



## Test prenatal no invasivo: preguntas emergentes desde el laboratorio clínico

### *Non invasive prenatal testing: emerging questions from the clinical laboratory*

**Moderadora:** Adela Pozo Giráldez<sup>1</sup>

**Expertas:** Laia Pedrola Vida<sup>2</sup>, Mónica Viejo Díaz<sup>3</sup>, Rosa María Lobo Valentín<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Valencia. <sup>2</sup>Unidad de Genética. Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Valencia. <sup>3</sup>Unidad de Genética. Hospital Universitario Central de Asturias. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo. <sup>4</sup>Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid

#### INTRODUCCIÓN

El test prenatal no invasivo (TPNI) ha supuesto una revolución en el abordaje del diagnóstico de aneuploidias prenatales y, hasta la fecha, ha sido clínicamente adoptado como una potente herramienta de cribado para las aneuploidias cromosómicas más frecuentes, como son la trisomía 21 (síndrome de Down), 18 síndrome de Edwards) o 13 (síndrome de Patau).

Este análisis presenta una serie de ventajas respecto a otras pruebas prenatales existentes. En primer lugar, requiere de un procedimiento menos invasivo para la gestante, ya que está basado en el análisis de ADN fetal libre de células circulantes en el plasma materno, por lo que no lleva asociado ningún riesgo de pérdida fetal. Por otra parte, puede realizarse a partir de la semana diez de gestación y es más preciso para detectar las trisomías comunes que otras pruebas prenatales, como las ecografías o el cribado combinado (bioquímico y ecográfico) del primer trimestre.

En los últimos años, las tecnologías genómicas emergentes, basadas principalmente en la secuenciación masiva de nueva generación, están teniendo un impacto significativo en el ámbito reproductivo, ampliando los análisis a detección de aneuploidias subcromosómicas (deleciones y duplicaciones) y disminuyendo considerablemente el porcentaje de prue-

bas invasivas realizadas (amniocentesis o biopsias coriales).

A pesar de las ventajas de este cribado, también se plantean cuestiones acerca del aumento de hallazgos incidentales, de la aparición de resultados con incertidumbre o de limitaciones para la detección de poliploidías (triploidía y tetraploidía), translocaciones y trisomías parciales o en mosaico.

La metodología empleada en el TPNI puede estar basada en la secuenciación del genoma completo a baja resolución, en la secuenciación de regiones específicas o en el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP).

Por otro lado, dependiendo de cada Comunidad Autónoma los criterios de acceso de las gestantes al TPNI son variables, así como la metodología empleada en cada laboratorio, lo que hace que la notificación de los resultados del TPNI no esté completamente estandarizada. A ello hay que sumar que la gran mayoría de las Comunidades Autónomas (CC. AA.) no tienen internalizada ni centralizada la prestación en sus sistemas sanitarios, lo que obliga a la externalización de la prueba a diferentes laboratorios privados, con los inconvenientes que ello supone. Ante la revolución que ha supuesto el TPNI, numerosas Sociedades Científicas han publicado recomendaciones sobre la aplicación adecuada de esta técnica para el diagnóstico prenatal de anomalías genéticas congénitas.

*Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.*



*Grupo de trabajo de test prenatal no invasivo. Unidad de Genética. Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Valencia.*

Para abordar estos avances y consideraciones emergentes, invitamos a un grupo de expertas del Sistema Nacional de Salud para que compartan sus puntos de vista sobre el tema y expliquen sus experiencias respecto a la centralización del cribado en cada una de las CC. AA. en las que trabajan.

**¿Qué criterios deben cumplirse para que una gestante pueda acceder a pruebas de TPNI en su Comunidad Autónoma dentro del sistema público de salud? ¿Qué técnica emplea en su laboratorio y a cuánta población cubre?**

**Laia Pedrola:** en la Comunidad Valenciana se ofrece TPNI en el Sistema Público de Salud como un cribado contingente, es decir, en función del resultado del cribado combinado (bioquímico y ecográfico) del primer trimestre. Se trata de un programa promovido por la Dirección General de Salud Pública y que se ofrece a todas aquellas gestantes de las veintiuna maternidades de la Comunidad Valenciana que tienen un riesgo intermedio (entre 1/50 y 1/1000). Además, se ofrece también a aquellas gestantes con un embarazo previo con aneuploidias en los cromosomas 21, 13 o 18 y gestantes portadoras de una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X para la determinación del sexo fetal. En las mujeres embarazadas que comiencen su seguimiento más allá de la semana veinte de gestación se valora la indicación del TPNI en función de los tiempos para poder realizar la confirmación en caso necesario.

