

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús estableties per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Tesis Doctoral

**DNA FETAL LIBRE EN PLASMA MATERNO: DESARROLLO
DE NUEVOS MÉTODOS DE ANÁLISIS Y APLICACIÓN
CLÍNICA EN DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO**

Elena Ordóñez Torra

Barcelona, 2016

**DNA fetal libre en plasma materno: desarrollo de nuevos
métodos de análisis y aplicación clínica en diagnóstico
prenatal no invasivo**

Memoria presentada por

Elena Ordóñez Torra

Para optar al título de Doctor en Biología

Programa de Biología Celular

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Tesis realizada bajo la dirección de los Drs.

Vincenzo Cirigliano y Carme Fuster

Dr. Vincenzo Cirigliano

Departamento de Genética y
Biología Molecular.
LABCO Diagnostics.
Barcelona.

Dra. Carme Fuster

Departament de Biologia Cel·lular,
Fisiologia i Immunologia.
Facultat de Medicina.
Universitat Autònoma de Barcelona.

Doctoranda

Elena Ordóñez Torra

A mi madre

Agradecimientos

Esta tesis es una realidad gracias al apoyo de muchas personas, espero no dejarme a ninguna de ellas aquí...

Mis primeras palabras de agradecimiento, como no puede ser de otra manera, son para mis dos directores: Dra. Carme Fuster y Dr. Vincenzo Cirigliano. Gràcies Carme per la paciència, la perseverança i la dedicació, i per l'empenta en el moment decisiu per continuar endavant (com et deia, aquell dinar dels tres al japo va marcar la diferencia!). Y gracias Vincenzo, Vincen, Ciri, Dottore (aquí me permito el lujo de perder las formas...) por el esfuerzo, por los ánimos, y también por la paciencia con la "rondineta" del laboratorio. Y gracias por descubrirme el mundo del diagnóstico prenatal, por darme la oportunidad de aprender de ti (¡y lo que me queda!) y por la confianza que depositas en mi cada día; y por el último año, sin duda esencial para llegar hasta aquí.

A mis compañeros del departamento de Biología Molecular en Lab2, General Lab, Labco, o Synlab: Isa, Laura, Maijo, Manu, Cristina, y todas las demás; gracias porque habéis participado activamente en todo esto, tanto laboral como personalmente, en los momentos buenos y en los malos. Y en especial gracias a la Dra. M^a Paz Cañadas, porque a pesar del enchufe inicial (gracias también a Jordi Suñer), pensaste que podía servir para esto y me descubriste "la molecular", dándome la primera oportunidad y enseñándome a todos los niveles (¡pues no hemos aprendido ni nada en todos estos años!); ya sabes, eres mi madre profesional (perdón! Mi hermana mayor!).

Gracias también a la Dra. Loles Pons, "la meva editora particular", por la ayuda en la revisión final.

También quiero agradecer el apoyo y la paciencia a esas amistades a las que tengo "aparcadas" y a todas aquellas que, a pesar del distanciamiento en los últimos tiempos, han formado parte de este largo camino (Cristina, Mañú, Utri, Mari, Nerea,... sois las primeras que me venís a la cabeza...).

Por último, pero no menos importante, gracias a mi familia. A mi madre, por sufrir y aguantar por partida doble (laboral y personalmente) los momentos malos y los buenos (menudos rollos te he soltado!); sin duda la persona que más cree en mi. Y a mi padre, por la paciencia y el cariño a pesar del poco tiempo que le dedico (sobretodo este último año...). También a mi segundo padre,

manitas a domicilio y ahora compañero de trabajo, gracias Pepe. Y no me puedo olvidar de los Torra en general, y las Torras Cotorras y los kartoffels en particular! Tendremos que cambiar la pregunta de la Navidad...jeje.

¡Gracias a todos! Ya podéis pasar a las conclusiones...

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Diagnóstico prenatal	17
1.2. Diagnóstico prenatal no invasivo: DNA fetal libre en plasma materno	19
1.2.1. Biología del DNA fetal libre en plasma materno (cffDNA)	20
1.2.1.1. Características de del cffDNA.....	20
1.2.1.2. Origen del cffDNA	21
1.3. Aplicaciones clínicas del análisis en cfDNA	24
1.3.1. Detección de enfermedades monogénicas	25
1.3.2. Determinación del sexo fetal	26
1.3.3. Determinación del grupo Rhesus (RhD) fetal	27
1.3.4.1. Sistema Rhesus D	27
1.3.4.2. Embarazo y RhD: Eritroblastosis fetal.....	29
1.3.4.3. Determinación no invasiva del RhD fetal	31
1.3.5. Detección de aneuploidías.....	33
1.3.5.1. Secuenciación de nueva generación (NGS)	33
1.3.5.2. Detección no invasiva de aneuploidías fetales mediante NGS.....	39
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
3.3. Material biológico.....	59
3.3.4. Obtención del plasma.....	60
3.4. Determinación del sexo y RhD fetales.....	61
3.4.4. Extracción del cfDNA.....	61
3.4.4.1. Extracción automática del cfDNA.....	62
3.4.5. Análisis del cfDNA.....	66
3.4.5.1. PCR a Tiempo Real: Principios del ensayo.....	66
3.4.5.2. Determinación del sexo fetal.....	71
3.4.5.3. Determinación del RhD fetal.....	74
3.5. Detección de aneuploidías fetales.....	83
4. RESULTADOS.....	91
4.3. Validación de protocolos.....	93
4.3.1. Protocolo de obtención del plasma.....	93
4.3.2. Detección y cuantificación de SRY.....	95
4.3.3. Determinación del RhD fetal.....	97
4.3.4. Detección de aneuploidías fetales.....	99
4.4. Aplicación clínica del análisis del cfDNA.....	106
4.4.1. Determinación no invasiva del sexo fetal.....	106
4.4.2. Determinación no invasiva del RhD fetal.....	109
4.4.3. Detección no invasiva de aneuploidías fetales.....	113

5. DISCUSIÓN.....	119
5.3. Análisis del DNA fetal.....	122
5.4. Determinación no invasiva del sexo fetal.....	127
5.5. Determinación no invasiva del RhD fetal.....	133
5.6. Limitaciones del análisis del cfDNA en la detección de secuencias de origen paterno para la aplicación en el diagnóstico clínico.....	143
5.7. Detección no invasiva de aneuploidías fetales.....	144
6. CONCLUSIONES.....	153
7. BIBLIOGRAFÍA.....	157
8. ANEXO: PUBLICACIONES.....	173

- Ordoñez E, Rueda L, Cañadas MP, Fuster C, Cirigliano V. Evaluation of sample stability and automated DNA extraction for fetal sex determination using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Biomed Res Int.* 2013.
- Ordoñez E, Rueda L, Cañadas MP, Fuster C, Cirigliano V. Development and validation of multiplex real-time PCR assay for noninvasive prenatal assessment of fetal RhD status and fetal sex in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther.* 2013.
- Grande M, Ordoñez E, Cirigliano V, Cid J, Grau E, Pericot A, Teixido I, Marin JL, Borrell A. Clinical application of midtrimester non-invasive fetal RHD genotyping and identification of RHD variants in a mixed-ethnic population. *Prenat Diagn.* 2013.
- Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierickx H, Willems PJ, Jani JC. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015.

ABREVIATURAS

cfDNA	DNA libre circulante (<i>cell free DNA</i>)
cffDNA	DNA fetal libre circulante (<i>cell free fetal DNA</i>)
CI	Intervalo de Confianza (<i>Confidence Interval</i>)
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
DR	tasa de detección (<i>Detection Rate</i>)
FPR	tasa de falsos positivos (<i>False Positive Rate</i>)
FF	Fracción Fetal
FR	tasa de fallos (<i>Failure Rate</i>)
MPSS	Secuenciación Masiva en Paralelo (<i>Massive Parallel Shotgun Sequencing</i>)
NCV	Valores Cromosómicos Normalizados (<i>Normalised Chromosome Values</i>)
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NIPT	<i>Non Invasive Prenatal Testing.</i> Término referido a la detección no invasiva de aneuploidías fetales en plasma materno
rt-PCR	PCR a Tiempo Real (<i>Real Time PCR</i>)
SNPs	Polimorfismos de un único nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Negativo

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diagnóstico prenatal invasivo

El Diagnóstico Prenatal es una parte indispensable en la obstetricia actual que tiene como objetivo la detección "in utero" de los defectos congénitos, entendiendo como tales cualquier anomalía en el desarrollo del feto que implique una manifestación en el recién nacido.

A finales de los sesenta, se introduce el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas. La incorporación de la amniocentesis, junto con el desarrollo de técnicas para el cultivo de las células fetales permitió el cariotipado fetal y la detección de anomalías cromosómicas, con la trisomía 21 como principal objetivo del mismo (Steele and Breg, 1966; Valenti et al., 1969). La incorporación de la biopsia de vellosidades coriales a principios de los 80 permitió adelantar este análisis de las semanas 15-17 de gestación al primer trimestre, aunque seguían siendo necesarias una media dos semanas de cultivo para obtener un resultado (Brambati et al., 1983) (Fig.1).

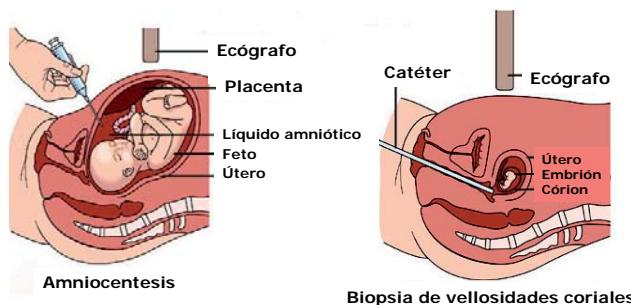


Figura 1. Procedimientos de obtención de material fetal para el diagnóstico prenatal. En la imagen izquierda, obtención de líquido amniótico mediante amniocentesis; a la derecha, obtención de vellosidades coriales mediante biopsia (Adaptada de Byer/Shainberg/Galiano. Dimensions of Human Sexuality, 5e. The McGraw-Hill Companies, Inc.).

En las últimas décadas la explosión tecnológica en la biología celular y molecular ha permitido acceder a métodos de análisis cada vez más precisos y rápidos, y que no necesitan del cultivo celular. Técnicas como la hibridación

fluorescente *in situ* (FISH) y la PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR) para la detección de las aneuploidías más frecuentes; los arrays de hibridación genómica comparada (aCGH) para la detección de anomalías debidas a microduplicaciones o microdeleciones a lo largo del genoma fetal; y las numerosas técnicas específicas de biología molecular basadas en la PCR o la secuenciación de DNA para la detección de alteraciones genéticas concretas (enfermedades como la fibrosis quística, distrofias, hemofilia, etc.) han supuesto grandes avances en el diagnóstico prenatal actual.

A pesar del alto grado de precisión diagnóstica alcanzado hoy en día, los procedimientos invasivos tienen asociado un riesgo de pérdida fetal que, dependiendo de la experiencia del operador puede variar entre más del 1% (Tabor et al., 2009) o el 0,2% y el 0,1% para la biopsia corial y la amniocentesis (Akolekar et al., 2015). Por esta razón, su aplicación está indicada en casos seleccionados de historia familiar de enfermedades hereditarias o gestaciones de riesgo para cromosomopatías.

La exploración ecográfica de la anatomía fetal y el cribado de segundo y actualmente de primer trimestre han sido la estrategia no invasiva más utilizada hasta el momento para seleccionar las gestaciones de riesgo. Mediante un análisis de sangre en las semanas 8-10 de embarazo se obtienen las concentraciones de la fracción beta de la gonadotropina coriónica humana (hormona del embarazo o hCG) y los valores de la proteína placentaria asociada al embarazo (PAPP-A). Aproximadamente a las 12 semanas de gestación se realiza una ecografía para establecer la edad gestacional y la translucencia nucal (TN). La estimación de los riesgos de trisomía 21 y 18 se realiza a partir del riesgo inherente de la edad materna modificado en función de la desviación de estos tres marcadores (TN, β hCG y PAPP-A) sobre los valores esperados para la edad gestacional. La incorporación de más marcadores ecográficos en el cribado

combinado de primer trimestre permite aumentar la detección a más del 90% de los casos de trisomía 21 (Nicolaides et al., 2004; Wright et al., 2010).

Se consideran gestaciones de riesgo aquéllas con un riesgo bioquímico superior a 1/270 y en estos casos se recomienda a las pacientes someterse a un método invasivo (amniocentesis o biopsia corial) para la detección de anomalías cromosómicas (Borrell et al., 2004). Aunque esta aproximación significó un gran avance en la detección de gestaciones de riesgo, la tasa de falsos positivos, del 5%, hace que muchas mujeres se sometan a métodos invasivos sin necesidad (Cicero et al., 2003; Wright et al., 2014). Por esta razón, se han invertido grandes esfuerzos en el desarrollo de métodos no invasivos para detectar posibles anomalías en el feto y limitar el uso de estos métodos a las gestaciones clasificadas como de riesgo.

1.2. Diagnóstico prenatal no invasivo: DNA fetal libre en plasma materno

Aunque tradicionalmente se había considerado que la placenta forma una barrera impermeable entre la mujer embarazada y su feto, en realidad constituye el punto de máxima proximidad entre la circulación sanguínea fetal y la materna y permite el intercambio de sustancias en ambos sentidos. Pero además del intercambio de nutrientes entre madre y feto, se ha descubierto que también existe un intercambio celular durante el embarazo (Bianchi et al., 1997). La detección de células de origen fetal en sangre periférica materna (mayoritariamente eritroblastos nucleados) y el aislamiento de células fetales del canal endocervical (Adinolfi et al., 1993), han permitido la identificación no invasiva de anomalías en el feto y han sido objeto de numerosos estudios. Sin

embargo, existen grandes dificultades como el escaso número de células presentes (1 cél/mL sangre aprox.) y la dificultad tecnológica que implica su aislamiento y enriquecimiento que, a pesar de los esfuerzos realizados en este campo, dificultan su implementación en el diagnóstico prenatal rutinario (Bianchi et al., 1999; Bianchi et al., 2002).

El mayor avance en el diagnóstico prenatal de las últimas décadas se produce a finales de los noventa. Despues del descubrimiento de la presencia de DNA de origen tumoral libre en plasma y suero de pacientes enfermos de cáncer (Mulcahy et al., 1996), y teniendo en cuenta que los procesos de desarrollo fetal y placentario tienen un comportamiento similar al de los tejidos tumorales, Lo y colaboradores demostraron la presencia de secuencias de DNA de feto masculino en plasma de mujeres embarazadas en cantidades significativamente más elevadas que las que se podían obtener a partir de las células fetales aisladas mencionadas anteriormente (Lo et al., 1997). Estos datos confirmaban los observados poco antes por Kazakov y colaboradores en 1995 y demostraban que además del intercambio de nutrientes existe un intercambio de material genético libre entre la madre y el feto. Técnicas de biología molecular como la PCR a Tiempo Real o la PCR digital permiten un análisis de este DNA más accesible, eficiente y sensible que el análisis de las pocas células fetales aisladas.

1.2.1. Biología del DNA fetal libre en plasma materno (cffDNA)

1.2.1.1. Características de del cffDNA

El DNA fetal libre en plasma materno coexiste con el DNA materno circulante (procedente de procesos apoptóticos de diferente origen celular) y representa menos del 10% del DNA libre circulante total. Puede ser detectado desde la 4^a

semana de gestación (Illanes et al.,2007), mayoritariamente se trata de fragmentos cortos, inferiores a 200 pb (Chan et al.,2004), y su cantidad aumenta con el embarazo, especialmente en las últimas 8 semanas previas al parto (Lo et al.,1998; Bischoff et al.,2005).

La concentración total de cffDNA es muy baja, de 16 equivalentes genómicos/mL de plasma en el primer trimestre hasta 80 en el tercero, existiendo una elevada variabilidad entre individuos (Birch et al.,2005). Pocas horas después del parto es indetectable ya que es rápidamente eliminado por la orina (Lo et al.,1999a). Los datos publicados sugieren que al menos parte del cffDNA está unido a histonas en forma de mononucleosomas (Lo et al.,2010).

Además de DNA, también se ha detectado mRNA fetal libre circulante en plasma (Poon et al.,2000; Ng et al.,2003) y aunque los estudios realizados se han centrado en el DNA, ambos ácidos nucleicos pueden ser de utilidad para el diagnóstico prenatal no invasivo (Lo et al.,2007).

1.2.1.1. Origen del cffDNA

Inicialmente se especuló mucho sobre el origen de los ácidos nucleicos fetales detectados en circulación materna, con tres fuentes candidatas posibles: las células hematopoyéticas, la transferencia directa de moléculas entre feto y madre, y la placenta:

- a) Células hematopoyéticas. Los eritroblastos nucleados fetales que pasan a circulación materna fueron los primeros candidatos propuestos como fuente principal de este DNA. Estas células son destruidas por el sistema inmune materno, liberando su DNA. van Wijk y colaboradores detectaron restos apoptóticos de células fetales en plasma materno (van Wijk et al.,2000). Sin embargo, estudios posteriores en embarazos con

complicaciones como la preeclampsia y en fetos aneuploides, donde se observa un incremento de DNA fetal libre y de células fetales, demostraron que no había ninguna correlación directa entre estos incrementos, sugiriendo que se trata de procesos independientes y que por tanto, la destrucción de estas células no era la fuente del DNA fetal libre en plasma (Zhong et al., 2002).

- b) Transferencia directa de moléculas de DNA. La detección de secuencias de DNA en otros fluidos como la orina materna, el líquido amniótico o incluso el líquido cerebroespinal y peritoneal materno, sugirió la posible existencia de un gradiente de transferencia directa de estas moléculas de DNA a través de placenta o de membranas fetales (Bianchi et al., 2004).
- c) Placenta. La circulación feto-placentaria no se establece totalmente hasta los 28-30 días posteriores a la concepción, pero hay estudios que evidencian la presencia de cffDNA en plasma materno previamente (Guibert et al., 2003). Esto implica que la fuente de DNA fetal no puede ser hematopoyética. La existencia de una correlación entre las concentraciones de hCG (gonadotropina coriónica, secretada por el trofoblasto) y de cffDNA en plasma materno fue una de las primeras evidencias del origen placentario del DNA fetal libre circulante en plasma, probablemente debido a los procesos apoptóticos que se producen en los trofoblastos del espacio intervelloso (Sekizawa et al., 2003).

Hoy en día, se sabe que la placenta es la principal fuente de origen del cffDNA (Flori et al., 2004), con un papel mínimo adicional de las células hematopoyéticas y la transferencia directa. En algunas de las complicaciones que se dan durante el embarazo se observa un incremento de la cantidad de cffDNA en plasma materno, especialmente en aquéllas con afectación directa de la placenta. Se han detectado concentraciones de cffDNA cinco veces

superiores a las encontradas en gestaciones normales en casos sintomáticos de preeclampsia, y la cantidad de cffDNA ya es significativamente superior a las 17 semanas de gestación en mujeres que sufrirán esta enfermedad, mucho antes del desarrollo de los síntomas clínicos (Lo et al.,1999b; Zhong et al.,2001b; Levine et al.,2004). De igual manera, se han descrito incrementos de la concentración de cffDNA en placenta previa (especialmente en los casos de placenta invasiva (Sekizawa et al.,2002)), en partos prematuros (Leung et al.,1998) y en hiperemesis gravídica (Sekizawa et al.,2003). En todas estas complicaciones se dan alteraciones en el proceso de proliferación y diferenciación trofoblástica y de formación de la placenta (Leung et al.,2001; Levine et al.,2004). Se ha sugerido que la cuantificación del cffDNA podría utilizarse como marcador de seguimiento en los embarazos con riesgo de patologías placentarias (Rolnik et al.,2015). Los procesos de apoptosis en la placenta que también se dan en gestaciones normales y que al igual que las concentraciones de DNA fetal aumentan con las semanas de gestación también señalan a la placenta como fuente de origen de este DNA (Smith et al.,1999). La detección de mRNA circulante en plasma materno de origen citotrofoblástico (Poon et al.,2000; Ng et al.,2003) es la prueba definitiva que permite concluir que la placenta, y más concretamente el citotrofoblasto, es la fuente principal de origen de los ácidos nucleicos fetales detectados en circulación materna (Alberry et al.,2007).

1.3. Aplicaciones clínicas del análisis del cffDNA

Teniendo en cuenta su biología, los métodos seleccionados para la obtención y el análisis del cfDNA constituyen un punto crucial para su aplicación clínica. Hoy en día sabemos que el porcentaje de DNA fetal circulante en plasma materno (fracción fetal) puede verse alterado debido a diversos factores biológicos, disminuyendo al aumentar el peso materno (Ashoor et al., 2013; Wang et al., 2015), en presencia de patologías placentarias (Levine et al., 2004) o incluso en presencia de aneuploidías fetales (Zhong et al., 2000; Gerovassili et al., 2007; Bauer et al., 2006). Sin embargo, la fracción fetal también puede verse alterada por factores relativos al procesamiento de la muestra. Diferentes autores han sugerido que factores preanalíticos, como el tiempo transcurrido desde la extracción de sangre y la separación del plasma, la temperatura de almacenamiento, el tratamiento posterior que se hace de éste (por ejemplo doble o simple centrifugación, tratamientos con formaldehído), o incluso el volumen total de sangre periférica a partir de la cual se realice la extracción de DNA; pueden afectar a la eficiencia de este tipo de ensayos (Chiu et al., 2001; Lo and Poon, 2003; Dhallan et al., 2004; Barret et al., 2011; Hidestrang et al., 2012).

Para el análisis del cfDNA se utilizan métodos de biología molecular como la Nested PCR, la Real Time PCR, la PCR digital o la espectrometría de masas (Guibert et al., 2003; Hromadnikova et al., 2003; Ding et al., 2004; Grill et al., 2009; Barret et al., 2012). Sin embargo, la falta de marcadores universales de DNA fetal que permitan diferenciar entre DNA materno y fetal, limitó inicialmente su uso en aplicación clínica a la detección de secuencias de origen paterno, no presentes en la madre (Fig.2).

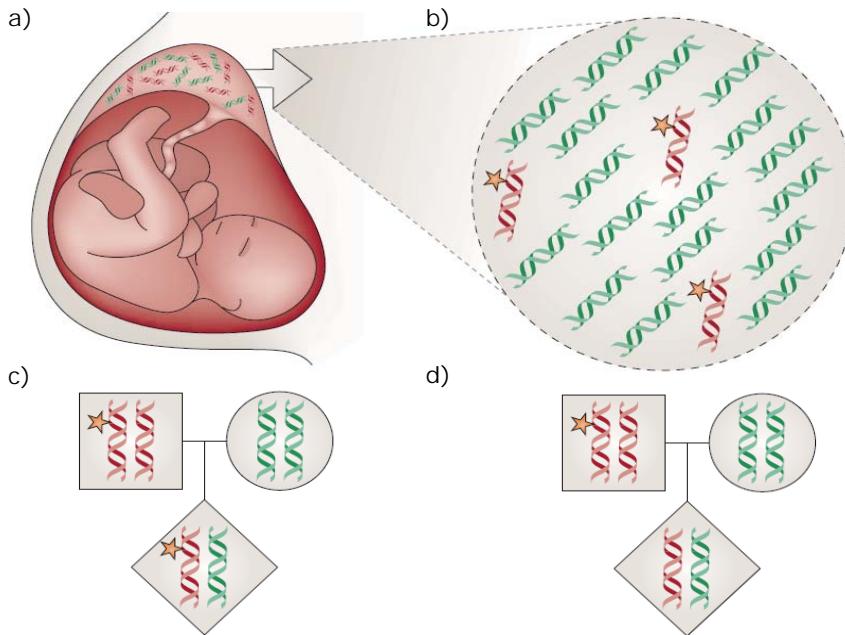


Figura 2. Principios del análisis de DNA fetal en plasma materno. a) Antes de su liberación al plasma materno, el número de moléculas de DNA de origen paterno (en rojo) y materno (en verde) es el mismo; b) en plasma materno, las moléculas fetales circulan en un elevado *background* de moléculas de DNA materno. El alelo de origen fetal de herencia materna es idéntico al presente en el *background* de secuencias maternas, mientras que el alelo heredado del padre es más fácilmente distinguible en el plasma materno; c) el genotipado no invasivo del feto se puede hacer mediante la detección positiva de marcadores únicamente presentes en el feto (marcado con una estrella); y d) de manera alternativa, es posible excluir la presencia de un marcador genético de herencia paterna. (Lo and Chiu, 2007).

1.3.1. Detección de enfermedades monogénicas

Existen miles de enfermedades causadas por mutaciones en un único gen y su frecuencia combinada es de 3,6:1000 nacimientos (Baird et al., 1988). El diagnóstico de las mismas mediante las técnicas de análisis existentes utilizando métodos invasivos para la obtención de DNA fetal está bien establecido en la rutina clínica pero su detección no invasiva se ha visto limitada a unos pocos ejemplos, dada la complejidad de su análisis en plasma materno (poca cantidad de DNA, fragmentación y elevado *background* de DNA materno). No obstante, se

ha utilizado para el diagnóstico de algunas enfermedades monogénicas dominantes de herencia paterna, como la enfermedad de Huntington (Gonzalez-Gonzalez et al., 2003) o la distrofia miotónica (Amicucci et al., 2000). En cuanto a enfermedades autosómicas recesivas, más difíciles de diagnosticar, se ha descrito la detección no invasiva de beta-talasemia (Chiu et al., 2002b), anemia falciforme (Barret et al., 2012), hemofilia (Tsui et al., 2011) y fibrosis quística (Hill et al., 2015). El reto técnico que supone detectar diferencias de un único nucleótido entre el DNA circulante fetal y materno ha sido superado mediante el uso de técnicas como la espectrometría de masas (Ding et al., 2004).

1.3.2. Determinación del sexo fetal

Existen del orden de 150 enfermedades ligadas al cromosoma X descritas, con una incidencia acumulada de ~5:10.000 nacimientos (Baird et al., 1988). En los casos de embarazos de riesgo para este tipo de enfermedades se realizan métodos de diagnóstico prenatal invasivo para la determinación del sexo y el diagnóstico molecular de la enfermedad. En estos casos, la determinación no invasiva del sexo fetal permite la reducción del uso de estos procedimientos invasivos (y de su riesgo asociado) a la mitad, limitándolos a las gestaciones de fetos de sexo masculino, que son los susceptibles de padecer la enfermedad.

La detección de secuencias del cromosoma Y (como las secuencias del gen SRY) es el método más utilizado para el análisis de las características del cfDNA (con una especificidad superior al 97%) dado su evidente origen fetal, lo que lo convierte en el primer marcador de presencia de DNA fetal en plasma materno (Devaney et al., 2011). La determinación no invasiva del sexo fetal mediante la detección de secuencias del cromosoma Y es de gran utilidad en casos de enfermedades ligadas al cromosoma X como la hemofilia o la distrofia muscular

de Duchenne. De igual modo, es de utilidad en el seguimiento de embarazos afectados por algunas enfermedades endocrinas, como la hiperplasia adrenal congénita, que provoca una virilización del feto y que se trata de manera prenatal mediante la administración de esteroides en el primer trimestre de gestación. Gracias a la determinación no invasiva del sexo fetal, este tratamiento (y los inconvenientes asociados al uso de tratamientos hormonales) puede limitarse a las gestantes de fetos femeninos. También resulta útil en el seguimiento de embarazos de fetos con genitales ambiguos.

1.3.3. Determinación del grupo Rhesus D (RhD) fetal

1.3.3.1. Sistema Rhesus

El grupo sanguíneo conocido como sistema Rhesus (Rh) incluye los 5 antígenos Rhesus más importantes (C, c, D, E y e), que se sitúan en la superficie de la membrana de los eritrocitos. El RhD es el más común y suele indicarse como sufijo positivo o negativo del tipo de sangre ABO debido a su elevada inmunogenicidad, que le confiere gran relevancia clínica (por ejemplo, en transfusiones).

El grupo Rh está codificado por dos genes: RHD y RHCE, que presentan un elevado grado de homología (93,8%, sólo difieren en 36 de 417 aminoácidos) y se organizan de manera contrapuesta en 10 exones en el extremo terminal del brazo corto del cromosoma 1 (1p36.2-p34) (Fig.3).

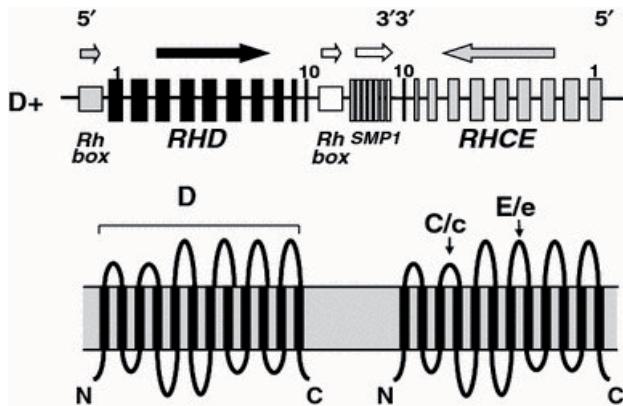


Figura 3. Genes del grupo Rh. En la parte superior, representación de los 10 exones del los genes RHD y RHCE en orientación opuesta y el gen SMP1 entre ellos (D+). En la parte inferior, representación de las proteínas de membrana a las que dan lugar, con 12 dominios intermembrana y 6 *loops* extracelulares (adaptado de Daniels, 2009).

El fenotipo RhD negativo se presenta con una frecuencia del 35% en la población caucásica, el 3-5% de la africana y es muy poco frecuente en la asiática. Este fenotipo es el resultado de la pérdida en homocigosis del gen RHD, aunque existen variantes que también dan lugar a fenotipo D-negativo y que se presentan con una frecuencia superior al 1% en determinadas poblaciones (africana mayoritariamente): el pseudogen RHD ($RHD\Psi$), que presenta mutaciones puntuales y una inserción de 37 pb en el intrón 4 que hacen que la proteína no sea funcional; y las variantes híbridas ($RHD-CE-D^S$), genes producto de reordenaciones entre los exones 1,2 y 8-10 del gen RHD y los exones 3-8 del gen RHCE, sin producción de antígeno D (Fig.4).

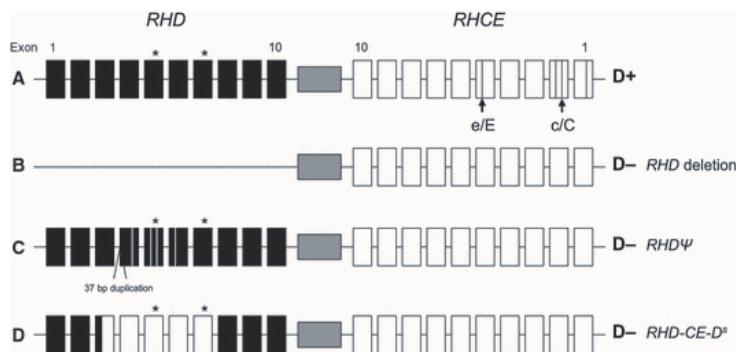


Figura 4. Diagrama de los haplotipos RH. (A) RHD normal, que da lugar al fenotipo D positivo (D+). (B) Ausencia del gen RHD, de fenotipo D negativo (D-). (C) Mutaciones (bandas blancas) presentes en el RHD Ψ , de fenotipo D-. (D) Ejemplo de gen híbrido RHD-CE-D s (Scheffer et al., 2011).

Desde su descubrimiento a principios de los noventa, se han descrito más de 200 alelos diferentes del gen RHD, dando lugar a una variabilidad fenotípica que va más allá del fenotipo positivo o negativo (fenotipo D parcial, D débil, DEL, Rh_{null} o variantes RhCE), y que son producto de mutaciones y reordenaciones de estos dos genes (Flegel, 2011).

1.3.3.2. Embarazo y RhD: Eritroblastosis fetal

La eritroblastosis fetal o enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (HDFN, *Haemolytic Disease of the fetus and the Newborn*) es una enfermedad fetal y neonatal provocada por incompatibilidad sanguínea materno-fetal que se produce en gestantes RhD negativas portadoras de fetos RhD positivos (Fig.5). La isoimunización se produce cuando existe un contacto de la sangre RhD negativa materna con sangre RhD positiva, normalmente en una gestación previa. Inicialmente, se produce la generación de IgM anti-D debido al primer

contacto. En el segundo, se producen IgG, que a diferencia de las anteriores, tienen la capacidad de atravesar la placenta, provocando la hemólisis por aglutinación de los eritrocitos fetales.

Aproximadamente en la mitad de los casos de isoinmunización la anemia fetal es leve o inexistente. Un 25% de los casos presentan anemia moderada que, aunque no tiene afectación prenatal, si no es tratada mediante una exanguino-transfusión neonatal puede resultar en kernicterus, síndrome neurológico que se produce por la acumulación de depósitos de bilirrubina en los tejidos cerebrales y sistema nervioso, y que puede provocar daño cerebral irreversible. Por último, en casos de anemia grave, puede producirse insuficiencia cardíaca y derivar en hidrops fetal, que puede evolucionar a la muerte fetal "in utero".

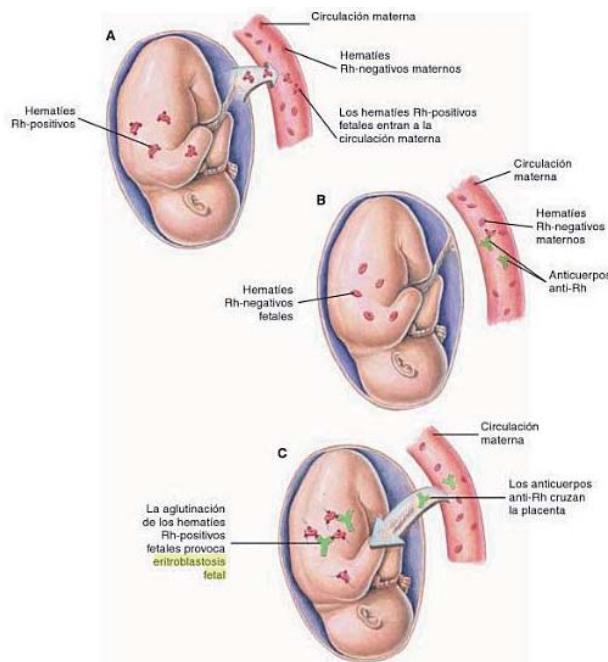


Figura 5. Enfermedad Hemolítica del Feto y recién Nacido. La isoinmunización en la gestante RhD negativa puede provocar el proceso de eritroblastosis en el feto RhD positivo (Netter. Anatomía Patológica, Estructura y Función Cuerpo Humano y Neonatología. Fisiopatología y manejo del recién nacido).

A todas las pacientes embarazadas se les determina el grupo sanguíneo, RhD y anticuerpos anti-Rh (Coombs indirecto). En las gestantes RhD negativas se determinan los anticuerpos cada trimestre (10, 24 y 34-36 semanas) para monitorizar la posible isoimunización.

La incorporación de la inmunoprofilaxis anti-D mediante la administración de gammaglobulina anti-D tras cada parto de gestantes RhD negativas con fetos RhD positivos, así como en situaciones de riesgo (aborto, amniocentesis, sangrado...) ha permitido reducir la incidencia de la enfermedad al 5% de los recién nacidos en mujeres RhD negativas de población caucásica.

Desde hace unos años, se recomienda también la administración de una dosis anti-D profiláctica a las 28-30 semanas de gestación, que ha conseguido la reducción de la incidencia de la enfermedad a cerca del 0,5% (Pilgrim et al., 2009). Sin embargo, debido a que no se conoce el fenotipo D del feto, aproximadamente un 40% de las gestantes RhD negativas (que serán portadoras de fetos RhD negativos, sin riesgo de isoimunización) reciben una terapia profiláctica innecesaria, con el riesgo asociado que comporta el uso de derivados sanguíneos obtenidos de donantes (van der Schoot et al., 2006).

1.3.3.3. Determinación no invasiva del RhD fetal

La limitación del empleo de la inmunoprofilaxis anti-D a las gestantes RhD negativas portadoras de fetos RhD positivos pasa por conocer el status RhD del feto durante la gestación. El uso de métodos invasivos (amniocentesis o biopsia corial) es una opción, pero al riesgo asociado de pérdida fetal que comportan estos métodos se añade un incremento del 17% en el riesgo de hemorragia transplacentaria (Tabor et al., 1987). La determinación no invasiva del RhD fetal

permite evitar el uso de procedimientos invasivos y aporta la información necesaria para el mejor seguimiento de este tipo de embarazos de riesgo.

El análisis de DNA fetal en plasma materno de gestantes RhD negativas se basa en la detección de secuencias RHD de origen paterno (RhD positivo), ya que en la mayoría de la población el fenotipo RhD negativo se debe a la ausencia del gen RHD. La determinación no invasiva del RhD fetal ha sido ampliamente utilizada desde que se demostró que era posible la detección de secuencias RHD en plasma materno (Lo et al., 1998a) y forma parte de la rutina clínica en diversos países europeos. En un metanálisis recientemente publicado en el que se incluyeron 44 protocolos para la determinación no invasiva del RhD fetal en plasma materno se observó una sensibilidad media del 95,4% y una especificidad del 98,6% (Geifman-Holzman et al., 2006), aunque estudios individuales más recientes han mostrado una especificidad del 95,7% (Finning et al., 2008) y del 99,8% (Minon et al., 2008).

Los resultados obtenidos en el análisis del cffDNA se utilizan como parte del seguimiento de los embarazos de gestantes RhD negativas para la administración de inmunoprofilaxis anti-D, limitándola a los casos necesarios y reduciendo así los riesgos asociados. No obstante, la diversidad genética del gen diana y la variabilidad fenotípica que ésta implica, representa un reto para el desarrollo de métodos de detección de elevada sensibilidad y especificidad que permitan reducir las tasas de falsos negativos y de resultados no concluyentes debido a la presencia de variantes que pueden implicar la administración de tratamientos innecesarios.

1.3.4. Detección de aneuploidías

1.3.4.1. Secuenciación de nueva generación (NGS)

La secuenciación de nueva generación permite realizar el recuento de moléculas de DNA, haciendo posible el análisis del DNA fetal en plasma materno para la detección de aneuploidías (*NIPT, Non Invasive Prenatal Testing*).

Con la aparición del método Sanger de secuenciación en 1977, los laboratorios pudieron disponer por primera vez de un método fiable y reproducible para la secuenciación de fragmentos de DNA (Sanger et al., 1977). Una década después, Applied Biosystems introduce los primeros modelos de secuenciadores automáticos y aparece la secuenciación mediante electroforesis capilar, que fue la base para el desarrollo del Proyecto Genoma Humano. A pesar de las mejoras y de que en su momento se consideraban instrumentos de alto rendimiento, en 2005 aparecen nuevos métodos de secuenciación y analizadores capaces de multiplicar la cantidad de datos obtenidos, pasando de 84 Kb/ensayo a 1 Gigabase (Gb)/ensayo. Es el nacimiento de lo que se conoce como "Secuenciación de nueva generación" (*Next Generation Sequencing, NGS*).

La evolución de las tecnologías para la secuenciación masiva de secuencias cortas (Massive Parallel Sequencing, MPS) ha sido constante desde la aparición de las primeras plataformas de NGS (Shendure et al., 2005; Margulies et al., 2005), con incrementos de capacidad de generación de datos de más del doble cada año. El mayor avance que implica la aparición la NGS es la capacidad para generar un enorme volumen de datos a bajo coste. Así, mientras en 2007 un ensayo de secuenciación podía generar 1 Gb de datos, en 2014 esta

capacidad se multiplica x1.000, obteniéndose hasta 1.8 Terabases de datos en un único ensayo.

El elevado número de datos obtenidos implica una gran complejidad en el manejo y almacenamiento de los mismos y ha ido acompañado del desarrollo de herramientas bioinformáticas potentes para su análisis (Pop and Salzberg, 2008). Mientras que la obtención del primer genoma humano copublicado por las revistas *Science* y *Nature* en 2001 supuso 15 años de trabajo de una amplia red internacional de laboratorios, con la tecnología disponible actualmente, es posible secuenciar 45 genomas humanos en un solo día. El incremento espectacular de los datos obtenidos ha ido acompañado de una reducción igual de significativa de los costes de este tipo de ensayos, facilitando su implementación en la rutina clínica (Stein, 2010). Este hecho expande su uso más allá de la sola determinación del orden de las bases en el DNA, permitiendo estudios de expresión génica, o estudios comparativos y de evolución a gran escala gracias a la posibilidad de secuenciar el genoma completo de numerosos organismos.

La aplicación más extendida para la NGS es la resecuenciación del genoma humano para aumentar el conocimiento de las diferencias genéticas, la asociación fenotípica de éstas y su impacto sobre la salud y la enfermedad, ya que la secuenciación masiva tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único ensayo (mutaciones puntuales, delecciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones,...). La diversidad de aplicaciones de esta tecnología facilita la coexistencia de diferentes plataformas y tecnologías de NGS (Metzker, 2010).

Las tecnologías de NGS incluyen varios métodos que se agrupan básicamente en un esquema de trabajo que consta de tres pasos: la preparación del DNA (construcción de una librería de DNA a partir de la muestra a analizar), la secuenciación y detección de dichas secuencias y el análisis de los datos

obtenidos mediante la comparación de las secuencias o lecturas obtenidas con un genoma de referencia (Fig.6).

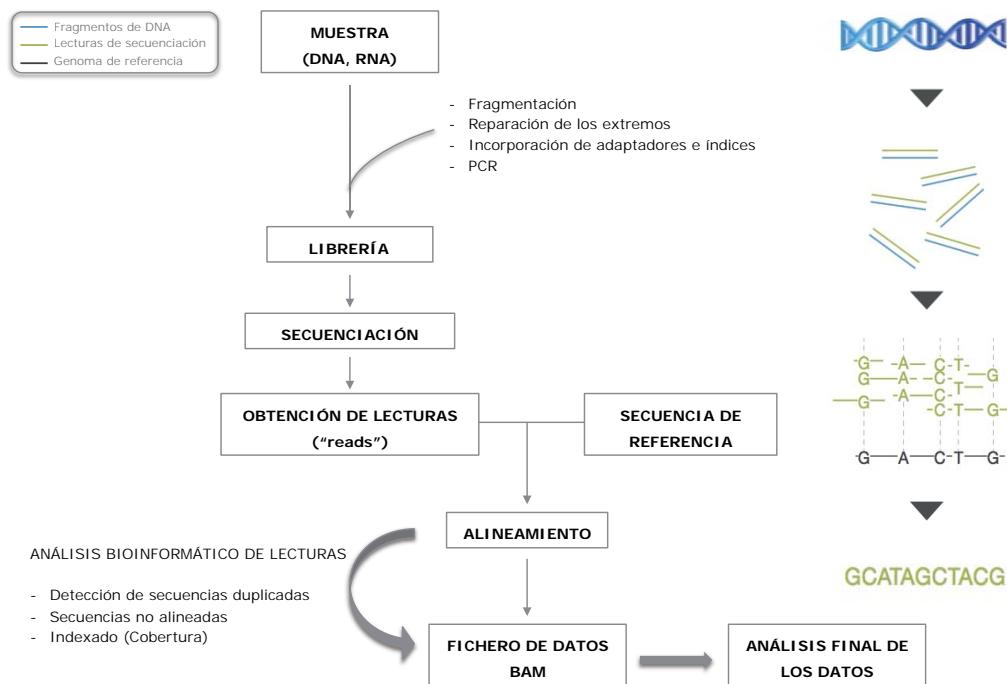


Figura 6. Esquema básico de la metodología de NGS. Librería: Preparación del DNA/RNA para la secuenciación. En la mayoría de protocolos implica la fragmentación y la incorporación de adaptadores para su adhesión en la plataforma de secuenciación. Una vez realizada la secuenciación, las lecturas obtenidas son alineadas en el genoma de estudio mediante la comparación con un genoma de referencia. El análisis bioinformático de los datos obtenidos permite el filtrado de las secuencias en base a su cantidad y calidad. La diferencia entre las plataformas disponibles radica en la combinación única de los protocolos utilizados para llevar a cabo estos tres pasos.

La preparación del DNA previa a la reacción de secuenciación es un punto crucial para la obtención de lecturas altamente representativas y con el mínimo bias posible del DNA a analizar (introducción de errores de secuencia). Existen dos métodos de obtención del DNA molde para la reacción de secuenciación masiva en paralelo: los moldes obtenidos por amplificación y clonación de diferentes moléculas de DNA y los moldes de molécula única de DNA. El primero

de los métodos es el más utilizado en aplicación clínica y la mayoría de las técnicas de NGS que permiten la detección y secuenciación de secuencias clonadas del DNA se basan en el anclaje del mismo en un soporte para su secuenciación. Existen dos tipos de estrategias para la clonación del DNA molde: la PCR por emulsión y la amplificación en superficie sólida (Fig.7).

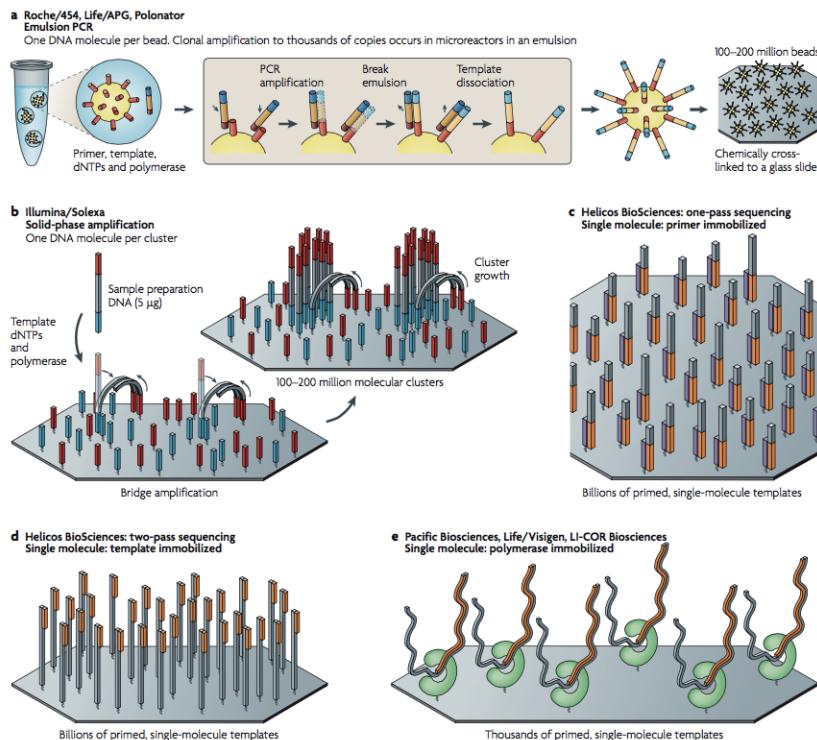


Figura 7. Estrategias de diferentes tecnologías de NGS. Se muestran dos estrategias basadas en el uso de moldes amplificados de manera clonal: por PCR por emulsión (a) o por amplificación en fase sólida (b). Otras tecnologías se basan en la inmovilización de una molécula única: mediante primer (c), la secuencia molde (d) o la polimerasa (e) (de Metzker, 2010).

Actualmente, la tecnología de NGS más ampliamente utilizada es la química de secuenciación por síntesis en fase sólida desarrollada por Illumina Inc. (*Sequencing by Synthesis*, SBS). Esta tecnología es similar a la de la secuenciación mediante electroforesis capilar. La DNA polimerasa cataliza la

incorporación de dNTPS terminadores reversibles marcados con fluorocromos durante ciclos secuenciales de síntesis de DNA. Mediante la excitación del fluorocromo específico, se identifican cada uno de los nucleótidos. La diferencia radica en que en lugar de secuenciar un único fragmento de DNA, mediante NGS esta secuenciación se extiende a millones de fragmentos que son secuenciados paralelamente sobre un soporte sólido conocido como *Flowcell*, donde tiene lugar todo el proceso.

Una vez obtenido el DNA, la metodología de secuenciación por síntesis (SBS) incluye cuatro pasos básicos: la construcción de la librería, la generación de los clusters de secuenciación, la reacción de secuenciación y el análisis bioinformático de los datos (Fig.8).

