



Fundación JL Castaño
SEQC

SEQC^{ML}
Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2017-2018

APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS TÉCNICAS ACTUALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Ed. Cont. Lab. Clin 37: 41 - 51

SECUENCIACIÓN MASIVA EN EL DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO.

Hada Macher Manzano.

Servicio de Bioquímica Clínica, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla.

Begoña Ezquieta Zubicaray.

Laboratorio Diagnóstico Molecular, Servicio de Bioquímica y Análisis Clínicos. Hospital Materno Infantil. Instituto de Investigación Biomédica Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

En el plasma de las gestantes circulan ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN del feto cuyas propiedades han sido bien descritas. Ambos están constituidos por fragmentos cortos, especialmente el fetal que en su mayoría son menores de 150 pares de bases. Se postula que su origen es mayoritariamente apoptótico de células provenientes de la placenta. Los ácidos nucleicos fetales circulantes (fCNAPS, *fetal circulating nucleic acids in plasma and serum*) son indetectables en el plasma materno a las 48 horas del parto, de hecho son eliminados en su mayoría durante las dos primeras horas postparto, por lo que no coexistirían con el ADN de un embarazo anterior. De manera que si durante la gestación se detecta en el ADN circulante un gen o mutación ausente en la madre, inequívocamente pertenecerá al feto.

El ADN de origen fetal que circula en el plasma materno es un "espejo" de todo el genoma del feto y representa un porcentaje reducido del ADN total en el plasma de la gestante. Puede ser detectado a partir del día 18 de gestación mediante técnicas de PCR de alta sensibilidad. El ADN procedente del feto diluido en el ADN circulante materno puede constituir entre un 3 y un 10 % en etapas tempranas y llegar incluso a un 20 % conforme avanza el embarazo. El hecho de que los fCNAPS estén presentes sólo como componentes minoritario del total de ácidos nucleicos circulantes maternos ha supuesto el principal obstáculo técnico en el desarrollo del diagnóstico prenatal no invasivo. En la actualidad, la detección de genes o mutaciones puntuales ausentes en la madre se aborda con técnicas de PCR a tiempo real o, de forma más sensible y específica, si es con PCR digital, considerándose ambas técnicas con capacidad diagnóstica para este tipo de alteraciones. Por el contrario, las

técnicas que requieren de una cuantificación relativa referida a material genético presente tanto en la madre como en el feto, como es el caso de las aneuploidías cromosómicas, se consideran técnicas de cribado ya que existen falsos positivos y requieren de una técnica de confirmación diagnóstica sobre material exclusivamente fetal (análisis citogenético del líquido amniótico o de la sangre de cordón).

En este capítulo nos centraremos en las técnicas de secuenciación masiva y sus características especiales para el cribado genético de anomalías cromosómicas refiriéndonos a ellas como NIPT (*non invasive prenatal test*). Nos referiremos a las trisomías 21,18 y 13, y a las aneuploidías de los cromosomas sexuales, para las que eficiencia es suficiente para ser incluidas en los planes nacionales de salud como método contingente a los actuales sistemas de cribado de aneuploidías cromosómicas prenatales.

Técnicas de secuenciación masiva aptas para el NIPT

Las tecnologías de secuenciación masiva implementadas en los distintos instrumentos actualmente utilizados difieren en varios aspectos, pero el esquema principal de trabajo es conceptualmente similar para todos ellos, se tienen que conseguir millones de copias de las secuencias a estudiar para conseguir detectar el ADN menos representado en la muestra (ADN fetal respecto al ADN materno). A diferencia de la secuenciación masiva aplicada a ADN genómico, dado que el ADN circulante se encuentra fraccionado, no es necesario digerir el ADN previo a su amplificación. La probabilidad teórica para detectar fracciones del 5 % de variaciones alélicas minoritariamente representadas, requiere que existan al menos 500 copias de cada secuencia amplificada para detectar al menos dos copias de la variante minoritaria, pero para que sea preciso se necesitarán miles de copias de la región a estudiar.

