

**CERPO**

**Centro de Referencia Perinatal Oriente**

Facultad de Medicina, Universidad de Chile



# **Seminario n°2: FISH, MLPA, Array CGH Técnica y aporte de su uso prenatal**

Dra. Paulina Vega Carrillo

Dra. Catherine Diaz Sanhueza

Programa especialización Obstetricia y Ginecología

Universidad de Concepción

# Introducción



- En la última década, con el impulso del Proyecto Genoma Humano, han surgido avances tecnológicos que permiten analizar todo el genoma de una forma más rápida, de manera simultánea y con gran capacidad de resolución.
- La segunda causa de mortalidad infantil en Chile, que causa el **38%** de todas las muertes infantiles, son las malformaciones congénitas .

# Utilidad general de estos exámenes genéticos



1. Exámenes con consejería pre test, post test.
2. Hacer consejería, de familia .
3. Reducir la ansiedad en parejas con riesgo elevado de tener hijos con anomalías congénitas.
4. Tomar decisiones con respecto a acogerse a ley IVE y poder constituir segunda causal.
5. Contacto con fundaciones a nivel mundial.
6. En Chile exámenes con convenio FONASA.

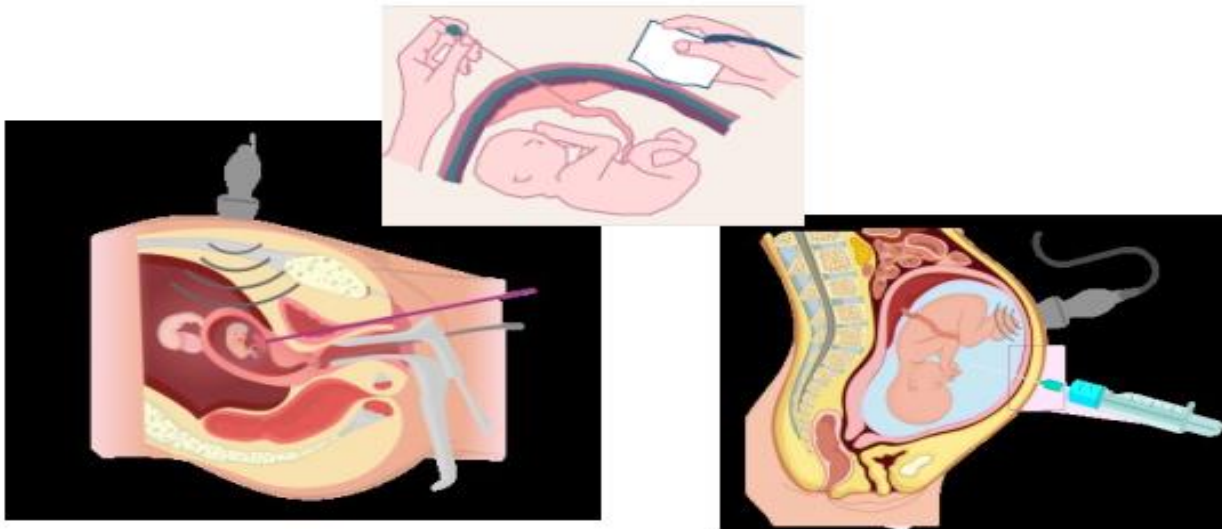


# Objetivos de estudios genéticos

- En cada caso se deberá escoger un test específico basándose en :
  - La sospecha diagnóstica.
  - La aceptación de la gestante en función de su riesgo individual y de sus preferencias.

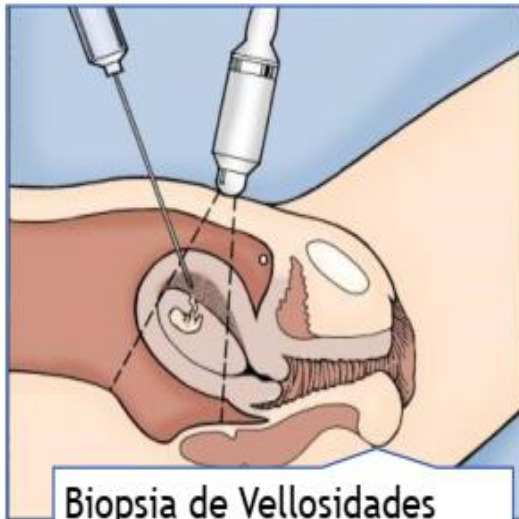
# Test genéticos

## Diagnósticos / Invasivos



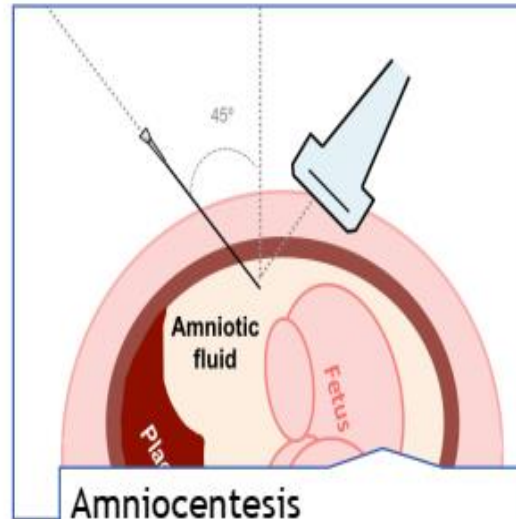
Cariograma / FISH  
QF - PCR  
MLPA  
Array CGH  
Exoma / Genoma

# Procedimientos invasivos



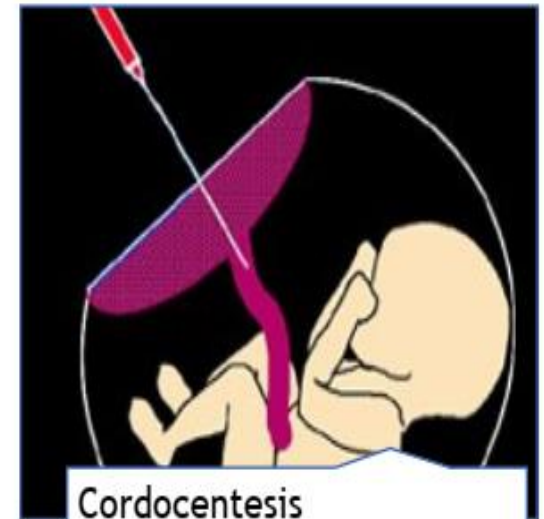
**Biopsia de Vellosidades coriales (BVC)**

