

CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente

Facultad de Medicina, Universidad de Chile



Métodos diagnósticos en genética perinatal

Autores:

Dra. Paula Correa

Dra. Catherine Díaz Sanhueza

Dr. Sergio de la Fuente

Hoja de ruta



Indicaciones y consideraciones de estudio genético



Técnicas de estudio y su utilidad



Rendimiento de las pruebas en distintas situaciones



Flujograma de evaluación

Asesoramiento prenatal pretest



Pruebas son opcionales

Riesgo según: edad, antecedentes familiares, salud materna, factores externos

Valorar riesgo y beneficio de screening vs. Prueba diagnóstica independiente del riesgo individual

Evaluación de fenotipo exhaustiva

Describir rendimiento y riesgo residual de los exámenes

Describir el procedimiento

Comentar costos

Aclarar: Resultado negativo no garantiza hijo sano/>Resultado positivo o alto riesgo no implica enfermedad.

Derivación a genética preconcepcional/prenatal



Diagnóstico genético conocido o sospechado en la paciente o en un familiar.

Sospecha de anomalías fetales.

Resultado anormal o imprevisto en una prueba de cribado.

Resultado anormal o imprevisto en una prueba diagnóstica.

Edad parental avanzada durante el embarazo.

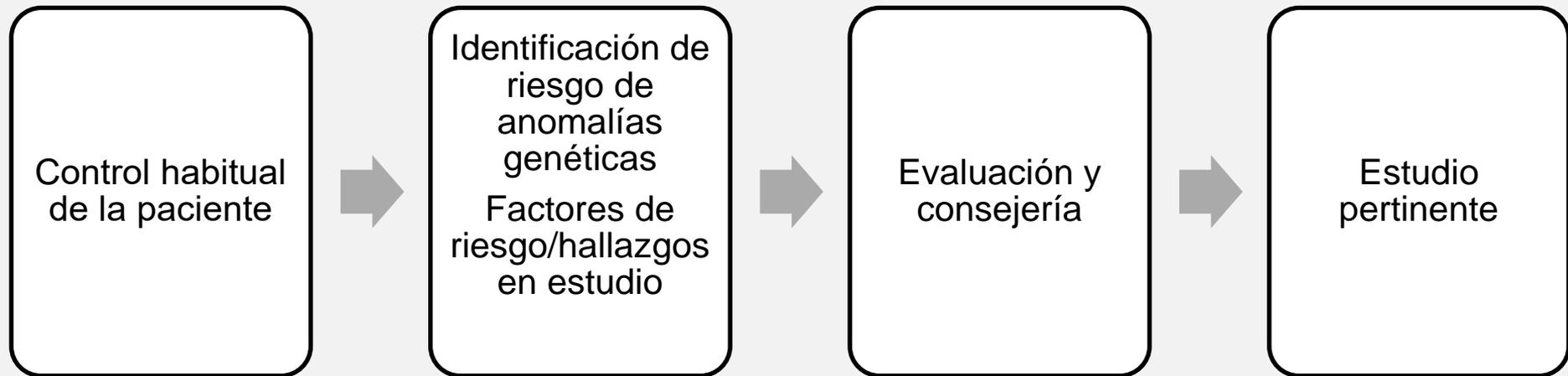
Exposición a teratógenos.

Etnia asociada a mayor prevalencia de un diagnóstico genético.

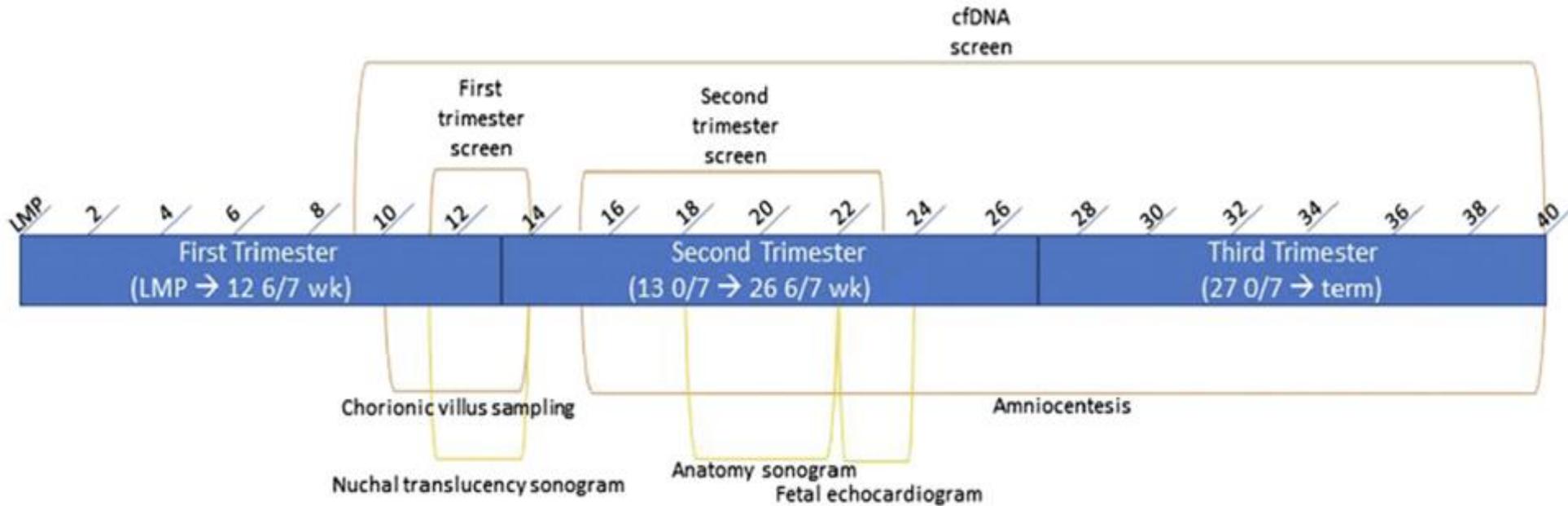
Aborto de repetición.