La secuenciación masiva produce una cantidad de datos sin precedentes que un ordenador común no puede manejar. Se han desarrollado herramientas de manejo de datos y análisis para variantes de baja frecuencia, que llegan a detectar variantes representadas incluso hasta en un 2 % en la muestra amplificada. Las técnicas de secuenciación masiva empleadas para el NIPT más extendidas actualmente se describen a continuación, y todas ellas han desarrollado sistemas de detección de la fracción fetal en la muestra además de haber validado sus programas de análisis bioinformático para la aplicación clínica de estas técnicas. Todas las sensibilidades descritas son a partir de la semana 10 de gestación y para un mínimo de fCNAPS del 4 %.

- DANSR™ assay (Ariosa-harmony/ Roche) (*Digital analysis of selected regions*) Este método utiliza oligonucleótidos que ligan locus genéticos específicos de los distintos cromosomas a estudiar haciendo una amplificación selectiva para su posterior cuantificación por "microarray" (con Affymetrics thecnology) y análisis. Su sistema de Análisis patentado FORTE (*Fetal fracción optimized risk of trisomy evaluation*) realiza un algoritmo donde además de la cuantificación del ADN materno y fetal consideran los riesgos asociados a las característi-

cas de la madre y a la edad gestacional. Realiza test de alta fiabilidad para la detección de aneuploidías en los cromosomas 21 en un 99 %, 18 en un 98 %, 13 en un 80 %.

- Verifi prenatal test (VERINATA) Realiza secuenciación masiva en paralelo de todo el ADN circulante (MPGS, massive parallel genomic sequencing), produce millones de amplicones cortos que suelen ser de 25 a 36 pares de bases de longitud y posteriormente por análisis bioinformático se agrupa cada secuencia obtenida con el cromosoma al que pertenece en base al genoma humano y cuantifica. El análisis bioinformático denominado SAFeR calcula el valor normalizado de cada cromosoma reduciendo las desviaciones causadas por los contenidos en CG. Sus sensibilidades son > 99.9 % para trisomías 21, 97.4 % para trisomías 18 y 87.5 % para trisomías 13.

- MaterniT21 PLUS (Sequenom) Realiza secuenciación masiva en paralelo de todo el ADN circulante generando millones de fragmentos pequeños que por análisis bioinformático posterior discierne y cuantifica la representación de cada cromosoma. Consigue sensibilidades de 99.1 % en trisomía 21, 99.9 % en trisomía 18, y 91.7 % en trisomía 13.

- Panorama test (NATERA Inc.) Este laboratorio realiza una secuenciación masiva dirigida basada en SNPs (*single nucleotides polymorphisms*) leyendo unos 20.000 SNPs diferentes, es un abordaje no solo cuantitativo sino también cualitativo. Amplifican el ADN circulante y el ADN de las células sanguíneas de la madre, para poder usar este último de patrón y poder discernir entre el ADN fetal y el materno. Su algoritmo diagnóstico se basa en el análisis exclusivo de la fracción fetal del ADN circulante y es muy robusto, denominado NATUS (*nex generation aneuploidy test using SNPs*). Consigue sensibilidades de > 99 % y especificidades > 99 % para las trisomías 21, 18 y 13.

El NIPT puede verse afectado cuando se reduce la cantidad de ADN fetal circulante en el plasma/ suero materno, siendo fundamental para el análisis conocer la existencia de una fracción fetal mínima del 4 %. La importancia de la detección y cuantificación de la fracción fetal ha llevado a los laboratorios a desarrollar algoritmos de cálculo y sistemas de medida cada vez más sofisticados y eficientes que detallamos:

En el caso de Ariosa/Harmony (Roche), realiza una amplificación de 192 locus de SNPs seleccionados entre los cromosomas 1 al 12 analizando las frecuencias alélicas minoritarias optimizado en el "HapMap 3 dataset" (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) para posteriormente realizar el análisis FORTE con todos los datos de la secuenciación.