- Desde la semana 10-11



**Amniocentesis**

- Desde la semana 15-16



**Cordocentesis**

- Desde las 16-20 semanas

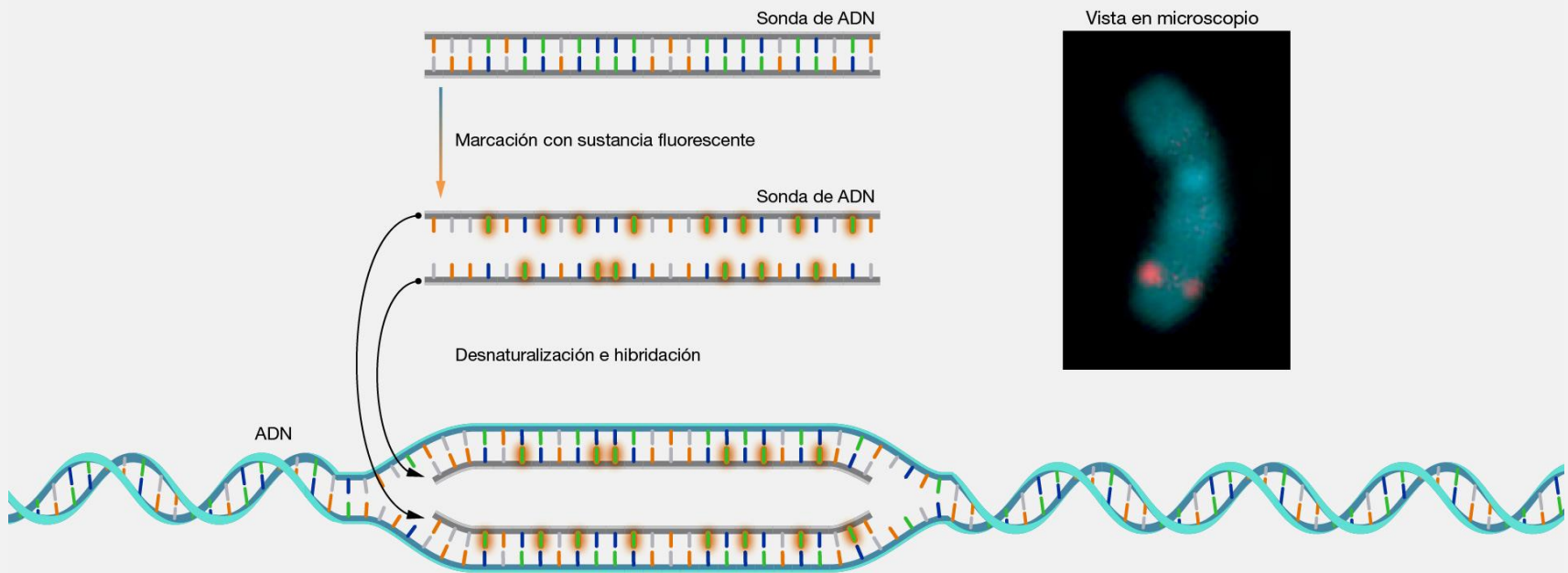
# Técnica FISH: Definición



- La hibridación fluorescente in situ (FISH) es una técnica de laboratorio que se usa para detectar y localizar una secuencia de ADN específica en un cromosoma.
- En esta técnica, el conjunto total de cromosomas de una persona se fija en un portaobjetos de vidrio y luego se expone a una “sonda”, una pequeña cantidad de ADN purificado marcado con una sustancia fluorescente.
- La sonda marcada con la sustancia fluorescente halla su secuencia correspondiente en el conjunto de cromosomas y se une a ella. Con el uso de un microscopio especial, se puede ver el cromosoma y la ubicación subcromosómica donde se unió la sonda fluorescente.

National human genome research institute

# Técnica FISH: Definición





# Técnica FISH: Estudio citológico

-La técnica de hibridación in situ Fluorescente (FISH), está disponible para un número limitado de patologías.

**-El análisis mediante sondas FISH se puede realizar en núcleos interfásicos, si hay suficientes células, o en cromosomas metafásicos tras un cultivo celular.**

**-El estudio FISH se ha utilizado en diagnóstico prenatal con 3 finalidades principales.**



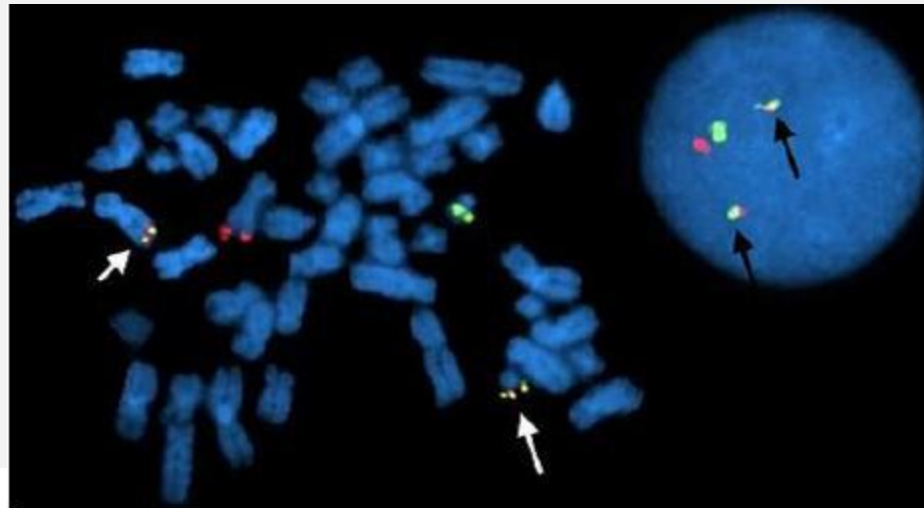


# Técnica FISH: estudio citológico

1. Caracterización cromosómica: útil ante el hallazgo de reorganizaciones cromosómicas o de cromosomas marcadores (de origen desconocido). Actualmente sustituido por el Array.
2. Estudio de microdeleciones: se ha utilizado para alteraciones específicas, como el síndrome de DiGeorge (del22q11.2) o el síndrome de Williams (del7q11.23). Cada microdelección requiere de una sonda específica. Está siendo reemplazado en la actualidad por el Array, a excepción de los estudios parentales.
3. Diagnóstico rápido de aneuploidías típicas con la utilización de una sonda para cada uno de los siguientes cromosomas 13,18,21, X e Y sobre núcleos interfásicos sin cultivar.

# Técnica FISH

- Diagnóstico rápido de aneuploidías: cromosomas 13.18.21, X e Y.
- Resolución 40-250 Kb
- Detección de mosaicismo >5% aprox.



**Características del diagnóstico prenatal por hibridación fluorescente  
*in situ* en Cuba**

Features of the prenatal diagnosis by fluorescence *in situ* hybridization  
in Cuba

**Revista Cubana de Pediatría. 2020;**



- Los motivos de indicación también variaron, los más frecuentes fueron aquellos asociados a alteraciones fetales detectadas por ultrasonido que hacían sospechar una anomalía cromosómica.