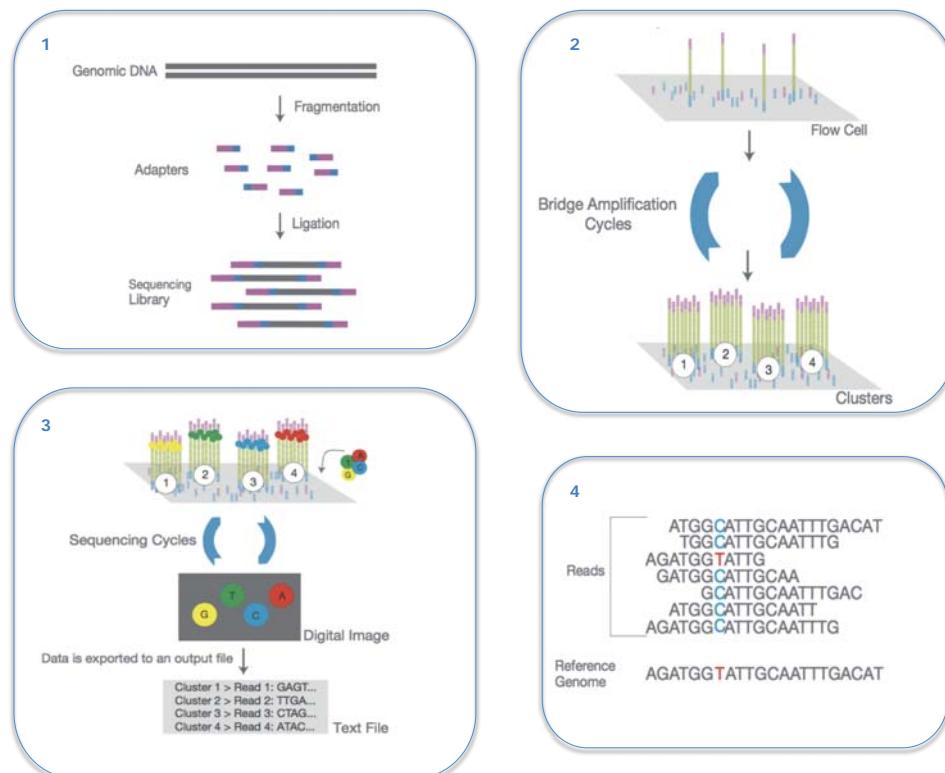


Figura 8. Esquema de funcionamiento de la secuenciación por síntesis (adaptado de Illumina Inc.).

1.- Construcción de la librería. La librería de DNA se construye a partir del DNA a secuenciar y consiste en su preparación para llevar a cabo dicha secuenciación en un soporte sólido (*Flowcell*). A partir del DNA fragmentado se reparan los extremos generados y se añade una base Adenina (A). Este tipo de extremos permite la ligación de las secuencias denominadas adaptadores en 5' y 3', que a su vez permitirán el anclaje de las moléculas de DNA a la *Flowcell*. (Fig.8.1).

2.- Generación de los *clusters*. La clonación de la librería se lleva a cabo en el analizador. La librería se carga en una *Flowcell* que contiene millones de secuencias complementarias a los adaptadores repartidas a lo largo de diversos canales o líneas, donde tendrá lugar todo el proceso. Los fragmentos de la librería quedan anclados a estas secuencias por complementariedad de bases. Mediante amplificación en fase sólida (*bridge amplification*) se clonian las moléculas de DNA, obteniéndose hasta 1.000 copias idénticas de cada molécula molde. De esta manera se generan millones de *clusters* en cada uno de los canales de la *Flowcell*, preparados para la secuenciación (Fig.8.2).

3.- Secuenciación. La tecnología utiliza 4 nucleótidos marcados con fluorescencia para secuenciar paralelamente las decenas de millones de *clusters* generados en la *Flowcell*. En cada ciclo de secuenciación, uno de los dNTPs marcados se incorpora a la cadena de nucleótidos. El fluorocromo sirve de terminador de la polimerización, y la base incorporada se detecta por emisión de fluorescencia, permitiendo la identificación del nucleótido incorporado. A continuación, el fluorocromo se elimina por reacción enzimática para permitir la incorporación del siguiente nucleótido. Este ciclo se repite "n" veces para obtener lecturas de "n" bases de longitud. Como los 4 dNTPS terminadores reversibles (A, C, T, G) son moléculas independientes, la competencia natural minimiza el bias por incorporación reduciendo la tasa de error. El resultado final es una secuenciación base a base altamente precisa (Fig.8.3).

4.- Análisis de los datos. Cada una de las lecturas obtenidas se somete a un análisis bioinformático para identificar homocigosidad y heterocigosidad, y para detectar errores de secuenciación (bias). A cada una de ellas se les asigna un valor de calidad y se alinean en base a un genoma de referencia para su posterior análisis (Fig.8.4).

1.3.4.2. Detección no invasiva de aneuploidías fetales mediante NGS

En 2008 se describe por primera vez el uso de la secuenciación masiva en paralelo (Massive Parallel Sequencing, MPS) para el análisis del cfDNA, ya que además de la secuenciación, permite la cuantificación de los fragmentos de DNA de todo el genoma presentes en la muestra. Mediante MPS es posible obtener millones de fragmentos de DNA, tanto fetales como maternos, que pueden ser asignados al cromosoma del cual provienen gracias a la disponibilidad de la secuencia completa del genoma humano (Chiu et al., 2008; Fan et al., 2008). A partir de ese momento, se desarrollan diferentes métodos de análisis para la detección no invasiva de aneuploidías fetales que son implementados en clínica a partir de 2011, aportando información muy precisa acerca del estado fetal desde las 10 semanas de gestación.

La mayoría de los ensayos desarrollados utilizan la secuenciación completa del genoma mediante MPS (*Shotgun* MPS, MPSS) para llevar a cabo la cuantificación relativa de, por ejemplo, el cromosoma 21 fetal. Esta tecnología se basa en la identificación y recuento de millones de fragmentos de DNA, tanto fetales como maternos, que son alineados en loci a lo largo de todo el genoma humano y pueden ser asignados al cromosoma de origen. En presencia de una aneuploidía fetal, se detecta un incremento en la cantidad relativa de lecturas de DNA

alineadas en el cromosoma implicado respecto a lo esperado en un feto euploide para dicho cromosoma. Las diferencias en el número de lecturas obtenidas que deben ser detectadas son muy pequeñas, debido a la baja proporción que representan las secuencias fetales respecto al total de DNA presente en la muestra. Por esta razón, es necesario obtener un elevado número de secuencias (profundidad de secuenciación elevada), que permita detectar excesos o déficits de DNA muy bajos.

La cuantificación de las lecturas en los cromosomas de interés se compara con la esperada para los cromosomas euploides de referencia secuenciados en el mismo ensayo. Para que la diferencia en el recuento de lecturas obtenidas sea estadísticamente significativa, se necesita una gran cantidad de secuencias analizables (millones de lecturas) correctamente alineadas en el genoma humano, lo que se traduce en una elevada profundidad de secuenciación y cobertura (Fig.9).

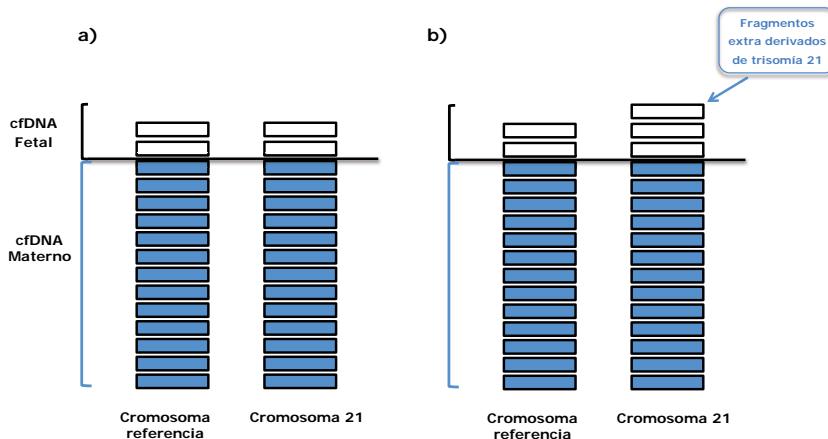


Figura 9. Detección de trisomía 21 mediante análisis de cfDNA en plasma materno. Representación de las lecturas de DNA fetal y materno obtenidas para: a) un feto euploide. b) una trisomía 21 fetal. La cantidad total de lecturas obtenidas (fetales y maternas) para este cromosoma será significativamente superior a la obtenida para el cromosoma de referencia.

El análisis puede realizarse mediante la normalización del número de lecturas obtenidas para el cromosoma de interés respecto a otros cromosomas de referencia, de contenido en GC comparable y esperados disómicos, que son analizados en el mismo ensayo (*Normalised Chromosome Values*, NCV) (Fan et al., 2008; Rava et al., 2014); o bien mediante la comparación con un set de casos euploides conocidos (Sehnert et al., 2011). Los resultados se pueden valorar mediante un valor z-Score que expresa el valor de desviación del resultado obtenido en el cromosoma de interés respecto a la situación euploide o normal (Fig.10). Los Softwares de análisis son capaces de filtrar las lecturas obtenidas, eliminando aquellas duplicadas (Chiu et al., 2008; Palomaki et al., 2011).

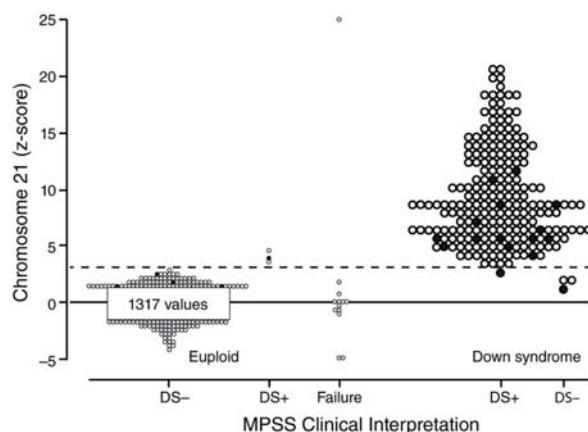


Figura 10. Interpretación de los datos obtenidos mediante MPSS correspondientes a una validación clínica de NIPT para la detección de trisomía 21. Las muestras se clasifican como positivas para trisomía 21 si en los valores de z-Score superan un valor límite preestablecido en base a casos euploides representado por la línea discontinua (Palomaki et al., 2011).

Otras aproximaciones estadísticas se basan el análisis mediante t-Students de dos hipótesis: que el resultado obtenido se deba la presencia de un feto euploide o que sea consecuencia de la presencia de un feto aneuploide y así calcular un valor estadístico o Likelihood ratio (Dan et al., 2012).

Además de la MPSS existen otras estrategias de NIPT disponibles para la detección de aneuploidías de los cromosomas 21, 18, 13, y cromosomas sexuales: la secuenciación masiva dirigida (*targeted MPS*, t-MPS); y los ensayos que aprovechan la variabilidad genética poblacional utilizando el análisis de SNPs (*Single Nucleotid Polymorphism*). El primero es similar a la MPSS pero utiliza el análisis selectivo de secuencias específicas de los cromosomas de interés mientras que el análisis de SNPs analiza las diferencias de polimorfismo entre el feto y la madre.

La secuenciación masiva dirigida utiliza sondas específicas para centenares de loci únicos en los cromosomas de interés para generar un oligonucleótido “puente” que será el DNA molde para una reacción de PCR. Los productos obtenidos son purificados y utilizados para la secuenciación y cuantificación simultánea de cientos de loci en el cromosoma de interés (DANSRTM, *Digital Analysis of Selected Regions*, Ariosa Inc.). Mediante la incorporación de la fracción fetal al algoritmo de análisis de los datos de secuenciación (no incluida en los algoritmos utilizados en los métodos de MPSS disponibles), se establece un valor de riesgo relativo para aneuploidías de los cromosomas 21, 18, 13 y cromosomas sexuales (Sparks et al. 2012).

El análisis de SNPs analiza los distintos polimorfismos entre el feto y la madre mediante la comparación del DNA de la fase celular (DNA materno) y del plasma (materno y fetal). Previamente a la secuenciación, se realiza una PCR múltiple de 20.000 secuencias SNPs y los productos se analizan bioinformáticamente en base a las hipótesis de feto con trisomía, monosomía o euploide. En función de la posición de los SNPs, y teniendo en cuenta la posibilidad de recombinación, se obtiene un valor estadístico *Likelihood* que establece un riesgo relativo de aneuploidía (Zimmermann et al., 2012).

Los laboratorios se diferencian también en el análisis bioinformático de los datos obtenidos que llevan a cabo y que permiten clasificar los resultados como positivos o de alto riesgo para las aneuploidías de los cromosomas de interés.

Debido a los costes de estas tecnologías, en la mayoría de los casos se opta por analizar un determinado número de muestras simultáneamente, añadiendo a cada una de ellas un “código de barras”, una secuencia corta de DNA que permitirá identificar las muestras y analizarlas de manera independiente. El número de muestras analizables de manera simultánea vendrá limitado por la profundidad de secuenciación requerida y el número de secuencias correspondientes a DNA fetal obtenidas dependerá de la fracción fetal presente en la muestra. Al necesitar un menor número de secuencias totales, la secuenciación dirigida permite reducir el tiempo de análisis y los costes (Cuckle et al., 2015), aunque actualmente este ensayo requiere una fracción fetal mínima necesaria del 4% (Benn et al., 2013).

Existen tres parámetros básicos para la evaluación de este tipo de ensayos: la tasa de detección (*Detection Rate*, DR, porcentaje de embarazos afectos con resultado “positivo” de *screening*), la tasa de falsos positivos (*False Positive Rate*, FPR, porcentaje de embarazos euploides con resultado de *screening* “positivo”), y el valor predictivo positivo (VPP, el riesgo de aneuploidía entre los positivos). A estos tres parámetros debe añadirse la tasa de fallos (FR) de estos ensayos, ya sea debido a la secuenciación o a la baja fracción fetal detectada. Las implicaciones para las pacientes en los casos en que las muestras no pueden ser analizadas deben ser tenidas en cuenta (Yaron, 2016).

El uso de recuentos estadísticos como el zScore o los valores cromosómicos normalizados (NCV) permite diferenciar los casos normales de los trisómicos. Aunque su sensibilidad para la detección de aneuploidías depende del número de lecturas útiles y de la profundidad de secuenciación (Fan et al., 2010; Rava et

al.,2014), la fiabilidad de estos valores aumenta de manera proporcional con el incremento de la fracción fetal (FF) en la muestra (Fig.11).

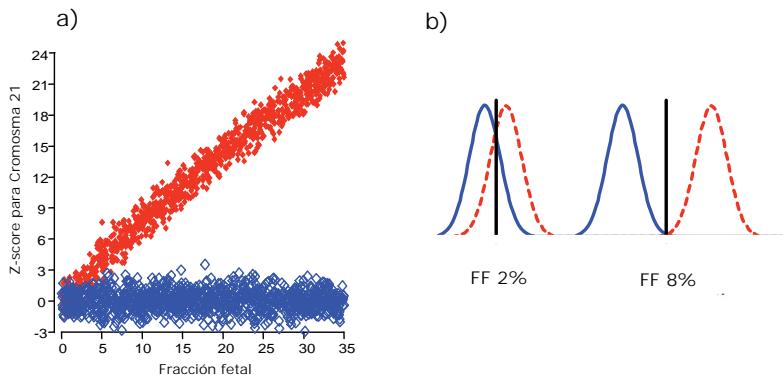


Figura 11. Representación de zScores obtenidos para el cromosoma 21 respecto a la fracción fetal (FF). En rojo, zScores positivos para trisomía 21; los resultados euploides se muestran en azul. a) Los valores de z-Score para las muestras aneuploides aumentan con el aumento de la FF. b) Con una FF mayor, el área de solapamiento (valores de zScore más próximos al valor *cut off*) de muestras euploides y trisómicas será menor (adaptada de Wright et al.,2015).

Los valores de zScore (o de NCVs) obtenidos en casos de trisomía con fracción fetal baja pueden ser similares a los obtenidos en un caso normal con una mayor fracción fetal, dificultando así su diferenciación y reduciendo la especificidad de estos algoritmos (Nygren et al.,2010; Rava et al.,2014). De manera similar, la sensibilidad puede verse reducida si la profundidad de secuenciación utilizada es insuficiente para la fracción fetal presente en la muestra (Fan et al.,2010; Benn et al.,2014). Así pues, la inclusión de la fracción fetal en los algoritmos de análisis puede incrementar su capacidad para discriminar entre los valores bajos de debidos a casos aneuploides con fracción fetal baja, de aquéllos obtenidos en muestras normales con una mayor fracción fetal, aumentando así su especificidad (Yeang et al.,2014). Los métodos de

reuento de secuencias (MPSS y t-MPS) tienen a priori una mayor eficacia si la fracción fetal es baja ya que implican una mayor profundidad de secuenciación en los cromosomas de interés, pero sólo pueden proporcionar una estimación directa de la misma en presencia de fetos de sexo masculino o aneuploides; por lo que se han desarrollado diferentes metodologías para establecer la idoneidad de la muestra y definir el límite de detección del ensayo utilizado (Nygren et al., 2010; Jensen et al., 2013; Fiorentino et al., 2016; Straver et al., 2016).

Sin embargo, los algoritmos de análisis utilizados no suelen incluir estos valores de forma directa, de manera que las muestras positivas con fracciones fetales bajas siguen planteando dificultades para ser discriminadas frente a los casos normales sin incrementar la tasa de falsos positivos (Sehnert et al., 2011; Rava et al., 2014; Yeang et al., 2014). Se han incorporado diferentes estrategias para la mejora de estas metodologías; como por ejemplo el uso de un doble *cut off* para los valores de NCV y definir una zona gris en ensayos basados en MPSS (Rava et al., 2014; Fiorentino et al., 2016). Aunque esta aproximación podría reducir la tasa de falsos positivos (FPR) al no considerar positivas las muestras situadas en la zona gris, la inclusión de los falsos positivos observados en esta zona en el cálculo de la tasa de falsos positivos ha multiplicado este valor hasta 3 veces (Taneja et al., 2016). Otros ensayos directamente excluyen del análisis aquellas muestras con una fracción fetal inferior al 4% (Sparks et al., 2012; Ashor et al., 2012; Palomaki et al., 2012; Norton et al., 2012). En este caso, a pesar de mejorar las tasas de falsos positivos y falsos negativos de estos ensayos, la exclusión de muestras basada únicamente en un *cut off* predefinido para la fracción fetal implica un incremento de la tasa de fallos de hasta el 5,9% (Hall et al., 2014).

Un avance reciente en secuenciación masiva ha sido la Secuenciación bidireccional (Paired-End MPSS), que permite secuenciar los dos extremos de los

fragmentos de DNA y alinear las lecturas Forward y Reverse como par de lecturas. Así se obtienen el doble de lecturas para la misma librería en un único ensayo, permitiendo una mayor cobertura genómica con una menor profundidad de secuenciación (Fig.12). Los algoritmos de alineamiento utilizan esta información para alinear de forma más precisa lecturas que quedan en regiones repetitivas, difíciles de secuenciar, incrementando así el número de secuencias útiles para la cuantificación. Después del alineamiento frente a la secuencia del genoma de referencia y la determinación de su localización, se puede identificar la distancia entre los extremos, y por tanto el tamaño de todos los fragmentos de DNA (Nakazato et al., 2013).

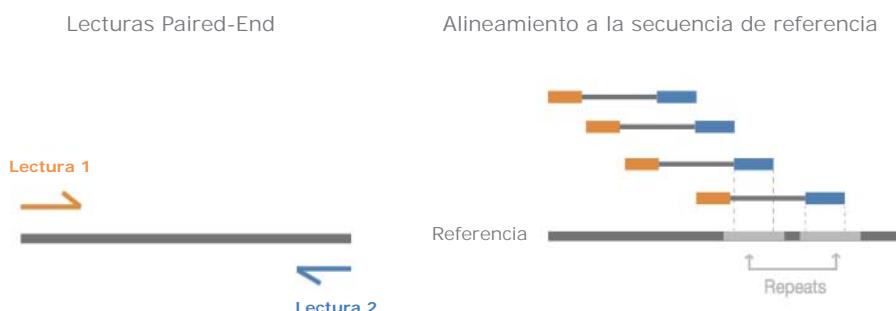


Figura 12. La secuenciación bidireccional permite secuenciar los dos extremos de los fragmentos de DNA molde, permitiendo así conocer el tamaño de cada uno de ellos.

Recientemente se ha demostrado que la distribución por tamaño de los fragmentos de DNA fetal circulante en plasma es diferente a la de los maternos, siendo los menores de 150 pb mayoritariamente de origen fetal (Lo et al., 2012) (Fig.13). Esta diferencia de tamaño permite además hacer una estimación de la proporción de DNA fetal en la muestra (Yu et al., 2014).

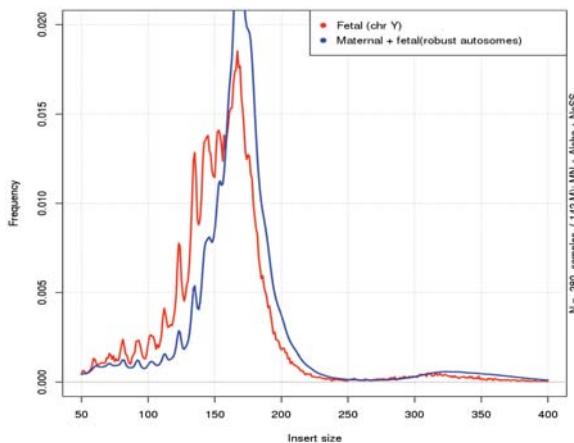


Figura 13. Distribución por tamaño de las lecturas correspondientes al DNA fetal (rojo) y total (azul) (Yu et al., 2014).

La posibilidad de discriminar fragmentos cortos de la secuenciación bidireccional permite además complementar el análisis estándar de los ensayos de MPSS enfocando la cuantificación a los fragmentos de origen mayoritariamente fetal. Así, en caso de trisomía, es lógico esperar que la diferencia en el número de secuencias en el cromosoma de interés sea mayor en la fracción de fragmentos cortos que en el DNA total (Fig. 14).

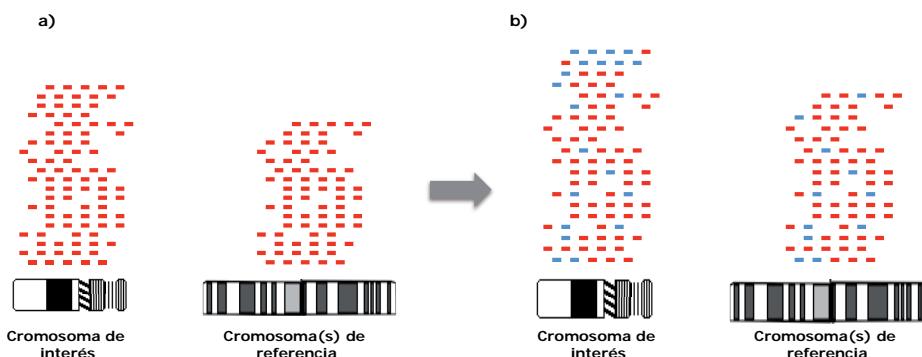


Figura 14. Metodología de análisis incorporando la distribución por tamaño.
a) Metodología estándar. Análisis estadístico para determinar si el número de lecturas totales obtenidas es mayor al esperado respecto al cromosoma de referencia; y b) nueva metodología basada en la secuenciación bidireccional. Al análisis estadístico anterior se añade el de la distribución por tamaño, se analiza si la cantidad de fragmentos cortos es mayor a la esperada. Ambos datos se evalúan conjuntamente (Illumina Inc.).

La aplicación clínica de las tecnologías de NGS para la detección de aneuploidías fetales a partir del 2011 se pone de manifiesto en numerosas publicaciones con números relativamente pequeños de muestras analizadas (Fan et al., 2010; Sehnert et al., 2011; Chiu et al., 2011; Sparks et al., 2012; Liang et al., 2013) a las que posteriormente se añaden validaciones clínicas en elevado número de muestras, tanto de gestantes de alto riesgo como de bajo riesgo (Chiu et al., 2011; Ehrlich et al., 2011; Palomaki et al., 2011; Ashoor et al., 2012; Sparks et al., 2012; Norton et al., 2012; Nicolaides et al., 2012; Song et al., 2013; Lau et al., 2014; Quezada et al., 2014; Bianchi et al., 2014; Norton et al., 2015).

No obstante, el análisis del cfDNA para la detección de aneuploidías fetales debe ser considerado como un método de cribado, no de diagnóstico, ya que no se debe olvidar que el DNA analizado es de origen mayoritariamente materno con una pequeña proporción fetal que proviene del citotrofoblasto. Por tanto, el resultado podría no reflejar el genotipo fetal real, como consecuencia por ejemplo, de mosaicismos placentarios o maternos. Se pueden dar diferentes situaciones de mosaicismo fetal como resultado de errores en las primeras divisiones mitóticas dando lugar a: un mosaicismo generalizado que afecte tanto al feto como a placenta, un mosaicismo confinado a placenta, o un mosaicismo exclusivamente fetal, sin afectación placentaria. La presencia de un mosaicismo confinado a placenta puede dar lugar a un resultado falso positivo en plasma y la presencia de un mosaicismo fetal, a un resultado falso negativo (Fig.15).

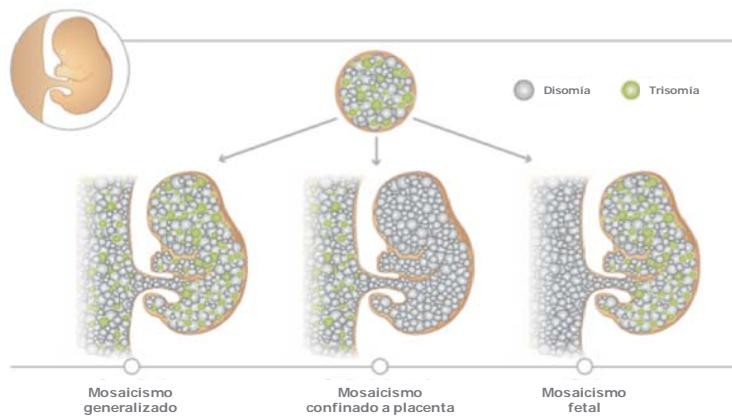


Figura 15. Tipos de mosaicismos fetales.

De manera similar, en gestaciones inicialmente gemelares con uno de los fetos no evolutivo (feto evanescente), los resultados en plasma podrían no reflejar el genotipo real debido a que ambos contribuyen a la fracción de DNA fetal en plasma (Fig.16).

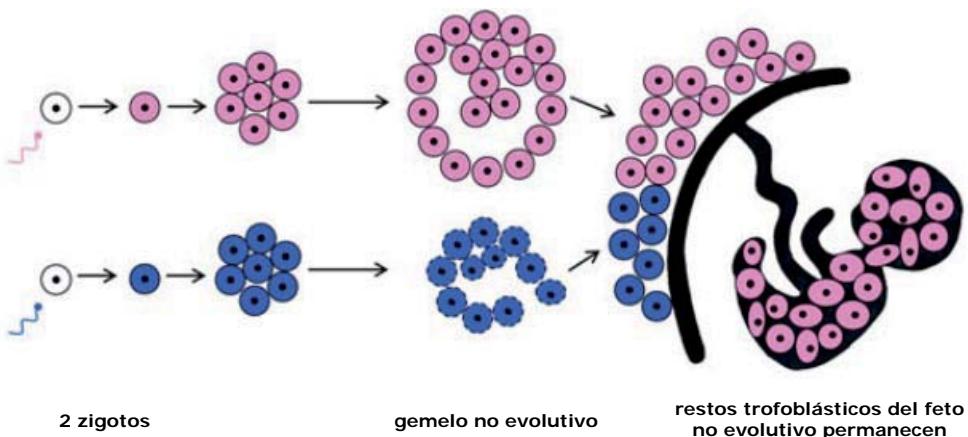


Figura 16. En gestaciones inicialmente gemelares, la contribución de DNA en plasma de un feto no evolutivo puede generar resultados que no reflejen el genotipo real (de Thurik et al.,2015).

A pesar de ello, su uso como método de cribado de aneuploidías supone un gran avance respecto a los métodos de cribado anteriores. En una reciente revisión y metanálisis incluyendo 37 estudios, Gil et al. (2015) concluyen que el *screening* mediante análisis de cfDNA para trisomía 21 es superior a todos los métodos de cribado anteriores (riesgo bioquímico, pliegue nucal...), con una tasa de detección global superior al 99% y de falsos positivos <0,1% (Fig.17). Respecto a la tasa de error, resulta bastante variable entre los diferentes estudios, con valores publicados que van desde el 0% al 12,2%. Aunque las tasas de detección del cribado bioquímico se han incrementado con la inclusión de la medida de la translucencia nucal (TN), la tasa de falsos positivos no se ha conseguido reducir por debajo del 5%, lo que implica la realización de un procedimiento invasivo para diagnóstico prenatal innecesario en 1 de cada 20 pacientes. El cribado basado en el análisis del cfDNA implica una reducción de la tasa de falsos positivos de por debajo del 0,1% (1:1000 pacientes), y por lo tanto permite reducir el número de procedimientos invasivos innecesarios hasta a 50 veces (Fig.17).

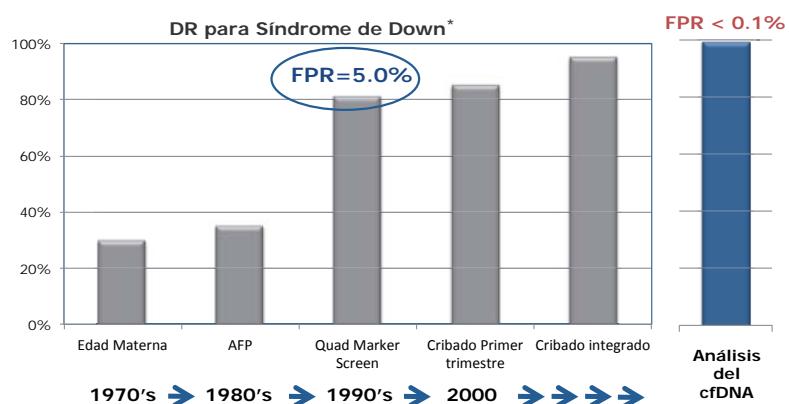


Figura 17. Evolución histórica del cribado no invasivo de Síndrome de Down (trisomía 21) (ACOG practice bulletin nº77.Obstet.Gynecol 2007).

Actualmente, el *screening* de estas aneuploidías mediante NIPT es una realidad en Estados Unidos, Europa y China, aunque los valores medios de la tasa de detección obtenidos resultan algo menores para las trisomías 13 y 18, con una mayor tasa de falsos positivos, y el análisis de las aneuploidías de los cromosomas sexuales presenta cierta controversia.

Recientemente se ha extendido el uso de estas tecnologías para la detección de otras aneuploidías, como la trisomía 9 o la 16, así como para la detección de alteraciones subcromosómicas en el feto, como la delección 22q11.2 o Síndrome de DiGeorge; microdelecciones de la región 15q11 (asociadas a los Síndromes de Prader-Willi y Angelman), microdelección 1p36 o Síndrome de Deleción 1p36, microdelección 4p- o Síndrome de Wolf-Hirschhorn, microdelección 5p- o Síndrome de Cri-du-chat (Srinivasan et al., 2013). No obstante, la falta de datos de validación, las elevadas tasas de falsos positivos y el bajo valor predictivo positivo observado hacen que su inclusión siga siendo causa de controversia.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La hipótesis de la presente tesis doctoral se basa en que las técnicas de biología molecular aparecidas en los últimos años permiten desarrollar nuevos métodos para el análisis del DNA fetal libre en plasma materno con elevada especificidad y sensibilidad para su uso en el Diagnóstico Prenatal no Invasivo y su implementación, como rutina, en el laboratorio clínico. Así mismo, es posible introducir métodos de cribado no invasivo de aneuploidías fetales en plasma materno. En ambos casos, la aplicación de estas metodologías permitirá reducir el número de procedimientos invasivos innecesarios llevados a cabo para realizar Diagnóstico Prenatal y mejorar el seguimiento de gestaciones de riesgo.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el desarrollo de nuevos métodos y protocolos que, mediante el análisis del DNA libre en plasma materno, permitan la determinación no invasiva del sexo y del grupo RhD fetales para su aplicación en el diagnóstico clínico en gestantes de riesgo, así como la detección de aneuploidías.

Para ello, los objetivos concretos a abordar han sido:

1. Establecer los protocolos preanalíticos más eficientes para:
 - 1.1. La conservación, el procesamiento y la obtención de plasma a partir de sangre periférica de gestantes.

Hipótesis y objetivos

- 1.2. La extracción de DNA en función de diferentes parámetros así como su automatización.
2. Establecer metodologías que permitan alcanzar los niveles de especificidad y sensibilidad necesarios para la determinación del sexo y del grupo RhD fetales a partir del DNA fetal libre en plasma materno.
 - 2.1. Metodología de PCR a tiempo real para la determinación del sexo fetal.
 - 2.2. Metodología de PCR a tiempo real para la determinación simultánea del sexo y del grupo RhD fetales.
3. Validar un nuevo método de análisis del cfDNA para la detección de aneuploidías fetales en plasma materno mediante secuenciación masiva bidireccional.
4. Aplicar los protocolos y métodos desarrollados en el diagnóstico clínico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

A lo largo de este estudio se han analizado un total de 6.502 muestras biológicas de mujeres embarazadas obtenidas en diferentes edades gestacionales con la siguiente distribución:

- Para el estudio de evaluación de la estabilidad de la muestra, automatización de la extracción de DNA y validación del protocolo de PCR a tiempo real de determinación del sexo fetal se han seleccionado 212 muestras pertenecientes a gestantes de primer trimestre (11 a 14 semanas de gestación; media=12 semanas) a las que previamente se les realizó biopsia corial para diagnóstico prenatal.
- Para la validación de los protocolos de determinación no invasiva del RhD fetal se han empleado 218 muestras de genotipo RHD fetal conocido, procedentes de gestantes RhD negativas y recogidas en las semanas 13 a 28 de gestación (media=22).
- Para la validación del nuevo test de detección de aneuploidías fetales se ha realizado un estudio retrospectivo en 1.709 muestras de plasma pertenecientes a embarazadas en el primer trimestre de gestación.
- La aplicación clínica, tras la validación de los protocolos, se ha llevado a cabo en 1.251 muestras para la determinación no invasiva del sexo fetal (6 a 34 semanas de gestación; media=11 semanas) y 284 muestras en segundo

trimestre de gestación (24-26 semanas) para la determinación no invasiva del RhD fetal. Hasta febrero de 2016, el test de secuenciación masiva bidireccional (NeoBona) se ha utilizado como método de *screening* de aneuploidías en un total de 2.828 muestras consecutivas de sangre periférica de mujeres embarazadas a partir de la 10^a semana de gestación (10 a 28 semanas de gestación; media=13 semanas).

3.1.1. Obtención del plasma

Para la determinación no invasiva del sexo y RhD fetales, los plasmas analizados se han obtenido a partir de un volumen de 3-6 mL de sangre periférica de mujeres embarazadas recogida en EDTA-K, de acuerdo con el protocolo estándar de separación de plasma por centrifugación a 3.000 r.p.m durante 10 minutos y en las 24 horas posteriores a la extracción (Chiu et al., 2001). La fracción plasmática obtenida se traspasa a tubos de 1,5 mL sin alterar la capa leucocitaria o "buffy coat" para evitar así la posible lisis celular y la liberación de DNA materno.

Con el fin de establecer las condiciones idóneas para eliminar al máximo los posibles restos celulares e inhibidores de la PCR presentes en el plasma recién obtenido, se procede a una segunda centrifugación. Las condiciones adecuadas de ésta se han establecido mediante el análisis de cuatro plasmas control obtenidos de una gestante portadora de un feto de sexo masculino. Se han realizado dos ensayos de centrifugación en paralelo y por duplicado para la detección y cuantificación absoluta del gen SRY: en el primero la centrifugación ha llevado a cabo a 1.200 g. durante 10 minutos, mientras que en el segundo la velocidad ha sido 12.500 g. y en centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante

recuperado se traspasa a microtubos de 2 mL debidamente identificados para, a continuación, proceder a la extracción de DNA o a su almacenamiento. Se han almacenado un mínimo de dos alícuotas de 1-2 mL de plasma de todas las muestras analizadas a lo largo del estudio a -20°C hasta su procesado.

Para la detección de aneuploidías (NIPT) las muestras se recogen en tubos Streck BCT (10 mL) que son enviados al laboratorio a temperatura ambiente, juntamente con el consentimiento informado de la paciente y bajo prescripción médica. Estos tubos aseguran la estabilidad del DNA fetal durante 5 días sin necesidad de centrifugar para separar el plasma. Cuando la muestra llega al laboratorio; se procede a la centrifugación para la separación del plasma a 1.600g durante 10 minutos en centrífuga refrigerada a 4°C y se almacenan en el contenedor original (ya que mantiene separado el plasma de la fase celular) a 4°C hasta su análisis. En estas condiciones, el cfDNA se mantiene estable otros 7 días.

3.2. Determinación del sexo y RhD fetales

3.2.1. Extracción de cfDNA

El método de referencia seleccionado para la extracción de DNA ha sido el QIAamp DSP Virus Kit (Qiagen Inc.), siguiendo el protocolo de purificación consensuado por la SAFE NoE (Special non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network. Legler et al., 2007) con pequeñas modificaciones, y que se detalla a continuación:

1. Equilibrar reactivos y muestras a temperatura ambiente (15–25°C) y el volumen necesario de agua destilada y estéril a 56°C en el bloque térmico hasta el momento de su utilización.

2. Pipetear 100 µL proteasa previamente reconstituida en un tubo de lisis debidamente identificado.
3. Añadir 500 µL de plasma.
4. Añadir 500 µL de tampón de lisis (AL) y agitar durante 15 segundos hasta obtener una solución homogénea.
5. Incubar a 56°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 20 minutos (± 1 minuto).
6. Centrifugar 5 segundos a máxima velocidad (>16.000 g.) para eliminar posibles gotas acumuladas en el tapón.
7. Añadir 500 µL de etanol (96–100%) y agitar 15 segundos.
8. Incubar 10 minutos (± 1 minutos) a temperatura ambiente (15–25°C).
9. Centrifugar 5 segundos a máxima velocidad (>16.000 g.) para eliminar posibles gotas acumuladas en el tapón.
10. Transferir 600µL de la solución al centro de la columna colocada en un tubo de recogida (QIAamp MinElute Column) debidamente identificadas y sin tocar la membrana. Centrifugar 1 minuto a 6.000 g. y colocar la columna en un nuevo tubo de recogida, descartando el tubo que contiene el filtrado.
11. Repetir el paso anterior dos veces más (hasta pasar toda la solución por la columna) y colocar la columna en un nuevo tubo de recogida.
12. Añadir 500 µL de tampón de lavado AW1 sin tocar la membrana y centrifugar 1 minuto a 6.000 g. y colocar la columna en un nuevo tubo de recogida, descartando el tubo que contiene el filtrado.
13. Añadir 500 µL de tampón de lavado AW2 sin tocar la membrana y centrifugar 3 minutos a 12.500 g. y colocar la columna en un nuevo tubo de recogida, descartando el tubo que contiene el filtrado.
14. Añadir 750 µL de etanol (96-100%) sin tocar la membrana, centrifugar 3 minutos a 12.500 g.

15. Colocar la columna en un nuevo tubo de recogida, descartando el tubo que contiene el filtrado. Centrifugar a 12.500 g. 1 minuto, para eliminar posibles restos de etanol, que podrían inhibir el ensayo.
16. Colocar la columna en un nuevo tubo de recogida, descartando el tubo que contiene el filtrado e incubar con el tapón de la columna abierto durante 5 minutos a 56°C, para evaporar el líquido restante.
17. Colocar la columna en el tubo de elución debidamente identificado y descartar el tubo de recogida anterior. Añadir 55 µL de agua destilada estéril, previamente equilibrada a 56°C en el centro de la membrana (sin tocarla) e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
18. Centrifugar a 6.000 g. durante 1 minuto.
19. Incubar los tubos (con la columna) a 56°C durante 5 minutos.
20. Volver a pasar por la columna el eluido obtenido y centrifugar 1 minuto a 6.000 g.
21. Descartar las columnas y proceder al análisis o almacenamiento a -20°C de las alícuotas de DNA obtenidas.

3.2.1.1. Extracción automática de cfDNA

La posibilidad de automatización de las extracciones de DNA se ha evaluado mediante la comparación del método automático de extracción basado en el uso de bolas magnéticas seleccionado (*Total Nucleic Isolation Kit* para COBAS AmpliPrep® DNA/RNA extracto; Jungkind,2001) con el método manual descrito en el apartado anterior (QIAamp DSP Virus Kit) (Fig.18).

Para ello, se obtuvo sangre periférica (3-6 mL) de un total de 426 mujeres embarazadas entre la 11^a-14^a semana de gestación (media: 12) en los instantes previos a la realización de un procedimiento invasivo de diagnóstico prenatal

(biopsia corial). Ambas muestras (sangre periférica y vellosidades coriales) se conservaron a 4°C hasta su envío al laboratorio y la separación del plasma se realizó pasadas un mínimo de 24 horas desde la extracción. Los plasmas obtenidos (2 mL aprox.), se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento para la extracción de DNA. Previamente al análisis de este DNA, se llevó a cabo el análisis mediante QF-PCR para la detección de aneuploidías de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y en las muestras de vellosidades coriales.

Se ha seleccionado un total de cincuenta muestras de plasma correspondientes a mujeres portadoras de fetos de sexo masculino que se han procesado paralelamente con ambos métodos. El protocolo de extracción automática se ha modificado para partir de 850 µL de plasma obteniéndose un volumen final de DNA de 75 µL; mientras que en el método manual los volúmenes han sido de 500 µL y 50 µL, respectivamente. En ambos casos los DNAs obtenidos se han almacenado a -20°C hasta su análisis para la detección y cuantificación absoluta del gen SRY.

A continuación se ha validado la metodología para la determinación no invasiva del sexo fetal mediante la detección y cuantificación del gen SRY por PCR a tiempo real a partir de DNA extraído utilizando el método automático; y se ha evaluado la estabilidad de la muestra de sangre sin procesar durante períodos superiores a 24 horas. Para ello, se han seleccionado 58 plasmas correspondientes a mujeres portadoras de fetos de sexo masculino y 50 plasmas procedentes de mujeres portadoras de fetos femeninos (controles negativos). Todas las muestras se han procesado utilizando el COBAS AmpliPrep® DNA/RNA extractor y, al igual que en el caso anterior, los DNAs obtenidos se han almacenado a -20°C hasta su análisis.

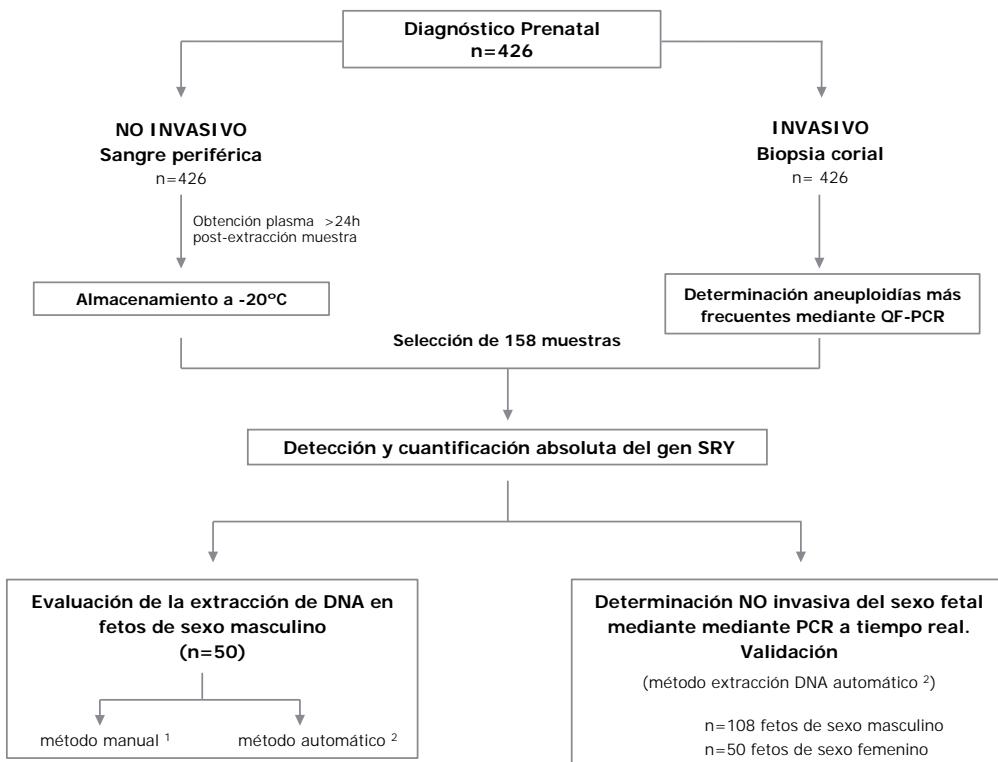


Figura 18. Esquema donde se muestra el diseño experimental utilizado.

¹ Método de extracción de DNA manual: QIAamp DSP Virus Kit (Legler et al., 2007).

² Método de extracción automática: *Total Nucleic Isolation Kit COBAS AmpliPrep® DNA/RNA extractor* (ROCHE).

Todos los DNAs han sido analizados por duplicado para la detección y cuantificación absoluta del gen SRY por PCR a tiempo Real.

3.2.2. Análisis del cfDNA

3.2.2.1. PCR a Tiempo Real: Principios del ensayo

El método elegido para el análisis del DNA fetal libre en plasma materno ha sido la PCR a Tiempo Real (Real-Time PCR, rt-PCR) ya que permite la detección ciclo a ciclo de productos de PCR. La combinación de termociclaje y detección de fluorescencia junto con la aplicación de programas específicos posibilita la detección y cuantificación de secuencias de ácidos nucleicos.

Para analizar las muestras se ha empleado el método TaqMan de PCR a Tiempo Real ya que esta técnica proporciona la especificidad y sensibilidad necesarias para el análisis del cfDNA, gracias al uso de sondas específicas marcadas con fluorocromos. Además, al ser posible procesar un elevado número de muestras simultáneamente (hasta 96) sin manipulación de productos amplificados, se reduce el riesgo de contaminación cruzada.

El ensayo Taqman es una modificación de la PCR convencional que se basa en la capacidad 5' exonucleasa de la Taq DNA polimerasa y en el uso de una sonda marcada con fluorescencia cuya secuencia complementaria (o diana) se sitúa dentro de la región a analizar. Esta sonda tiene ligados a sus extremos 5' y 3' dos fluorocromos, conocidos como *reporter* y *quencher* respectivamente (Fig.19). Cuando la sonda está intacta, hibridada o no a su secuencia diana, el *reporter* no emite energía (la absorbe el *quencher*). En la fase de *annealing*, la sonda se une a la secuencia diana (se diseña una sonda interna a la secuencia delimitada por los *primers*). Durante la fase de extensión, en el momento en que la Taq DNA polimerasa se sitúa en la región donde está unida la sonda, su actividad exonucleasa la hidroliza y libera el *reporter*, que emitirá fluorescencia, mientras la extensión continua.

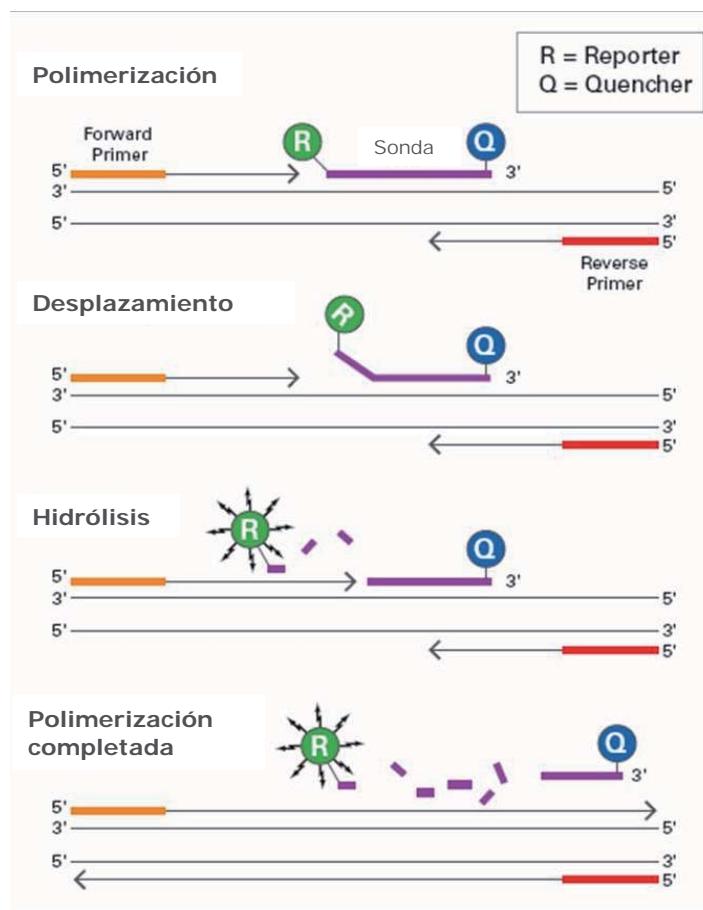


Figura 19. Esquema del funcionamiento de la PCR TaqMan a Tiempo Real (de Applied Biosystems).

La fluorescencia emitida se detecta mediante una cámara CCD y la señal aumenta en relación a la cantidad de producto. El sistema puede detectar hasta cuatro fluorocromos diferentes permitiendo el diseño de ensayos para la detección de más de una secuencia simultáneamente (PCR múltiple). El uso combinado de *primers* y sondas específicos incrementa la especificidad del ensayo, y la incorporación de fluorocromos aumenta la sensibilidad de detección.

