	Sistema de Gestión de Calidad Registro	RG 756
		Rev. 07
Consentimiento informado para test prenatal no invasivo (NIPT)		Sector: SAB

El **test prenatal no invasivo (NIPT)** es un ensayo de screening no invasivo que permite detectar de forma segura, temprana y confiable aneuploidías cromosómicas en el feto (*PMID: 28397325*).

A diferencia de la amniocentesis o la biopsia de vellosidades coriales (CVS, del inglés *Corionic Villus Sampling*) que son métodos invasivos, este test puede realizarse más tempranamente, a partir de la semana 9 de gestación desde ADN circulante libre en sangre materna y, por lo tanto, no conlleva riesgo alguno ni para la madre ni para el feto.

El ensayo **NIPT** permite detectar:

NIPT básico:

- Las trisomías más frecuentes: **Trisomía 21 (Síndrome de Down), Trisomía 18 (Síndrome de Edwards) y Trisomía 13 (Síndrome de Patau)**. En la Tabla 1 se detalla sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo.
- **El sexo fetal.**
- **Aneuploidías en los cromosomas del par sexual:** Monosomía de X (Síndrome de Turner) para la cual se detalla sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo en la Tabla 1, trisomía X (Síndrome de Triple X), XXY (Síndrome de Klinefelter) y XYY (Síndrome de Jacobs)

NIPT ampliado:


- Las trisomías más frecuentes: **Trisomía 21 (Síndrome de Down), Trisomía 18 (Síndrome de Edwards) y Trisomía 13 (Síndrome de Patau)**. En la Tabla 1 se detalla sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo.
- **El sexo fetal.**
- **Aneuploidías en los cromosomas del par sexual:** Monosomía de X (Síndrome de Turner) para la cual se detalla sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo en la Tabla 1, trisomía X (Síndrome de Triple X), XXY (Síndrome de Klinefelter) y XYY (Síndrome de Jacobs)
- **Aneuploidías en los cromosomas 7, 9, 14, 15, 16 y 22**, asociados a retraso de crecimiento intrauterino (RCIU), pérdida de embarazo del primer trimestre, y algunos de ellos, asociados a trastorno de *imprinting* evidente luego de un rescate placentario trisómico anómalo. La evaluación de estos otros cromosomas si bien no está incluida como screening de rutina porque los tamaños muestrales reportados y confirmados son muy pequeños, y no permiten determinar el valor predictivo positivo (PPV) para dichas anomalías, pueden asociarse a compromiso feto-placentario (*PMID: 27467454; 29032050*). Dichos hallazgos deberán correlacionarse con la evolución del embarazo, marcadores ecográficos fetales y bioquímicos de cada gestación.
- **Aneuploidías en los otros cromosomas diferentes a los descriptos previamente** que pudieran asociarse a screening combinado alterado, presencia de malformaciones fetales o gesta detenida.
- **Microdeleciones y/o Microduplicaciones patogénicas:** Se analizarán pérdidas o ganancias a lo largo de todo el genoma de más de 10 Mb y deleciones de menos de 10 Mb en regiones seleccionadas asociadas a los siguientes síndromes patogénicos conocidos: Síndrome de DiGeorge (22q11.2), Síndrome de Prader Willi/Angelman (15q11.2), Síndrome de Jacobsen (11q23), Síndrome de Langer-Giedion (8q24.11-q24.13), Síndrome de Cri-du-chat (5p15.3), Síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p16.3) y Síndrome de deleción 1p36 (1p36). Estos hallazgos sólo podrán evaluarse en embarazos de gesta única o embarazo gemelar monocorial.

Se debe tener en consideración que la sensibilidad en la detección de las variantes en número de copias varía en función del tamaño y del porcentaje de fracción fetal obtenido en el ensayo. Fracciones fetales (FF) elevadas aumentan la probabilidad de detectar anomalías fetales subcromosómicas. Una FF >10% reduce de manera considerable la probabilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos (*PMID: 23313373; 26332378; 24831532; 17234643; 25710461; 23592550*). Asimismo, el valor predictivo positivo de estas anomalías es muy bajo o desconocido en algunos casos. Esto se traduce en un porcentaje elevado de falsos positivos, siendo la interpretación y correlación genotipo-fenotipo muy compleja, generando necesidad de confirmación por prueba invasiva ante un resultado detectado. En contraparte, si se trata de un caso con signos ecográficos de sospecha, screening combinado alterado, presencia de malformaciones fetales, antecedentes familiares relacionados o incluso una gesta detenida, es posible establecer una mejor correlación genotipo-fenotipo, disminuyendo así la tasa de falsos positivos. Es por ello que se recomienda la solicitud de análisis de estas microdeleciones ante embarazos con presencia de hallazgos clínicos de sospecha.