# Características del diagnóstico prenatal por hibridación fluorescente *in situ* en Cuba

Features of the prenatal diagnosis by fluorescence *in situ* hybridization  
in Cuba

**Revista Cubana de Pediatría. 2020;**



**Tabla 2** – Asociación entre los motivos de indicación para la prueba FISH, los períodos de gestación con mayor número de muestras analizadas y los casos positivos detectados

Motivo de indicación del estudio prenatal por FISH	No. (%)	Semanas de embarazo (16-19)	Semanas de embarazo (22-25)	Aberraciones detectadas prenatalmente por FISH						Total casos positivos No. (%)
		No. (%)	No. (%)	T- 21	T-18	T- 13	Gonosomas	Del.* 22q11.2	Marca-dor	
Anomalías ultrasonido	337 (55,0)	68 (20,0)	177 (52,2)	15	10	5	4	-	-	34 (68,0)
Avanzada edad materna	233 (38,0)	100 (43,2)	43 (18,4)	7	-	-	2	-	-	9 (18,0)
Ansiedad materna	5 (1,0)	5 (100,0)	-	1	-	-	-	-	-	1 (2,0)
Corroborar resultados	12 (1,9)	7 (58,3)	5 (41,7)	3	-	-	-	-	1	4 (8,0)
Antecedente familiar	25 (4,0)	25 (100,0)	-	-	-	-	-	2	-	2 (4,0)
Total	612 (100,0)	205 (33,4)	225 (36,7)	26	10	5	6	2	1	50 (100,0)

\*Delección.



# Técnica MLPA

**-EI MLPA** (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) es un método reciente, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de cuantificación relativa del número de copias normales y anormales de (ADN) de hasta 40 secuencias genómicas diferentes. Su uso se ha difundido tanto en la investigación como en el diagnóstico clínico.

-No requiere células vivas o en cultivo celular a diferencia del FISH.

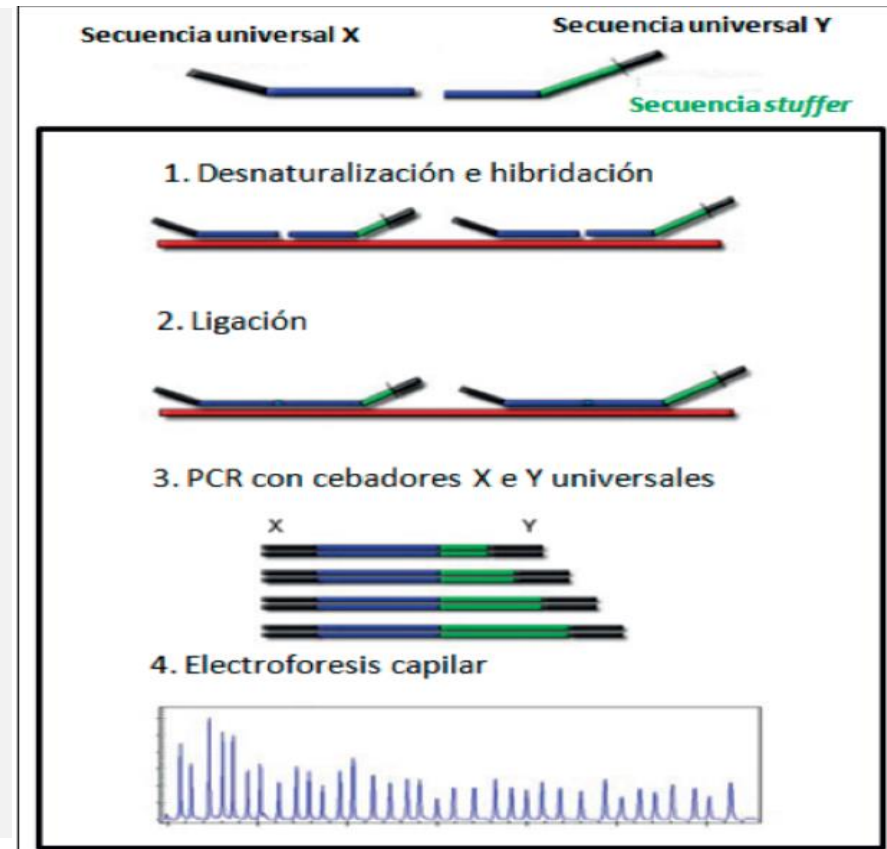
-Permite diagnosticar microdeleciones y microduplicaciones de hasta 1 exón. (parte de ARN que codifica para proteínas)

**-Objetivo:** Presentar los primeros resultados obtenidos con MLPA en el diagnóstico perinatal de las principales aneuploidías de los cromosomas 13, 18, 21, X y Y.

# Técnica MLPA



- El ADN se desnaturaliza y se incuba con la mezcla de sondas.
- Los dos oligonucleótidos de cada sonda reconocen secuencias de ADN contiguas, y sólo cuando ambos se unen perfectamente a estas secuencias, pueden ser ligados por la ligasa y posteriormente amplificados.
- La amplificación por PCR, se lleva a cabo por cebadores .
- Sólo las sondas que están ligadas serán amplificadas.
- Estas últimas sondas tienen una secuencia stuffer .
- Cada sonda MLPA distinta (específica de regiones objetivo distintas) genera un amplicón con una longitud única que se separa y cuantifica mediante electroforesis capilar.





# MLPA en Chile



Sistema de Información de Exámenes, SINFEX

## 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.





## Research Letter

## Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of a proximal deletion of 22q (22q11.2 → q11.21)

Chih-Ping Chen <sup>a,b,c,d,e,f,g,\*</sup>, Tsang-Ming Ko <sup>h</sup>, Yi-Ning Su <sup>i</sup>, Jun-Wei Su <sup>b,j</sup>, Yu-Ting Chen <sup>c</sup>,  
Chen-Chi Lee <sup>b</sup>, Li-Feng Chen <sup>b</sup>, Wayseen Wang <sup>c,k</sup>

El diagnóstico prenatal de delección 22q proximal que involucre la región 22q11.2 debería levantar sospechas de síndrome de Di George y síndrome velocardiofacial. Se sugiere que aCGH, FISH y MLPA son útiles herramientas para la exclusión rápida de DGS/VCFS bajo tales circunstancias. El síndrome de delección del cromosoma 22q11.2, que incluye DGS( Síndrome de Di George), velocardiofacial y síndrome facial de anomalía conotruncal , pueden ser causado por una delección hemicigota de 1.5w3.0-Mb del cromosoma 22q11.2 y está asociado con un fenotipo altamente variable.

# Técnica Array CGH (CMA)



- El Array cromosómico (CMA), también conocido como array CGH (Hibridación Genómica Comparada).
- La técnica array-CGH analiza el genoma completo de un individuo en busca de ganancias o pérdidas de material genético, dicho de otra forma, el array-CGH permite identificar duplicaciones o ausencias de pequeñas regiones cromosómicas que el cariotipo no alcanza a detectar.