La cuantificación absoluta permite determinar la cantidad de secuencia diana presente en una muestra problema. En la fase exponencial de la amplificación por PCR, la cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de producto obtenido y por tanto a la cantidad inicial de DNA molde; de manera que es posible implementar la cantidad de DNA presente en la muestra. Para realizar este cálculo es necesario establecer el *threshold*, nivel de fluorescencia entre el ruido de fondo y la fluorescencia debida a amplificación. El primer ciclo de PCR en el que se detecta fluorescencia por encima del ruido de fondo (es decir, como resultado de la amplificación) se denomina Ciclo *threshold* (C_t). Es el momento en el que empieza a detectarse producto de amplificación y en el que la cuantificación es más exacta, ya que es el primer ciclo de la fase exponencial (Fig.20).

Para realizar una cuantificación absoluta por PCR a tiempo real es necesario obtener una recta patrón a partir de los C_t s obtenidos para controles de concentraciones de DNA conocidas. Se puede determinar la cantidad de DNA presente en las muestras problema por comparación de los C_t s obtenidos en ellas con esta recta patrón (Fig.20a). La recta estándar se genera amplificando un mínimo de cuatro muestras a diferentes diluciones en un mínimo de tres réplicas. Se considera que la recta es correcta y reproducible cuando las tres réplicas presentan C_t s idénticos y la diferencia de ciclos entre las diluciones se mantiene constante. La eficiencia de la reacción de PCR viene definida por la pendiente de la recta estándar. Cuando ésta es igual a la diferencia de ciclos entre los C_t s de los estándares de dilución 1/10, el ensayo se considera 100% eficiente (Fig.20b).

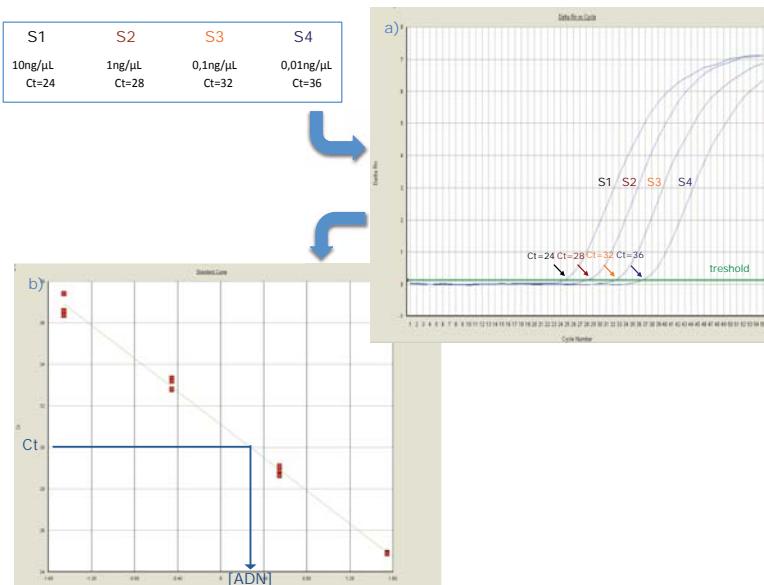


Figura 20. Resultados de la PCR a Tiempo Real para la detección del gen SRY. a) Curvas de amplificación de los 4 estándares de dilución utilizados (S1, S2, S3 y S4). También se indican los Cts obtenidos. b) Recta estándar generada a partir de las curvas anteriores. La pendiente es igual a la diferencia de ciclos entre los Cts de las diluciones. A partir del Ct obtenido en una muestra problema se puede establecer la cantidad de DNA presente.

Para el análisis del cfDNA se ha optado por el uso de la 2x TaqMan Gene Expression Master Mix de Applied Biosystems (GE Master Mix), desarrollada para ensayos de PCR a tiempo real multiplex y que incorpora Uracil-N-glicosilasa o Amperasa, para reducir el riesgo de contaminaciones debidas a productos de amplificaciones previas. El elevado número de ciclos de PCR y la gran sensibilidad de esta técnica implica un peligro potencial de contaminación por la presencia de productos amplificados en ensayos anteriores, que podrían dar lugar a falsos positivos. Durante la PCR se incorporan nucleótidos que contienen uracilo (dUTP) en lugar de timina (dTTP). La Amperasa reconoce los dUTPs y los hidroliza, destruyendo las secuencias que contienen uracilo, de manera que si hay algún producto amplificado anterior será eliminado antes de empezar la amplificación y no interferirá en el ensayo.

Las concentraciones de los *primers* y sondas seleccionados y diseñados se han ajustado para utilizar las mismas condiciones de PCR en cada ensayo. Todas las PCRs a Tiempo Real se han llevado a cabo en un volumen final de 25 μ L utilizando 12,5 μ L de Gene Expression Master Mix (GE Master Mix) y 9 μ L de DNA extraído.

Las condiciones de PCR para los protocolos desarrollados, Figura 20, han sido:

1. 2 minutos a 50°C para permitir la actividad de la Amperasa.
2. 10 minutos a 95°C (activación de la AmpliTaq Gold DNA polimerasa).
3. 50 ciclos de PCR a 2 temperaturas:

- 50x** 
- 15 segundos a 95°C (desnaturalización).
 - 1 minuto a 60°C (*annealing* y extensión). En esta fase se realiza la detección.

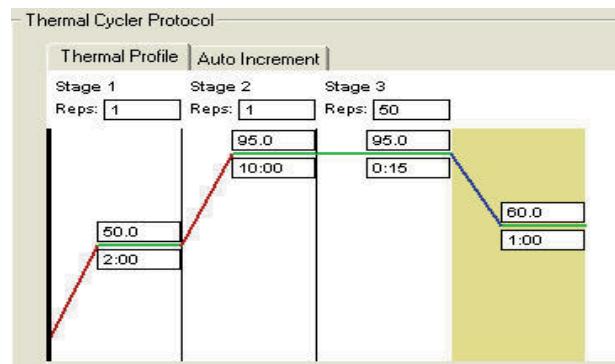


Figura 20. Esquema del protocolo de PCR Taqman (de 7300 Real-Time PCR System).

Los ensayos de PCR se han llevado a cabo en el 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Una vez finalizados los 50 ciclos de amplificación, los resultados se analizan mediante el programa SDS Software v1.2.1, que permite establecer el *threshold* del ensayo. Se consideran muestras positivas para la detección de la secuencia diana aquéllas en las cuales se detecta amplificación por encima de dicho *threshold*.

3.2.2.2. Determinación del sexo fetal

La cuantificación absoluta de la secuencia SRY se ha utilizado para establecer y evaluar la eficiencia de los protocolos de procesamiento de las muestras de sangre periférica y la extracción de DNA; y para definir los límites de sensibilidad y detección de los ensayos de PCR desarrollados.

Se ha diseñado un protocolo para la detección de una secuencia del gen SRY, situado en el cromosoma Y (Yp11.3). Los *primers* (SRYF, SRYR) y la sonda TAMRA (SRYP) utilizados son los descritos por Zhong et al. (2001), utilizando 6-Fam como fluorocromo *reporter*.

SRY-F (*forward*): 5' TCC TCA AAA GAA ACC GTG CAT 3'

SRY-R (*reverse*): 5' AGA TTA ATG GTT GCT AAG GAC TGG AT 3'

SRY-P: 5'(FAM) CAC CAG CAG TAA CTC CCC ACA ACC TCT TT (TAMRA) 3'

La concentración final de los *primers* y la sonda específicos para la secuencia SRY han sido de 800 nM y 240 nM, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de PCR a Tiempo Real para la determinación del sexo fetal.

Detección de SRY		
	Concentración	Reacción de PCR (x1)
SRYF	100 pmol/µL	0,2 µL
SRYR	100 pmol/µL	0,2 µL
SRYP	12 pmol/µL	0,5 µL
GE Master Mix	-	12,5 µL
Agua estéril	-	2,6 µL
DNA	-	9 µL
Vol. final		25 µL

La validación del ensayo se ha llevado a cabo en 158 muestras procedentes de gestantes de primer trimestre a las que se realizó biopsia corial para Diagnóstico Prenatal y durante este estudio se han recibido un total de 1.251 muestras clínicas para la determinación no invasiva del sexo fetal, en las semanas 6 a 34 de gestación (media: 11). La separación del plasma se ha llevado a cabo a partir de un mínimo de 6 mL de sangre periférica recogida en tubos de EDTA-K y se ha realizado en las 24 horas posteriores a la extracción. Se han almacenado un mínimo de dos alícuotas de 1-2 mL de plasma a -20°C hasta su procesamiento y la extracción de DNA se ha realizado mediante el extractor COBAS AmpliPrep.

Las muestras han sido analizadas por triplicado y en todos los ensayos se han incluido tres controles (SRY positivo, SRY negativo y control negativo de PCR). Se han considerado positivas para la detección de SRY, y por tanto pertenecientes a gestantes de fetos de sexo masculino, siempre que al menos dos de las réplicas hayan sido positivas para la amplificación de la secuencia. Aquellas en las que no se ha detectado amplificación en ninguna de las réplicas se han considerado como pertenecientes a gestantes de fetos de sexo femenino. En estos casos, se ha procedido a la confirmación en una segunda extracción de DNA procedente de la segunda alícuota de plasma almacenada. Los dos DNAs obtenidos para dichas muestras se han analizado por duplicado para la detección simultánea de los genes RHD (exón 10) y SRY. La detección de RHD confirma la presencia de DNA en la muestra, fetal en el caso de gestantes RhD negativas, y total en gestantes RhD positivas (control de extracción). La falta de amplificación del gen SRY descarta la presencia de un feto de sexo masculino, siendo por tanto compatible con la presencia de un feto de sexo femenino. En los casos de gestantes RhD negativas se ha utilizado la detección de una secuencia del gen de

la β -actina para confirmar la eficiencia de la extracción de DNA total y la ausencia de inhibidores de la PCR (Fig.22).

En las muestras con un $Ct \geq 42$ y las positivas para la amplificación de la secuencia en sólo una de las réplicas, no concluyentes, se ha procedido a la repetición del análisis en nueva extracción de DNA. En los casos en los que no ha sido posible obtener un resultado concluyente a pesar de analizar dos extracciones de DNA diferentes, se ha solicitado una segunda muestra de sangre de las pacientes.

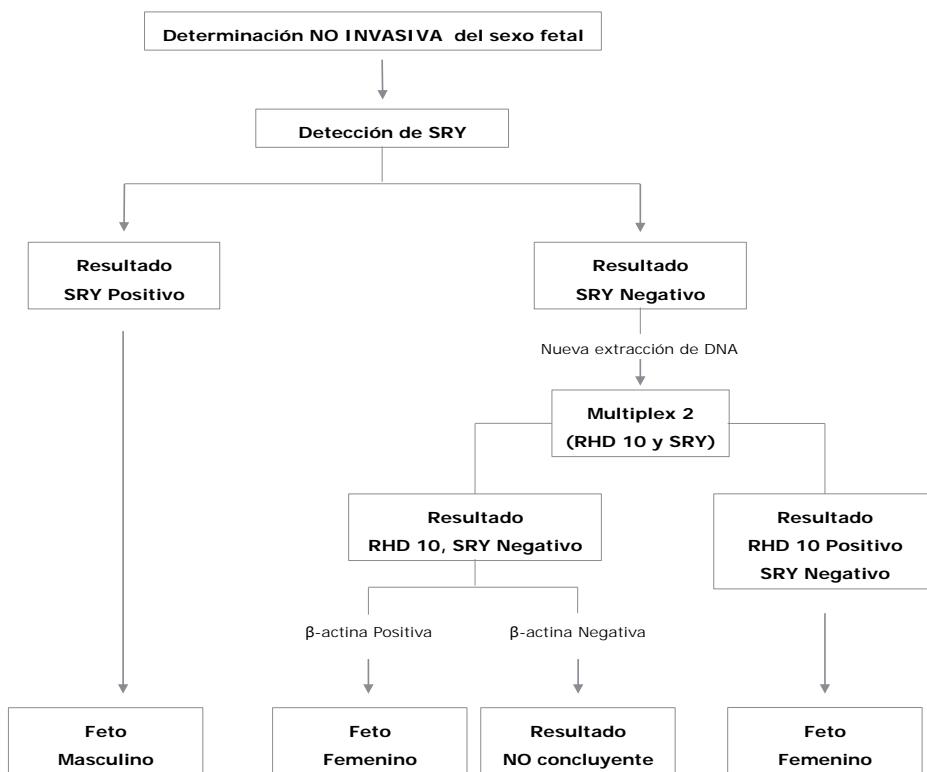


Figura 22. Esquema de la metodología utilizada para la determinación no invasiva del sexo fetal.

3.2.2.3. Determinación del RhD fetal

Durante este estudio se han analizado un total de 502 muestras para la determinación no invasiva del RhD fetal, procedentes de mujeres RhD negativas en las semanas 13^a a 28^a de gestación (media=22). El protocolo de determinación del grupo RhD fetal mediante PCR a tiempo real multiplex se ha evaluado utilizando 60 muestras de genotipo RHD fetal conocido obtenidas de gestantes isoinmunizadas RhD negativas previamente a la realización de procedimientos invasivos (amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales), y se ha validado analizando 158 muestras clínicas de manera prospectiva. A continuación, se ha determinado el grupo RhD fetal en 284 muestras clínicas.

Los plasmas se han obtenido mediante separación por doble centrifugación en las 24 horas posteriores a la extracción a partir de un mínimo de 6 mL de sangre periférica, siendo almacenados a -20°C hasta dos años. La extracción de DNA se ha realizado utilizando el extractor COBAS AmpliPrep, y los DNAs obtenidos han sido almacenados a -20°C hasta su análisis.

Para el análisis de las muestras se han utilizado cuatro protocolos para la detección: de los exones 5 y 7 del gen RHD y la secuencia multicopia DYS14 (Multiplex 1), del exón 10 del gen RHD y el gen SRY (Multiplex 2), del exón 6 del gen RHD y por último del gen de la β-actina.

Se ha diseñado un ensayo multiplex que permite la detección de tres secuencias simultáneamente (Multiplex 1) mediante el uso de *primers* y sondas para la detección de los exones 5 y 7 del gen RHD y la secuencia multicopia DYS14 (con 9 repeticiones) localizada en el gen TSPY (Yp11.2), que sirve como marcador de presencia de DNA fetal.

Los *primers* y sondas para la detección de la secuencia diana del exón 7 del gen RHD se han obtenido mediante el software *Primer Express* de Applied

Biosystems. A partir de la secuencia diana que queremos amplificar, el programa genera una lista de posibles juegos de oligonucleótidos. De igual modo, permite estudiar la idoneidad de los oligonucleótidos diseñados o seleccionados por el usuario para el ensayo; aportando la información necesaria para la optimización de la PCR (temperatura *melting*, estructuras secundarias, diseño de sondas...) (Fig.23).

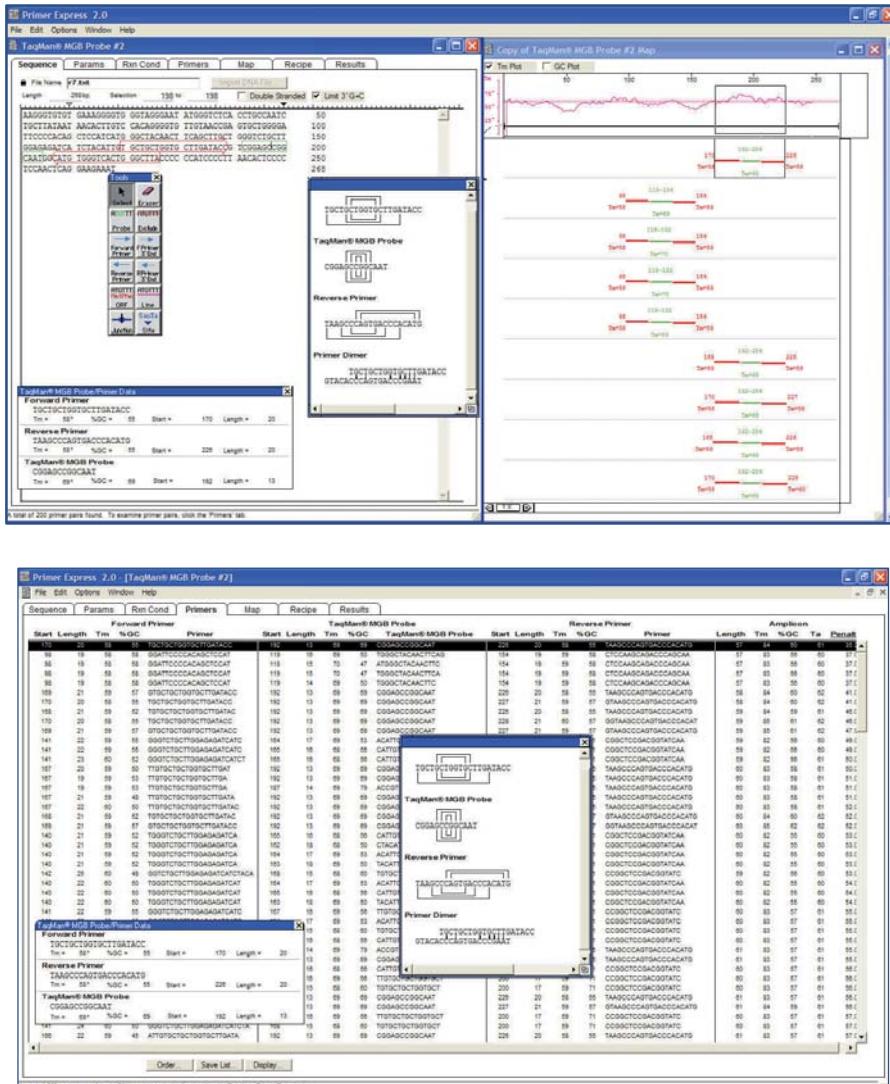


Figura 23. Diseño de los *primers* y sondas para la detección del exón 7 del gen RHD mediante el programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems).

En este caso, y al tratarse de una PCR multiplex para tres secuencias se ha optado por el diseño de sondas MGB, *quencher* que permite obtener productos amplificados más cortos, además de la incorporación de un tercer fluorocromo, NED, incompatible con el *quencher* TAMRA, ya que emiten en la misma longitud de onda.

Los *primers* y sondas utilizados para la detección del exón 5 del RHD se han adaptado de Finning et al. (2002) para su uso en un ensayo multiplex, ya que permiten la detección de la presencia de dos de las variantes más comunes del gen RHD: el pseudogen (RHD Ψ) y algunas variantes híbridas (RHD-CE-D S). Existen 3 mutaciones puntuales presentes en el exón 5 del RHD Ψ : 609G>A, 654G>C y 667T>G, además de una inserción de 37 bp en el intrón 4; manteniéndose intactos los exones 7 y 10 de dicho gen. El uso de un primer (r5F) cuya base en el extremo 3' está implicada en la mutación 654G>C y una sonda (r5P) donde se encuentra otra de estas mutaciones (667T>G) hace que, en presencia de esta variable, la DNA polimerasa no reconozca el extremo 3' y no haya amplificación, de manera que en el ensayo multiplex no se detecta amplificación de la secuencia del exón 5 del gen RHD, pero sí de la secuencia diana del exón 7 (Fig.23) (Ordoñez et al., 2013; Grande et al., 2013).

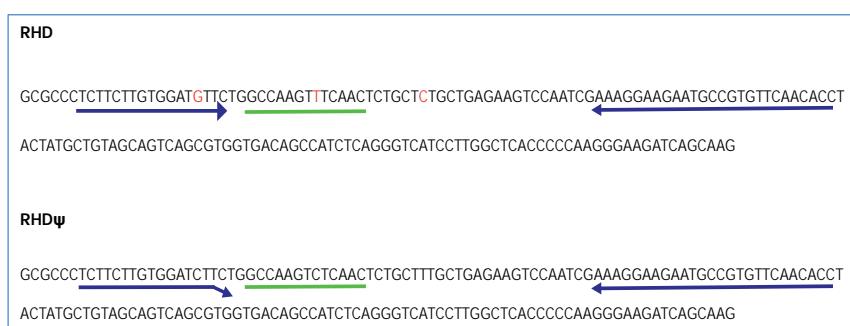


Figura 23. Localización de las secuencias de *primers* y sondas utilizadas para la amplificación en el exón 5 del gen RHD. Las flechas azules indican la posición de los *primers*, las verdes la de la sonda. En rojo, los nucleótidos implicados en las mutaciones puntuales que se encuentran en el RHD Ψ .

La utilización de este ensayo juntamente con el diseñado para la detección simultánea del exón 10 del gen RHD y el gen SRY (Multiplex 2) permite discernir también la presencia de variantes producto de reordenamientos de los genes RHD y RHCE que implican la pérdida del exón 5 del RHD, conocidas como variantes híbridas RHD-CE-D^S.

Por otro lado, la detección específica del exón 6 del gen RHD mediante un tercer juego de *primers* y sonda específicos (Finning et al., 2002) se ha utilizado para la confirmación de la presencia del RHD Ψ y ha permitido la detección de otra variante, la RHD-VI. En el exón 6 del RHD Ψ existe una mutación puntual *nonsense* (807T>G). De igual manera que para el exón 5, con los *primers* y sonda seleccionados y en presencia del pseudogen no habrá amplificación de la secuencia, mientras que ésta sí será detectada en otras variantes.

Las tres sondas utilizadas en la Multiplex 1 se marcan con tres fluorocromos diferentes para su uso en PCR multiplex: 6-Fam para la sonda del exón 5, VIC para la sonda del exón 7 y NED para la sonda del DYS14 (r5P, r7P y DYS14P, respectivamente). La detección de la secuencia multicopia DYS14 del cromosoma Y permite la determinación del sexo fetal, así como la confirmación de la presencia de DNA fetal en las muestras pertenecientes a fetos de sexo masculino.

En el ensayo Multiplex 2 se utilizan dos juegos de *primers* (r10F,R; SRYF,R) y sondas (SRYP y r10P) para la detección simultánea del exón 10 del gen RHD y el gen SRY. En este caso las sondas están marcadas con dos fluorocromos diferentes: 6-Fam para la sonda SRYP y VIC para la r10P.

Los *primers* y sondas utilizados en el curso de este estudio se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Primers y sondas utilizados para las Real Time-PCR.

Secuencia Diana (tamaño amplicón)	Nomenclatura*	Secuencia** (5` -3`)
Multiplex 1		
DYS14 ⁽¹⁾ (84bp)	DYS14F DYS14R DYS14P	GGGCCAATGTTATCCTTCTC GCCCATCGGTCACTTACACTTC (NED) TCTAGTGGAGAGGTGCTC (MGB)
RHD Exón 5 ⁽²⁾ (82bp)	r5F r5R r5P	CGCCCTTCTTGATG GAACACGGCATTCTCCTTC (6-Fam) CTGGCCAAGTTTC (MGB)
RHD Exón 7 (57bp)	r7F r7R r7P	TGCTGCTGGTGCCTGATACC CATGTGGGTCACTGGGCTTA (VIC) CGGAGCCGGCAAT (MGB)
Multiplex 2		
RHD Exón 10 ⁽³⁾ (74bp)	r10F r10R r10P	CCTCTCACTGTTGCCTGCATT AGTGCCTGCGCGAACATT (VIC) TACGTGAGAAACGCTCATGACAGCAAAGTCT (TAMRA)
SRY ⁽³⁾ (78bp)	SRYF SRYR SRYP	TCCTCAAAAGAAACCGTGCAT AGATAATGGTTCTAAGGACTGGAT (6-Fam) CACCAGCAGTAACTCCCCACAACCTCTT (TAMRA)
RHD Exón 6 ⁽²⁾ (153bp)	r6F r6R r6P	ACACGCTATTCTTGAGACTTCT AGGTACTGGCTCCCCAAC (VIC) AGATAGCCCAGCCACAAGACCCAG (MGB)
β-actina (137bp)	β-actF β-actR β-actP	GCGCCGTTCCGAAAGTT CGGCGGATCGGCAAA (NED) ACCGCGAGACCGCGTC (MGB)

* F = primer forward, R= primer reverse, P= sonda.

** Secuencias de oligonucleótidos utilizadas. En el caso de las sondas se indican también los fluorocromos utilizados como reporter (extremo 5') y quencher (3').

⁽¹⁾ Adaptados de Zimmermann et al. (2005).

⁽²⁾ Adaptados de Finning et al. (2002). Las bases que permiten diferenciar RHD de RHCE se muestran en negrita; las bases que permiten diferenciar RHD y RHDΨ aparecen subrayadas.

⁽³⁾ Adaptados de Zhong et al. (2001).

Todas las secuencias amplificadas con los respectivos juegos de *primers* seleccionados y adaptados han sido confirmadas como pertenecientes a las secuencias diana del estudio mediante la base de datos pública BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Fig.25).

Figure 25. Confirmation of the amplified sequence for exon 5 using the BLAST database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Las concentraciones finales de *primers* utilizadas en la Multiplex 1 han sido: 600nM para el exón 5 (r5F, r5R), 800nM para el exón 7 (r7F, r7R) y 1.000 nM para DYS14 (DYS14F, DYS14R). En el caso de las sondas, las concentraciones finales han sido: 200 nM para las sondas de los exones 5 y 7 (r5P, r7P) y 640 nM para la sonda de DYS14 (DYS14P). Los *primers* específicos para la Multiplex 2 (SRYF y SRYR para la determinación del sexo fetal y r10F y r10 para el RHD) se han utilizado a una misma concentración final de 800nM; y las sondas TAMRA (SRYP y r10P) a una concentración final de 240 nM (Tabla 3).

Tabla 3. Protocolos de PCR a Tiempo Real para la determinación del RhD fetal.

Multiplex 1			Multiplex 2		
Detección simultánea de RHD (exones 5 y 7) y DYS14			Detección simultánea de RHD (exón 10) y SRY		
	Concentración	Reacción de PCR (x1)		Concentración	Reacción de PCR (x1)
r5F	200 pmol/µL	0,075 µL	r10F	100 pmol/µL	0,2 µL
r5R	200 pmol/µL	0,075 µL	r10R	100 pmol/µL	0,2 µL
r5P	100 pmol/µL	0,05 µL	r10P	12 pmol/µL	0,5 µL
r7F	200 pmol/µL	0,1 µL	SRYF	100 pmol/µL	0,2 µL
r7R	200 pmol/µL	0,1 µL	SRYR	100 pmol/µL	0,2 µL
r7P	100 pmol/µL	0,05 µL	SRYP	12 pmol/µL	0,5 µL
DYS14F	400 pmol/µL	0,0625 µL		-	-
DYS14R	400 pmol/µL	0,0625 µL		-	-
DYS14P	100 pmol/µL	0,16 µL		-	-
GE Master Mix	-	12,5 µL	GE Master Mix	-	12,5 µL
Agua estéril	-	2,765 µL	Agua estéril	-	1,7 µL
DNA	-	9 µL	DNA	-	9 µL
Vol. final		25 µL	Vol. final		25 µL

Las muestras se han analizado por triplicado y se han considerado pertenecientes a fetos RhD positivos aquéllas en las que los exones 5 y 7 se han detectado en al menos dos de las réplicas para la Multiplex 1. La detección de la

secuencia DYS14 en mínimo dos réplicas ha indicado la presencia de fetos de sexo masculino confirmando la presencia de DNA fetal en la muestra. Las muestras negativas para la detección de las tres secuencias se han confirmado en una nueva extracción de DNA mediante el uso de la Multiplex 2. La detección del gen de la β -actina, de uso en el laboratorio, ha permitido la confirmación de la presencia de DNA en las muestras negativas para la amplificación de todas las secuencias diana (r5/r7/DYS14 negativas y r10/SRY negativas), confirmando así la correcta extracción de DNA y procesamiento del plasma (Fig.26, Tabla 4). Por último, la detección del exón 6 del gen RHD se ha empleado para ampliar el estudio en tres casos, negativos únicamente para la detección del exón 5 (Tabla 4). Los resultados positivos para cualquiera de las tres secuencias con $Ct \geq 42$ se han considerado no concluyentes y las muestras se han repetido en una segunda extracción de DNA. En los casos en que tampoco ha sido posible obtener un resultado concluyente en esta segunda extracción, se ha solicitado nueva muestra de la paciente para un segundo análisis.

Tabla 4. Protocolos de análisis por PCR a Tiempo Real para la detección de β -actina y del exón 6 del RHD.

Detección de β -actina			Detección de RHD (exón 6)		
	Concentración	Reacción de PCR (x1)		Concentración	Reacción de PCR (x1)
β -actF	100 pmol/ μ L	0,2 μ L	r6F	100 pmol/ μ L	0,2 μ L
β -actR	100 pmol/ μ L	0,2 μ L	r6R	100 pmol/ μ L	0,2 μ L
β -actP	12 pmol/ μ L	0,5 μ L	r6P	12 pmol/ μ L	0,5 μ L
GE Master Mix	-	12,5 μ L	GE Master Mix	-	12,5 μ L
Agua estéril	-	2,6 μ L	Agua estéril	-	2,6 μ L
DNA	-	9 μ L	DNA	-	9 μ L
Vol. final		25 μ L	Vol. final		25 μ L

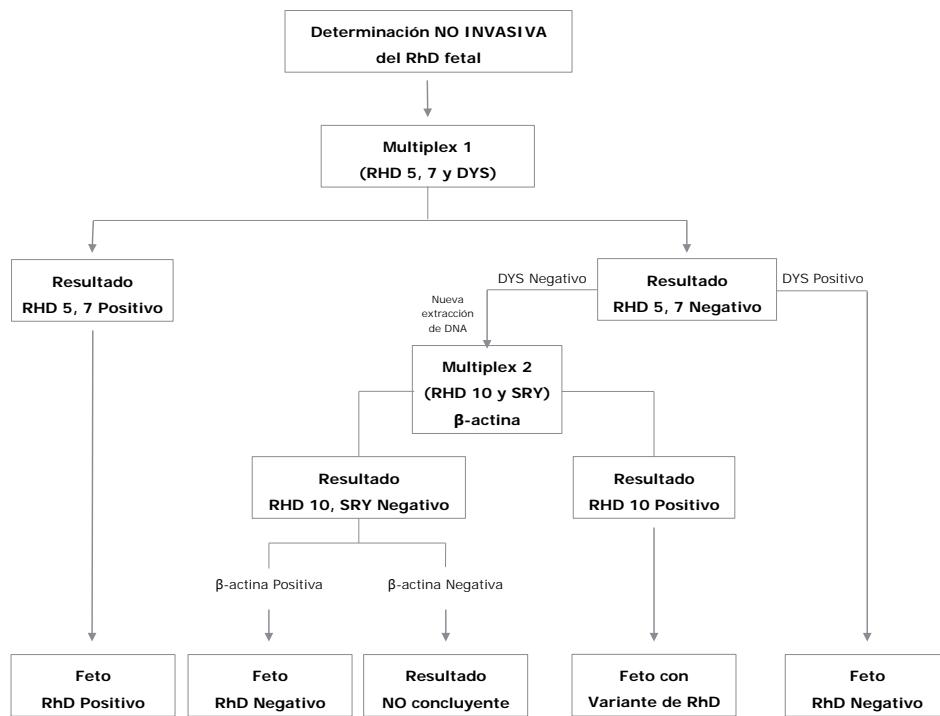


Figura 26. Diagrama del protocolo para la determinación no invasiva del RhD fetal.

3.3. Detección de aneuploidías fetales en cfDNA

Previamente a su aplicación por primera vez en un laboratorio clínico, se ha procedido a la validación un nuevo método de cribado de detección de aneuploidías en cfDNA (NIPT) mediante secuenciación masiva bidireccional (Paired-End MPSS), desarrollado en colaboración con Illumina Inc. a partir del test VeriSeq NIPT v1.0 (Illumina Inc, San Diego, U.S.).

La validación se ha llevado a cabo en un estudio ciego retrospectivo en dos grupos de gestantes:

- En un primer grupo se han incluido 1.000 muestras provenientes del banco de muestras del Harris Birthright Research Centre for Fetal Medicine (King's College Hospital, London). A partir de la sangre periférica recogida en tubos EDTA-K se procedió a la obtención de plasma mediante centrifugación de 10 minutos a 2.000 g. (Plasma 1), seguida de una segunda centrifugación del sobrenadante de 10 minutos a 16.000 g. (Plasma 2). Los sobrenadantes finales se almacenaron a -80°C hasta nueve años previos a la realización de este estudio. Se han seleccionado 50 casos de trisomía 21, 30 de trisomía 18 y 10 de trisomía 13, y 910 casos correspondientes a fetos normales, todos ellos confirmados mediante cariotipo o seguimiento en el recién nacido. Las muestras se han enviado al laboratorio en alícuotas codificadas de 1 mL e identificadas como Plasma 1 o Plasma 2.
- En el segundo grupo se han incluido un total de 709 muestras consecutivas de sangre periférica de embarazadas recogidas por nuestro grupo en tubos Streck BCT para la realización de un test de NIPT de secuenciación dirigida (Harmony™ Prenatal Test, Ariosa). Los plasmas se obtuvieron por doble centrifugación (10 minutos a 1.200 g. seguidos de una centrifugación de 10 minutos a 16.000 g. a 4°C) y los sobrenadantes obtenidos se codificaron y

almacenaron a -80°C durante un periodo de hasta dos años. Las muestras incluían 16 casos de trisomía 21, 4 de trisomía 18, 3 de trisomía 13 y 8 de aneuploidías de los cromosomas sexuales (5 casos X0 y tres 47,XXY). De todas ellas se disponía de confirmación por cariotipo o seguimiento en el recién nacido.

Todas las muestras se han procesado utilizando la química de secuenciación de Illumina VeriSeq NIPT v1.0 (Illumina Inc, San Diego, U.S.) en un nuevo sistema totalmente automatizado, el Hamilton Star (Hamilton Robotics ,Reno, U.S.), en el que se lleva a cabo el alicuotado del plasma a partir de la muestra de sangre periférica previamente centrifugada a placas de 96 pocillos, la extracción de DNA mediante columna de afinidad, la preparación y cuantificación de la librería de secuenciación y la preparación de las mezclas de muestras para la realización de la secuenciación. Así, el sistema permite trabajar con 96 muestras simultáneamente, agrupadas en dos mezclas o *pools* de 48 DNAs para su secuenciación (Fig.27). La duración del proceso desde el alicuotado del plasma hasta la obtención de los *pools* de DNA para secuenciación es de aproximadamente 6 horas, y la secuenciación bidireccional de 48 genomas en un único ensayo conlleva unas 13 horas, a las que se suman 4-5 horas de autoanálisis de los datos. Los resultados pueden ser emitidos aproximadamente en 48 horas desde la recepción de la muestra.

Al tratarse de plasmas ya alicuotados y almacenados, se ha procedido directamente a la extracción de DNA. Las muestras identificadas como Plasma 1 del primer grupo de estudio se han centrifugado una segunda vez a 16.000 g. previamente a la extracción de DNA. Se ha transferido 1 mL de plasma de cada muestra a placas de 96 pocillos y se ha llevado a cabo la extracción de DNA y la preparación de la librería en dos *pools* finales de 48 muestras, que se han secuenciado mediante dos sets de 36 ciclos de secuenciación masiva

bidireccional utilizando los secuenciadores NextSeq 500 y 550 (Illumina Inc.). Los datos de secuenciación generados se han analizado mediante el software VeriSeq NiPT v1.0 (Illumina Inc.).

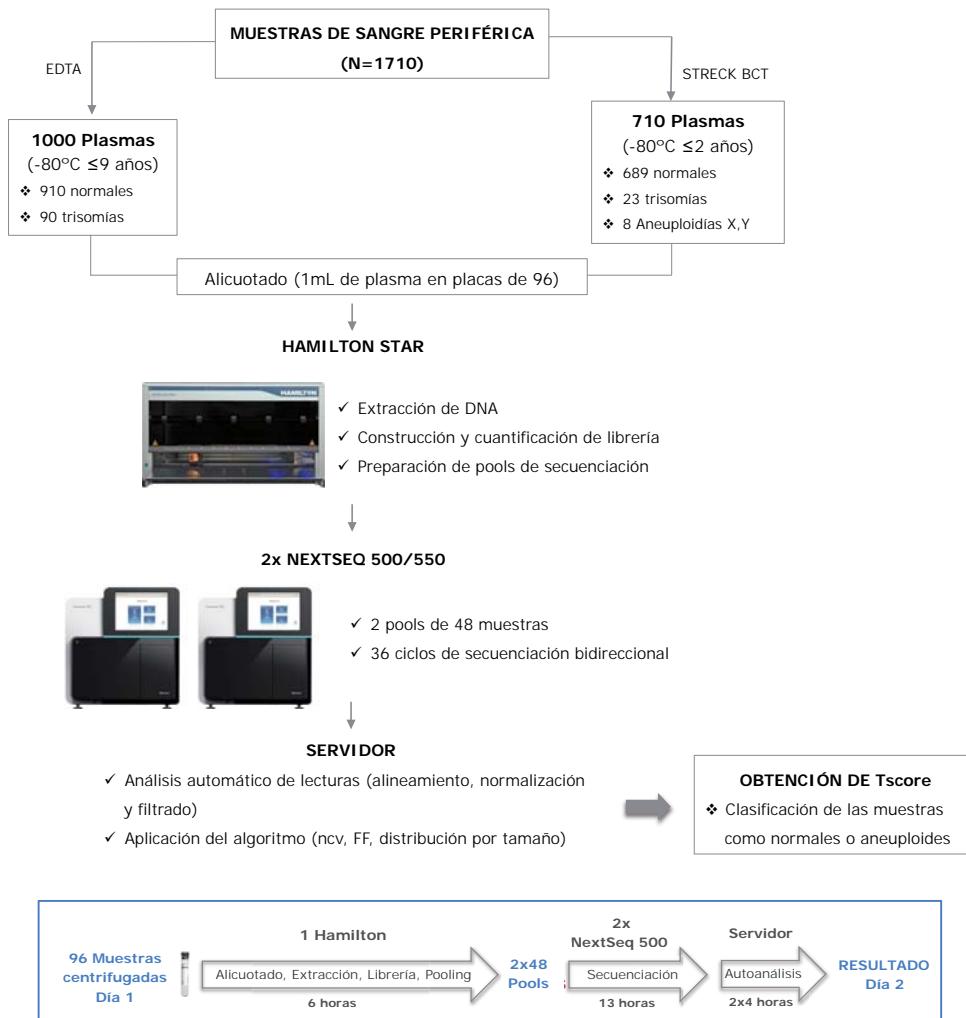


Figura 27. Diseño experimental utilizado para la validación del test de detección de aneuploidías fetales.

La construcción automática de la librería se realiza sin PCR a partir del cfDNA, que se encuentra ya fragmentado (Fig28a). Los extremos de los fragmentos se

reparan enzimáticamente para obtener extremos romos aprovechando la actividad exonucleasa (Fig.28b) y se seleccionan mediante el uso de bolas magnéticas (Fig.28c). A continuación se añade una base adenina (A) a uno de los extremos romos de cada una de las cadenas de DNA (Fig.28d). Esta base permitirá la unión mediante ligación de los adaptadores, que contienen una base timina (T). Los adaptadores son construcciones de oligonucleótidos que permiten la unión del DNA a la *Flowcell* para la secuenciación sin necesidad de PCR. Además contienen la secuencia complementaria para la hibridación de los *primers* de secuenciación y los índices para la identificación de la muestra (fig28e).

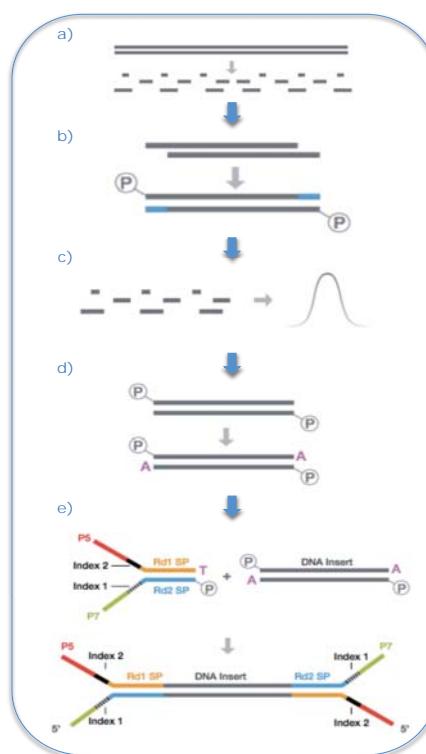


Figura 28. Construcción de la librería de secuenciación utilizada en este trabajo (Illumina Inc.)

- P5,P7: Adaptadores
- Index1, Index2: índices identificadores de la muestra
- Rd1SP,Rd2SP: secuencias complementarias para la unión de los *primers* de secuenciación.

Además de los adaptadores para la hibridación del DNA a la *Flowcell*, la incorporación de dos índices permite la secuenciación múltiplex de los DNAs (Fig.29). Así, a partir de 96 muestras, se obtienen dos mezclas o *pools* de 48 DNAs cada uno que serán secuenciados en un único ensayo en dos secuenciadores. Los índices son secuencias únicas que se incorporan al DNA y que permitirán la identificación de las lecturas obtenidas a partir de un mismo DNA de origen. Una vez obtenidas todas las secuencias, las muestras se identifican por las lecturas correspondientes a cada una de ellas y se agrupan mediante un algoritmo “demultiplexador” para su posterior análisis de alineamiento.

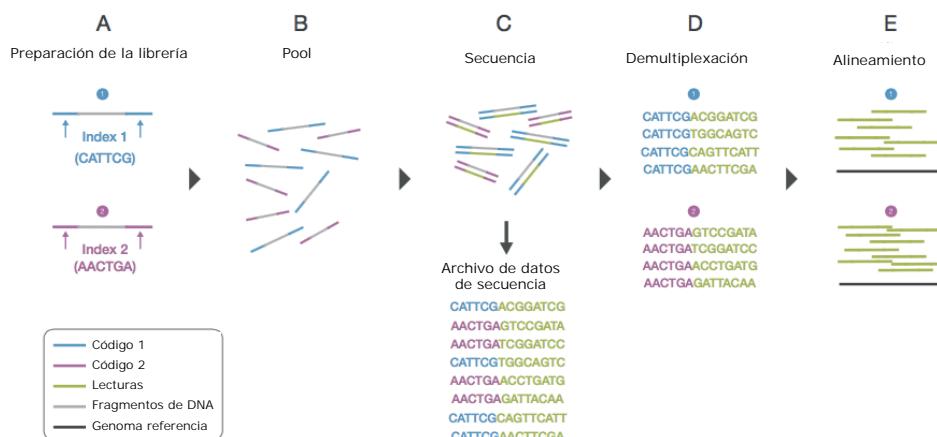


Figura 29. Esquema de la secuenciación múltiple utilizada. El uso de dos índices por muestra permite secuenciar 48 muestras de manera simultánea en un único ensayo (Illumina Inc.).

El análisis de los datos de secuenciación se realiza utilizando el programa Veriseq NIPT Software v1.0 (Illumina). Después de la demultiplexación de las lecturas obtenidas, las secuencias son alineadas frente al genoma humano de

referencia hg19 para su identificación, normalización y comparación intercromosómica (Fan and Quake, 2010). Las secuencias duplicadas y/o mal alineadas son eliminadas (aplicando parámetros de filtrado como el análisis del contenido C/G), sólo se seleccionan las alineadas en loci únicos para su posterior normalización mediante análisis de componentes principales (Zhao et al., 2015). El algoritmo desarrollado incluye el cálculo de la fracción fetal basado en la distribución diferencial por tamaño, las diferencias en cobertura de secuenciación entre cfDNA fetal y materno, y complementada con los datos obtenidos para los cromosomas X e Y en el caso de fetos de sexo masculino (Fan et al., 2010; Yu et al., 2014; Kim et al., 2015). El cálculo de los valores de NCV para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y se realiza siguiendo metodología descrita (Sehnert et al., 2011; Rava et al., 2014).

El resultado del análisis da lugar a un valor numérico, el Likelihood ratio (LR) o TScore calculado para cada una de las muestras y cada uno de los cromosomas de interés para reflejar la probabilidad estadística de trisomía, basándose en la fracción fetal estimada, la comparación intercromosómica tanto para fragmentos largos como cortos (NCV) y el número de secuencias únicas obtenidas en cada cromosoma. Las muestras se clasifican como normales o aneuploides utilizando un valor *cut off* de TScore específico para cada cromosoma (>1,5 para trisomía 21, >3 para trisomías 13 y 18). TScores por encima de estos valores se interpretan como presencia de trisomía fetal. Para los cromosomas sexuales, al algoritmo utilizado se añaden cálculos estadísticos basados en la relación entre los valores TScore XXX, Monosomía X, y los valores de NCV obtenidos para los cromosomas X e Y (Fig.30). En base a estos criterios, las muestras se clasifican como: compatibles con la presencia de trisomía 21, 18 y 13; compatibles con aneuploidía de los cromosomas sexuales; o como compatibles con la ausencia de aneuploidías.

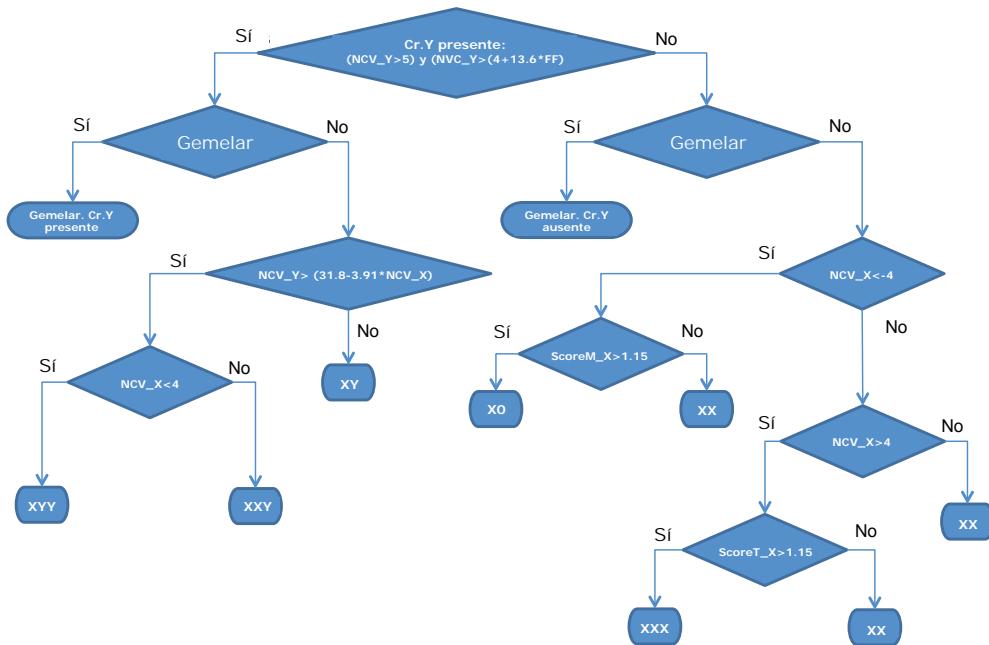


Figura 30. Algoritmo lógico utilizado en el análisis de los cromosomas sexuales.

Los resultados obtenidos en las muestras de validación se han comparado con los del cariotipo en los casos disponibles o el seguimiento en el recién nacido.

Una vez realizada la validación y confirmada la idoneidad de los cut off establecidos para el ensayo, el test NeoBona se ha implementado en la rutina clínica de Labco Diagnostics Barcelona. Se han analizado 2.828 gestaciones utilizando un análisis básico de detección de trisomías de los cromosomas 21, 13, 18 y determinación del sexo fetal, o la posibilidad de añadir a éste el análisis de aneuploidías de los cromosomas sexuales (X,Y).

4. RESULTADOS

4.1. Validación de protocolos

4.1.1. Obtención del plasma

Las condiciones idóneas de separación del plasma se han establecido mediante la realización de dos ensayos de centrifugación con cuatro plasmas control obtenidos de una gestante portadora de un feto de sexo masculino y mediante la detección y cuantificación de SRY en paralelo y por duplicado (ver apartado 1.1).

El Ciclo *threshold* (Ct) medio observado al utilizar plasma obtenido después de una segunda centrifugación a 1.200 g. ha sido de 35,66 mientras que cuando dicha centrifugación se ha realizado a 16.000 g. a 4°C el valor de Ct medio ha sido de 34,51 (Fig.31).

