

Desarrollo del primer ensayo prenatal no invasivo (NIPT) en Argentina

Martín Vázquez*^{1,2}, Cristian Rohr¹, Bianca Brun¹, Mauricio Grisolia¹, Guadalupe Méjico³, María Florencia Gosso³, Fabián Fay³

¹ Héritas -INDEAR. ²CONICET. ³ Héritas -CIBIC S.A.

*Autor responsable, martin.vazquez@heritas.com.ar

El ensayo se realiza como un screening en etapa temprana de gestación, desde la semana nueve, usando tecnologías de secuenciación masiva de ADN.

Resumen

El ensayo prenatal no invasivo, conocido por sus siglas en inglés como NIPT (Non-Invasive Prenatal Testing) permite detectar de forma segura, temprana y confiable las trisomías más comunes que pueden ocurrir durante el desarrollo fetal.

El ensayo se realiza en una muestra de sangre de la madre embarazada desde la semana nueve de gestación. En la sangre circulan libremente tanto ADN materno como fetal proveniente principalmente de trofoblastos. A partir de esta información se pueden detectar las trisomías más frecuentes usando secuenciación masiva de ADN y un sofisticado análisis estadístico.

Si bien NIPT se adoptó rápidamente en la clínica, por su seguridad, simpleza y alto valor predictivo positivo para las trisomías 21, 18 y 13, no existe una implementación local en Argentina de la tecnología y todas las muestras deben ser enviadas al exterior.

En este trabajo mostramos el primer desarrollo local e implementación de la tecnología NIPT. El ensayo fue registrado bajo el nombre de Héritas Prenatal Visión.

Introducción

El ensayo prenatal no invasivo (NIPT) utiliza ADN libre circulante en sangre materna para detectar las principales trisomías durante el desarrollo fetal. El ensayo se realiza como un screening en etapa temprana de gestación, desde la semana nueve, usando tecnologías de secuenciación masiva de ADN (NGS, Next-Generation-Sequencing).

La presencia de ADN circulante libre en la sangre fue descrita hace ya unos 20 años por Lo et al, y proviene tanto de células maternas como de citotrofoblastos que incurrir en apoptosis. El ADN libre circulante está altamente fragmentado en fracciones de aproximadamente 160 a 140 pares de bases. De esta forma, la información en el ADN circulante se puede utilizar para detectar aneuploidías. Hasta el momento, diferentes aproximaciones se desarrollaron con este objetivo usando secuenciación masiva de ADN, tanto secuenciación de todo

Investigación

el genoma como secuenciación de captura de regiones específicas que han sido validadas en muy amplios ensayos clínicos a nivel mundial. Con secuenciación de captura específica (Target-NIPT) se pueden aplicar tecnologías de estadísticas de conteo o análisis de SNPs (single nucleotide polymorphisms) para detectar las aneuploidías, ejemplos de esto son los ensayos Panorama de Natera (2) o Harmony de Ariosa (3). Con Secuenciación de todo el genoma (WGS-NIPT), se aplica fundamentalmente conteo estadístico, ejemplos de esto son los ensayos de Verity de Illumina (5) o MaterniT21 de Sequenom (4). En conteo estadístico, el número de secuencias de ADN obtenidas para cada cromosoma se cuentan y comparan contra una base de datos de embarazos euploides usados como base de datos de referencia (7). En caso de trisomía fetal, un número significativo de secuencias de ADN se verá enriquecido para el cromosoma afectado.

Sin embargo, la correcta detección de la aneuploidía fetal depende de una serie de factores, biológicos y tecnológicos, siendo el principal el porcentaje de ADN libre circulante en sangre que corresponde al feto. Debido a un bajo porcentaje de fracción fetal el ensayo puede indicar falsos positivos, por lo cual los ensayos disponibles prefieren rechazar la muestra.

En este sentido los ensayos basados en Target-NIPT tienen mucha menos sensibilidad/especificidad a bajas fracciones fetales. Por el contrario, se ha demostrado que las tecnologías basadas en WGS-NIPT mantienen una altísima especificidad independiente de la fracción fetal mientras que sostienen sensibilidades por encima del 80% a las fracciones fetales más bajas (6).

Un embarazo normal presenta fracciones fetales que oscilan entre 8-12% desde la semana nueve, mientras que una baja fracción fetal se considera por debajo de 4%. El WGS-NIPT es capaz de detectar incluso por debajo del 3% (6). Esto es sumamente relevante, ya que los métodos Target-NIPT pueden disparar una cantidad importante de procedimientos invasivos como consecuencia de rechazar la muestra por baja fracción fetal, algo que se evita usando WGS-NIPT (6).