# Técnica Array CGH



El uso de esta herramienta en el ámbito clínico permite la identificación de desequilibrios genómicos submicroscópicos con una resolución de hasta 50 kb, lo que equivale a cientos de veces mayor resolución que un cariotipo con bandeado GTG convencional. Los desequilibrios de tamaño submicroscópico y que resultan en pérdidas o ganancias de información genética sobre 1 kb son denominados variaciones en el número de copias (CNV, por sus siglas en inglés).

Los CNV son parte de la variabilidad interindividual, son relativamente comunes en la estructura de nuestros genomas y no necesariamente se asocia a una patología.

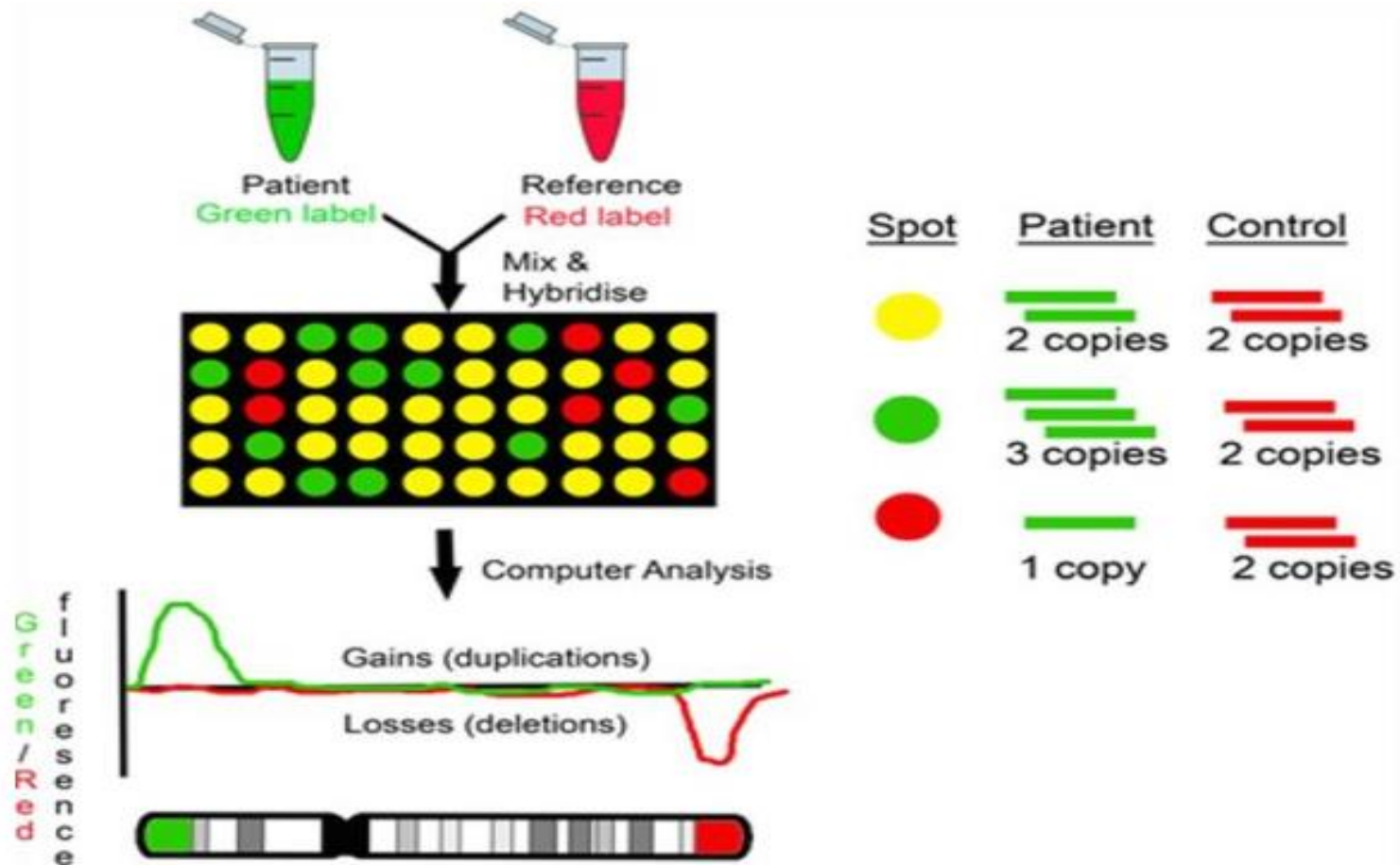
Guillermo Lay-Son R.1,2,\* , Luis León P.1 1. Centro de Genética y Genómica, Clínica Alemana–Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile. 2. Hospital Padre Hurtado, San Ramón, Santiago, Chile.



# Técnica Array CGH: Paso a paso

1. El ADN problema es marcado fluorescentemente en color verde. En paralelo un ADN control (sin ningún tipo de alteración cromosómica) se marca en color rojo.
2. La mezcla de ambos marcajes fluorescentes se hibrida contra un “chip” de ADN. Este chip o array contiene una colección de moléculas de ADN que barren todo el genoma humano.
3. El resultado de la hibridación es analizado por un scanner. Cuando el contenido de ADN es normal el scanner detectará color amarillo que es suma de los colores rojo y verde. En cambio si una determinada región cromosómica se encuentra en exceso o defecto el scanner detectara el color verde o rojo respectivamente.

# Técnica Array CGH





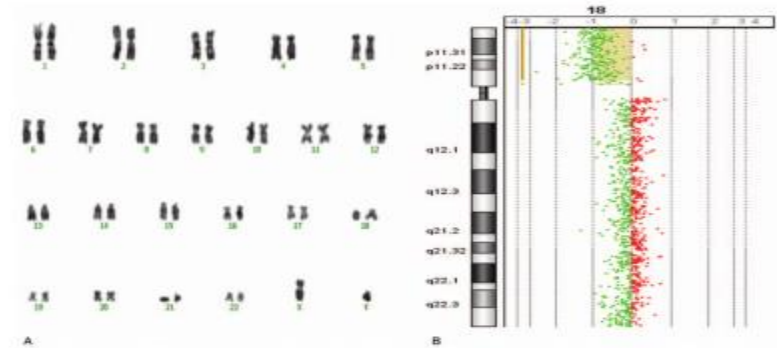
# Ventajas Array

- **Ventajas del diagnóstico con Array:**

Si bien existen diferentes metodologías que permiten realizar un Array, que se diferencian en la plataforma tecnológica utilizada y en el nivel de resolución alcanzado, la técnica ha permitido reconocer enfermedades genéticas causadas por variaciones en el número de copias, que no son fácilmente detectadas con los métodos anteriormente descritos, lo que aumenta la capacidad diagnóstica y la descripción de nuevos síndromes.