Para la realización de la técnica de TPNI empleamos una tecnología de secuenciación de genoma completo (secuenciación por síntesis de Illumina, Inc.), que se lleva a cabo en el laboratorio de la unidad de genética del Hospital Universitari i Politècnic La Fe.



**Mónica Viejo:** en el Principado de Asturias la estrategia diseñada para la incorporación del TPNI ha sido de contingencia o de segundo nivel, es decir, para aquellas gestantes con un riesgo en el cribado combinado de entre 1/50 y 1/250. También se ha dado cabida a aquellas gestantes que no han podido entrar en el cribado combinado por desconocer su embarazo a tiempo o por algún error de fechas, es decir, como cribado de rescate, además de aquellas gestantes con antecedentes de aneuploidias de los cromosomas 13, 18 y 21, siempre que hayan sido trisomías libres.

La población diana son todas las gestantes de la comunidad (alrededor de unas 6000 anuales).

La técnica que empleamos es la secuenciación masiva, que se encuentra externalizada, y uno de los requisitos para su adjudicación es que el laboratorio externo la tenga acreditada bajo la NORMA ISO 15189.



**Rosa María Lobo:** en Castilla y León los criterios de selección incluyen principalmente a gestantes con riesgo intermedio en el cribado combinado (comprendido entre 1/50 y 1/1000). Asimismo, se incluyen a gestantes con enfermedades víricas (VIH, VHB y VHC) susceptibles de transmisión vertical con técnicas invasivas, a gestantes con múltiplos de la mediana (MoM) para  $\beta$ -hCG libre y

PAPP-A  $< 0,4$  simultáneamente, gestaciones conseguidas por técnicas de reproducción asistida con cribado combinado entre 1/1 y 1/1000 y por último, a gestantes con antecedentes previos de cromosomopatías.

Empleamos una tecnología de secuenciación de genoma completo (secuenciación por síntesis de Illumina, Inc.). El estudio se realiza en el Hospital Universitario Río Hortega (HURH) para todas las gestantes de la Comunidad Autónoma que cumplen los criterios descritos en el documento consenso elaborado por la Sociedad Regional de Ginecología y Obstetricia y el Laboratorio de Genética del HURH.

**En países como Inglaterra, Francia o Alemania se ofrece el TPNI como prueba de segundo nivel (tras una evaluación inicial del riesgo) para todas las gestantes dentro del sistema público de salud, mientras que en otros países europeos, como Bélgica o Países Bajos, su uso está indicado como prueba de primer nivel en su programa nacional prenatal. ¿A qué estándar europeo consideras que debería converger el Sistema Nacional de Salud español? ¿Crees que el TPNI debería estar disponible de forma generalizada para todas las gestantes que así lo soliciten?**

**Laia Pedrola:** La indicación para realizar un estudio de TPNI debe estar siempre basada en criterios científicos y de efectividad. En este momento no existen evidencias de que un cribado universal aporte beneficios sobre un cribado contingente. Paradójicamente, una estrategia de este tipo podría llevar a un aumento del número de pruebas invasivas innecesarias. Es evidente que esto redundaría en un aumento muy notable del coste sin que reportara ningún beneficio claro.

En general, solo países con poblaciones relativamente pequeñas han adoptado este tipo de estrategia en la que, seguramente, también influyen otras consideraciones no estrictamente científicas.

En el sistema de salud de nuestro país debería ofrecerse a todas las gestantes, al menos como prueba de segundo nivel. Nuestros esfuerzos deben encaminarse

a la unificación de criterios entre las distintas CC. AA. para garantizar un acceso equitativo a esta prestación para todas las mujeres gestantes que lo precisen.

