



# Exámenes genéticos en medicina maternofetal

---

Fernanda Martin Merlez

Residente Genética Clínica

Hospital Clínico Universidad de Chile



# Contenidos

1. Introducción
2. Tipos de enfermedades genéticas
3. Obtención de muestras
4. Cariograma
5. FISH
6. NIPS
7. QF - PCR
8. MLPA
9. Array CGH
10. Exoma / Genoma
11. Conclusiones



# Introducción diagnóstico prenatal

- La segunda causa de mortalidad infantil en Chile, que causa el **38%** de todas las muertes infantiles, son las malformaciones congénitas
- Los objetivos del diagnóstico prenatal en nuestro medio son:
  - ✓ Establecer un diagnóstico en el feto por si hubiera alguna opción terapéutica que ofrecerle
  - ✓ Establecer el mejor nivel de atención para la atención del embarazo y parto
  - ✓ Reducir la ansiedad en parejas con riesgo elevado de tener hijos con anomalías congénitas

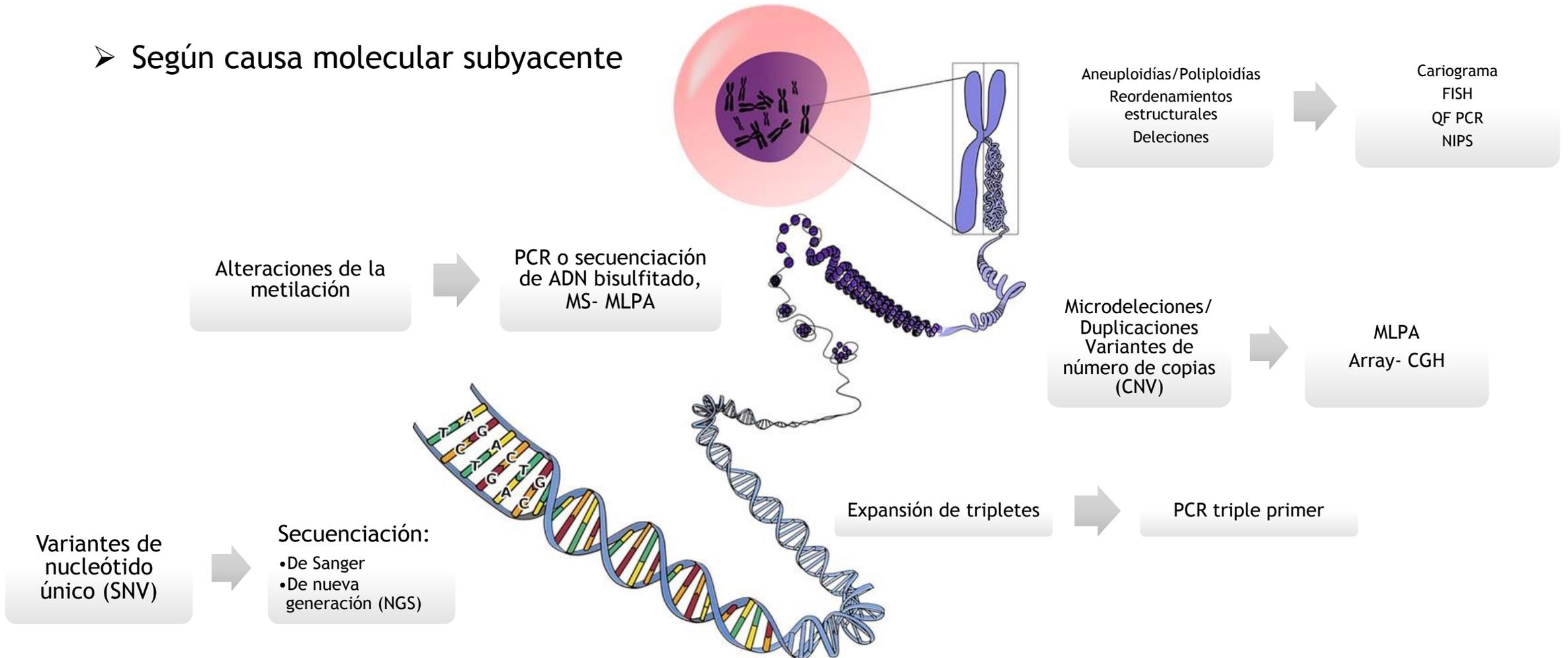
# Indicaciones de estudio prenatal



- Padres portadores de reordenamiento cromosómico balanceado
- Hijo previo con Síndrome de Down u otra anomalía cromosómica
- Aborto espontáneo aneuploide en gestación previa
- Historia familiar de malformaciones congénitas
- Hallazgos ultrasonográficos de malformaciones fetales
- Retraso de crecimiento intrauterino severo
- Riesgo alto para anomalías cromosómicas calculado por tamizaje ecográfico o en Test Prenatal No Invasivo en ADN fetal circulante en sangre materna (NIPS)

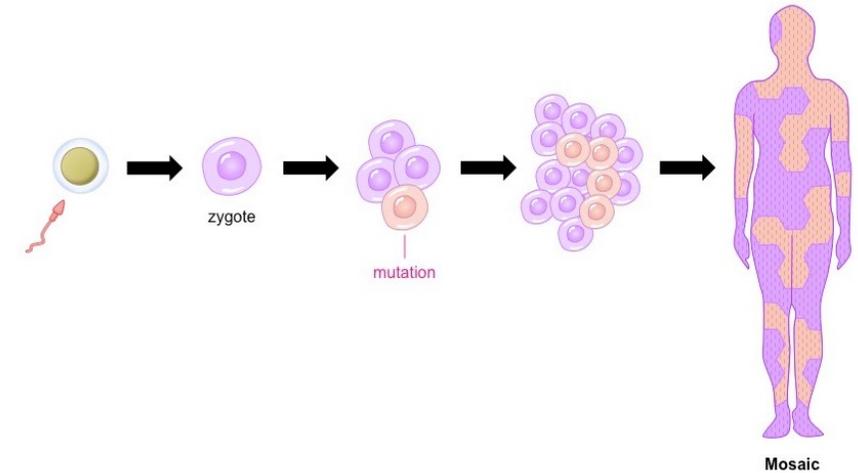
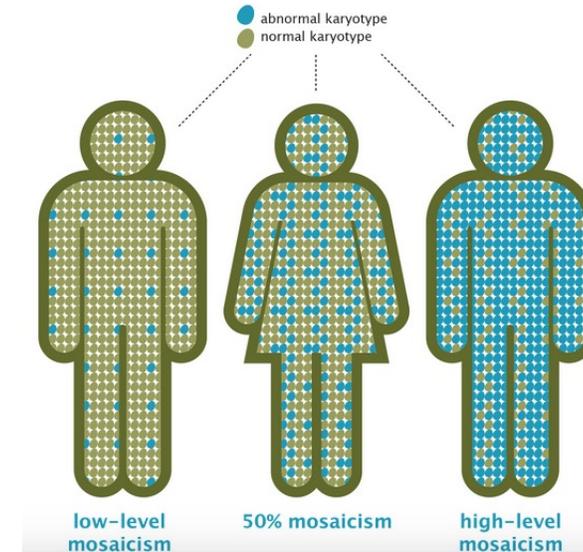
# Enfermedades genéticas

➤ Según causa molecular subyacente



# Mosaicismo

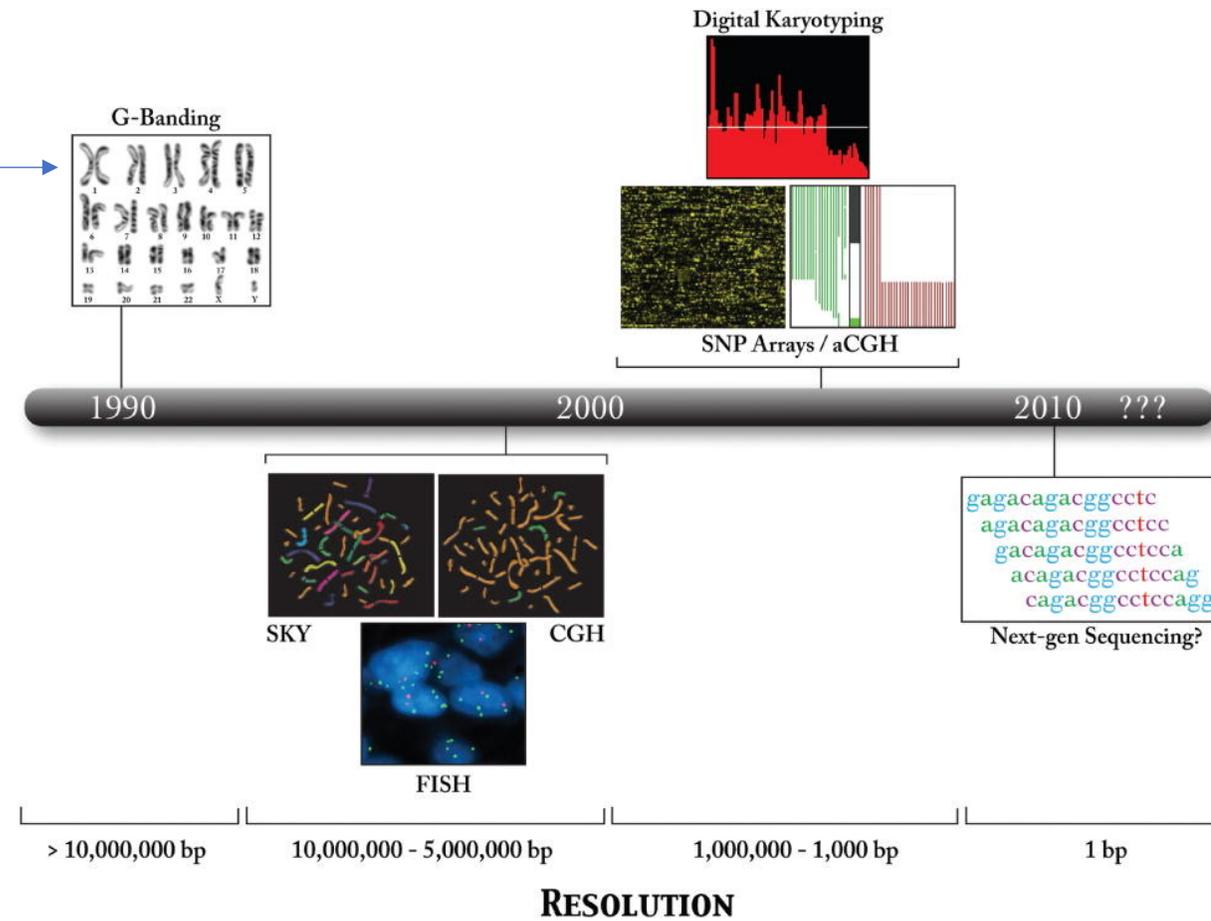
- De aneuploidías
- De CNV
- De variantes de nucleótido único (SNV)



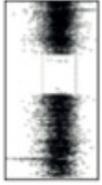
# Exámenes genéticos

- Historia de los exámenes genéticos

El diagnóstico prenatal citogenético comenzó a realizarse en Chile en 1988

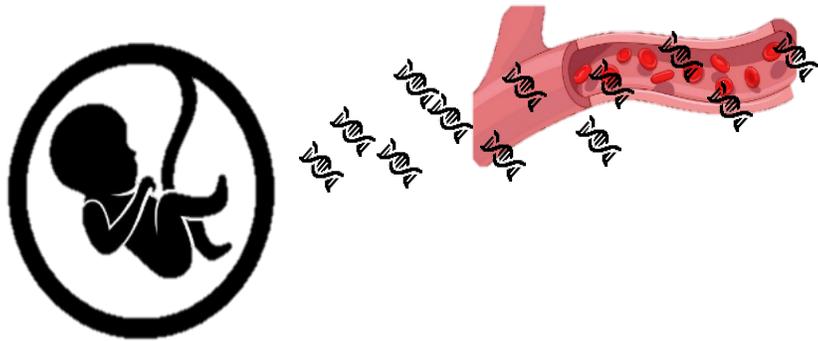


# Test genómicos

<b>a</b>	<b>Light microscope</b>	<b>G-banded karyotype</b>	<b>Microarray</b>	<b>Whole-exome sequence</b>	<b>Whole-genome sequence</b>
<b>Appearance</b>				<pre>CGGATGATTACCCGTT G.....GCTC TAGCTAGCTATA....</pre>	<pre>CGGATGATTACCCGTT GATATAGCTCTCGCTC GCTCTAGCTAGCTATA GGCTATGGGTGGGGGC</pre>
<b>Resolution</b>	Entire chromosome	5–10 Mb	50–100 kb	1 bp	1 bp
<b>Number of loci probed</b>	N/A	~500	~0.05–2 million	~50 million	3 billion
<b>Variants detected</b>	Aneuploidy, polyploidy	Variants >5 Mb	Copy number variants	Coding regions	Majority of variants
<b>Variants per person</b>	0 or 1	0 or 1	10–100s	~20,000	4–5 million
<b>Diagnostic yield</b>	Low	—————→			High
<b>Incidental findings</b>	Low	—————→			High