Si bien NIPT mostró una rápida adopción como método de screening de aneuploidías en primer trimestre de embarazos a nivel mundial, en Argentina no se ha implementado localmente por lo cual todas las muestras deben ser enviadas y procesadas en el exterior. Esta situación presenta varios problemas a considerar, entre ellos: 1) puede complicar la logística y en algunos casos la fiabilidad del ensayo, 2) Los reportes no se encuentran customizados para la realidad local, usualmente recibiendo en otro idioma y llegando a la paciente de esa forma, 3) Con la muestra en el exterior la paciente pierde el amparo de la ley de protección de datos personales local y pierde el rastreo de su muestra. Es importante recordar que se secuencia ADN de la madre y del feto que es información considerada sensible y protegida por ley, 4) Se pierde la posibilidad de contar con un biobanco y base de datos local centralizada para realizar seguimientos y casuística en la Argentina, 5) no hay interacción directa y fluida entre los médicos y los prestadores de la tecnología para resolver puntos potencialmente conflictivos o pedir una extensión de la caracterización de la muestra en algunas situaciones puntuales.

Estas razones motivaron que desarrollemos e implementemos a nivel local por primera vez en Argentina un ensayo NIPT. Para el desarrollarlo decidimos usar como base WGS-NIPT por ser más confiables a bajas fracciones fetales como se describió. El desarrollo se registró bajo el nombre de Héritas Prenatal Visión.

Materiales y Métodos

Reclutamiento de muestras de embarazadas euploides y no embarazadas para la base de datos de referencia y controles positivos aneuploides.

Se reclutaron 44 muestras de sangre de mujeres utilizando dos tubos cell-free DNA BCT marca Streck por cada una. Estos tubos especiales conservan el ADN libre circulante preservándolo de la degradación y evitan la contaminación con ADN no circulante proveniente de células sanguíneas.

De las 44 muestras colectadas, 13 muestras correspondían a mujeres no embarazadas y el resto a mujeres cursando embarazos con las siguientes características:

- 1) Semanas de gestación desde 9 a 26
- 2) Edades de la embarazada al momento de gestación desde 26 a 44
- 3) Índices de masa corporal desde 20 a 32
- 4) Embarazos en curso tanto XX como XY

En todos los casos cursando embarazos euploides. Los coeficientes de variación (CV) de la base de datos control se determinaron en 0.34 para cromosoma 13, 0.33 para cromosoma 18 y 0.6 para cromosoma 21.

Se incluyeron como controles aneuploides cuatro muestras comerciales de las siguientes características: Trisomía 18 con 12% fracción fetal, Trisomía 13 con 12% de fracción fetal, Trisomía 21 con 8%, 4%, 2% y 1% de fracción fetal (SeraCare, USA). Estos controles sintéticos se encuentran embebidos en una matriz símil-plasma y deben pasar por el mismo procedimiento de extracción que las muestras de pacientes.

Se incluyeron además dos muestras positivas de embarazos aneuploides para trisomía 21 de semanas 12 y 26 de gestación que fueron comprobadas como positivas por otras metodologías.

Procesamiento de las muestras.

El ADN libre circulante de las muestras se extrae usando el kit QIAmp Circulating Nucleic Acids (Qiagen, USA) a partir del material contenido en los tubos BCT.

El ADN extraído es cuantificado mediante picogreen y chips de ADN high Sensitivity en Agilent 2100 Bioanalyzer para comprobar cantidad y distribución de tamaños del ADN.

Luego de un proceso de "dual size selection" para garantizar presencia de ADN libre en plasma sin contaminación genómica, se preparan bibliotecas usando el kit Truseq Nano (Illumina, USA) y se vuelve a cuantificar concentración del material por Kappa y Agilent 2100 Bioanalyzer.

Los ADN de las bibliotecas preparadas se secuencian en un equipo NextSeq500 (Illumina, USA) usando kits High Output de 75 ciclos con densidades de cluster entre 140 y 180 K/mm²

Desarrollo del algoritmo bioinformático para detección de aneuploidías.

Las secuencias obtenidas como output del NextSeq500 se procesaron para alinearlas al genoma de referencia humano hg19 no enmascarado usando el algoritmo BWA. Las lecturas duplicadas y de calidad de alineamiento menores a Q30 se eliminan del análisis posterior. Con el mapeo final se inicia el proceso estadístico de conteo para aneuploidías. Previo paso, se realiza una corrección por contenido de GC usando el método de LOESS en ventanas de 50Kb por autosoma. La ventana final de proceso es de 5 Mb por autosoma lo cual implica contemplar el promedio de 100 ventanas móviles.

Para el proceso de conteo final, usando lenguaje de programación en R se codificó un algoritmo que procede a determinar cuatro puntajes diferentes como se indica a continuación:

- Valor Z, el valor estadístico Z indica cuantos desvíos estándar se aleja el valor observado de la media de lo que se está midiendo. Se calcula un valor Z por autosoma.
- Valor ZZ, representa el valor Z de todos los valores Z medidos para cada autosoma
- Valor MAI (Mediana Autosoma de Interés), representa la me-

diana de los valores medidos en ventanas de 5 Mb para el autosoma de interés

- Valor MAR (Mediana Autosomas Restantes), representa la mediana de los valores medidos en ventanas de 5 Mb para todo el resto de los autosomas.