# Array CGH

- La interpretación de las variaciones en el número de copias, 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 inMedicine

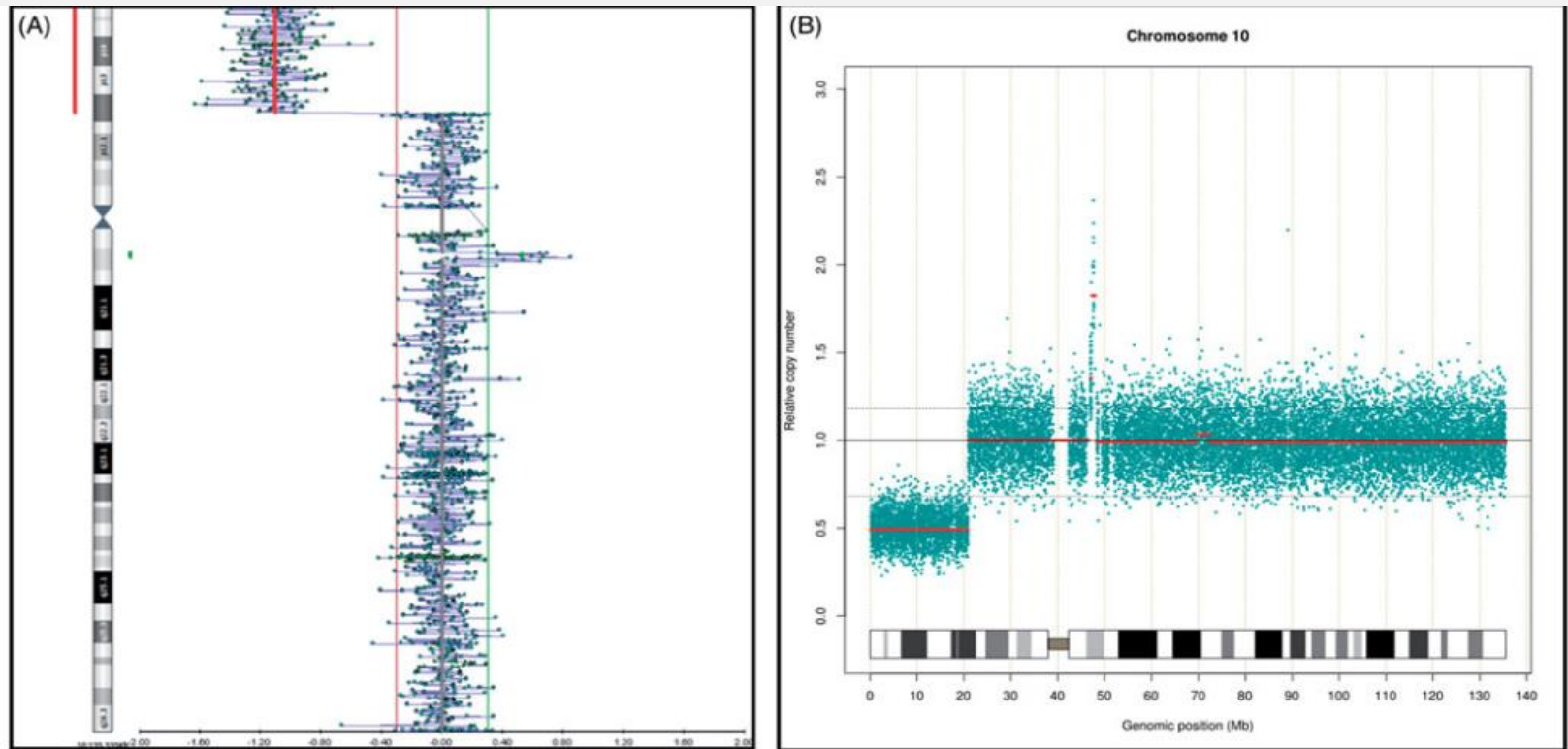
**Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)**

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>5,11</sup> and Christa Lese Martin, PhD<sup>1</sup>



# An alternative to array-based diagnostics: a prospectively recruited cohort, comparing arrayCGH to next-generation sequencing to evaluate foetal structural abnormalities

Lesley Walker, Christopher M. Watson, Sarah Hewitt, Laura A. Crinnion, David T. Bonthron & Kelly E. Cohen



Muestra (A) una deleción terminal heterocigota del brazo p del cromosoma 10 del software BlueFuse Multi. (B) La eliminación correspondiente según lo detectado por el flujo de trabajo de CNVseq.



**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



# Recomendaciones y consideraciones en diagnóstico prenatal.

- En presencia de un cariotipo 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 cariotipo para diagnosticar aneuploidías y las variaciones en el número de copias en mortinatos o productos de concepción.

# Limitaciones Array CGH



1. No detecta rearrreglos realmente balanceados
  2. No detecta niveles bajos de mosaicismo (<20%)
  3. Variantes de significado incierto (VUS) 1-2%
- 
- Interpretación desafiante de VUS prenatal por fenotipificación limitada.
  - Dificultad para los obstetras en predecir los outcome reales postnatalmente.

Chau MHK, Choy KW. The role of chromosomal microarray and exome sequencing in prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2021 Apr 1;33(2):148-155.

# Comparación entre distintos métodos



Tabla 1. Comparación de los diferentes métodos de diagnóstico citogenético

	Nivel de resolución estándar	Cobertura	Anomalías detectables
Cariograma estándar con bandeado GTG	> 5-10 Mb	Genoma nuclear completo	Anomalías cromosómicas numéricas (poliploidías, aneuploidías); anomalías cromosómicas estructurales (inversiones, translocaciones, deleciones, etc.)
FISH metafase	> 2-5 Mb	Locus específico	Rearreglos genómicos submicroscópicos (microdeleciones, microduplicaciones, translocaciones)
FISH interfase	> 40-150 kb	Locus específico	Rearreglos genómicos submicroscópicos (microdeleciones, microduplicaciones, translocaciones)
MLPA	> 1 pb	Locus específico	Rearreglos genómicos muy pequeños (microdeleciones, microduplicaciones)
CMA	> 50 kb	Genoma nuclear completo	Rearreglos genómicos submicroscópicos (microdeleciones, microduplicaciones)

Guillermo Lay-Son R.1,2,\*, Luis León P.1 1. Centro de Genética y Genómica, Clínica Alemana– Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile. 2. Hospital Padre Hurtado, San Ramón, Santiago, Chile.