METODOLOGÍA (*Vázquez, MP y cols., 2017, Desarrollo del primer ensayo prenatal no invasivo (NIPT) en Argentina*)

1. Extracción de ADN libre circulante a partir de una muestra de sangre materna colectada en tubos ROCHE (*Cell-Free DNA Collection Tube*)
2. Preparación y enriquecimiento de las bibliotecas de ADN libre circulante utilizando el kit Illumina Truseq® Nano
3. Secuenciación de genoma completo a baja cobertura de las bibliotecas usando tecnología Illumina NextSeq2000 en modo 1x75 pb.

Documento confidencial . No se permite reproducir o ceder a terceros sin autorización de CIBIC S.A. Este documento deja de ser una copia controlada al imprimirse o cambiarse el formato de soporte digital.	Página 1 de 5
---	---------------

	Sistema de Gestión de Calidad Registro	RG 756
		Rev. 07
Consentimiento informado para test prenatal no invasivo (NIPT)		Sector: SAB

4. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas: Las lecturas se mapean contra genoma de referencia hg19 usando BWA. Lecturas duplicadas y de calidad de alineamiento menores a Q30 se eliminan del análisis posterior.
5. El porcentaje de fracción fetal se determina según la metodología descrita en *Kim y cols., 2015 (PMID: 25967380)*.

RESULTADO DE LA PRUEBA E INTERPRETACIÓN

Los resultados de este estudio genético deberán ser evaluados por el médico solicitante en el contexto de sus antecedentes personales y estudios complementarios. Los resultados posibles son: ALTO RIESGO, SOSPECHADA, BAJO RIESGO o NO DETERMINADA según los valores arrojados por el sistema de cuádruple puntaje utilizado (Tabla 2). Los resultados asociados a Síndrome de Turner son calculados según *Mazloom y cols., 2013 (PMID: 23592550)*.

Los mismos se informan de acuerdo con los 4 puntajes mencionados Z, ZZ, MAI y MAR de la siguiente forma (Tabla 2):

- **ALTO RIESGO**, los 4 puntajes coinciden en el rango de aneuploidía y un algoritmo de *back-up* confirma soporte. Existe un elevado riesgo que la paciente esté gestando un feto con alguna de las alteraciones cromosómicas reportadas por el ensayo. En este caso se sugiere confirmación por un método invasivo como CVS o amniocentesis.
- **SOSPECHADA**, al menos uno de los puntajes se observa en la zona de trisomía o monosomía, pero el resto de los puntajes no da soporte. Aquí, los resultados del estudio indican sospecha de aneuploidía o presencia de CNV fetal o materno. Se recomienda evaluar en el contexto clínico, la necesidad de repetición del test en nueva muestra versus verificación por un método invasivo como CVS o amniocentesis.
- **BAJO RIESGO**, los 4 puntajes indican valores normales. Existe un muy bajo riesgo que la paciente esté gestando un feto con alteraciones cromosómicas asociadas a alguna de las aneuploidías en estudio.
- **NO-DETERMINADA**, no es posible realizar el análisis. El % de fracción fetal (%FF) es bajo (<3% o <6% para gestas gemelares bicoriales), por lo que se recomendará una nueva toma de muestra a mayor edad gestacional. Al momento de solicitar la nueva toma de muestra se debe tener en cuenta que a partir de la semana 10 la fracción fetal aumenta aproximadamente sólo un 0,1% por semana, y a partir de la semana 21 tiene un aumento teórico más significativo de un 1% semanal (*PMID: 25963912*).

Puede ocurrir que las métricas de calidad interna de nuestro ensayo no arrojen los valores establecidos (QS > 2,5 y MAPQ30 < 8 millones), por lo que se deberá repetir el ensayo sobre nueva muestra. En ocasiones, puede ocurrir que, debido a razones biológicas propias de la muestra, en una segunda toma no sea posible alcanzar un %FF óptimo o valores de calidad adecuados, por lo que en estos casos la muestra deberá ser RECHAZADA, no pudiendo entregarse a la paciente un resultado de la prueba genética.

LIMITACIONES DE LA TÉCNICA

NIPT es un método de *screening*. Este estudio puede producir resultados no concluyentes o anómalos en casos de mosaicismos en células de la madre, de la placenta o del feto, cuyos resultados deberán ser confirmados por otros ensayos diagnósticos como amniocentesis o biopsia corial.