Los valores de corte para nuestras euploides se establecieron en menos de 2,5 para Z y ZZ y menor a 1 para MAI. Los valores de corte positivos para aneuploidía se establecieron en mayor a 3 para Z y ZZ, mayor a 1,5 para MAI y menor a 1 para MAR (7).

Resultados

Interpretación de los valores del algoritmo de Héritas Prenatal Visión.

El Valor Z indica la probabilidad de tener una trisomía y debe ser ratificado por el valor ZZ. Se considera trisomía detectada cuando cada uno de esos valores supera 3. No se detecta trisomía si es menor a 2.5 y se considera trisomía sospechada para valores entre 2.6 y 3. Estos valores se deben analizar en el contexto de los valores MAI y MAR. Un MAI mayor a 1.5 en contexto de Z y ZZ mayores a 3 indican una trisomía detectada, mientras que el valor MAR debe mantenerse cercano a 0. El agregado de los valores MAI y MAR corrigen muchos de los problemas de falsos positivos causados por CNVs locales (variación en número de copias intracromosoma) maternos. De esta forma un MAI menor a 1.5 en contexto de Z y ZZ mayores a 3 puede estar indicando presencia de CNV maternos que afectan y confunden la medición las trisomías en cuestión. Cuando Z, ZZ y MAI indican presencia de una trisomía, pero el valor MAR es mayor a 1, se invalida el resultado ya que puede estar indicando la presencia de variantes en número de copias (CNVs) generalizados maternos en varios de los autosomas confundiendo el resultado. El valor MAR no tiene significancia cuando el resto de los valores NO indican presencia de una trisomía.

Adicionalmente, corroboramos los resultados internamente usando otro algoritmo de código abierto, Wisecondor, que se basa en un principio diferente (8). Una trisomía detectada por el sistema de 4 puntajes, pero no detectada en Wisecondor se informa como Sospechada. Si se obtienen puntajes Z, ZZ, MAI, MAR en las zonas de seguridad o indefinidas y Wisecondor informa detectada se informará como Sospechada. Cualquier otra situación se informa como No detectada, dado que el algoritmo principal es el de cuatro puntajes y Wisecondor es confirmatorio (ver Tabla 1).

Determinación de la sensibilidad/especificidad de Héritas Prenatal Visión usando controles aneuploides sintéticos y de pacientes.

La sensibilidad/especificidad del ensayo está determinada fundamentalmente por tres factores:

- La calidad y diversidad de la base de datos euploide de referencia.
- Porcentaje de fracción fetal en el ADN libre circulante.
- Cantidad de secuencias calidad mayor a 30 (MAPQ30) aliñadas al genoma de referencia hg19.

El primer punto es clave ya que los ensayos NIPT son métodos estadísticos que no pueden operar sin la base de datos de referencia euploide. Dicha base de datos debe ser construida específicamente para la metodología y los parámetros técnicos usados en el ensayo, no pudiendo usarse una base de datos construida para otros parámetros tecnológicos. Nuestra base de datos apuntala su fuerte en la diversidad para contener toda la variación biológica natural que sea posible con el objetivo de disminuir el ruido de fondo del ensayo.

La determinación de fracción fetal (FF) de ADN libre circulante la realizamos post-ensayo usando el método de Kim et al.,

2015 conocido como seqFF. Este método es un modelo multivariado de regresión lineal que usa machine learning para encontrar las regiones del genoma de referencia en donde la fracción fetal está más representada que la materna y usa esa información para calcular el % de ADN libre circulante que proviene del feto.

Este método es uno de los más robustos y seguros para calcular fracción fetal. En la Figura 1 se puede observar nuestro cálculo de FF en Prenatal Visión en un grupo de embarazadas a distintas semanas de gestación y un grupo control de No embarazadas como comparación.

Concluimos que el método discrimina bien entre embarazadas y no embarazadas usadas como control, incluso en la semana nueve de gestación (la primera semana en la que nuestro ensayo está disponible). Se puede observar como el %FF crece con la semana de gestación y es perfectamente detectable (8%) desde semana nueve en embarazos de curso normal. Del análisis de los datos surge que el método no sería capaz de distinguir con sensibilidad fracciones fetales por debajo del 2%, por lo cual establecimos una zona de seguridad de baja resolución entre 2% y 3%.

Para medir la sensibilidad de la metodología de Prenatal Visión, utilizamos controles sintéticos de SeraCare (www.sera-care.com). Los controles utilizados fueron Trisomía 21 con 1%, 2%, 4% y 8% de FF, Trisomía 18 con 12% de FF y Trisomía 13 con 12% de FF. En la Figura 2 se pueden observar resultados para la Trisomía 21 a distintas fracciones fetales en función del MAPQ30.