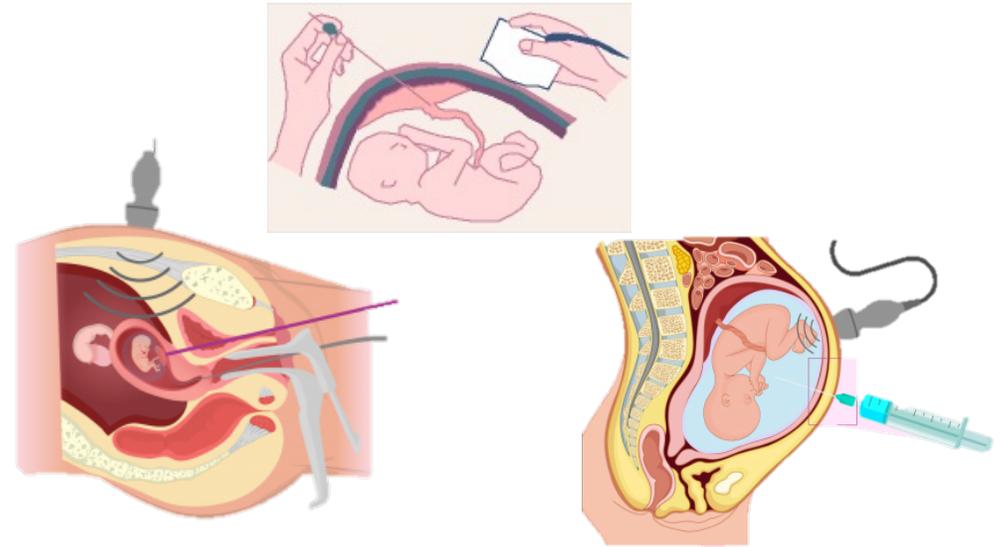
# Tipos de test genéticos fetales

## Tamizaje o no invasivos



Tamizaje prenatal no invasivo (NIPS o NIPT)

## Diagnósticos / Invasivos

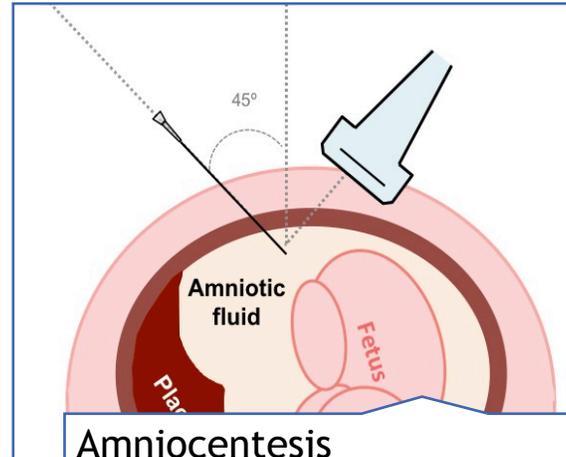


Cariograma / FISH  
QF - PCR  
MLPA  
Array CGH  
Exoma / Genoma

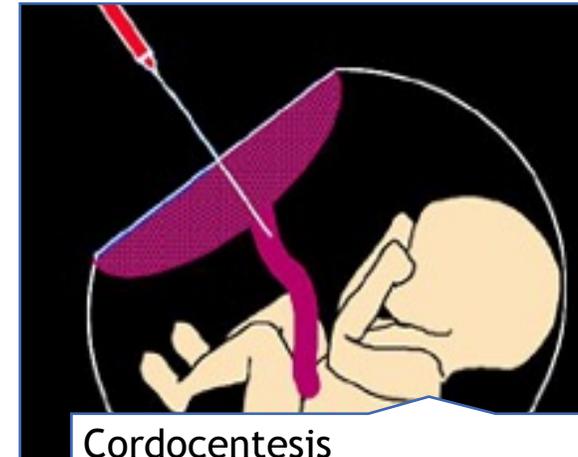
# Procedimientos invasivos



**Biopsia de Vellosidades coriales (BVC)**  
• Desde la semana 10-11

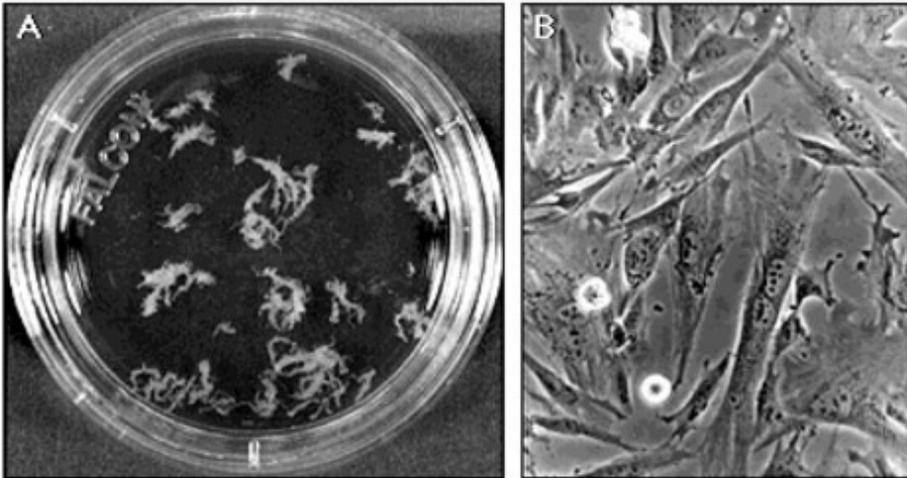


**Amniocentesis**  
• Desde la semana 15-16



**Cordocentesis**  
• Desde las 16-20 semanas

# Biopsia de vellosidades coriales



Sangrado vaginal: 10%

- Mayor en abordaje transcervical

Pérdida reproductiva: 0.2%

Falla de obtención de muestra: 2.5-4.8%

Falla cultivo citotrofoblasto: < 0.5%

Mosaisismo : 1-2%

Reporte cariograma: 48 hrs aprox

# Amniocentesis

RPM : 1-2%

Pérdida reproductiva: 0.3%

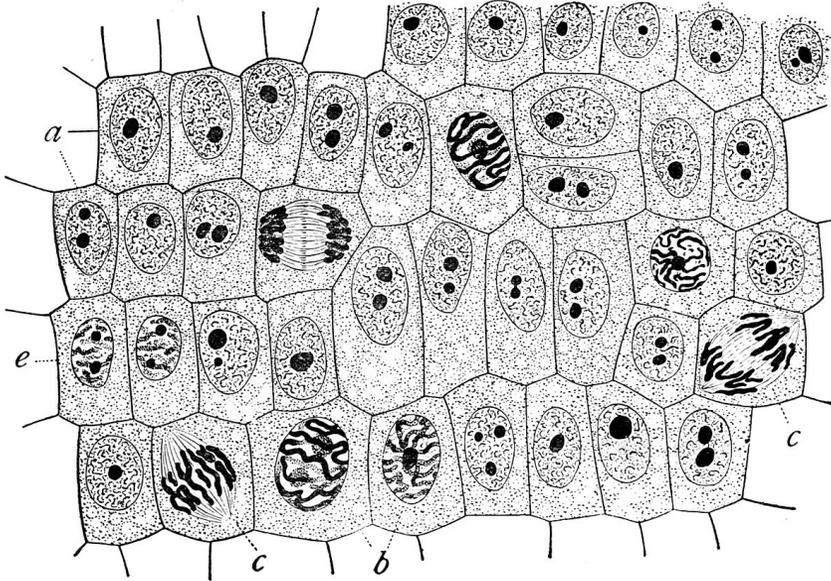
Falla de amniocultivo: 0,1 %

- Reporte retrospectivo: falla de 9,7% si mayor 28 semanas

Mosaisismo : 0,35%

- Evitar paso transplacentario
- Evitar >1 punción
- Eliminar los primeros 2 mL

Reporte cariograma: 14-21 días



# Cordocentesis

Pérdida del embarazo ( $\geq 1.3\%$ )

## Complicaciones

- Sangrado desde el sitio de punción (20-30%)
- Bradicardia fetal (5-10%)

Reporte cariograma: 72 hrs



# Estudios citológicos

Cariograma

FISH

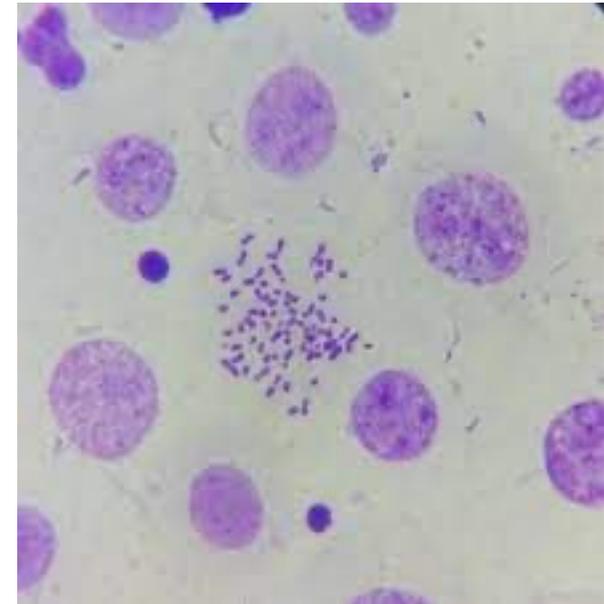
Cultivo

Amniocitos

BVC

Trofoblasto o  
restos de aborto

Sangre de  
cordón



# Estudios Moleculares

No requieren cultivo celular

Extracción de ADN

De BVC, amniocentesis, sangre de cordón, restos de aborto

CG002610640

This form is processed by machine. Please use block letters and write clearly.