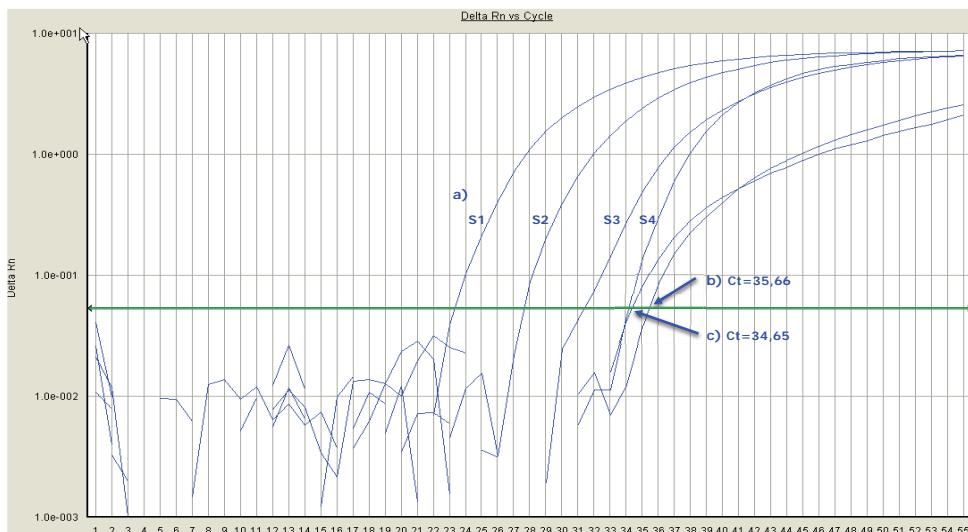


Figura 31. Cuantificación absoluta de SRY para la muestra M1. a) Amplificación de los 4 estándares de cuantificación S1,S2,S3,S4; b) Segunda centrifugación a 1.200 g.; c) Segunda centrifugación a 16.000 g. y 4°C.

Resultados

La cantidad media de DNA fetal obtenida ha sido de 16 pg para los plasmas sometidos a una segunda centrifugación a 1.200 g. y de 30 pg para los centrifugados a 16.000 g. a 4°C. Teniendo en cuenta que la secuencia SRY se encuentra en copia única en la célula y que se considera que el genoma de una célula equivale a unos 5 pg de DNA (1 Genomic Equivalent, GE), y la cantidad de DNA utilizado en el ensayo (9 µL obtenido de 500 µL de plasma en un volumen de elución final de DNA de 50 µL), es posible extrapolar el resultado obtenido a una concentración de DNA fetal libre en plasma materno. Así pues, para las muestras de plasma centrifugadas a 1.200 g. la concentración media de DNA fetal inferida ha sido de 35,56 GE/mL y de 66,67 GE/mL para la misma muestra centrifugada a 16.000 g. y 4°C (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de los valores de Ciclo *threshold* para la detección de SRY y concentración observados en las réplicas obtenidas en los dos ensayos de centrifugación.

MUESTRA (réplicas)	16.000 g. 4°C		1.200 g.	
	Ciclo <i>threshold</i> (Ct)	Concentración (GE/mL)	Ciclo <i>threshold</i> (Ct)	Concentración (GE/mL)
M1	34,65	92,40	35,66	95,09
M2	35,01	93,36	36,24	96,64
M3	34,02	90,72	35,01	93,36
M4	34,35	91,60	35,74	95,29
media	34,51	92,02	35,66	95,10

El rendimiento obtenido utilizando la segunda centrifugación a mayor velocidad y refrigerada ha sido significativamente superior, con un Ct de 34,51 ($p=0,0188$, significancia $p<0,05$ 95%CI) y una concentración media de DNA fetal detectada superior ($p<0,001$, significancia $p<0,05$ 95%CI).

4.1.2. Detección y cuantificación de SRY

La eficiencia del método de extracción de DNA automático frente al manual se ha evaluado mediante la detección y cuantificación de SRY en 50 muestras de DNA extraído paralelamente por ambos métodos obtenido de plasma de gestantes portadoras de fetos masculinos (ver apartado 2.1). La amplificación del gen SRY únicamente ha fallado en uno de los duplicados en 6 muestras en las que la extracción se ha realizado mediante el método automático. Los valores de Ct y concentración de DNA fetal medios obtenidos con el método manual han sido de 36,59 y 259,43 respectivamente; y de 37,61 y 109,27 con el método automático (Tabla 7).

Los valores de Ct obtenidos en los 50 DNAs extraídos manualmente han sido significativamente más bajos que los obtenidos utilizando el método automático ($p<0,001$, significancia $p<0,05$ 95%CI). Por tanto, la concentración de DNA fetal obtenida utilizando el método manual ha resultado significativamente superior a la obtenida con el método de extracción automática ($p<0,001$, significancia $p<0,05$ 95%CI) (Tabla 6).

Tabla 6. Eficiencias de los métodos de extracción manual y automático detectadas en nuestro estudio.

	MANUAL (QIAgen DSP) n=50	AUTOMÁTICA (AmpliPrep) n=50
Ciclo threshold (Ct)	36,59 (34,31-44,87)	37,61 (34,32-46)
Concentración (GE/mL)	259,43 (61,05-725,33)	109,27 (10,28-327,06)

Resultados

Tabla 7. Comparación de los valores de Ciclo *threshold* para la detección de SRY y concentración observados en las 50 muestras de DNA obtenidas en paralelo mediante extracción manual y automática.

Muestra	Ciclo threshold para la detección de SRY (Cts)		Concentración de DNA (GE/mL plasma)	
	Manual	Automático	Manual	Automático
M1	35,22/37,26	38,42/37,28	92,80	28,24
M2	34,34/35,47	35,77/35,32	181,33	103,53
M3	34,91/35,11	35,15/35,47	161,87	120,00
M4	36,36/35,11	35,22/-	107,73	23,53
M5	35,59/36,17	36,17/36,37	98,40	47,06
M6	35,90/38,08	38,08/38,27	61,07	30,59
M7	35,74/35,58	35,58/35,50	110,13	121,88
M8	36,89/36,10	36,10/38,17	69,07	52,24
M9	34,74/34,32	34,32/35,58	216,00	85,18
M10	37,03/35,53	37,27/37,12	84,00	39,29
M11	39,01/39,03	37,57/-	89,07	168,94
M12	36,48/36,00	37,90/37,01	389,33	184,47
M13	37,20/36,66	39,43/38,18	272,00	93,18
M14	37,04/37,23	41,11/39,58	241,87	42,35
M15	37,53/36,02	37,45/37,78	314,67	165,88
M16	36,58/37,48	38,28/40,22	262,40	78,82
M17	36,46/38,42	39,55/39,60	233,33	58,59
M18	39,29/38,71	39,47/-	91,20	62,12
M19	36,33/44,87	39,32/37,88	186,13	105,41
M20	36,15/37,08	38,53/37,41	328,00	143,06
M21	36,78/34,74	36,37/37,50	570,67	247,06
M22	36,96/36,53	38,12/37,74	298,67	140,71
M23	36,51/38,30	38,21/38,25	233,07	118,35
M24	37,16/37,32	37,40/39,49	228,00	123,06
M25	37,17/37,28	38,63/-	230,67	99,53
M26	37,26/36,30	-/37,89	195,20	85,88
M27	36,37/35,47	38,83/36,83	320,00	106,12
M28	35,65/34,31	36,11/36,74	573,33	207,53
M29	38,62/36,21	36,95/-	162,93	155,53
M30	35,22/35,48	38,80/39,13	432,00	47,06
M31	34,40/35,13	37,01/36,74	616,00	157,88
M32	37,06/37,10	37,63/37,14	146,40	117,88
M33	35,44/35,74	36,20/37,10	376,00	184,71
M34	37,28/35,52	46,00/38,79	265,60	26,12
M35	35,32/36,31	38,60/38,89	344,00	53,41
M36	36,35/38,54	35,93/37,26	154,40	198,59
M37	34,64/35,61	37,83/36,32	509,33	153,41
M38	34,72/34,47	36,72/36,06	669,33	212,00
M39	35,60/35,00	37,65/35,56	450,67	218,35
M40	37,61/36,72	38,75/37,09	155,47	95,76
M41	35,96/37,05	36,97/37,56	231,47	127,06
M42	35,65/36,19	37,06/37,26	314,67	133,65
M43	35,21/34,91	36,38/37,23	512,00	168,71
M44	35,05/34,00	36,15/35,19	725,33	327,06
M45	37,10/36,43	36,55/37,88	87,47	61,65
M46	36,60/36,65	40,00/39,69	93,60	10,28
M47	37,01/35,65	37,59/38,50	124,00	34,12
M48	36,37/36,13	38,51/37,95	119,47	29,65
M49	35,94/35,65	37,37/39,61	160,53	31,29
M50	36,65/37,07	38,70/37,32	80,80	36,94
Media	36,59	37,61	259,43	109,27

La variabilidad observada en la cantidad de DNA detectada ha sido mayor en las muestras obtenidas mediante extracción de DNA manual (61,07-725,33

GE/mL) comparada con la variabilidad observada para las muestras obtenidas mediante extracción de DNA automática (10,28-327,06 GE/mL) (Fig.32).

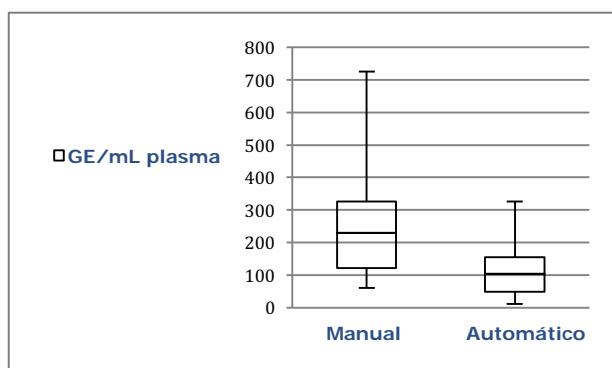


Figura 32. Equivalentes Genómicos detectados en 50 muestras de DNA de fetos masculinos extraídos con el método manual y automático.

Después de este estudio, se ha procedido a la extracción de DNA utilizando únicamente el método automático en 108 muestras: 58 procedentes de gestantes de fetos masculinos y 50 de gestantes de fetos femeninos. La amplificación de SRY ha fallado en uno de los duplicados en 10 ocasiones y se ha detectado correctamente en todas las muestras de fetos masculinos y en ninguna de las de fetos femeninos, sin generar resultados falsos positivos ni falsos negativos.

4.1.3. Determinación del RhD fetal

Los resultados obtenidos en el estudio preliminar de 60 muestras han sido concordantes para la determinación del RhD fetal y la determinación del sexo fetal. La amplificación de las secuencias diana fetales en las muestras positivas se ha detectado con valores de Ct comprendidos entre 33 y 38. En dos casos se ha detectado amplificación de las secuencias de RHD con Ct<30. El origen

Resultados

materno de las mismas se ha confirmado mediante el análisis en sangre periférica materna.

Posteriormente al estudio preliminar, se ha procedido al análisis de 158 muestras consecutivas. Los resultados obtenidos mediante el primer ensayo (Multiplex 1, detección de los exones 5 y 7 del RHD y de DYS14) han sido concluyentes en 153 muestras. El análisis en una segunda extracción de DNA ha permitido obtener un resultado concluyente en los 5 casos restantes. En 4 muestras se han detectado fallos de amplificación de alguna de las secuencias en alguna de las tres réplicas (detección del exón 5 en tres de los casos, y del exón 7 en el cuarto). La concordancia entre las réplicas para el resto de muestras ha sido del 100%.

En total, la determinación del RhD fetal se ha realizado en 218 muestras. La secuencia DYS14 se ha detectado en un total de 118 casos, correspondientes a fetos masculinos. Los exones 5 y 7 del gen RHD se han detectado en 148 muestras, compatibles con la presencia de fetos RhD positivos (68% de los casos), 81 de ellas correspondientes a fetos masculinos (detección de la secuencia DYS14) y 67 a femeninos (secuencia DYS14 no amplificada). Los resultados de las 70 muestras restantes han sido compatibles con la presencia de fetos RhD negativos (32%), 37 de ellos masculinos y 33 femeninos.

La detección del exón 10 del gen RHD y del gen SRY (Multiplex 2) se ha empleado para confirmar los resultados negativos para la amplificación de las tres secuencias analizadas en la Multiplex 1 en 33 muestras (15%) compatibles con fetos femeninos RhD negativos. El exón 10 del RHD únicamente se ha detectado en 2 de los casos, genotipados como posibles variantes híbridas del gen RHD, de fenotipo RhD fetal negativo. La correcta extracción de DNA en los casos negativos para todas las secuencias (tanto para la Multiplex 1 como para la

Multiplex 2) se ha confirmado mediante la amplificación del gen de la β -actina (Tabla 8).

Tabla 8. Determinación del sexo y RhD mediante análisis de DNA fetal libre en plasma materno en nuestro estudio, y comparación con el fenotipo del recién nacido.

Deteción simultánea de DYS14/RHD5/RHD7 en cfDNA			Genotipo Fetal (plasma)	Recién Nacido (fenotipo)
Positivo DYS14	Positivo exón 5 RHD	Positivo exón 7 RHD		
81	81	81 ¹	XY/RhD n=81 (37%)	Masculino RhD+ (81)
37	-	-	XY/Rhd n=37 (17%)	Masculino RhD- (37)
-	67 ¹	67	XX/RhD n=67 (31%)	Femenino RhD+ (67)
-	-	-	XX/Rhd n=33 ² (15%)	Femenino RhD- (33) ²

⁽¹⁾ La amplificación del exón 5 y del 7 ha fallado en una de las réplicas en 3 y 1 muestras, respectivamente.

⁽²⁾ En dos muestras el exón 10 del gen RHD se ha detectado en la Multiplex 2 (variantes RHD-C-D^s).

Todos los resultados han sido comparados con los obtenidos en los recién nacidos con una concordancia del 100%, sin observarse falsos negativos ni falsos positivos (sensibilidad y especificidad del 100%) tanto para la determinación del RhD fetal como para la determinación del sexo fetal. La presencia de las dos posibles variantes del gen RHD se ha confirmado mediante análisis en sangre periférica de los recién nacidos. En ambos casos el fenotipo postnatal RhD negativo corrobora el fenotipo inferido a partir del resultado obtenido mediante el análisis en plasma materno (Tabla 8).

4.1.4. Detección de aneuploidías fetales

El test NeoBona se ha validado mediante un estudio caso-control retrospectivo en 1.709 muestras. Se han analizado todas las muestras recibidas, incluidas 60 en las que el volumen de muestra inicial era inferior a 1 mL (rango

Resultados

de volúmenes 500 µL-900 µL). El análisis ha fallado en 23 muestras (que no se han tenido en cuenta en el análisis estadístico) y se ha obtenido un resultado de secuenciación válido en 1.686 (98,6%). A partir de los datos de la secuenciación y posterior aplicación del algoritmo para el cálculo de los TScores correspondientes a cada cromosoma analizado, las muestras se han clasificado como aneuploides (trisomías 13, 18 y 21 y aneuploidías de los sexuales) o euploides (Tabla 10). Los *cut off* establecidos en el TScore (1,5 para trisomía 21, y 3 para las trisomías 13 y 18) han permitido identificar correctamente los 59 casos de trisomía 21, con valores de TScore en un rango variable entre 7 y 392. Se han detectado 13 casos de trisomía 13 con valores de TScore de 24,3 a 479, y 31 de trisomía 18 con valores de TScore de 17 a 765. Las 4 muestras correspondientes a aneuploidías de los cromosomas sexuales (dos 47,XXY y dos 45,X) han sido correctamente identificadas, así como los sexos fetales en 709/709 casos. Las 1579 muestras restantes se han clasificado como euploides con valores de TScore globales para los cromosomas 13, 18 y 21 en un rango de -2591 a 1,466 (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de la detección no invasiva de aneuploidías en 1709 muestras.

Muestras	Total	Análisis en cfDNA (Tscores)	Análisis en cfDNA fallado (FR%)
Normales	1599	1579 -73,004 (-2591;1,466)	20
Trisomía 21	62	59 109,701 (7,206;392,051)	3
Trisomía 18	32	31 176,761 (16,853;765,178)	-
Trisomía 13	12	13 171,881 (23,885;479,514)	-
45, X	2	2	-
47, XXY	2	2	-
Total	1709	1686	23 (1,3)

FR: tasa de fallos. En 23 muestras no fue posible obtener un resultado de secuenciación.

Resultados

Tabla 10. Resultados obtenidos de la secuenciación para la detección de aneuploidías fetales.

SampleID	SampleType	Flowcell	Batch Name	IndexID	NCV_13	NCV_18	NCV_21	NCV_X	NCV_Y	FF	Score_13	Score_18	Score_21	Score_X	Score_Y	Class_X	Class_Y	Class_Sx	QCFlag	QCFailure	NCD_13	NCD_18	NCD_21	NCD_X	NCD_Y	Sites			
3385	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D701-0502	1.44037103	1.699635886	1.251013281	1.784049141	5.75092741	0.172578501	-31.0340413	-27.9314209	1.89861587	0	0	0	0	3	0	5758350	4973300	-1.643483041	1.023921112	-1.247798291	-0.432759596	1.02395334	5216986		
3342	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D701-0504	0.940367983	0.11357213	0.041986555	-1.4721421	2.03814941	0.178585228	-170.7774602	-120.4840402	-43.4929431	-48.9179353	-47.9922938	0	0	0	0	0	5758350	4973300	-1.643483041	1.023921112	-1.247798291	-0.432759596	1.02395334	5216986	
3349	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D701-0506	-0.933050805	0.081473056	-1.207138915	-0.532524444	5.146623187	0.188309544	-53.676206	-45.6774443	-374.3558606	-78.67643943	0	0	0	3	0	7826182	6534040	-0.85274069	2.42403266	-2.7988578	0.825011951	5.332306571	70615135		
3359	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D701-0508	0.205795916	16.6372637	-1.5295722	-0.737015828	-0.34357382	0.107172537	-15.0587229	238.6269569	-15.806166	-6.458625186	-15.57329775	0	1	0	2	0	8756512	7738444	1.008267333	-0.8837764	-1.161861682	-0.598512441	2.341204361	8020573	
3362	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D702-0501	-1.597638728	-1.843095786	-0.482776134	21.64566762	0.05402932	-30.3884737	-37.0160606	-23.65714621	-30.5577347	31.0285905	0	0	0	3	0	9700262	8270400	0.24406955	0.058198587	0.775269443	0.006988673	0.042986679	8388893		
3367	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D702-0503	0.900991133	0.805344531	-15.8513668	1.041986866	0.158339207	-30.5211389	-21.3902006	-16.36165027	-22.06316351	87.64808729	0	0	0	3	0	6400943	5324558	-1.48851916	-1.136356661	-0.06775711	-0.211971456	1.76892395	5808085		
4408	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D702-0505	6.238019688	1.763046688	1.169573213	-0.382511389	26.74339	-12.2441411	8.45.761312	45.80548816	0	0	0	3	0	6235108	5265599	0.595285815	1.84976418	0.2738585	1.81838745	5.686292	1000000				
4412	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D702-0507	-0.572401905	-1.185380392	-0.393803868	0.52608953	-1.49629282	1.2768534	-35.2049058	-21.08789108	-23.3472129	-17.591851914	-13.06728785	0	0	0	2	0	4820802	4251469	-2.8310205	0.08756904	-1.69309755	1.180118909	1.62120762	4415224	
4426	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D703-0502	1.468238518	1.463463951	-0.845457111	-4.791794753	35.11904659	0.078117795	-48.1992622	-32.2513565	-38.10977105	-57.86637898	33.8228231	0	0	0	3	0	9295847	8207950	0.520593305	0.286592677	0.025454040	1.751027079	4897060		
4435	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D703-0504	0.450382482	-1.570146535	-0.701246653	-0.482545711	1.468238518	0.156032935	4.42696619	-6.63527426	1.686000111	-11.0727948	-30.532526137	0	0	0	3	0	5423447	4765515	1.003887339	1.727952693	0.323742459	0.85208262	1.222702045	4937698	
4451	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D703-0506	-0.270753824	-1.142697231	0.156032935	4.42696619	0.156032935	-0.482545711	1.468238518	-6.63527426	1.686000111	-11.0727948	-30.532526137	0	0	0	2	0	10483418	9072519	-1.08810063	-2.323443708	-0.679546462	0.366373643	9573237		
4427	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D703-0508	0.072503224	-0.39057058	-1.451248868	-0.482545711	1.468238518	-1.3040287	62.64456561	-25.9585804	-19.857039	141.1501206	0.24406955	0	0	0	3	0	6485401	21.0205316	0.058198587	0.775269443	0.006988673	0.042986679	8388893		
4428	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D704-0501	0.536320318	-0.240691928	-0.432005203	-11.65.5488822	36.6023194	0.160630293	-21.3262686	-16.5488822	0.089730274	-11.791204065	-10.56563043	36.66183754	0	0	0	3	0	7961882	6859307	-1.08245664	-0.598968634	0.64734722	-0.74033035	8.57888686	7267108
4355	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D704-0503	0.099412674	-0.240692526	-0.432005203	-11.65.5488822	36.6023194	0.160630293	-21.3262686	-16.5488822	0.089730274	-11.791204065	-10.56563043	36.66183754	0	0	0	2	0	6270371	5515746	0.206396021	1.11804075	0.020346143	-1.97629157	5.733918	
4442	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D704-0505	-0.107446619	-1.194609408	0.589754447	-0.646056527	-1.7189404	-0.1001188	-14.5847874	0.44.2498278	-0.74.2498278	-0.849504562	-0.74.2498278	-12.70378945	0	0	0	2	0	9654094	8481054	-0.4878827	-0.373902909	-0.673611586	-0.298232231	916490628	8833409
4494	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D704-0507	-0.387460591	-1.120634571	0.504696571	-0.821521503	57.73863386	0.129765708	-28.1026269	-21.08789108	-17.83221387	-60.0825913	0	0	0	3	0	8104651	707464	0.97061338	0.681727885	0.83403955	0.967904765	1.70565381	7392098		
4561	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D705-0502	-0.021272979	-0.120512042	0.120512042	-0.120512042	0.120512042	-0.120512042	-0.120512042	-0.120512042	-0.120512042	-0.120512042	-0.120512042	0	0	0	2	0	9982277	6945000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	9136734	
5576	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D705-0504	-0.021272979	-0.120512042	0.120512042	-0.120512042	0.120512042	-0.120512042	-0.120512042	-0.120512042	-0.120512042	-0.120512042	0	0	0	2	0	5245059	20.0291156	0.751544045	0.723709794	0.723709794	0.723709794	0.723709794	51651		
5579	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D705-0506	-1.660793224	-0.187794881	-0.143397416	-0.143397416	-0.143397416	-0.143397416	-0.143397416	-0.143397416	-0.143397416	-0.143397416	-0.143397416	0	0	0	2	0	7077717	6055972	0.141501216	1.371025899	0.584549236	2.325740282	6470782		
5589	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D705-0508	-0.57981347	0.78283426	-0.423921265	-0.137098428	6.160402884	0.134117042	-31.73508087	-11.30402888	0.097170800	-10.97170800	0	0	0	3	0	9155217	7856954	0.268651128	0.31442269	0.314126584	0.102074596	0.590703116	357724		
5596	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D706-0501	0.485377001	-0.8419765	-0.423921265	-0.137098428	6.160402884	0.134117042	-31.73508087	-11.30402888	0.097170800	-10.943750125	0	0	0	2	0	5648628	4771435	0.172273925	0.372273925	0.514507651	1.543064761	5.733918			
5603	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D706-0509	0.036175188	0.96301547	0.96301547	0.96301547	0.96301547	0.96301547	0.96301547	0.96301547	0.96301547	0.96301547	0	1	0	2	0	4783012	4118824	-0.91246887	0.172680691	0.165160241	0.21744062	43.802493			
5609	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D706-0505	0.188508216	-0.188508216	-0.188508216	-0.188508216	-0.188508216	-0.188508216	-0.188508216	-0.188508216	-0.188508216	-0.188508216	0	0	0	2	0	5131364	4516133	-0.185791729	-0.523157942	-0.170466003	0.993061199	3.480271	486611		
5626	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D706-0507	-0.434714786	0.238900694	-0.08101708	18.561946	0.139512081	-0.883140897	-0.883140897	-0.883140897	-0.883140897	-0.883140897	0	0	0	3	0	8532286	7482478	1.7857442	0.7696506	0.902104098	0.809350209	3.7058564	7048458		
5653	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D707-0502	-0.177286328	-0.143438881	-0.083153375	-0.177286328	0.135508023	0.135508023	0.135508023	0.135508023	0.135508023	0.135508023	0.135508023	0	0	0	3	0	10235655	8689771	0.53834687	0.932397657	0.158752653	0.82117997	2.0845851	3383764	
5658	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D707-0504	-0.206399246	0.335508023	0.161466687	0.335508023	0.335508023	0.335508023	0.335508023	0.335508023	0.335508023	0.335508023	0	0	0	3	0	6612009	5659888	0.745375873	0.664458051	0.278505781	0.952404534	1.320204740	603300		
5664	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D707-0506	-0.077279888	-0.198877988	-0.077279888	-0.198877988	-0.198877988	-0.198877988	-0.198877988	-0.198877988	-0.198877988	-0.198877988	0	0	0	2	0	5346007	4654567	-0.249936247	-0.6358332	0.53286	0.698892828	7.73228899	4946363		
5669	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D707-0508	-0.132127046	-0.625547802	0.311850203	-0.132127046	0.486801339	0.110989586	-0.124.1998116	-0.93882425	-0.815187047	-0.815187047	0	0	0	3	0	6420375	5425082	0.09898587	0.774895171	0.178339899	0.488433748	5.8167			
5670	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D708-0501	-0.0047995	-1.4265265	-0.0047995	-1.4265265	0.048672176	-0.112456732	-0.112456732	-0.112456732	-0.112456732	-0.112456732	0	0	0	3	0	7666663	6636368	1.175882904	0.74829962	0.1093062108	0.73902480	3.61060083	6991849		
6181	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D708-0503	-0.00898093	-1.4265265	-0.0047995	-1.4265265	0.048672176	-0.112456732	-0.112456732	-0.112456732	-0.112456732	-0.112456732	0	0	0	3	0	6062734	4922416	-0.447477322	-0.63434737	-0.10511334	-0.40621293	5.151311			
6223	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D708-0505	-0.140401026	-0.625547802	-0.140401026	-0.625547802	0.048672176	-0.112456732	-0.112456732	-0.112456732	-0.112456732	-0.112456732	0	0	0	2	0	7036271	42.047607	-0.447477322	-0.634347378	-0.158455117	-0.605493983	7.280465299	470532		
7216	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D710-0503	0.04977406	0.186183418	0.186183418	0.186183418	0.186183418	0.186183418	0.186183418	0.186183418	0.186183418	0.186183418	0	0	0	3	0	510973	4496504	-1.43644085	-2.41552788	0.158455117	0.605493983	7.280465299	470532		
7218	Singleton	HWK738GX	fmf_1	D710-0507	-0.245344949	0.097638471	-0.181793184	-0.181793184	0.181793184	-0.181793184	-0.181793184	-0.181793184	-0.181793184	-0.181793184	0	0	0	2	0	4041595</td									

En la figura 33 se comparan los resultados obtenidos del análisis del cfDNA para la detección de trisomía 18 mediante normalización intercromosómica (NCV) con los valores TScore en función de la fracción fetal. Como se esperaba, los NCV en las muestras trisómicas (en rojo) aumentan a mayor FF.

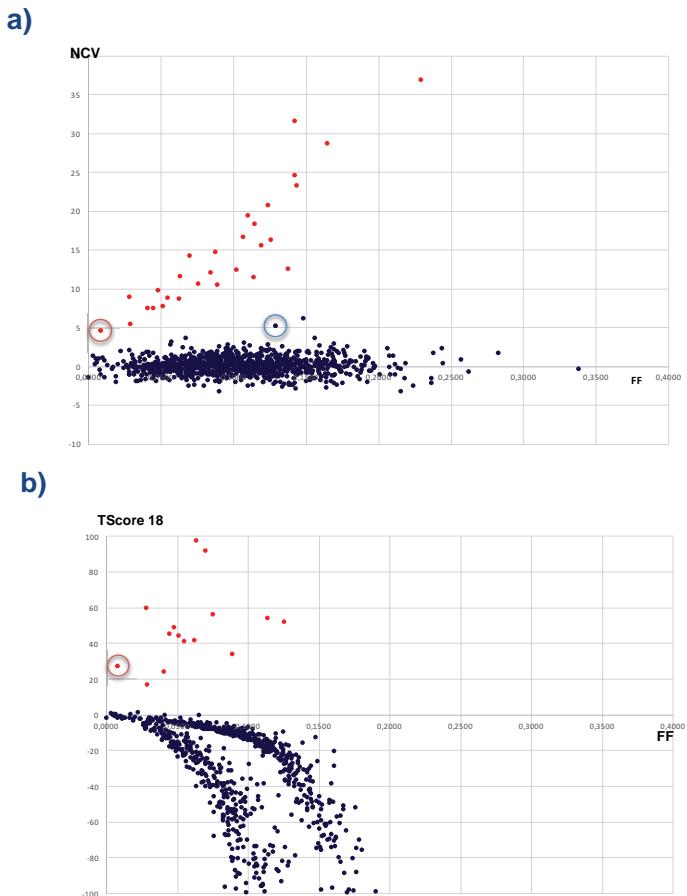


Figura 33. Comparación de los resultados del análisis del cfDNA para cromosoma 18 mediante valores normalizados (NCV) y TScore, en función de la fracción fetal (FF).

a) Valores normalizados (NCV) para el cromosoma 18 frente las FF correspondientes. Los métodos convencionales de MPSS utilizan un valor de *cut off* fijo (aproximadamente 3) para discriminar muestras normales y trisómicas. Las dos muestras destacadas ilustran la limitación de esta metodología ya que una trisomía 18 con baja FF (círculo rojo) puede tener un valor de NCV similar al de una muestra negativa con una FF mayor (círculo azul).

b) Valores TScore para trisomía 18 frente las FF correspondientes. Las trisomías 18 (rojo) han podido ser inequívocamente discriminadas independientemente de la FF. Muestras con menor FF pueden resultar en un score más alto como resultado, por ejemplo, de una mayor profundidad de secuenciación. La muestra destacada con FF<1% presenta Tscore mayor al de otra con FF del 4%.

Los valores NCV obtenidos para los cromosomas sexuales junto con el algoritmo lógico utilizado para el análisis de estos cromosomas, ha permitido la determinación del sexo fetal y aneuploidías de los cromosomas sexuales en las 709 muestras que han sido correctamente identificadas (Fig.34).

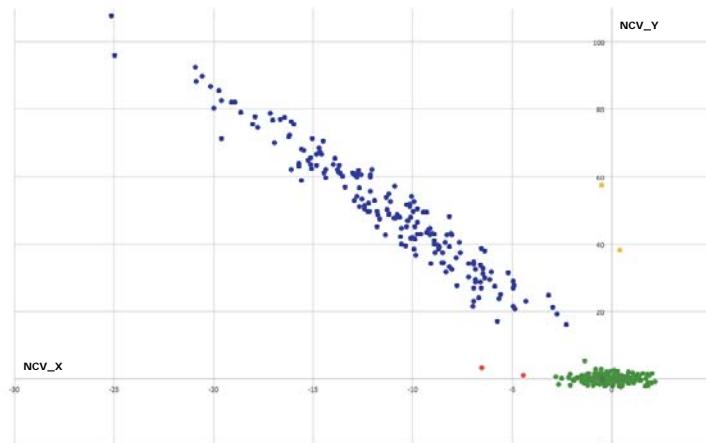


Figura 34. Resultados del análisis de los cromosomas X e Y. Los fetos femeninos (verde) se identifican por valor NCV_Y próximo a 0 y $-3 < NCV_X < 3$, para los fetos masculinos (azul) a valores de NCV_X negativos corresponden NCV_Y positivos que aumentan proporcionalmente a la fracción fetal. En amarillo, los casos XXY y en rojo las 45,X.

En total, 23 muestras (3 correspondientes a muestras procedentes de gestaciones con trisomía 21 y 20 procedentes de gestaciones euploides) no han alcanzado los estándares de calidad para la secuenciación y por tanto no se ha podido obtener un resultado válido (FR 1,3%). El motivo de fallo más común ha sido una distribución de fragmentos cortos fuera del rango esperado (11 casos); seguido por una cobertura final obtenida por debajo de la necesaria para establecer la FF en la muestra (falta de profundidad de secuenciación, 4 casos) y por la cobertura insuficiente para la FF observada (3 casos). Una muestra con

Resultados

una concentración de DNA inusualmente elevada se ha eliminado del ensayo de secuenciación y tampoco ha sido analizada.

Los resultados correspondientes al análisis de aneuploidías en esta serie de validación se muestran en la Tabla 11. Con los valores de cutt-off establecidos se han identificado correctamente todos los casos de trisomía 21 y 18, y 12 de los trisomía 13. La fracción fetal detectada en las muestras normales ha variado entre 0,3 y 33,8% (media 10,8%). La FF observada en las muestras trisomía 21 ha oscilado entre el 3,8 y el 19,8% (media 10,7%), en las muestras trisomía 18 ha sido del 0,8 al 23% (media 9,6%) y en las muestras trisomía 13 del 4 al 15,3% (media 8,6%). En 80 muestras, todas ellas correctamente identificadas, la FF obtenida ha sido inferior al 4%, situándose por debajo del 1% en 9 casos euploides y una trisomía 18. Una muestra procedente de una gestación trisomía 18 con una FF del 11% y un valor de TScore de -18 se ha clasificado como normal.

Tabla 11. Resultados de TScores y FF obtenidos para cada tipo de muestra.

Resultado	Euploide (n=1579)	Trisomía 21 (n=59)	Trisomía 18 (n=32)	Trisomía 13 (n=12)
Tscore para trisomía 21	-46,604 (-1074,210;0,992)	109,701 [7,206;392,051]	-31,66 (-294,726;-1,109)	-31,12 (-121,86;-5,228)
Tscore para trisomía 18	-75,304 (-1960,640;1,010)	-65,412 [-322,157;-3,621]	176,761 (-17,892*;765,178)	-46,71 (-247,158;-7,154)
Tscore para trisomía 13	-1295,066 (-2591,597;158,146*)	-85,081 [-449,561;-1,338]	-63,595 (-655,947;1,990)	171,881 (23,855;479,514)
Fracción fetal (%)	10,8 (0,3;33,8)	10,7 (3,8;19,8)	9,6 (0,8;23,0)	8,6 (4,0;15,3)
Cutt-off				
Trisomía 21 Tscore > 1,5, n (%)	0	59 (100)	0	0
Trisomía 18 Tscore > 3, n (%)	0	0	31 (96,7)	0
Trisomía 13 Tscore > 3, n (%)	1 (0,06)	0	0	12 (100)

La tasa de detección (DR) para trisomía 21, trisomía 13 y aneuploidías de los sexuales ha sido del 100% y del 96,7% para trisomía 18. Únicamente se ha detectado un falso positivo de trisomía 13, con un TScore de 158 y una FF del 10%; de manera que la tasa de falsos positivos para aneuploidías ha sido inferior

al 0,1% ($FPR=0,06\%$). El valor predictivo positivo (VPP) para trisomías 21 y 18 y para aneuploidías de los sexuales ha sido del 100%, y para trisomía 13 del 92,3%; mientras que el valor predictivo negativo (VPN) ha sido del 100% para trisomía 21 y 13 y aneuploidías sexuales, y del 99,94% para la trisomía 18. La sensibilidad ha sido del 100% para todos los casos, con la excepción de la trisomía 18 (96,88%). La especificidad ha sido del 99,94% para la trisomía 13 y del 100% para 18 y 21 (Tabla 12).

Tabla 12. Eficiencia del test NeoBona en la detección de aneuploidías en este estudio.

		Valor	(95% CI)
Trisomía 21	DR	>99,9%	
	Sensibilidad	100.00%	(93.94% a 100.00%)
	Especificidad	100.00%	(99.77% a 100.00%)
	VPP	100.00%	(93.94% a 100.00%)
	VPN	100.00%	(99.77% a 100.00%)
Trisomía 18	DR	>97%	
	Sensibilidad	96.88%	(83.78% a 99.92%)
	Especificidad	100.00%	(99.78% a 100.00%)
	VPP	100.00%	(88.78% a 100.00%)
	VPN	99.94%	(99.66% a 100.00%)
Trisomía 13	DR	>99,9%	
	Sensibilidad	100.00%	(73.54% a 100.00%)
	Especificidad	99.94%	(99.67% a 100.00%)
	VPP	92.31%	(63.97% a 99.81%)
	VPN	100.00%	(99.78% a 100.00%)
Aneuploidías X,Y	DR	>99,9%	
	Sensibilidad	100.00%	(39.76% a 100.00%)
	Especificidad	100.00%	(99.78% a 100.00%)
	VPP	100.00%	(39.76% a 100.00%)
	VPN	100.00%	(99.78% a 100.00%)

4.2. Aplicación clínica del análisis del cfDNA

4.2.1. Determinación no invasiva del sexo fetal

Se han analizado 1.251 muestras de sangre periférica de gestantes en las semanas 6 a 34 de gestación (media: 11) para la determinación no invasiva del sexo fetal. La indicación diagnóstica ha sido el riesgo de Distrofia muscular de Duchenne en 2 casos y de Enfermedad de Bruton en otros 2 (ambas patologías de herencia ligada al sexo). En más del 99% de los casos (1.202) el estudio se ha llevado a cabo sin indicación clínica y en uno la paciente estaba en tratamiento con dexametasona por riesgo de hiperplasia adrenal congénita.

No se han podido analizar 44 muestras (3,5%) por diversos motivos: la presencia de hemólisis después de la separación del plasma (30 casos), debido a la baja edad gestacional (inferior a 8 semanas) en el momento de la extracción de sangre (2 casos), obtención de volumen de plasma insuficiente (1 caso), y por incidencias en el transporte al laboratorio (11 casos; en 2 casos los tubos llegaron rotos y 9 muestras llegaron al laboratorio en un plazo superior a las 24 horas posteriores a la extracción).

El análisis del cfDNA se ha llevado a cabo en 1.207 muestras (Fig.35). En 1.102 casos (91%) se ha obtenido un resultado concluyente a partir de una primera muestra. En 60 no ha sido posible obtener un resultado concluyente pese a la repetición del análisis a partir de las segundas alícuotas de plasma recogidas y almacenadas por lo que se ha solicitado nueva muestra de la paciente. Se han recibido 45 nuevas extracciones de sangre periférica, obteniéndose un resultado válido en todas ellas. Así pues, la determinación del sexo fetal ha sido posible en un total de 1.147 pacientes (95%) y en 15 (5%) el resultado final ha sido no concluyente.

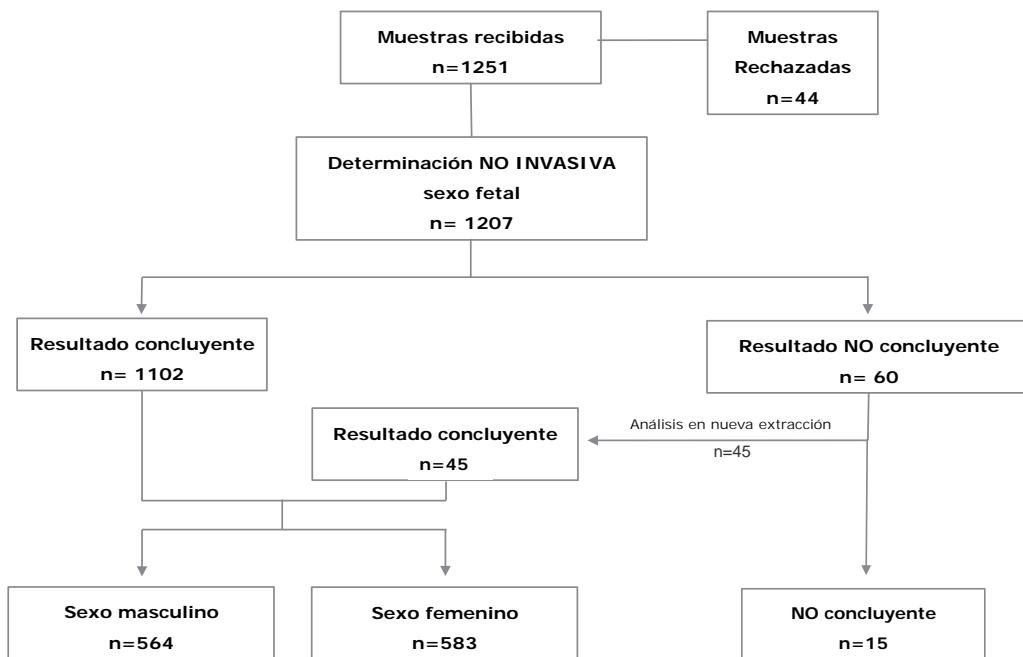


Figura 35. Resultados obtenidos en nuestro estudio para la determinación del sexo fetal en muestras clínicas.

En 564 (49,2%) muestras se ha detectado la presencia del gen SRY, resultado compatible con la presencia de fetos de sexo masculino; mientras que en 583 (50,8%) dicha secuencia no ha sido detectada en ninguna de las réplicas, siendo este resultado compatible con la presencia de fetos de sexo femenino (Tabla 13). Todos los casos de sexo femenino se han confirmado mediante análisis de una segunda extracción de DNA a partir de segunda alícuota de plasma almacenada. La correcta extracción de DNA se ha confirmado en ambas extracciones mediante la detección de la secuencia RHD (utilizando la Multiplex 2) o de la β -actina en los casos de gestantes RhD negativas.

Tabla 13. Resultados obtenidos en la aplicación clínica de la detección del gen SRY en DNA fetal libre en plasma materno.

	Detección en plasma (nº muestras)	Recién Nacidos (nº muestras)	Sexo fetal
SRY Positivo	564 (49,2%)	561 (48,9%)	Masculino
SRY Negativo	583 (50,8%)	586 (51,1%)	Femenino
Total	1.147	1.147	

La secuencia SRY se ha detectado en 3 casos correspondientes a fetos femeninos diagnosticados por ecografía y en uno correspondiente a un feto de sexo masculino no se ha obtenido amplificación de la secuencia SRY. El análisis en nueva muestra de sangre materna ha confirmado la presencia de tres fetos femeninos y uno masculino, resultados compatibles con los datos ecográficos respectivos.

En una muestra se ha detectado SRY en todas las réplicas con valores de Ct<28, compatible con la presencia de DNA de sexo masculino en sangre materna de origen no fetal. La paciente se sometió a una amniocentesis para la realización de diagnóstico prenatal de aneuploidías y se confirmó la presencia de un feto de sexo femenino. No obstante, se ha confirmado la presencia de DNA de sexo masculino en sangre materna mediante QF-PCR y detección de SRY. Un examen de la historia clínica de la paciente nos ha permitido averiguar que fue sometida a un trasplante de médula ósea en la adolescencia, explicando así la discrepancia de resultado entre el análisis en plasma y líquido amniótico.

La sensibilidad del ensayo ha sido del 99,8% (560/561, 95%CI 99,01%-100%) y la especificidad del 99,5% (582/583, 95%CI, 98,52%-99,89%). El Valor Predictivo Positivo ha sido del 99,5% (95%CI, 98,45%- 99,89%), con una

tasa de falsos positivos de 0,53%. El Valor Predictivo Negativo observado ha sido del 99,8% (95%CI, 99,05%-100%), con una tasa de falsos negativos del 0,17%.

4.2.2. Determinación no invasiva del RhD fetal

La determinación no invasiva del RhD fetal en sangre materna se ha ofrecido a un total de 302 gestantes RhD negativas de las que 284 han aceptado (94%); 268 con embarazos únicos y 16 gemelares. El origen étnico de la población estudiada ha sido: un 84% caucásicas (n=238), 12% latinoamericanas (n=35), 1,4% norte-africanas (n=4), 1,1% paquistaníes (n=3), 0,4% orientales (n=1), 0,4% subsaharianas (n=1), y un 0,7% procedente de otras etnias (n=2).

Durante el estudio se han detectado dos casos en los que los valores de Ct obtenidos para la detección de las secuencias en el gen RHD eran compatibles con la presencia de RHD de origen materno en ($Ct < 30$). El resultado RHD positivo obtenido en el botón celular de sangre periférica de las pacientes confirmó el origen materno de dichas secuencias por lo que estas muestras se descartaron en los estudios posteriores.

En 184 de las 282 muestras restantes se ha obtenido un resultado positivo para la detección de RHD (fetos RhD positivos, 65%) y un resultado negativo en 91 (fetos RhD negativos, 32%), 40 de ellas de sexo femenino (Tabla 14). En 7 casos el resultado obtenido en el genotipado antenatal ha sido compatible con la presencia de variantes estructurales del gen RHD en el feto, 3 de ellas correspondientes a gestantes caucásicas y 4 a latinoamericanas. En tres de las muestras se ha detectado amplificación de los exones RHD 7 y 10 pero ausencia del exón 5, patrón compatible con la presencia del pseudogen (RHD Ψ) o de la variante RHDVI, compatible con fenotipo positivo en el feto (Fig.36). El fenotipo RhD se ha confirmado mediante serotipado en los recién nacidos (RhD positivos),

Resultados

mientras que el seguimiento del genotipado en sangre periférica de los recién nacidos, ampliado con la detección del exón 6 del RHD, ha confirmado la posible presencia de la variante RHDVI tipo1 o tipo 4 en dos de los casos (con fenotipo RhD positivo). En el tercero de ellos, la presencia de una variante no ha podido ser confirmada ya que todos los exones, incluido el exón 5 no detectado en el genotipado antenatal, se han detectado en muestra postnatal (Tablas 14 y 15). El estudio del exón 10 del RHD se ha utilizado para la confirmación de los 91 resultados negativos en una segunda extracción de DNA. En 4 muestras ésta ha sido la única secuencia RHD detectada, compatible con la presencia de una variante híbrida RHD-CE-D y fenotipo RhD negativo (Fig.36). El análisis postnatal ha confirmado los resultados obtenidos en plasma materno.

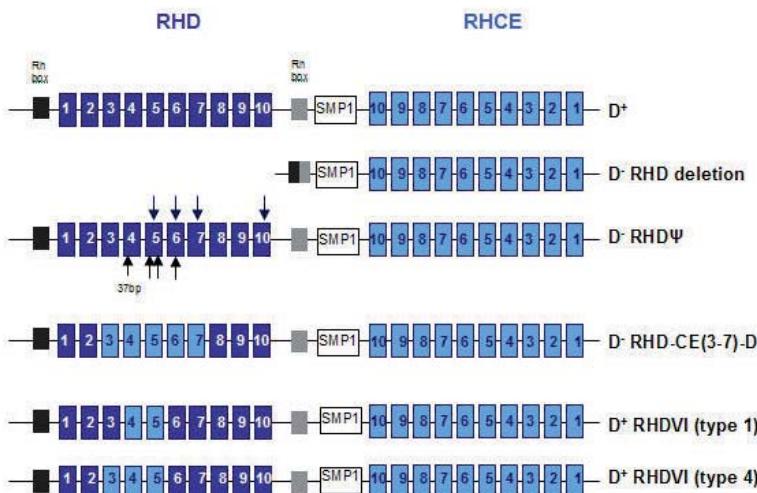


Figura 36. Diagrama de los genes del Rh detectados. El estado Rh negativo (D-) se debe principalmente a la pérdida completa del gen RHD. Los *primers* y sondas seleccionados para los exones 5 y 6 (flechas superiores) diseñados en puntos de *missmatch* (flechas inferiores) han permitido la detección de variantes comunes del gen RHD. El pseudogen del RHD se ha detectado por la falta de amplificación para los exones 5 y 6 en presencia del 7 y el 10. También se han detectado otras variantes del gen, como los híbridos D negativos RHD-CE-D (en la figura, RHD-CE(3-7)-D) o las variantes D positivas RHDVI tipos 1 y 2. (de M.Grande et.al, 2012).

Tabla 14. Resultados obtenidos en el genotipado en DNA fetal libre en plasma comparados con los obtenidos en los recién nacidos mediante serotipado.

Fenotipo fetal	Genotipado antenatal	Recién Nacidos
RhD Positivo	184	184
Possible variante RhD Positivo	3 ¹	2
RhD Negativo	91	91
Possible variante RhD Negativo	4 ²	5 ³
No informativo	2 ⁴	-
TOTAL	284	282

⁽¹⁾ Exones 6, 7 y 10 positivos; exón 5 negativo, compatible con la presencia de las variantes RHDVI tipo 1 o 4 (de fenotipo RhD positivo).

⁽²⁾ Exones 5,6,y 7 negativos, exón 10 positivo; compatible con la presencia de la variante RHD-CE-D⁵ (fenotipo RhD negativo).

⁽³⁾ Recién Nacido RhD negativo, positivo para todos los exones estudiados, compatible con una mutación *de novo* o la presencia de una variante RHD no detectada de fenotipo RhD negativo.

⁽⁴⁾ Dos casos de gestantes RHD positivas.

Los resultados del serotipado postnatal de RhD han sido concordantes con los obtenidos mediante análisis antenatal en plasma materno en el 99,6% (281/282) de los embarazos, con un 100% de sensibilidad (95%CI, 98,04%-100%) y un 99% de especificidad (95%CI 94,39%-99,97%). El valor predictivo positivo ha sido del 99,5% (95%CI 97,06%-99,99%) y el valor predictivo negativo del 100% (95%CI, 96,23%-100%).