Nuestros resultados indican que Prenatal Visión tiene sensibilidad para detectar Trisomía 21 con 2% de FF en donde los puntajes Z (3.3) y MAI (1.52) superan los valores de corte establecidos usando 9 millones de MAPQ30. Es interesante resaltar que un re-muestreo de los datos a 7 y 5 millones MAPQ30 no modificó significativamente los valores Z y MAI. El mismo resultado se puede observar para 4% FF donde 5 y 7 millones MAPQ30 tuvieron nulo impacto de significancia sobre Z y escaso impacto sobre MAI. En controles con 8% de FF se observa lo mismo con 5, 7, 9 y 17 Millones de MAPQ30, con algo de impacto sobre el valor Z con 2 puntos de incremento desde 7 millones MAPQ30 y nulo impacto sobre el valor MAI. Los resultados obtenidos con los controles sintéticos de trisomías 18 y 13 muestran la misma performance (datos no mostrados).

En base a los resultados mostrados en las Figuras 1 y 2, nuestro algoritmo toma la siguiente decisión si verifica un mínimo de 7 millones de MAPQ30 por muestra: 1) rechaza las muestras por debajo de 2% FF, 2) informa todos los resultados por encima del 3% FF, 3) solo informa muestras con aneuploidías sospechadas o detectadas entre 2% y 3% FF, colocando como "No determinado" si el ensayo fuera negativo en ese rango de fracción fetal. En el caso de la regla de decisión 3, el valor de los puntajes obtenidos para Z, ZZ y MAI debe ser evaluado en contexto clínico de riesgo a priori de la paciente (edad materna y semana de gestación). Así como valor de Z y ZZ entre 3 y 5,5 para la regla de decisión 2 también deben evaluarse en base a riesgo a priori de la paciente. Para estos casos puntuales, nuestro ensayo incluirá además una valoración de riesgo post-test basado en el riesgo a priori para guiar al médico obstetra. Valores Z y ZZ mayores a 5,5 son considerados seguros independientemente del riesgo a priori para fracciones fetales mayores a 3% (10)

A continuación, probamos nuestro ensayo con una muestra comprobada de una mujer embarazada con feto con trisomía 21. Esta muestra fue confirmada al mismo tiempo por la tecnología de Panorama de Natera y por posterior ensayo de biopsia de vellosidades coriales. La paciente cursaba la

Investigación

semana 12 de gestación y presentaba un %FF de 12%. Los resultados usando Prenatal Visión se pueden observar en la Figura 4. Utilizamos MAPQ30 de 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 11 millones para calcular los valores Z, ZZ y MAI de la muestra. En todos los casos resultó como detectada la trisomía 21 y valores no detectados para todo el resto de los autosomas, mostrando un ensayo muy sensible y específico incluso con el menor valor de 1 millón MAPQ30 ensayado.

De esta forma, Prenatal Visión fue seguro y sensible tanto sobre muestras de controles sintéticos como sobre muestras controles positivas de pacientes embarazadas.

Determinación de sexo fetal usando Héritas Prenatal Visión.

Para la determinación de sexo fetal tuvimos en cuenta la cantidad de lecturas que se alinean con el cromosoma Y de acuerdo a la siguiente fórmula que desarrollamos exclusivamente para Prenatal Visión.

$$\text{Valor Y} = ((Y \text{ MAPQ30} / \text{ALL MAPQ30}) \times 1000) / \%FF$$

En donde %FF es el porcentaje de fracción fetal en ADN libre circulante determinado según la metodología descrita en el apartado anterior y ALL MAPQ30 indica el total de lecturas mapeadas. El factor de 1000 se introdujo a los efectos de generar valores en una escala de 0 a 10.

En base a analizar 30 muestras de nuestra base de datos con sexo conocido por otra metodología, determinamos los valores de línea de corte para establecer si el Valor Y indica presencia de feto masculino o femenino. Además, establecimos una zona de seguridad o exclusión en donde el sexo se informa como No determinado, según se puede observar en la figura 4. En efecto, valores menores a 1,5 se reportan como sexo femenino, valores mayores a 2,5 se reportan como masculinos y valores entre 1,6 y 2,4 se reportan como No Determinado.

Conclusiones

Héritas Prenatal Visión presenta la siguiente innovación sobre otros ensayos NIPT: La combinación de secuenciación Illumina de 75 ciclos con cuatro puntajes estadísticos que consideran a todos los autosomas y una base de datos euploide propia de amplia diversidad que como resultado permiten tener la máxima sensibilidad con tan solo producir 1 millón de MAPQ30 a 12% de FF para las trisomías 21, 18 y 13.