**Mónica Viejo:** el TPNI presenta una sensibilidad y una especificidad más elevada que el cribado combinado. Es muy importante recalcar que también nos permite detectar la trisomía 13 (síndrome de Patau), una malformación que, aunque detectable en la ecografía, pasa desapercibida en el cribado combinado. Debería dirigirse a una sustitución gradual del cribado combinado por el TPNI, siempre que sistema sanitario público pueda asumir el coste del TPNI y permita el cribado poblacional en todas las gestantes.

**Rosa María Lobo:** en mi opinión el TPNI está llamado a convertirse en la prueba de elección en cribado prenatal con carácter totalmente universal para las trisomías comunes, siempre y cuando la disminución de costes de la prueba así lo permita.

**Una reciente declaración del American College of Medical Genetics and Genomics recomienda informar del rendimiento clínico de aquellos laboratorios que realizan TPNI en términos de tasa de la tasa de detección, especificidad clínica y valor predictivo positivo (VPP) para los síndromes de Down, Patau y Edwards. ¿Qué desafíos crees puede imponer esto a los laboratorios que realizan la prueba TPNI y qué rendimiento estimas que puede tener tu laboratorio o también el número de pruebas invasivas evitadas?**

**Laia Pedrola:** los laboratorios tenemos la obligación de recoger bien todos estos datos para poder ofrecer estadísticas y tener una estimación del rendimiento. Nuestra tasa de detección para estas tres aneuploidias es del 100 % y la especificidad es del 99,95 %. El VPP es más elevado para la trisomía 21 (95,92 %), en segundo lugar para la trisomía 18 (80 %) y en tercer lugar para la trisomía 13 (60 %).

**Mónica Viejo:** considero que es muy importante poder evaluar los resultados y así permitirnos conocer los datos reales de su rendimiento. En nuestro laboratorio evaluamos anualmente el rendimiento de la prueba calculando la tasa de detección y su correlación con las pruebas invasivas realizadas.

Desde la implantación del cribado en junio de 2019, la tasa de detección para las tres aneuploidias ha sido del 100 %. En este periodo no hemos tenido ningún falso negativo. Asimismo, hemos observado desde 2013 una reducción de pruebas invasivas de forma gradual. Entre las causas que podrían explicar esta disminución está la incorporación del TPNI en el ámbito privado.

La implementación del TPNI en la sanidad pública asuriana ha permitido una mayor equidad entre todas

las gestantes y una reducción de un 23 % del número de pruebas invasivas realizadas.

**Rosa María Lobo:** considero que todos los laboratorios que realizan la técnica deben conocer e informar sobre el rendimiento diagnóstico obtenido. Para ello es necesario recopilar los resultados de la prueba invasiva en todos los informados de alto riesgo, en aquellos casos falsos negativos informados de bajo riesgo y en los que al nacimiento se demuestre cromosomopatía en los cromosomas 13, 18 o 21.

El descenso de pruebas invasivas en nuestra Comunidad Autónoma fue del 40 % (2018), del 52 % (2019) y del 61 % (2020), consiguiendo una sensibilidad del 100 % para nuestro valor de corte superior a 1/1000.

Nuestra tasa de detección para estas tres aneuploidias es del 100 %, con una especificidad del 86,3 % y una tasa de falsos negativos del 0 %. El VPP para la trisomía 21 es del 81 %, para la trisomía 18, del 80 % y para la trisomía 13, del 50 %.

**¿Con qué frecuencia y en qué condiciones estimas que pueden encontrarse hallazgos incidentales asociados al TPNI? ¿Consideras esto como una ventaja o una limitación de la prueba? ¿Crees que los laboratorios deben informar sobre ellos?**

**Laia Pedrola:** en nuestra casuística, los hallazgos incidentales (aneuploidias raras y segmentales) se detectan con una elevada frecuencia (por delante de la trisomía 18 y de la trisomía 13); sin embargo, el VPP en ellos es bajo (5,56 % y 23,53 %, respectivamente).

Pensamos que es una ventaja y que deben publicarse, ya que, aunque muchos de ellos podrían estar confinados a placenta, también pueden, de distintos modos, afectar a la gestación.