**PATIENT INFORMATION**

DOE  
First Name  
JACK  
Last Name  
Gender  Male  Female Date of Birth 16.07.2010 (DD/MM/YYYY)

**PHYSICIAN INFORMATION**

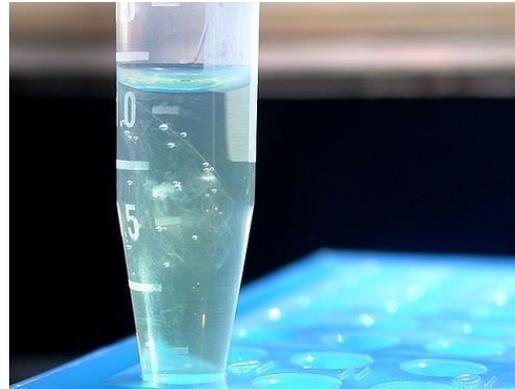
RICHARD  
Physician First Name  
ROE  
Physician Last Name  
SAMPLE@EMAIL.COM  
E-mail  
HOSPITAL FOR CHILDREN  
Affiliation  
456 MAIN STREET  
Street / Number  
ANYTOWN  
City ST1123456  
ZIP Code  
BRAZIL  
Country

CG002610640

CG002610640

CG002610640

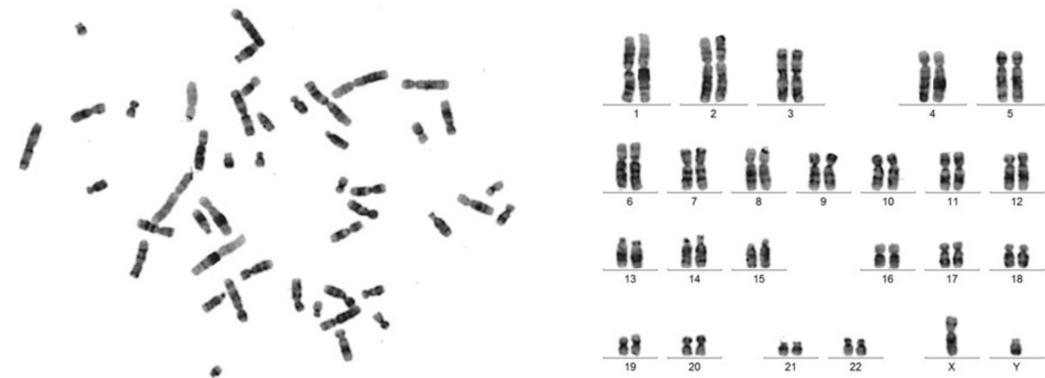
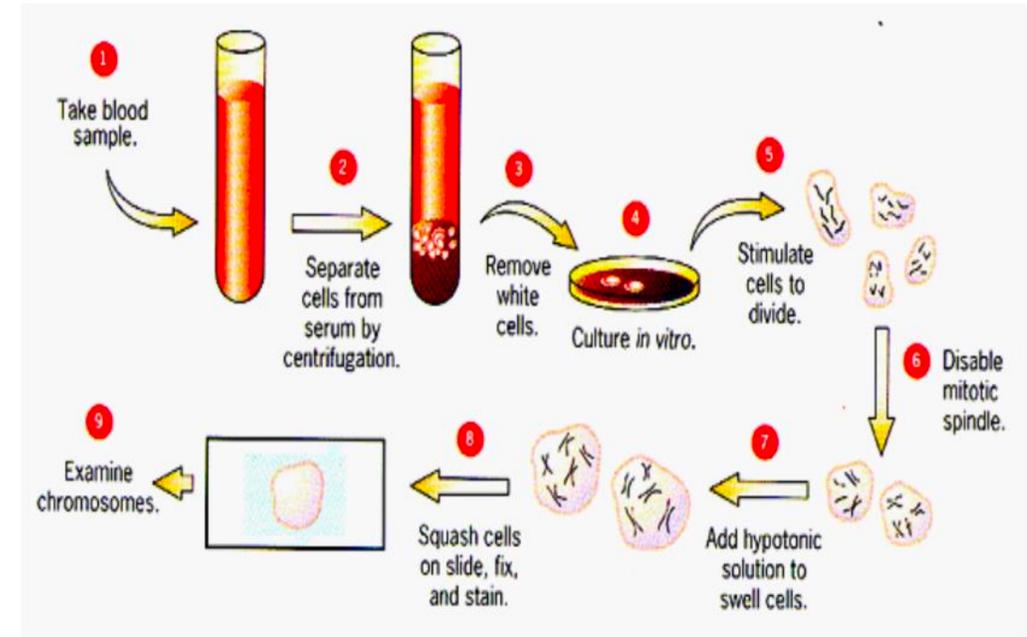
CG002610640



- Puede guardarse congelado
- Gotas de sangre en papel filtro

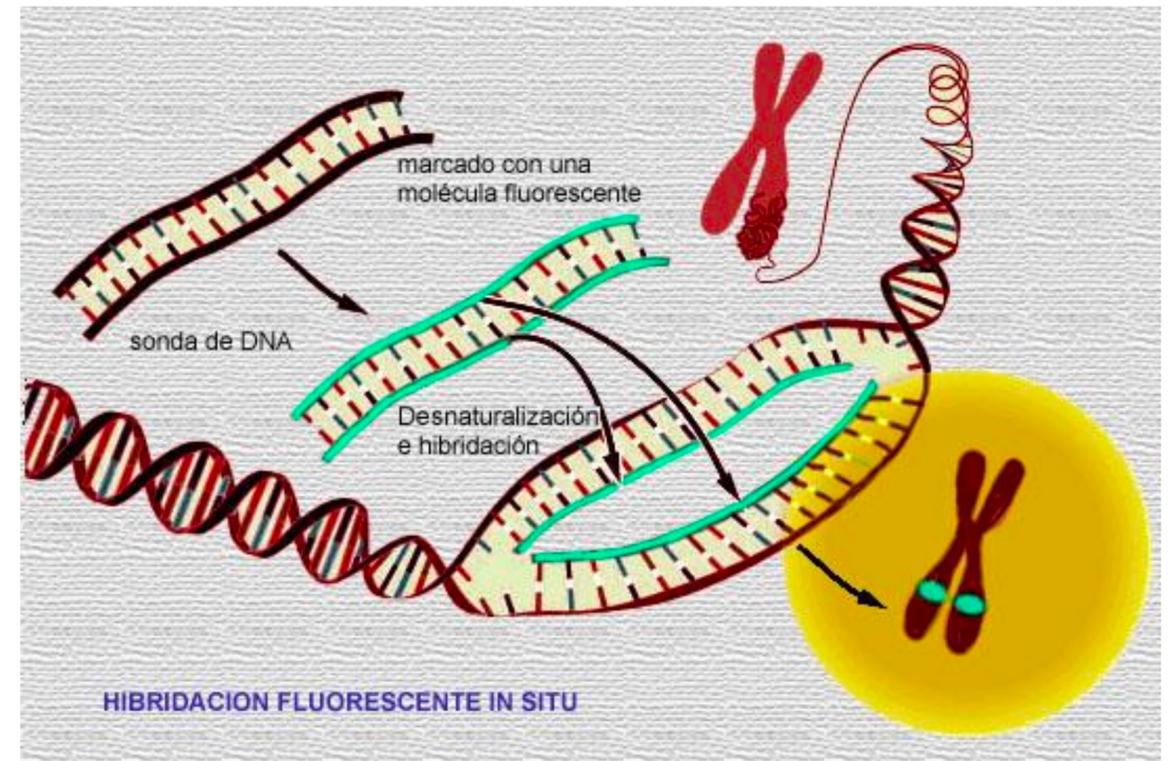
# Cariograma

- Detecta alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales sobre 5-10 MB
- Habitualmente se analizan 20-25 metafases con bandeo G (400 bandas)
- Detección de mosaicismo > 10%



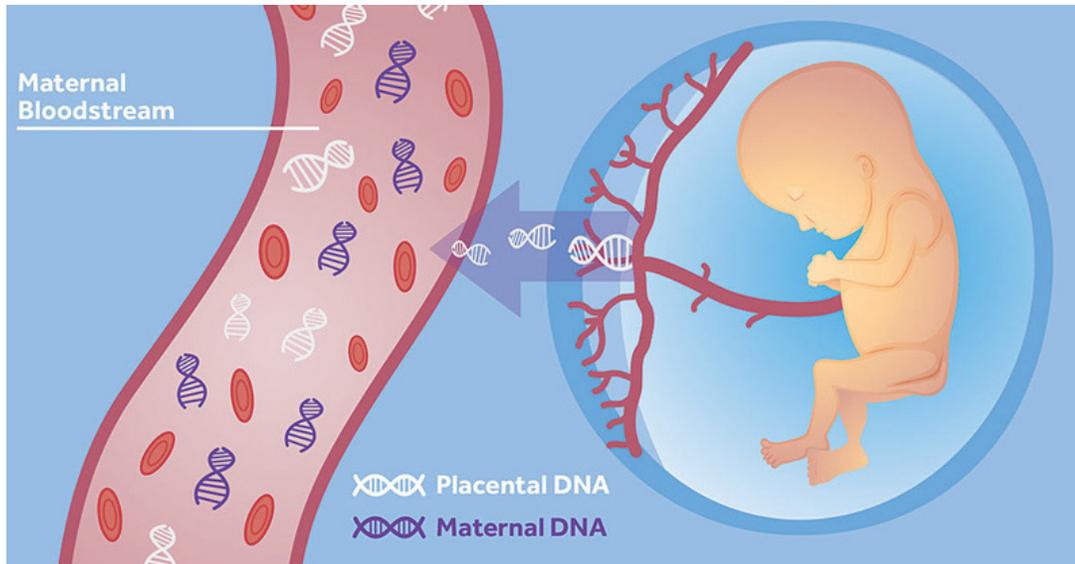
# FISH

- Se puede realizar en núcleos interfásicos (nuc ish 200 metafases aprox) o en cromosomas metafásicos (ish) tras un cultivo celular
- Usos:
  - ✓ Caracterización de rearrreglos cromosómicos estructurales, cromosomas marcadores
  - ✓ Estudio de microdeleciones (22q11.2, Sd. Williams, etc)
  - ✓ Diagnóstico rápido de aneuploidías: cromosomas 21,18,13, X e Y
- Resolución 40-250 Kb
- Detección de mosaicismo >5% aprox



# ADN Libre fetal en sangre materna

- Técnica no invasiva que permite la detección de aneuploidías desde la semana 10 del embarazo



Aneuploidía	Sensibilidad	Falsos positivos
T21	99,7%	0,04%
T18	97,9%	0,04%
T13	99,0%	0,04%
45, X	95,8%	0,14%

# Técnica

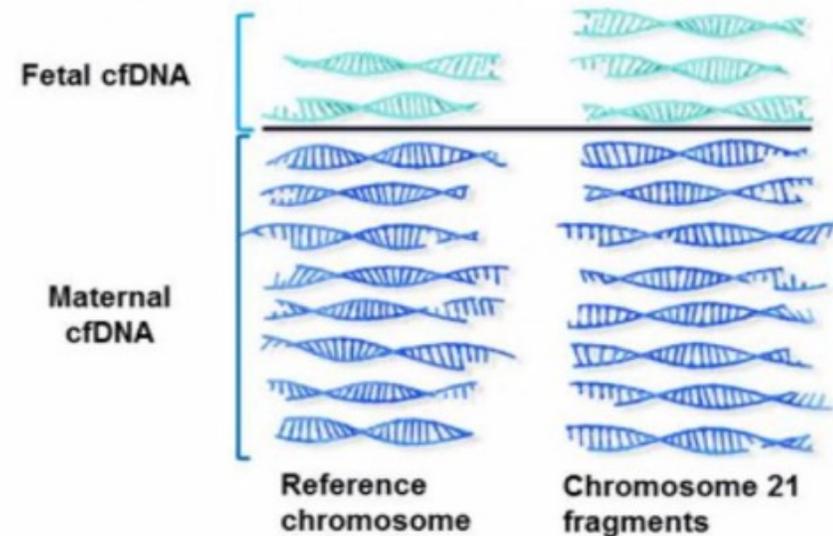
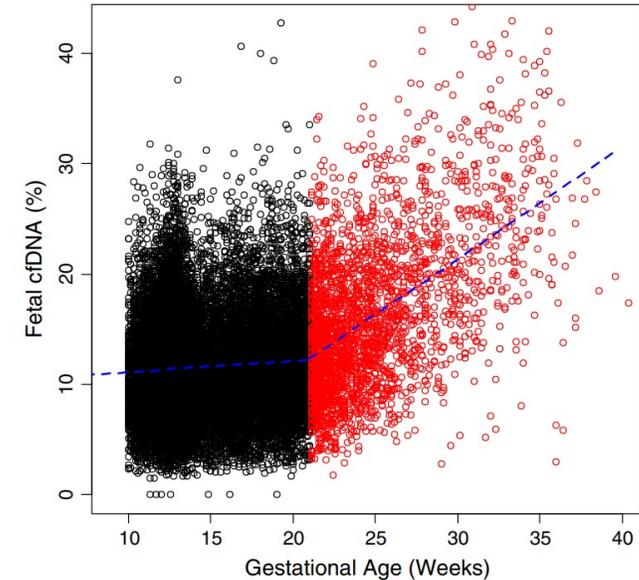
- ADN fetal de apoptosis de células del sincitiotrofoblasto circula en pequeños fragmentos 50 – 200 pb

- Se puede detectar desde las 5 semanas, con una concentración óptima para análisis desde las 9 sem