Veriref utiliza el método denominado SeqFF, que utiliza información de la secuenciación genómica obtenida, que cubre todos los cromosomas, sin requerir ensayos adicionales. Valora ligeras diferencias halladas por su comportamiento en la amplificación que permiten discernir entre el ADN de origen materno y el fetal siempre que se hayan realizado miles de copias de las regiones de interés. Para su análisis seleccionan pequeñas regiones del genoma que están "sobrerepresentadas" en el ADN fetal. Este método contabiliza secuencias

autosómicas fragmentadas en regiones de 50kb para su análisis estadístico mediante un sistema de ponderación derivado de un modelo multivariante.

Existen métodos comerciales con mayor capacidad de discernimiento entre el ADN fetal y el materno, como son los que realizan una amplificación paralela del ADN de los leucocitos maternos, como es el caso de Panorama que añade su sistema de cálculo NATERA. Una aproximación similar es la que realiza el FetalQuant^{SD}. En esta técnica las células sanguíneas maternas son genotipadas con plataformas de microarray que localizan SNPs para los que la madre es homocigota, sustraen entonces la información de los alelos distintos al materno que representan potencialmente a la herencia paterna (Figura 1).

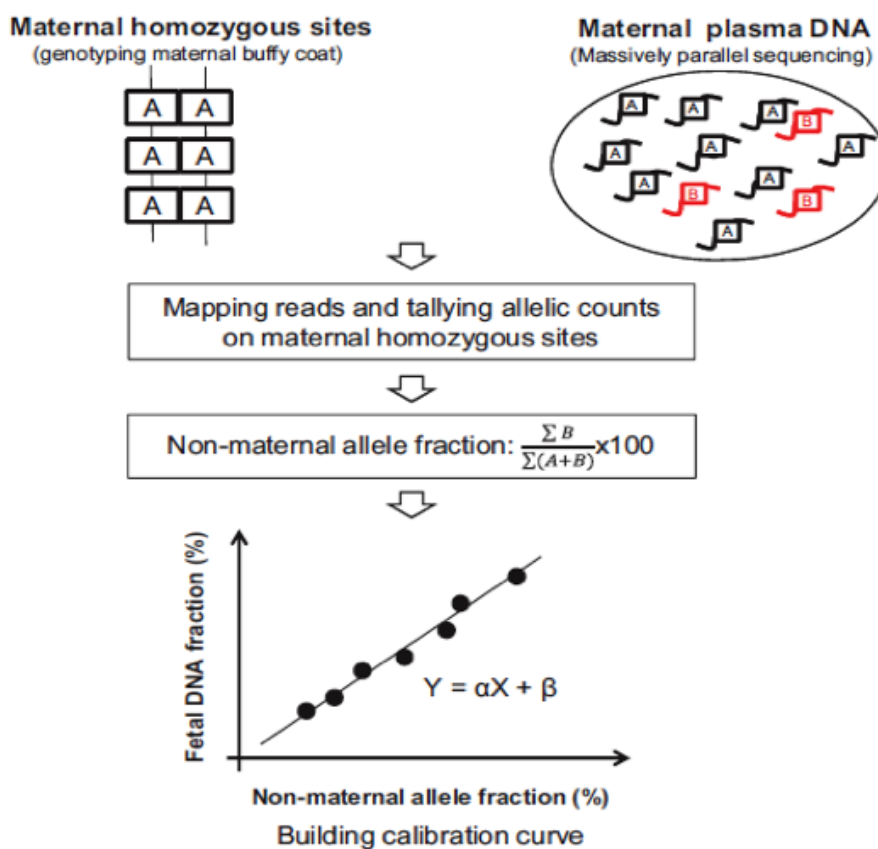


Figura 1: Ilustración esquemática del principio usado en FetalQuantSD. Las lecturas de la secuencias se han alineado con el genoma humano de referencia y comparadas con las secuencias en las que el genotipo materno está en homocigosis. Las fracciones alélicas no maternas pueden ser deducidas agregando todas las lecturas con alelos diferentes al materno correspondiente a los alelos homocigotos maternos en el grueso de la secuenciación masiva (Peiyong Jiang y cols, 2016).

