conseguir una cita en Genética Clínica.	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
El tiempo que ha esperado desde la hora de la cita hasta que la han atendido.	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
El tiempo que ha esperado hasta tener los resultados de las pruebas realizadas.	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>ACCESIBILIDAD</b>						
La facilidad de acceso al hospital (parking, transporte público, acceso a minusválidos, etc.).	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La facilidad de acceso a la Sección de Genética Clínica dentro del Hospital.	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>INFORMACIÓN</b>						
La información facilitada sobre el screening prenatal en la consulta de enfermería.	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La claridad de la información facilitada por el médico.	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
El asesoramiento médico.	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La confidencialidad de la información.	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ATENCIÓN DE LOS PROFESIONALES		Muy Insatisfecho	Insatisfecho	Ni Insatisfecho Ni Satisfecho	Satisfecho	Muy Satisfecho	No Sabe/ No Contesta
Médico	Eficacia y profesionalidad	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Amabilidad y trato	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Tiempo y dedicación	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Enfermera	Eficacia y profesionalidad	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Amabilidad y trato	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Tiempo y dedicación	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SATISFACCIÓN GLOBAL							
Cuál es su grado de satisfacción con la atención recibida de forma global.		1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Recomendaría esta Sección a otras personas?		SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>		No Sabe/ No Contesta <input type="checkbox"/>	

Por favor, responda **SI, No o No sabe/No contesta** a las siguientes preguntas:

	SI	NO	No Sabe/ No Contesta
¿Tiene algún hijo/a más?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Ha sido atendida más veces en esta sección de Genética?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Le han realizado alguna vez pruebas sin su permiso?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cuando ha estado en el servicio, ¿ha sabido siempre quién le atendía?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Si no entendió algo de la explicación, ¿pudo preguntar o pedir aclaraciones?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
¿Solucionaron sus dudas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Por favor, indique si tiene algún **comentario o sugerencia**

.....  
.....  
.....

#### DATOS DE LA PERSONA QUE RESPONDE LA ENCUESTA

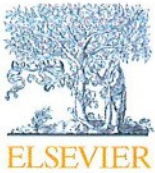
EDAD _____	Lugar de Nacimiento: España <input type="checkbox"/>	Otro <input type="checkbox"/> .....(especificar)
<b>Estudios :</b> Menos de primarios <input type="checkbox"/> Secundarios <input type="checkbox"/> Primarios <input type="checkbox"/> Universitarios <input type="checkbox"/>	<b>Ocupación:</b> Trabaja <input type="checkbox"/> Desempleada <input type="checkbox"/> Estudia <input type="checkbox"/> Ama de Casa <input type="checkbox"/>	

**POR FAVOR DEPOSITE ESTA ENCUESTA UNA VEZ CUMPLIMENTADA EN EL BUZON A LA ENTRADA DE LA SECCIÓN**

**MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN**

## 12. Actividad científica relacionada con la tesis doctoral





Contents lists available at ScienceDirect

# European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology: X

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eurox](http://www.elsevier.com/locate/eurox)

## A contingent model for cell-free DNA testing to detect fetal aneuploidy after first trimester combined screening

Carmen Cotarelo-Pérez<sup>a,\*</sup>, Raluca Oancea-Ionescu<sup>a</sup>, Eloy Asenjo-de-la-Fuente<sup>b</sup>, Dolores Ortega-de-Heredia<sup>c</sup>, Patricia Soler-Ruiz<sup>b</sup>, Pluvio Coronado-Martín<sup>b</sup>, María Fenollar-Cortés<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Clinical Genetics Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 May 2018

Received in revised form 20 December 2018

Accepted 22 December 2018

Available online 15 January 2019

#### Keywords:

Cell-free fetal DNA test

Chromosomal abnormalities

Aneuploidy

First trimester combined screening

Contingent model

### ABSTRACT

**Objective:** To assess the results of the first trimester combined test to design a prenatal protocol for the introduction of the cell-free fetal DNA test as a contingent screening model.

**Method:** An observational retrospective study in 12,327 singleton pregnancies to analyze the results of the combined first trimester screening, the nuchal translucency  $\geq 97.5$  percentile, their cytogenetic results and birth outcomes.

**Results:** A total of 533 (4.3%) pregnant women had a risk in combined first trimester screening above 1/300. In this group, sixty nine had an unbalanced karyotype. The abnormal/normal karyotype ratio was 1/28 in pregnant women with intermediate risk (1/51–1/300) for trisomy 21 and trisomy 18, 1/58 with intermediate risk just for trisomy 21 and 1/37 with intermediate risk just for trisomy 18. A 19.8% of the unbalanced karyotypes had chromosomal abnormalities other than trisomies 21, 18 and 13. Two false negatives cases at first trimester combined screening presented a nuchal translucency  $\geq p97.5^{\text{th}}$ .