Concentración aumenta con la EG

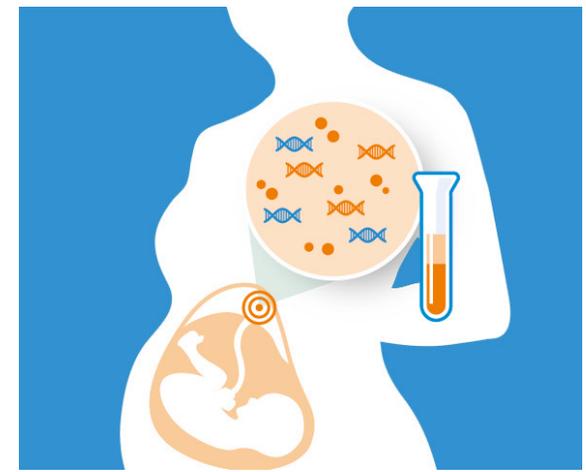
10 – 20 semanas  $\uparrow$  0,1% por semana

> 20 semanas  $\uparrow$  1% por semana



# Limitaciones

---



## Falsos positivos

- Mosaicismo confinado a la placenta
- Gemelo evanescente
- Mosaicismo materno
- Cáncer materno
- Variaciones en el número de copias materno
- Azar
- Técnica
- Receptor de transplante
- Transfusión sanguínea reciente

## Falsos negativos

- Mosaicismo confinado a la placenta
- Fracción fetal *borderline*
- Variaciones en el número de copias materno
- Técnica

# Desde Chile



Invitae NIPS detects:

Trisomy	Sensitivity*	Specificity*
Trisomy 21 (Down Syndrome)	99%	99%
Trisomy 18 (Edwards Syndrome)	99%	99%
Trisomy 13 (Patau syndrome)	99%	99%

\*Specificity and sensitivity calculated using [internal validation data](#)

Microdeletions add-on**	Sex chromosome add-on**
Detect five clinically significant microdeletion regions to screen for syndromes that may be undetectable by ultrasound and other early screening technologies.	Predict fetal sex—as early as 10 weeks—with greater than 99% accuracy, and simultaneously detect aneuploidies to determine the risk of sex chromosome disorders.
<p>Microdeletions detected:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1p36 deletion syndrome</li> <li>▪ DiGeorge syndrome (22q11.2 deletion syndrome)</li> <li>▪ Angelman/Prader-Willi syndrome (15q11.2 deletion syndrome)</li> <li>▪ Cri du Chat syndrome (5p15.2 deletion)</li> <li>▪ Wolf-Hirschhorn syndrome (4p16.3 deletion)</li> </ul>	<p>Aneuploidies detected:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Turner syndrome (monosomy X)</li> <li>▪ Triple X syndrome (47,XXX)</li> <li>▪ Klinefelter syndrome (47,XXY)</li> <li>▪ Jacob's syndrome (47,XYY)</li> </ul>

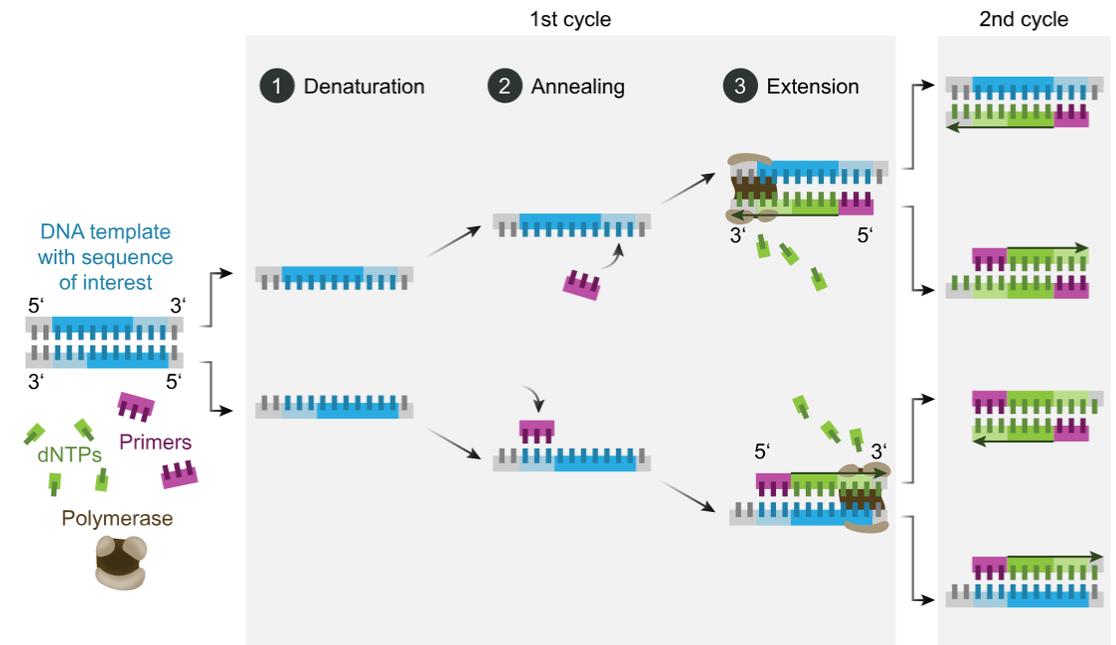
Sensibilidad para microdeleciones ≈ 80%

\*\*Not available for twin pregnancies

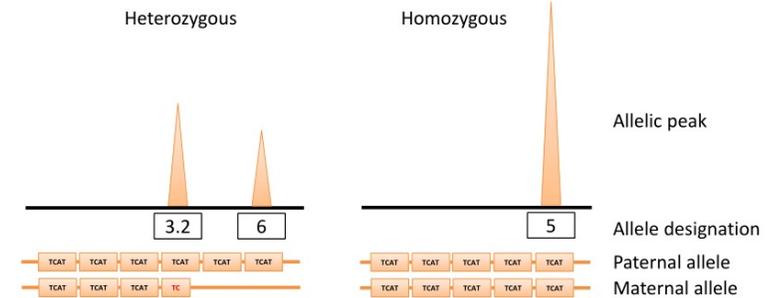
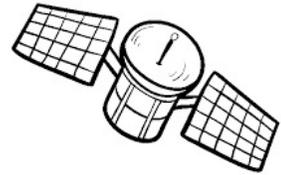


# PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR)

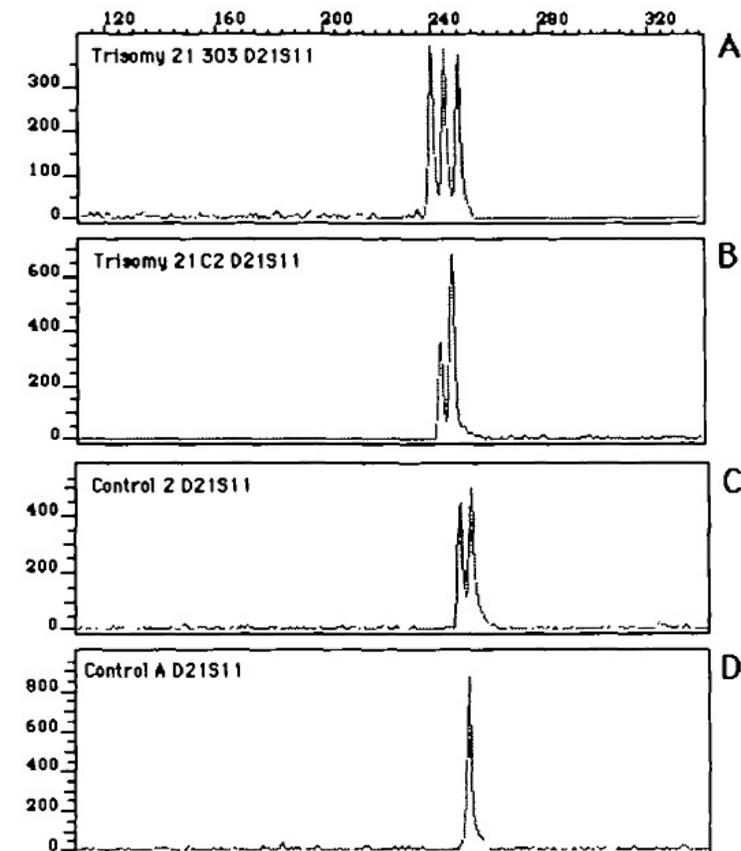
- Cuantifica el número de cromosomas 13, 18, 21, X e Y mediante el estudio de secuencias de ADN polimórficas denominadas repeticiones cortas en tándem (STR)
  - Permite detectar la contaminación celular materna
  - Permite conocer el origen parental de las triploidías y de detectar la zigosis de los gemelos
  - En la mayoría de los casos los resultados están disponibles en 24 horas



# Short Tandem Repeats (STR)



- También llamados microsatélites: son secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de manera consecutiva
  - La variación en el número de repeticiones, y no la secuencia repetida, crea diferentes alelos
- Los STR son marcadores muy variables en la población, a veces con más de 30 alelos diferentes con distintas frecuencias según la población
  - Son el marcador de elección para estudios de parentesco
- La QF-PCR de 3 STR por cromosoma debería ser un 99% informativo



# QF-PCR

---

- 7679 muestras prenatales con cariógrama y QF-PCR
  - 1243 vellosidades coriónicas y 6436 amniocentesis
- **Concordancia QF-PCR y cariotipo en el 98,75%**
  - Resultados discordantes con implicancias en el fenotipo fetal en el 0,24% (18 casos)
  - Cariotipo anormal asociado con un resultado clínico adverso no detectado por QF-PCR en el 0.05% de las muestras (4 fetos)
- El cariotipo debe realizarse en embarazos con resultados normales de QF-PCR y hallazgos ecográficos anormales, aumento de TN o antecedentes familiares de reordenamiento cromosómico
- No se puede determinar si las trisomías son libres o por translocación
- QF-PCR no detecta niveles bajos de mosaicismo (<15-20%)

## Assessment of QF-PCR as the First Approach in Prenatal Diagnosis

Celia Badenas   • Laia Rodríguez-Revenga • Carme Morales • Carmen Mediano • Alberto Plaja •  
Ma Mar Pérez-Iribarne • Anna Soler • Núria Clusellas • Antoni Borrell • Ma Ángeles Sánchez • Elisabeth Miró •  
Aurora Sánchez • Montserrat Milà • Wladimiro Jiménez • [Show less](#)

[Open Archive](#) • DOI: <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090224>

## Use of a DNA Method, QF-PCR, in the Prenatal Diagnosis of Fetal Aneuploidies

Table 2. Performance of QF-PCR

Reference	Number and type of specimens	Sample failure/ not tested or UI, %	Number of cases detected / number of actual non-mosaic autosomal trisomies and triploidies	False positives for trisomy or triploidy	Number of cases detected / number of actual non-mosaic sex chromosomal aneuploidies	False positives for sex chromosomal aneuploidy
Levett et al. 2001 <sup>6</sup>	5097 AF	0.1 / 2	89/89	0	16/20	0
Schmidt et al. 2001 <sup>7</sup>	662 AF	0 / 0	14/15 1 case of T18 was UI	0	5/5*	0
Bili et al. 2002 <sup>8</sup>	1020 AF	0 / 1.2	16/19 3 cases were UI	0	0/0	0
Mann et al. 2004 <sup>9</sup>	7720 (6147AF, 1552 CVS, 21 FBS)	0.09 / 2.1	437/437	0	N/A	N/A
Caine et al. 2005 <sup>10</sup>	10253AF	2.9	429/429	0	NA	NA
Brown et al. 2006 <sup>11</sup>	687 AF	0 / 2.5	14/14	0	1/3 Only 2 markers on X chr	0
Kozlowski et al. 2006 <sup>12</sup>	4692 AF	0.06 / 0.15	71/73 2 cases missed at the beginning when only two markers per chr used.	0	2/8	0
Kagan et al. 2007 <sup>4</sup>	3854 AF	None reported	202/202	0	14/14	0
Onay et al. 2008 <sup>13</sup>	576 AF	0 / 2.9	15/15	0	4/4	0
Putzova et al. 2008 <sup>14</sup>	2906 (142 CVS, 2764 AF)	0 / 0.26 for AF	110/110	0	20 / 20	0
Cirigliano et al. 2009 <sup>15</sup>	37544 AF 4687 CVS	0.05 / 0.82	1287/1290† 3 cases were UI	0	265/267†† 1 abnormality missed; 1 UI MCC	0

- QF-PCR es un método confiable para detectar trisomías y debería reemplazar el cariógrama siempre que se realicen pruebas prenatales únicamente debido a un mayor riesgo de aneuploidía en los cromosomas 13, 18, 21, X o Y
- Cariograma y QF-PCR en todos los casos de anomalía ecográfica fetal o un reordenamiento cromosómico familiar
- Se recomienda seguimiento citogenético de los hallazgos de QF-PCR para descartar translocaciones heredadas

# En Chile



Sistema de Información de Exámenes, SINFEX

## ANEUPLOIDIA, PCR FLUORESCENTE DE LOS CROMOSOMAS 13, 18, 21, X e Y

Actualizado en Septiembre de 2019 por TM Ligia Valdivia  
Revisado y Aprobado por Dra. Marcela Lagos

Código del Examen : 2328

Nombres del Examen : Estudio de aneuploidía de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y por PCR fluorescente  
Estudio genético molecular de aneuploidía de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y  
Screening de aneuploidía de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y por PCR fluorescente

Laboratorios de Procesamiento :

Laboratorio	Días de Procesamiento	Plazo de Entrega de Resultados
Biología Molecular	Lunes a Viernes	1-2 días hábiles

- Se debe avisar al Laboratorio (22 3548515) el envío y recepción de muestras.
- Las muestras deben ser enviadas con carácter de urgente a la Unidad de Biología Molecular, ubicada en Centro Médico San Joaquín.
- Las muestras tomadas fuera de la Red de Salud UC CHRISTUS deben ser avisadas al Laboratorio y entregadas directamente en la UTM San Joaquín Av. Vicuña Mackenna 4686, de 8:00 a 17:00 hrs (22 3548965).
- Para informe de resultados en el día, debe contactar al laboratorio para informar el envío, las muestras deben estar en el Laboratorio antes de las 12:00 hrs.