Los factores que determinan la exactitud de este método de medida de la fracción fetal de ADN son la profundidad de la secuenciación y el número de SNPs seleccionados. En la Figura 2 se muestra la desviación con un intervalo de confianza del 95% para diferentes cantidades de SNPs frente a las profundidades de secuenciación particulares. Por ejemplo, 8 millones de lecturas y 300 SNPs en estudio pueden dar una desviación de $\pm 1,8\%$.

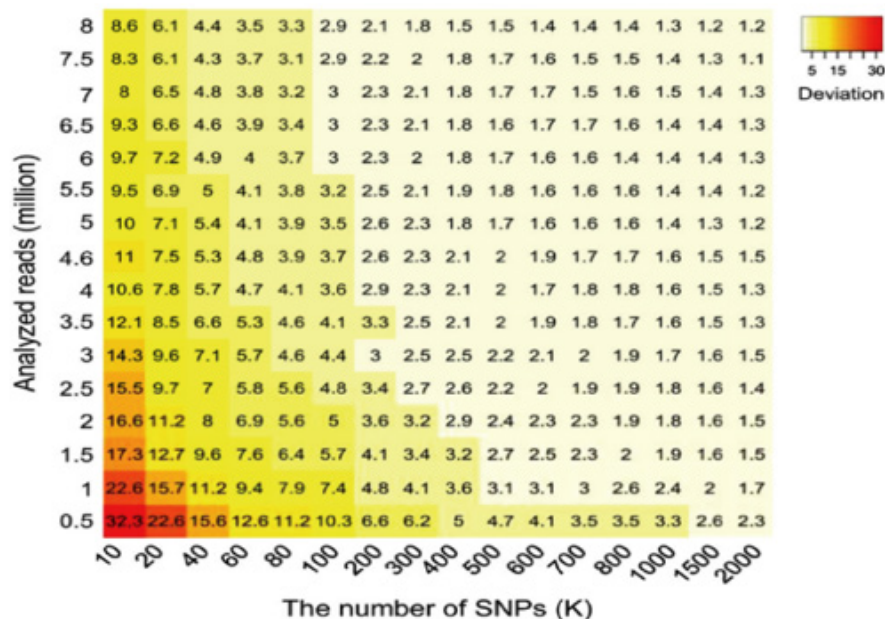


Figura 2: Impacto de la profundidad de la secuenciación y el número de SNPs valorados en la eficiencia para estimar la fracción fetal. El numero en cada cuadrícula indica la mitad de la amplitud del intervalo de confianza del 95% de las desviaciones a una profundidad de secuenciación dada y un numero de SNPs determinado. El gradiente de colores de cada cuadrícula del mapa de calor indica el rendimiento de cada combinación (Peiyong Jiang y cols, 2016) maternos en el grueso de la secuenciación masiva (Peiyong Jiang y cols, 2016).

Observándose en el mapa de calor gráficamente la mitad de la amplitud del intervalo de confianza del 95 % para demostrar la influencia de la profundidad de secuenciación y el número de SNPs estudiados sobre la exactitud de la valoración de la fracción de ADN fetal.