**Conclusion:** We propose the introduction of the cell-free fetal DNA test when the risk of first trimester combined screening is intermediate (1/51–1/300) and when nuchal translucency is  $\geq p97.5^{\text{th}}$  with a low risk in the combined screening. This policy would allow us to continue to detect uncommon chromosomal abnormalities.

© 2019 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Introduction

First trimester combined screening (FTCS) has reported detection rates for trisomy 21 (T21) of 85–90% with a false positive rate of 3–5% [1,2] and its influence in women's prenatal choices has already been demonstrated [3–5]. Pregnant women with a low risk at FTCS usually decline an invasive test because of the risk of miscarriage that is quoted in 0.1–1% [6,7]. Cell-free fetal DNA (cf-DNA) test in maternal blood for T21, trisomy 18 (T18) and trisomy 13 (T13) offers an alternative option with a high specificity and sensitivity for all pregnant women but especially as a contingent screening model in women at risk for fetal common aneuploidies.

T21, T18 and T13 represented approximately 70% of aneuploidies prenatally detected [8,9], but there are other chromosomal abnormalities that must be evaluated before the implementation of the cf-DNA test in order to avoid their undiagnosis [8,10–12].

The aim of this study is to assess the results of the FTCS to design a prenatal protocol in our hospital, with the introduction of the cf-DNA test as a contingent screening model to achieve a better selection of pregnant women at risk for fetal aneuploidies and to avoid the invasive test. We present the analysis of a population of pregnant women with their results at birth and propose a cut-off risk for the introduction of the cf-DNA test for T21, T18 and T13 as well as the inclusion of other criteria for the cf-DNA test.

### Methods

We performed an observational retrospective cohort study, to evaluate the results of the FTCS and the prenatal and postnatal cytogenetic studies, during 2009–2014, on pregnant women who came to our hospital. The inclusion criteria were all singleton

\* Corresponding author at: Clinical Genetics Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos, C/ Prof Martín Lagos s/n., 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: [mariacarmen.cotarelo@salud.madrid.org](mailto:mariacarmen.cotarelo@salud.madrid.org) (C. Cotarelo-Pérez).

pregnancies who were undergone to FTCS and the exclusion criteria those with no FTCS, twin pregnancies or miscarriages.

All pregnant women underwent an ultrasound scan between 10 and 14 weeks' gestational for measuring crown-rump length and nuchal translucency (NT) following by a biochemical analysis of the pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and  $\beta$  fraction of free human chorionic gonadotrophin at the same day. NT percentile was estimated with the scale of Borrell et al [13]. FTCS was performed and provided a risk assessment for T21 and T18 (SsdwLab V. 5.0. © SBP Software CB. Spain). Pregnancies with a FTCS risk greater than 1/300 for T21 or T18 were considered at risk for fetal aneuploidies. Pregnant women with advanced maternal age (AMA,  $\geq 35$  years old), abnormal ultrasound, FTCS at risk, family or personal history of aneuploidies or maternal anxiety were referred for prenatal counselling. An invasive prenatal testing by chorionic villus sampling or amniocentesis was offered to them and a rapid test by quantitative fluorescence-polymerase chain reaction (QF-PCR, Devyser Compact v3) for the most common aneuploidies and a karyotype study were performed. Pregnancies with risk at FTCS  $\geq 1/50$  for T21 or T18 were considered at high risk, with a FTCS risk between 1/51–1/300 for T21 or T18 were considered at intermediate risk and with a FTCS risk  $<1/300$  for T21 and T18 were considered at low risk. In pregnancies with high risk or an abnormal ultrasound scan, subtelomeric and microdeletion syndromes were ruled out by multiplex ligation dependent probe amplification techniques (MLPA, Salsa P036, P070, P245, MRC Holland) or array comparative genomic hybridization (array-CGH, KaryoNIM 60K@prenatal), as long as the results of QF-PCR and karyotypes were normal. Birth outcome data were compiled and postnatal karyotypes were performed if newborn's physical examination suggested a chromosomal syndrome.

In order to decide the FTCS risk cut-off in which pregnant women could benefit from cf-DNA test for T21, T18 and T13 as an alternative option to an invasive procedure, we analyzed the prenatal and postnatal unbalanced karyotypes classifying them in three groups: high, intermediate and low risk just for T21, just for T18 and for both trisomies (T21-T18) at FTCS. Other risk cut-offs for T21 and T18 at FTCS have also been evaluated. False negative cases for T21 and NT percentile in our risk groups were evaluated. Other chromosomal abnormalities with relevant clinical significance which could not be detected by cf-DNA test were included into the analysis.