Preparación del Paciente : No requiere

Muestra Requerida

- Sangre total, un tubo tapa lila con EDTA, volumen mínimo 2 mL, sangre fetal o de recién nacido, volumen mínimo 1 mL.
  - Otras: líquido amniótico (volumen mínimo: 2 mL), vellosidades coriónicas, tejido. Recolectar en tubo seco y estéril.
- De preferencia, las muestras de líquido amniótico no deben estar contaminadas con sangre materna. Las muestras muy contaminadas (sanguinolentas) serán rechazadas.
- El método no está validado para muestras de líquido de quiste fetal (punción de higroma) u orina fetal (punción de vejiga).**

**IMPORTANTE:** Para la confirmación final de los resultados se requiere que esta prestación sea solicitada en conjunto con la prestación de cariotipo, de no cumplirse esta condición las muestras no serán recibidas. Consultar al laboratorio (22 3548515) por situaciones excepcionales.

Estabilidad de la Muestra<sup>1</sup>

Muestra	T° Ambiente (20 - 25 °C)	Refrigerada (2 - 8 °C)	Congelada (-20°C)
Sangre Total con EDTA	3 días	1 mes	No aplica
Líquido amniótico	*1 día	No aplica	No aplica

\*Dado que es compartida para cariotipo, nunca refrigerar (ver Sinfex 1861)

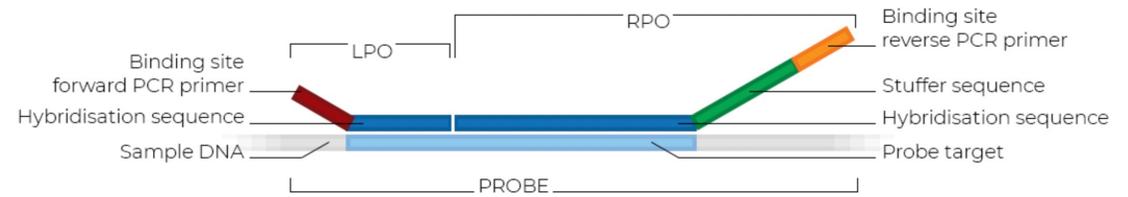
Condiciones de Envío al Laboratorio

: \*Dentro de Santiago y en el día  
Sangre Total con EDTA: Ambiente SI/ Refrigerada SI/ Congelada NO  
Líquido Amniótico: Ambiente SI/ Refrigerada NO/ Congelada NO

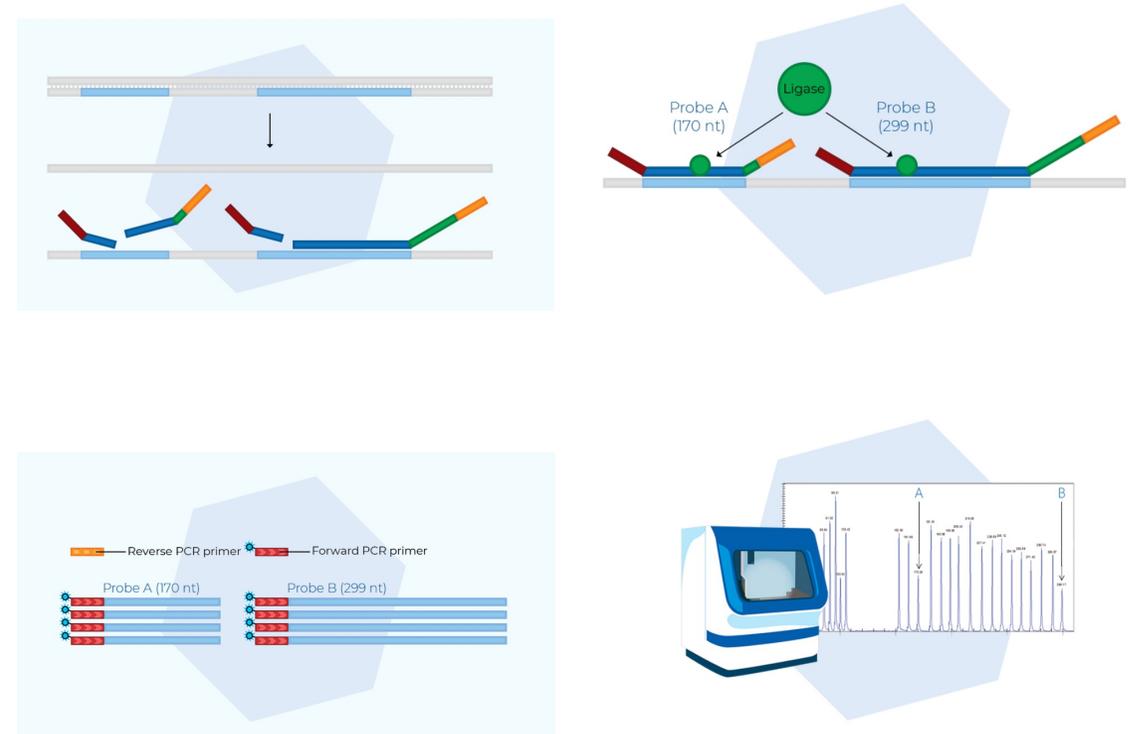
\*Desde fuera de Santiago  
Sangre Total con EDTA y otras muestras: Ambiente SI/ Refrigerada SI/ Congelada NO  
Líquido Amniótico: Ambiente SI/ Refrigerada NO/ Congelada NO

\*Sólo si el tiempo de traslado cumple con la estabilidad de la muestra.

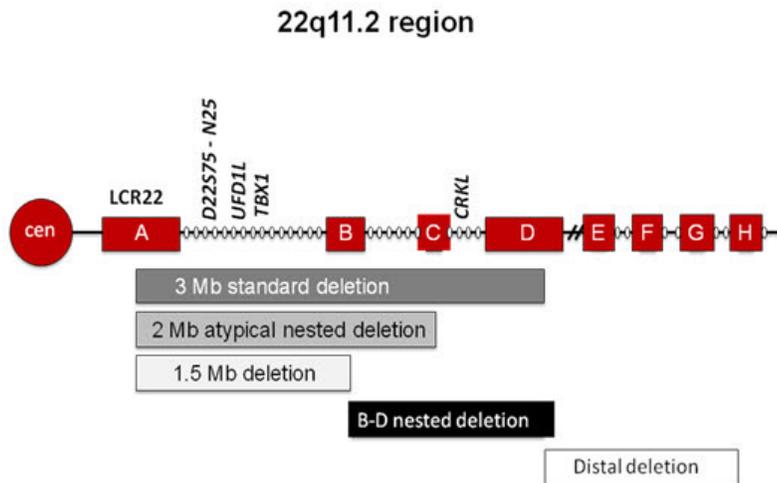
# Multiple ligand probe amplification (MLPA)



- Amplificación de sondas que detectan **secuencias específicas** de ADN, que consisten en dos partes que al unirse a la secuencia diana quedan adyacentes y pueden ser ligadas para su posterior amplificación
  - La señal emitida por las sondas que fueron amplificadas permite analizar el número de copias de la región interrogada
- Permite diagnosticar microdeleciones y microduplicaciones de hasta 1 exón



## En Chile



- Alrededor de un 15% de los casos de síndrome de microdelección 22q11.2 tiene deleciones atípicas, que no pueden identificarse mediante FISH

## SÍNDROME DE MICRODELECIÓN 22q11.2, DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR POR MLPA

Elaborado en Agosto de 2019 por TM Ligia Valdivia  
Revisado y Aprobado por Dra. Marcela Lagos

Código del Examen : 2565

Nombres del Examen : Síndrome de microdelección 22q11.2, Estudio genético molecular por MLPA  
Síndrome de DiGeorge, Síndrome Velocardiofacial (VSF) y otros síndromes relacionados. Síndrome Opitz G/BBB

Laboratorios de Procesamiento :

Laboratorio	Días de Procesamiento	Plazo de Entrega de Resultados
Biología Molecular	Lunes a Viernes	10 días hábiles *4 días hábiles

\*Plazo de entrega para muestras de recién nacidos. Coordinar con el laboratorio fono 22 3548515.

Preparación del Paciente : En caso de estudio prenatal (líquido amniótico) la muestra será obtenida por Médico Obstetra (Amniocentesis).

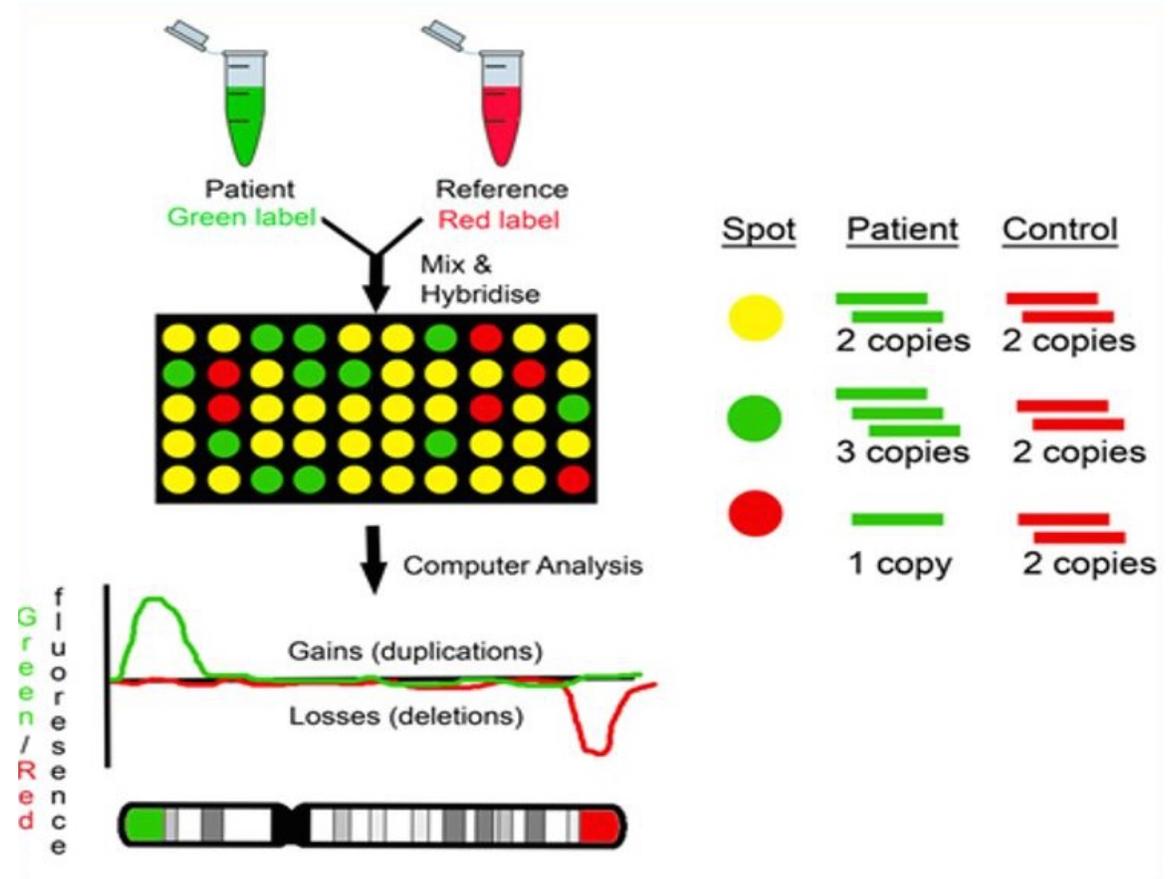
Muestra Requerida :