Existen otras aproximaciones para el cálculo de la fracción de ADN fetal, pero con las expuestas pretendemos mostrar que es importante tanto la profundidad de la secuenciación (millones de fragmentos amplificados) como la valoración de la fracción fetal. Remarcar también que el análisis bioinformático para la enorme cantidad de datos generados es de suma importancia para la eficiencia del proceso.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

La posibilidad de detectar en una muestra no invasiva los desbalances numéricos de los cromosomas fetales ha abierto grandes posibilidades para el cribado prenatal. El cribado ecográfico/bioquímico presenta dos puntos débiles: su elevada tasa de falsos positivos (asumida para garantizar una máxima sensibilidad pero cuyo bajo valor predictivo positivo conlleva numerosos procedimientos invasivos que, a su vez, pueden originar pérdidas fetales) el 80- 90% de los cribados positivos para síndrome de Down resultan ser negativos y además adolece de una cierta insensibilidad para la aneuploidía más frecuente, el síndrome de Down (trisomía 21, T21). Tanto en población gestante de alto como de bajo riesgo, los metanálisis más recientes han establecido la elevada sensibilidad (99,4 %) y especificidad (99,9 %) del NIPT para el síndrome de Down. También lo fue, aunque con sensibili-

dades algo menores, la de los síndromes de Edwards (T18) y Patau (T13), 97,7 % y 90,6 %, respectivamente.

El NIPT permite detectar con sensibilidad y especificidad las aneuploidías más frecuentes, pero no sustituye al cribado ecográfico/bioquímico ya que sólo está validado para las trisomías más frecuentes, Down, Edwards y Patau (T21, T18 y T13, respectivamente) y las aneuploidías que afectan a los cromosomas sexuales, aunque éstas con algunas limitaciones (ver apartado). No toda la patología fetal que se sospecha ecográficamente y/o da lugar a marcadores bioquímicos patológicos, genera alteraciones que el NIPT detecta por lo que la implementación de NIPT en un contexto asistencial de sanidad pública (que ya incluye el cribado prenatal ecográfico/bioquímico) deba ser contingente al mismo. El cribado de primer trimestre permite sospechar mejor las T18, T13, y las triploidias y la patología fetal derivada de deleciones parciales, y presenta la ventaja de predecir otros factores de interés, como el parto prematuro o la preeclampsia. También permite, en las muestras sin resultado del análisis NIPT (ver apartado LIMITACIONES), disponer de datos predictivos para orientar el manejo del embarazo. NIPT no debe aplicarse como técnica única de primer nivel y requerirá, al menos, de una ecografía experta. Tampoco debe ser el test aplicado para decidir, tras unos hallazgos ecográficos positivos, si se practica o no un procedimiento invasivo. NIPT es una técnica de cribado, no es una técnica diagnóstica ya que tiene falsos positivos, por lo que requiere del método invasivo para alcanzar el diagnóstico.

Los recientes estudios prospectivos europeos, ya en práctica clínica real de toma de decisiones, también documentan la aportación del NIPT aplicado de forma contingente al cribado prenatal. En el estudio de Reino Unido en un entorno de sanidad pública NIPT ha detectado el 98 % de las T21 (frente a un 87 % el cribado), aunque ha sido superado por el cribado clásico para las T18 y T13 (que ha detectado el 93 % frente a 87 % el NIPT). Estos estudios han mostrado que los falsos positivos en el cribado clásico (3,4 %) superaron ampliamente a los de NIPT (0,25 %). La introducción de NIPT se tradujo en una reducción real en el número de procedimientos invasivos (62 % frente a 43 %) aunque los supuestos teóricos de ahorro no se cumplieron fielmente (ver más abajo).

El planteamiento consiste en que NIPT, aplicado como test de segundo nivel, puede evitar procedimientos invasivos por su mayor valor predictivo positivo (0,09 % T21 o 0,32 % falsos positivos, respectivamente, para T21 o T21+T18+T13 en NIPT frente a 5,4 % falsos positivos en el cribado) y mejorar la detección de la trisomía 21 por su mayor sensibilidad para T21 (99 % vs 85 %).