Consanguinidad.

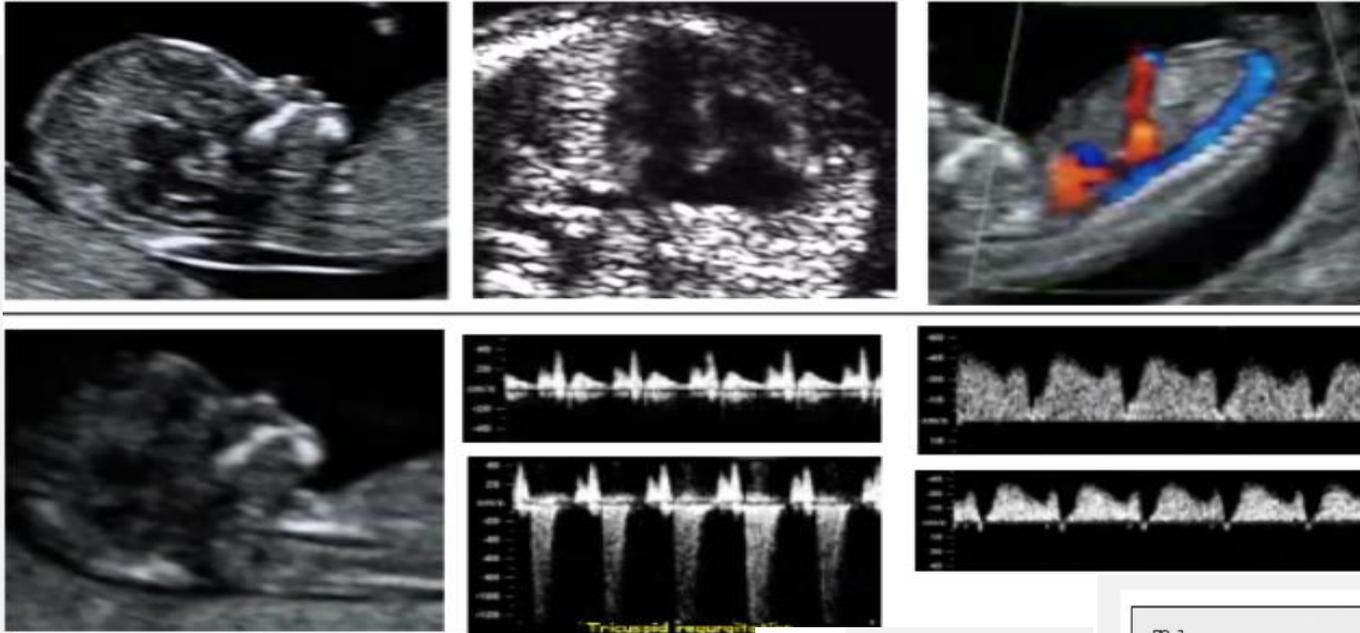
Cualquier paciente que desee información detallada sobre las pruebas de portadores y/o de aneuploidías que supere a lo que el obstetra puede proporcionar.



Evaluación genética de anomalías fetales

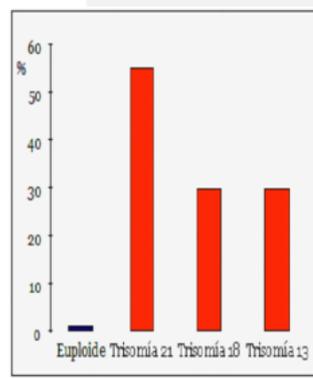
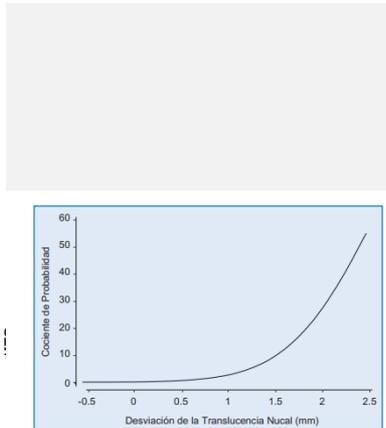
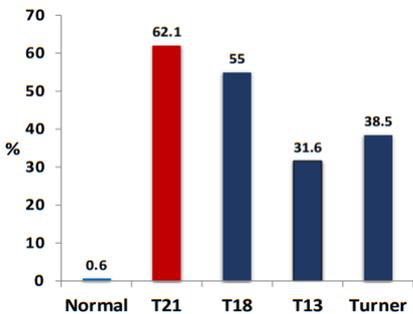


Aproximación diagnóstica frente a anomalías fetales

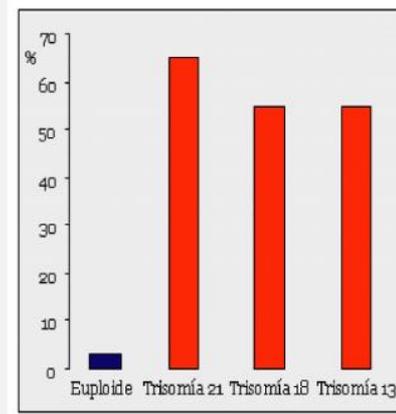


- Ecografía 11-14 semanas
 - TN
 - RT
 - DV
 - HN

Prevalencia de HN ausente (n=20.418)



Prevalencia de reflujo tricuspídeo



Prevalencia de onda a reversa o anormal en DV

Figura 11. Coeficientes de probabilidad para la trisomía 21 en relación a la desviación en el grosor de la translucencia nucal fetal con respecto a la mediana normal para la longitud cráneo-rabadilla¹¹.