# Phenotype to genotype characterization by array-comparative genomic hybridization (a-CGH) in case of fetal malformations: A systematic review



El objetivo de la revisión actual es informar las anomalías de a-CGH identificadas en fetos con malformaciones en quienes se diagnosticó un cariotipo normal con análisis citogenético convencional. Se ha realizado una búsqueda electrónica sistemática de bases de datos (PubMed/Medline, EMBASE/SCOPUS) desde el inicio hasta mayo de 2017

# Phenotype to genotype characterization by array-comparative genomic hybridization (a-CGH) in case of fetal malformations: A systematic review

Gabriele Tonni <sup>a, \*</sup>, Marcella Palmisano <sup>a</sup>, Ana Cristina Perez Zamarian <sup>b</sup>, Ana Carolina Rabachini Caetano <sup>b</sup>, Eduardo Félix Martins Santana <sup>b</sup>, Alberto Borges Peixoto <sup>b</sup>, Edecio Armbruster-Moraes <sup>c, d</sup>, Rodrigo Ruano <sup>e</sup>, Edward Araujo Júnior <sup>b</sup>

Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology 58 (2019) 15–28



**Table 1**

Microarray results in cases of central nervous system (CNS), cranial, facial malformation with conventional karyotype and pregnancy outcomes in relation to maternal age (MA) and gestational age (GA) at diagnosis. (Legend: ACC: agenesis of the corpus callosum, Chr: chromosome; CL/CLP: cleft lip/cleft lip and palate, CPCs: choroid plexus cysts, CT-scan: computed tomography, MRI: magnetic resonance imaging, NR, not reported, SUA: single umbilical artery, PDA: patent ductus arteriosus, SHH, sonic hedge hog; TOP: termination of pregnancy).

Ref. number (yr.)	Case	MA	GA	Karyotype	Microarray result (CNVs)	Gain or Loss size (Mb)	Pregnancy outcome
Ref. [15] (2015)	Case 1: Holoprosencephaly	NR	23w	Normal	arr 7q36 del (155,473,296–158,909,738) × 1 encompassing the sonic hedgehog (SHH) gene	3.44 del at 7q36	TOP
Ref. [15] (2015)	Case 2: Hydrocephaly	NR	22w	Normal	arr 22q11.21 (18,648,855–21,800,471) × 3 dupl, including TBX1 gene	3.15 dupl at 22q11	TOP
Ref. [15] (2015)	Case 5: Holoprosencephaly, cleft lip and cleft palate (CL/CLP)	NR	23w	Normal	arr 2p21 del (44,749,075–45,098,283) × 1 which harbors SIX3 gene	0.34 del at 2p21	TOP
Ref. [15] (2015)	Case 6: Exencephaly	NR	21w	Normal	arr 19p12p13.11 del (19,838,485–23,868,512) × 1	4.03 del at 19p12p13.11	TOP
Ref. [16] (2014)	Case G4: Holoprosencephaly, flat face and nasal bridge	NR	16w	45,XX,der(15)t(15;18)(q10;q10)	arr 18p11.32p11.21 <i>de novo</i>	14 dupl at 18p11	NR
Ref. [17] (2013)	Case 17: Bilateral ventriculomegaly	NR	NR	46,XY,del(1)(p36.3)dn	arr 1p36.33p36.32(RP5-857k21-RP11-333E3) × 1 <i>de novo</i> 1p36 microdeletion syndrome	NR del at 1p36	TOP
Ref. [17] (2013)	Case 24: Agenesis of the corpus callosum (ACC) and meningocele	NR	NR	Normal	arr 5q35.3 (RP11-281O15- > RP11-99H18) × 1 mat	del of 1.9 and dupl of 1.1	Vaginal delivery, admitted to SCBU, anomalies confirmed.
Ref. [18] (2013)	Microcephaly, ventriculomegaly, abnormal sulcal development with the absence of gyri and sulci and a shallow sylvian fissure. Fetal MRI confirmed corpus callosum dysgenesis and lissencephaly. Extracranial finding: single umbilical artery (SUA).	40yr	31w	46,XX del(17)(p13.3)	arr [hg19] 17p13.3 (0-3,165,530) × 1 mat (qPCR) (Miller-Dieker lissencephaly syndrome)	3.17 del at 17p13	Stillbirth at 32 weeks of gestation. Type of delivery: NR
Ref. [19] (2013)	Ventriculomegaly	NR	34w	46,XX,r(6)(p25;q27)	arr 6p25.3 del arr 6q26.27 del	1.3 del 6p25.3; 6.7 del 6q25-27	TOP at 38w
Ref. [20] (2012)	Case 1: Hypertelorism, epicanthic folds, depressed nasal bridge, long philtrum and low-set ears	35yr	17w	47,XX,r(2)(p11.1q21.2) [14]/46,XX; Interphase FISH revealed a mosaic level of 52%	Gain in chromosome 2 encompassing 2q11.2/q21.2; a small supernumerary marker chromosome derived from ring chromosome 2	39.4 dupl at 2q11.2/q21.2	TOP: GA not reported (NR)
Ref. [21] (2012)	Case 42: Lissencephaly	NR	NR	Normal	arr 17p13.3(RP11-629C16 → CTD-2386E6) × 1 <i>de novo</i>	2.1 del at 17p13	NR
Ref. [22] (2011)	Ventriculomegaly, oligohydramnios	NR	NR	Normal	arr 17q22-q23.1 (chr17:53,072,536–56,612,662, hg18) including genes from MSI2 to BCAS3	3.54 del at 17q22-q23.1	TOP
Ref. [23] (2009)	Case 1: Holoprosencephaly	20yr	NR	46,XX FISH: unbalanced translocation t(7;8)	arr7q36.1q36.3(151,071,240–158,788,150) × 1 pat, 8q24.3(141,793,142–146,236,298) × 3 pat Partial monosomy 7q (deletion SHH); Partial trisomy 8q	del at 7.6 7q36.1q36.3; dupl at 4.4 of 8q24.3	NR
Ref. [23] (2009)	Case 5: Holoprosencephaly	22yr	NR	46,XX	arr 14q12q21.1(28,168,333–37,866,321) × 1 <i>de novo</i> interstitial del Partial monosomy 14q encompassing HPEB region	9.7 del at 14q12.21.1	NR
Ref. [24] (2006)	Case 1: Borderline ventriculomegaly	38yr	18w	Interstitial deletion at the long arm of 1 chromosome 2	arr 2q14.2-2q21.3 <i>de novo</i> interstitial del	NR	At 5 months, the infant had febrile convulsions, atrophy of the left, undescended testis and developmental delay.

(continued on next page)



# Phenotype to genotype characterization by array-comparative genomic hybridization (a-CGH) in case of fetal malformations: A systematic review

Gabriele Tonni <sup>a, \*</sup>, Marcella Palmisano <sup>a</sup>, Ana Cristina Perez Zamarian <sup>b</sup>, Ana Carolina Rabachini Caetano <sup>b</sup>, Eduardo Félix Martins Santana <sup>b</sup>, Alberto Borges Peixoto <sup>b</sup>, Edecio Armbruster-Moraes <sup>c, d</sup>, Rodrigo Ruano <sup>e</sup>, Edward Araujo Júnior <sup>b</sup>

Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology 58 (2019) 15–28



**Table 1**

Microarray results in cases of central nervous system (CNS), cranial, facial malformation with conventional karyotype and pregnancy outcomes in relation to maternal age (MA) and gestational age (GA) at diagnosis. (Legend: ACC: agenesis of the corpus callosum, Chr: chromosome; CL/CLP: cleft lip/cleft lip and palate, CPCs: choroid plexus cysts, CT-scan: computed tomography, MRI: magnetic resonance imaging, NR, not reported, SUA: single umbilical artery, PDA: patent ductus arteriosus, SHH, sonic hedge hog; TOP: termination of pregnancy).