En resumen, de los resultados se concluye que:

- El límite inferior de sensibilidad del ensayo Prenatal Visión se establece en 2% de fracción fetal circulante usando 7 millones de MAPQ30
- El límite de operación segura del ensayo Prenatal Visión se establece en 3% de fracción fetal circulante usando 7 millones de MAPQ30
- La sensibilidad de detección de fracción fetal circulante incluida en Prenatal Visión se establece en un límite inferior seguro de 3%, siendo entre 2% y 3% una zona de exclusión de menor resolución. El método no reporta resultados por debajo de 2% que es la sensibilidad real observada.
- Para embarazos de bajo riesgo a priori, valores de Z y ZZ mayores a 5,5 a partir de 3% de FF son considerados seguros. Mientras que valores Z y ZZ entre 3 y 5,5 deben ser evaluados en contexto de riesgo a priori de la paciente, especialmente a valores estándar de % de fracción fetal. Para dichos casos, nuestro ensayo incluirá una estimación de riesgo post-test, basado en el riesgo a priori (edad materna y semana de gestación)
- Para determinación de sexo fetal establecimos un algoritmo

de valor Y tal que siendo este mayor a 2,5 es sexo masculino, siendo menor a 1,5 es sexo femenino y entre 1,6 y 2,4 es una zona de exclusión no determinada.

- Prenatal visión tuvo excelente performance con una de las mejores sensibilidades del mercado

¿Cuándo es recomendable el ensayo?

Extensos estudios sobre sensibilidad y especificidad demuestran que el ensayo es recomendable para todas las mujeres embarazadas como primer screening, pero especialmente está recomendado para mujeres de más de 30 años, dado que presentan mayor riesgo de cursar embarazos con dichas trisomías. En efecto, desde los 30 a los 35 años la probabilidad se incrementa por sobre un 5% de la población general hasta un 7%. De 35 a 40% se incrementa hasta un 10-12% sobre la población general y más de 40 años se puede incrementar hasta un 35% sobre la población general.

Trisomía 21 se presenta en 1 de cada 800 nacimientos en la población general. Trisomía 18 se presenta en 1 de cada 5000 nacimientos y trisomía 13 en uno de cada 16.000 nacimientos. Para todos los casos también es recomendable que se acompañe de una ecografía en la semana de la toma de la muestra de sangre, con el fin de evaluar que el embarazo en curso no se encuentre detenido o evaluar la presencia de embarazos múltiples.

¿Cuáles son las limitaciones de la tecnología?

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

No pueden descartarse otras alteraciones cromosómicas no incluidas en este estudio. La ausencia en el reporte de otros hallazgos adicionales no necesariamente representa ausencia de riesgo para los mismos.

En mujeres cuyo IMC es mayor a 30, es posible que no se llegue a obtener el porcentaje mínimo de fracción fetal requerida. Esto se debe a lipolisis en exceso de células de la madre que pueden disminuir el % de fracción fetal mínima necesaria para el ensayo.

En la población media de embarazadas el % de fracción fetal se ubica entre el 8 a 12% desde la semana nueve. Algunos casos particulares (4 cada 10.000 en promedio) pueden presentar un % muy bajo (menor a 3%) debido a una placenta muy pequeña, a un retraso de crecimiento patológico o a otras causas genéticas no conocidas. Las mujeres de origen afroamericano también suelen presentar un % menor que el resto de la población.

Por el contrario, NO es limitación de la tecnología Prenatal Visión el análisis de embarazos de mellizos/gemelos, ni casos de fertilización in vitro incluyendo ovodonaciones.

¿Qué tipo de resultados se informan?

- trisomías 21,
- trisomías 18,
- trisomías 13
- sexo fetal.

Los mismos se informan de acuerdo a los 4 puntajes mencionados Z, ZZ, MAI y MAR de la siguiente forma:

- DETECTADA, los 4 puntajes coinciden y un algoritmo de backup confirma soporte.
- SOSPECHADA, Alguno de los puntajes se observa en la zona de seguridad o exclusión y el algoritmo de backup da soporte.
- NO-DETECTADA, los 4 puntajes indican valores normales
- NO-DETERMINADA, hubo un problema con el ensayo.

Investigación

El problema más común observado es % de fracción fetal (FF) de ADN libre menor al límite de detección.

Evolución de prenatal visión .