Para el primer objetivo planteado el análisis no invasivo se ofrecería a las gestantes cuyo riesgo en el manejo actual implicaría el planteamiento del invasivo (>1:270), aportando el asesoramiento preprueba y dejando claro el potencial de la técnica y el que la prueba no es diagnóstica y requeriría el invasivo de ser positiva. Debe por tanto definirse un nivel a partir del que las pacientes a riesgo podrían optar por el análisis NIPT. Cuanto más alto sea el riesgo (más bajo el denominador) a partir del que se filtra por NIPT es mayor el número de invasivos que se evita, pero es también mayor la probabilidad de dejar sin diagnosticar

los casos que, al no ser 21 ni 18 ni 13, resultarían negativos para NIPT.

Para el segundo objetivo, NIPT se ofrece a pacientes con riesgos menores ($>1:500$, $>1:1000$). Ello incrementa el número de análisis NIPT a realizar pero mejora la detección del síndrome de Down.

Las gestantes jóvenes en las que el factor edad puede, al calcular el índice de riesgo, "neutralizar" datos de translucencia nucal o valores de PAPP-A o β hCG muy alejados de la media y las gestantes en las que aparecen marcadores ecográficos blandos en el segundo trimestre podrían beneficiarse de la aportación de la sensibilidad de NIPT para la detección del síndrome de Down.

Las aportaciones clave de esta técnica son: la reducción de los procedimientos invasivos (por tanto de las pérdidas fetales) derivada de la reducción de los falsos positivos lo que mejora sensiblemente el valor predictivo positivo, y la mejora de la sensibilidad para la detección de algunas aneuploidías, muy significativamente del síndrome de Down (aneuploidía más frecuente cuya detección ecográfica/bioquímica se limita al 85-90 % en el cribado neonatal habitualmente planteado).

Los estudios de coste beneficio tienen en cuenta que la reducción del número de pruebas invasivas (además de reducir las pérdidas fetales) supone unos menores costes sanitarios a expensas de los cuales puede quedar justificado el gasto adicional del NIPT. También la reducción de los casos Down se plantea como factor de ahorro por los costes sanitarios a los que da lugar esta entidad clínica. No han sido, sin embargo, reales algunos supuestos teóricos de ahorro en los que se fundamentaban los análisis coste/beneficio. Los primeros estudios de aplicación en práctica clínica mencionados han mostrado que la disminución de invasivos ha sido menor de lo esperado, especialmente en la población de alto riesgo (un 38 % prefirieron el test invasivo). Tampoco las terminaciones voluntarias del embarazo en los casos Down detectados han sido tan numerosas como se preveía (un 32 % de los Down detectados nacieron). Este tipo de decisiones de la gestante son muy dependientes de cuestiones culturales, sociales, etc...

3. LIMITACIONES DEL NIPT. RECOMENDACIONES INTERNACIONALES

Se trata de una metodología nueva en sus fundamentos y en su potencial cuyo utilidad en un contexto clínico debe ir precedida, no solo de una validación analítica y clínica sino de una garantía del conocimiento de la misma por parte de los profesionales sanitarios que han de utilizarla, técnica o conceptualmente. Requiere no sólo garantizar los aspectos formativos del personal sanitario sino también el evaluar si se ha conseguido la comprensión de la información que aporta, su significado y sus limitaciones tanto por parte de los facultativos como de las gestantes. También se debe evaluar si los supuestos teóricos en los que se ha fundamentado la disminución de costes (económicos y sociales) se mantienen en su implementación real.

No es despreciable el número de muestras que puede quedar sin resultado y ello es muy dependiente de la preanalítica y de la calidad técnica. El tipo de metodología empleada también afecta de forma muy significativa, 1,6 % de “no resultados” en MPGS frente a 6,4 % en la fundamentada en SNPs. El impacto de las muestras sin resultado es del 0,32 a 5,3 % según una revisión sistemática de 2016. Las muestras sin resultado son frecuentemente debidas a una fracción fetal reducida (<4 %) que, en caso de que la edad gestacional no fuera la adecuada (>9-10 semanas), requeriría una segunda muestra. El consiguiente incremento del tiempo de respuesta no es la limitación más importante de las muestras que quedan sin resultado ya que algunas no se resuelven con una segunda muestra porque el “no resultado” es intrínseco a la fisiología de la gestante (obesidad) y lo que es más grave, los “no resultado” pueden estar enmascarando patología fetal (4,7 % de ellos son aneuploidías) que per se había sido la causa de una fracción fetal menor (ej: la T18 o las triploidías).