Ref. number (yr.)	Case	MA	GA	Karyotype	Microarray result (CNVs)	Gain or Loss size (Mb)	Pregnancy outcome
Ref. [15] (2015)	Case 1: Holoprosencephaly	NR	23w	Normal	arr 7q36 del (155,473,296–158,909,738) × 1 encompassing the sonic hedgehog (SHH) gene	3.44 del at 7q36	TOP
Ref. [15] (2015)	Case 2: Hydrocephaly	NR	22w	Normal	arr 22q11.21 (18,648,855–21,800,471) × 3 dupl, including TBX1 gene	3.15 dupl at 22q11	TOP
Ref. [15] (2015)	Case 5: Holoprosencephaly, cleft lip and cleft palate (CL/CLP)	NR	23w	Normal	arr 2p21 del (44,749,075–45,098,283) × 1 which harbors SIX3 gene	0.34 del at 2p21	TOP
Ref. [15] (2015)	Case 6: Exencephaly	NR	21w	Normal	arr 19p12p13.11 del (19,838,485–23,868,512) × 1	4.03 del at 19p12p13.11	TOP
Ref. [16] (2014)	Case G4: Holoprosencephaly, flat face and nasal bridge	NR	16w	45,XX,der(15)t(15;18)(q10;q10)	arr 18p11.32p11.21 <i>de novo</i>	14 dupl at 18p11	NR
Ref. [17] (2013)	Case 17: Bilateral ventriculomegaly	NR	NR	46,XY,del(1)(p36.3)dn	arr 1p36.33p36.32(RP5-857k21-RP11-333E3) × 1 <i>de novo</i> 1p36 microdeletion syndrome	NR del at 1p36	TOP
Ref. [17] (2013)	Case 24: Agenesis of the corpus callosum (ACC) and meningocele	NR	NR	Normal	arr 5q35.3 (RP11-281O15- > RP11-99H18) × 1 mat	del of 1.9 and dupl of 1.1	Vaginal delivery, admitted to SCBU, anomalies confirmed.
Ref. [18] (2013)	Microcephaly, ventriculomegaly, abnormal sulcal development with the absence of gyri and sulci and a shallow sylvian fissure. Fetal MRI confirmed corpus callosum dysgenesis and lissencephaly. Extracranial finding: single umbilical artery (SUA).	40yr	31w	46,XX del(17)(p13.3)	arr [hg19] 17p13.3 (0-3,165,530) × 1 mat (qPCR) (Miller-Dieker lissencephaly syndrome)	3.17 del at 17p13	Stillbirth at 32 weeks of gestation. Type of delivery: NR
Ref. [19] (2013)	Ventriculomegaly	NR	34w	46,XX,r(6)(p25;q27)	arr 6p25.3 del arr 6q26.27 del	1.3 del 6p25.3; 6.7 del 6q25-27	TOP at 38w
Ref. [20] (2012)	Case 1: Hypertelorism, epicanthic folds, depressed nasal bridge, long philtrum and low-set ears	35yr	17w	47,XX,r(2)(p11.1q21.2) [14]/46,XX; Interphase FISH revealed a mosaic level of 52%	Gain in chromosome 2 encompassing 2q11.2/q21.2; a small supernumerary marker chromosome derived from ring chromosome 2	39.4 dupl at 2q11.2/q21.2	TOP: GA not reported (NR)
Ref. [21] (2012)	Case 42: Lissencephaly	NR	NR	Normal	arr 17p13.3(RP11-629C16 → CTD-2386E6) × 1 <i>de novo</i>	2.1 del at 17p13	NR
Ref. [22] (2011)	Ventriculomegaly, oligohydramnios	NR	NR	Normal	arr 17q22-q23.1 (chr17:53,072,536–56,612,662, hg18) including genes from MSI2 to BCAS3	3.54 del at 17q22-q23.1	TOP
Ref. [23] (2009)	Case 1: Holoprosencephaly	20yr	NR	46,XX FISH: unbalanced translocation t(7;8)	arr7q36.1q36.3(151,071,240–158,788,150) × 1 pat, 8q24.3(141,793,142–146,236,298) × 3 pat Partial monosomy 7q (deletion SHH); Partial trisomy 8q	del at 7.6 7q36.1q36.3; dupl at 4.4 of 8q24.3	NR
Ref. [23] (2009)	Case 5: Holoprosencephaly	22yr	NR	46,XX	arr 14q12q21.1(28,168,333–37,866,321) × 1 <i>de novo</i> interstitial del Partial monosomy 14q encompassing HPE8 region	9.7 del at 14q12.21.1	NR
Ref. [24] (2006)	Case 1: Borderline ventriculomegaly	38yr	18w	Interstitial deletion at the long arm of 1 chromosome 2	arr 2q14.2-2q21.3 <i>de novo</i> interstitial del	NR	At 5 months, the infant had febrile convulsions, atrophy of the left, undescended testis and developmental delay.

(continued on next page)

# An alternative to array-based diagnostics: a prospectively recruited cohort, comparing arrayCGH to next-generation sequencing to evaluate foetal structural abnormalities



Lesley Walker, Christopher M. Watson, Sarah Hewitt, Laura A. Crinnion, David T. Bonthron & Kelly E. Cohen

La secuenciación tiene un tiempo de respuesta similar y tasa de detección comparable de variantes del número de copias en comparación con aCGH  
 La detección de CNV identificados fue concordante entre ambos conjuntos de datos aCGH y CNVseq.

Alto costo al establecer la secuenciación de próxima generación , pero sin duda es el futuro








**Table 2.** Genomic positions of clinically significant variants identified in the aCGH and CNVseq processed samples. Genomics coordinates are reported for human genome build hg19.

Sample number	Clinical features	Karyotype	aCGH min positions			aCGH max positions			CNVseq window boundaries		
			Start	Stop	Size (Mb)	Start	Stop	Size (Mb)	Start	Stop	Size (Mb)
CS19	IUGR, posterior fossa abnormality, echogenic bowel	10p deletion	136,391	20,825,562	20.7	1	21,431,063	21.4	73,503	20,888,107	20.8
CS25	Echogenic kidneys, polyhydramnios	17q12 deletion	34,856,085	36,248,889	1.4	34,611,377	36,510,769	1.9	34,851,278	36,249,761	1.4
CS27	Bowel dilatation, polyhydramnios	22q11 deletion	18,894,865	21,540,318	2.6	18,847,965	21,561,492	2.7	18,886,235	21,461,135	2.6

min: minimum; max: maximum; Mb: Megabase; IUGR: Intrauterine growth restriction.