Cálculo de riesgo T1



- <https://appsjuan.shinyapps.io/myhgcapp/>

Genetic Sonography App Previous autosomal trisomy **First Trimester Markers** Second Trimester Markers About

Risk by Screening 1/
250

Absent nasal bone
 Abnormal Ductus Venosus Flow
 Tricuspid Regurgitation

Clear

Risk modified by sonographic markers

1/1174 Low risk of trisomy 21

© Juan Acosta Diez

Reference:
Illa M., Mula R., Arigita M., Grande M., Gonca A., Borobio V., Borrell A. Fetal Diagn Ther 2013;34:116-120

Cálculo de riesgo T1



Risk by Screening 1/

940

Absent nasal bone

Abnormal Ductus Venosus Flow

Tricuspid Regurgitation

Clear

Risk modified by sonographic markers

1/241

An invasive test should be considered

Risk by Screening 1/

940

Absent nasal bone

Abnormal Ductus Venosus Flow

Tricuspid Regurgitation

Clear

Risk modified by sonographic markers

1/164

An invasive test should be considered

Risk by Screening 1/

940

Absent nasal bone

Abnormal Ductus Venosus Flow

Tricuspid Regurgitation

Clear

Risk modified by sonographic markers

1/212

An invasive test should be considered

Cálculo de riesgo en T2



Marcador	Manejo antenatal	LR (+)/(-)	LR marcador aislado
Foco ecogénico cardiaco	Control habitual	5.83/0.80	0.95
Intestino ecogénico	Evaluación FQ, infección congénita viral, sangrado intraamniótico	11.44/0.90	1.65
Ventriculomegalia	Evaluación estructural detallada	27.5/0.94	3.81
Pielectasia	Control y vigilancia	7.63/0.92	1.08
Huesos largos cortos	Evaluación displasias esqueléticas	H: 4.81/0.74 F: 3.72/0.80	0.78 0.61
Pliegue nucal aumentado	Control habitual	23.3/0.80	3.79
Hueso Nasal hipoplásico o ausente	Control habitual	23.27/0.46	6.58
ARSA	Ecocardiografía	21.78/0.71	3.94

Cálculo de riesgo en T2



Risk by screening 1/

Cardiac echogenic foci

Pyelectasis

Short Femur

Echogenic bowel

Increased Nuchal Fold

ARSA

Absent or hypoplastic nasal bone

Ventriculomegaly

Risk modified by sonographic markers

1/1921

Low risk of trisomy 21

Reference:
 Agatholekus, *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:247-261



perinatology.com
 Age Adjusted Ultrasound Risk Assessment
BETA TESTING

[Home > Calculators > Age Adjusted Ultrasound Risk Assessment](#)

Genetic sonography has been used to adjust the age related a priori risk for Down syndrome, and increase the detection rate for Down syndrome [1, 2]. Some authors suggest that the genetic sonogram should not be used as a sequential test following serum biochemistry and question the association of most isolated soft markers with Down syndrome in women at low risk [3, 4]. Women with a high a priori risk for Down syndrome should consider amniocentesis for karyotyping regardless of a normal ultrasound [1, 3].

The calculator below may be used to estimate the risk for Down syndrome after a "genetic sonogram".
 To use the calculator:
 1. Enter the mid trimester risk for Down syndrome in the a priori risk directly, or select the patient's age at the time of delivery and press use maternal age to use the values from The California Prenatal Screening Program Provider Handbook.
 2. Select the markers (if any) found during the sonogram. Press "Calculate Likelihood Ratio" or enter the value for likelihood ratio directly.
 3. Press "Calculate Posterior Probability" to obtain the patient specific risk for Down syndrome.

Calculation of Age Adjusted Ultrasound Risk Assessment	
Mid trimester a priori risk of Down Syndrome is	1 in <input type="text" value="720"/>
Use midtrimester risk for Down syndrome by maternal age of <input type="text" value="30"/>	<input type="button" value="Use Maternal Age for Apriori Risk [5]"/>
Ultrasound Marker [6]	* Likelihood Ratios [7]
<input type="checkbox"/> Nuchal fold Thickened soft tissue at the fetal occiput ≥ 6 mm between 15 to 20 weeks'	17
<input type="checkbox"/> Hyperechoic bowel Bowel echogenicity comparable to bone	6.1
<input checked="" type="checkbox"/> Short humerus Measured to Expected Humeral Length is < 0.9 Expected Humeral Length = $-7.9404 + 0.8492 * BPD$ Measured Humeral Length <input type="text"/> BPD <input type="text"/> <input type="button" value="Calculate >"/> MHL/EHL = <input type="text"/>	7.5
<input type="checkbox"/> Short femur Measured to Expected Femur Length is ≤ 0.91 Expected Femur Length = $-9.3105 + 0.9028 * BPD$ Measured femur Length <input type="text"/> BPD <input type="text"/> <input type="button" value="Calculate >"/> MFL/EFL = <input type="text"/>	2.7
<input type="checkbox"/> Echogenic intracardiac focus Discrete echogenic spot as bright as bone	2.8
<input type="checkbox"/> Pyelectasis Anterior posterior dimension of the renal pelvis ≥ 4 mm between 16 to 20 weeks'	1.9
Total post-ultrasound likelihood ratio	<input type="button" value="Calculate Likelihood Ratio"/> <input type="text"/>
Patient-specific risk for Down syndrome posterior probability	1 in <input type="text"/> <input type="button" value="Clear"/> <input type="button" value="Calculate Posterior Probability"/>

Cálculo de riesgo de aneuploidía según evaluación ecográfica



Ejemplo:

Paciente de 32 años, sana.