Sangre periférica completa  
Recolectar 1 tubo tapa lila con EDTA, volumen mínimo: 2 ml

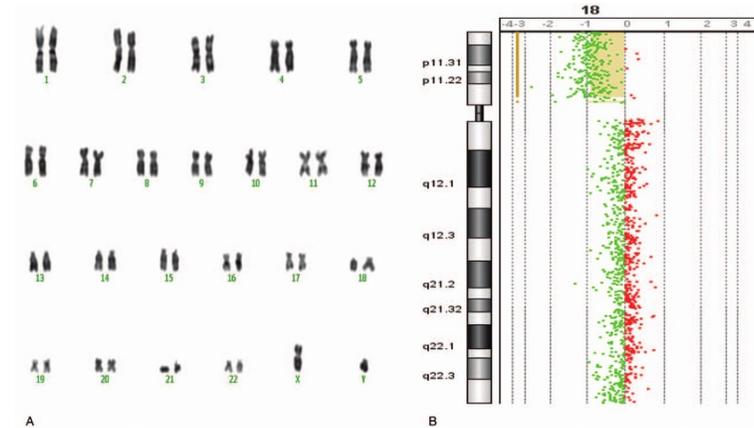
Líquido amniótico  
Recolectar mínimo 5 mL de líquido amniótico en jeringa estéril. Se recomienda tomar la muestra a partir de las 16 semanas de gestación.

# Array CGH (CMA)

- En el año 2012 se demostró la utilidad del CMA en diagnóstico prenatal en 4406 embarazos
- 6% de los fetos con anomalías estructurales tienen variantes de número de copias (CNV) patogénicas
- Detecta **Variantes de número de copias (CNV)** con una resolución de 50-100Kb
  - Aneuploidías
  - Deleciones
  - Duplicaciones



- La interpretación de CNVs requiere de un análisis sistemático con evaluación del contenido génico, y de la correlación clínica de los hallazgos con la literatura médica y bases de datos
- Existen guías que estandarizan la evaluación de las CNV basadas en la evidencia, publicadas por el Colegio Americano de Genética y Genómica (ACMG) y el Clinical Genome Resource (ClinGen)



© American College of Medical Genetics and Genomics **ACMG TECHNICAL STANDARDS** Genetics in Medicine

**Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)**

Erin Rooney Riggs, MS, CGC<sup>1</sup>, Erica F. Andersen, PhD<sup>2,3</sup>, Athena M. Cherry, PhD<sup>4</sup>, Sibel Kantarci, PhD<sup>5</sup>, Hutton Kearney, PhD<sup>6</sup>, Ankita Patel, PhD<sup>7</sup>, Gordana Raca, MD, PhD<sup>8</sup>, Deborah I. Ritter, PhD<sup>9</sup>, Sarah T. South, PhD<sup>10</sup>, Erik C. Thorland, PhD<sup>5</sup>, Daniel Pineda-Alvarez, MD<sup>11</sup>, Swaroop Aradhya, PhD<sup>4,11</sup> and Christa Lese Martin, PhD<sup>1</sup>



# Recomendaciones y consideraciones en diagnóstico prenatal

- En presencia de un cariograma normal, el CMA identifica CNVs clínicamente significativas en:

6-10% de fetos con anomalías estructurales

0.4-2% en fetos sin anomalías estructurales

5% en fetos con TN aumentada con cariotipo normal

1/64 embarazos en los que se realizó examen prenatal invasivo

- El CMA tiene mayor rendimiento que el cariograma para diagnosticar aneuploidías y CNVs en mortinatos o productos de concepción

**Table 1.** Recommendations for prenatal chromosomal microarray and exome sequencing by various professional bodies/ societies

Professional body	Recommendations for CMA	Recommendations for ES
American College of Medical Genetics and Genomics	(1) Has applications in prenatal specimens	Considered in fetus with one or more significant anomalies when routine prenatal methods are negative
American College of Obstetricians and Gynecologists and The Society of Maternal-Fetal Medicine	(1) Fetuses with structural abnormalities or fetal demise, CMA replaces karyotyping (2) Structurally normal fetuses undergoing invasive testing, CMA or karyotype could be performed	Not currently recommended outside the context of clinical trials
Canadian College of Medical Genetics & Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada	(1) Normal RAD and multiple fetal abnormalities (2) Increased NT $\geq 3.5$ mm (3) Stillbirth after RAD with or without congenital anomalies	NA
Royal College of Obstetricians and Gynaecologists & The Royal College of Pathologists	(1) Fetuses with one or more structural anomalies (2) Increased NT at least 3.5 mm (3) Fetuses with sex chromosomal abnormality that is unlikely to explain the ultrasound anomalies	NA
International Society for Prenatal Diagnosis	NA	The routine use of prenatal sequencing as a diagnostic test cannot currently be supported due to insufficient validation data and knowledge about its benefits and pitfalls Currently ideally done in a research setting/protocol Case by case basis when a genetic disorder is suspected for confirmatory genetic testing by exome sequencing.
Chinese Medical Association	(1) Fetuses with one or more structural anomalies (2) Stillbirth after normal karyotype	NA

- Rendimiento diagnóstico según sistemas afectados

**Table 2.** Additional diagnostic rates of prenatal chromosomal microarray analysis over conventional karyotyping stratified by prenatal ultrasound structural abnormality

Ultrasound structural abnormality	Additional diagnostic yield of CMA <sup>a</sup>	Additional diagnostic yield of ES <sup>b</sup>
Isolated to a single anatomical system	% (positive case/cohort size)	% (positive case/cohort size)
Cardiac	4.6 (30/650)	13.9 (16/115)
Respiratory	5.5 (6/109)	0.0 (0/23)
CNS	5.7 (37/652)	12.7 (17/134)
Facial	4.3 (8/185)	10.2 (5/49)
Musculoskeletal	6.9 (25/364)	17.3 (13/75)
Gastrointestinal	5.5 (8/145)	2.0 (1/50)
Urogenital	4.8 (9/186)	23.1 (6/26)
Increased NT	1.8 (6/334)	3.2 (3/93)
Cystic hygroma	4.0 (12/300)	–
Multiple abnormalities	9.1 (104/1139)	23.7 (93/392)

# Limitaciones del CMA

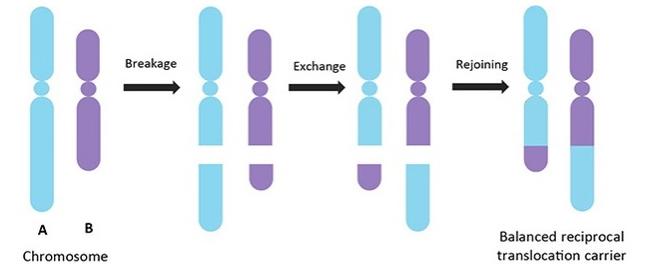
No detecta rearrreglos realmente balanceados

No detecta niveles bajos de mosaicismo (<20%)

- El SNP-array tiene mejor sensibilidad (5-10%)

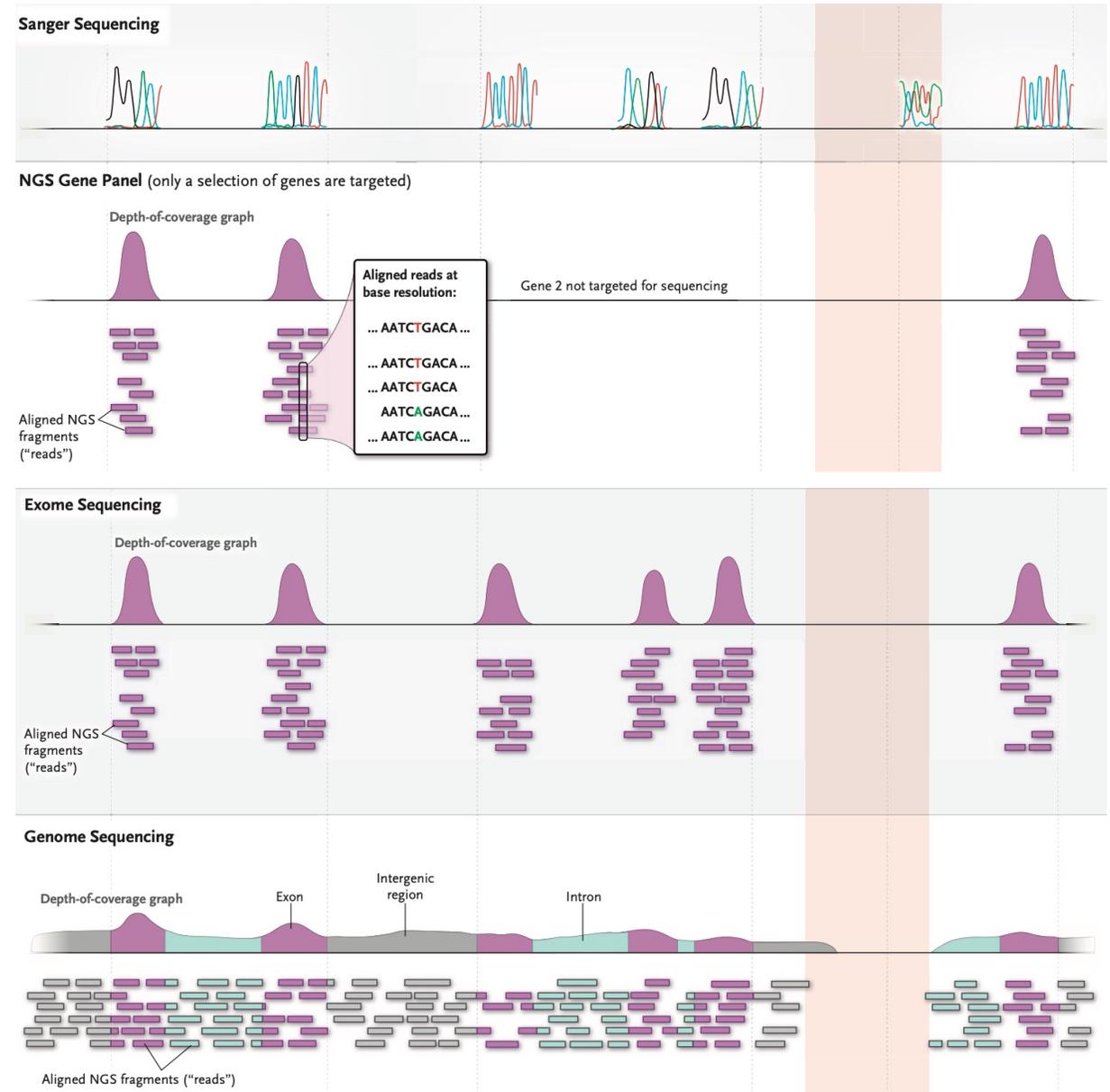
Variantes de significado incierto (VUS) 1-2%

- Interpretación desafiante de VUS en el prenatal por fenotipificación limitada
- Dificultad para los obstetras en predecir los outcome reales postnatalmente