This study was approved by the research ethics committee of our hospital.

## Results

During the period 2009–2014 a total of 12,327 singleton pregnancies came to our hospital for fetal screening of common aneuploidies by FTCS. Table 1 shows demographic and clinical data of our population.

Fig. 1 shows a schematic distribution of pregnant women. In 954 cases an invasive prenatal test was performed for fetal karyotype, which was normal or balanced in 878 cases (92%). There were 76 unbalanced prenatal karyotypes and 5 unbalanced postnatal karyotypes. The prevalence of chromosomal abnormalities in our cohort was 0.7%.

### FTCS and unbalanced karyotypes

There were 533 (4.3% of 12,327) of all pregnant women with FTCS risk above 1/300. Only 12.9% of these pregnancies with FTCS at risk had an unbalanced karyotype. The results of FTCS and karyotypes studies in our risk groups are shown in Table 2. The detection rate of FTCS for T21 and T18 was 88.5% with a 4% of false positives. The detection rate only for T21 was 83.3% with a 2.3% of false positives. The positive predictive values were 10.1% and 10.9% for both T21-T18 and only for T21, respectively.

T21, T18 and T13 represented 80.2% of unbalanced karyotypes in our cohort. All T18 and T13 had a FTCS at risk. There were 39 cases of T21 prenatally detected, 35 by a FTCS at risk ( $R \geq 1/300$ ), 3 by abnormal ultrasound and 1 by AMA. In the remaining abnormal group, 8.65% of the cases were sex chromosomal aneuploidies (SCAs), 8.65% other uncommon chromosomal abnormalities and 2.5% were triploidy. In pregnancies with high risk ( $\geq 1/50$ ) in the FTCS were detected 43% of the uncommon chromosomal abnormalities, and 57% were detected in the low risk group in the FTCS, all of them by karyotype. There were no cases in pregnancies with intermediate risk in the FTCS.

All the complementary studies by MLPA or array-CGH in pregnancies with high risk ( $R \geq 1/50$ ) in the FTCS or with abnormal ultrasound scan, as long as they had normal QF-PCR and karyotypes, were normal.

### FTCS risk cut-offs

The Table 3 shows the distribution of several risk cut-offs at FTCS according to T21, T18 and others unbalanced karyotypes. Of the 81 unbalanced chromosomal abnormalities, 60% (49/81) were

**Table 1**  
Demographic and clinical data in 12,327 pregnant women.

Population data n=12,327	Risk $\geq 1/50$ n=147	Risk 1/51–1/300 n=386	Risk $<1/300$ n=11,794
Maternal age	36.3 $\pm$ 4.7	36.9 $\pm$ 4.4	31.1 $\pm$ 5.4
Weight	65.9 $\pm$ 12.2	71.6 $\pm$ 15.2	62.8 $\pm$ 11.1
Size	161.6 $\pm$ 6.6	163.3 $\pm$ 6.5	162 $\pm$ 6.8
Smoker	24 (16.3)	71 (18.4)	1,432 (12.2)
Origin			
Caucasian	108 (73.5)	275 (71.2)	7,587 (64.3)
Afro-Caribbean	2 (1.4)	5 (1.3)	516 (4.4)
Asian	1 (0.7)	9 (2.3)	410 (3.5)
Arabs	4 (2.7)	9 (2.3)	304 (2.6)
South-American	30 (20.4)	79 (20.5)	2,769 (23.5)
Others	2 (1.4)	9 (2.3)	208 (1.8)
Nuchal translucency (mm)	3.5 $\pm$ 2	1.5 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.3
Crown-rump length (mm)	57.6 $\pm$ 8.8	61.6 $\pm$ 8.3	60.4 $\pm$ 8.1
<sup>a</sup> Free- $\beta$ HCG (MoM)	1.4 $\pm$ 1.3	1.3 $\pm$ 1.2	1.2 $\pm$ 0.9
<sup>b</sup> PAPP-A (MoM)	0.69 $\pm$ 0.5	0.63 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.7

<sup>a</sup> Free- $\beta$ HCG:  $\beta$  fraction of free human chorionic gonadotrophin.

<sup>b</sup> PAPP-A: Pregnancy-associated plasma protein-A. Data are given as frequencies and percentages (%) for qualitative variables and as mean and standard deviation for quantitative variables with symmetric distribution.