Ecografía 12 semanas: hueso nasal ausente

Genetic Sonography App Previous autosomal trisomy First Trimester Markers Second Trimester Markers About

Risk by Screening 1/
1100

Absent nasal bone

Abnormal Ductus Venosus Flow

Tricuspid Regurgitation

Clear

Risk modified by sonographic markers

1/282 Low risk of trisomy 21

Reference:

Illa M, Mula R, Arigita M, Grande M, Gonca A, Borobio V, Borrell A. Fetal Diagn Ther 2013;34:116-120

<https://appsjuan.shinyapps.io/myhgcapp/>

TABLA 4.3
Riesgo de anomalías cromosómicas en función de la edad materna a término del embarazo

Edad a término	Riesgo de trisomía 21 ^a	Riesgo de cualquier anomalía cromosómica ^b
15 ^c	1:1.578	1:454
16 ^c	1:1.572	1:475
17 ^c	1:1.565	1:499
18 ^c	1:1.556	1:525
19 ^c	1:1.544	1:555
20	1:1.480	1:525
21	1:1.460	1:525
22	1:1.440	1:499
23	1:1.420	1:499
24	1:1.380	1:475
25	1:1.340	1:475
26	1:1.290	1:475
27	1:1.220	1:454
28	1:1.140	1:434
29	1:1.050	1:416
30	1:940	1:384
31	1:820	1:385
32	1:700	1:322
33	1:570	1:285
34	1:456	1:243
35	1:353	1:178
36	1:267	1:148
37	1:199	1:122
38	1:148	1:104
39	1:111	1:80
40	1:85	1:62
41	1:67	1:48
42	1:54	1:38
43	1:45	1:30
44	1:39	1:23

Ecografía 22 semanas: pielectasia e hipoplasia de hueso nasal

Genetic Sonography App

Previous autosomal trisomy

First Trimester Markers

Second Trimester Markers

About

Risk by screening 1/

282

- Cardiac echogenic foci
- Pyelectasis
- Short Femur
- Echogenic bowel
- Increased Nuchal Fold
- ARSA
- Absent or hypoplastic nasal bone
- Ventriculomegaly

Clear

Risk modified by sonographic markers

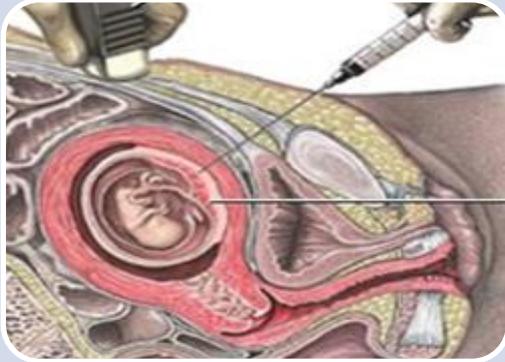
1/5

An invasive test should be considered

Reference:

Agatholekus, Ultrasound Obstet Gynecol 2013;41:247-261

Procedimientos invasivos



Biopsia vellosidades coriales

Desde **10-13** semanas

Vía abdominal o transcervical

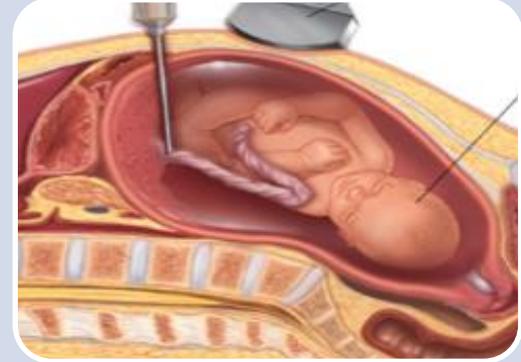
Riesgos: pérdida del embarazo 0,22%, 32% metrorragia.

Riesgo falla cultivo, infección o rotura de membranas < 0,5%.



Amniocentesis

Desde **16** semanas
Riesgo pérdida del embarazo 0,13-0,27%, punción transplacentaria no otorga mayor riesgo de pérdida del embarazo
Riesgo rotura de membranas o sangrado 1-2%.



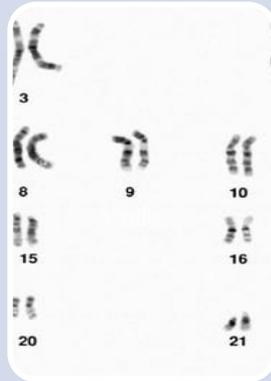
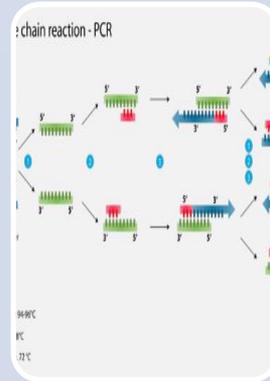
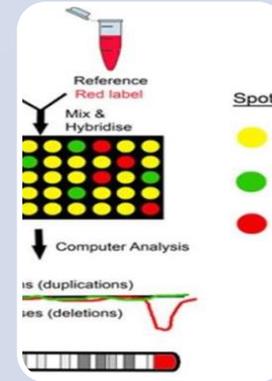
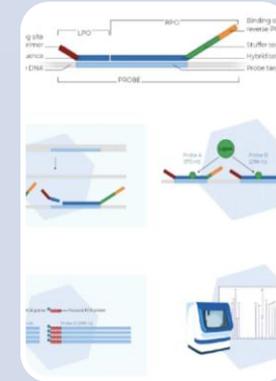
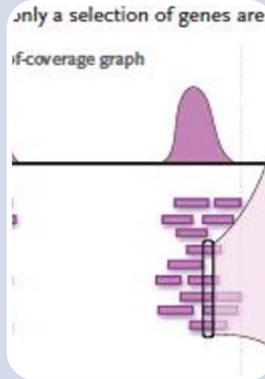
Cordocentesis

Desde **20** semana
Riesgo 1,3% pérdida del embarazo
Riesgo 5-10 % de bradicardia y 20-30% sangrado desde el sitio de punción

Exámenes Disponibles



CERPO



NGS

- Codificación de secuencias de nucleótidos en exones, genoma completo, genes puntuales

MLPA

Sondas para secuencias específicas de ADN, se unen a secuencia diana de forma adyacente ligándose entre ellas → amplificación por PCR. Permite analizar el número de copias de la región de interés.