Este test no detecta triploidía, ni poliploidías y no pueden detectarse otras alteraciones cromosómicas no incluidas en este estudio. La ausencia en el reporte de otros hallazgos adicionales no necesariamente representa ausencia de riesgo para los mismos.

Valores de índice de masa corporal materna significativamente elevados (>30), tratamiento con heparina de bajo peso molecular, así como también un porcentaje de fracción fetal de ADN menor a 3% o <6% para gestas gemelares bicoriales pueden dar lugar a un resultado NO DETERMINADO.

Procesos biológicos presentes en la madre tales como cáncer, presencia de células provenientes de un trasplante de órganos y padecimiento de algunas enfermedades autoinmunes, entre otros, pueden influenciar en el análisis de la muestra, llevando en ocasiones a resultados no concluyentes, falsos positivos, falsos negativos o rechazo de muestra sin resultado (*PMID: 32039788*).

Hallazgos incidentales maternos pueden ser identificados, pero sólo serán informados si estuvieran asociados o relacionados a la interpretación del resultado cromosómico fetal.

En caso de que la paciente hubiera recibido un trasplante, la evaluación de aneuploidías del par sexual y CNVs puede verse influenciada por la presencia de ADN derivado del donante, lo que limita la posibilidad de atribuir los resultados al genoma fetal (PMIDs: 40438556, 39881673). En la misma línea, la detección de cromosoma Y en presencia de un donante masculino o de sexo desconocido no permite excluir que dicho hallazgo sea atribuible al ADN del donante (PMIDs: 36778193, 38860502, 33407713). En trasplantes de tejidos avasculares, no se espera una influencia en los

	Sistema de Gestión de Calidad Registro	RG 756
		Rev. 07
Consentimiento informado para test prenatal no invasivo (NIPT)		Sector: SAB

resultados del NIPT, dado que estos tejidos no aportan ADN libre circulante detectable a la sangre materna. Los resultados del estudio serán informados considerando estas limitaciones analíticas.

Si bien la precisión en la determinación del sexo fetal inferida por NIPT es alta (*PMID: 27245374*), en la bibliografía se han reportado resultados discordantes (*PMID: 32282607*, *PMID: 32125721*, *PMID: 32282607*). Existen diferentes causas que pueden dar lugar a discordancias en la determinación del sexo fetal por NIPT: falla en el procesamiento de las muestras, falla en el pipeline debido a gran cantidad de lecturas en las regiones de alta homología entre el cromosoma Y y el cromosoma X (regiones PAR), entre otras (*PMID: 23765643*). Entre las posibles causas biológicas podemos mencionar: *vanishing twin*, mosaico confinado a la placenta, factores maternos (trasplante materno, neoplasia en la madre, anomalías numéricas en el cromosoma X materno), factores fetales (mosaico fetal verdadero, discordancia XX genotipo-XY fenotipo, discordancia XY genotipo-XX fenotipo), hipospadias y genitales ambiguos (*PMID: 32125721*).

La presencia de rearrreglos estructurales que involucren al cromosoma 21, como translocación o isocromosoma 21q21q, que representan entre el 1-2% de los casos de Trisomía 21, como suelen ser eventos *de novo*, postcigóticos, se asocian a mosaicos placentarios bajos a nivel de mesénquima embrionario, sin presencia de la trisomía en el citotrofoblasto. Por lo que, en estos casos, en la fracción fetal analizada no se observará la trisomía, lo que representa un falso negativo del test. Esta limitación se da en todas las plataformas de secuenciación utilizadas, ya que NIPT no detecta las trisomías 21 generadas por este mecanismo cromosómico (*PMID: 29899373*).


EMBARAZOS GEMELARES, aunque la fracción fetal total de los embarazos gemelares podría ser mayor que la de los embarazos únicos, la contribución individual de cada gemelo es generalmente menor, por lo que el límite para reportar resultados en estos casos se establece en una fracción fetal mayor al 6%. En los embarazos dicigóticos, en donde es más probable que un sólo feto tenga la aneuploidía, cuando ésta esté presente, cada feto puede contribuir con diferentes cantidades de ADN libre en la circulación materna, y es posible que, en esta discordancia fetal para la aneuploidía, la fracción fetal del feto afectado esté por debajo del umbral de FF esperado, y podría conducir a un falso negativo, debido a una elevada contribución de la disomía co-gemelo que podría dar lugar a una fracción fetal total satisfactoria. La tasa de gemelos desaparecidos (*vanishing twin*) detectados por NIPT varía de 0,42-0,6% y representa hasta el 42.1% de los resultados falsos positivos de NIPT (*PMID: 28382695; 25447960*).