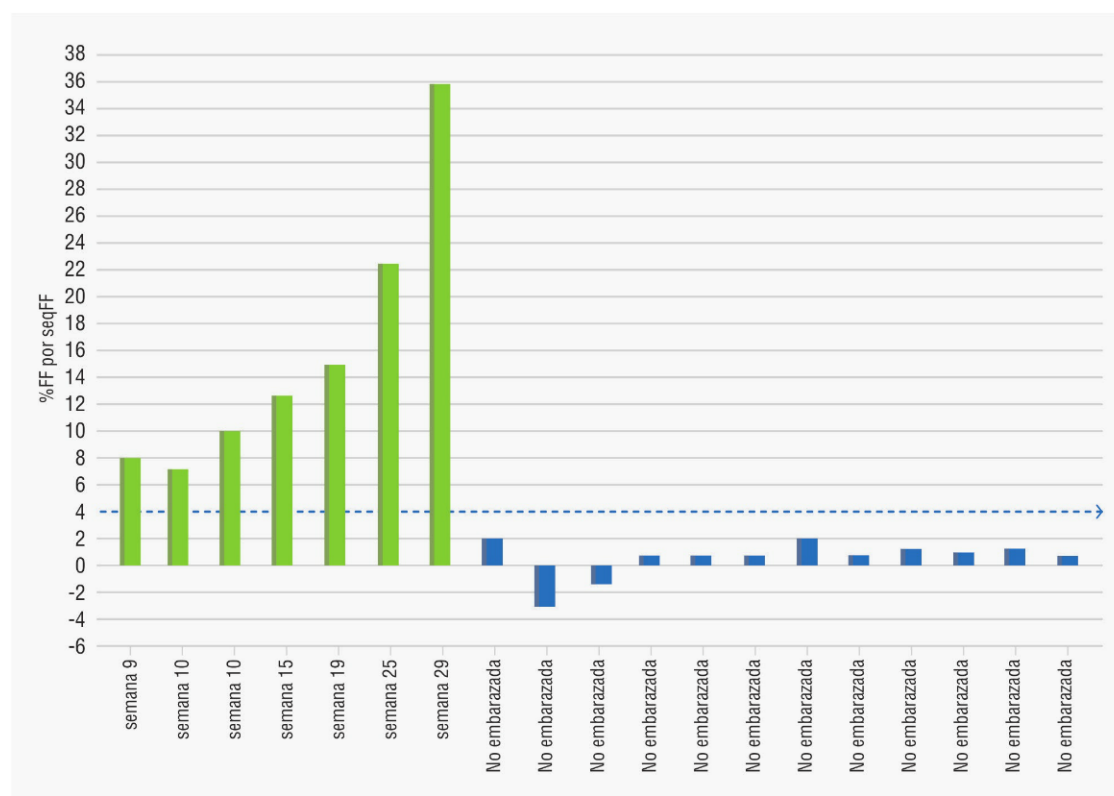
Actualmente en Prenatal Visión no se informan otras alteraciones que las específicamente indicadas. Si bien nuestra tecnología es capaz de detectar otras alteraciones, los resultados actuales a nivel mundial indican valores predictivos positivos muy bajas para ser confiables en el caso de alguna de ellas. En Héritas estamos trabajando para ampliar el ensayo a Triso-

mías y mosaicos 9 y 16 (11), también para reportar alteración subcromosómica de delección en cromosoma 22 que conlleva a síndrome de DiGeorge cuya frecuencia es 1 en 4000 e independiente de la edad materna. Adicionalmente, estamos investigando y siguiendo de cerca otros reportes a nivel mundial sobre el valor predictivo positivo en casos de Monosomía X (síndrome de Turner), dado que hasta el momento ha generado gran cantidad de reportes falsos positivos debido principalmente a mosaicismos tanto de la madre como del feto (12, 13).

Tabla 1: Sistema de cuatro puntajes de Héritas Prenatal Visión y sus reglas de decisión.

Score	Normal	Trisomía
Z	Menor a 2,5	Mayor a 3
ZZ	Menor a 2,5	Mayor a 3
MAI	Menor a 1	Mayor a 1,5
MAR	No	Menor a 1

Figura 1: Determinación de % de fracción fetal en Prenatal Visión usando seqFF en embarazadas y control de no embarazadas. La línea de corte de 4% se estableció como corte para en ensayo, si bien el método seqFF fue sensible hasta casi 2%.



Investigación

Figura 2: Control SeraCare de Trisomía 21 a distintas fracciones fetales y en función del MAPQ30 de cada muestra. En los controles SeraCare solo es posible calcular los puntajes específicos del cromosoma de interés sin el contexto del resto de los cromosomas, esto es puntajes Z y MAI. Las líneas punteadas muestran los valores de corte para los valores positivos de Z y MAI. Los * indican los %FF que pudieron ser detectados por la metodología.