Array

- Determina **ganancia o pérdida de material genético, CNV.**
- No identifica **translocaciones balanceadas ni triploidias.**
- **No requiere cultivo**
- Elección en óbitos o mortinatos
- Retorno 3-7 días

QF-PCR

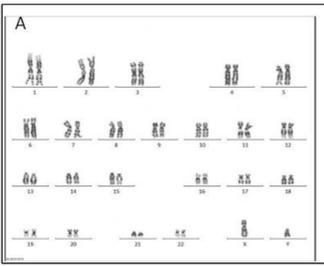
- Amplificación exponencial de segmentos específicos de ADN (STR/marcadores microsatélites) de los cromosomas estudiados.
- Aneuploidías 13,18 y 21, XY
- Resultado 48h.
- VPP 100%, VPN 99,7%

FISH

- Hibridación in Situ con fluorescencia con sondas específicas
- No requiere cultivo celular.
- Retorno: 2 días
- **Confirmación con cariógrama o array**

Cariograma

- Evaluación estructural del material genético. Aneuploidías y reordenamientos (5-10 megabases)
- **Requiere cultivo**
- No evaluable en necropsia



Cariograma



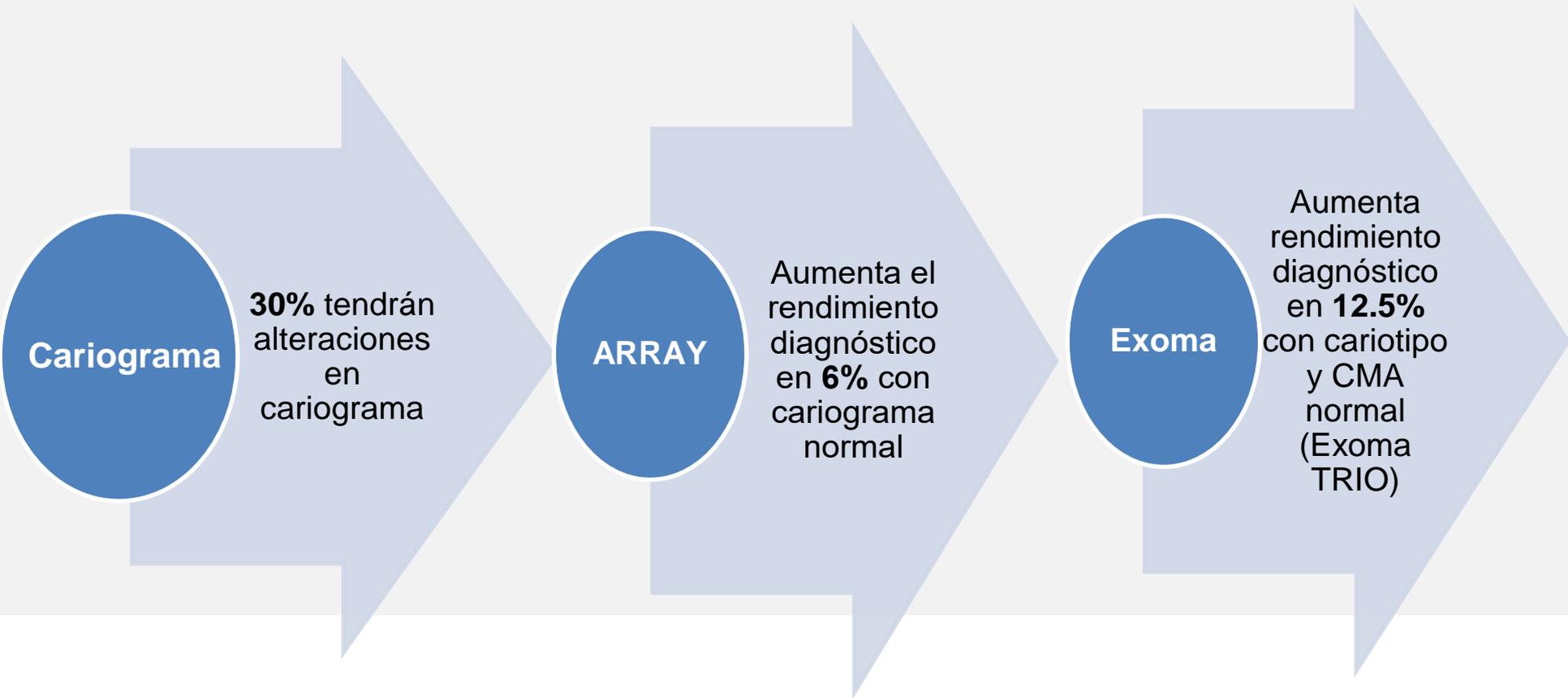
Analiza número y estructura de cromosomas en metafase del genoma completo.

Precisión diagnóstica 99% con alteraciones superiores a 5-10Mb.

3 métodos de obtención de metafases.

- **Cultivo corto o semidirecto en VC:** 3-7 días, sin riesgo de contaminación materna, pero riesgo 2% de detectar anomalías confinadas a placenta. 1/3000 FN. Debería ser confirmado con cultivo largo.
- **Cultivo largo:** 10-15 días, mayor riesgo de contaminación materna, pero menos FN
- **Cultivo en sangre fetal (cordocentesis):** Linfocitos periféricos

Exámenes y Rendimiento en anomalías estructurales



Rendimiento de CMA por tipo de anomalía con cariograma normal.



Table 3

Frequency of Ultrasonographically Detected Anomalies by Anatomical System in Karyotypically Normal Pregnancies

Ultrasound Anomaly	ALL (n=752)				Isolated			
	n†	Array CNVs(n)	IncrementalYield (%)	P	n	Array CNVs(n)	IncrementalYield (%)	P
Cardiac	154	24	15.58%	<0.001‡	66	7	10.61%	0.012*
Face	66	10	15.15%	<0.001*‡	20	2	10.00%	-
Thorax	40	6	15.00%	0.004*	22	1	4.55%	-
Amniotic Fluid	44	6	13.64%	0.006*	2	1	50.00%	-
Head shape	23	3	13.04%	-	6	0		
Umbilical	32	4	12.50%	0.03*	0	0		
Renal	69	8	11.59%	0.004*	20	3	15.00%	0.036*
Gastrointestinal	37	4	10.81%	0.047*	5	0		
Central nervous system	149	14	9.40%	<0.001‡	63	2	3.17%	-
Skeletal	136	12	8.82%	0.003	36	1	2.78%	-
Genital	12	1	8.33%	-	3	0		
Effusion	65	4	6.15%	-	15	1	6.67%	-
Spine	18	1	5.56%	-	2	0		
Neck	236	12	5.08%	-	187	7	3.74%	-
Neck (excluding NT>3.5mm, NF>6mm, and cystic hygroma)	2	0			1	0		
Abdominal wall	40	1	2.50%	-	24	0		
Ear	0	0			0	0		
Placenta	8	0			1	0		