El sexo fetal, análisis de CNVs y aneuploidías sexuales, de haber sido solicitados, serán informados en embarazos gemelares monocigóticos (fetos genéticamente idénticos).

En embarazos dicigóticos, las aneuploidías sexuales y CNVs no serán informados. En relación con el sexo fetal, si hay ausencia del cromosoma Y, se informará el sexo fetal como femenino; si hay presencia del cromosoma Y, se informará que al menos uno de los fetos sería de sexo masculino. En caso de no conocer la corionicidad de la gesta, los resultados serán informados considerando las limitaciones de un embarazo dicigótico.

EMBARAZO LOGRADO POR OVODONACIÓN En estos casos el riesgo *a priori* y *a posteriori* de aneuploidías, se determinará teniendo en cuenta la edad de la donante del óvulo. En caso de desconocerse dicha edad, este riesgo se reportará tomando la edad máxima generalmente aceptada en un programa de donación de óvulos (35 años).

EMBARAZO LOGRADO POR CRIOPRESERVACIÓN En estos casos el riesgo *a priori* y *a posteriori* de aneuploidías, se determinará teniendo en cuenta la edad materna a la fecha de la criopreservación. En los casos en los que no se tenga información de dicha edad, ambos riesgos se calcularán teniendo en cuenta la edad materna a la fecha de realización del test.

	Sistema de Gestión de Calidad Registro	RG 756
		Rev. 07
Consentimiento informado para test prenatal no invasivo (NIPT)		Sector: SAB

ANEXO

Tabla 1: Especificidad, Sensibilidad y Valor Predictivo Positivo (VPP)

Anomalía cromosómica	Sensibilidad (PMID: 28397325)	Especificidad (PMID: 28397325)	VPP a los 35 años [‡]	VPP a los 40 años [‡]	VPP a los 45 años [‡]
Trisomía 21 (Síndrome de Down)	99,7% IC 95% [99,1-99,9%]	99,96% IC 95% [99,93-99,98%]	89%	97%	99%
Trisomía 18 (Síndrome de Edwards)	97,9% IC 95% [94,9-99,1%]	99,96% IC 95% [99,93-99,97%]	68%	88%	97%
Trisomía 13 (Síndrome de Patau)	99% IC 95% [65,8-100%]	99,96% IC 95% [99,93-99,98%]	49%	78%	>92%
Monosomía del X (Síndrome de Turner)	95,8% IC 95% [70,3-99,5%]	99,86% IC 95% [99,62-99,95%]	55%	55%	55%


[‡]Calculado según: <https://ppv.geneticsupportfoundation.org/> from *National Society of Genetic Counselors*.

Para la determinación del sexo fetal (en gestas únicas), se ha reportado una sensibilidad y especificidad del estudio del 98.9% (95% CI 98%–99.4%) y 99.6% (95% CI 98.9%–99.8%), respectivamente (doi.org/10.1111/1471-0528.14050).

Tabla 2. Valores de Referencia para aneuploidías en autosomas

Score	BAJO RIESGO	ALTO RIESGO TRISOMÍA	ALTO RIESGO MONOSOMÍA
Z (Z-Score)	-3 < Z < 3	≥ 3	≤ -3
ZZ (ZZ-Score)	-3 < ZZ < 3	≥ 3	≤ -3
MAI (Mediana Autosoma Interés)	-1.5 < BM < 1.5	≥ 1.5	≤ -1.5
MAR (Mediana Resto Autosoma)	No	< 1	< 1

Adicionalmente se realiza una inspección visual (algoritmo Wisecondor (PMID: 24831532) y CBS, *circular binary segmentation* (PMID: 17234643) de los cromosomas estudiados, para correlacionar los valores arrojados por los scores arriba mencionados.

	Sistema de Gestión de Calidad Registro	RG 756
		Rev. 07
Consentimiento informado para test prenatal no invasivo (NIPT)		Sector: SAB

Para completar por personal de Cibic S.A.

Código:	<i>Nro. de ingreso Cibic:</i>
----------------	-------------------------------

Para completar por paciente y/o médico solicitante

Nombre y Apellido: _____

SELECCIONE EL PANEL QUE DESEA REALIZAR (indique sólo una de las dos opciones):

- Test prenatal no invasivo (NIPT) básico
- Test prenatal no invasivo (NIPT) ampliado

Lugar y Fecha

Firma paciente

Firma y sello del profesional responsable