En lo que se refiere a las muestras sin resultado, las recomendaciones más recientes (ACMG 2016) son: ofrecer invasivo y no la obtención de una nueva muestra cuando la primera determinación se ha hecho en edad gestacional adecuada, no ofrecer NIPT a gestantes obesas, determinar e incluir el dato de fracción fetal en el informe, reflejar el motivo que ha llevado a la no obtención de resultado en dicha muestra. Para los casos con resultado las recomendaciones generales (ACMG 2016) son: que el informe deberá incluir siempre los datos de tasa de detección, especificidad y valores predictivos positivo y negativo propios de la técnica aplicada en el laboratorio y que no deberán informarse riesgos para condiciones para las que no se disponga de dichos datos. Se debe cuantificar la fracción fetal y reflejar en el informe la cuantía de esta fracción. Debe garantizarse que el consejo genético pre- y postprueba a la embarazada sea el adecuado.

Otro aspecto también muy importante que la recomendación de ASHG/ESHG en 2015 ya señalaba, es que debe evitarse en lo posible una extensión del análisis (otros cromosomas o deleciones/duplicaciones de menor tamaño) que pueda incrementar los falsos positivos, ya que produciría un aumento de los procedimientos invasivos que se pretendían evitar con la implementación del método. A este respecto la recomendación de la ACMG (2016), es que solo pueden informarse aquellos resultados para los que el laboratorio pueda aportar datos propios de tasa de detección y especificidad y, en cuanto a los valores predictivos positivo y negativo, en caso de aportar datos modelizados (por no disponerse todavía de datos suficientes de utilidad clínica) debe reflejarse en el informe el origen de estos datos.

La valoración de las aneuploidías de los cromosomas sexuales en NIPT está bien optimizada en los métodos fundamentados en SNPs, y no lo estuvo en los métodos fundamentados en la MPGS en sus primeras etapas. El número de publicaciones por el momento disponibles es limitado y en las revisiones sistemáticas solo analizan las trisomías 21, 18 y 13 de forma completa. La monosomía del X (síndrome de Turner) se evalúa en el metanálisis de 2017 (sensibilidad 93 %, 74-98 %) aunque con un número de estudios todavía insuficiente. La

recomendación general es que debe evitarse que exista selección de sexo, lo que puede llevar a decidir acordar no analizar/informar los resultados relativos a cromosomas sexuales. Debe tenerse en consideración que los análisis de los cromosomas sexuales originan "sin resultado" más frecuentemente y que los mosaicismos placentarios son frecuentes en estos cromosomas.

El incremento de falsos positivos que, sobre la detección exclusiva del síndrome de Down (0,09 %), origina la inclusión de los cromosomas 18, 13 y sexuales (0,72 %) lleva a algunos autores a considerar innecesaria, e incluso contraproducente, su valoración en el análisis NIPT. La detección mediante NIPT de otras aneuploidías más infrecuentes o de deleciones parciales no ha sido evaluada en las revisiones sistemáticas y solo han sido documentadas por algún grupo investigador. ACMG 2016 no recomienda analizar aneuploidías que no sean 21, 18 y 13.

Situaciones que desaconsejan la utilización de NIPT son: una edad gestacional menor de 9-10 semanas y la obesidad, ya que la fracción fetal es menor y son proclives a ser muestras sin resultado, lo que conduciría a recomendar procedimiento invasivo. Cuando ha existido trasplante o transfusiones previas los posibles factores de confusión en los patrones bioinformáticos deben ser evaluados con cautela. La aplicación de NIPT en gemelares requiere metodología y algoritmos específicos de los que el laboratorio debe disponer.