# Secuenciación

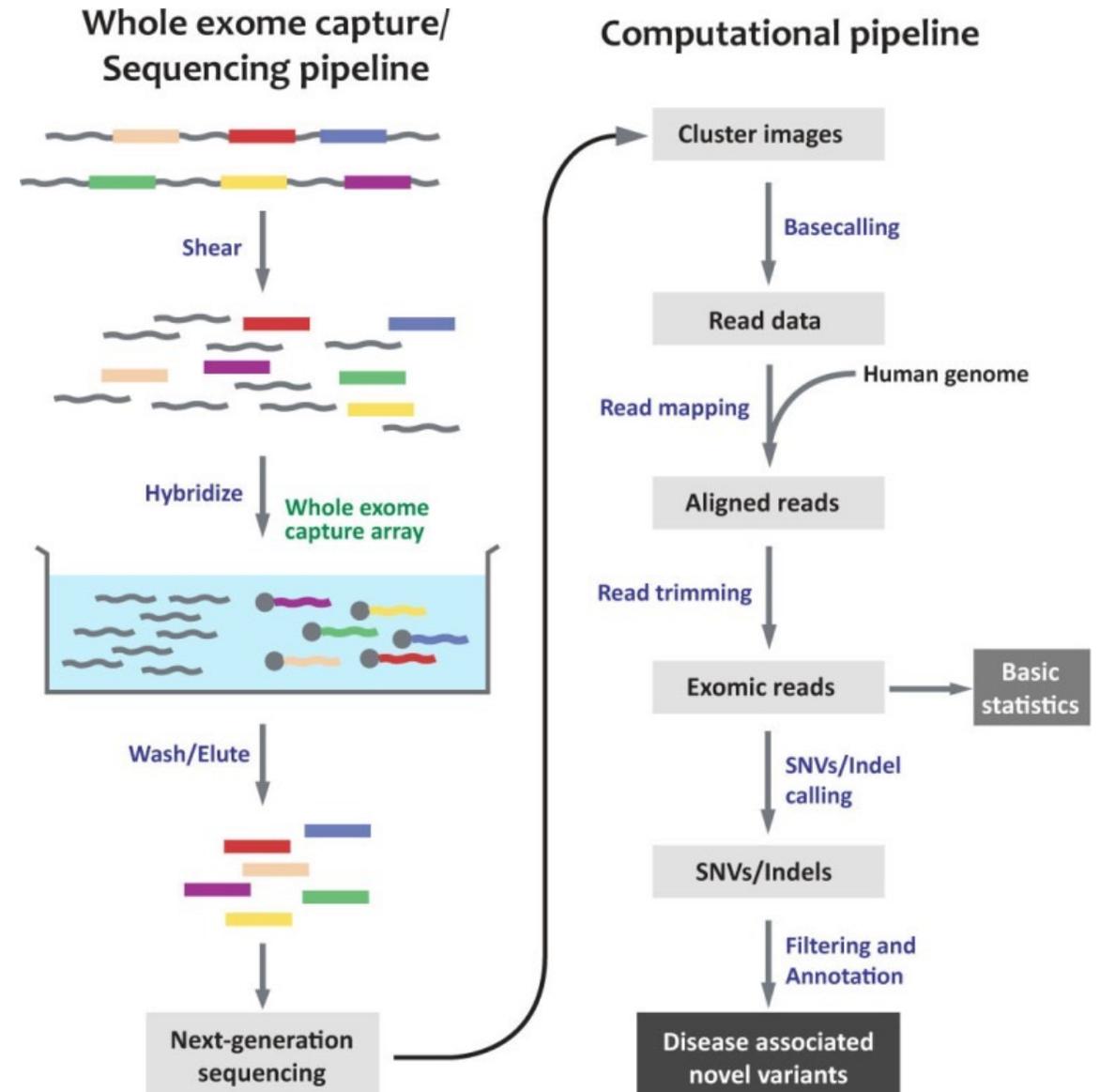
- Secuenciación de Sanger
  - SNVs
  - Secuencia fragmentos de 500-1000 pb
- NGS
  - Detección de SNVs e indels
  - Detección de CNV
  - Secuencia rápida de grandes cantidades de ADN (hasta 3.000 kb)



# Secuenciación completa de exoma (WES)

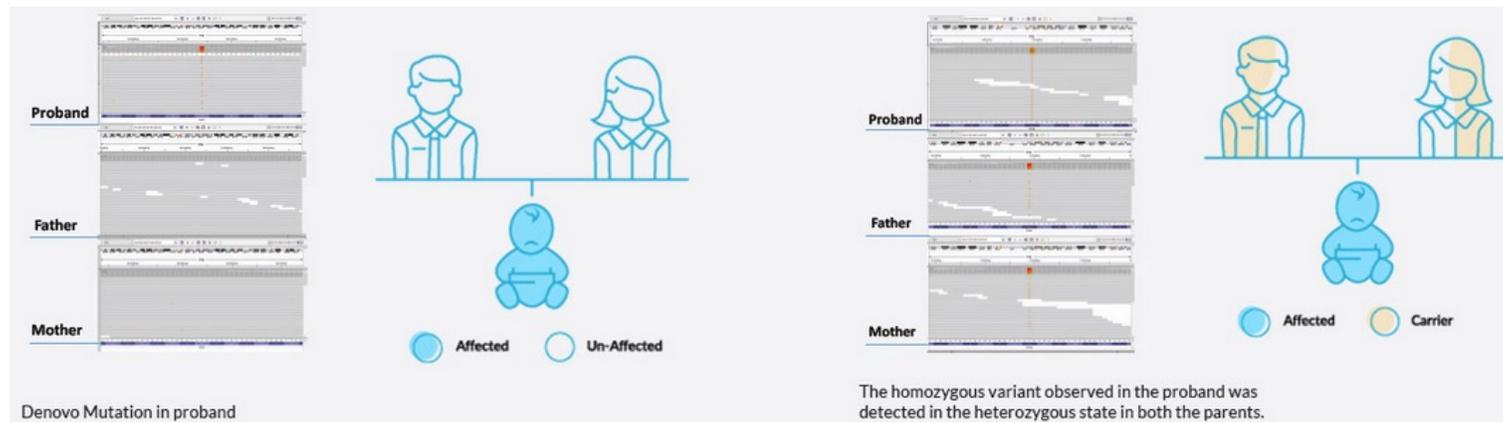
1%- 1,5% del genoma = 180.000 exones

- Es capturado selectivamente
- Detecta SNVs (variantes de nucleótido único)
- Detecta Indels (deleciones y duplicaciones de < 50 pb)
- **85% de las mutaciones causantes de enfermedad**

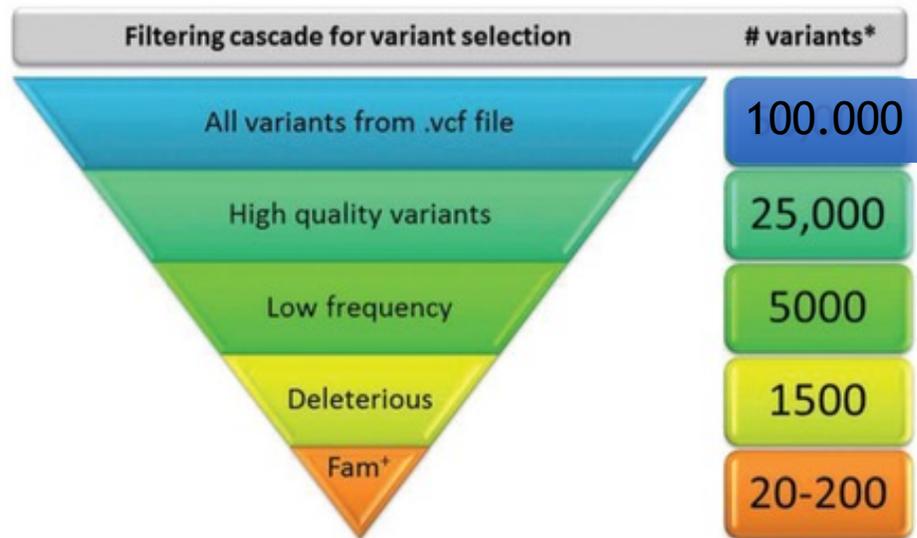


# WES probando/solo vs WES trio

- El uso de trio permite:
  - Filtrar variantes genéticas raras benignas en una familia
  - Identificar fácilmente variantes *de novo* en el probando
  - Evidenciar la fase en que están variantes de enfermedades recesivas
- En los casos en que hay padres sanos, el análisis de trio reduce 10 veces aprox. la cantidad de variantes candidatas a analizar y permite aumentar la tasa diagnóstica



- Filtrado de variantes



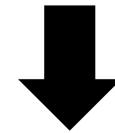
© American College of Medical Genetics and Genomics **ACMG STANDARDS AND GUIDELINES** | Genetics inMedicine

**Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology**

Sue Richards, PhD<sup>1</sup>, Nazneen Aziz, PhD<sup>2,16</sup>, Sherri Bale, PhD<sup>3</sup>, David Bick, MD<sup>4</sup>, Soma Das, PhD<sup>5</sup>, Julie Gastier-Foster, PhD<sup>6,7,8</sup>, Wayne W. Grody, MD, PhD<sup>9,10,11</sup>, Madhuri Hegde, PhD<sup>12</sup>, Elaine Lyon, PhD<sup>13</sup>, Elaine Spector, PhD<sup>14</sup>, Karl Voelkerding, MD<sup>13</sup> and Heidi L. Rehm, PhD<sup>15</sup>; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

Figure 1. Overview of the filters used to select relevant pathogenic variants from a Whole Exome Sequencing experiment.

- El WES debería ser un examen guiado por el fenotipo, ya que detecta miles de variantes cuyo filtrado y priorización depende en gran parte de la correlación con el fenotipo
- La evaluación clínica prenatal está limitada a las anomalías estructurales mayores detectadas por ecografía, siendo desconocidas las otras características clínicas y funcionales



# Limitaciones WES



No detecta rearrreglos estructurales: traslocaciones, inversiones, indels fuera del exoma

Habilidad limitada para detección de CNVs

No detecta expansiones de trinucleótidos o niveles bajos de mosaicismo

Tiempo del análisis

- Terminación del embarazo generalmente regulada por EG
- Un análisis de exoma puede demorar 2-3 semanas

Reporte de hallazgos incidentales e inconclusos

Costo

Fenotipo incompleto prenatal es un desafío para la interpretación de variantes

- Estudios han mostrado un rendimiento entre 6.2-80% de casos en poblaciones pequeñas, seleccionadas y con criterios de interpretación variables
- 2 estudios recientes a gran escala investigaron su rendimiento diagnóstico en cohortes no seleccionadas de embarazos con anomalías estructurales fetales con estudio de cariógrama- CMA negativo

### Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study

*Jenny Lord\*, Dominic J McMullan\*, Ruth Y Eberhardt\*, Gabriele Rinck, Susan J Hamilton, Elizabeth Quinlan-Jones, Elena Prigmore, Rebecca Keelagher, Sunayna K Best, Georgina K Carey, Rhiannon Mellis, Sarah Robart, Ian R Berry, Kate E Chandler, Deirdre Cilliers, Lara Cresswell, Sandra L Edwards, Carol Gardiner, Alex Henderson, Simon T Holden, Tessa Hornfray, Tracy Lester, Rebecca A Lewis, Ruth Newbury-Ecob, Katrina Prescott, Oliver W Quarrell, Simon C Ramsden, Eileen Roberts, Dagmar Tapon, Madeleine J Tooley, Pradeep C Vasudevan, Astrid P Weber, Diana G Wellesley, Paul Westwood, Helen White, Michael Parker, Denise Williams, Lucy Jenkins, Richard H Scott, Mark D Kilby†, Lyn S Chitty†, Matthew E Hurley†, Eamonn R Maher†, for the Prenatal Assessment of Genomes and Exomes Consortium†*

Lord et al.  
Estudio PAGE  
2019

610 fetos (596 trios, 14 diadas)  
Rendimiento diagnóstico 8,5%  
3,9% VUS

### Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study

*Slavé Petrovski\*, Vimla Aggarwal\*, Jessica L Giordano, Melissa Stosic, Karen Wou, Louise Bier, Erica Spiegel, Kelly Brennan, Nicholas Stong, Vaidehi Jobanputra, Zhong Ren, Xiaolin Zhu, Caroline Mebane, Odellia Nahum, Quanli Wang, Sitharthan Kamalakaran, Colin Malone, Kwame Anyane-Yeboah, Russell Miller, Brynn Levy, David B Goldstein†, Ronald J Wapner†*

Petrovski et al.  
2019

234 trios  
Rendimiento 10.3%

- 
- Revisión sistemática que demuestra un rendimiento diagnóstico mediante NGS de un **29%** de los casos de **hidrops fetal no inmune (NIHF)**, siendo mayor en aquellos casos asociados a otras anomalías
  - Principalmente en
    - NIHF aislada en rasopatías: 47,8%
    - Desórdenes musculoesqueléticos: 14,6%
    - Errores innatos del metabolismo: 12,4%

**ULTRASOUND**  
in Obstetrics & Gynecology



Systematic Review

**Fetal hydrops and the Incremental yield of Next generation sequencing over standard prenatal Diagnostic testing (FIND) study: prospective cohort study and meta-analysis**

F. Mone ✉, R. Y. Eberhardt, M. E. Hurles, D. J. McMullan, E. R. Maher, J. Lord, L. S. Chitty, E. Dempsey, T. Homfray, J. L. Giordano, R. J. Wapner, L. Sun, T. N. Sparks, M. E. Norton, M. D. Kilby

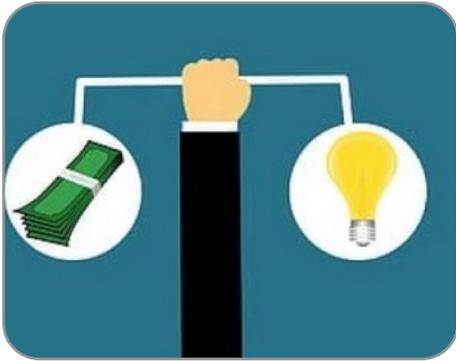
First published: 13 April 2021 | <https://doi.org/10.1002/uog.23652>

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/uog.23652.