En una muestra procedente de una gestación gemelar se ha detectado amplificación de los exones RHD 5 y 7, mientras que el resultado del serotipado postnatal en los dos recién nacidos ha sido RhD negativo. El genotipado postnatal de los dos gemelos ha confirmado la ausencia de los exones RHD analizados (5, 6, 7 y 10) en uno de los gemelos, serológicamente RhD negativo, y la presencia de las mismas en el segundo gemelo, resultado compatible con el obtenido en el análisis antenatal pero no con el tipado postnatal. El análisis de cigosidad en muestra paterna, ha revelado el estado heterocigoto del mismo,

Resultados

resultado que podría explicar los genotipos discrepantes entre gemelos (uno con genotipo RHD positivo y el otro RHD negativo para las secuencias estudiadas). Una mutación *de novo* o un reordenamiento que inactivara el gen RHD podría explicar esta discrepancia (genotipo positivo vs fenotipo negativo en uno de los gemelos).

En la Tabla 15 se resumen de los resultados obtenidos en la aplicación clínica de la determinación no invasiva del RhD fetal. Únicamente el 5% de las gestantes portadoras de fetos RhD negativos han solicitado la inmunoprofilaxis (administración de inmunoglobulina anti-D), de manera que no se ha administrado tratamiento antenatal profiláctico en el 95% de los casos de gestantes portadoras de fetos RhD negativos.

Tabla 15. Resultados de la aplicación clínica de la determinación no invasiva del RhD fetal (Grande et al., 2013).

Resultado Prenatal	RHD exón 5	RHD exón 7	DYS14	RHD exón 10	SRY	RHD exón 6	Administración gammaglobulina Anti-D
Masculino positivo (n=101)	101	101	101	no testado	no testado	no testado	Sí
Masculino negativo (n=51)	-	-	51	-	-	no testado	No
Femenino positivo (n=83)	83	83	-	no testado	no testado	no testado	Sí
Femenino negativo (n=40)	-	-	-	-	-	no testado	No
Masculino RHD-VI tipo1 o 4 (n=1)	-	1	1	1	1	1	Sí
Femenino RHD-VI tipo1 o 4 (n=2)	-	2	-	2	-	2	Sí
Masculino RHD-CE-D (n=2)	-	-	4	4	4	no testado	No

4.2.3. Detección no invasiva de aneuploidías fetales

Se han recibido un total de 2.840 muestras de sangre periférica de gestantes para la detección no invasiva de aneuploidías fetales en las semanas 10 a 34 de gestación (media: 13⁺⁴). Doce de ellas se han descartado: 10 por llegar al laboratorio en un plazo superior a los 5 días, dos muestras por presentar un volumen insuficiente (<2 mL) y una más por llegar coagulada al no utilizarse el contenedor adecuado.

La indicaciones más frecuentes para el estudio han sido la ansiedad materna en el 41,2% de los casos y la edad materna avanzada en el 26,7%, seguidas del cribado bioquímico combinado alterado (13,9%). Un 3,5% de las pacientes presentaba ecografía anómala, un 2,5% tenía historia clínica sugestiva de aneuploidía y cerca del 13% indicaba otros motivos de estudio sin especificar (Fig.37).

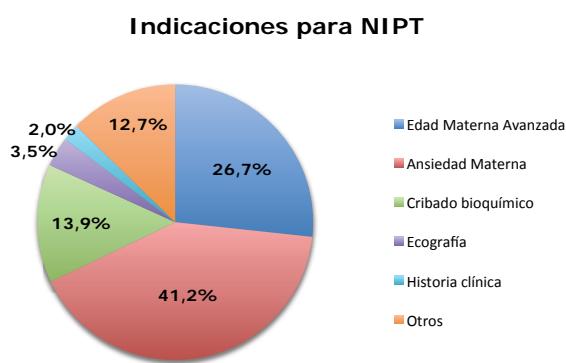


Figura 37. Distribución de las indicaciones para el análisis de aneuploidías en cfDNA en nuestro estudio.

Para la detección de las trisomías 21, 18 y 13 se han analizado un total de 2.828 muestras correspondientes a 2.774 gestantes; de las que 1.603 solicitaban además el análisis de las aneuploidías de los cromosomas sexuales. Un total de

Resultados

93 correspondían a gestaciones gemelares (3,3%) y 335 pacientes se habían sometido a un tratamiento de fecundación in vitro (52 de ellas con resultado de gestación gemelar). Se ha obtenido un resultado válido en 2.711 muestras (97,7%). En 63 el análisis ha fallado y se ha ofrecido a las pacientes la posibilidad de repetirlo en una nueva extracción de sangre periférica (Fig.38). Se han recibido y analizado 54 nuevas muestras, obteniéndose un resultado válido en 48 de ellas. En total, se han obtenido 2759 resultados (99,5%). Únicamente en 15 casos (0,54%) no ha sido posible obtener un resultado válido; en 9 las pacientes han optado por no repetir el análisis y en 6 ha fallado por segunda vez. Las muestras se han informado como compatibles con la ausencia de aneuploidía o la presencia de trisomía incluyendo la fracción fetal observada en la muestra.

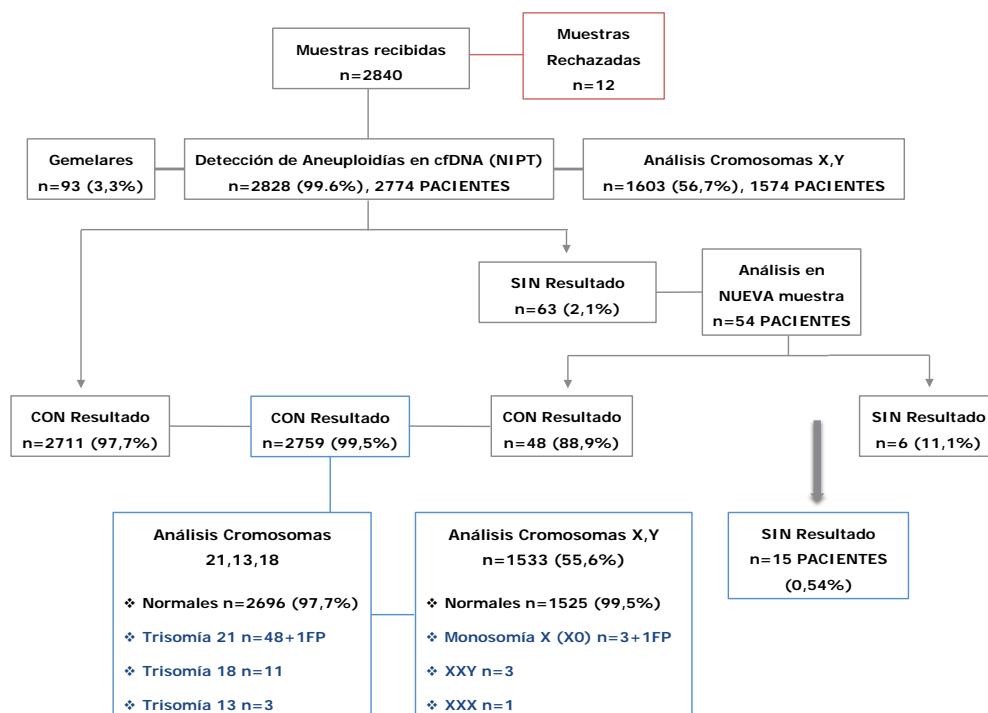


Figura 38. Resultados de la aplicación clínica de la detección de aneuploidías fetales mediante análisis de cfDNA.

La distribución de trisomías 21, 18 y 13 por motivo de estudio se muestra en la Figura 39 y se han observado más frecuentemente en casos de cribado bioquímico alterado (33,3%) y ecografía anómala (25%), seguidos por la ansiedad materna y la edad materna avanzada (16 y 14%).

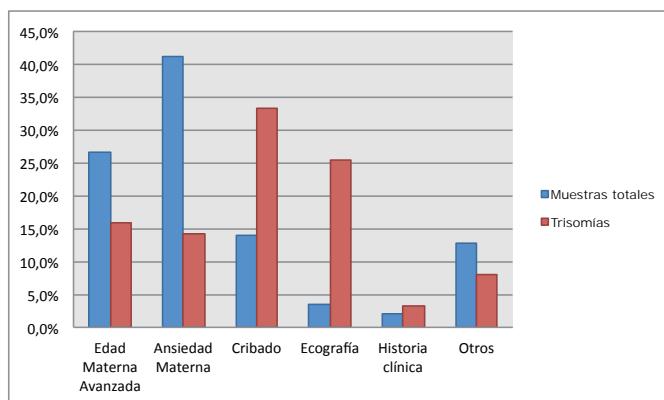


Figura 39. Frecuencia de las indicaciones para la detección no invasiva de aneuploidías de muestras trisómicas vs. la totalidad de las muestras.

Se han detectado 8 aneuploidías de los cromosomas X,Y en las 1.533 muestras analizadas para los cromosomas sexuales: 4 compatibles con la presencia de monosomía X (X0), 3 con Síndrome de Klinefelter (47,XXY) y uno con trisomía XXX. Se han observado 1.383 gestaciones de fetos de sexo masculino (56 de ellas gemelares, donde la detección del cromosoma Y indica la presencia de al menos un feto masculino) y 1349 de fetos de sexo femenino (29 gemelares).

El test ha fallado en 63 de 2.774 casos (FR: 2,1%), uno de ellos correspondiente a una gestación gemelar y 3 a gestaciones únicas de embarazos por fecundación in vitro. Los motivos de fallo más comunes han sido la cobertura insuficiente para la fracción fetal observada (43%) y la distribución de fragmentos fuera del rango esperado (30%).

Resultados

El TScore medio observado en los 49 casos de trisomía 21 ha sido de 145,865 (3,755-443,121) (Tabla 16). Once muestras han sido compatibles con la presencia de trisomía 18 con TScore medio de 100,021 (3,565-332,255). También se han detectado 3 trisomías 13 con TScores de 9,858; 27,234 y 81,035. Los valores de TScore para las muestras no aneuploidies han variado en un rango de -1774,145 a 1,382 y la fracción fetal media observada ha sido del 10,8% (1-27%). Los resultados de trisomía 21, 18 y 13 se han confirmado mediante técnica diagnóstica en todos los casos excepto en uno (falso positivo para trisomía 21, con un TScore de 3,755 y una FF del 3%). En cuanto a las aneuploidías de los cromosomas sexuales, los resultados han sido confirmados en ser confirmados en el 75% de las muestras (6/8), con 5 resultados confirmados (X0, XXX y XXY) y uno falso positivo para monosomía X. Hasta el momento, no se dispone de datos de seguimiento postnatal al tratarse de gestaciones todavía en curso.

Tabla 16. Detección de aneuploidías en cfDNA mediante el test Neobona.

Resultado	Muestras	NeoBona (TScore)	Confirmadas	Falsos Positivos	FPR	VPP 95% CI
Trisomía 21	49	145,865 (3,755-443,121)	48	1	0,03%	97,96%
Trisomía 18	11	100,021 (3,565-332,255)	11	-	-	100%
Trisomía 13	3	39,376 (9,858;81,035)	3	-	-	100%
45,X	4	-	3	1	0,1%	
XXY	3	-	1	-	-	75%
XXX	1	-	1	-	-	
Ausencia de Aneuploidía	2688	-78,269 (-1774,145-1,382)	-	-	-	
No válido	69		-	-	-	
Total	2828		67		0,13%	

FPR: tasa de falsos positivos.

VPP: valor predictivo positivo.

*: 63 resultados no válidos más 6 que fallaron por segunda vez.

Las tasas de falsos positivos observadas para las trisomías 13, 18 y 21 han sido del 0,0%, 0,0% y 0,03% respectivamente, y del 0,1% para la monosomía X; con una FPR global del 0,13% (Tabla 16). El valor predictivo positivo (VPP) para trisomías 13 y 18 ha sido del 100%, y del 97,96% para trisomía 21.

5. DISCUSIÓN

El descubrimiento del DNA fetal libre circulante en 1997 abrió nuevas perspectivas en el diagnóstico prenatal, al permitir el acceso a material genético fetal sin el riesgo de pérdida asociado a técnicas invasivas como la amniocentesis o la biopsia corial. A finales de los 90 ya se disponía de técnicas de PCR lo bastante sensibles como para poder detectar pocas copias de una secuencia fetal específica en un elevado *background* de DNA de origen materno. A partir del año 2000 el desarrollo de la cuantificación por PCR a tiempo real ha permitido alcanzar los niveles de sensibilidad y especificidad necesarios para la aplicación clínica de su análisis. El primer marcador de DNA fetal ha sido el gen SRY, cuya detección en plasma materno permite la determinación del sexo fetal. Basado en el mismo principio de detección de secuencias de DNA heredadas por parte del padre no presentes en la madre, la detección del gen RHD en gestantes RhD negativas ha sido la primera aplicación de diagnóstico prenatal no invasivo desde el 2001 (Finning et al., 2002). La aparición de la secuenciación masiva en el 2005 abre una nueva ventana de análisis del cfDNA y en 2008 se utiliza por primera vez para la detección no invasiva de aneuploidías fetales (Chiu et al., 2008; Fan et al., 2008). Sin embargo, la introducción de este tipo de ensayos se ha visto relativamente limitada a pocos laboratorios altamente especializados, principalmente debido a la dificultad de desarrollar protocolos diagnósticos específicos, robustos, reproducibles y con acceso a las muestras adecuadas para poder validar los mismos satisfactoriamente antes de su aplicación clínica.

En esta tesis doctoral se han desarrollado y validado dos protocolos automatizados para la determinación prenatal no invasiva del RhD y del sexo fetales, llevándose a cabo su aplicación clínica. Así mismo, se ha validado un nuevo método de detección de aneuploidías fetales que incorpora por primera vez en el NIPT la secuenciación masiva bidireccional y se ha aplicado en muestras clínicas.

5.1. Análisis del DNA fetal

El análisis del DNA fetal libre en plasma puede verse limitado debido a diversos factores que afectan a la cantidad y calidad del DNA obtenido, por lo que es necesario minimizar sus efectos para poder desarrollar métodos que permitan aumentar la sensibilidad en su detección y reducir el riesgo de resultados falsos positivos y negativos y las implicaciones clínicas que éstos conllevan.

El porcentaje de DNA fetal circulante en plasma materno puede verse alterado debido a diversos factores biológicos; disminuyendo al aumentar el peso materno probablemente debido a que el recambio de adipocitos aumenta el porcentaje de DNA materno circulante (Ashoor et al.,2012; Wang et al.,2015), en presencia de patologías placentarias (Levine et al.,2004) o incluso en presencia de aneuploidías fetales (Zhong et al.,2000; Bauer et al.,2006; Gerovassili et al.,2007). Pero la fracción fetal también puede verse alterada por factores relativos al procesamiento de la muestra. Entre ellos, se han descrito variaciones debidas al tiempo transcurrido desde la extracción de sangre y la separación del plasma, la temperatura de almacenamiento, el tratamiento posterior que se hace de éste (por ejemplo doble o simple centrifugación, tratamientos con formaldehído), o incluso el volumen total de sangre periférica a partir de la cual se realice la extracción de DNA (Chiu et al.,2001; Lo and Poon, 2003; Dhallan et al., 2004; Barret et al.,2011; Hidstrand et al.,2012). Si bien todas estas variables pueden ser factores limitantes, para un laboratorio que actúe como centro de referencia para el análisis de DNA fetal, el tiempo transcurrido entre la extracción de sangre y la llegada de la muestra al laboratorio es un punto crítico y debe ser el menor posible. La lisis de las células sanguíneas maternas que se produce en el período comprendido entre la extracción y la separación del

plasma previa a la extracción de DNA implica una reducción de la fracción fetal; y puede verse incrementada por otros factores como la temperatura de almacenamiento, el anticoagulante utilizado o las condiciones de transporte de las muestras (Jorgez et al., 2006; Müller et al., 2011, Ordoñez et al., 2013). Por todo ello, el desarrollo de un método de extracción eficiente y de ensayos de PCR robustos es esencial para poder llevar a cabo este tipo de análisis (Barret et al., 2011; Ordoñez et al., 2013).

Previamente a la aplicación clínica de los protocolos desarrollados para la determinación del sexo y RhD fetales se ha llevado a cabo un estudio para evaluar la estabilidad de la muestra utilizando tubos EDTA-K3, de uso habitual para la obtención de sangre periférica; y la eficiencia de su procesamiento posterior. Para ello se ha utilizado la detección del gen SRY como marcador de DNA fetal en muestras seleccionadas de gestantes portadoras de fetos masculinos. También se ha evaluado la posibilidad de utilizar muestras de plasma separadas del botón celular una vez transcurrido el tiempo máximo aconsejado (24 horas) para el envío de muestras desde varios lugares de España y Europa a nuestro laboratorio central de diagnóstico en Barcelona. La cuantificación del gen SRY en los ensayos de centrifugación realizados ha evidenciado que es posible obtener hasta el doble de DNA fetal en la extracción si la separación del plasma se lleva a cabo con una segunda centrifugación a velocidad más elevada y en centrífuga refrigerada. Nuestros datos demuestran que el incremento de la velocidad de centrifugación permite eliminar posibles restos celulares de origen materno que pueden interferir en la extracción del DNA y disminuir la fracción fetal sin alterar el DNA fetal libre; y reducir la acumulación de otros posibles inhibidores de PCR. Así mismo, la refrigeración permite la estabilización de las moléculas de ácidos nucleicos. La secuencia SRY se ha detectado correctamente en 158 muestras procedentes de mujeres

embarazadas portadoras de fetos de sexo masculino, almacenadas a 4°C un mínimo de 24-48 horas antes de la separación del plasma mediante doble centrifugación. Estos resultados confirman que las muestras se mantienen lo suficientemente estables en tubos estándar de EDTA-K3 durante un período de hasta 48 horas, obteniéndose la cantidad de DNA fetal suficiente para la detección de secuencias como el SRY o el RHD.

Recientemente se ha desarrollado un tipo de tubo específico para el análisis de DNA circulante (*Streck Cell-Free DNA™ BCT*) que contiene estabilizantes que reducen al mínimo la lisis de linfocitos y que inhiben la degradación por nucleasas de DNA extracelular durante 5-7 días, permitiendo que la fracción fetal se mantenga constante hasta los 7 días posteriores a la toma de muestra (Fernando et al., 2010). Este tipo de tubo es muy útil para ensayos que se basan en una cuantificación precisa del DNA fetal por lo que ha sido el contenedor de elección para la detección no invasiva de las aneuploidías fetales mediante secuenciación masiva de cfDNA (Wong et al., 2013), aunque su uso para la determinación del sexo y el RhD fetales representaría un incremento de los costes para estas técnicas de más del 50%. Además, el coste de los mismos es superior al coste de los ensayos cualitativos para la detección específica de secuencias de origen paterno desarrollados en este estudio, que han mostrado su elevada eficiencia sin necesidad de una mayor estabilización de la muestra, lo que implica una reducción de los costes.

Otro de los puntos limitantes en el análisis del DNA fetal circulante en plasma es la cantidad de DNA obtenida. El método manual de extracción de DNA QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) se considera el método de referencia para el análisis del cfDNA (Chiu et al., 2001; Legler et al., 2007; Legler et al., 2009; Wong et al., 2013). No obstante, el uso de un extractor automático de ácidos nucleicos es de gran utilidad para la reducción del riesgo de errores en

el manejo de muestras o de contaminación cruzada, y para el aumento del rendimiento de los laboratorios de diagnóstico prenatal, contribuyendo también a la reducción de costes. En el presente estudio se ha desarrollado un protocolo para la determinación del sexo fetal a partir de plasma materno automatizando la extracción de DNA. Este sistema de extracción de ácidos nucleicos aprobado por la Agencia de Drogas y Medicamentos de E.E.U.U. (FDA) y la Comunidad Europea (marcado CE) para uso diagnóstico, se utiliza normalmente para la extracción de ácidos nucleicos de origen viral en muestras clínicas, con una eficiencia para la detección de secuencias diana en concentraciones de hasta 5 copias/mL mediante PCR. A pesar de que la cantidad de cfDNA obtenida utilizando este método de extracción ha sido menor en comparación con la observada al utilizar el método de extracción manual (QIAgen DSP Virus Kit), en nuestro estudio el método automático ha demostrado ser lo suficientemente robusto para la detección de secuencias específicas de DNA fetal sin afectar la sensibilidad de la PCR a tiempo real y sin dar lugar a resultados falsos negativos, siendo el método de extracción elegido para ensayos de tipo cualitativo.

Se han realizado diversos estudios de comparación de métodos de extracción manuales y automáticos que muestran resultados similares (Brojer et al.,2005; Clausen et al.,2007; Banzola et al.,2008; Huang et al.,2008). El extractor automático COBAS AmpliPrep evaluado y utilizado en este estudio presenta un elevado rendimiento, con capacidad para procesar 72 muestras por ensayo; en un sistema cerrado con muy poca manipulación de la muestra, lo que disminuye el riesgo de contaminación cruzada; permitiendo así la reducción de costes y el tiempo invertido en el proceso (Grande et al.,2013; Ordoñez et al.,2013). Así mismo, diversos grupos han presentado resultados de aplicación de protocolos de análisis de DNA fetal libre en plasma materno utilizando diferentes tipos de extracción automática con elevada sensibilidad y especificidad (Grill et al.,2009;

Akolekar et al., 2011; Macher et al., 2012). Sin embargo, algunos autores no han encontrado una diferencia significativa entre el uso de un método de extracción automática vs el manual (Horinek et al., 2008). Estas discrepancias pueden deberse a diferentes causas, como el número de muestras utilizadas en los estudios o el tipo de las mismas (suero o plasma) (Tabla 17). En este sentido, a pesar de que tanto en suero como en plasma materno se puede detectar DNA fetal, el plasma es la muestra más idónea debido a que contiene menos cantidad de DNA materno que el suero, muy probablemente porque en este último es capturado por la fase celular durante en el proceso de coagulación (Finning et al., 2008).

Tabla 17. Estudios de comparación de métodos de extracción de cfDNA manuales vs automáticos.

	Nº de muestras	Método manual	Método automático	Comparativa	Secuencia detectada
<i>Brojer et al., 2005</i>	255	QIAgen	NMAG	NMAG >QIAgen	RHD
<i>Huang et al., 2006</i>	9	HP-PCR Template	MagNa Pure	MagNa>HP-PCR	-
<i>Clausen et al., 2007</i>	75	QIAgen	NMAG	NMAG >QIAgen	RHD
<i>Banzola et al., 2008</i>	32	QIAgen	MagNa Pure	NMAG >QIAgen	DYS-14
<i>Horinek et al., 2008</i>	238	HP-PCR Template	MagNa Pure	sin diferencias	SRY-DYS-14
Presente estudio	158	QIAgen	COBAS Ampliprep	QIAgen>COBAS*	SRY

Los métodos manuales utilizados se basan en la extracción por columna.

* A pesar de que el método manual ha sido más eficiente que el automático; no se han observado resultados falsos negativos. HP-PCR Template: High Pure PCR Template Preparation Kit™; Roche Diagnostics; QIAgen: QIAgen Spin Column kits; NMAG: NucliSENS Magnetic System (Biomérieux); COBAS AmpliPrep: COBAS AmpliPrep, Roche Diagnostics.

Los estudios de evaluación de estabilidad de la muestra y de su procesado y el desarrollo de métodos específicos de PCR a tiempo real combinados con el empleo de un método de extracción automático, han permitido la implementación del análisis del DNA fetal en la rutina clínica del laboratorio de diagnóstico prenatal para la determinación del sexo y el RhD fetales en un total de 1.535 muestras clínicas consecutivas.

5.2. Determinación no invasiva del sexo fetal

La detección de secuencias del cromosoma Y en plasma materno es hasta el momento la manera más fiable de confirmar la presencia de DNA fetal en sangre materna. Desde su descubrimiento por Y.M.D. Lo en 1997, la determinación del sexo fetal ha sido una de las primeras aplicaciones clínicas de los test prenatales no invasivos (Zhong et al.,2000; Costa et al.,2002; Rijnders et al.,2003).

En el presente estudio, el método desarrollado para la determinación del sexo fetal, basado en la detección del gen SRY mediante PCR a tiempo real, se ha aplicado en un total de 1207 muestras de gestantes a partir de la octava semana de embarazo, siendo una de las series más amplia en muestras clínicas publicadas. Los valores de sensibilidad (99,8%) y especificidad (99,5%) obtenidos están por encima de la media observada en los estudios y revisiones publicados más recientemente (Tabla 18).

En un primer metanálisis realizado a partir de 57 estudios publicados se describe una sensibilidad y especificidad medias observadas del 95,4% y el 98,6% respectivamente (Devaney et al.,2011). En la revisión realizada por Wright y colaboradores en 2012, que incluye 90 estudios con un total de 10.587 muestras analizadas, la sensibilidad media observada es del 96,6% y la especificidad media del 98,9% (Wright et al.,2012). La pequeña diferencia observada entre ambas revisiones puede deberse a los ~3.500 casos adicionales incorporados en el estudio de Wright. No obstante, ambos estudios demuestran la fiabilidad de los ensayos desarrollados para la determinación no invasiva del sexo fetal. Más recientemente, en la revisión y metanálisis realizados por Mackie y colaboradores con la inclusión de 60 estudios que incluyen los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva, la sensibilidad media observada ha sido del 98,9% con una especificidad media del 99,6% (Mackie et al.,2016).

Tabla 18. Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para la determinación no invasiva del sexo fetal en diferentes estudios.

	Número de muestras	Sensibilidad [95%CI]	Especificidad [95%CI]
<i>Brojer et al., 2005</i>	746	95% [92-97]	99% [97-100]
<i>Galbiati et al., 2005</i>	1681	91% [89-93]	100% [99-100]
<i>Bustamante et al., 2008</i>	316	96% [92-99]	100% [99-100]
<i>Minon et al., 2008</i>	545	100% [99-100]	100% [99-100]
<i>Vodicka et al., 2008</i>	475	93% [89-96]	96% [92-98]
<i>Devany et al., 2011 (Metanálisis)</i>	6541	95,4% [94,7-96,1]	98,6% [98,1-99]
<i>Wright et al., 2012 (Metanálisis)</i>	10587	96,6% [95,2-97,7]	98,9% [98,1-99,4]
<i>Mackie et al., 2016 (Metanálisis)</i>	11179	98,9% [98,9-99,8]	99,6% [98,9-99,8]
Presente estudio	1207	99,8% [99-100]	99,5% [98,5-99,9]

El método de análisis más utilizado, la PCR cuantitativa a Tiempo Real, ha demostrado una mayor especificidad en comparación con otros métodos (PCR nested, PCR convencional, p.ej.), independientemente de la secuencia diana seleccionada como marcador, aunque los datos sugieren que SRY y DYS14 presentan una mayor especificidad frente a otras utilizadas (Picchiassi et al., 2008; Wright et al., 2012).

El valor predictivo positivo del ensayo desarrollado para la determinación del sexo fetal ha sido del 99,9% y el valor predictivo negativo del 99,3%, con una tasa de falsos positivos del 0,5% y de falsos negativos del 0,17%. En base a nuestra experiencia, y como otros estudios han sugerido previamente (Hromadnikova et al., 2005; Rijnders et al., 2004; Hyett et al., 2005; Ordoñez et al., 2013a), podemos afirmar que el análisis simultáneo de tres réplicas de cada muestra, así como la confirmación de los resultados negativos para la amplificación de SRY en nueva extracción de DNA a partir de una segunda

alícuota de plasma, permiten mejorar la sensibilidad y especificidad del ensayo; reduciendo así la tasa de falsos positivos y negativos.

La determinación no invasiva del sexo fetal está clínicamente indicada en casos de riesgo de enfermedades ligadas al Cromosoma X, hiperplasia adrenal congénita o genitales ambiguos en ecografía. Aunque es posible realizarla mediante ecografía a partir de las doce semanas de gestación, cuando empieza la diferenciación genital, la identificación de fetos masculinos a esta edad gestacional tiene menor sensibilidad que en segundo trimestre (Efrat et al.,1999). Así, en estos casos se recomienda la realización de diagnóstico prenatal mediante un método invasivo, como la biopsia de vellosidades coriales, con el riesgo de pérdida fetal que conlleva. El análisis del DNA fetal en plasma materno ofrece una alternativa válida y a baja edad gestacional, limitando la aplicación de métodos invasivos para diagnóstico prenatal a aquellas gestantes portadoras de fetos masculinos (Hyett et al.,2005; Hill et al.,2011; Pan et al.,2014). Desde la implementación en la rutina clínica del análisis del DNA fetal en plasma en países como el Reino Unido se ha observado una reducción de más del 40% del uso de test invasivos en gestantes de riesgo para enfermedades ligadas al sexo fetal (Hill et al.,2012).

La determinación del sexo fetal también es de utilidad clínica para el seguimiento prenatal en los casos de hiperplasia adrenal congénita (CAH), ya que la virilización asociada a esta enfermedad sólo se produce en fetos femeninos. La administración de dexametasona a edad gestacional temprana reduce los efectos de la enfermedad (Joint LWPES/ESPE CAH Working Group,2002), y diferentes autores sugieren reducir la terapia con esteroides a aquellas gestantes identificadas como portadoras de fetos femeninos mediante el análisis del DNA fetal en plasma materno (Bartha et al.,2003; Hyett et al.,2005).

En este tipo de gestaciones de riesgo cobra especial importancia la tasa de falsos negativos que ofrezca el test, ya que puede tener un efecto directo en el tratamiento clínico de la gestación. La identificación errónea de un feto masculino como femenino podría llevar a la no realización de una prueba diagnóstica invasiva necesaria con consecuencias clínicas importantes. No así para los falsos positivos; en un feto identificado erróneamente como masculino se procedería al seguimiento habitual (realización de diagnóstico prenatal), que permitiría detectarlo en los casos de enfermedades ligadas a Cromosoma X. La tasa de falsos negativos observada en nuestro estudio fue del 0,17% (1/583), muy por debajo de la publicada en otros estudios de aplicación clínica, con tasas de falsos negativos superiores al 3% (Bustamante et al, 2008; Vodicka et al.,2008). El único falso negativo observado podría deberse a la baja fracción fetal presente en la muestra en una primera extracción unida a la baja edad gestacional (inferior a 9 semanas), ya que la presencia de un feto masculino ha podido ser confirmada en un nuevo análisis a edad gestacional más avanzada.

En uno de los casos analizados se ha detectado la presencia de SRY con un Ct<28, compatible con la presencia de DNA masculino de origen no fetal. La presencia de DNA masculino en sangre total de la gestante se ha confirmado mediante la detección de SRY por QF-PCR. El posterior estudio de la historia clínica de la paciente ha permitido descubrir que se había sometido a un trasplante de médula en la adolescencia que había provocado un desplazamiento completo de las células hematopoyéticas por las del donante, de sexo masculino. Este hecho explica la discrepancia entre el resultado obtenido en plasma y el sexo fetal femenino confirmado mediante amniocentesis, ya que la mayor parte del DNA circulante en sangre proviene de las células hematopoyéticas maternas (Lui et al.,2002).

Tres casos se han sido confirmados como falsos positivos al analizar una segunda muestra de las pacientes. La causa más probable de la discordancia en estas muestras es la contaminación de la muestra con DNA de sexo masculino durante el ensayo de PCR.

La indicación de la gran mayoría de las muestras recibidas a lo largo de este estudio ha sido la ansiedad/curiosidad materna. Únicamente en 5 casos se tuvo constancia de una indicación clínica para el análisis, a pesar del elevado número de muestras analizadas. En cuatro casos existía riesgo de enfermedad ligada al Cromosoma X: en dos de ellos la gestante era portadora de Distrofia Muscular de Duchenne y en los otros dos de Enfermedad de Bruton. En todos ellos los fetos han resultado ser femeninos, pudiéndose evitar así la realización de un diagnóstico prenatal invasivo para la enfermedad. El quinto caso corresponde a una gestación de riesgo de hiperplasia adrenal congénita en el que la paciente estaba en tratamiento con dexametasona. El resultado obtenido en plasma, compatible con la presencia de un feto de sexo masculino (sin riesgo de padecer la enfermedad) ha permitido eliminar el tratamiento innecesario con esteroides.

Desde el inicio del diagnóstico prenatal, la selección del sexo fetal ha puesto sobre la mesa aspectos éticos, pero el fácil acceso a la determinación del sexo fetal en los primeros meses de gestación que permiten las nuevas tecnologías hace resurgir de nuevo esta controversia (Lewis et al.,2012). En general, la selección de género mediante interrupción del embarazo no es una práctica socialmente aceptable para la mayoría de la población occidental (Europa y Estados Unidos). Con la excepción de países como España o Islandia, donde la preferencia es tener una hija, en estos países existe cierta preferencia hacia el primogénito varón (van Balen,2006). No obstante, la mayoría de la sociedad se muestra reacia al uso de la interrupción del embarazo como método de selección

de género y la selección del sexo sólo se contemplaría en algunas excepciones como el equilibrio de géneros en la descendencia familiar (Hank and Kohler,2000). En cambio en países como China e India, donde existe una rotunda preferencia por la descendencia masculina debido a factores políticos y culturales (George,2006; Chan et al.,2006), las encuestas muestran una mayor aprobación por parte de la población del uso de la selección de género mediante interrupción del embarazo (Hall et al.,2006). En estas sociedades, donde la presión sobre la mujer a la hora de decidir sobre su embarazo es muy elevada, la determinación no invasiva del sexo fetal a baja edad gestacional puede dejar de ser una herramienta con un elevado valor diagnóstico para convertirse en un factor decisivo en la interrupción del embarazo por motivos no médicos. Este hecho, unido al fácil acceso de las nuevas tecnologías en diagnóstico prenatal plantea retos a nivel ético y legislativo que en Europa han sido estudiados mediante programas específicos como el programa *Special Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network of Excellence*, donde algunos grupos han indicado la necesidad de establecer líneas guía a nivel internacional (Guetta et al.,2006). De hecho, en países como Reino Unido, Suiza y más recientemente Alemania, la determinación del sexo fetal sólo es posible si existe una indicación médica; con el objetivo de eliminar la posibilidad de la interrupción selectiva del embarazo.

5.3. Determinación no invasiva del RhD fetal

La determinación del grupo RhD fetal en mujeres RhD negativas ha sido la primera aplicación clínica del uso del cfDNA en diagnóstico prenatal no invasivo (Finning et al., 2002), convirtiéndose en un gran avance para el seguimiento de este tipo de embarazos (Daniels et al., 2004). Su aplicación ha sido evaluada en numerosos estudios desde el descubrimiento del DNA fetal libre circulante en plasma, tanto en mujeres inmunizadas como en no-inmunizadas (Lo et al., 1998; Faas et al., 1998; Finning et al., 2002; Costa et al., 2002). Actualmente en diferentes países como Holanda, Dinamarca o Reino Unido, existen programas de determinación no invasiva del RhD fetal que la establecen como parte esencial en los protocolos de seguimiento de gestantes RhD negativas para limitar la inmunoprofilaxis a aquéllas portadoras de fetos RhD positivos (Müller et al., 2008; de Haas et al., 2012; Clausen et al., 2012; Soothill et al., 2015).

La variabilidad genética que presenta el gen RHD hace necesarios protocolos de análisis muy bien definidos y de alta especificidad. La selección previa de las secuencias a analizar es fundamental para poder discriminar la presencia de variantes del gen RHD que podrían resultar en fetos de fenotipo RhD positivo o negativo en presencia de parte del gen. A pesar de que la mayoría de protocolos descritos se basan en el uso de secuencias específicas de uno o dos exones del gen RHD por ensayo (Grooterk et al., 2006; Tynan et al., 2011; Macher et al., 2012), en el presente estudio se ha desarrollado un ensayo de PCR a Tiempo Real para la detección simultánea de tres secuencias de origen fetal en una única reacción (exones 5 y 7 del RHD y DYS14), y un ensayo complementario de confirmación con otras 2 (exón 10 del RHD y SRY). Para la validación de este protocolo se han analizado un total de 218 muestras, obteniendo resultados concluyentes en 213 casos (98%) en menos de 5 horas. La incorporación de la

secuencia DYS14 ha permitido confirmar de manera inequívoca la presencia de DNA fetal en 37 muestras RHD negativas (fetos de sexo masculino) sin necesidad de estudios posteriores y en un único ensayo de PCR. Todos los fetos RhD negativos de sexo femenino también han sido genotipados correctamente. En estos casos los resultados obtenidos con la Multiplex 1 se han confirmado mediante el ensayo Multiplex 2 y la detección del gen de la β -actina. Los resultados observados en ambos ensayos han sido concordantes, de manera que la confirmación en una segunda extracción de DNA podría ser innecesaria en la mayoría de ellos, ya que la correcta extracción de DNA se ha confirmado con la detección del gen de la β -actina.

En la serie de muestras analizadas, el método de extracción automático de DNA junto al uso de un ensayo de PCR multiplex ha mostrado ser altamente eficiente y preciso para la discriminación de todas las muestras pertenecientes a fetos RhD negativos de sexo femenino, sin resultados falsos negativos. El uso de una segunda Multiplex para la detección simultánea del gen SRY y el exón 10 del gen RHD que se ha empleado para la confirmación de las muestras RhD negativas femeninas ha permitido además la detección de variantes híbridas RHD-CE-D^s, de fenotipo RhD negativo, en dos casos (exón RHD 10 positivas), ambos confirmados postnatalmente. La presencia de este tipo de variantes se podría haber detectado en alguno los casos pertenecientes a fetos masculinos RhD negativos en la Multiplex 1 si se hubiera ampliado el estudio con la Multiplex 2. Sin embargo, el resultado antenatal RhD negativo ha sido concordante con el fenotipo en el recién nacido en todos los casos RhD negativos masculinos. El test está concebido para la determinación del grupo RhD fetal, de manera que la detección de variantes que no implican un cambio en el fenotipo RhD fetal inferido a partir del resultado obtenido con la Multiplex 1 puede considerarse un hallazgo accidental. En cambio, el uso de la detección del exón 10 como única

secuencia de cribado para la determinación del RhD fetal podría incrementar los resultados falsos positivos debidos a la presencia de variantes híbridas de fenotipo negativo (Finning et al., 2008). Por esta razón, se ha optado por su inclusión en el ensayo de confirmación, reduciendo así la posibilidad de obtener resultados falsos positivos.

Para la aplicación clínica de la determinación no invasiva del RhD fetal en el cribado de una población heterogénea, se ha diseñado un protocolo en el que la Multiplex 1 incluye el uso de *primers* específicos para el exón 5 que permiten discriminar también la presencia del pseudogen RHD ($RHD\Psi$), variante que se presenta en el 15% de los RhD negativos de origen subsahariano. No obstante, esta variante no ha sido detectada en ningún caso, probablemente debido al origen étnico de la población estudiada, mayoritariamente caucásica. Sin embargo, la inclusión en el análisis del exón 5 del RHD tiene un elevado valor diagnóstico ya que la limitación del estudio a los exones 7 y 10 en la determinación del RhD fetal podría dar lugar a resultados falsos positivos (Finning et al., 2002; van der Schoot et al., 2008; Clausen et al., 2011; Scheffer et al., 2011).

El protocolo desarrollado para el genotipado no invasivo del RHD fetal se ha utilizado a nivel clínico en un estudio intervencionista para el cribado antenatal de 284 muestras clínicas procedentes de mujeres RhD negativas con parejas RhD positivos, con el objetivo de evaluar el uso de este método diagnóstico para reducir la administración de gammaglobulina anti-D en gestantes RhD negativas en la red de Salud Pública de Barcelona. Los resultados obtenidos han demostrado que utilizando los exones 5, 7 y 10 (y el 6 ocasionalmente), el genotipado antenatal no invasivo del gen RHD es altamente preciso y fiable, y puede ser utilizado para limitar la administración de inmunoglobulina anti-D a los casos estrictamente necesarios (embarazadas portadoras de fetos RhD

positivos). Además, el ensayo ha permitido discriminar variantes RHD en un número de casos más elevado del esperado.

A pesar de que no existe un consenso claro sobre los exones del gen RHD más idóneos para este tipo de ensayo; los exones 4, 5, 7 y 10 son los más comúnmente seleccionados. Además de evitar resultados falsos positivos y falsos negativos, la elección correcta de los exones estudiados es muy importante a la hora de discriminar entre las variantes más prevalentes que se pueden encontrar en poblaciones multiétnicas (Amaral et al., 2011; Grande et al 2013).

El análisis realizado con las Multiplex 1 y 2 utilizado en este estudio ha sido ampliado mediante el análisis del exón 6 del RHD únicamente en tres casos, positivos para los exones 7 y 10 y negativos para el 5. El diseño específico de los *primers* utilizados para la detección de los exones 5 y 6 ha permitido discriminar entre la presencia del RHD Ψ y la presencia de la variante RHDVI, positiva para el exón 6 (Finning et al., 2002). La detección de esta variante ha sido de gran utilidad diagnóstica en dos casos ya que el fenotipo de los portadores de las variantes RHDVI tipo 1 o tipo 4 es positivo, frente al fenotipo negativo del RHD Ψ . La sospecha de la presencia de una de estas variantes ha ayudado en el seguimiento de las pacientes, a las que se ha tratado como gestantes portadoras de fetos RhD positivos, con administración de inmunoglobulinas anti-D. En el tercer caso analizado, el genotipado del recién nacido ha confirmado el fallo en la detección del exón 5 en la muestra antenatal. Aunque las variantes RHDVI tipo 1 y tipo 4 corresponden al 88% de los alelos RHDVI en población española, mayoritariamente caucásica (Esteban et al., 2006); en nuestra serie ambos casos corresponden a mujeres de origen latinoamericano.

Las variantes híbridas RHD-CE-D^S han sido las más observadas en la población de estudio sospechándose su presencia en los casos en los que se ha detectado el exón 10 del gen RHD en el ensayo Multiplex 2 de confirmación en

segunda extracción de DNA de las muestras negativas para los exones 5 y 7 y DYS14. Según estos resultados, esta segunda confirmación no sería necesaria ya que el resultado RHD negativo obtenido del análisis de los dos primeros exones ha sido compatible con el fenotipo RhD negativo observado en los recién nacidos. No obstante, los ensayos de *screening* para el genotipado antenatal del RhD utilizando únicamente uno o dos exones (por ejemplo 7 y 10 o 5 y 7) podrían dar lugar a resultados falsos positivos o no concluyentes en poblaciones multiétnicas con presencia de variantes como el RHD Ψ (Rouillac-Le Sciellour et al., 2004; Minon et al., 2007; Akolekar et al., 2011). Recientemente, el uso de un protocolo analizando únicamente la presencia del exón 4 ha mostrado ser eficiente para la determinación del status RhD fetal en presencia de variantes híbridas RHD-CE-D S y de RHD Ψ (Wikman et al., 2012). Sin embargo, este ensayo no habría permitido detectar la variante RHDVI presente en la población analizada en este estudio, resultando en dos falsos negativos. A pesar de que se trata de variantes con bajos niveles de aloinmunización materna (conocidas como *weak D*), ante la sospecha de presencia de éstas en el feto, se recomienda tratar a las gestantes como portadoras de fetos RhD positivos y proceder a la administración de inmunoglobulinas (Finning et al., 2008; Müller et al., 2008).

El genotipado del RHD en muestra postnatal ha permitido la confirmación de las variantes identificadas en el análisis antenatal. El seguimiento postnatal ha llevado a la confirmación de la presencia de una variante rara en el único falso positivo observado en el curso de este estudio. El caso corresponde a un embarazo gemelar en el que todos los exones del RHD estudiados (5, 6, 7 y 10) se han detectado en plasma materno y en uno de los gemelos en el análisis postnatal, que también presenta resultado de serología RhD negativo. Se han descrito diferentes variantes del gen RHD con haplotipo positivo y serología negativa en población europea cuya presencia sería compatible con los

resultados obtenidos, como por ejemplo la variante híbrida RHD-CE(8-9)-D, con una prevalencia de 1:15.512 (Wagner et al., 2001). Esta variante híbrida podría haberse originado por una reorganización del gen o una mutación *de novo*, ya que uno de los gemelos heredó un alelo RHd (negativo) y el otro un alelo RHD inactivo de un padre RhD positivo en estado heterocigoto.

El porcentaje de mujeres de origen caucásico que ha participado en este estudio (84%) podría estar sobrerepresentado, ya que según los datos del hospital sólo el 50% de los partos corresponden a este grupo étnico. Las dificultades a la hora de explicar los objetivos y las implicaciones de este estudio podría explicar la menor presencia de otras etnias (magrebí, asiática, africana...), más frecuentemente portadoras de variantes de RHD. Aún así, la tasa de variantes con implicación clínica detectadas fue del 1% (3/282), superior a las observadas en los estudios a gran escala publicados hasta la fecha (Müller et al., 2008). Estos estudios muestran tasas de portadoras de variantes del gen RHD de alrededor del 0,5%, aunque presentan tasas de resultados no concluyentes de alrededor del 2%, recomendando el seguimiento de ambos tipos de pacientes como portadoras de fetos RhD positivos, con la consecuente administración profiláctica de inmunoglobulinas (de Haas et al., 2012).

La especificidad del 99,6% en la detección de secuencias fetales del gen RHD en plasma materno observada en este estudio ha sido superior a la media del 94,8% publicada en el primer metanálisis realizado incluyendo 44 protocolos distintos (Geifman et al., 2006), y también a la especificidad media del 98,4% obtenida en el metanálisis más reciente, con 30 estudios evaluados (Mackie et al., 2016) (Tabla 19). La reducción de falsos positivos detectada en este estudio coincide con la observada en estudios más recientes del 99,3-99,8% (Rouillac-Le Scielour et al., 2007; Minon et al., 2008; Clausen et al., 2012; Moise et al., 2013; Chitty et al., 2014), y es muy similar a la obtenida mediante serotipado postnatal

convencional en sangre de cordón umbilical, del 99,5% (Geifman et al., 2006).

Durante este estudio no se han observado resultados falsos negativos, demostrando así que el genotipado antenatal puede presentar un 100% de valor predictivo negativo si se realiza a finales del segundo trimestre, coincidiendo con el momento de la administración de inmunoglobulinas en caso necesario.

Tabla 19. Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para la determinación no invasiva del RhD fetal en diferentes estudios.

	Número de muestras	Sensibilidad [95%CI]	Especificidad [95%CI]
<i>Rouillac-Le Sciellour et al., 2007</i>	306	100% [98-100]	97% [91-100]
<i>Minon et al., 2008</i>	545	100% [99-100]	99% [97-100]
<i>Clausen et al., 2012</i>	2312	99,9% [99-100]	99,3% [99-100]
<i>Moise et al., 2013</i>	320	100% [98-100]	97% [91-99]
<i>Chitty et al., 2014</i>	2563	99% [99-100]	99% [99-99]
<i>Geifman et al., 2006 (Metanálisis)</i>	3261	95,4% [90,6-97,8]	98,9% [96,4-99,5]
<i>Mackie et al., 2016 (Metanálisis)</i>	10290	99,3% [98,2-99,7]	98,4% [96,4-99,3]
Presente estudio	284	100% [98-100]	99% [94,4-100]

La elevada sensibilidad demostrada por el método desarrollado en la presente tesis es clínicamente relevante ya que resultados falsos negativos habrían implicado la no administración de inmunoglobulinas anti-D a gestantes de riesgo. Los resultados falsos negativos suelen relacionarse con el método de extracción de DNA utilizado (Müller et al., 2008), el tiempo de almacenamiento de la muestra hasta su procesamiento (Finning et al., 2008) o, especialmente, con la baja edad gestacional en el momento de la toma de muestra ya que implica una cantidad inferior de DNA fetal. A pesar de que es posible detectar secuencias del gen RHD en el primer trimestre de gestación, las tasas de falsos negativos del 1,1% al 3,5% observadas en esta edad gestacional (Akolekar, 2011; Bombard et

al., 2011; Wikman et al., 2012), son difíciles de aceptar a nivel clínico, por lo que se hace necesario reducirlos lo máximo posible. Aquellas mujeres identificadas erróneamente como portadoras de fetos RhD negativos no recibirán la profilaxis necesaria, con el consecuente riesgo aumentado de aloinmunización en el momento del parto y el riesgo asociado de enfermedad hemolítica del feto en el siguiente embarazo.

En el presente estudio se ha optado por realizar el análisis de DNA fetal simultáneamente con la analítica de seguimiento de segundo trimestre entre las 22-24 semanas de gestación, cuando la fracción fetal es significativamente más elevada (Lo et al., 1998), con el objetivo de reducir la tasa de falsos negativos debidos a la baja fracción fetal en la muestra. La determinación del RhD fetal al final del segundo trimestre de gestación ya se ha implementado en la rutina clínica de países europeos como Dinamarca y Holanda, donde se realiza en las semanas 25 y 28 de gestación obteniendo tasas de falsos negativos de alrededor del 0,2% (Clausen et al., 2012; de Haas et al., 2012). Por otro lado, la automatización de la técnica desarrollada y su incorporación en la rutina del laboratorio clínico ha permitido obtener los resultados con un margen de tiempo suficiente para decidir la administración de profilaxis anti-D en el momento recomendado del tercer trimestre, a partir de las 28 semanas de gestación (NICE guidelines, 2008). La realización del análisis a la edad gestacional más conveniente desde un punto de vista clínico, sumada a la selección adecuada de los exones a analizar, ha permitido identificar correctamente todos los fetos RhD negativos.