NIPT no detecta actualmente las translocaciones no balanceadas, las deleciones y las duplicaciones y no puede distinguir las formas específicas de la aneuploidía (Ej: no puede distinguir si un síndrome de Down es debido a cromosoma extranumerario, /translocación Robertsoniana que implique al cromosoma 21 o mosaicismo de alto grado).

La posibilidad de explotar en toda su extensión la lectura del genoma, explorando todas las regiones y cubrir, garantizando la profundidad requerida para obtener datos valorables, desde las alteraciones puntuales hasta las grandes deleciones y variaciones numéricas de los cromosomas está en el terreno de la investigación, no de la aplicación clínica.

En población española no se ha planteado un protocolo consensuado ni una evaluación conjunta y no se dispone de estudios prospectivos, ni existen recomendaciones de las sociedades científicas implicadas. No obstante, la comunidad andaluza publicó en 2011 una descripción pormenorizada del método y se dispone de la evaluación realizada en el País Vasco en 2015 que aporta un estudio de coste/beneficio, que desafortunadamente solo considera el síndrome de Down.

Observamos que la difusión del método está siendo mayoritariamente dirigida a los ginecólogos y obstetras con poca implicación por parte de los laboratorios que no solo son actualmente partícipes muy activos del cribado prenatal, sino que sus profesionales disponen de una cualificación técnica que les permite afrontar los retos de esta nueva metodología, lo que hace imprescindible su colaboración en la toma de decisiones relativas a la incorporación de esta técnica en el seguimiento clínico prenatal.

4. BIBLIOGRAFÍA

- **Bayón Yusta JC, Orruño Aguado E, Portillo Villares MI, Asua Batarrita J.** Cribado prenatal para la detección del síndrome de Down mediante el análisis de ADN fetal en sangre materna. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco; 2016. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias: OSTEBA.
<https://goo.gl/qkhJhA>
- **Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al.** Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* 2011;342:c7401
- **Gil MM, Revello R, Poon LC, et al.** 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 Jan;47(1):45-52.
- **Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al.** ACMG Noninvasive Prenatal Screening Work Group. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2016.
- **Jiang P, Peng X, Su X, et al.** FetalQuantSD: accurate quantification of fetal DNA fraction by shallow-depth sequencing of maternal plasma DNA. *NPJ Genom Med* 2016 1, 16013.
- **Mackie FL, Hemming K, Allen S, et al.** The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG.* 2017 Jan;124(1):32-46
- **Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al.** Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med.* 2015 Apr 23;372(17):1589-97.
- **Oepkes D, Page-Christiaens GC, Bax CJ, et al.** and for the Dutch NIPT Consortium. Trial by Dutch laboratories for evaluation of non-invasive prenatal testing. Part I-clinical impact. *Prenat Diagn.* 2016 Dec; 36(12):1083-1090.
- **Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al.** DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012;14:296–305.
- **Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A.** Non- invasive 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;206:319.
- **Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, et al.** Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2016 Jan 18;6(1):e010002.

- **Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, et al.** Non-invasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of poly-morphic loci. *Prenat Diagn* 2012;32:1233–41.

COMISIÓN DE GENÉTICA

Presidenta: Pilar Carrasco Salas.

Miembros: Concepción Alonso Cerezo, Ana Cuesta Peredo, Orland Diez Gibert, Begoña Ezquieta Zubicaray, Hada Macher Manzano, Jesús Molano Mateos, Josep Oriola Ambròs, Raquel Rodríguez López, Atocha Romero Alfonso, Ana M^a Sánchez de Abajo, María Santamaría González (*coordinadora*), Cristina Torreira Banzas.

ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi, R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, A. Merino, A. Moreno, A. Peña, N. Rico, M. Rodríguez (*Presidente*), MC. Villà.

ISBN 978-84-697-4013-2 – Marzo 2018 (recibido para publicación Junio 2017).