# Prenatal Diagnosis by Array Comparative Genomic Hybridization in Fetuses with Cardiac Abnormalities

Katarzyna Kowalczyk <sup>1,\*</sup>, Magdalena Bartnik-Głaska <sup>1</sup>, Marta Smyk <sup>1</sup>, Izabela Plaskota <sup>1</sup>, Joanna Bernaciak <sup>1</sup>, Marta Kędzior <sup>1</sup>, Barbara Wiśniowiecka-Kowalnik <sup>1</sup>, Krystyna Jakubów-Durska <sup>1</sup>, Natalia Braun-Walicka <sup>1</sup>, Artur Barczyk <sup>1</sup>, Maciej Geremek <sup>1</sup>, Jennifer Castañeda <sup>1</sup>, Anna Kutkowska-Kaźmierczak <sup>1</sup>, Paweł Własienko <sup>1</sup>, Marzena Dębska <sup>2</sup>, Anna Kucińska-Chahwan <sup>3</sup>, Tomasz Roszkowski <sup>3</sup>, Szymon Kozłowski <sup>1</sup>, Boyana Mikulska <sup>4</sup>, Tadeusz Issat <sup>4</sup>, Ewa Obersztyn <sup>1</sup> and Beata Anna Nowakowska <sup>1</sup>



Array es recomendado por organizaciones científicas a nivel mundial como prueba de primera línea en el diagnóstico prenatal de fetos con anomalías ecográficas, especialmente defectos cardíacos.









Debido a esta capacidad, se identificó la etiología de los defectos cardíacos en el 37% de los casos de un total de 484 casos.

**Table 1.** Specific heart defects of our cases with common aneuploidies.

Aneuploidy	Heart Defects in Ultrasound
Trisomy 21	AVSD, VSD, TOF, ASD
Trisomy 18	VSD, AVSD, DORV
Trisomy 13	VSD, ASD
Monosomy X	VSD

(Atrial septal defect (ASD), atrioventricular septal defect (AVSD), double outlet right ventricle (DORV), tetralogy of Fallot (TOF), and ventricular septal defect (VSD)).

# Prenatal Diagnosis by Array Comparative Genomic Hybridization in Fetuses with Cardiac Abnormalities

Katarzyna Kowalczyk <sup>1,\*</sup>, Magdalena Bartnik-Głaska <sup>1</sup>, Marta Smyk <sup>1</sup>, Izabela Plaskota <sup>1</sup>, Joanna Bernaciak <sup>1</sup>, Marta Kędzior <sup>1</sup>, Barbara Wiśniowiecka-Kowalnik <sup>1</sup>, Krystyna Jakubów-Durska <sup>1</sup>, Natalia Braun-Walicka <sup>1</sup>, Artur Barczyk <sup>1</sup>, Maciej Geremek <sup>1</sup>, Jennifer Castañeda <sup>1</sup>, Anna Kutkowska-Kaźmierczak <sup>1</sup>, Paweł Własienko <sup>1</sup>, Marzena Dębska <sup>2</sup>, Anna Kucińska-Chahwan <sup>3</sup>, Tomasz Roszkowski <sup>3</sup>, Szymon Kozłowski <sup>4</sup>, Boyana Mikulska <sup>4</sup>, Tadeusz Issat <sup>4</sup>, Ewa Obersztyn <sup>1</sup> and Beata Anna Nowakowska <sup>1</sup>



El método de microarrays no solo proporciona información sobre la presencia de CNV, también es posible identificar el mosaicismo cromosómico. Identificamos tres tipos de trisomías en mosaico de los cromosomas 16, 18 y 22

**Table 2.** Pathogenic structural aberrations found in our cases.

Patient	Prenatal Diagnosis	Aberration (Inheritance—If It Has Been Identified)	Size
1166	Cleft palate, VSD, foot deformation	1p36.33p36.22(779733_9620926)x1,5p15.33(22149_2274755)x3	8.8 Mb; 2.2 Mb
254	cardiomegaly	1q21.1q44(142491666_246928498)x3	104 Mb
2054	HLHS	2p25.3(21191_3062258)x1,12q24.13q24.33(113023613_133773393)x3	3 Mb; 21 Mb
1220	TOF	1q42.12q44(226703815_249203359)x3, 9q34.3(138907844_141018976)x1	22.2 Mb; 2.1 Mb
653	VSD	3p22.2(37646228_38961056)x1,3q24q25.32(145448788_158594702)x1	1.3 Mb; 13 Mb
1214	AVSD	3p24.1p22.3(27228808_33971880)x1	6.7 Mb
551	VSD	5p15.33p12(22149_45362363)x3	45 Mb
13	TOF	6q25.3q26(156813910_162033274)x3 dn	5.2 Mb
322	VSD	6q26q27(163436214_170847447)x1 dn	7.4 Mb
589	ASD	7p14.3p14.1(31773017_42738664)x1	11 Mb

# Copy Number Variant Detection with Low-Coverage Whole-Genome Sequencing Represents a Viable Alternative to the Conventional Array-CGH

Published: 15 April 2021



Marcel Kucharík <sup>1,2,\*</sup> , Jaroslav Budiš <sup>1,2,3</sup> , Michaela Hýblová <sup>4</sup>, Gabriel Minárik <sup>4</sup> and Tomáš Szemes <sup>1,2,5</sup>

El nuevo método detectó todas las aberraciones conocidas y encontró aún más aberraciones principalmente en regiones intergénicas donde el aCGH estudiado ofrece una cobertura deficiente.

Según los resultados presentados, GenomeScreen es actualmente capaz de detectar casi todas las variaciones de más de 100 kb en regiones mapeables del genoma humano. Además, es más barato y ofrece tiempos de respuesta más cortos en comparación con el aCGH.

# Copy Number Variant Detection with Low-Coverage Whole-Genome Sequencing Represents a Viable Alternative to the Conventional Array-CGH

Marcel Kucharík <sup>1,2,\*</sup> , Jaroslav Budiš <sup>1,2,3</sup> , Michaela Hýblová <sup>4</sup>, Gabriel Minárik <sup>4</sup> and Tomáš Szemes <sup>1,2,5</sup>



- Genomescreen, representa un reemplazo favorable para el método aCGH más convencional para detectar CNV de más de 100 kb.
- GenomeScreen y aCGH detectaron 59 desviaciones, mientras que GenomeScreen además detectó otras 134 variaciones (generalmente) más pequeñas.



# Conclusión

- Actualmente en Chile las pruebas prenatales están limitadas al cariógrama.
- Cada vez se ha avanzado más en el reconocimiento de las bases moleculares de las enfermedades humanas y la cantidad de test disponibles.
- En varios países, el CMA está incorporado en las coberturas de los sistemas de salud y puede tener un costo similar al de un cariotipo convencional.

# CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente

Facultad de Medicina, Universidad de Chile



## **Seminario n°2: FISH, MLPA, Array CGH Técnica y aporte de su uso prenatal**

Dra. Paulina Vega Carrillo

Dra. Catherine Diaz Sanhueza

Programa especialización Obstetricia y Ginecología

Universidad de Concepción