Una limitación de la realización del genotipado antenatal en el segundo trimestre sería la exclusión de mujeres en situaciones que podrían comportar una sensibilización materna, como son el sangrado en primer trimestre, abortos espontáneos o la realización de procedimientos como la amniocentesis,

normalmente llevada a cabo en las semanas 15-18 de gestación (Queenan et al., 2012; Chitty et al., 2014). Sin embargo, estos casos representan menos del 10% de las mujeres embarazadas; de manera que el genotipado tardío en el segundo trimestre implicaría la administración innecesaria de inmunoglobulinas en menos de un 4% de los casos. Esta “sobre administración” del 4% implicaría un menor impacto que el 1,1%-3,5% de pacientes que podrían no ser tratadas debido a los resultados falsos negativos obtenidos en el análisis en primer trimestre (Akolekar et al., 2011, Wikman et al., 2012).

Este estudio se ha realizado de manera intervencionista en el escenario clínico real del sistema de Salud Pública catalán. Las visitas antenatales se han llevado a cabo en seis centros de atención primaria en los casos de bajo riesgo y en el Hospital Clínic de Barcelona en las pacientes de alto riesgo. La mayoría de las pacientes a las que se ha solicitado la participación en el estudio han accedido al mismo, tanto para el análisis antenatal no invasivo (94%) como para la no administración de inmunoglobulinas anti-D en los casos con resultado antenatal de RhD fetal negativo. El 95% de las mujeres diagnosticadas como portadoras de fetos RhD negativos (90/95) ha renunciado a la administración de inmunoglobulinas anti-D ya que resulta innecesaria en estos casos. El genotipado antenatal ha permitido una reducción del 32% en la administración de inmunoglobulinas; resultado muy similar a los obtenidos en otros estudios realizados con un mayor número de muestras (Finning et al. en 2008, Müller et al. 2008; Clausen et al. en 2012; de Haas et al., 2012). En estas publicaciones se presentan tasas de administración de inmunoprofilaxis innecesaria de alrededor del 2%, ya sea por resultados falsos positivos o no concluyentes, porcentaje muy por debajo del 35-40% que implicaría la administración profiláctica a todas las gestantes RhD negativas sin un cribado antenatal previo de las gestaciones de fetos RhD positivos.

La implementación del genotipado antenatal del RHD fetal no invasivo permite una reducción en el uso de hemoderivados en casos innecesarios y del riesgo asociado de su uso. Cada dosis de anti-D se prepara a partir de múltiples donaciones de múltiples donantes pero a pesar de que su producción es altamente segura, existen riesgos asociados que no deben ignorarse aún siendo muy poco frecuentes. Entre ellos, pueden darse reacciones de hipersensibilidad a alguno de sus componentes o infecciones por priones o virus, como ya ocurrió con el virus de la hepatitis C en Irlanda en los años 1977-78, afectando a cientos de mujeres (Kenny-Wash.,1999). Además, la disponibilidad de este tipo de productos es limitada y por tanto implica un coste relativamente elevado. Los estudios de coste-beneficio demuestran que el uso del genotipado antenatal no invasivo del RHD fetal tienen asociada una reducción de costes en el seguimiento de las gestantes RhD negativas. En un estudio de seguimiento de los embarazos de 2.127 pacientes RhD negativas se calcula un ahorro de unos 49.000€ (Macher et al.,2012). La implementación del genotipado no invasivo en la sanidad pública del Reino Unido también constata una reducción de costes (Soothill et al.,2015). Independientemente de las posibles ventajas económicas, el hecho de poder ofrecer a las pacientes un método de análisis no invasivo con una elevada sensibilidad que puede mejorar el seguimiento de su gestación reduciendo los riesgos tanto para el feto como para la gestante resulta absolutamente justificado (Daniels et al.,2007; Kent et al.,2014). En este sentido, servicios como el de Medicina Materno-Fetal del Hospital Clínic de Barcelona han incorporado recientemente el uso del genotipado no invasivo del RHD fetal sus guías clínicas para gestaciones con riesgo de isoimunización (Borrell A.,2014).

5.4. Limitaciones del análisis del cfDNA en la detección de secuencias de origen paterno para la aplicación en el diagnóstico clínico

El uso del análisis de cfDNA en plasma materno para la detección de secuencias de DNA fetal de origen paterno no presentes en el feto implica la necesidad de confirmar la presencia de DNA fetal en aquellas muestras en las que dichas secuencias no sean detectadas, de manera que se pueda confirmar que la falta de amplificación no se debe a un fallo en la extracción de DNA o en el ensayo de PCR. La detección de genes como la β -actina, CCR5 o GAPDH puede utilizarse para estimar la cantidad de DNA total presente en la muestra pero no implica la confirmación de la presencia de DNA fetal en ella; de manera que se hace necesario incorporar el uso de marcadores universales independientes de sexo fetal o de la detección de secuencias de herencia paterna. Se han realizado numerosos intentos para implementar marcadores universales en los protocolos de análisis del DNA fetal en plasma materno establecidos en rutina clínica, como el análisis de microsatélites o de otros polimorfismos (Pertl et al., 2000; Page-Christiaens et al., 2006; Akolekar et al., 2010; Tynan et al., 2011). Otro campo de estudio para la obtención de marcadores de uso universal es la epigenética dada la existencia de patrones diferenciales de metilación entre DNA de origen placentario y DNA materno (Poon et al., 2002; Lo et al., 2006). Este hecho ha permitido el descubrimiento de marcadores como la secuencia hipermetilada en placenta RASFF1A, descrito como primer marcador universal para el DNA fetal libre en plasma (Chan et al., 2006; White et al., 2012). También se ha propuesto el uso del RNA libre circulante en plasma de origen trofoblástico y por tanto fetal como marcador universal de DNA fetal (Mersy et al., 2015). Sin embargo, la

introducción de estos marcadores en la rutina del diagnóstico clínico es limitada, ya que implican el uso de protocolos laboriosos y complejos que habría que sumar a los de análisis del cfDNA (Brojer et al.,2005; Scheffer et al.,2011; Bombard et al.,2011; Tounta et al.,2011; Kolialexi et al.,2012).

Aunque el uso de marcadores fetales universales permitiría ampliar este tipo de análisis a otras aplicaciones, lo cierto es que actualmente los estudios publicados en muestras clínicas (el presente y otros mencionados a lo largo de este trabajo) presentan una elevada eficiencia y sensibilidad de los protocolos ya implementados en rutina clínica para la determinación del sexo y del RhD fetales, permitiendo obtener resultados con un elevado valor diagnóstico altamente fiables

5.5. Detección no invasiva de aneuploidías fetales en cfDNA

El *screening* de aneuploidías fetales en plasma materno es hoy una realidad gracias al uso de la secuenciación masiva. En este estudio se ha aplicado por primera vez en la detección no invasiva de aneuploidías fetales la secuenciación bidireccional o Paired End MPSS y se ha introducido un nuevo algoritmo que genera un valor TScore multivariante que permite cuantificar la probabilidad de trisomía como resultado del recuento estadístico de los fragmentos cortos y fragmentos totales del cfDNA, la estimación de la fracción fetal y las lecturas de secuenciación útiles obtenidas para cada cromosoma. Como han mostrado los datos de validación de la metodología, trisomías con fracciones fetales bajas pueden dar lugar a valores de TScore mayores a los obtenidos en muestras con FF más elevada si, por ejemplo, el resultado de la secuenciación ha sido mejor (mayor número de lecturas útiles obtenidas), o el recuento estadístico en los fragmentos cortos ha sido más eficiente (Fig.34 resultados). Así, y a diferencia

del resto de ensayos existentes, la resolución para la diferenciación entre muestras normales y trisómicas no es únicamente dependiente de la fracción fetal. En cambio, en otros ensayos directamente se excluyen del análisis aquellas muestras con una fracción fetal inferior al 4% (Sparks et al., 2012, Ashor et al., 2012; Palomaki et al., 2012; Norton et al., 2012). En este caso, a pesar de mejorar las tasas de falsos positivos y falsos negativos de estos ensayos, la exclusión de muestras basada únicamente en un *cut off* predefinido para la fracción fetal implica un incremento de la tasa de fallos de hasta el 5,9% (Hall et al., 2014).

La aplicación de un único *cut off* para los valores de TScore cromosoma específico ha permitido identificar 106 de las 107 trisomías analizadas en el estudio de validación, y la inclusión en el algoritmo del recuento estadístico basado en el tamaño de los fragmentos y de la fracción fetal ha demostrado ser altamente eficiente, permitiendo la detección de los 4 casos de trisomía con fracción fetal inferior al 4% (0,8-3,5%). En total, se han identificado correctamente 80 muestras con fracción fetal inferior al 4% (incluyendo 9 casos euploides y 1 trisomía 18 con FF<1%), que no habrían sido analizables mediante otras metodologías. Por tanto, la exclusión de muestras basada únicamente en un valor de fracción fetal inferior al 4% no es aplicable con el uso de este nuevo método siempre que la profundidad de secuenciación obtenida sea la adecuada. Los resultados obtenidos en la validación han mostrado una elevada sensibilidad y especificidad en muestras con baja fracción fetal y han demostrado la eficiencia del Tscore para incrementar la especificidad del análisis en la detección de aneuploidías. Como ejemplo dos muestras, una normal y otra trisomía 21, que presentando unos valores de NCV similares (3,362 y 3,588 respectivamente) no habrían sido diferenciadas por otros métodos de análisis de MPSS y que se han

identificado correctamente utilizando el valor TScore (-14,178 para la normal y 10,357 la trisomía 21).

Únicamente se ha detectado un falso positivo de trisomía 13, con un TScore de 158 y una FF del 10%. Estos valores no indican la falta de especificidad de la técnica como la causa de la discordancia. Tal y como ya ha sido descrito en la literatura y teniendo en cuenta que el DNA fetal detectado en plasma es de origen placentario, la presencia de mosaicismos confinados a placenta puede ser la causa de discrepancias entre el genotipo determinado en plasma y el fetal, generando resultados falsos positivos o negativos en el cribado de aneuploidías (Hall et al., 2014; Mao et al., 2014; Zhang et al., 2015). La presencia de un feto evanescente en gestaciones inicialmente gemelares también podría originar falsos positivos en plasma materno (Grömminger et al., 2014; Bevilacqua et al., 2015; 2016). En este caso, la causa más probable del resultado falso positivo observado es la presencia de un mosaicismo 47,XX+13/46,XX confinado a placenta, con la línea trisómica placentaria evidentemente no detectable en el líquido amniótico de confirmación.

De las 32 trisomías 18 analizadas en la validación, sólo una no ha sido detectada. Se trata de una muestra de plasma recogida en 2009 con un 11% de fracción fetal, por lo que la falta de sensibilidad debida a la técnica tampoco parece la causa más probable de la no detección. No ha sido posible analizar una nueva muestra para repetir el análisis y descartar un error en su manipulación. Tampoco ha sido posible descartar un rescate de la trisomía en el citotrofoblasto que pueda explicar esta discordancia ya que la información de seguimiento disponible sólo incluye la QF-PCR y el cariotipo de vellosidad corial en cultivo largo y no se dispone de datos de un estudio semidirecto.

La tasa de detección para trisomía 18 observada en esta validación (DR 96,7%) es comparable con la global del 96,3% calculada para este cromosoma

en un reciente metanálisis que incluye 37 estudios (Gil et al.,2015). Del mismo modo, la tasa de falsos positivos observada ha sido del 0,03%, por debajo de la esperada según los datos publicados en este mismo metanálisis, que describe una tasa global de falsos positivos para trisomías 21 del 0,09% y del 0,13% para trisomías 18 y 13.

A pesar de que más de la mitad de las muestras analizadas durante la validación han sido almacenadas durante un largo período de tiempo y la limitación del volumen disponible en algunas de ellas, la tasa de fallos observada ha sido de tan sólo el 1,2%. Aunque las tasas de fallos publicadas son muy variables entre estudios, este valor es algo inferior a la tasa global calculada para los métodos de MPSS (1,58%) y se sitúa por debajo de las observadas para los métodos de secuenciación dirigida (3,56%) y de análisis de polimorfismos (6,39%) recientemente publicadas (Yuval Yaron, 2016). La tasa de fallos obtenida en la aplicación clínica del test NeoBona ha sido del 2,1%. A pesar de ser superior a la observada en el estudio de validación, ha sido posible obtener un resultado válido en el 88,9% de los casos en los que se ha realizado un segundo análisis en nueva muestra. Así, tan sólo en un 0,5% de los casos no se ha obtenido un resultado; por lo que es de esperar una reducción de la tasa de fallos con el incremento del número de muestras analizadas. Aunque los estudios son limitados, se ha descrito una mayor tasa de fallos en gestaciones gemelares, que se excluyen del análisis por presentar una FF<4% (Bevilacqua et al.,2015). En gestaciones gemelares dizigóticas los dos fetos no contribuyen en igual proporción a la cantidad de cfDNA (Leung et al.,2013), de manera que es posible obtener un resultado discordante debido a la falta de representación de uno de los dos gemelos (Qu et al.,2013; Struble et al.,2014). En esta serie se han analizado 93 muestras procedentes de gestaciones gemelares de las cuales únicamente en una no ha sido posible obtener un resultado válido debido a la

baja fracción fetal observada. Así, la tasa de fallos en gestaciones gemelares, del 1%, ha sido inferior a la observada con otros métodos por Bevilacqua et al. (2015), siendo incluso inferior a la observada en gestaciones únicas.

En el presente estudio, los resultados obtenidos en 2.828 muestras clínicas consecutivas de la población general analizadas han confirmado los datos obtenidos en la validación, permitiendo la obtención de resultados válidos en 84 muestras con una fracción fetal inferior al 4% que incluyen 2 trisomías 18 (con fracciones fetales del 1% y el 3%). La tasa de falsos positivos observada ha sido del 0,03% para trisomías 21, 18 y 13; con un único falso positivo de trisomía 21, muy por debajo de los datos publicados en el metanálisis de Gil et al. (2015). La inclusión en el análisis de las aneuploidías de los cromosomas sexuales en 1.533 muestras eleva la tasa de falsos positivos al 0,13%, con un falso positivo de monosomía X (0,1%). A pesar de ser inferior a la observada con otras metodologías, con una tasa de falsos positivos global del 0,37%, la tasa de falsos positivos para aneuploidías de los cromosomas sexuales triplica la observada para los autosomas. Existen diferentes causas biológicas que pueden dar lugar a estos falsos positivos: la presencia de una aneuploidía de los cromosomas sexuales materna como por ejemplo 47,XXX, desconocida en el 90% de los casos (Tartaglia et al., 2010); la presencia de un mosaicismo materno como por ejemplo 45,X/46,XX (Wang et al., 2014); o el incremento en las aneuploidías del cromosoma X observado en linfocitos, especialmente la pérdida de un cromosoma X (Russell et al., 2007). A estas causas se añaden los casos de mosaicismo confinado a placenta, donde los cromosomas sexuales suelen verse implicados con mayor frecuencia, y los fetos evanescentes en gestaciones inicialmente gemelares (Lau et al., 2014).

Las aneuploidías de los cromosomas sexuales (a diferencia de las aneuploidías de los autosomas) suelen presentar efectos fenotípicos leves, sin afectación física

o discapacidad intelectual con la excepción de algunos casos de monosomía X, que presentan una elevada translucencia nucal en el primer trimestre de gestación o higroma quístico en el segundo. Si añadimos este hecho a la mayor tasa de falsos positivos que se observa; la inclusión del análisis de estas aneuploidías al *screening* mediante cfDNA en la población general debe ser considerada con cautela y debe incluir un consejo genético riguroso previo y posterior al análisis para llevar a cabo un correcto seguimiento de estos embarazos (Gil et al., 2015; Mennuti et al., 2015). De manera similar, y aunque la tecnología actual lo permite, la inclusión de otras alteraciones cromosómicas mucho menos frecuentes en la población también es causa de controversia ya que implica un incremento de las tasas de falsos positivos superiores al 1,5% con tasas de detección del 60-70%, muy inferiores a las observadas para los cromosomas 21, 18 y 13 (Rose et al., 2016).

Aunque en los casos con resultado de bajo riesgo todavía no disponemos de datos de seguimiento en recién nacidos ya que se trata de gestaciones en curso en su mayoría, la aplicación clínica nos ha permitido evaluar la tasa de falsos positivos en la población general. El valor del 0,03% observado para los cromosomas 21, 18 y 13 confirma la elevada especificidad de este nuevo método en comparación con otros ensayos.

A pesar de que se trata de una tecnología altamente eficiente, el resultado del análisis de cfDNA debe ser interpretado como método de *screening*, no de diagnóstico, y por lo tanto valorado conjuntamente con el resto de datos clínicos disponibles para cada gestación (datos ecográficos, historia familiar...). Un resultado positivo siempre debe ser confirmado mediante una técnica diagnóstica de análisis directo del feto utilizando un método invasivo (amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales) teniendo en cuenta las posibles discrepancias que pueden generar las causas biológicas mencionadas anteriormente.

Dependiendo de la anomalía cromosómica, y en ausencia de marcadores ecográficos concordantes, la confirmación de un resultado positivo en cfDNA debería realizarse preferiblemente mediante análisis en líquido amniótico para evitar el riesgo de encontrarse frente a un mosaicismo en biopsia corial que requiera de una confirmación diagnóstica posterior con amniocentesis (Murdy et al.,2016; Van Opstal and Srebnik,2016).

Los datos obtenidos también confirman la superioridad de estos métodos de cribado frente a los de cribado bioquímico convencional cuya tasa de falsos positivos se sitúa en el 5% (Nicolaides et al.,2011; Wright et al.,2014), por lo que deberían ser el método de *screening* de elección para la población general. Sin embargo, su introducción se ha visto limitada al área de la sanidad privada debido al alto coste de la tecnología. En la actualidad, ya se están llevando a cabo estudios coste-beneficio para su implementación como método de cribado en distintos países europeos, que tienen en consideración tanto la reducción del uso de técnicas invasivas innecesarias como los recién nacidos con anomalías cromosómicas (TRIDENT study: *Trial by Dutch laboratories for Evaluation of Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT)*, Holanda; Fairbrother et al.,2015). En este sentido, en el servicio de salud pública inglés se ha evaluado la implementación de un sistema de *screening* de contingencia, utilizando el cribado combinado de primer trimestre como test de primera línea para detectar a las pacientes de alto riesgo ($\geq 1/100$) o riesgo intermedio (1/101 a 1/2500) y ofrecerles la posibilidad de realizar el análisis en cfDNA frente al test invasivo. Se espera que este sistema incremente la tasa de detección a más del 97% reduciendo los falsos positivos por debajo del 0,5% sin el incremento del coste que representaría aplicar el cribado mediante análisis del cfDNA a todas las pacientes, que se utilizaría en un 20-30% de la población general (Nicolaides et al.,2015; Wright et al.,2015; Gil et al.,2015). Estudios recientemente publicados en población

española presentan datos similares y confirman la reducción en el uso de procedimientos invasivos en población de alto riesgo y riesgo intermedio así como en casos de bajo riesgo con ansiedad materna o edad materna avanzada (Maiz et al.,2016).

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que:

1. Los métodos de procesamiento de las muestras para la obtención del plasma, la extracción del DNA y la automatización de ésta han probado ser altamente eficientes para su utilización en la detección de secuencias fetales de origen paterno (SRY y RHD).
2. Los protocolos desarrollados para la determinación del sexo fetal y del RhD fetal en plasma materno han demostrado una elevada sensibilidad y especificidad en los ensayos de validación realizados, avalándolos para su aplicación clínica y se han implementado con éxito en la rutina clínica del laboratorio en 1.535 muestras clínicas consecutivas.
3. El nuevo método de cribado de aneuploidías fetales en plasma materno ha probado ser altamente eficiente, permitiendo la detección de trisomías con una tasa de falsos positivos extremadamente baja (0,03%) y una tasa global de fallos del 0,5%; y sin necesidad de establecer un límite mínimo de fracción fetal para el análisis de las muestras.
4. La detección no invasiva de aneuploidías fetales mediante el test NeoBona se ha implementado con éxito en la rutina clínica del laboratorio, con 2828 muestras analizadas entre Octubre de 2015 y Febrero de 2016.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent ND, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007;27:415–418.
- Adinolfi M, Davies A, Sharif S, Soothill P, Rodeck C. Detection of trisomy 18 and Y-derived sequences in fetal nucleated cells obtained by transcervical flushing. *Lancet*. 1993 Aug 14;342(8868):403-4.
- Akolekar R, Farkas DH, VanAgtmael AL, Bombard AT, Nicolaides KH. Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) at 11 to 13 weeks of gestation. *Prenat Diagn*. 2010 Oct;30(10):918-23.
- Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, Daniels G, Nicolaides KH. Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11-13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther*. 2011;29:301-6.
- 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 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636. Review.
- Amaral DR, Credidio DC, Pellegrino J Jr, Castilho L. Fetal RHD genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population. *J Clin Lab Anal* 2011;25:100-4
- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46:301–302.
- Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors. *Fetal Diagn Ther* 2012; 31:237-43.
- Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, Nicolaides KH. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of triso- my 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206(322):1–5.
- Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, 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 Jan;41(1):26-32.
- Avent ND. RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges. *Methods Mol Biol*. 2008;444:185-201.
- Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, Lowry RB. Genetic disorders in children and young adults: a population study. *Am J Hum Genet* 1988; 42:677 – 693.
- Banzola I, Kaufmann I, Lapaire O, Hahn S, Holzgreve W, Rusterholz C. Isolation of serum nucleic acids for fetal DNA analysis: comparison of manual and automated extraction methods. *Prenat Diagn*. 2008;28:1227-31.
- Barrett AN, Zimmermann BG, Wang D, Holloway A, Chitty LS. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS One*. 2011;6(10)
- Barrett AN, McDonnell TC, Chan KC, Chitty LS. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. *Clin Chem* 2012;58:1026–32.
- Bartha JL, Finning K, Soothill PW. Fetal sex determination from maternal blood at 6 weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency. *Obstet Gynecol*. 2003 May;101(5 Pt 2):1135-6.
- Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, Leshane E, Johnson KL, Peter I, Bianchi DW, Pertl B. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn*. 2006 Sep;26(9):831-6.
- Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 Jul;42(1):15-33. doi: 10.1002/uog.12513. Review.
- Benn P, Cuckle H. Theoretical performance of non-invasive prenatal testing for chromosome imbalances using counting of cell-free DNA fragments in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2014; 34:778-83.

Bibliografía

- Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierickx H, Willems PJ, Jani JC. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):61-6.
- Bevilacqua E, Guizani M, Cos Sanchez T, Jani JC. Concerns with performance of screening for aneuploidy by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016 Jan;47(1):124-5.
- Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet.* 1997 Oct;61(4):822-9.
- Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999;105:574–583.
- Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, Dukes KA, Sullivan LM, Klinger KW, Bischoff FZ, Hahn S, Johnson KL, Lewis D, Wapner RJ, de la Cruz F. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn.* 2002 Jul;22(7):609-15.
- Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta.* 2004 Apr;25 Suppl A:S93-S101. Review.
- Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, et al. DNA 925 sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014; 370(9):799–808.
- Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem* 2005; 51:312 – 320.
- Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* 2005;11:59–67.
- Bombard AT, Akolekar R, Farkas DH et al.. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. *Prenat Diagn* 2011;31:802-8.
- Borrell A, Casals E, Fortuny A, Farre MT, Gonçalves A, Sanchez A, Soler A, Cararach V, Vanrell JA. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat Diagn.* 2004 Jul;24(7):541-5.
- Borrell, A. Guías clínicas medicina materno-fetal servei d'obstetricia – icgon – hospital clínic barcelona. Isoinmunización. Febrero,2014.
- Brambati B, Simoni G. Diagnosis of fetal trisomy 21 in first trimester. *Lancet.* 1983 Mar 12;1(8324):586.
- Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzińska A, Kalińska A. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion.* 2005;45:1473-80.
- Bulmer JN, Cioni R, Bussani C, Cirigliano V, Sole F, Costa C, Garcia P, Adinolfi M. HLA-G positive trophoblastic cells in transcervical samples and their isolation and analysis by laser microdissection and QF-PCR. *Prenat Diagn.* 2003 Jan;23(1):34-9.
- Bustamante-Aragones A, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, de Alba MR, Gonzalez-Gonzalez C, Glover G, Diego-Alvarez D, Ayuso C, Ramos C. New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma. *J Cyst Fibros.* 2008 Nov;7(6):505-10.
- Bustamante-Aragones A, Rodriguez De Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Trujillo-Tiebas MJ, Diego-Alvarez D, Vallespin E, et al. Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the foetuses of female carriers. *Haemophilia* 2008;14:593–8.
- Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW, Lo YM. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2004 Jan;50(1):88-92.
- Chan LC, Blyth E, Hoi-yan CC. Attitudes to and practices regarding sex selection in China. *Prenat Diagn.* 2006 Jul;26(7):610-3.

- Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH, Lo YM. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem.* 2006;52:2211-8.
- Chitty LS, Finning K, Wade A, Soothill P, Martin B, Oxenford K, Daniels G, Massey E. Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ.* 2014 Sep 4;349:g5243.
- Chiu RWK, Poon LLM, Lau TK, Leung TN, Wong EMC, Lo YMD. Effects of blood processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem.* 2001;47:1607-1613.
- Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet.* 2002a. Sep 28; 360(9338):998-1000.
- Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem.* 2002b May;48(5):778-80.
- Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, 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 USA.* 2008;105:20458-63.
- Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validation study. *Br Med J* 2011;342:c7401.
- Cicero S, Bindra R, Rembouskos G, Spencer K, Nicolaides KH. Integrated ultrasound and biochemical screening for trisomy 21 using fetal nuchal translucency, absent fetal nasal bone, free beta-hCG and PAPP-A at 11 to 14 weeks. *Prenat Diagn.* 2003 Apr;23(4):306-10.
- Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Dziegiej MH. Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *Prenat Diagn.* 2007;27:6-10.
- Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Råsmark EE, Dziegiej MH. Evaluation of two real-time multiplex PCR screening assays detecting fetal RHD in plasma from RhD negative women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Fetal Diagn Ther.* 2011;29(2):155-63.
- Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, et al. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion* 2012;52:752-8.
- Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. [First trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2002 Dec;30(12):953-7. French.
- Costa JM, Giovangrandi Y, Ernault P et al. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 2002;119:255-60.
- Cuckle H, Benn P, Pergament E. Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy as a clinical service. *Clin Biochem.* 2015 Oct;48(15):932-41. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.02.011. Epub 2015 Feb 27. Review.
- Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, Xu Z, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn* 2012;32:1225-32.
- Daniels GL, Faas BH, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, Zondervan HA, von dem Borne AE, van der Schoot CE. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion.* 1998;38(10):951-8.
- Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang.* 2004;87:225-32.
- Daniels G, Finning K, Martin P, Summers J. Fetal RhD genotyping: a more efficient use of anti-D immunoglobulin. *Transfus Clin Biol.* 2007;14:568-71.

Bibliografía

- Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet.* 2009 Dec;126(6):729-42.. Review.
- Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn.* 2009;29:101-7.
- Daniels G. Variants of RhD--current testing and clinical consequences. *Br J Haematol.* 2013 May;161(4):461-70. doi: 10.1111/bjh.12275. Epub 2013 Feb 25. Review.
- Das K, Fernando MR, Basiaga S, Wigginton SM, Williams T. Effects of a novel cell stabilizing reagent on DNA amplification by PCR as compared to traditional stabilizing reagents. *Acta Histochem.* 2014 Jan;116(1):55-60. doi: 10.1016/j.acthis.2013.05.002. Epub 2013 Jun 28.
- Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2011 Aug 10;306(6):627-36. doi: 10.1001/jama.2011.1114. Review.
- Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, Cronin M, Chou V, Mohr M. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA.* 2004 Mar 3;291(9):1114-9.
- Ding C, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, et al. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *PNAS;* 2004.101:29: 10762-10767.
- Efrat Z, Akinfenwa OO, Nicolaides KH. First-trimester determination of fetal gender by ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999 May;13(5):305-7.
- Esteban R, Montero R, Flegel WA et al. The D category VI type 4 allele is prevalent in the Spanish population. *Transfusion* 2006;46:616-23.
- 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 USA.* 2008;105:16266-71.
- Fan CH and Quake SR (2010) Sensitivity of Noninvasive Prenatal Detection of Fetal Aneuploidy from Maternal Plasma Using Shotgun Sequencing Is Limited Only by Counting Statistics. *PLoS ONE* 5(5) e10439
- Faas BH, Beckers EA, Wildoer P, Ligthart PC, Overbeeke MA, Zondervan HA, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion.* 1997;37(1):38-44
- Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC et al. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet.* 1998 ; 352:1196.
- Fernando MR, Chen K, Norton S, Krzyzanowski G, Bourne D, Hunsley B, Ryan WL, Bassett C. A new methodology to preserve the original proportion and integrity of cell-free fetal DNA in maternal plasma during sample processing and storage. *Prenat Diagn.* 2010 May;30(5):418-24.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion.* 2002;42:1079-85.
- Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ.* 2008;336:816-8.
- Fiorentino F., Bono S., Pizzuti F., Mariano M., Polverari A., Duca S., Sessa M., Baldi M., Diano L., Spinella F. (2016). The importance of determining the limit of detection of non invasive prenatal testing methods. *Prenat Diagn.* Jan 27. doi: 10.1002/pd.4780.
- Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci.* 2011 Feb;44(1):81-91. doi: 10.1016/j.transci.2010.12.013. Epub 2011 Jan 28. Review.
- Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P, Flori J, et al. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytiotrophoblastic cells. Case report. *Hum Reprod* 2004;19:723-4.

- Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Campogrande M, Bastonero S, Pagliano M, Calza S, Ferrari M, Cremonesi L. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet.* 2005 Jul;117(2-3):243-8. Epub 2005 May 20.
- Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood-a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195:1163-73.
- George SM. Millions of missing girls: from fetal sexing to high technology sex selection in India. *Prenat Diagn.* 2006 Jul;26(7):604-9. Review.
- Gerovassili A, Garner C, Nicolaides KH, Thein SL, Rees DC. Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities? *Prenat Diagn.* 2007 Feb;27(2):104-10.
- 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 Mar;45(3):249-66. Review.
- 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 Jan;47(1):45-52.
- Gonzalez-Gonzalez C, Trujillo-Tiebas MJ, Rodriguez de Alba M, Garcia-Hoyos M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. Huntington disease—unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn.* 2003;23:232-234.
- González-González C, García-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Lorda-Sánchez I, de Alba MR, Infantes F, Gallego J, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience. *J Histochem Cytochem.* 2005 Mar;53(3):307-14.
- Grande M, Ordoñez E, Cirigliano V, Cid J, Grau E, Pericot A, Teixido I, Marin JL, Borrell A. Clinical application of midtrimester non-invasive fetal RHD genotyping and identification of RHD variants in a mixed-ethnic population. *Prenat Diagn.* 2013 Feb;33(2):173-8. doi: 10.1002/pd.4035. Epub 2012 Dec 20.
- Grill S, Banzola I, Li Y, Rekhviashvili T, Legler TJ, Müller SP, Zhong XY, Hahn S, Holzgreve W. High throughput non-invasive determination of foetal Rhesus D status using automated extraction of cell-free foetal DNA in maternal plasma and mass spectrometry. *Arch Gynecol Obstet.* 2009;279:533-7.
- Grömminger S, Yagmur E, Erkan S, Nagy S, Schöck U, Bonnet J, Smerdka P, Ehrlich M, Wegner RD, Hofmann W, Stumm M. Fetal Aneuploidy Detection by Cell-Free DNA Sequencing for Multiple Pregnancies and Quality Issues with Vanishing Twins. *J Clin Med.* 2014 Jun 25;3(3):679-92.
- Grootkerk-Tax MG, Soussan AA, de Haas M, Maaskant-van Wijk PA, van der Schoot CE. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion.* 2006;46:2142-8.
- Guetta E. Noninvasive detection of fetal sex: the laboratory diagnostician's view. *Prenat Diagn.* 2006 Jul;26(7):635-6. Review.
- Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault O, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of gene SRY appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003;18:1733-6.
- de Haas M, van der Ploeg CPB, Scheffer PG, Verlinden DA, Hirschberg H, Abbink F, et al. A nation-wide fetal RHD screening programme for targeted antenatal and postnatal anti-D. *ISBT Sci Ser* 2012;7:164-7.
- Hall S, Reid E, Marteau TM. Attitudes towards sex selection for non-medical reasons: a review. *Prenat Diagn.* 2006 Jul;26(7):619-26. Review.
- Hall MP, Hill M, Zimmerman B, Sigurjonsson S, Westemeyer M, Saucier J, Demko Z, Rabinowitz M. (2014) Non-invasive prenatal detection of trisomy 13 using a single nucleotide polymorphism- and informatics-based approach. *PLoS One.* 7;9(5):e96677.
- Hank K, Kohler HP. 2000. Gender preferences for children in Europe: empirical results from 17 FFS countries. *Demogr Res* www.demographic-research.org/Volumes/Vol2/1.

Bibliografía

- Hawk AF, Chang EY, Shields SM, Simpson KN. Costs and clinical outcomes of noninvasive fetal RhD typing for targeted prophylaxis. *Obstet Gynecol.* 2013 Sep;122(3):579-85.
- Hideström M, Stokowski R, Song K, Oliphant A, Deavers J, Goetsch M, Simpson P, Kuhlman R, Ames M, Mitchell M, Tomita-Mitchell A. Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther.* 2012;31(2):122-8.
- Hill M, Finning K, Martin P, et al. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Genet* 2011;80:68-75.
- Hill M, Lewis C, Jenkins L, Allen S, Elles RG, Chitty LS. Implementing noninvasive prenatal fetal sex determination using cell-free fetal DNA in the United Kingdom. *Expert Opin Biol Ther.* 2012 Jun;12 Suppl 1:S119-26.
- Hill M, Twiss P, Verhoef TI, Drury S, McKay F, Mason S, Jenkins L, Morris S, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: detection of paternal mutations, exploration of patient preferences and cost analysis. *Prenat Diagn.* 2015 Oct;35(10):950-8. doi: 10.1002/pd.4585. Epub 2015 Apr 5.
- Horinek A, Korabecna M, Panczak A, Ulcova Gallova Z, Nouzova K, Calda P, Hancarova M. Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: methodology issues and kinetics. *Fetal Diagn Ther.* 2008;24(1):15-21.
- Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Kofer J, Komrska V, Habart D. Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Diagn.* 2003 Mar;23(3):235-8.
- Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Kulovany E, Vlk R. Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther.* 2005;20:275-80.
- Huang DJ, Zimmermann BG, Holzgreve W, Hahn S. Use of an automated method improves the yield and quality of cell-free fetal DNA extracted from maternal plasma. *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2419-20.
- Huang DJ, Mergenthaler-Gatfield S, Hahn S, Holzgreve W, Zhong XY. Isolation of cell-free DNA from maternal plasma using manual and automated systems. *Methods Mol Biol.* 2008;444:203-8. doi: 10.1007/978-1-59745-066-9_15.
- Hyett JA, Gardener G, Stojiljkovic-Mikic T, Finning KM, Martin PG, Rodeck CH, Chitty LS. Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *LS.* *Prenat Diagn.* 2005;25:1111-6.
- Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev* 2007;83: 563 – 566.
- Illumina Inc. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology.
- Jensen TJ, Zwiefelhofer T, Tim RC, Dzakula Z, Kim SK, et al. . (2013) High-Throughput Massively Parallel Sequencing for Fetal Aneuploidy Detection from Maternal Plasma. *PLoS ONE* 8(3): e57381. doi:10.1371/journal.pone.0057381.
- Johnson KL, Dukes KA, Vidaver J, LeShane ES, Ramirez I, Weber WD, Bischoff FZ, Hahn S, Sharma A, Dang DX, Hire LM, Bianchi DW, Simpson JL, Holzgreve W, Elias S, Klinger KW. Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR. *Clin Chem.* 2004;50:516-21.
- Joint LWPES/ESPE CAH Working Group. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Paediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87: 4048e53.
- Jorgez CJ, Dang DD, Simpson JL, Lewis DE, Bischoff FZ. Quantity versus quality: optimal methods for cell-free DNA isolation from plasma of pregnant women. *Genet Med.* 2006 Oct;8(10):615-9.
- Jungkind D. Automation of laboratory testing for infectious diseases using the polymerase chain reaction-- our past, our present, our future. *J Clin Virol.* 2001 Jan;20(1-2):1-6. Review.

- V.I. Kazakov, V.M. Bozhkov, V.A. Linde, M.A. Repina, V.M. Mikhailov. Extracellular DNA in the blood of pregnant women. *Tsitologiia*,37(1995),pp.232–236.
- Kent J, Farrell AM, Soothill P. Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014;14:87.
- Kim SK, Hannum G, Geis J, Tynan J, Hogg G, Zhao C, Jensen TJ, Mazloom AR, Oeth P, Ehrich M, van den Boom D, Deciu C. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat Diagn.* 2015 Aug;35(8):810-5.
- Kolialexi A, Tounta G, Apostolou P, et al. Early non-invasive detection of fetal Y chromosome sequences in maternal plasma using multiplex PCR. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;161:34-7.
- Lau TK, Cheung SW, Lo PS, Pursley AN, Chan MK, Jiang F, et al. Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA: review of 1982 consecutive cases in a single center. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;43(3):254–64.
- Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Fanning K, Hromadnikova I, Galbiati S, Meaney C, Hultén MA, Crea F, Olsson ML, Maddocks DG, Huang D, Fisher SA, Sprenger-Haussels M, Soussan AA, van der Schoot CE. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2007;27:824-9.
- Legler TJ, Liu Z, Heermann KH, Hempel M, Guttensohn K, Kiesewetter H, Pruss A. Specific magnetic bead-based capture of free fetal DNA from maternal plasma. *Transfus Apher Sci.* 2009;40:153-7.
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker of preterm labour. *Lancet* 1998;352:1904-5.
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan YL, Lo YM. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem* 2001;47:137-9.
- Leung TY, Qu JZ, Liao GJ, Jiang P, Cheng YK, Chan KC, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive twin zygosity assessment and aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Prenat Diagn.* 2013 Jul;33(7):675-81.
- Levine RJ, Qian C, Leshane ES, Yu KF, England LJ, Schisterman EF, Wataganara T, Romero R, Bianchi DW. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Mar;190(3):707-13.
- Lewis C, Hill M, Skirton H, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis for fetal sex determination: benefits and disadvantages from the service users' perspective. *Eur J Hum Genet.* 2012 Nov;20(11):1127-33.
- Liang D, Lv W, Wang H, Xu L, Liu J, Li H, et al. Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing. *Prenat Diagn* 2013;33(6):409–15.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350:485-7.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Leung TN, Poon PM et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998a;62:768-775.
- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med.* 1998b ; 339:1734-8.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999a Jan;64(1):218-24.
- Lo YM, Poon LL. The ins and outs of fetal DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2003 Mar;23(3):235-8.
- Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999b;45:148-8.
- Dennis Lo YM. Fetal DNA in maternal plasma: progress through epigenetics. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1075:74-80.

Bibliografía

- Lo YM, Chiu RW. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet.* 2007 Jan;8(1):71-7. Epub 2006 Dec 5. Review.
- Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gerovassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR, Ding C. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* 2007 Feb;13(2):218-23.
- Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2010;2:61ra91.
- Lo YM, Chiu RW. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:285-306. doi: 10.1146/annurev-genom-090711-163806. Epub 2012 May 29. Review.
- Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem.* 2002 Mar;48(3):421-7.
- Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, Chow KC, Lo WY, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Cantor CR, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 16;105(50):19920-5.
- Macher HC, Noguerol P, Medrano-Campillo P, et al. Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: results in clinical benefits and cost saving. *Clin Chim Acta* 2012;413:490-4.
- Mackie FL, Hemming K, Allen S, Morris RK, Kilby MD. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG.* 2016 May 31. doi: 10.1111/1471-0528.14050. [Epub ahead of print] Review.
- Madgett TE, Ross Welch C, Avent ND. Fetal Sex and RHD Genotyping with Digital PCR Demonstrates Greater Sensitivity than Real-time PCR. *Clin Chem.* 2015 Nov;61(11):1399-407.
- Maiz N, Alzola I, Murua EJ, Rodríguez Santos J. Cell-free DNA testing after combined test: factors affecting the uptake. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016 Feb 10:1-5.
- Manzanares S, Entrala C, Sánchez-Gila M, Fernández-Rosado F, Cobo D, Martínez E, Molina L, Reche R, Pineda A, Gallo JL. Noninvasive fetal RhD status determination in early pregnancy. *Fetal Diagn Ther.* 2014;35(1):7-12.
- Mardy A, Wapner RJ. Confined placental mosaicism and its impact on confirmation of NIPT results. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2016 Jun;172(2):118-22.
- Margulies, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–380 (2005).
- Mao J, Wang T, Wang BJ, Liu YH, Li H, Zhang J, Cram D, Chen Y. Confined placental origin of the circulating cell free fetal DNA revealed by a discordant non-invasive prenatal test result in a trisomy 18 pregnancy. *Clin Chim Acta.* 2014 Jun 10;433:190-3. doi: 10.1016/j.cca.2014.03.011. Epub 2014.
- Mennuti MT, Chandrasekaran S, Khalek N, Dugoff L. Cell-free DNA screening and sex chromosome aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2015 Oct;35(10):980-5.
- Mersy E, Faas BH, Spierts S, Houben LM, Macville MV, Frints SG, Paulussen AD, Veltman JA. Cell-Free RNA Is a Reliable Fetoplacental Marker in Noninvasive Fetal Sex Determination. *Clin Chem.* 2015 Oct 14.
- Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31-46. doi: 10.1038/nrg2626. Epub 2009 Dec 8. Review.
- Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion.* 2008;48:373-81.
- Moise K, Boring N, O'Shaughnessy R, Simpson L, Wolfe H, Baxter J, et al. Circulating cell-free fetal DNA for the detection of RHD status and sex using reflex fetal identifiers. *Prenat Diagn* 2013;33:95–101.

- Mulcahy HE, Croke DT, Farthing MJG. Cancer and mutant DNA in blood plasma. *Lancet* 1996; 348: 628.
- Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Guttensohn K, Köhler M, Legler TJ. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion*. 2008 Nov;48(11):2292-301.
- Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Guttensohn K, Legler TJ. Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days. *Prenat Diagn*. 2011 Dec;31(13):1300-4.
- Nakazato T, Ohta T, Bono H. Experimental design-based functional mining and characterization of high-throughput sequencing data in the sequence read archive. *PLoS One*. 2013;22;8(10):e77910.
- Ng EKO, Tsui NBY, Lau TK, Chiu RWK, Pansear NS, Lit LCW et al.. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100:4748-4753.
- NICE. Routine antenatal anti-D prophylaxis for women who are rhesus D negative. Technology appraisal guidance 156. 2008. [www.nice.org.uk/guidance/ta156]. Accessed 7 August 2014.
- Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jul;191(1):45-67. Review.
- Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet. Non invasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207(374):e1-6.
- Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207:137.e1-8.
- Norton SE, Lechner JM, Williams T, Fernando MR. A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clin Biochem*. 2013 Oct;46(15):1561-5.
- Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, Tomlinson MW, Pereira L, Spitz JL, Hollemon D, Cuckle H, Musci TJ, Wapner RJ. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med*. 2015 Apr 23;372(17):1589-97. doi: 10.1056/NEJMoa1407349. Epub 2015 Apr 1.
- Nygren AO, Dean J, Jensen TJ, Kruse S, Kwong W, et al. . (2010) Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. *Clin Chem* 56: 1627–1635. doi: 10.1373/clinchem.2010.146290.
- Ordoñez E, Rueda L, Cañadas MP, Fuster C, Cirigliano V. Development and validation of multiplex real-time PCR assay for noninvasive prenatal assessment of fetal RhD status and fetal sex in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther*. 2013a;34(1):13-8.
- Ordoñez E, Rueda L, Cañadas MP, Fuster C, Cirigliano V. Evaluation of sample stability and automated DNA extraction for fetal sex determination using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Biomed Res Int*. 2013b;2013:195363.
- Page-Christiaens GC, Bossers B, VAN DER Schoot CE, DE Haas M. Use of bi-allelic insertion/deletion polymorphisms as a positive control for fetal genotyping in maternal blood: first clinical experience. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Sep;1075:123-9.
- Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrlich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, Nelson SF, Canick JA. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med*. 2011 Nov;13(11):913-20.
- 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.
- Pan X, Zhang C, Li X, Chen S, Ge H, Zhang Y, Chen F, Jiang H, Jiang F, Zhang H, Wang W, Zhang X. Non-invasive fetal sex determination by maternal plasma sequencing and application in X-linked disorder counseling. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014 Dec;27(18):1829-33.

Bibliografía

- Perl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet.* 2000;106(1):45-9.
- Picchiassi E, Coata G, Fanetti A, Centra M, Pennacchi L, Di Renzo GC. The best approach for early prediction of fetal gender by using free fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2008; 28: 525 – 530.
- Pilgrim H, Lloyd-Jones M, Rees A. Routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2009 Feb;13(10):iii, ix-xi, 1-103.
- Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Lo YMD. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46:1832– 1834.
- Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Chow KCK, Lo YMD. Differential DNA Methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2002;48:1.35-41.
- Pop M, Salzberg SL. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends Genet.* 2008 Mar;24(3):142-9. doi: 10.1016/j.tig.2007.12.006. Epub 2008 Feb 11. Review.
- Qu JZ, Leung TY, Jiang P, Liao GJ, Cheng YK, Sun H, Chiu RW, Chan KC, Lo YM. Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis. *Clin Chem.* 2013 Feb;59(2):427-35.
- Queenan JT. Rh immunoprophylaxis and fetal RHD genotyping: where are we going? *Obstet Gynecol.* 2012 Aug;120(2 Pt 1):219-20.
- Quezada MS, Gil MD, Francisco C, Oròsz G, Nicolaides KH. Screening for trisomies 21 18 and 13 cell-free DNA analysis of maternal blood at 10–11 weeks' gestation and the combined test at 11–13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014.
- Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem.* 2014 Jan;60(1):243-50.
- Rebouché R. Non-Invasive Testing, Non-Invasive Counseling. *J Law Med Ethics.* 2015 Summer;43(2):228-40. doi: 10.1111/jlme.12237.
- Rijnders RJ, Van Der Luijt RB, Peters ED, Goeree JK, Van Der Schoot CE, Ploos Van Amstel JK, Christiaens GC. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2003;23:1042-4.
- Rijnders RJ, Christiaens GC, Bossers B, van der Smagt JJ, van der Schoot CE, de Haas M. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet Gynecol.* 2004 Jan;103(1):157-64.
- Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R et al. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn* 2004;8:23-31
- Rouillac-Le Sciellour C, Sérazin V, Brossard Y et al. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD. *Transfus Clin Biol.* 2007 ; 14:572-7.
- Rose NC, Benn P, Milunsky A. Current controversies in prenatal diagnosis 1: should NIPT routinely include microdeletions/microduplications? *Prenat Diagn.* 2016 Jan;36(1):10-4.
- Russell LM, Strike P, Browne CE, Jacobs PA. X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res.* 2007;116(3):181-5.
- Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA, Johnson ST, Katz L, Queenan JT, Vassallo RR, Simon CD; College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. Transfusion.* 2015 Mar;55(3):680-9.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 1977;74:5463-5467.
- Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, de Haas M. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *BJOG.* 2011;118:1340-8.

- Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y et al., 2002. Increased cell-free fetal DNA is in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 2002;48:353-4.
- Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, Iwasaki M, Yukimoto Y, Ichizuka K, Saito H, Okai T. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta. *Hum Genet*. 2003 Sep;113(4):307-10. Epub 2003 Jul 23.
- Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Matsuoka R, Okai T et al. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:480-4.
- Sehnert AJ, Rhee B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J, Rava RP. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem*. 2011 Jul;57(7):1042-9.
- Sillence KA, Roberts LA, Hollands HJ, Thompson HP, Kiernan M, Madgett TE, Ross Welch C, Avent ND. Fetal Sex and RHD Genotyping with Digital PCR Demonstrates Greater Sensitivity than Real-time PCR. *Clin Chem*. 2015 Nov;61(11):1399-407.
- Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000;95(1):12-8.
- Shendure, J. et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728–1732 (2005).
- 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 Aug 1;352(9125):343-6.
- Smith SC, Baker PN. Placental apoptosis is increased in post-term pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106:861-862.
- Song Y, Liu C, Qi H, Zhang Y, Bian X, Liu J. Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat Diagn* 2013;33(7):700–6.
- Soothill PW, Fanning K, Latham T, Wreford-Bush T, Ford J, Daniels G. Use ofcffDNA to avoid administration of anti-D to pregnant women when the fetus is RhD-negative: implementation in the NHS. *BJOG*. 2015 Nov;122(12):1682-6.
- 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;206:319 e1–9.
- 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 Feb 7;92(2):167-76. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.12.006. Epub 2013 Jan 10.
- Srinivasan A, Bianchi D, Liao W, Sehnert A, Rava R. Maternal plasma DNA sequencing: effects of multiple gestation on aneuploidy detection and the relative cell-free DNA (cffDNA) per fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2013(Suppl.S31).
- Steele MW, Breg WR Jr. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet*. 1966 Feb 19;1(7434):383-5.
- Stein LD. The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biol*. 2010;11(5):207. doi: 10.1186/gb-2010-11-5-207. Epub 2010 May 5.
- Straver R, Oudejans CB, Sistermans EA, Reinders MJ. Calculating the fetal fraction for noninvasive prenatal testing based on genome-wide nucleosome profiles. *Prenat Diagn*. 2016 Jul;36(7):614-21. doi: 10.1002/pd.4816. Epub 2016 May 20.
- Struble CA, Syngelaki A, Oliphant A, Song K, Nicolaides KH. Fetal fraction estimate in twin pregnancies using directed cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35(3):199-203.