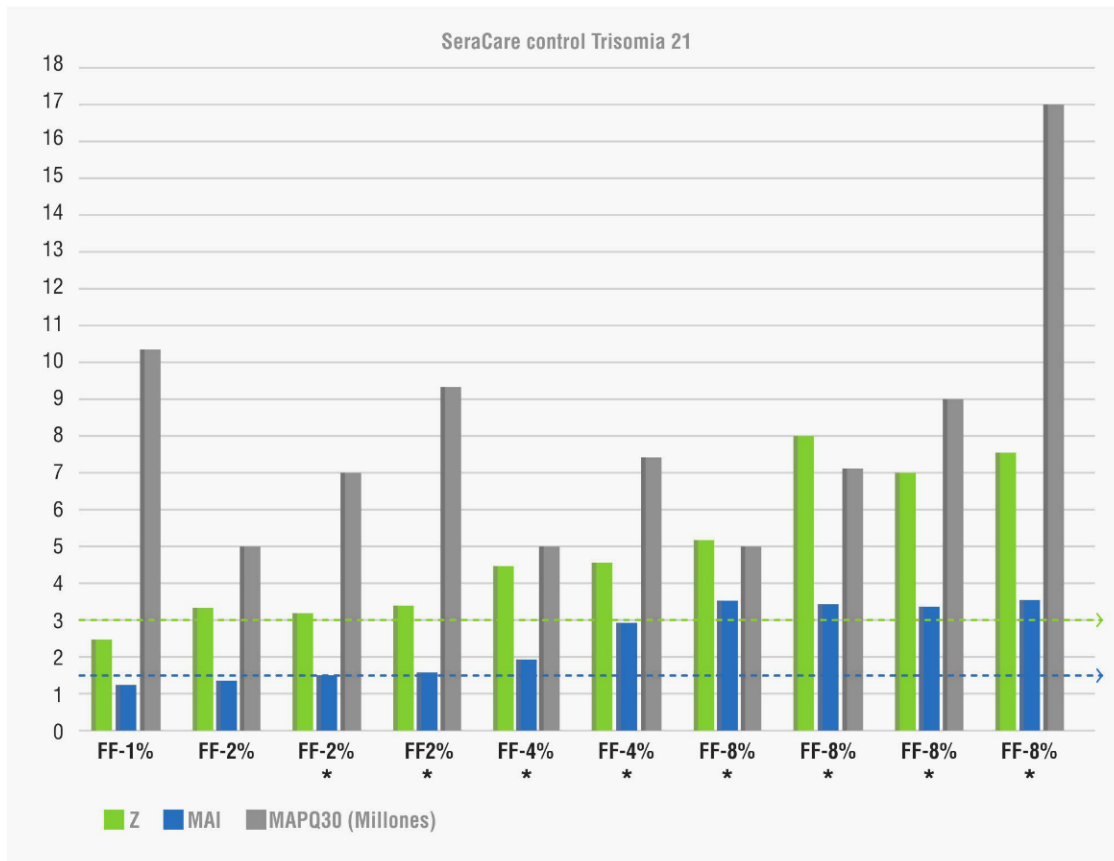


Figura 3: Prenatal Visión ensayado sobre una muestra positiva de embarazada para trisomía 21 con 12% de FF, donde la única variable fue el MAPQ30 de 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 11 millones. Las líneas punteadas muestran los valores de corte para los valores positivos de Z/ZZ (Azul) y MAI (naranja) respectivamente.

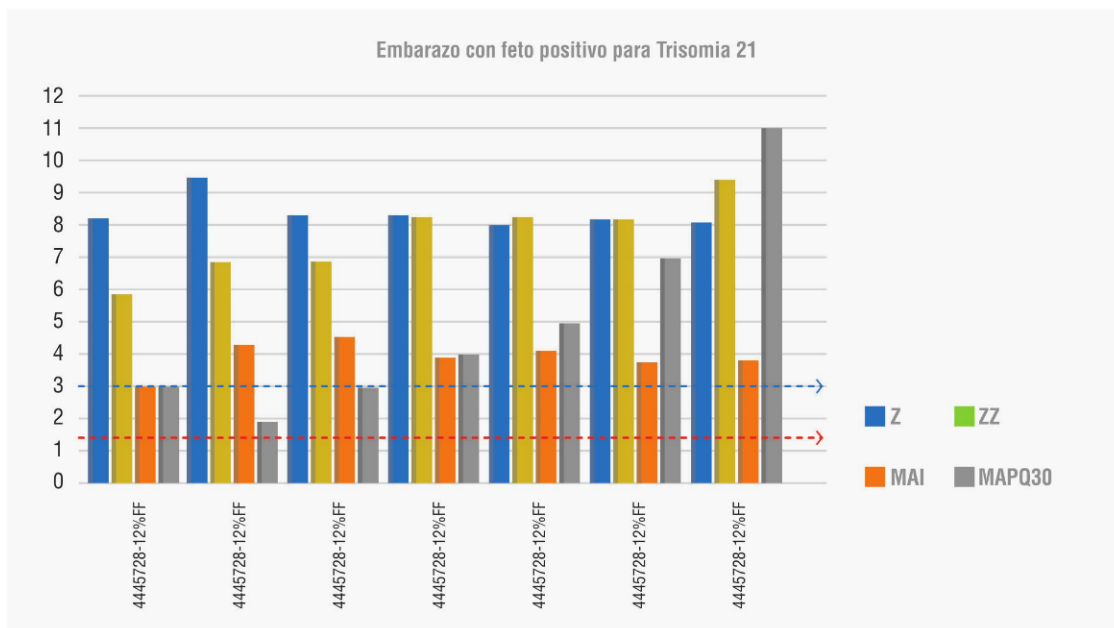
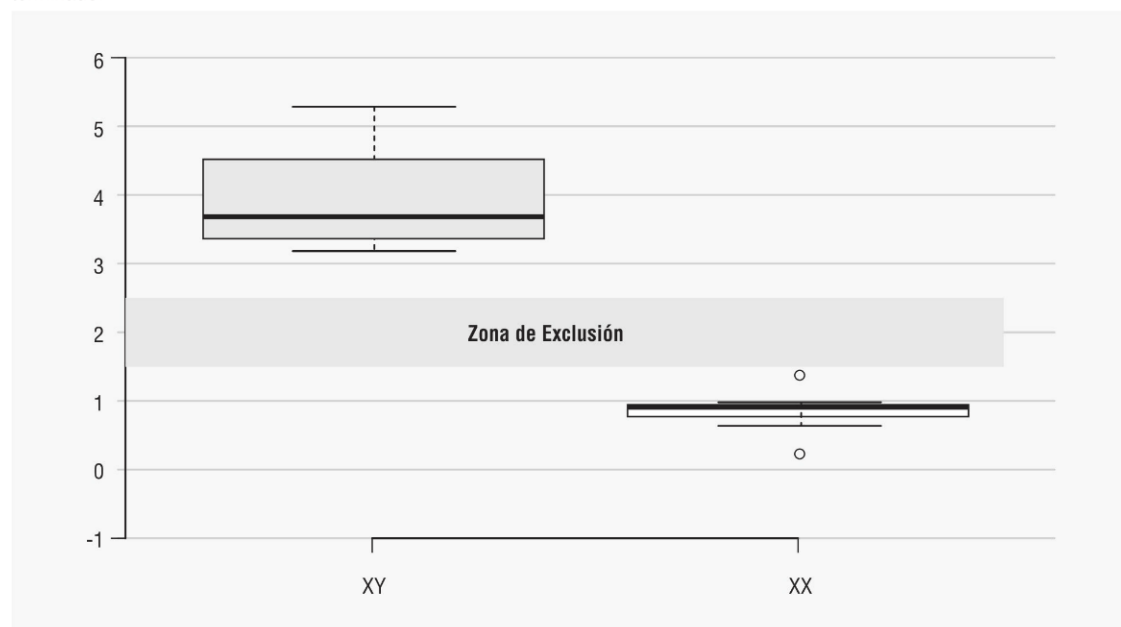