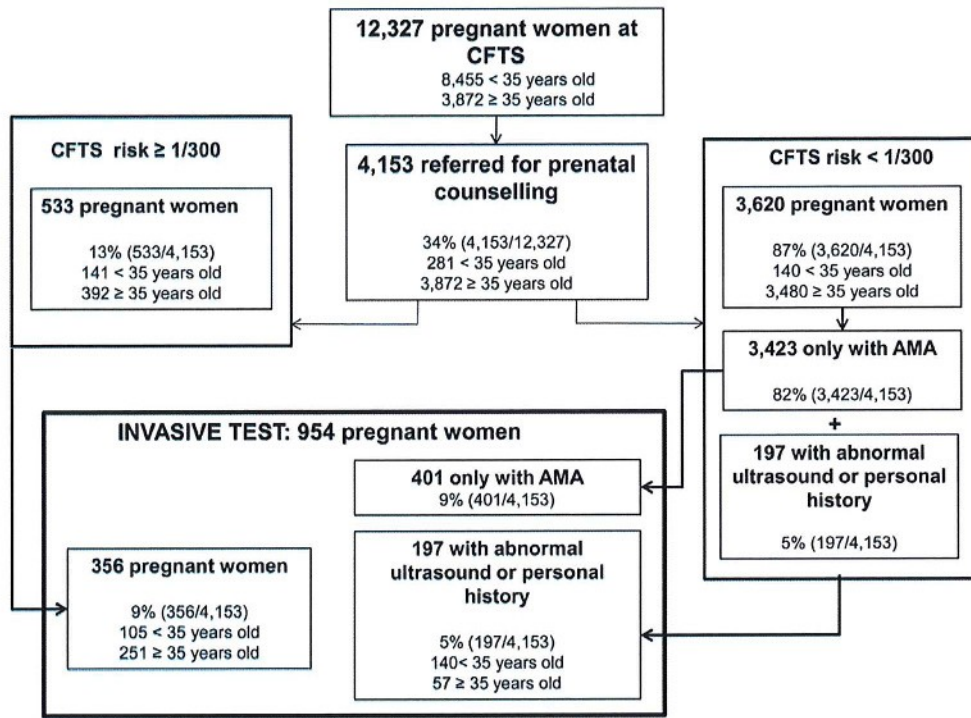


Fig. 1. Distribution of pregnant women referred for prenatal counselling.

Table 2  
Results of FTCS and karyotype studies performed in pregnant women by risk group during 2009–2014.

FTCS Risk groups	† FTCS								Total	
	Risk for T21-T18				Risk just for T21		Risk just for T18			Low risk
	‡ HR-T21		§ IR-T21		HR-T21	IR-T21	¶ LR-T21			LR-T21
	‡ HR-T18	§ IR-T18	HR-T18	IR-T18	¶ LR-T18	HR-T18	IR-T18	LR-T18		
Pregnant women on each risk group	6	20	2	28	92	173	27	185	11,794	12,327
Invasive test	6	20	1	19	81	108	18	103	598	954
Normal or balanced karyotype	0	5	1	18	49	105	12	99	589	878
Unbalanced karyotype	6	15	0	1	33	3	6	5	12	81
Trisomy 21		6		1	<sup>a</sup> 26	2			<sup>b</sup> 7	42
Trisomy 18	6	6					6	<sup>c</sup> 1		19
Trisomy 13		3						1		4
Monosomy X					2					2
Triploidy					1			1		2
Sexual Chromosomal Abnormalities					<sup>b</sup> 1	<sup>d</sup> 1		<sup>e</sup> 2	<sup>f</sup> 1	5
Uncommon Chromosomal Abnormalities					<sup>c</sup> 3				<sup>g</sup> 4	7
Ratio between unbalanced karyotype and pregnant women on each risk group	1:1	1:1.2	0:2	1:28	1:3	1:58	1:4.5	1:37	1:983	1:152

† FTCS: First Trimester Combined Screening.

‡ HR-T21: High Risk for T21 (1/2-1/50).

§ IR-T21: Intermediate Risk for T21 (1/51-1/300).

¶ LR-T21: Low Risk for T21 (<1/300).

‡ HR-T18: High Risk for T18 (1/2-1/50).

§ IR-T18: Intermediate Risk for T18 (1/51-1/300).

¶ LR-T18: Low Risk for T18 (<1/300).

<sup>a</sup> 25 Prenatal and 1 postnatal karyotypes.

<sup>b</sup> 1 mosaic XXY/XY Trisomy.

<sup>c</sup> 1 Mosaic Trisomy 22, 1 Partial Duplication 5q and 1 Partial Trisomy 14q with Partial Monosomy 17q.

<sup>d</sup> XXX Trisomy.

<sup>e</sup> 1 Postnatal Karyotype.

<sup>f</sup> 1 XYY Trisomy and 1 Mosaic Monosomy X.

<sup>g</sup> 4 Prenatal and 3 postnatal karyotype.

<sup>h</sup> XXY Trisomy.