Bibliografía

- Tabor A, Bang J, Nørgaard-Pedersen B. Feto-maternal haemorrhage associated with genetic amniocentesis: results of a randomized trial. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987 Jun;94(6):528-34. PubMed PMID: 2441735.
- Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther.* 2010;27(1):1-7. doi: 10.1159/000271995. Epub 2009 Dec 24. Review.
- Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L: A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 8.
- Thurik FF, Ait Soussan A, Bossers B, Woortmeijer H, Veldhuisen B, Page-Christiaens GC, de Haas M, van der Schoot CE. Analysis of false-positive results of fetal RHD typing in a national screening program reveals vanishing twins as potential cause for discrepancy. *Prenat Diagn.* 2015 Aug;35(8):754-60. doi: 10.1002/pd.4600. Epub 2015 May 19.
- Tounta G, Vrettou C, Kolialexi A, et al. A multiplex PCR for non-invasive fetal RHD genotyping using cell-free fetal DNA. *In Vivo* 2011;25:411-7.
- Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood.* 2011 Mar 31;117(13):3684-91.
- Tynan JA, Mahboubi P, Cagasan LL et al. Restriction enzyme-mediated enhanced detection of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J Mol Diagn* 2011; 13:382-9
- Tynan JA, Angkachatchai V, Ehrlich M, Paladino T, van den Boom D, Oeth P. Multiplexed analysis of circulating cell-free fetal nucleic acids for noninvasive prenatal diagnostic RHD testing. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:251 e1-6.
- Valenti C, Schutta EF, Khehaty T. Cytogenetic diagnosis of Down's syndrome in utero. *J Am Med Assoc* 1969 207.
- Van Balen F. Attitudes towards sex selection in the Western world. *Prenat Diagn.* 2006 Jul;26(7):614-8. Review.
- van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LGC, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006;13:53-57.
- van der Schoot CE, Hahn S, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13:63-8.
- Van Opstal D, Srebnik MI. Cytogenetic confirmation of a positive NIPT result: evidence-based choice between chorionic villus sampling and amniocentesis depending on chromosome aberration. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016 May;16(5):513-20.
- van Wijk IJ, deHoon AC, Jurhawan R, Tjoa ML, Griffioen S, Mulders MA et al. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. *Clin Chem* 2000;46:729-31.
- Vodicka R, Vrtěl R, Schneiderová E, Vrbická D, Procházka M, Dhaifalah I, Santavá A, Santavý J. [Noninvasive fetal sex detection from maternal plasma in pregnant women]. *Ceska Gynekol.* 2008 Jun;73(3):150-3.
- Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet.* 2001;2:10.
- Wang Q, Cai Y, Brady P, Vermeesch JR. Real-time PCR evaluation of cell-free DNA subjected to various storage and shipping conditions. *Genet Mol Res.* 2015 Oct 19;14(4):12797-804.
- Wang Y, Chen Y, Tian F, Zhang J, Song Z, Wu Y, Han X, Hu W, Ma D, Cram D, Cheng W. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *ClinChem* 2014; 60: 251 – 259.
- White HE, Dent CL, Hall VJ, Crolla JA, Chitty LS. Evaluation of a Novel Assay for Detection of the Fetal Marker RASSF1A: Facilitating Improved Diagnostic Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. *PLoS One.* 2012;7:e45073.

- Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A et al. Noninvasive Single-Exon Fetal RHD Determination in a Routine Screening Program in Early Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2012; 120:227-234.
- Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, Mueller R, DeSantis G, van den Boom D, Ehrich M. Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem*. 2013 Aug;46(12):1099-104.
- Wright CF, Wei Y, Higgins JP, Sagoo GS. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res Notes*. 2012 Sep 1;5:476. doi: 10.1186/1756-0500-5-476. Review.
- Wright D, Spencer K, Kagan K K, Tørring N, Petersen OB, Christou A, Kallikas J, Nicolaides KH. First-trimester combined screening for trisomy 21 at 7-14 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010 Oct;36(4):404-11.
- Wright D, Syngelaki A, Bradbury I, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomies 21, 18 and 13 by ultrasound and biochemical testing. *Fetal Diagn Ther* 2014; 35:118-126.
- Wright D, Wright A, Nicolaides KH. A unified approach to risk assessment for fetal trisomies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 45: 48 – 54.
- Yaron Y. (2016) The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon. *Prenat Diagn*. Mar 4. doi: 10.1002/pd.4804.
- Yeang CH, Ma GC, Hsu HW, Lin YS, Chang SM, Cheng PJ, Chen CA, Ni YH, Chen M. (2014) Genome-wide normalized score: a novel algorithm to detect fetal trisomy 21 during non-invasive prenatal testing. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014 44(1):25-30.
- Yu SC, Chan KC, Zheng YW, Jiang P, Liao GJ, Sun H, Akolekar R, Leung TY, Go AT, van Vugt JM, Minekawa R, Oudejans CB, Nicolaides KH, Chiu RW, Lo YM. (2014) Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10:111(23):8583-8.
- Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, Zhu Z, Lin M, Liu Q, Tian Z, Zhang H, Chen F, Lau TK, Zhao L, Yi X, Yin Y, Wang W. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146,958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 May;45(5):530-8. doi: 10.1002/uog.14792. Epub 2015 Apr 8. Erratum in: *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Jul;46(1):130.
- Zhao C, Tynan J, Ehrich M, Hannum G, McCullough R, Saldivar JS, Oeth P, van den Boom D, Deciu C. Detection of fetal subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Clin Chem*. 2015 61(4):608-16.
- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG*.2000;107:766-9.
- Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn* 2000;20:795-8.
- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. *Swiss Med Wkli* 2001a;131:70-74.
- Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001b;184:414-9.
- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod* 2002;8:864-70.
- Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2005;51:1598-604.
- Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, et al. Noninva- 902 sive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using 903 targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn* 2012;32(13):1233–41.

8. ANEXO: PUBLICACIONES



Clinical Study

Evaluation of Sample Stability and Automated DNA Extraction for Fetal Sex Determination Using Cell-Free Fetal DNA in Maternal Plasma

Elena Ordoñez,^{1,2} Laura Rueda,^{1,2} M. Paz Cañadas,¹
 Carme Fuster,² and Vincenzo Cirigliano^{1,2}

¹ Departament de Genètica Molecular, Labco Diagnostics, c/Londres 28, 08029 Barcelona, Spain

² Unitat de Biologia, Departament de Biología Celular, Fisiología i Immunología, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to Vincenzo Cirigliano; vincenzo.cirigliano@labco.eu

Received 30 April 2013; Revised 24 August 2013; Accepted 16 September 2013

Academic Editor: M. Ilyas Kamboh

Copyright © 2013 Elena Ordoñez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Objective. The detection of paternally inherited sequences in maternal plasma, such as the SRY gene for fetal sexing or RhD for fetal blood group genotyping, is becoming part of daily routine in diagnostic laboratories. Due to the low percentage of fetal DNA, it is crucial to ensure sample stability and the efficiency of DNA extraction. We evaluated blood stability at 4°C for at least 24 hours and automated DNA extraction, for fetal sex determination in maternal plasma. **Methods.** A total of 158 blood samples were collected, using EDTA-K tubes, from women in their 1st trimester of pregnancy. Samples were kept at 4°C for at least 24 hours before processing. An automated DNA extraction was evaluated, and its efficiency was compared with a standard manual procedure. The SRY marker was used to quantify cfDNA by real-time PCR. **Results.** Although lower cfDNA amounts were obtained by automated DNA extraction (mean 107.35 GE/mL versus 259.43 GE/mL), the SRY sequence was successfully detected in all 108 samples from pregnancies with male fetuses. **Conclusion.** We successfully evaluated the suitability of standard blood tubes for the collection of maternal blood and assessed samples to be suitable for analysis at least 24 hours later. This would allow shipping to a central reference laboratory almost from anywhere in Europe.

1. Introduction

The use of cell-free fetal DNA (cfDNA) in maternal plasma is part of the daily routine in several genetic centers for noninvasive fetal sex determination, RhD genotyping, and more recently aneuploidy screening [1–5]. Although cfDNA represents a very low percentage of the total amount of free DNA circulating in plasma (3–6%), paternally inherited sequences absent in the mother can easily be detected in plasma samples from pregnant women from the first trimester of pregnancy. Non-invasive fetal sex determination has become a very useful tool in the management of pregnancies at risk of X-linked inherited disorders, as it allows reducing the need of invasive procedures [6–9].

However, the low proportion of cfDNA present in maternal plasma still poses some technical difficulties related to

sample stability during transport and DNA extraction methods. Different effects of blood processing protocols on the amount of retrievable cfDNA have been reported, and the time between venopuncture and cfDNA recovery has also been shown to favor blood cells haemolysis, thus, reducing the fetal DNA fraction [10–12].

Different strategies have been suggested to try stabilizing blood samples to improve cfDNA extraction, mainly limiting the time before plasma separation or eventually using formaldehyde [13–17]. Also, specific collection tubes stabilizing blood samples are now commercially available, although being not approved yet for diagnostic purposes [18].

We evaluated the suitability of blood collection in standard CE marked EDTA-K tubes and their storage at 4°C for at least 24 hours, to detect fetal SRY sequences in maternal plasma.

This could allow easy and cost-effective sample collection at local clinics, providing enough time for samples shipping to a central reference lab to be processed on the following day.

We also evaluated the suitability of using an automated DNA extraction method for low cost and high throughput analysis by comparing cfDNA yield obtained with a reference manual DNA extraction procedure.

2. Materials and Methods

Blood samples were collected in $2 \times 3\text{ mL}$ EDTA-K tubes from over 400 pregnant women between 11th and 13th weeks of gestation (mean: 12) just before undergoing an invasive procedure (CVS) for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. Blood samples were kept at 4°C before being sent to the laboratory; same storage conditions were also kept upon reception for at least 24 hours from venupuncture. Plasmas were separated from the cellular fraction by a first centrifugation at low speed (10 minutes at 1200 g) and second high speed centrifugation for 10 minutes at 16000 g and 4°C . Supernatants were stored at -20°C until DNA extraction. All CVS samples were analysed by QF-PCR for rapid prenatal diagnosis of chromosomes X, Y, 21, 18, and 13 aneuploidies with results made available to referring physicians within 24 hours from sampling [19].

Based on QF-PCR results, a total of 108 plasmas were selected from women carrying normal male fetuses so that DNA extraction efficiency could be monitored by real-time PCR quantification of the SRY gene. Fifty more samples from women carrying normal female fetuses were also selected as negative controls.

The first batch of 50 samples from male fetuses was processed in duplicate using manual and automated extractions. DNA extractions were performed from $500\text{ }\mu\text{L}$ of plasma using the QIAamp DSP virus kit (QIAGEN Inc.) slightly modifying the manufacturer protocol, with a final DNA elution of $55\text{ }\mu\text{L}$. A total of $850\text{ }\mu\text{L}$ of plasma from the same sample was also extracted using the COBAS AmpliPrep-total nucleic acid isolation (TNAI) kit on the COBAS AmpliPrep DNA/RNA extractor (Roche Diagnostics) using a final elution volume of $75\text{ }\mu\text{L}$.

All remaining samples were processed with the automated method; DNAs were kept at -20°C until PCR analysis.

Extracted DNAs were tested in duplicates, and cfDNA amounts were evaluated by absolute quantification of the SRY gene using real-time PCR as previously described (Zhong et al., 2001) [20]. Positive SRY amplification with a threshold cycle value (Ct) <42 was expected in at least one of the duplicates from male pregnancies, while undetectable amplification was expected in female pregnancies used as negative controls.

Standard quantification curves were generated using human male DNA at $10\text{ ng}/\mu\text{L}$, $1\text{ ng}/\mu\text{L}$, $0.1\text{ ng}/\mu\text{L}$, and $0.01\text{ ng}/\mu\text{L}$ concentrations, and cfDNA yield (Genomic Equivalents/mL of plasma) was calculated for all samples, and results were compared for manual and automated DNA extraction.

TABLE 1: Efficiencies of manual and automated cfDNA extractions. Despite consistently producing higher Ct values (lower cfDNA amounts), automated DNA extraction of samples collected in the 1st trimester of pregnancies produced cfDNA amounts well within the detection limits of rtPCR.

	Manual DNA extraction (QIAGEN DSP) $N = 50$	Automated DNA extraction (COBAS AmpliPrep) $N = 108$
Ct values	34.31–44.87 (36.59)	34.17–46 (37.74)
cfDNA amounts (GE/mL)	259.43 (61.05–725.33)	107.35 (10.28–327.06)

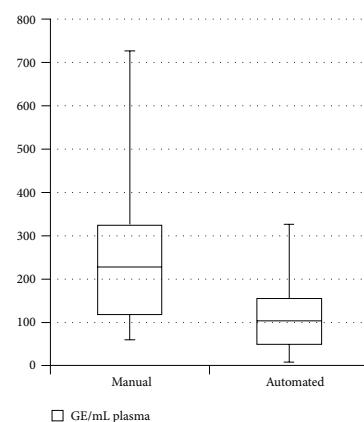


FIGURE 1: Genomic equivalents of cfDNA in 50 samples from male fetuses extracted with COBAS Ampliprep and QIAGEN Viral DSP procedures.

3. Results

DNA extraction following whole blood storage at 4°C for at least 24 hours was successful using both manual and automated procedures, and SRY amplification was detected in all 108 plasma samples from pregnant women with male fetuses. No false negative results were observed; SRY amplification was positive in both duplicates from all manual extractions and in 102/108 cases from automated procedure.

As shown in Table 1, manual DNA extraction resulted in lower Ct values for the SRY amplification (mean $\text{Ct} = 36.59$) than automated procedure (mean $\text{Ct} = 37.74$). Overall, cfDNA amounts were higher using manual extraction compared with the automated system, with a mean quantity of cfDNA of 259.43 GE/mL of plasma (range: 61.05–725.33) and 107.35 GE/mL (range: 10.28–327.06), respectively (Figure 1).

Only 6 samples failed one of the duplicates, all extracted with the automated procedures, and in 4/6 cases, the cfDNA amount was slightly lower than the observed mean.

As shown in Figure 1, more variability in cfDNA amounts was observed for samples obtained by manual DNA extraction compared with the automated procedure.

SRY detection and quantification were also possible in the remaining 58 samples, and no SRY amplification was observed for the 50 DNAs derived from women carrying female fetuses, all tested only with the automated procedure.

4. Discussion

Cell-free fetal DNA is present in low proportion in maternal plasma; thus, an efficient DNA extraction method and a robust PCR assay are crucial to detect paternally inherited sequences such as the SRY or RhD genes. Apart from different biological factors such as maternal weight or placental pathology [5, 21–24] the fetal fraction can also decrease as a result of maternal blood cells lysis in the time between blood draw and plasma separation prior to DNA extraction [14, 16, 25–27]. This might be a limitation for a central reference diagnostic laboratory offering cfDNA analysis for fetal sexing or RhD genotyping, as samples must reach the laboratory within the shortest possible period of time.

We evaluated the cfDNA stability when using standard EDTA-K tubes to collect maternal blood, by only separating maternal plasma from the cell pellets after enough time to eventually allow samples to be shipped from almost anywhere in Europe to a reference diagnostic laboratory.

The SRY sequence was detected in all plasmas from male pregnancies, despite samples being kept at 4°C for at least 24 hours from sampling.

The QIAamp DSP Virus Kit (QIAGEN, Hilden, German) has been shown as one of the most efficient DNA extraction methods for cfDNA analysis [14, 28, 29]; however, the use of an automated extractor, would ideally help in reducing risks of sample mishandling and cross contamination, while also contributing to a reduction of costs [30–35].

We successfully evaluated a protocol for the COBAS AmpliPrep automated system to be used for cfDNA extraction from maternal plasma samples collected in the 1st trimester of pregnancy. This is a CE/FDA approved system routinely used for the detection and quantification of viral nucleic acids in clinical samples with proven efficiency to allow PCR detection of targets with concentrations as low as 5 copies per mL. Despite the lower cfDNA yield observed in comparison with the QIAGEN DSP Virus Kit, the automated DNA extraction provided lower variability in concentrations range and proved to be robust enough to not affect the rtPCR efficiency allowing detecting SRY for at least one of the replicates in all male cases.

Automated DNA extraction allows high throughput of samples (up to 72 samples/run) in a closed system greatly reducing the risk of cross contamination, and it also requires little manipulation thus reducing overall costs and hands on time.

Specific cfDNA collection tubes have recently been developed in order to stabilise the sample at room temperature

by limiting maternal blood cells lysis during transport. This solution is now routinely used for cfDNA screening of fetal aneuploidies in the US [18]. However, these tubes are more expensive than most rtPCR, while this would not be an issue for next generation sequencing based tests, it represents more than doubling overall laboratory costs for fetal sexing and RhD genotyping. Furthermore, cfDNA collection tubes are still labelled for *research use only*, thus, not suitable to collect diagnostic samples in European countries, unless being previously fully validated by each laboratory and for each different intended use.

5. Conclusion

We successfully evaluated the suitability of using standard CE marked blood tubes for the collection of maternal blood and the stability of samples following storage for at least 24 hours. This was coupled with an automated DNA extraction, to further simplify the procedure with a view to cost reduction and to simplify its introduction in the daily routine of clinical diagnostic laboratories. This approach was shown to be robust enough to obtain cfDNA from samples collected in the 1st trimester of pregnancy allowing fetal sex to be correctly identified in all cases analysed in the course of this study.

References

- [1] M. Hill, K. Finning, P. Martin et al., "Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice," *Clinical Genetics*, vol. 80, no. 1, pp. 68–75, 2011.
- [2] G. Daniels, K. Finning, P. Martin, and P. Soothill, "Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn," *Vox Sanguinis*, vol. 87, no. 4, pp. 225–232, 2004.
- [3] N. D. Avent, "RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges," *Methods in Molecular Biology*, vol. 444, pp. 185–201, 2008.
- [4] P. G. Scheffer, C. E. van der Schoot, G. C. M. L. Page-Christiaens, and M. de Haas, "Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, e and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience," *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, vol. 118, no. 11, pp. 1340–1348, 2011.
- [5] K. H. Nicolaides, A. Syngelaki, G. Ashoor, C. Birdir, and G. Touzet, "Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population," *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 207, no. 5, pp. 374.e1–374.e6, 2012.
- [6] R. J. P. Rijnders, R. B. van der Luijt, E. D. J. Peters et al., "Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma," *Prenatal Diagnosis*, vol. 23, no. 13, pp. 1042–1044, 2003.
- [7] R. Akolekar, K. Finning, R. Kuppusamy, G. Daniels, and K. H. Nicolaides, "Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11–13 weeks of gestation," *Fetal Diagnosis and Therapy*, vol. 29, no. 4, pp. 301–306, 2011.
- [8] R. Akolekar, D. H. Farkas, A. L. VanAgtmael, A. T. Bombard, and K. H. Nicolaides, "Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccfDNA) at 11 to 13 weeks of gestation," *Prenatal Diagnosis*, vol. 30, no. 10, pp. 918–923, 2010.

- [9] J. A. Hyett, G. Gardener, T. Stojilovic-Mikic et al., "Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy," *Prenatal Diagnosis*, vol. 25, no. 12, pp. 1111–1116, 2005.
- [10] K. M. Finning and L. S. Chitty, "Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice," *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 69–75, 2008.
- [11] V. Houfflin-Debarge, H. O'Donnell, T. Overton, P. R. Bennett, and N. M. Fisk, "High sensitivity of fetal DNA in plasma compared to serum and nucleated cells using unnested PCR in maternal blood," *Fetal Diagnosis and Therapy*, vol. 15, no. 2, pp. 102–107, 2000.
- [12] M. Hideström, R. Stokowski, K. Song et al., "Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis," *Fetal Diagnosis and Therapy*, vol. 31, no. 2, pp. 122–128, 2012.
- [13] G. Norbury and C. J. Norbury, "Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: how close are we?" *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 76–83, 2008.
- [14] R. W. K. Chiu, L. L. M. Poon, T. K. Lau, T. N. Leung, E. M. C. Wong, and Y. M. D. Lo, "Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma," *Clinical Chemistry*, vol. 47, no. 9, pp. 1607–1613, 2001.
- [15] T. J. Legler, Z. Liu, A. Mavrou et al., "Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma," *Prenatal Diagnosis*, vol. 27, no. 9, pp. 824–829, 2007.
- [16] R. Dhallan, W.-C. Au, S. Mattagajasingh et al., "Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation," *Journal of the American Medical Association*, vol. 291, no. 9, pp. 1114–1119, 2004.
- [17] Y. Zhang, Q. Li, N. Hui, M. Fei, Z. Hu, and S. Sun, "Effect of formaldehyde treatment on the recovery of cell-free fetal DNA from maternal plasma at different processing times," *Clinica Chimica Acta*, vol. 397, no. 1–2, pp. 60–64, 2008.
- [18] M. R. Fernando, K. Chen, S. Norton et al., "A new methodology to preserve the original proportion and integrity of cell-free fetal DNA in maternal plasma during sample processing and storage," *Prenatal Diagnosis*, vol. 30, no. 5, pp. 418–424, 2010.
- [19] V. Cirigliano, G. Voglino, E. Ordóñez et al., "Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience," *Prenatal Diagnosis*, vol. 29, no. 1, pp. 40–49, 2009.
- [20] X. Y. Zhong, W. Holzgreve, and S. Hahn, "Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma," *Swiss Medical Weekly*, vol. 131, no. 5–6, pp. 70–74, 2001.
- [21] X. Y. Zhong, M. R. Bürk, C. Troeger, L. R. Jackson, W. Holzgreve, and S. Hahn, "Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses," *Prenatal Diagnosis*, vol. 20, no. 10, pp. 795–798, 2000.
- [22] E. Wang, A. Batay, C. Struble, T. Musci, K. Song, and A. Oliphant, "Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma," *Prenatal Diagnosis*, vol. 33, no. 7, pp. 662–666, 2013.
- [23] A. Gerovassili, C. Garner, K. H. Nicolaides, S. L. Thein, and D. C. Rees, "Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities?" *Prenatal Diagnosis*, vol. 27, no. 2, pp. 104–110, 2007.
- [24] M. Bauer, G. Hutterer, M. Eder et al., "A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome," *Prenatal Diagnosis*, vol. 26, no. 9, pp. 831–836, 2006.
- [25] C. J. Jorgez, D. D. Dang, J. L. Simpson, D. E. Lewis, and F. Z. Bischoff, "Quantity versus quality: optimal methods for cell-free DNA isolation from plasma of pregnant women," *Genetics in Medicine*, vol. 8, no. 10, pp. 615–619, 2006.
- [26] A. N. Barrett, B. G. Zimmermann, D. Wang, A. Holloway, and L. S. Chitty, "Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 10, Article ID e25202, 2011.
- [27] S. P. Müller, I. Bartels, W. Stein, G. Emons, K. Gutensohn, and T. J. Legler, "Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days," *Prenatal Diagnosis*, vol. 31, no. 13, pp. 1300–1304, 2011.
- [28] I. Banzola, I. Kaufmann, O. Lapaire, S. Hahn, W. Holzgreve, and C. Rusterholz, "Isolation of serum nucleic acids for fetal DNA analysis: comparison of manual and automated extraction methods," *Prenatal Diagnosis*, vol. 28, no. 13, pp. 1227–1231, 2008.
- [29] F. B. Clausen, G. R. Krog, K. Rieneck, and M. H. Dziegiele, "Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit," *Prenatal Diagnosis*, vol. 27, no. 1, pp. 6–10, 2007.
- [30] T. J. Legler, Z. Liu, K.-H. Heermann et al., "Specific magnetic bead-based capture of free fetal DNA from maternal plasma," *Transfusion and Apheresis Science*, vol. 40, no. 3, pp. 153–157, 2009.
- [31] S. Grill, I. Banzola, Y. Li et al., "High throughput non-invasive determination of foetal Rhesus D status using automated extraction of cell-free foetal DNA in maternal plasma and mass spectrometry," *Archives of Gynecology and Obstetrics*, vol. 279, no. 4, pp. 533–537, 2009.
- [32] J.-M. Minon, C. Gerard, J.-M. Senterre, J.-P. Schaaps, and J.-M. Foidart, "Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium," *Transfusion*, vol. 48, no. 2, pp. 373–381, 2008.
- [33] H. C. Macher, P. Noguerol, P. Medrano-Campillo et al., "Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: results in clinical benefits and cost saving," *Clinica Chimica Acta*, vol. 413, no. 3–4, pp. 490–494, 2012.
- [34] M. Grande, E. Ordóñez, V. Cirigliano et al., "Clinical application of midtrimester non-invasive fetal RHD genotyping and identification of RHD variants in a mixed-ethnic population," *Prenatal Diagnosis*, vol. 33, no. 2, pp. 173–178, 2013.
- [35] E. Ordóñez, L. Rueda, M. P. Cañadas, C. Fuster, and V. Cirigliano, "Development and validation of multiplex real-time PCR assay for noninvasive prenatal assessment of fetal RhD status and fetal sex in maternal plasma," *Fetal Diagnosis and Therapy*, vol. 34, no. 1, pp. 13–18, 2013.

Original Paper

Fetal Diagn Ther 2013;34:13–18
DOI: 10.1159/000346809Received: December 26, 2012
Accepted after revision: January 4, 2013
Published online: March 14, 2013

Development and Validation of Multiplex Real-Time PCR Assay for Noninvasive Prenatal Assessment of Fetal RhD Status and Fetal Sex in Maternal Plasma

Elena Ordoñez^{a,b} Laura Rueda^{a,b} M. Paz Cañadas^a Carme Fuster^b
Vincenzo Cirigliano^{a,b}^aDepartament de Genètica Molecular, Labco Diagnostics, and ^bUnitat de Biologia, Departament de Biologia Cellular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain**Key Words**

RHD genotyping · Maternal circulation · Noninvasive prenatal diagnosis · Polymerase chain reaction

Abstract

Objective: Noninvasive prenatal detection of RhD status and fetal sex is becoming part of daily practice in clinical laboratories. We evaluated a high throughput procedure for automated DNA extraction and developed a multiplex real-time PCR (rt-PCR) for the simultaneous detection of three fetal loci in a single reaction to assess fetal sex and RhD status in maternal plasma. **Methods:** An automated DNA extraction method was evaluated together with a new multiplex rt-PCR assay for the simultaneous detection of exons 5 and 7 of the *RHD* gene together with the Y chromosome marker *DYS14* in maternal plasma. The test was evaluated on 60 samples of known fetal genotype obtained from RhD-negative pregnant women before being applied prospectively on 158 consecutive clinical cases. Results were compared with newborn phenotypes. **Results:** Automated DNA extraction allowed successful analysis of all samples. *DYS14* was detected in 118 cases (male fetuses) and both *RHD* exon 5 and 7 were detected in 148 samples. In 70 samples neither *RHD* exon 5 nor

RHD exon 7 were detected (RhD-negative fetuses). Absence of all three sequences (female RhD-negative fetuses) was assessed in 33 samples. All prenatal results were in concordance with postnatal RhD status and fetal sex without false-positive or -negative results. **Conclusion:** The automated DNA extraction procedure coupled with a novel multiplex rt-PCR assay proved accurate, efficient and reliable allowing rapid and high throughput noninvasive determination of fetal sex and RhD status in clinical samples.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

The discovery of cell-free fetal DNA (cffDNA) in maternal plasma opened new perspectives in noninvasive prenatal diagnosis [1]. Although cffDNA represents only 3–6% of total cffDNA in plasma from pregnant women, measurable amounts of cffDNA can be detected from the first trimester and its quantity increases throughout the pregnancy [2]. This allows detection of paternally inherited sequences absent in the mother such as those derived from the Y chromosome or the *RHD* gene.

Y chromosome-specific sequences can be detected in maternal plasma from the first trimester of pregnancy allowing noninvasive fetal sex determination in pregnancies at risk of X-linked inherited disorders, thus reducing the need for invasive techniques [3–8].

Noninvasive determination of fetal RhD status is useful in the management of pregnancies at risk of hemolytic disease of the fetus and the newborn. This is caused by RhD incompatibility between RhD-negative mothers producing Immunoglobulin G antibodies against fetal D antigen from RhD-positive fetuses. Noninvasive prenatal diagnosis using the detection of fetal *RHD* gene sequences in maternal plasma potentially allows reducing invasive methods and unnecessary treatments with blood derivatives in women carrying RhD-negative fetuses, thus also potentially reducing treatment costs [9–14].

The RhD-negative phenotype is mainly due to the absence of the *RHD* gene and it is found in 15% of Caucasians and in 3–5% of African populations. However, over 50% of RhD-negative Africans are carriers of two different *RHD* gene variants, the *RHD* pseudogene (*RHDΨ*) bearing a duplication in exon 4 and a nonsense mutation in exon 6 [15] or the hybrids *RHD-CE-D* carrying exons from both the *RHD* and *RHCE* genes [16, 17]. On the other hand, other relatively common RhD variants, such as the DVI, may result in RhD-positive phenotypes despite the lack of *RHD* exon 5. This poses difficulties for RhD genotyping as nonfunctional *RHD* sequences could be detected in maternal plasma even in presence of RhD-negative fetuses or specific *RHD* exons could be undetectable even in presence of positive fetuses; thus the need of accurate selection of target genomic sequences has already been stressed in order to avoid false-positive or -negative *RHD* results [18, 19]. Our aim was to set up a simple, accurate and reliable test for noninvasive prenatal determination of fetal RhD status and sex using maternal plasma.

We evaluated an automated DNA extraction procedure suitable for high throughput analyses together with a new multiplex real-time PCR (rt-PCR) assay for the simultaneous detection of *RHD* gene exons 5, 7 and the *DYS14* multicopy sequence on the Y chromosome for fetal sexing. Multiplex rt-PCR primers and probes were designed targeting the *RHD* exon 5 also allowing discrimination of true RhD-negative fetuses from cases carrying common *RHD* gene variants (such as *RHDΨ* or the *RHD-CE-D*). A second multiplex rt-PCR was also developed to confirm negative results using alternative sequences such as the *RHD* exon 10 and the Y chromosome marker *SRY* for fetal sexing.

Materials and Methods

Samples

DNA extraction and multiplex rt-PCR were evaluated using 60 samples of known fetal *RHD* genotype obtained from isoimmunized RhD-negative women undergoing amniocentesis or chorionic villus sampling. Blood samples were collected before the invasive procedure, plasma separated within 24 h, coded and kept at –20°C for up to 2 years before the analysis. The assay was then applied prospectively on 158 consecutive clinical samples collected between 13 and 28 weeks of gestation (mean 22). At least 6 ml of blood was collected in 3 ml EDTA-K tubes and kept at 4°C, plasma was separated by centrifugation at low speed (10 min at 1,200 g) within 24 h from venipuncture. A second high-speed centrifugation of 10 min at 16,000 g and 4°C was performed in all samples. Plasmas were coded and stored at –20°C until DNA extraction.

DNA Extraction

A total of 850 µl plasma was processed using the COBAS AmpliPrep-Total Nucleic Acid Isolation Kit® and creating a custom module on the COBAS AmpliPrep® DNA/RNA automated extractor from Roche Diagnostics. Final elution volume was of 75 µl and extracted DNAs were stored at –20°C until analysis. A total of 9 µl was used as template for each PCR reaction.

rt-PCR

As shown in table 1, two independent TaqMan assays were developed for the simultaneous detection of exons 5 and 7 of the *RHD* gene together with the *DYS14*, or the exon 10 and the *SRY*.

PCR primers and probe for the exon 7 of the *RHD* gene were designed using the Primer Express Software (Applied Biosystems), primers and probe for the *RHD* exon 5 were adapted from Finning et al. [18] to also target the mismatch which allows discriminating the *RHDΨ*. The *DYS14* multicopy sequence on the Y chromosome, adapted from Zimmerman et al. [20], was also included in the multiplex rt-PCR assay. TaqMan MGB probes were labeled with different fluorochromes allowing all sequences to be analyzed in a single multiplex reaction (table 1). Primers and probes were also selected to target the *RHD* exon 10 and *SRY* [3] with a second multiplex reaction which was used to confirm negative samples and ambiguous results. All plasma samples from RhD-negative female fetuses were also tested using rt-PCR amplification of the β-actin gene to confirm the efficiency of total plasma DNA extraction and the absence of PCR inhibitors.

All PCR reactions were performed including 9 µl of extracted DNA in a final volume of 25 µl using the Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) and primer/probes concentrations as shown in table 1. After 2 min incubation at 50°C with AmpErase and 10 min at 95°C for Taq activation, PCR was performed for 50 repeating cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min on the 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All samples were tested in triplicates.

Analysis

Samples were considered as derived from RhD-positive fetuses if both *RHD* exons 5 and 7 were detected in at least two replicates following Multiplex 1.

Table 1. Primers and probes used for multiplex rt-PCR assays

Target (amplicon size)	Name	Sequence (5'-3')	PCR concentration, nM (final volume: 25 µl)
<i>Multiplex 1</i>			
DYS14 ¹ gene (84 bp)	DYS14F	GGGCCAATGTTGATCCTTCTC	1,000
	DYS14R	GCCCCATCGGTCACTTACACTTC	1,000
	DYS14P	(NED) TCTAGTGGAGAGGTGCTC (MGB)	640
RHD ² exon 5 (82 bp)	r5F	CGCCCTCTTCTGTGGATG	600
	r5R	GAACACGGCATTCTTCTTTC	600
	r5P	(6-Fam) CTGGCCAAGTTTC (MGB)	200
RHD exon 7 (57 bp)	r7F	TGCTGCTGGTGCTTGATACC	800
	r7R	CATGTGGGTCACTGGGCTTA	800
	r7P	(VIC) CGGAGCCGCAAT (MGB)	200
<i>Multiplex 2</i>			
RHD ³ exon 10 (74 bp)	r10F	CCTCTCACTGTTGCCGTGATT	800
	r10R	AGTGCTGGCGAACATT	800
	r10P	(VIC) TACGTGAGAAACCTCATGACAGCAAATCT (TAMRA)	240
SRY ³ gene (78 bp)	SRYF	TCCCTCAAAAGAAACCGTGCAT	800
	SRYR	AGATTAATGGTTGCTAAGGACTGGAT	800
	SRYP	(6-Fam) CACCAGCAGTACTCCCCACAACCTTT (TAMRA)	240
β-Actin (137 bp)	β-actF	GCGCCGTTCCGAAGTT	800
	β-actR	CGGGGGATCGGCAAA	800
	β-actP	(NED) ACCGCCGAGACCGCGTC (MGB)	240

F = Forward primer; R = reverse primer; P = probe. Reporter (5') and quencher (3') used for probes are also shown.

¹ Adapted from reference 20. ² Adapted from reference 18. Bases discriminating RHD and RHCE are shown in bold; bases discriminating RHD and RHDΨ are underlined. ³ Adapted from reference 4.

Positive amplification for *DYS14* in at least two replicates was considered evidence of male fetuses. Samples negative for all targets (RhD-negative females) were confirmed using a second DNA extraction with Multiplex 2 and amplification of the β-actin gene.

Positive results with a threshold cycle value (*C_t*) ≥42 for the same target in two replicates or samples with detectable amplification for one or more targets in only one of the replicates were considered as inconclusive and confirmed on a second DNA extraction. Predicted fetal RhD status and sex were compared in all cases with newborn phenotypes.

Results

During the preliminary assay evaluation, automated DNA extraction from maternal plasma was successful in all cases, providing concordant results for fetal RhD genotyping and sex in all 60 samples analyzed. Multiplex amplification of fetal targets resulted in *C_t*s ≥33 and <38. Samples with positive RHD targets with *C_t*<30 were only observed in the course of preliminary set-up experiments,

these were all investigated further using the correspondent buffy coat to confirm the maternal origin (data not shown).

Multiplex 1 provided inconclusive results in 5/158 samples, which were correctly assessed following the second DNA extraction. Only in four samples did one sequence fail to amplify in one of the replicates, exon 5 in 3 cases and exon 7 in one.

All other samples showed full concordance between the replicates. As shown in table 2, both *RHD* exons 5 and 7 were detected in 148 samples (68%), 81 corresponding to male and 67 to female fetuses. 70 RhD-negative fetuses were detected (32%), 33 females and 37 males. *DYS14* was detected in 118 cases corresponding to male fetuses. No false-negative or -positive results were observed.

Multiplex 2 for *RHD* exon 10 and SRY was performed to confirm 33 samples (15%) negative for all sequences of Multiplex 1 (*RHD*-negative females). *RHD* exon 10 was detected in 2 cases that were genotyped as a possible *RHD* gene hybrid variant compatible with a fetal RhD-negative phenotype.

Table 2. Fetal RHD status and sex prediction by Multiplex I analysis ofcffDNA in maternal plasma compared with newborn phenotypes

Simultaneous DYS14/RHD5/RHD7 detection in cffDNA			Fetal genotype (plasma)	Newborn (phenotype)
DYS14 positive	RHD exon 5 positive	RHD exon 7 positive		
81	81	81 ¹	XY/RhD+ n = 81 (37%)	male RhD+
37	-	-	XY/Rhd n = 37 (17%)	male RhD-
-	67 ¹	67	XX/RhD n = 67 (31%)	female RhD+
-	-	-	XX/Rhd n = 33 (15%)	female RhD-

¹ Three samples failed to amplify exon 5 and one sample failed to amplify exon 7 in one of the replicates.
² Two samples were exon 10 positive as detected by the Multiplex 2 assay.

All prenatal results were in concordance with postnatal RhD status and fetal sex (table 2), the presence of exon 10 in both cases with possible RhD variants was also confirmed with follow-up genotyping of the newborns.

Discussion

cffDNA is present in a low proportion in maternal plasma, thus an efficient DNA extraction method and a robust PCR assay are crucial to reduce the number of inconclusive results. For the same reason, also the need of triplicate analysis for each sample has been stressed [21–25]. The use of an automated extractor ideally should help in reducing the risk of sample mishandling and cross-contamination, while also contributing to a reduction of costs [26–31].

We successfully evaluated a modified protocol for the COBAS AmpliPrep® DNA/RNA automated extractor from Roche Diagnostics, which allows easy handling of up to 72 samples/run at very low cost. This is a CE/FDA-approved system routinely used for the detection and quantification of viral nucleic acids in clinical samples with proven efficiency to allow PCR detection of targets with concentrations as low as 5 copies/ml. DNA extraction protocol was modified to increase the initial plasma volume up to 850 µl and a final elution volume of 75 µl. A new multiplex rt-PCR assay was then developed for the

simultaneous detection of three fetal loci in the same reaction. Despite being quite uncommon in diagnostic settings [32, 33], this approach allowed to test each sample in triplicate with a single DNA extraction, providing conclusive results for 213/218 (98%) of cases in less than 5 h.

Fetal sex was assessed in all cases using the *DYS14* included in Multiplex 1. This was of particular help in 37 *RHD*-negative samples where the presence of cffDNA could unequivocally be confirmed by detecting the Y chromosome-derived sequence.

All RhD-negative female fetuses were also correctly genotyped by cffDNA analysis. In these cases, Multiplex 1 results were confirmed in a second DNA extraction using Multiplex 2 together with the amplification of the *β*-actin gene. No discrepant results were observed between the two multiplexes thus, in these cases, the second DNA extraction might even not be necessary, provided the presence of DNA is always confirmed by PCR amplification of the *β*-actin gene.

Confirmation of DNA extraction efficiency did not provide information about the actual presence of fetal DNA in the sample. Active research is ongoing in this field to assess the suitability of universal fetal markers like STR or SNPs analysis. Also, the hypermethylated DNA sequence of RASSF1A gene was reported as the first suitable universal marker for cffDNA. However, the labor-intensive procedure related to the analysis of universal fetal markers has limited its introduction in the daily practice of clinical laboratories [34–44].

In our series, the DNA extraction coupled with the multiplex rt-PCR proved to be efficient and reliable discriminating all *RHD*-negative females without false-negative results. The approach of double confirming *RHD*-negative female results with another Multiplex including the SRY and *RHD* exon 10 allowed detecting exon 10-positive *RHD* variants in 2 cases, likely *RHD-CE-D* hybrids compatible with the RhD-negative phenotype confirmed at postnatal analysis. For sure some of these cases from male fetuses could have been missed and reported as *RHD*-negative following the first multiplex rt-PCR. However, even if this was the case, genotype result from maternal plasma was found in agreement with the neonatal phenotype in all cases.

Although Multiplex 1 was designed to also target the *RHDY*, which is a common variant in Black African populations, no such cases were detected, probably because of the ethnic origin of our population (mainly Caucasian) and the limited number of samples analyzed. The inclusion of exon 5 in this assay is potentially of great diagnostic value as in these cases exons 7 and/or exon 10 might

provide false-positive results if analyzed alone [11, 14, 18, 22].

We successfully evaluated an automated DNA extraction method for cfDNA analysis between 13 and 28 weeks of gestation. This was coupled with a new multiplex rt-PCR in order to further simplify the procedure

with a view to its introduction in the daily routine of clinical diagnostic laboratories. The simultaneous analysis of three fetal sequences was efficient and reliable for both RHD genotyping and fetal sexing, allowing its correct prediction in all clinical cases analyzed in the course of this study.

References

- 1 Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-487.
- 2 Lo YM, Tein MS, Lau TK, Leung TN, Poon PM, et al: Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-775.
- 3 Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S: Detection of fetal rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG* 2000;107:766-769.
- 4 Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S: Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Swiss Med Wkly* 2001;131:70-74.
- 5 Rijnders RJ, Van Der Luijt RB, Peters ED, Goeree JK, Van Der Schoot CE, Ploos Van Amstel JK, Christiaens GC: Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat Diagn* 2003;23:1042-1044.
- 6 Johnson KL, Dukes KA, Vidaver J, LeShane ES, Ramirez I, Weber WD, Bischoff FZ, Hahn S, Sharma A, Dang DX, Hire LM, Bianchi DW, Simpson JL, Holzgreve W, Elias S, Klinger KW: Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR. *Clin Chem* 2004;50:516-521.
- 7 Hyett JA, Gardener G, Stojiljkovic-Mikic T, Fanning KM, Martin PG, Roddeck CH, Chitty LS: Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat Diagn* 2005;25:1111-1116.
- 8 Hill M, Fanning K, Martin P, et al: Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Genet* 2011;80:68-75.
- 9 Daniels G, Fanning K, Martin P, Soothill P: Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 2004;87:225-232.
- 10 Daniels G, Fanning K, Martin P, Summers J: Fetal RhD genotyping: a more efficient use of anti-D immunoglobulin. *Transfus Clin Biol* 2007;14:568-571.
- 11 Van der Schoot CE, Hahn S, Chitty LS: Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:63-68.
- 12 Avent ND: RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges. *Methods Mol Biol* 2008;444:185-201.
- 13 Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, et al: Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion* 2012;52:752-758.
- 14 Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Rasmussen EE, Dziegiele MH: Evaluation of two real-time multiplex PCR screening assays detecting fetal RHD in plasma from RhD-negative women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Fetal Diagn Ther* 2011;29:155-163.
- 15 Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G: The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95:12-18.
- 16 Faas BH, Beckers EA, Wildoer P, Ligthart PC, Overbeeke MA, Zondervan HA, von dem Borne AE, van der Schoot CE: Molecular background of VS and weak C expression in Blacks. *Transfusion* 1997;37:38-44.
- 17 Daniels GL, Faas BH, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, Zondervan HA, von dem Borne AE, van der Schoot CE: The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion* 1998;38:951-958.
- 18 Fanning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND: Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42:1079-1085.
- 19 Daniels G, Fanning K, Martin P, Massey E: Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn* 2009;29:101-107.
- 20 Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S: Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2005;51:1598-1604.
- 21 Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucja J, Kulovany E, Vlk R: Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther* 2005;20:275-280.
- 22 Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, de Haas M: Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *BJOG* 2011;118:1340-1348.
- 23 Legler TJ, Liu Z, Mavron A, Fanning K, Hromadnikova I, Galbiati S, Meaney C, Hultén MA, Crea F, Olson ML, Maddocks DG, Huang D, Fisher SA, Sprenger-Haussels M, Soussan AA, van der Schoot CE: Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2007;27:824-829.
- 24 Legler TJ, Liu Z, Heermann KH, Hempel M, Guttensohn K, Kiesewetter H, Pruss A: Specific magnetic bead-based capture of free fetal DNA from maternal plasma. *Transfus Apher Sci* 2009;40:153-157.
- 25 Banzola I, Kaufmann I, Lapaire O, Hahn S, Holzgreve W, Rusterholz C: Isolation of serum nucleic acids for fetal DNA analysis: comparison of manual and automated extraction methods. *Prenat Diagn* 2008;28:1227-1231.
- 26 Grill S, Banzola I, Li Y, Rekhvashvili T, Legler TJ, Müller SP, Zhong XY, Hahn S, Holzgreve W: High throughput non-invasive determination of foetal rhesus D status using automated extraction of cell-free foetal DNA in maternal plasma and mass spectrometry. *Arch Gynecol Obstet* 2009;279:533-537.
- 27 Grooterk-Tax MG, Soussan AA, de Haas M, Maaskant-van Wijk PA, van der Schoot CE: Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion* 2006;46:2142-2148.
- 28 Fanning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G: Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD-negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008;336:816-818.

- 29 Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Dziegiel MH: Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *Prenat Diagn* 2007;27:6–10.
- 30 Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM: Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2008;48:373–381.
- 31 Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, Daniels G, Nicolaides KH: Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11–13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther* 2011;29:301–306.
- 32 Macher HC, Noguerol P, Medrano-Campillo P, et al: Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: results in clinical benefits and cost-saving. *Clin Chim Acta* 2012;413:490–494
- 33 Tynan JA, Mahboubi P, Cagasan LL, et al: Restriction enzyme-mediated enhanced detection of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J Mol Diagn* 2011;13:382–389.
- 34 Scheffer PG, de Haas M, van der Schoot CE: The controversy about controls for fetal blood group genotyping by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Curr Opin Hematol* 2011;18:467–473.
- 35 Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Chow KCK, Lo YMD: Differential DNA Methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2002;48:35–41.
- 36 Dennis LO YM: Fetal DNA in maternal plasma: progress through epigenetics. *Ann NY Acad Sci* 2006;1075:74–80.
- 37 Perl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW: Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* 2000;106:45–49.
- 38 Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzinska A, Kalinowska A: Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005;45:1473–1480.
- 39 Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH, Lo YM: Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 2006;52:2211–2218.
- 40 White HE, Dent CL, Hall VJ, Crolla JA, Chitty LS: Evaluation of a novel assay for detection of the fetal marker RASSF1A: facilitating improved diagnostic reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *PLoS One* 2012;7:e45073.
- 41 Bombard AT, Akolekar R, Farkas DH, Vanagtmael AL, Aquino F, Oeth P, Nicolaides KHF, et al: RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD-negative women. *Prenat Diagn* 2011;31:802–808.
- 42 Tynan JA, Angkachatchai V, Ehrlich M, Paladino T, van den Boom D, Oeth P: Multiplexed analysis of circulating cell-free fetal nucleic acids for noninvasive prenatal diagnostic RHD testing. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:251.e1–e6.
- 43 Tounta G, Vrettou C, Kolialaxi A, et al: A multiplex PCR for non-invasive fetal RHD genotyping using cell-free fetal DNA. *In Vivo* 2011;25:411–417.
- 44 Kolialaxi A, Tounta G, Apostolou P, et al: Early non-invasive detection of fetal Y chromosome sequences in maternal plasma using multiplex PCR. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;161:34–37.

Erratum

In the paper by Wright D, Akolekar R, Syngelaki A, Poon LCY and Nicolaides KH, entitled 'A competing risks model in early screening for preeclampsia' [Fetal Diagn Ther 2012;32:171–178, DOI: 10.1159/000338470], some amendments should be made. The corrections are for the following tables:

Table 2. Fitted regression model for posited gestational age in weeks at delivery with PE

Age >30 years should be replaced by Age – 30 years, if age >30 years
Weight ≤69 kg should be replaced by Weight – 69 kg
Height ≤1.64 m should be replaced by Height – 1.64 m

Table 3. Fitted regression model for \log_{10} uterine artery PI in unaffected pregnancies

Gestation ≤77 days should be replaced by Gestation – 77 days
Weight ≤69 kg should be replaced by Weight – 69 kg
(Weight ≤69 kg)² should be replaced by (Weight – 69 kg)²

Table 4. Fitted regression model for \log_{10} MAP in unaffected pregnancies

Weight ≤69 kg should be replaced by Weight – 69 kg
(Weight ≤69 kg)² should be replaced by (Weight – 69 kg)².