Figura 4: Determinación de sexo fetal. Valores menores a 1.5 se informan como sexo femenino. Valores mayores a 2.5 se informan como sexo masculino. Los valores entre 1.6 y 2.4 pertenecen a la zona de exclusión de modo que se informan como sexo No determinado.



Agradecimientos:

Agradecemos la colaboración de todo el personal de CIBIC S.A. y de INDEAR con su esfuerzo en la puesta en marcha del ensayo de Héritas. Héritas recibió financiación de CIBIC S.A. e INDEAR a través del instrumento PROFJET del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación productiva de la Nación (MINCYT). MPV es además investigador de CONICET y forma parte del programa líderes de opinión de Illumina. Héritas Prenatal Visión es una marca registrada de Héritas.

Referencias

- Lo YM, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*; 350 (9076):485-7, 1997.
- Eiben B, et al. Single Nucleotide Polymorphism-Based Analysis of Cell-Free Fetal DNA in 3000 Cases from Germany and Austria. *Ultrasound Int Open*. 1(1):E8-E11, 2015.
- Norton ME, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med*. 372(17): 1589-97, 2015
- Porreco RP, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am J Obstet Gynecol*. 211(4): 365. e1-12. 2014
- Taneja PA, et al. Noninvasive Prenatal Testing in the General Obstetric Population: Clinical Performance and Counseling Considerations in Over 85 000 Cases. *Prenatal diagnosis* 36 (3): 4766. 2016.
- Artieri CG, et al. Noninvasive Prenatal Screening at Low Fetal Fraction: Comparing Whole-genome Sequencing and Single-nucleotide Polymorphism Methods. *Prenatal diagnosis* 37(1):1-9. 2017.
- Bayindir B, et al. Noninvasive Prenatal Testing Using a Novel Analysis Pipeline to Screen for All Autosomal Fetal Aneuploidies Improves Pregnancy Management. *Eur J Hum Genet* 23 (10):1286-1293. 2015.
- Straver R, et al. WISECONDOR: Detection of Fetal Aberrations From Shallow Sequencing Maternal Plasma Based on a Within-sample Comparison Scheme. *Nucleic Acids Res* 42 (5): e31. 2014
- Kim SK, et al. Determination of Fetal DNA Fraction From the Plasma of Pregnant Women Using Sequence Read Counts. *Prenatal diagnosis* 35(8): 810-815. 2015
- Sikkema-Raddatz B, et al. NIPTRIC: An Online Tool for Clinical Interpretation of Non-invasive Prenatal Testing (NIPT) Results. *Scientific reports* 6: doi:10.1038/srep38359. 2016
- Sparks TN, et al. Mosaic Trisomy 16: What Are the Obstetric and Long-term Childhood Outcomes? *Genet Med*. doi:10.1038/gim.2017.23. 2017
- Kalafat E, et al. Non-invasive Prenatal Testing for Sex Chromosome Abnormalities: A Source of Confusion. *BMJ Case Rep*. doi:10.1136/bcr-2014-207309. 2015
- Wang L, et al. Maternal Mosaicism of Sex Chromosome Causes Discordant Sex Chromosomal Aneuploidies Associated with Noninvasive Prenatal Testing. *Taiwan J Obstet Gynecol* 54 (5): 527-531. 2015