<sup>i</sup> 1 Mosaic Tetraploidy, 1 Mosaic Trisomy 20, 1 Mosaic 13q Deletion and 1 Supernumerary marker chromosome 15.

**Table 3**  
Distribution of the FTCS risk cut-offs according to T21, T18 and others unbalanced karyotypes.

Risk cut offs at <sup>†</sup> FTCS	Trisomy 21 cases (%) n=42	Trisomy 18 cases (%) n=19	Others unbalanced karyotypes cases (%) n=20	Unbalanced / total cases
R ≥ 1/10	27 (64.3)	13 (68.4)	9 (45)	49/86
R ≥ 1/50	32 (76.2)	18 (94.7)	10 (50)	60/147
R 1/11-1/50	5 (11.9)	5 (26.3)	1 (5)	11/150
R 1/11-1/300	8 (19)	6 (31.6)	6 (30)	20/447
R 1/51-1/300	3 (7.1)	1 (5.3)	5 (25)	9/386
R 1/301-1/1000	2 (4.8)	–	2 (10)	4/1048
R 1/1001-1/2000	3 (7.1)	–	1 (5)	4/1215
R 1/2001-1/3000	1 (2.4)	–	–	1/926
R 1/3001-1/6000	1 (2.4)	–	1 (5)	2/2130
R < 1/6001	–	–	1 (5)	1/6475

<sup>†</sup> **FTCS:** First Trimester Combined Screening. When there were high or intermediate risks for both T21-T18, the highest risk of the two was considered to stratify the results of the karyotypes. Dates are given as frequencies and percentages.

detected when the risk was greater than 1/10 and 74% (60/81) when it was greater than 1/50. The 97.7% of the pregnancies in the intermediate risk group (1/51-1/300) had a normal outcome. In this intermediate risk group there were 9 unbalanced karyotypes (9/386): three T21, one T18, one T13, one triploidy and three SCAs cases. In the low risk group (<1/300) there were 25% (5/20) of the chromosomal abnormalities others than T21 and T18. These 5 unbalanced karyotypes are shown in Table 2, and only the partial deletion of 13q chromosome mosaicism detected by a Dandy-Walker malformation on second trimester ultrasound had clinical relevance.

#### False negative cases for T21

The seven false negatives cases of the FTCS for T21 are shown in Table 4. Two of them (numbers 1 and 5) had a FTCS risk between 1/301-1/1000 and both had a NT in 97.5 percentile (p97.5<sup>th</sup>).

#### NT and unbalanced karyotypes

There were a total amount of 38 cases with NT higher than p97.5<sup>th</sup> and low risk for T21 at FTCS (21 cases, Group A + 17 cases, Group B, Table 5), and 33 of these pregnant women were under 35 years old. There were 35 cases with a NT between p97.5<sup>th</sup>-p99<sup>th</sup> and only T21 cases have been detected. The two false negatives of the FTCS for T21 were in this group (Group A, Table 5). Of the 142 fetuses with a NT ≥ p99<sup>th</sup> (Group B, Table 5), 17 cases presented low risk for T21 and normal outcome.

#### cf-DNA as contingent screening model

The introduction of the cf-DNA test for T21, T18 and T13 will be recommended in our hospital as first choice in pregnant women with an intermediate risk at FTCS (1/51-1/300) and in those with a NT ≥ p97.5<sup>th</sup> and low risk at FTCS (<1/300). An invasive test will

be recommended in pregnant women with a risk at combined test ≥ 1/50.

#### Discussion

In our series, 74% (60/81) of chromosomal unbalanced abnormalities with serious effect on fetus phenotype, including uncommon aneuploidies, had a high risk (R ≥ 1/50) at the FTCS. At this risk cut-off we can detect the highest percentage of T21 (32/42) and T18 (18/19) cases as well as 50% (10/20) of others unbalanced karyotypes: monosomy X, T13, triploidy and the uncommon chromosomal abnormalities associated with adverse outcome. Our results are according with previous reports [11,14]. Also, it seems that the ratio between unbalanced karyotype and pregnancies on each risk groups support the recommendation of an invasive test (between 1/1 and 1/4.5, Table 2).

We have considered as intermediate risk the pregnancies which have a FTCS between 1/51-1/300 because unbalanced karyotypes represent only 2.3% (9/386) of the cases. In this intermediate risk group the ratio between chromosomal abnormalities and pregnancies on each risk groups suggests a cf-DNA test (between 1/28 and 1/58, Table 2). Other authors raise the possibility of offering cf-DNA test at a risk cut-off of 1/11 to 1/500 or 1/1000 [15]. In our series there are 11.9% of T21 and 26.3% of T18 between the risk cut-off 1/11-1/50 which makes us consider an invasive test in this group.