Rendimiento del exoma por sobre CMA según tipo de anomalía



TABLE 3 Pooled effect size for incremental diagnostic yield of ES over CMA in different phenotypic groups

Phenotypic group	Cases analysed	Pooled estimated diagnostic yield [95% CI], <i>p</i> -value
Skeletal	424	53% [42%–63%], <i>p</i> < 0.0001
Neuromuscular/Fetal akinesia deformation sequence (FADS)	33	37% [20%–54%], <i>p</i> < 0.0001
Multisystem	698	29% [22%–35%], <i>p</i> < 0.0001
Hydrops/Oedema	137	22% [14%–31%], <i>p</i> < 0.0001
Central nervous system (CNS)	417	17% [12%–22%], <i>p</i> < 0.0001
Cardiac	773	11% [7%–16%], <i>p</i> < 0.0001
Craniofacial	99	9% [1%–17%], <i>p</i> = 0.02
Congenital anomalies of kidneys and urinary tract (CAKUT)	278	9% [5%–12%], <i>p</i> < 0.0001
Fetal growth restriction	28	4% [–9 to 17%], <i>p</i> = 0.59
Isolated increased nuchal translucency (NT)	290	2% [0%–5%], <i>p</i> = 0.04
Gastrointestinal	60	2% [–4 to 8%], <i>p</i> = 0.5
Respiratory/Chest	38	0 [–7 to 7%], <i>p</i> = 1
Abdominal wall	7	0 [–31% to 31%], <i>p</i> = 1

Note: Phenotypic groups refer to fetuses with one or more anomalies in a single body system. Fetuses with anomalies in more than one system are classified as 'Multisystem'. The 'isolated increased NT' group contains a mixture of (i) cases with isolated increased NT at presentation where it was unspecified whether additional anomalies developed later in pregnancy, and (ii) cases where isolated increased NT remained isolated throughout pregnancy. The bold and underlined formatting was just for emphasis in defining the two sub-groups.

Abbreviations: CMA, chromosomal microarray; ES, exome sequencing.

Indicación para NGS



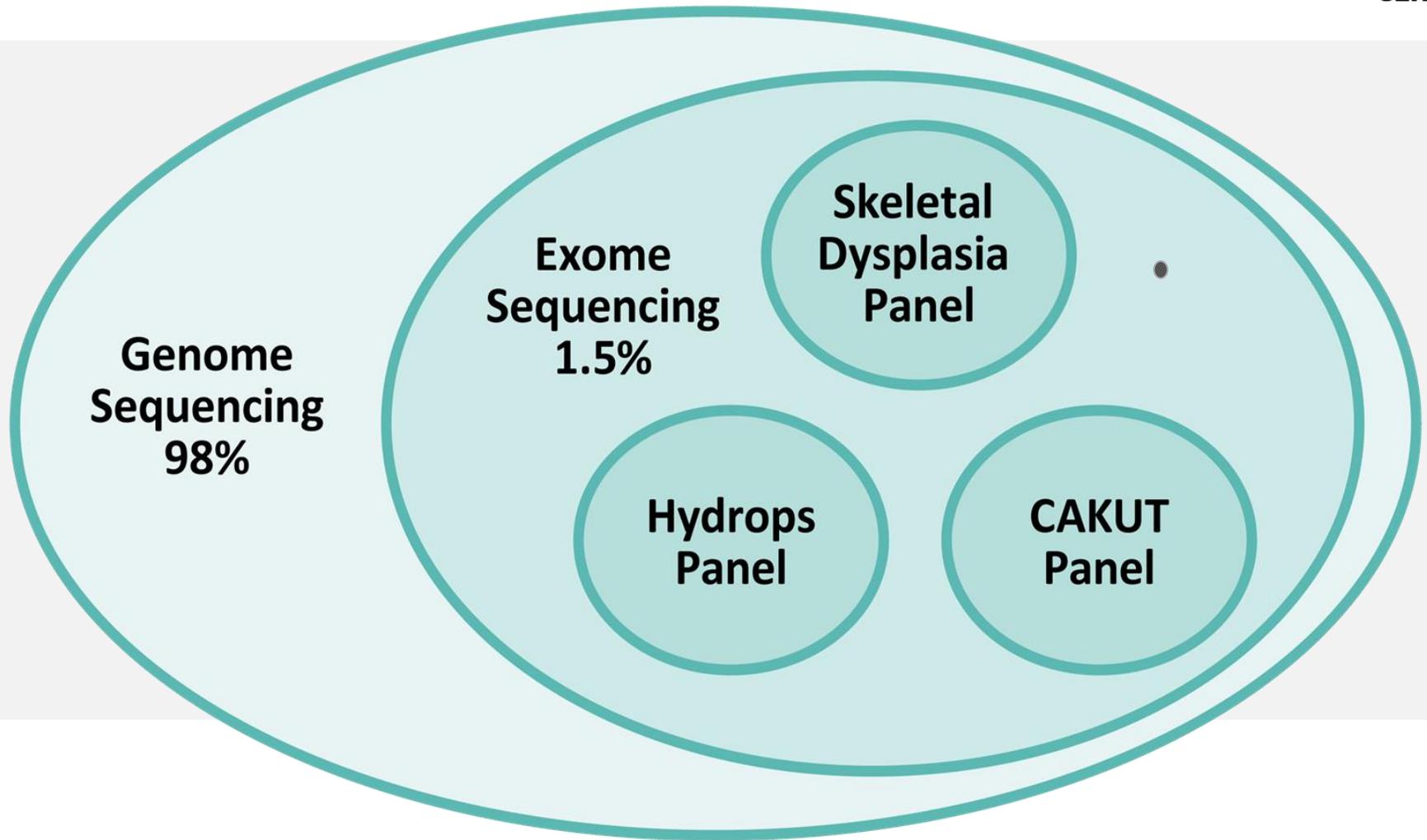
Anomalía fetal mayores o múltiples sistemas afectados, con **CMA no diagnóstico o no disponible o con cariógrama normal.**

Feto previo con anomalías sugerentes de etiología genética y recurrencia de anomalías similares sin causa evidente.