**Mónica Viejo:** el hallazgo de resultados incidentales asociados al TPNI creo que viene asociado de una forma inherente al tipo de estrategia seguida. En nuestro caso, con un cribado de contingencia y utilizando el TPNI básico estos hallazgos son mínimos. Si se extendiera a toda la población gestante, podríamos encontrar monosomías X no confirmables en el feto por mosaicismos confinados a placenta o riesgos altos tanto de trisomía 13 como de trisomía 18 asociadas a procesos malignos en la gestante y no en el feto.

No hemos encontrado hallazgos incidentales informativos, pero sí que realizamos estudios por técnica invasiva en aquellas gestaciones en las que, en clínicas privadas, ha salido un riesgo alto para aneuploidias cromosómicas pocas frecuentes o deleciones de gran tamaño. Hasta el momento, ninguno de estos casos ha tenido confirmación diagnóstica (cariotipo/array CGH/DUP).

Considero, por tanto, que informar de los hallazgos incidentales puede considerarse como una desventaja técnica, pero al mismo tiempo podría conseguirse una sensibilidad-especificidad muchísimo mayor para las aneuploidias más frecuentes, lo que permite que todas las parejas pudieran decidir de forma prenatal si seguir o no con el embarazo.

**Rosa María Lobo:** entiendo como hallazgo incidental el resultado no buscado de manera específica, tendríamos todas aquellas aneuploidias de cromosomas distintos al 13, 18 y 21 y sexuales y las anomalías segmentales superiores a 7 Mb.

Su conocimiento es una ventaja si resultan ser ciertos y una limitación si reflejan mosaicos confinados a placenta, ya que en estos casos se habría ofertado una técnica invasiva innecesaria.

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio estimamos un 10 % adicional de este tipo de hallazgos. Su incorporación o no en el informe debe hacerse por consenso y es así como se hace en la Comunidad Autónoma de Castilla y León.

La frecuencia observada en los dos años tras su implantación ha sido del 3,5 % y su VPP ha sido del 12 %.

Las Sociedades Científicas nacionales aún no han avalado su introducción en la práctica clínica habitual, por lo que creo que debemos esperar a que lo hagan. Todos deberíamos trabajar en la misma dirección, aunque conocemos países de la Unión Europea que ya están informando de estos hallazgos.

En nuestro centro se informan en caso de feto no viable y siempre que los progenitores soliciten conocer estos hallazgos en el consentimiento informado.

**¿Qué información consideras que es fundamental incluir en el consentimiento informado para el TPNI?**

**Laia Pedrola:** considero que debe incluir una breve descripción de la técnica, su objetivo, los beneficios esperados, su tasa de sensibilidad y de especificidad, el tipo de resultados que pueden obtenerse y sus limitaciones técnicas. Además, es imprescindible conocer el deseo de la gestante de ser informada o no sobre el sexo fetal o los hallazgos incidentales.

**Mónica Viejo:** es muy importante insistir en que es un test de cribado y no una prueba diagnóstica definitiva, así como en explicar sus limitaciones, como, por ejemplo, la disminución del ratio de ADN fetal cuando la gestante tiene una elevada masa corporal. El paciente debe saber que pueden existir otro tipo de alteraciones que no pueden detectarse con esta técnica y que, por ejemplo, carece de valor en algunas situaciones, como

en los portadores de una translocación en la que no estén implicados los cromosomas analizados.

**Rosa María Lobo:** considero que deben aclararse conceptos como su naturaleza no diagnóstica, los cromosomas de los que va a informarse, las tasas de detección de patología y de falsos negativos, la necesidad de repetición de la prueba o la obtención de una nueva muestra y las limitaciones de la prueba según el método elegido, así como especificar aspectos como el uso de muestras sobrantes y la confidencialidad de la información.

### ¿Qué desafíos o retos crees que existen a la hora de implantar un programa de calidad analítica en un laboratorio que realiza TPNI?