There are reports which analyze the distribution of risk from FTCS according to T21, T18, T13 and others chromosomal abnormalities outcome. The authors propose different policies for the introduction of cf-DNA test. With a cut-off risk at 1/1000, their detection rate for T21 was 98% [15,16]. In our series the detection rate at this cut-off would be 88% but between 1/301-1000 there were 1048 pregnant women and only two cases of T21. So this option would increase the cost of cf-DNA test implementation. Besides we could detect this two T21 cases through the NT

**Table 4**  
False negatives cases at FTCS for T21.

Case number	Trisomy 21 risk at <sup>†</sup> FTCS	Maternal age at term	<sup>‡</sup> Nuchal Translucency mm (Percentile)	Indication for prenatal counselling
1	1/445	28	3.1 (p97.5 <sup>th</sup> )	NT>3 mm
2	1/1167	39	1.5 (p5 <sup>th</sup> )	<sup>§</sup> FHD
3	1/1273	28	1.8 (p75 <sup>th</sup> )	<sup>§</sup> FHD
4	1/1626	38	1 (p10 <sup>th</sup> )	<sup>¶</sup> AMA
5	1/882	30	2.9 (p97.5 <sup>th</sup> )	
6	1/2687	24	1.9 (p75 <sup>th</sup> )	
7	1/5116	30	1 (p10 <sup>th</sup> )	

<sup>†</sup> **FTCS:** First trimester combined screening.

<sup>‡</sup> **NT** millimeters (percentile) depending on CRL [13].

<sup>§</sup> **FHD:** Fetal heart defect.

<sup>¶</sup> **AMA:** Advanced maternal age.

**Table 5**  
Karyotype and Nuchal Translucency  $\geq 97.5^{\text{th}}$  percentile [13].

†FTCS	Group A: $p97.5^{\text{th}} \leq \text{NT} < p99^{\text{th}}$ (35 cases)						Group B: $\text{NT} \geq p99^{\text{th}}$ (142 cases)						Total
	‡HR-T21		§IR-T21		¶LR-T21		HR-T21		IR-T21		LR-T21		
	< 35	$\geq 35$	< 35	$\geq 35$	< 35	$\geq 35$	< 35	$\geq 35$	< 35	$\geq 35$	< 35	$\geq 35$	
Age (years)													
Trisomy 21	–	1	–	–	*2	–	8	21	1	–	–	–	33
Other Unbalanced Fetal Karyotype	–	–	–	–	–	–	4	17	–	–	–	–	21
Normal Karyotype	–	–	5	8	14	5	27	25	12	10	<sup>b</sup> 17	–	123
Total		1		13		21		102		23		17	177

† NT: Nuchal translucency.

‡ FTCS: Combined First Trimester Screening test.

§ HR-T21: High Risk for T21 (1/2–1/50).

¶ IR-T21: Intermediate Risk for T21 (1/51–1/300).

¶¶ LR-T21: Low Risk for T21 (<1/300).

\* false negatives cases for T21.

<sup>b</sup> 14 cases with  $\text{NT} < 3,5$  mm.

percentile because these two cases had a NT percentile between  $p97.5^{\text{th}}$ – $p99^{\text{th}}$  and low risk at FTCS in a <35 years old women. The scope of maternal age on the calculation of risks in FTCS is probably modifying the risk despite the NT measurement. We could detect more T21 cases if we offered a cf-DNA test to all pregnancies with  $\text{NT} \geq p97.5^{\text{th}}$  when FTCS risk is low and it suppose a small increase in cost because there are 21 pregnant women that meet these criteria (Group A, Table 5).

An increased NT ( $p99^{\text{th}}$  or  $\geq 3.5$  mm) is associated with a high risk of chromosomal abnormalities [11], being monosomy X, T21 and T18 cases the more frequent unbalanced karyotypes found in these cases [14,17,18]. NT in  $p99^{\text{th}}$  is an indication for invasive test but we think that it is necessary to get the result of FTCS in these pregnancies because it provides information that can help women to make a decision about all their options, mainly when the NT is <3.5 mm. In our series, there was only one abnormal karyotype (T21) with intermediate risk for T21 and none with low risk for T21 despite of the NT in  $p99^{\text{th}}$ . Although other authors report different percentages of uncommon chromosomal abnormalities in pregnancies with a NT in  $p99^{\text{th}}$  depending on the technique used for its detection [19,20] in our series all the complementary molecular studies were normal and had a normal outcome. So we could offer cf-DNA test to all pregnancies with  $\text{NT} \geq p99^{\text{th}}$  and low risk for T21.