ORIGINAL ARTICLE

Clinical application of midtrimester non-invasive fetal RHD genotyping and identification of RHD variants in a mixed-ethnic population

M. Grande¹, E. Ordoñez², V. Cirigliano², J. Cid³, E. Grau³, A. Pericot¹, I. Teixido¹, J. L. Marín⁴ and A. Borrell^{1*}

¹Department of Maternal-Fetal Medicine, Institute Gynecology, Obstetrics and Neonatology, Hospital Clinic Barcelona, Catalonia, Spain

²Laboratori General, Barcelona, Catalonia, Spain

³Institut Català de la Salut, Barcelona, Catalonia, Spain

⁴Centre de Diagnostic Biomèdic, Barcelona, Catalonia, Spain

*Correspondence to: Antoni Borrell. Email: aborrell@clincat.cat

ABSTRACT

Objective This study aims to assess the suitability of non-invasive prenatal *RHD* genotyping in non-immunized midtrimester pregnant women from a mixed ethnic population, to prevent unnecessary anti-D immunoglobulin prophylaxis and to identify *RHD* variants

Methods Rhesus D-negative pregnant women were offered fetal *RHD* genotyping at 24 gestational weeks. A total of 284 samples were tested for *RHD* status using multiplex rt-PCR amplification of exons 5 and 7 of the *RHD* gene and exons 6 and 10 in selected cases. Women carrying *RHD*-negative fetuses were counseled about their option to avoid routine antenatal anti-D immunoglobulin administration. Diagnostic accuracy of *RHD* genotyping was compared with postnatal Rhesus D serotyping.

Results A total of 184 positives (65%), 91 negatives (32%) and 7 cases (2.5%) compatibles with *RHD* variants were detected by *RHD* genotyping. No false negative results were found, and a single false positive was observed in a twin pregnancy. Genotyping was accepted when offered by 94% of women (284/302), and anti-D immunoglobulin was avoided in 95% (90/95) of *RHD*-negative fetuses.

Conclusions Non-invasive routine antenatal *RHD* genotyping at 24 weeks of pregnancy is a highly accurate method, resulting in the avoidance of 95% of unnecessary administrations of anti-D immunoglobulin, with no false negative results. © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Funding sources: This study was supported by Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria [ETES PI09/90539].
Conflicts of interest: None declared

INTRODUCTION

Non-invasive fetal *RHD* genotyping in maternal blood was initially applied in alloimmunized pregnant women to confirm the risk of fetal hemolytic disease, avoiding the need of genotyping in amniotic fluid.¹ More recently, it has been applied to Rhesus D (RhD)-negative pregnant women from the general population in order to avoid routine antenatal anti-D prophylaxis, when the fetus was found to be *RHD* negative.²

The *RHD* gene is located in chromosome 1, and it encompasses ten exons contiguous to the *RHCE* gene to form the *RH* locus.³ In Caucasians, the vast majority of RhD negative individuals are homozygous for a complete deletion of the *RHD* gene.⁴ However, in other ethnicities such as black Africans, several *RHD* variants have been described with an RhD-negative phenotype, such an inactive *RHD* gene called *RHDΨ* pseudogene harboring a 37-bp duplication in exon 4

and a nonsense mutation in exon 6⁵ or the *RHD-CE-D* hybrid gene containing exons from both *RHD* and *RHCE*.^{6,7}

Prenatal *RHD* genotyping can be performed in maternal plasma, using circulating cell-free fetal DNA (cffDNA) to detect fetal *RHD*-specific sequences, which are absent in RhD-negative women.^{8–11} Several studies on *RHD* genotyping in individuals of Caucasian origin have reported an accuracy near to 100%, using sequences from two or three exons.^{12–14} However, first trimester *RHD* genotyping may result in a high false negative rate, and limited data are available on *RHD* genotyping in mixed ethnic populations, including postnatal confirmation of plasma analysis and of the *RHD* variants.

The aim of our study was to screen our mixed-ethnic population in the late second trimester to increase the sensitivity of *RHD* detection by exploiting the increased amount of cffDNA in maternal plasma. We also aimed to assess

the accuracy of *RHD* genotyping using *RHD* exons 5, 7 and 10 in our mixed-ethnic population, including the identification and postnatal confirmation of *RHD* variants and the evaluation of its implementation as a routine test within the Catalan public health service in Spain.

MATERIALS AND METHODS

Population and study design

From February 2010 to October 2011, 302 RhD-negative pregnant women from the general population, attending one of the six health centers of Barcelona-West health district, were offered fetal *RHD* genotyping in maternal blood, at 24–26 gestational weeks, at the time of second trimester blood testing. The study was approved by the Hospital Ethics Committee, and all samples were collected with informed consent. Pregnant women were counseled about their option to avoid routine antenatal anti-D immunoglobulin in the third trimester in the presence of *RHD*-negative fetus. Twin pregnancies were also included in the study.

Sample collection

Blood samples were collected in two different 3 mL EDTA-K vacutainer tubes and plasma separated by low speed centrifugation (10 min at 3000 rpm) within 24 h from extraction. A second high speed centrifugation of 10 min at 12 500 rpm and 4 °C was performed in all samples. Collected supernatants were coded and stored at –20 °C until further processing.

DNA extraction

DNA was extracted from 850 µL of plasma using the COBAS AmpliPrep® DNA/RNA automated extractor (Roche Diagnostics), lowering the final elution volume to 75 µL; 9 µL of this volume was used as PCR template.

Real-time PCR

All samples were tested using a single multiplex rt-PCR including the primers and probes for *RHD* exons 5 and 7 and the *DYS14* multiplex sequence on the Y chromosome. Primers and probes for the *RHD* exon 5 were adapted from Finning *et al.*¹¹ to also target the mismatches that allow discriminating the *RHD^W* pseudogene (Table 1 and Figure 2).

The inclusion of one marker on the Y chromosome allows confirming the presence of fetal DNA in *RHD*-negative male fetuses. A second multiplex including *RHD* exon 10 and SRY was used to confirm *RHD*-negative fetuses on a second DNA extraction. Negative female results were reported following two independent assays performed in triplicate (six PCRs in total on two different DNA extractions), with positive amplification of the β -actin gene to confirm the presence of DNA and exclude the possibility of assay failure. PCR amplification of the *RHD* exon 6 was only used in selected cases to confirm the presence of an *RHD* variant.

All rt-PCR amplifications were performed in a final volume of 25 µL using the Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) for 50 repeating cycles using the 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All samples were tested in

Table 1 Primers and probes used for multiplex real-time PCR assays

Target (amplicon size)	Name*	Sequence (5'-3')
DYS14 (84bp)	DYS14F	GGGCAATGTGTATCTCTCTC
	DYS14R	GCCCCATCGGTCACTTACACTC
	DYS14P	[NED] TCTAGTGAGAGGTGCTC [MGB]
<i>RHD</i> exon 5 (82 bp)	i5F	CGCCCTCTCTGTGCGATG
	i5R	GAACACGGCATCTTCCTTC
	i5P	[6-Fam] CTGGCCAAGTT [MGB]
<i>RHD</i> exon 7 (57 bp)	i7F	TGCTGCTGGTGCCTGATACC
	i7R	TAAGCCCAGTGACCCACATG
	i7P	[VIC] CGGAGCCGCAAT [MGB]
<i>RHD</i> exon 10 (74 bp)	i10F	CCTCTCACTGTGCCCTGCATT
	i10R	AGTGCCTGCGCGAACATT
	i10P	[VIC] TACGTGAGAAACGCTCAT GACAGCAAAGTCT [TAMRA]
SRY (78 bp)	SRYF	TCCTCAAAAGAAACCGTGCAT
	SRYR	AGATTAATGGTGCTAAGGACTGGAT
	SRYP	[6-Fam] CACCAAGCAGTACTCCCA CAACCTCTT [TAMRA]
<i>RHD</i> exon 6 (153 bp)	i6F	ACACGCTATTCTCTTGCGACAGTCT
	i6R	AGGTACTTGGCTCCCCAAC
	i6P	[VIC] AGATAGCCAGCCACAA GACCCAG [MGB]
β -Actin (137 bp)	β -actF	GC GCCCGTICCGGAAGTT
	β -actR	CGGC GGATCGGCAA
	β -actP	[NED] ACCGCCGAGACCGCGTC [MGB]

Primers and probes in exons 5 and 6 are designed on the mismatches that distinguish *RHD* from *RHCE* (bold) and *RHD* from *RHD^W* (double-underlined). Probes labeling for multiplex PCR amplification is also shown.

*F = forward primer, R = reverse primer, P = probe.

triplicates; positive and DNA extraction negative controls were included in all PCR batches.

Sample analysis

Samples were scored as *RHD*-positive if both *RHD* exons 5 and 7 were detected in at least two replicates and *RHD*-negative in the absence of amplification for all replicates. Positive amplification for *DYS14* in at least two replicates was considered evidence of male fetuses. Positive results with a threshold cycle value (*Ct*) ≥ 42 for any target or samples with detectable amplification in only one of the replicates were deemed inconclusive and confirmed on a second DNA extraction.

Data analysis

Maternal and demographic data and details on antenatal *RHD* genotyping and postnatal RhD serotyping were registered in an SPSS database (Statistical Package for the Social Sciences). Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of antenatal *RHD* genotyping were compared

with conventional RhD serotyping, carried on routinely in umbilical cord blood after birth. Variants were confirmed in newborn blood spots using a single multiplex rt-PCR including primers and probes for *RHD* exons 5 and 7 and 6 and 10 in selected cases. Data were stratified by ethnic origin, because of known *RHD* variability in non-Caucasian ethnicities.

RESULTS

Genotyping was accepted by 94% (284/302) of RhD-negative pregnant women, and a total of 284 plasma samples were collected from 268 singleton and 16 twin pregnancies. Our study population was of mixed ethnic origin including 84% Caucasians ($n=238$), 12% Latin Americans (n=35), 1.4% Magreb Africans (n=4), 1.1% Pakistanis (n=3), 0.4% Oriental (n=1), 0.4% Sub-Saharan Africans (n=1) and 0.7% (n=2) from other ethnicities. Blood group distribution was as follows: 43% O negative ($n=123$), 39% A negative ($n=112$), 13% B negative ($n=36$) and 3.9% AB negative ($n=11$) (Table 2).

Two samples were not informative, as *RHD* exons were detected in amount compatible with a maternal origin; the maternal *RHD* positive result was also confirmed on DNA extracted from the correspondent buffy coat. These two samples were excluded from further analysis. Antenatal *RHD* genotyping resulted in 65% positive (184/282) and 32% negative (91/282) results (Figure 1). Negative female fetuses accounted for 44% (40/91) of negative results (Table 2).

RHD variants were suspected in 2.5% of samples (7/282) (Table 2), 1.3% (3/238) in those from Caucasian and 11.4% (4/35) from Latin American women. Three samples showed positive amplification for *RHD* exons 7 and 10 in the absence of exon 5, a pattern compatible with *RHD^W* or *RHD^{V1}* variant

(Table 3, Figure 2). Two samples were from Latin American, and the third was from a Caucasian woman. These results were reported as likely *RHD* variants, with a positive phenotype, which was confirmed postnatally by RhD typing. Postnatal follow-up *RHD* genotyping, with further detection of the *RHD* exon 6, confirmed the presence of a possible *RHD^{V1}* type 1 or 4 variant in two Latin American women, and the remaining variant was not confirmed, as all *RHD* exons, including exon 5, were postnatally detected.

The *RHD* exon 10 was only used to confirm *RHD* negative results, using a second PCR on a second DNA extraction. This was the only detectable *RHD* sequence in four samples, compatible with a hybrid *RHD-CE-D* variant (Table 3). Two of these samples were from Latin American and two from Caucasian women, the four cases being reported as *RHD* negatives. Postnatal RhD serotyping and genotyping confirmed the RhD status established at antenatal genotyping.

The single false positive result was observed in one sample from a twin pregnancy, showing *RHD* exons 5 and 7 amplification, while postnatal RhD typing revealed two RhD-negative newborns. Postnatal *RHD* genotyping confirmed the absence of exons 5, 6, 7 and 10 in one of the newborns, in agreement with the RhD-negative phenotype. However, amplification of *RHD* exons 5, 6, 7 and 10 was observed in the sibling, compatible with the antenatal *RHD* genotyping but in disagreement with the RhD typing. Paternal zygosity analysis revealed a heterozygous RhD positive status, which may explain the discordant *RHD* genotypes of siblings. However, a *de novo* mutation or rearrangement inactivating the *RHD* gene in one of the siblings is suspected as the only possible explanation of this discrepant result.

Rhesus D typing of the newborns was concordant with prenatal *RHD* genotyping in 99.6% (281/282) of the pregnancies, resulting in 100% (186/186) sensitivity, 99% (95/96) specificity, 99% (186/187) positive predictive value and 100% (95/95) negative predictive value.

Only 5% (5/95) of women carrying an *RHD*-negative fetus requested antenatal anti-D immunoglobulin. Thus, unnecessary prophylactic treatment could be avoided in 95% (90/95) of women carrying RhD-negative fetuses.

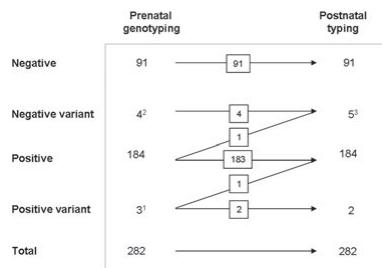
DISCUSSION

Our study demonstrates that midtrimester non-invasive fetal *RHD* genotyping by targeting exons 5, 7 and 10 (with the occasional inclusion of exon 6) is a highly accurate method to avoid unnecessary anti-D immunoglobulin administration in women carrying RhD-negative fetuses. Interestingly, *RHD* variants were found more frequently than expected in our mixed ethnic pregnant population.

Non-invasive fetal *RHD* genotyping has extensively been evaluated in immunized and non-immunized pregnancies since free fetal DNA in maternal plasma was identified.^{9–11,15} The 99.6% of accuracy observed is higher than the overall 94.8% reported in a meta-analysis including 44 protocols for non-invasive fetal *RHD* testing¹⁶ and similar to more recent reports (99.3–99.8%)^{12–14} or to conventional postnatal blood serotyping. False negative results, which are really clinically relevant, were not observed, confirming that fetal genotyping

Table 2 Pregnancy characteristics and sampling results

Ethnic group	
Caucasians	238 (84%)
Latin Americans	35 (12%)
Magreb Africans	4 (1.4%)
Pakistanis	3 (1.1%)
Oriental	1 (0.4%)
Sub-Saharan Africans	1 (0.4%)
Other	2 (0.7%)
Maternal blood group serology	
O negative	123 (43%)
A negative	112 (39%)
B negative	36 (13%)
AB negative	11 (3.9%)
Fetal <i>RHD</i> genotyping/sex determination	
<i>RHD</i> positive/male	101 (36%)
<i>RHD</i> positive/female	83 (29%)
<i>RHD</i> negative/male	51 (18%)
<i>RHD</i> negative/female	40 (14%)
Suspected variant male	5 (1.8%)
Suspected variant female	2 (0.7%)



⁽¹⁾ Exons 6, 7 and 10 positive , exon 5 negative, compatible with DVI type 1 or 4. One case confirmed as positive for all exons at birth

⁽²⁾ Exons 5, 6, and 7 negative, exon 10 positive compatible RHD-CE-D

⁽³⁾ 1 RhD negative newborn with positive exons 5, 6, 7 and 10 compatible with *de novo* mutation

Figure 1 Results of fetal RHD genotyping in 282 pregnancies and the corresponding newborn RhD typing

Table 3 Results of testing 282 consecutive clinical samples for prenatal assessment of RHD genotypes and fetal sex

Prenatal results	RHD exon 5	RHD exon 7	DYS14	RHD exon 10	SRY	RHD exon 6	Anti-D immunoglobulin administration
Male positive (n=101)	101	101	101	Not tested	Not tested	Not tested	yes
Male negative (n=51)	—	—	51	—	51	Not tested	No
Female positive (n=83)	83	83	—	Not tested	Not tested	Not tested	Yes
Female negative (n=40)	—	—	—	—	—	Not tested	No
Male RHD/DVI type 1 or 4 (n=1)	—	1	1	1	1	1	Yes
Female RHD/DVI type 1 or 4 (n=2)	—	2	—	2	—	2	Yes
Male RHD-CE-D (n=4)	—	—	4	4	4	Not tested	No

can achieve a 100% negative predictive value if carried out late in the second trimester. False negative results have mainly been related to specific DNA extraction methods,¹² prolonged stored time before sample processing¹⁷ and, particularly, early gestational age at maternal blood draw, because of the low amount of fetal DNA present in maternal plasma. Although recent first trimester studies have reported false negative rates ranging from 1.1% to 3.5%,^{18–20} we assumed that false negative rates above 1% would have not been easily accepted by clinicians. Thus, we opted to perform cfDNA analysis at the time of routine midtrimester maternal blood sampling (about 24 weeks) when the amount of fetal DNA in maternal plasma is much higher.²¹ Even in this case, the gestational age at reporting time, 1–2 weeks after sampling, is still well ahead the recommended gestational age for routine antenatal anti-D prophylaxis in the third trimester. Furthermore, the

multicopy *DYS14* and the single-copy *SRY*-based internal positive control used together with *RHD* exons 5 and 7 or 10, respectively, at least confirmed the presence of cfDNA in male *RHD*-negative fetuses. Alternatively, the use of three Y-chromosome sequences with the *TGIF* marker has recently been reported to maximize the accuracy of the test,^{20,22} whereas the hypermethylated DNA sequence of *RASSF1A* described as the first universal marker for cfDNA²³ is rarely used in daily routine because of the labor-intensive procedure involved in its analysis. Confirming the presence of fetal specific DNA markers in maternal plasma is of course of paramount importance during first trimester, to reduce false negative results. Different approaches have been used such as multiple SNPs genotyping to detect paternally inherited polymorphisms.^{20,22,24} Our study design targeting the *RHD* genotyping at 24 weeks using a screening multiplex rt-PCR

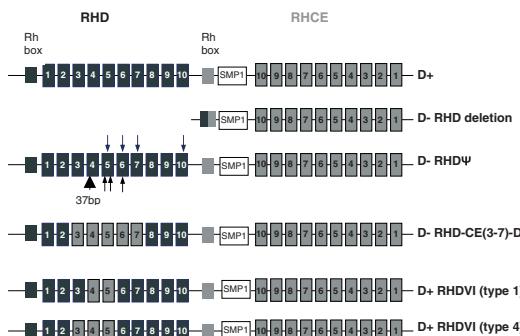


Figure 2 Diagram of Rh genes. RhD negative status (D⁻) is mostly due to the complete lack of the RHD gene. Primers and probes selected for the RHD exons 5 and 6 (top arrows) are designed on mismatches (bottom arrows) allowing discriminating true RhD-negative fetuses from cases carrying common RHD gene variants. The RHD pseudogene can be detected as lack of RHD exons 5 and 6 amplification in the presence of exons 7 and 10. Other Rh gene variants, such as RHD-CE-D (D⁻) hybrids (RHD-CE(3-7)-D shown here) or the DV1 type 1 and type 4 variants, D positive (D⁺), can also be detected

including appropriate selection of *RHD* exons resulted in all RhD-negative fetuses being correctly identified.

There is no consensus about the *RHD* exons to be tested in fetal genotyping, with exons 4, 5, 7 and 10 the most widely used by different groups. *RHD* sequences selection is crucial to discriminate common *RHD* variants in multi-ethnic populations and to avoid false positive and negative results.²⁵ In our series, we screened all samples using exons 5 and 7, confirming negative results with exon 10 and extending the study to exon 6 only in selected cases. The inclusion of exon 5 has been proven useful to detect the *RHD Ψ* pseudogene, which might give false positive results when testing only exons 7 and 10.¹¹ However, in our series, we observed three cases without amplification of this sequence, which could be identified as *RHDVI* variants (either type 1 or 4 and both RhD positive) by detecting amplification for the exon 6. The inclusion of this sequence was of diagnostic value to determine the fetal positive RhD status, allowing for the discrimination of this variant from the *RHD Ψ* , even in one case in which newborn analysis confirmed the exon 5 amplification failure in maternal plasma. Although *RHDVI* type 1 or 4 has been described to account up to 88% *RHDVI* alleles in Spain,²⁶ the *RHDVI* variants were identified in women of Latin-American ethnicity.

The *RHD-CE-D* hybrid was the most frequent variant in our population and could only be detected when confirming the negative results for both exons 5 and 7 in a second DNA extraction, positive for the exon 10. In our experience, this second confirmation might have not been required as the negative *RHD* result for the first two exons would have agreed with the RhD negative result of the newborn. Our results confirm that screening protocols including only two *RHD* exons are not suitable for pregnant women of different ethnicities. Amplification of exons 7 and 10 or exons 5 and 7, for instance, might provide false positive or inconclusive results, respectively, in *RHD Ψ* .

variants.^{18,27} More recently, the use of a single *RHD* exon (4) has been reported to correctly assign the RhD status in *RHD Ψ* and *RHD-CE-D*,¹⁹ but this approach would fail in our population because it would provide a false negative result in *RHDVI* variants.

Newborn blood spots retesting was available and allowed to confirm all suspected variants. Neonatal follow-up raised the suspicion of a new rare variant causing the only false positive result observed in the course of this study. This was a twin pregnancy, in which all *RHD* exons 5, 6, 7 and 10 were detected in maternal plasma, and at birth in one of the two siblings, with discordant RhD-negative serology. Several RHD variants, such as *RHD-CE(8-9)-D* variant, have been described in Europeans as *RHD*-positive haplotype and negative serology with a prevalence of 1:15 512.²⁸ Interestingly, in this case, the rearrangement or mutation even must have arose *de novo* as one of the siblings inherited an *RHD*-negative allele while the other inherited an inactive *RHD* from the RhD⁺ father.

This study is strengthened by it being performed as an interventional study in a real clinical setting, the Catalan public health service, with antenatal visits being carried out in antenatal care centers for low risk women and in the hospital for high risk patients. All six antenatal care centers of our health district were involved in the study, resulting in a high uptake of pregnant women, which agreed in their vast majority both to participate (94%) and to avoid unnecessary prophylaxis (95%). One limitation of *RHD* genotyping in the second trimester might be the exclusion of women with early vaginal bleeding and threatened abortion or undergoing invasive procedures, commonly performed at 12–18 weeks.²⁹ However, these cases account for less than 10% of the pregnant women; thus, the approach of late genotyping would avoid immunoprophylaxis in less than 4% of women with *RHD*-negative fetuses. This 4% overtreatment would have a much smaller impact than the 1.1% to 3.5% undertreatment produced by first trimester false

negative results.^{18,19} On the other hand, the overall proportion of Caucasians in our population (84%) might be overrepresented considering that only 50% deliveries in our hospital are from women of this ethnic group. Difficulties to explain the aims of the study might have precluded a higher representation of other ethnicities (i.e. Latin Americans, Africans or Asians), which more frequently carry RHD variants.

Our results indicate that fetal genotyping with exons 5, 6 (in selected cases), 7 and 10 in our mixed population before 28 weeks of gestation is highly accurate to avoid unnecessary treatment in one third of the pregnant women screened, and it should be considered for further clinical application.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the collaboration of A. Gonçal, J. Bellart, M. Muñoz, R. Mula and J. Fornells from Hospital Clinic of Barcelona and R. Almirall, A. Payaro, N. Dominguez, E. Castellanos, J. Xandri,

A. Vilallón, C. Segui, E. Picola, E. Crespo, I. Bianchi, M. Montaner and C. Armenter from Institut Català de la Salut, Barcelona.

WHAT'S ALREADY KNOWN ABOUT THIS TOPIC?

- Routine antenatal RHD genotyping performed in maternal plasma by real-time PCR is an accurate method to avoid the use of anti-D immunoglobulin when both the pregnant woman and the fetus are RhD negative.

WHAT DOES THIS STUDY ADD?

- Fetal genotyping at 24 weeks of gestation is highly accurate using probes for RHD exons 5 and 7 (10 and 6 in selected cases), minimizing the false negative results and allowing prenatal detection of RHD variants in our mixed ethnic population.

REFERENCES

- Moise KJ Jr. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2008;112:164–76. Review.
- Routine antenatal anti-D prophylaxis for women who are rhesus D negative. Review of NICE technology appraisal guidance 41. National Institute for Clinical Excellence.
- Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000;95:3662–8.
- Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, et al. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991;78:2747–52.
- Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95:12–8.
- Faas BH, Beckers EA, Wildoer P, et al. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion* 1997;37:38–44.
- Daniels GL, Faas BH, Green CA, et al. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion* 1998;38:951–8.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–7.
- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734–8.
- Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, et al. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998;352:1196.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42:1079–85.
- Müller SP, Bartels I, Stein W, et al. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion* 2008;48:2292–301.
- Rouillac-Le Scellour C, Sérafin V, Brossard Y, et al. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma: Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RHD. *Transfus Clin Biol* 2007;14:572–7.
- Minon JM, Gerard C, Senterre JM, et al. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2006;46:873–81.
- Costa JM, Giovangrandi Y, Ernault P, et al. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 2002;119:255–60.
- Geifman-Holtzman O, Grottegut CA, Vaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood—a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1163–73.
- Finning K, Martin P, Summers I, et al. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008;336:816–8.
- Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, et al. Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11–13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther* 2011;29:301–6.
- Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, et al. Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 2012;120:227–34.
- Bombard AT, Akolekar R, Parkas DH, et al. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. *Prenat Diagn* 2011;31:802–8.
- Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768–75.
- Akolekar R, Parkas DH, VanAgtmael AL, et al. Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccfDNA) at 11 to 13 weeks of gestation. *Prenat Diagn* 2010;30:318–23.
- Chan KC, Ding C, Gerovassili A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 2006;52:2211–8.
- Tynan JA, Mahboubi P, Cagasan LL, et al. Restriction enzyme-mediated enhanced detection of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J Mol Diagn* 2011;13:382–9.
- Amaral DR, Credidio DC, Pellegrino J Jr, Castillo L. Fetal RHD genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population. *J Clin Lab Anal* 2011;25:100–4.
- Esteban R, Montero R, Flegel WA, et al. The D category VI type 4 allele is prevalent in the Spanish population. *Transfusion* 2006;46:616–23.
- Rouillac-Le Scellour C, Puillandre P, Gillot R, et al. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn* 2004;8:23–31.
- Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RhD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet* 2001;2:10.
- Queenan JT. Rh immunoprophylaxis and fetal RHD genotyping: where are we going? *Obstet Gynecol* 2012;120:219–20.

Ultrasound Obstet Gynecol 2015; 45: 61–66
Published online 4 December 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/uog.14690

Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies

E. BEVILACQUA*, M. M. GIL†, K. H. NICOLAIDES†, E. ORDOÑEZ‡, V. CIRIGLIANO‡,
H. DIERICKX§, P. J. WILLEMS§ and J. C. JANİ*

*Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Brugmann, Brussels, Belgium; †Harris Birthright Research Centre for Fetal Medicine, King's College Hospital, London, UK; ‡Department of Molecular Genetics, Labco Diagnostic, Barcelona, Spain and Department of Biología Celular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; §GENDIA (GENetic DIAGnostic Network), Antwerp, Belgium

KEY WORDS: aneuploidies; cell-free DNA; screening test; trisomies; twin pregnancies

ABSTRACT

Objectives To report clinical implementation of cell-free DNA (cfDNA) analysis of maternal blood in screening for trisomies 21, 18 and 13 in twin pregnancies and examine variables that could influence the failure rate of the test.

Methods cfDNA testing was performed in 515 twin pregnancies at 10–28 weeks' gestation. The failure rate of the test to provide results was compared with that in 1847 singleton pregnancies, and logistic regression analysis was used to determine which factors among maternal and pregnancy characteristics were significant predictors of test failure.

Results Failure rate of the cfDNA test at first sampling was 1.7% in singletons and 5.6% in twins. Of those with a test result, the median fetal fraction in twins was 8.7% (range, 4.1–30.0%), which was lower than that in singletons (11.7% (range, 4.0–38.9%)). Multivariable regression analysis demonstrated that twin pregnancy, higher maternal weight and conception by in-vitro fertilization provided significant independent prediction of test failure. Follow-up was available in 351 (68.2%) of the twin pregnancies and comprised 334 with euploid fetuses, 12 discordant for trisomy 21 and five discordant for trisomy 18. In all 323 euploid cases with a result, the risk score for each trisomy was <1:10 000. In 11 of the 12 cases with trisomy 21 and in the five with trisomy 18, the cfDNA test gave a high-risk result, but in one case of trisomy 21, the score was <1:10 000.

Conclusion In twin pregnancies screening by cfDNA testing is feasible, but the failure rate is higher and detection rate may be lower than in singletons. Copyright © 2014 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd.

INTRODUCTION

In singleton pregnancies, cell-free DNA (cfDNA) analysis of maternal blood provides effective screening for trisomies 21, 18 and 13 with respective detection rates of about 99%, 97% and 92%, at a combined false-positive rate (FPR) of 0.4%¹. Such high performance of screening has been reported for both high-risk pregnancies and in the general population^{1–3}.

The incidence of multiple pregnancy has increased worldwide, mainly owing to the increased use of assisted reproductive techniques and the increasing maternal age of the population^{4–8}. Both the risk for aneuploidies and the risk of miscarriage from invasive testing are higher in twin pregnancies than in singletons^{9,10}. It would therefore be useful if cfDNA testing could be used for effective screening in twins. However, in twin pregnancies cfDNA testing is more complex than in singleton pregnancies because in dizygotic twins only one fetus is likely to have aneuploidy when detected, and the contribution of cfDNA of the two fetuses into the maternal circulation can vary by nearly two-fold^{11,12}. Consequently, if the fetal fraction of the affected fetus is below the threshold of 4% necessary for successful cfDNA analysis, but there is a high contribution from the normal cotwin, so that the total fetal fraction is satisfactory, the wrong conclusion can be reached – that the pregnancy is not trisomic. To avoid this potential mistake, it has been proposed that, in cfDNA testing in twin pregnancies, the lower fetal fraction of the two fetuses, rather than the total, should be used in the assessment of risk for aneuploidies¹³. However, an inevitable consequence of such a policy is that the no-result rate in twins is likely to be higher than in singleton pregnancies¹⁴.

Correspondence to: Prof. J. C. Jani, Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Brugmann, Place A. Van Gehuchten 4, 1020 Brussels, Belgium (e-mail: jackjani@hotmail.com)

Accepted: 25 September 2014

The objective of this study was to report the clinical implementation of cfDNA analysis of maternal blood in screening for trisomies 21, 18 and 13 in a large series of twin pregnancies and examine variables that could influence the failure rate of the test.

SUBJECTS AND METHODS

In this prospective multicenter study, 515 twin pregnancies underwent screening for trisomies 21, 18 and 13 by cfDNA testing at 10–28 weeks' gestation between May 2013 and September 2014. All patients received detailed pretest counseling and provided written informed consent for the test. Maternal blood was obtained by venepuncture (20 mL, in Streck cfDNA BCT™ tubes) and sent via courier to the USA for chromosome-selective cfDNA testing (Harmony™ Prenatal Test, Ariosa Diagnostics, Inc., San Jose, CA, USA)^{13–15}. The information given to the laboratory for each sample was patient-unique identifier, maternal age, method of conception and date of blood collection. Risk scores for each trisomy were provided as a percentage with ranges capped at > 99% and < 0.01%.

The failure rate of the cfDNA test to provide results was compared with that in prospectively collected samples from 1847 singleton pregnancies undergoing cfDNA testing between January 2013 and September 2014, at the department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Brugmann, Brussels, Belgium, at which all data from the participating centers were collated in a unique database. The study was approved by the local ethics committee.

Statistical analysis

In cases with a cfDNA test result, the median of the lower fetal fraction of twin pregnancies was compared with the corresponding median in singleton pregnancies using the Mann–Whitney *U*-test. In the whole population of singleton and twin pregnancies, regression analysis was used to investigate the effect on test failure rate at first sampling of twin pregnancy (yes/no), maternal smoking status (smoker/non-smoker), method of conception (*in-vitro* fertilization (IVF)/non-IVF) and origin of oocyte (mother/donor), as categorical variables and maternal weight (kg) and gestational age at test (weeks), as continuous numerical variables. In twin pregnancies, regression analysis was used to investigate the effect on test failure rate of maternal smoking status, method of conception, origin of oocyte and chorionicity (monochorionic/dichorionic) as categorical variables and maternal weight and gestational age as continuous numerical variables.

Data were analyzed with the statistical software SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and Excel version 9.0 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Two-sided $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Study population

In total, 1847 singleton and 515 twin pregnancies underwent cfDNA testing either because prior screening by the first-trimester combined test or second-trimester triple/quadruple biochemistry test or ultrasound examination identified them as being at high risk for fetal trisomy or the women wanted to have the new test as a primary method of screening. The median maternal age was 36.8 (range, 19.0–50.3) years and the median maternal weight was 64.4 (range, 42.0–148.0) kg. The test was performed at a median gestational age of 13.6 (range, 10.0–34.7) weeks for singletons and 13.0 (range, 10.0–28.0) weeks for twins; the gestational age was < 14 weeks in 1027 (55.6%) of the singletons and in 353 (68.5%) of the twins. Conception was by IVF in 189 (10.2%) of the singletons and in 272 (52.8%) of the twin pregnancies.

Fetal fraction

The median of the lower fetal fraction in twin pregnancies was 8.7% (range, 4.1–30.0%), which was lower than the corresponding median in singleton pregnancies (11.7% (range, 4.0–38.9%)) ($P < 0.001$). In the cases tested before 14 weeks' gestation, the median of the lower fetal fraction in twins was 8.6% (range, 4.1–30.0%) and the median fetal fraction in singletons was 11.3% (range, 4.0–38.9%) ($P < 0.001$).

No result from cfDNA testing

The cfDNA test failed to provide results in the first sample obtained from patients in 32 (1.7%) singletons and in 29 (5.6%) twins (Figure 1). In the cases tested before 14 weeks' gestation, the cfDNA test did not provide results in 22 (2.1%) of the singletons and in 16 (4.5%) of the twins.

Univariable regression analysis demonstrated that significant predictors of failure of the test were twin pregnancy, higher maternal weight and conception by IVF, but not gestational age at test, cigarette smoking or origin of oocyte. Multivariable regression analysis demonstrated that significant independent predictors of test failure were twin pregnancy, higher maternal weight and conception by IVF (Table 1 and Figure 2). In twin pregnancies, univariable regression analysis demonstrated that significant predictors of failure of the test were higher maternal weight and conception by IVF, but not gestational age at test, cigarette smoking, origin of oocyte or chorionicity. Multivariable regression analysis demonstrated that significant independent predictors of test failure were higher maternal weight and conception by IVF (Table 2).

In 26 of the 29 twin pregnancies in which the first sample did not provide a result from cfDNA testing, a second sample was examined and a result was obtained in 13 (50.0%). In singleton pregnancies, the test was repeated in 28 of the 32 cases with a failed first sample and a result was obtained in 19 (67.9%).

Screening for aneuploidies by cfDNA testing in twins

63

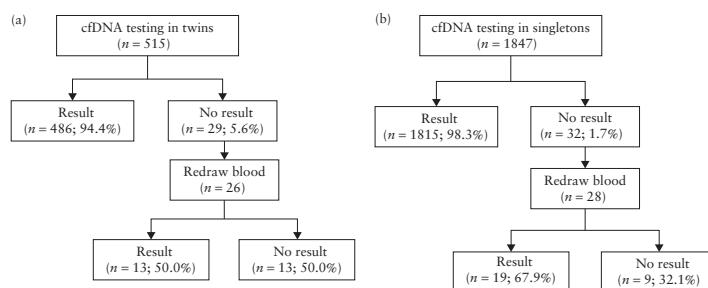


Figure 1 Flowcharts of prospective screening for trisomies 21, 18 and 13 by cell-free DNA (cfDNA) testing of maternal blood for aneuploidies in twin (a) and singleton (b) pregnancies.

Table 1 Regression analysis in prediction of effect of different variables on failure of cell-free DNA testing for aneuploidies in twin and singleton pregnancy (n = 2362)

Variable	Value	Univariable analysis		Multivariable analysis	
		Odds ratio (95% CI)	P	Odds ratio (95% CI)	P
Twin pregnancy					
Yes	515 (21.8)	3.384 (2.028–5.650)	< 0.001	2.331 (1.245–4.362)	0.008
No	1847 (78.2)	1		1	
Maternal smoker*					
Yes	91 (3.9)	1.362 (0.417–4.448)	0.609		
No	2130 (90.2)	1			
Maternal weight (kg)†	64.4 (42.0–148.0)	1.049 (1.034–1.065)	< 0.001	1.057 (1.040–1.075)	< 0.001
Gestational age at test (weeks)	13.6 (10.0–34.7)	0.954 (0.876–1.041)	0.284		
Method of conception					
IVF	461 (19.5)	4.496 (2.692–7.508)	< 0.001	3.781 (2.025–7.057)	< 0.001
Non-IVF	1901 (80.5)	1		1	
Origin of oocyte					
Mother	2303 (97.5)	1			
Donor	59 (2.5)	2.074 (0.631–6.819)	0.230		

Data given as n (%) or median (range). *Data available for 2221 (94.0%) patients. †Data available for 2296 (97.2%) patients. IVF, *in-vitro* fertilization.

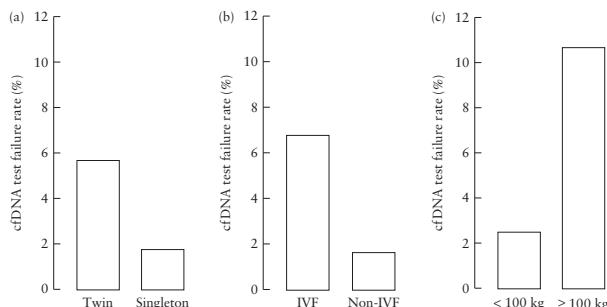


Figure 2 Relationship of maternal and pregnancy characteristics (pregnancy status (a), mode of conception (b) and maternal weight (c)) with failure of cell-free DNA (cfDNA) testing of maternal blood for aneuploidies. IVF, *in-vitro* fertilization.

Table 2 Regression analysis in prediction of effect of different variables on failure rate of cell-free DNA testing for aneuploidies in twin pregnancy ($n=515$)

Variable	Value	Univariable analysis		Multivariable analysis	
		Odds ratio (95% CI)	P	Odds ratio (95% CI)	P
Maternal smoker*					
Yes	19 (3.7)	1.871 (0.405–8.642)	0.422		
No	355 (68.9)	1			
Maternal weight (kg)†	64.0 (43.9–117.0)	1.058 (1.028–1.090)	<0.001	1.064 (1.031–1.097)	<0.001
Gestational age at test (weeks)	13.0 (10.0–28.0)	0.918 (0.886–1.143)	0.918		
Method of conception					
IVF	272 (52.8)	2.967 (1.244–7.074)	<0.014	3.557 (1.372–9.217)	<0.01
Non-IVF	243 (47.2)	1		1	
Origin of oocyte					
Mother	467 (90.7)	1			
Donor	48 (9.3)	0.709 (0.163–3.076)	0.646		
Chorionicity‡					
Monochorionic	67 (13.0)	1			
Dichorionic	301 (58.4)	2.313 (0.527–10.145)	0.266		

Data given as n (%) or median (range). *Data available for 374 (72.6%) patients. †Data available for 449 (87.2%) patients. ‡Data available for 368 (71.5%) patients. IVF, *in-vitro* fertilization.

Pregnancy outcome in twins and performance of the cfDNA test

Outcomes were divided into (1) normal if the karyotype of chorionic villi, amniotic fluid or neonatal blood was normal or the neonate was phenotypically normal ($n=334$); (2) trisomies 21, 18 or 13 if the karyotype of chorionic villi, amniotic fluid or neonatal blood demonstrated the relevant trisomy (12 cases discordant for trisomy 21 and five discordant for trisomy 18); (3) unknown karyotype because the pregnancy resulted in miscarriage or stillbirth and no karyotyping of fetal tissue was carried out ($n=7$); and (4) outcome unknown because the pregnancies were continuing ($n=19$) or were lost to follow-up ($n=138$).

cfDNA testing provided risk scores after first or second sampling in 340 (96.9%) of the 351 twin pregnancies with known outcome. In the 323 euploid cases in which a cfDNA test result was obtained, the risk score for each trisomy was <1:10 000. In 11 of the 12 cases with trisomy 21 and in the five with trisomy 18, the cfDNA test gave a high-risk result, but in one case of trisomy 21 the score was <1:10 000.

DISCUSSION

Main findings of the study

This prospective study demonstrates the feasibility of chromosome-selective sequencing of cfDNA in maternal blood for the assessment of risk for fetal trisomies 21, 18 and 13 in twin pregnancies. In twins, the rate of reporting results from cfDNA testing was 94.4%, which improved to 96.9% after repeat sampling, and in those with results the median of the lower fetal fraction was 8.7%. These rates were lower than the respective values of 98.3% and 99.3% observed in singleton pregnancies, in which the median fetal fraction was 11.7%. The reason for the

lower reporting rate in twins was low fetal fraction, which is the inevitable consequence of selecting the lower fetal fraction of the two fetuses, rather than the total fetal fraction, in estimating the risk for aneuploidies¹. The rationale for this choice is to avoid a false-negative result in a dizygotic twin pregnancy discordant for aneuploidy, for which the total fetal fraction is satisfactory but the contribution of the affected fetus could be less than 4%.

In twins, the cfDNA test did not provide any false-positive results and it detected 16 of the 17 pregnancies discordant for trisomy 21 or 18. However, many of the pregnancies were continuing or were lost to follow-up and therefore the study cannot provide accurate assessment of detection rate.

Significant predictors of failure of the cfDNA test to provide results are high maternal weight and IVF conception, which was by far more common in the twin than in the singleton pregnancies (53% vs 10%). Although the failure rate was twice as high in dichorionic than in monochorionic twins, this difference was not significant. The likely source of fetal cfDNA in maternal plasma is dying cells in the placenta, and the inverse association between fetal fraction and maternal weight could be attributed to a dilutional effect^{16–18}. Another possible explanation for such an association is that, in obese women, there is an accelerated turnover of adipocytes, which releases an increased amount of cfDNA of maternal origin into the circulation, hence relatively less fetal cfDNA^{19,20}.

The finding of lower fetal fraction in IVF conceptions may be the consequence of a smaller placental mass and lower number of apoptotic cells than in natural conceptions. We have previously reported significant associations between fetal fraction and serum pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and free β -human chorionic gonadotropin, whose concentration provides an indirect measure of placental mass^{17,18,20}. Evidence for impaired placentation in IVF conceptions is provided by reports

that in such pregnancies the serum concentration of PAPP-A is decreased by 10–25%^{21–23} and the incidence of pre-eclampsia is increased²⁴.

Limitations of the study

The main limitations of the study relate to the small number of trisomic pregnancies and the lack of data on pregnancy outcome in about one third of the cases, which prevents definitive conclusions from being drawn as to the performance of screening by cfDNA testing through chromosome-selective sequencing in twins.

Comparison with previous studies

There are four previous studies on screening for trisomies by cfDNA testing in twin pregnancies. In three studies, massively parallel shotgun sequencing was used to examine stored plasma or prospectively collected blood from a combined total of 226 twin pregnancies^{25–27}. In these studies, no attempt was made to determine the fetal fraction for each twin and it was assumed that the contribution from each fetus to the maternal plasma cfDNA was adequate for accurate results. There were 206 cases with euploid fetuses, 15 discordant and two concordant for trisomy 21, two discordant for trisomy 18 and one discordant for trisomy 13. The cfDNA test provided results for all cases and correctly classified all cases except one of the cases of trisomy 18, which was reported as normal. Therefore, the detection rate for all trisomies was 95.0% (19 of 20), with an FPR of 0%.

One previous study used chromosome-selective sequencing and an algorithm that relied on the lower fetal fraction of the twins, as in the present study, to assess the risk for trisomies in stored plasma samples obtained at 11–13 weeks' gestation from 207 twin pregnancies¹⁴. Risk scores for trisomies 21, 18 and 13 by cfDNA testing were provided for 192 (92.8%) cases, including 181 with euploid fetuses, 10 discordant for trisomy 21 and one discordant for trisomy 13. The test correctly identified nine of the 10 cases of trisomy 21 and the one case of trisomy 13 with no false-positive results¹⁴.

In the cumulative data from the literature and the present study on cfDNA testing, in a total of 758 twin pregnancies with known outcome, comprising 710 with euploid fetuses, 39 with trisomy 21, seven with trisomy 18 and two with trisomy 13, the respective detection rates for the trisomies were 95%, 86% and 100%, at an FPR of 0%.

Conclusions

There are sufficient data to suggest that with cfDNA testing for trisomies in twin pregnancies, firstly, the FPR is very low, as in singletons, secondly, the detection rate is high, albeit the total number of affected cases is too small for accurate conclusions to be drawn, and thirdly, the method of estimating the fetal fraction from each twin and ensuring that the lower of the two is at least 4%, aiming

to minimize the risk of providing false-negative results, is associated with a higher failure rate than methods that ignore assessment of the contribution of each fetus to the maternal cfDNA concentration.

In twin pregnancies, the rate of failure to obtain results from cfDNA testing increases with maternal weight, as in singleton pregnancies, and is higher in IVF than in natural conceptions.

ACKNOWLEDGMENT

The study was partly funded by The Fetal Medicine Foundation Belgium and by The Fetal Medicine Foundation (Registered Charity 1037116).

REFERENCES

1. Gil MM, Akolekar R, Quezada MS, Bregant B, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: meta-analysis. *Fetal Diagn Ther* 2014; 35: 156–173.
2. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207: 374.e1–6.
3. Song Y, Liu C, Qi H, Zhang Y, Bian X, Liu J. Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat Diagn* 2013; 33: 700–706.
4. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, Craig JA, Chudova DI, Devers PL, Jones KW, Oliver K, Rava RP, Schnett AJ; CARE Study Group. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014; 370: 799–808.
5. Quezada MS, Gil MM, Francisco C, Orósz 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: 36–41.
6. Reynolds MA, Schieve LA, Martin JA, Jeng G, Macaluso M. Trends in multiple births conceived using assisted reproductive technology, United States, 1997–2000. *Pediatrics* 2003; 111: 1159–1162.
7. Luke B, Martin JA. The rise in multiple births in the United States: who, what, when, where, and why. *Clin Obstet Gynecol* 2004; 47: 118–133.
8. Khosnood B, Blondel B. Regional variations in trends for multiple births: a population-based evaluation in France, 1972–2003. *Twin Res Hum Genet* 2007; 10: 406–415.
9. Hansen M, Kurinczuk JJ, Milne E, de Klerk N, Bower C. Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013; 19: 330–353.
10. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG). *Ammniocentesis and Chorionic Villus Sampling*. Green-Top Guideline No. 8. RCOG Press: London, 2010.
11. Qu JZ, Leung TY, Jiang P, Liao GJ, Cheng YK, Sun H, Chiu RW, Chan KC, Lo YM. Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis. *Clin Chem* 2013; 59: 427–435.
12. Leung TY, Qu JZ, Liao GJ, Jiang P, Cheng YK, Chan KC, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive twin zygosity assessment and aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Prenat Diagn* 2013; 33: 675–681.
13. Struble CA, Syngelaki A, Oliphant A, Song K, Nicolaides KH. Fetal fraction estimate in twin pregnancies using directed cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther* 2014; 35: 199–203.

14. Gil MM, Quezada MS, Bregant B, Syngelaki A, Nicolaides KH. Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first-trimester twin pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 2014; 35: 204–211.
15. 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: 319.e1–9.
16. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrlich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, Nelson SF, Canick JA. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 2011; 13: 913–920.
17. 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: 237–243.
18. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, 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: 26–32.
19. Haghjac M, Vora NL, Basu S, Johnson KL, Presley L, Bianchi DW, Hauguel-de Meuzon S. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20: 2213–2219.
20. Poon LC, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagn Ther* 2013; 33: 215–223.
21. Kagan KO, Wright D, Spencer K, Molina FS, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 493–502.
22. Amor DJ, Xu JX, Halliday JL, Francis I, Healy DL, Breheny S, Baker HW, Jaques AM. 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: 1330–1338.
23. Engels MA, Pajkrt E, Groot DT, Schat R, Twisk JW, van Vugt JM. 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: 217–224.
24. Chaveeva P, Carbone IP, Syngelaki A, Akolekar R, Nicolaides KH. Contribution of method of conception on pregnancy outcome after the 11–13 weeks scan. *Fetal Diagn Ther* 2011; 30: 9–22.
25. Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Ehrlich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Palomaki GE. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn* 2012; 32: 730–734.
26. Lau TK, Jiang F, Chan MK, Zhang H, Lo PS, Wang W. Non-invasive prenatal screening of fetal Down syndrome by maternal plasma DNA sequencing in twin pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; 26: 434–437.
27. Huang X, Zheng J, Chen M, Zhao Y, Zhang C, Liu L, Xie W, Shi S, Wei Y, Lei D, Xu C, Wu Q, Guo X, Shi X, Zhou Y, Liu Q, Gao Y, Jiang F, Zhang H, Su F, Ge H, Li X, Pan X, Chen S, Chen F, Fang Q, Jiang H, Lau TK, Wang W. Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2014; 34: 335–340.