# Recomendaciones y consideraciones para WES

**Table 1.** Recommendations for prenatal chromosomal microarray and exome sequencing by various professional bodies/societies

Professional body	Recommendations for CMA	Recommendations for ES
American College of Medical Genetics and Genomics	(1) Has applications in prenatal specimens	Considered in fetus with one or more significant anomalies when routine prenatal methods are negative
American College of Obstetricians and Gynecologists and The Society of Maternal-Fetal Medicine	(1) Fetuses with structural abnormalities or fetal demise, CMA replaces karyotyping (2) Structurally normal fetuses undergoing invasive testing, CMA or karyotype could be performed	Not currently recommended outside the context of clinical trials
Canadian College of Medical Genetics & Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada	(1) Normal RAD and multiple fetal abnormalities (2) Increased NT $\geq 3.5$ mm (3) Stillbirth after RAD with or without congenital anomalies	NA
Royal College of Obstetricians and Gynaecologists & The Royal College of Pathologists	(1) Fetuses with one or more structural anomalies (2) Increased NT at least 3.5 mm (3) Fetuses with sex chromosomal abnormality that is unlikely to explain the ultrasound anomalies	NA
International Society for Prenatal Diagnosis	NA	The routine use of prenatal sequencing as a diagnostic test cannot currently be supported due to insufficient validation data and knowledge about its benefits and pitfalls Currently ideally done in a research setting/protocol Case by case basis when a genetic disorder is suspected for confirmatory genetic testing by exome sequencing.
Chinese Medical Association	(1) Fetuses with one or more structural anomalies (2) Stillbirth after normal karyotype	NA



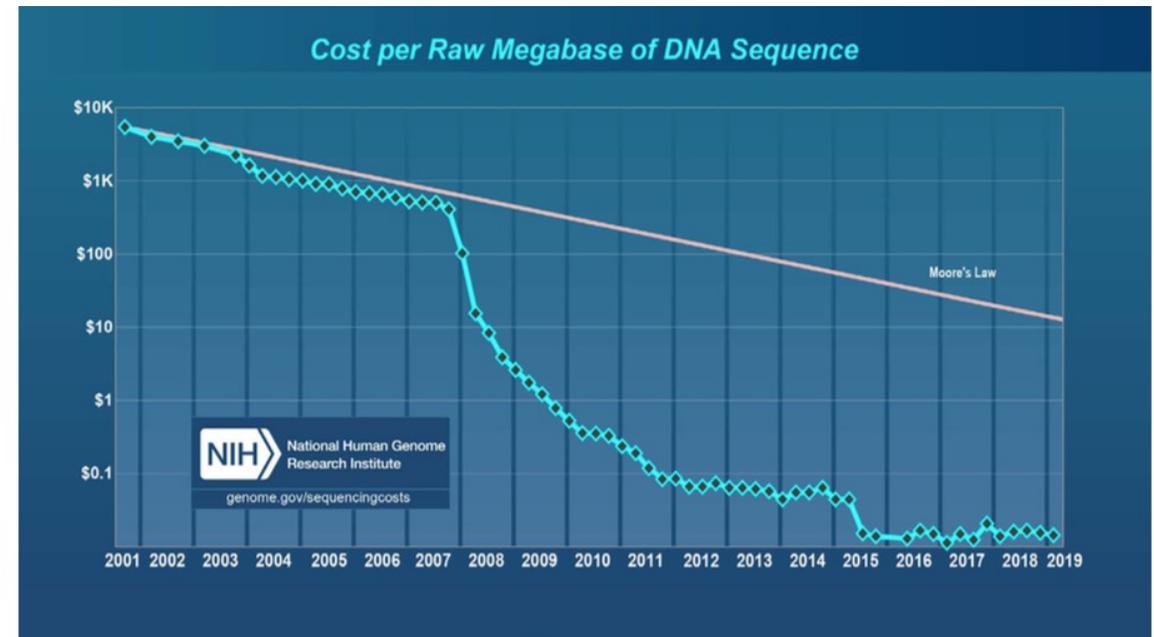
Se necesitan más estudios para determinar la utilidad clínica y costo-eficacia de la implementación clínica de WES



Su mejor rendimiento sería si es dirigido a grupos en donde el fenotipo fetal muestra una fuerte sospecha de desórdenes mendelianos (Ej: displasias esqueléticas o rasopatías)

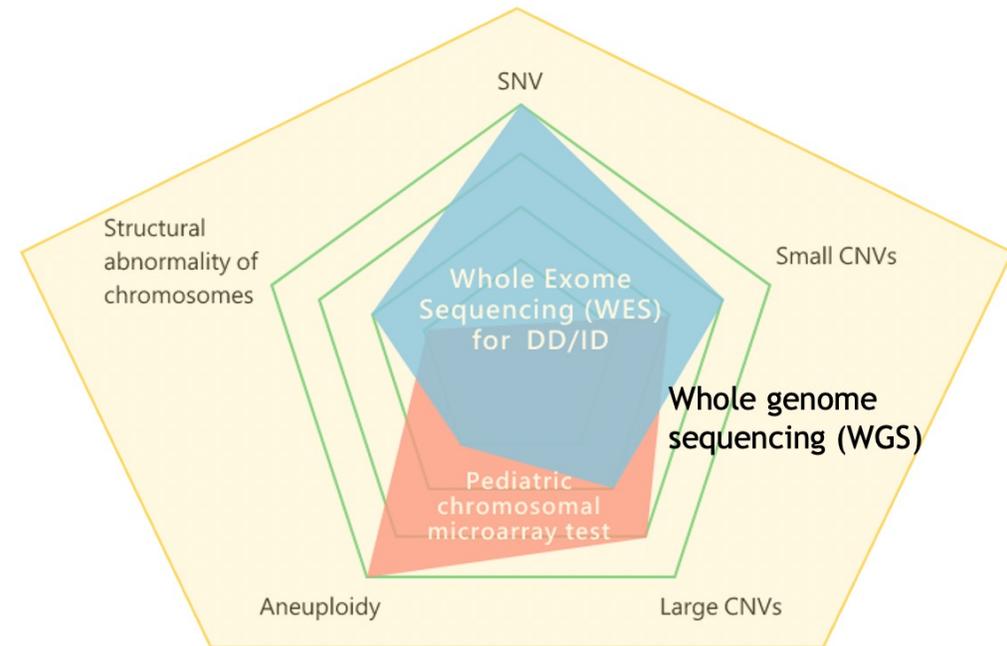
- Esto evitaría los grupos en donde el rendimiento es bajo y disminuiría las probabilidades de detectar VUS

- 
- En los últimos años ha ocurrido una disminución drástica de los costos de secuenciación con el desarrollo de nuevas tecnologías y su masificación



# Secuenciación completa de genoma (WGS)

- La **secuenciación completa de genoma** ha demostrado su utilidad para
  - ✓ Detectar variantes patogénicas codificantes y no codificantes
  - ✓ Rearreglos estructurales como traslocaciones, inversiones e inserciones
  - ✓ Tiene una mejor resolución que el CMA para detectar CNVs



# Desde Chile

---

- Extracción de ADN o sangre de cordón en papel filtro para envío de muestra a laboratorio en el extranjero previo asesoramiento genético, consentimiento informado y presentación de caso al laboratorio
  - A través de intermediarios
  - Directamente desde hospital



CG002610640 This form is processed by machine. Please use black letters and write clearly. CentoCard®

**PATIENT INFORMATION**

First Name: DOE

Last Name: JACK

Gender:  Male  Female Date of Birth: 16 / 07 / 2010 (DDMMYYYY)

**PHYSICIAN INFORMATION**

Physician First Name: RICHARD

Physician Last Name: ROE

E-mail: SAMPLE@EMAIL.COM

Affiliation: HOSPITAL FOR CHILDREN

Street / Number: 456 MAIN STREET

City: ANYTOWN ZIP Code: 81123456

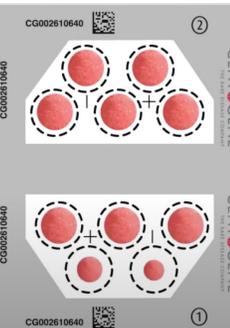
Country: BRAZIL

CG002610640

CG002610640

CG002610640

CG002610640



CENTOGENE

# Conclusiones

---



- El objetivo del diagnóstico prenatal es identificar una causa genética del fenotipo clínico para guiar la toma de decisiones
- Actualmente en Chile las pruebas prenatales están limitadas al cariógrama
- La cantidad de exámenes prenatales disponibles aumenta cada día en conjunto con la necesidad del conocimiento por parte de los clínicos de estas
- Las tecnologías de secuenciación son un campo emergente con potencial de aumentar el rendimiento diagnóstico en fetos con anomalías estructurales o sospecha de enfermedad monogénica, después de que las pruebas convencionales han fallado en dar un diagnóstico
- Es esencial el **asesoramiento pre y post-test** informando a los pacientes de los beneficios, limitaciones, resultados, potencial de identificar variantes inciertas, no-paternidad, consanguinidad y hallazgos

## PROPUESTA DE PLAN NACIONAL DE ENFERMEDADES RARAS, HUÉRFANAS O POCO FRECUENTES



Enfermedades raras son uno de los objetivos sanitarios de la Estrategia Nacional de Salud de la década 2021-2030

La misión del Plan Nacional de Enfermedades Raras, Huérfanas o Poco Frecuentes es desarrollar acciones destinadas al abordaje integral de dichas enfermedades, en consideración a sus necesidades, preferencias, la mejor evidencia científica disponible y las determinantes sociales de estas, articulando los distintos niveles de atención e intersectorialidad, para garantizar el otorgamiento de atenciones de salud efectivas y oportunas, y satisfacer todas las necesidades de las personas con dichas enfermedades

<p><b>Estrategia de intervención</b></p>	<p>Promoción de estrategias de salud pública y programas específicos.</p>
<p><b>Iniciativas</b></p>	<p>3.1. Implementación de screening neonatal ampliado, a través de la reactivación del Plan Piloto de Pesquisa Neonatal para 26 condiciones iniciado en el año 2017 en el Hospital San Juan de Dios en conjunto con el INTA</p> <p>3.2. Creación de una Comisión Nacional de trastornos innatos del metabolismo que evalúe permanentemente nuevas condiciones a ser incorporadas y los resultados de aquellas que han sido incorporadas, así como optimizar de forma continua su funcionamiento.</p> <p>3.3. Otorgar garantías de acceso y oportunidad para la entrega de prestaciones de asesoramiento genético de personas con ER- EPOF-EH y a sus familiares de primer grado de consanguinidad o familiares pertinentes.</p> <p>3.4. Incorporación de especialistas (genetistas clínicos, asesores genéticos, profesionales de la salud capacitados) en procesos de diagnóstico prenatal para asesoramiento genético.</p>



---

---

Muchas Gracias