No se recomienda de rutina para estudio aparte de anomalías fetales. La interpretación requiere un fenotipo

En sospecha de alteraciones genéticas puntuales: Panel genético.

Espectro de estudio NGS



Asesoría genética en NGS

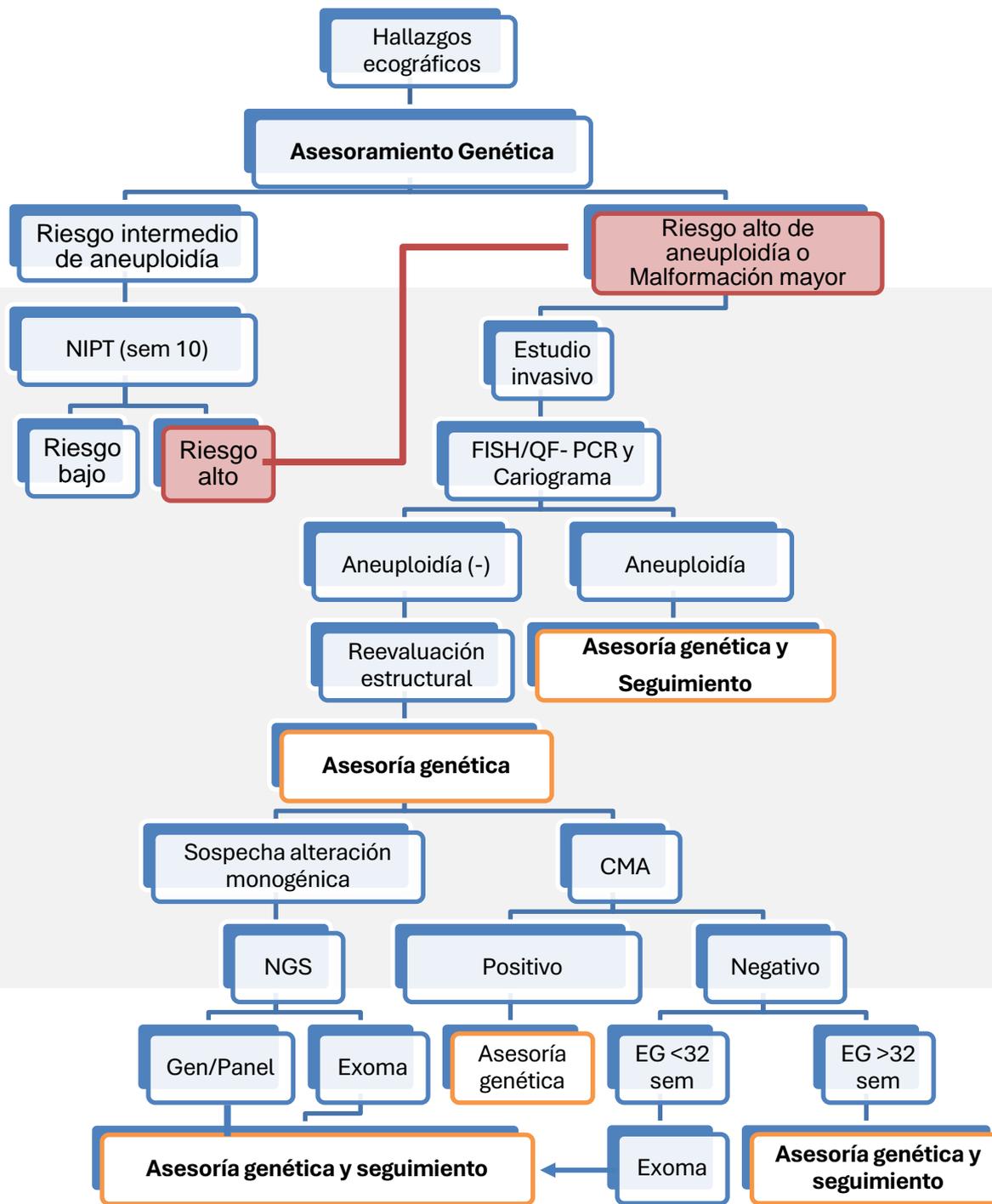


Pre-Test

- **WES** evalúa variaciones en genes individuales.
- **No** detecta todos los tipos de variantes genéticas
- Identifica resultados:
 - **Positivos**: muy probablemente asociados al diagnóstico.
 - **Negativos**: sin hallazgos diagnósticos
 - **Inciertos**: Hallazgo de variante pero significado incierto
- Hallazgo de variante significativa: **20-25%**
- Se requiere DNA **parental** para interpretar las variantes
- Es posible encontrar resultados **inesperados**
- Los resultados se pueden compartir en bases de datos, previo consentimiento.
- Es un proceso **evolutivo** que puede requerir reanálisis en el futuro

Post test

- El resultado **negativo** no implica que no haya desorden genético.
- La secuenciación no detecta todas las variantes genéticas
- Los resultados **inciertos** no deben ser usados para estudio preimplantacional o prenatal futuro. Deben ser discutidos con genetista.
- Los resultados negativos e inciertos podrían **aumentar el rendimiento diagnóstico al ser reanalizados con nuevos hallazgos fenotípicos**, un nuevo embarazo o el paso del tiempo