Evidence data about the performance of cf-DNA test in a general population show a positive predictive value range for T21 from 45.5% [21] to 94.4% [22] and show high sensitivity and specificity in low risk population [23]. Because the positive predictive value of FTCS is less than in cf-DNA test and the FTCS false negative cases for T21 are more frequent in women under the age of 35, it would be necessary to perform the cf-DNA test into general obstetric population [24]. Currently this is not possible in our public health service due to the cost of the test.

There are several studies that have shown that contingent model can be cost-effective because it implies a reduction in the rate of the invasive tests and a lower procedure-related loss rate [25,26]. Although the cost effectiveness studies should be done with caution due to the large number of topics that must be evaluated, in our cohort we have 7 false negatives cases for T21 that would mean an additional cost between 594,000–790,000 € for the health and social care per case [27,28], and therefore that would imply an additional cost between 337–448 € for each pregnant woman. With this theoretical saving we could introduce the cf-DNA to all pregnant women, but maintaining the FTCS that allows us to have additional information on PAPP-A levels to assess the risk of preeclampsia or preterm delivery. Besides, both FTCS and TN allow us to identify other chromosomal abnormalities

other than T21 which are not estimated by the cf-DNA. In addition, cf-DNA also has false negative and positive results, although there are very few. Detecting pathological cases does not always imply cost reduction since we ought always to respect the autonomy of the pregnant women. In the near future a more accurate study about economic feasibility should be done.

Available data indicate that cf-DNA test has less accuracy for SCAs than for T21 and T18, mainly due to a confined placental or maternal mosaicism that can increase the false positive rates [29–31]. We assume that we will not diagnose SCAs different than non mosaic monosomy X if we do not analyze the fetal sex by cf-DNA test. These SCAs have a mild phenotype and their diagnosis is usually fortuitous when invasive test are performed by AMA or FTCS at risk to rule out a T21 fetus [32]. In addition, X chromosome aneuploidies have been associated to AMA and these cases probably remain undiagnosed at this moment because in our cohort, 88% (3,022/3,423) of pregnant women with AMA and low risk at FTCS declined an invasive test.

It is necessary to remind the important role of ultrasound scan screening that could detect fetus at risk for any chromosomal abnormalities, including uncommon abnormalities, triploidies and false negative cases of cf-DNA test or FTCS. In our series, three of the FTCS false negatives, one triploidy and a partial deletion of 13q chromosome mosaicism were detected by an abnormal ultrasound scan and they could be missed by cf-DNA test or FTCS.

Regardless of our recommendations, all pregnant women must be informed about the chromosomal abnormalities that couldnt be detected by cf-DNA test or by second trimester ultrasound as well as about all prenatal diagnosis options.

One of the limitations of this study is that the cohort belongs only to our center so this proposed policy cannot be applied to another population. Another limitation could be the lack of MLPA or array-CGH results that detect unusual cryptic anomalies in all invasive tests of pregnant women at intermediate risk and that could have a future clinical impact on newborn, although the data at birth were normal. The low prevalence of uncommon chromosome abnormalities could affect the validation of our new policy.

Here we present a contingent screening model for the introduction of cf-DNA test in our hospital in two pregnancies group: i) those with an intermediate risk at FTCS and ii) those with a low risk at FTCS and  $\text{NT} \geq p97.5^{\text{th}}$ . We consider that those two assumptions could allow us to detect the most common aneuploidies, and to decrease the number of invasive test and consequently, the fetal losses. Our data suggest that the others uncommon chromosomal abnormalities with severe effect in the fetal phenotype would not be underdiagnosed since all of them

had a high risk at FTCS or an abnormal ultrasound scan in which it was recommended to perform an invasive test. The new proposed policy has been implemented in our hospital since October 2015 and future analyses of those data with the previous policy will allow us to verify and to improve our prenatal protocol.

#### Contribution to authorship

Carmen Cotarelo-Pérez, Raluca Oancea-Ionescu and María Fenollar-Cortés contributed equally to this work.

#### Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

#### Funding sources

None.

#### Acknowledgements

We appreciate the collaboration for the analysis of the data to predoctoral student Miss Irene Serrano García, Mathematics of the Research Unit, Department of Epidemiology.