**Laia Pedrola:** si bien es verdad que en los inicios del TPNI la existencia de diferentes metodologías hacía necesario instaurar programas estrictos de calidad, hoy en día puede considerarse como una técnica robusta que incluye marcado CE-IVD con gran implantación en el laboratorio. En este sentido, los programas de calidad analítica en TPNI no deberían variar de otros programas de cribado que realizan en el laboratorio en los que se aplican normas ISO. Cabe destacar, obviamente, que se trata de una técnica que, además de un resultado, debe llevar implícito un asesoramiento genético, lo que debería recogerse en los programas de calidad que evalúen el TPNI.

**Mónica Viejo:** contar con un programa de calidad es básico para poder informar de esta prueba y sin él no deberían poder emitirse resultados. A la hora de implantarlo, no encuentro que existan más retos que los que se nos presentan para cualquier otra prueba que se realice en el laboratorio.

**Rosa María Lobo:** es obligatoria la inscripción y la realización de un control externo de calidad que asegure la adecuada realización de la técnica, en un esquema con un suficiente número de usuarios y la acreditación de la técnica, preferiblemente con la norma UNE-EN-ISO 15189.

### Publicaciones recientes de la *European Journal of Human Genetics* hacen referencia a la "rutinización del TPNI". En esta, abundan resultados con incertidumbre (por ejemplo, alteraciones genéticas no catalogadas), especialmente aquellos que proporcionan información limitada sobre el tipo o la gravedad de la alteración genética encontrada. ¿Cree que este problema podría paliarse con un asesoramiento genético postest?

**Laia Pedrola:** sí. De hecho, nuestra legislación obliga, al igual que en cualquier otra determinación genética, a llevar a cabo un asesoramiento genético pre- y postest adecuado.

**Mónica Viejo:** El asesoramiento postest es fundamental para explicar el riesgo detectado e insistir que la prueba no es diagnóstica y que se requiere de una prueba invasiva para confirmar o descartar el riesgo resultante. Todo ello recordando a la gestante lo importante que es el seguimiento ecográfico, que este test no sustituye a la ecografía y que el embarazo es un proceso evolutivo continuo en el que puede que en algún otro momento sea necesario realizar una prueba invasiva por alguna otra sospecha ecográfica.

**Rosa María Lobo:** pienso que las Sociedades Científicas deben avalar la inclusión del asesoramiento y las parejas deben recibir la información necesaria sobre la prueba y los resultados de los que se les va a informar o no en las consultas pre- y posprueba, que considero imprescindibles.

### En el futuro, ¿crees probable que en el cribado de TPNI se incluyan más microdeleciones, microduplicaciones y mutaciones para los trastornos mendelianos de un solo gen, como las talasemias o la anemia de células falciformes? ¿Cuáles son las perspectivas de futuro del TPNI?

**Laia Pedrola:** sí, técnicamente ya es posible incluir buena parte de los síndromes de microdelección. Es probable que con el tiempo y el aumento de la fiabilidad en las determinaciones se amplíe el espectro de alteraciones que pueden detectarse. El cribado de enfermedades monogénicas, sin embargo, supone todavía un reto y puede que sean necesarios nuevos desarrollos tecnológicos para detectarlas. Probablemente, el futuro del TPNI se encuentre en la secuenciación completa y en el análisis de las secuencias en todo el genoma, lo que supondrá un grandísimo reto para los laboratorios.

**Mónica Viejo:** La perspectiva de que en un futuro seamos capaces de detectar más alteraciones sería positiva. Al existir muchos síndromes que no presentan alteraciones ecográficas fetales o las presentan de forma muy sutil, la perspectiva de que en un futuro seamos capaces de detectar más alteraciones mediante el TPNI es alentadora. Para poder aplicarlo para detectar cualquier otra alteración, el ensayo debería estar correctamente validado para ello y presentar unas elevadas sensibilidad y especificidad.

**Rosa María Lobo:** Sin lugar a dudas nos encontramos con una prueba de cribado con amplias perspectivas de futuro. Es probable que con el tiempo se introduzcan más aplicaciones, que los pipelines diagnósticos mejoren e incluso que se descubran nuevas propiedades en el ADN fetal libre circulante que lo diferencien del material materno, lo que podría ser la base para nuevas aplicaciones de este test.