Especificaciones técnicas: Cariograma en sangre de cordón

Tubo: Jeringa Heparinizada y/o tubo tapa verde con heparina

Volumen: 1 ml +FISH: 2 ml

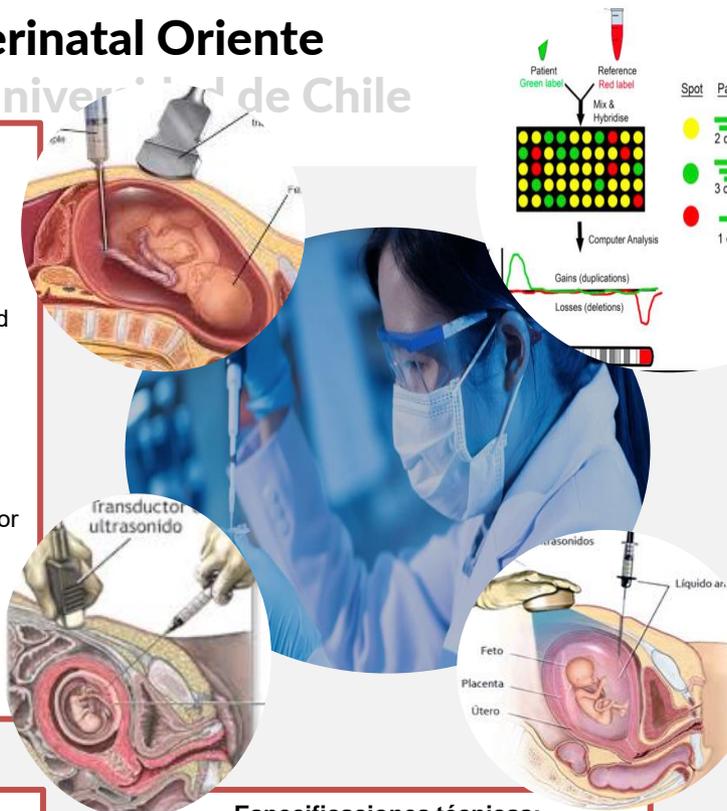
Orden: nombre, RUT, fecha de nacimiento, edad gestacional, fecha toma de muestra, sospecha diagnóstica, médico que solicita el estudio, tipo de estudio (cariograma y/o FISH) y tipo de muestra. **Prueba de Apt- Downey (KOH) con resultado (+) para verificar sangre fetal.**

Traslado: Jeringa y tubos tapados en contenedor sólido, en posición vertical.

Temperatura ambiente sin unidad refrigerante.

Estabilidad: Máximo 48 hrs a 4°C

Resultado: 7 días hábiles



Especificaciones técnicas: CMA

Sangre periférica

Tubo: EDTA Vacutainer

Volumen: 3-4 ml

Temperatura: 20-25°C

Tejido fetal

Frasco estéril con suero fisiológico. Sangre cardíaca o de cordón en vacutainer.

Muestra: 50-100 mg de tejido

Temperatura: 20-25°C

Líquido amniótico

Contenedor estéril

Volumen 10-15 ml.

Temperatura: 20-25°C

Vellosidades coriales

Contenedor: Frasco estéril con medio de cultivo o solución salina con antibiótico 1%

Muestra: 300-500 mg

Temperatura: 2-8°C

Resultados: 25 días hábiles

Especificaciones técnicas: Cariograma vellosidades coriales

Frasco estéril con suero fisiológico

Orden: CRS ingresada en LIS, formulario especial de solicitud con detalles.

Traslado: Jeringa y tubos tapados en contenedor sólido, en posición vertical. Temperatura ambiente sin unidad refrigerante.

Estabilidad: Máximo 72 hrs a 4°C

Resultado: 7 días hábiles

Especificaciones técnicas: Cariograma líquido amniótico

Tubo: Jeringa estéril Terum o Nipro

Volumen: 20 ml +FISH: 30 ml

Traslado: Jeringa tapada con émbolo y tapón en contenedor sólido, temperatura ambiente sin unidad refrigerante.

Estabilidad: Máximo 24 hrs a 4°C

Resultado: 20 días hábiles



-Mellis R, Oprych K, Scotchman E, Hill M, Chitty LS. Diagnostic yield of exome sequencing for prenatal diagnosis of fetal structural anomalies: a systematic review and meta-analysis. *Prenat Diagn.* 2022;42(6):662-685.

-Genetics in Medicine (2020) 22:675–680; <https://doi.org/10.1038/s41436019-0731-7>

-The use of fetal exome sequencing in prenatal diagnosis: a points to consider document of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)

-Diagnostic yield of exome sequencing for prenatal diagnosis of fetal structural anomalies: A systematic review and meta-analysis
[Prenat Diagn.](#) 2022 May; 42(6): 662–685.

-Prenatal Assessment of Genomes and Exomes Consortium. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet.* 2019 Feb 23;393(10173):747-757.

-Genetic Sonography App: [Genetic Sonography App \(shinyapps.io\)](https://shinyapps.io/genetic-sonography/)

-Prabhu M, Kuller JA, Biggio JR. Society for Maternal-Fetal Medicine Consult Series #57: Evaluation and management of isolated soft ultrasound markers for aneuploidy in the second trimester: *Am J Obstet Gynecol.* 2021 Oct;225(4):B2-B15.

-Agathokleous M, Chaveeva P, Poon LC, Kosinski P, Nicolaides KH. Meta-analysis of second-trimester markers for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013 Mar;41(3):247-61.

-Genética perinatal, de Mary E. Norton, Jeffrey A. Kuller y Lorraine Dugoff
© 2020 Elsevier España, S.L.U.

-Nicolaides K. La ecografía de 11 a 13+6 semanas. Fetal Medicine Foundation, Londres, 2013

- Estudios Genéticos En Muestras Fetales: protocolos Medicina Maternofetal Hospital Clínic- Hospital Sant Joan De Déu- Universitat De Barcelona.

CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente

Facultad de Medicina, Universidad de Chile



Evaluación genética en medicina perinatal.

Autores:

Dra. Paula Correa

Dra. Catherine Diaz Sanhueza

Dr. Sergio de la Fuente