#### References

- [1] Kagan KO, Wright D, Baker A, Sahota D, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31(6):618–24.
- [2] Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* 2011;31(1):7–15.
- [3] Jaques AM, Collins VR, Muggli EE, et al. Uptake of prenatal diagnostic testing and the effectiveness of prenatal screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* 2010;30(6):522–30.
- [4] Wray AM, Ghidini A, Alvis C, Hodor J, Landy HJ, Poggi SH. The impact of first-trimester screening on AMA patients' uptake of invasive testing. *Prenat Diagn* 2005;25(5):350–3.
- [5] Nicolaides KH, Chervenak FA, McCullough LB, Avgidou K, Papageorgiou A. Evidence-based obstetric ethics and informed decision-making by pregnant women about invasive diagnosis after first-trimester assessment of risk for trisomy 21. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193(2):322–6.
- [6] Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther* 2010;27(1):1–7.
- [7] Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:16–26.
- [8] Alamillo CM, Krantz D, Evans M, Fiddler M, Pergament E. Nearly a third of abnormalities found after first-trimester screening are different than expected: 10 year experience from a single center. *Prenat Diagn* 2013;33(3):251–6.
- [9] Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, 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.
- [10] Norton ME, Jelliffe-Pawlowski LL, Currier RJ. Chromosome abnormalities detected by current prenatal screening and non invasive prenatal testing. *Obstet Gynecol* 2014;124(5):979–86.
- [11] Syngelaki A, Pergament E, Homfray T, Akolekar R, Nicolaides KH. Replacing the combined test by cell-free DNA testing in screening for trisomies 21, 18 and 13: impact on the diagnosis of other chromosomal abnormalities. *Fetal Diagn Ther* 2014;35(3):174–84.
- [12] Petersen OB, Vogel I, Ekelund C, Hyett J, Tabor A. Potential diagnostic consequences of applying non-invasive prenatal testing: population-based study from a country with existing first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;43(3):265–71.
- [13] Borrell A, Quintó LL, Fortuny A, et al. Nuchal translucency and ductus venosus. Reference intervals in the first trimester of pregnancy. *Prog Obstet Gynecol* 2006;49(8):434–40 Spanish.
- [14] Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(1):45–67.
- [15] Santorum M, Wright D, Syngelaki A, Karagiorgi N, Nicolaides KH. Accuracy of first trimester combined test in screening for trisomies 21, 18 and 13. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;49(6):714–20.
- [16] Gil MM, Revello R, Poon LC, Akolekar R, Nicolaides KH. Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;47(1):45–52.
- [17] Souka AP, von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. Increased nuchal translucency with normal Karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192(4):1005–21.
- [18] Beke A, Joó JG, Csaba A, et al. Incidence of chromosomal abnormalities in the presence of fetal subcutaneous oedema, such as nuchal oedema, cystic hygroma and non-immune hydrops. *Fetal Diagn Ther* 2009;25(1):83–92.
- [19] Srebnik MI, de Wit MC, Diderich KEM, et al. Enlarged NT ( $\geq 3.5$  mm) in the first trimester—not all chromosome aberrations can be detected by NIPT. *Mol Cytogenet* 2016;9(1):69.
- [20] Yang X, Li R, Fu F, Zhang Y, Li D, Liao C. Submicroscopic chromosomal abnormalities in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017;30(2):194–8.
- [21] Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014;370(9):799–808.
- [22] Manotaya S, Xu H, Uerpaiojkit B, et al. Clinical experience from Thailand: noninvasive prenatal testing as screening tests for trisomies 21, 18 and 13 in 4736 pregnancies. *Prenat Diagn* 2016;36(3):224–31.
- [23] Zhang H, Gao Y, Jiang F, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45(5):530–8.
- [24] Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, 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.
- [25] Cuckle H, Benn P, Pergament E. Maternal cfDNA screening for Down syndrome—a cost sensitivity analysis. *Prenat Diagn* 2013;33(7):636–42.
- [26] Song K, Musci TJ, Caughey AB. Clinical utility and cost of non-invasive prenatal testing with cfDNA analysis in high risk women based on a US population. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26(12):1180–5.
- [27] Kageleiry A, Samuelson D, Duh MS, Lefebvre P, Campbell J, Skotko BG. Out-of-Pocket medical cost and third-party healthcare costs for children with down syndrome. *Am J Med Genet A* 2017;173(3):627–37.
- [28] Walker BS, Jackson BR, LaGrave D, Ashwood ER, Schmidt RL. A cost effectiveness analysis of cell free DNA as a replacement for serum screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* 2015;35(5):440–6.
- [29] Yao H, Jiang F, Hu H, et al. Detection of fetal sex chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA: initial experience in a Chinese hospital. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;44(1):17–24.
- [30] Grati F, Malvestiti F, Ferreira JCPB, et al. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genet Med* 2014;16(8):620–4.
- [31] Wang Y, Chen Y, Tian F, et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clin Chem* 2014;60(1):251–9.
- [32] Gruchy N, Blondeel E, Le Meur N, et al. Pregnancy outcomes in prenatally diagnosed 47, XXX and 47, XYY syndromes: a 30-year French, retrospective, multicentre study. *Prenat Diagn* 2016;36(6):523–9.



