

Curso Biología Molecular CMR MEDICINA REPRODUCTIVA

**Héritas Visión: Desarrollo e implementación de NIPS en Argentina
aCGH: Primer línea diagnóstica en DD/ID, TEA, MC**

Dra. Ivana Canonero
Lic. Guadalupe Méjico

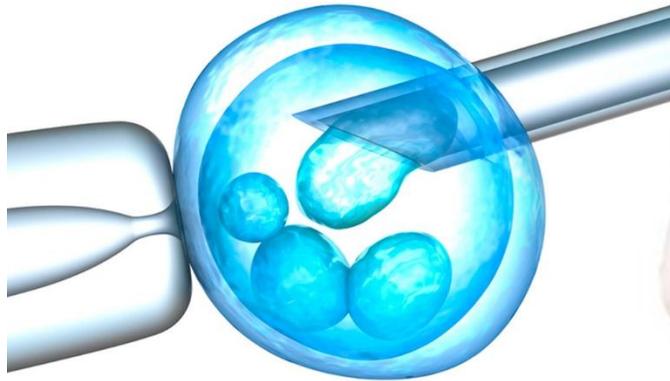


DIAGNÓSTICO GENÉTICO



PRECONCEPCIONAL

PREIMPLANTACIONAL



PRENATAL

POSTNATAL

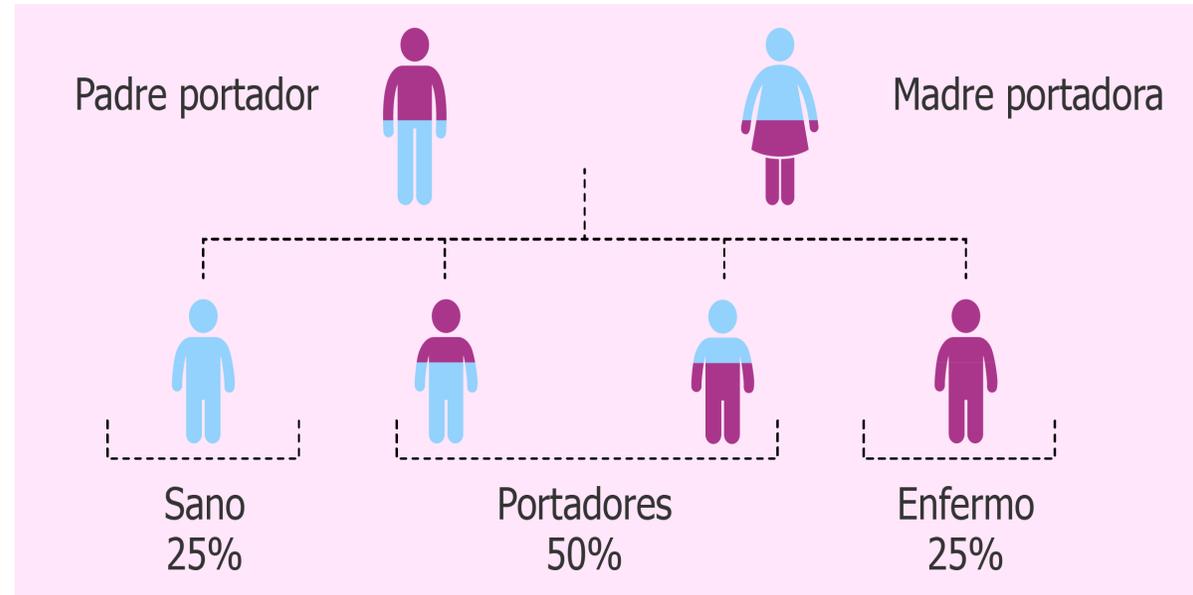


PRECONCEPCIONAL

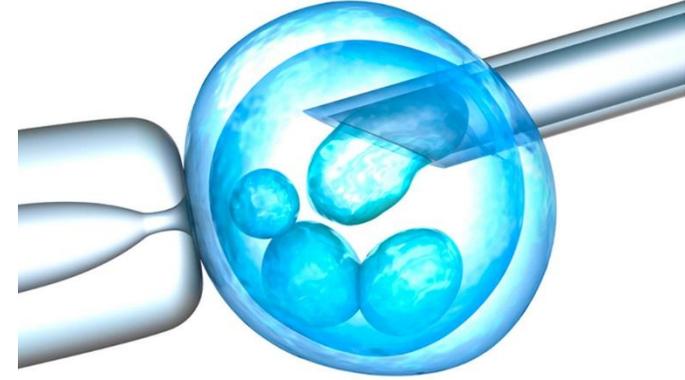


Brindar información a los progenitores de la posibilidad de transmisión de enfermedades hereditarias. Principalmente de aquellas de herencia recesiva.

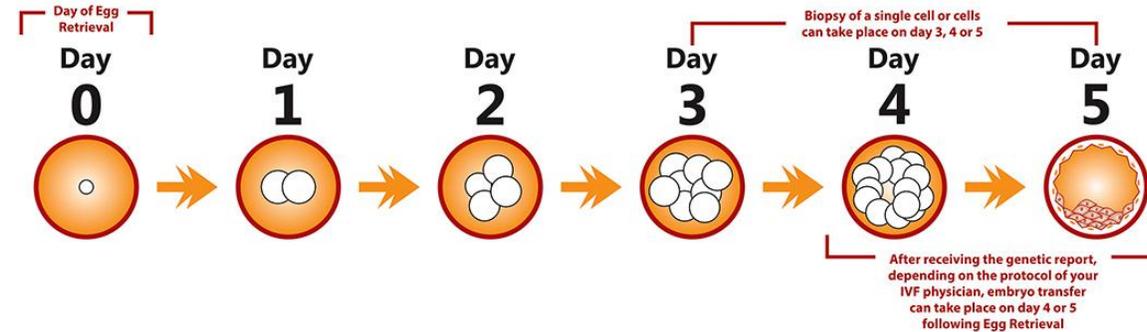
- Enfermedades con frecuencia de portador alto: FQ (1/25), AME (1/40), FRAXA (1/125)
- Riesgo de tener un hijo afectado, en función de la compatibilidad de los progenitores para las enfermedades testeadas
- También usado en dadores de gametos



PREIMPLANTACIONAL



Selección de embriones para tratamiento de fertilidad in vitro



PGT: Test Genético Preimplantacional

Técnica actualmente utilizada, donde a partir de biopsia embrionaria (D5) se realiza la secuenciación de todo el genoma a baja cobertura y permite seleccionar embriones euploides, o sin una condición genética definida *a priori* en la familia.

PGTA → Aneuploidías

PGTSR → Traslocaciones

PGTM → Mendelianas



NICS: Noninvasive Chromosome Screening

Método basado en WGS para la detección de aneuploidías o traslocaciones desbalanceadas, a partir del ADN secretado por los blastocistos al medio de cultivo.

Ventajas:

Evitar la biopsia del embrión
Metodología *a priori* menos compleja y menos costosa

Limitaciones:

FN → presencia de células del *cumulus* (origen materno)
FP → se piensa que pueden ser mosaico, células que el embrión elimina (rescate de trisomía)

- Serviría principalmente para la selección de embriones euploides, y cuando fuese aneuploide se debería confirmar por método invasivo.
- Falsos negativos es un gran problema si se logra el embarazo y no se aborta espontáneamente!

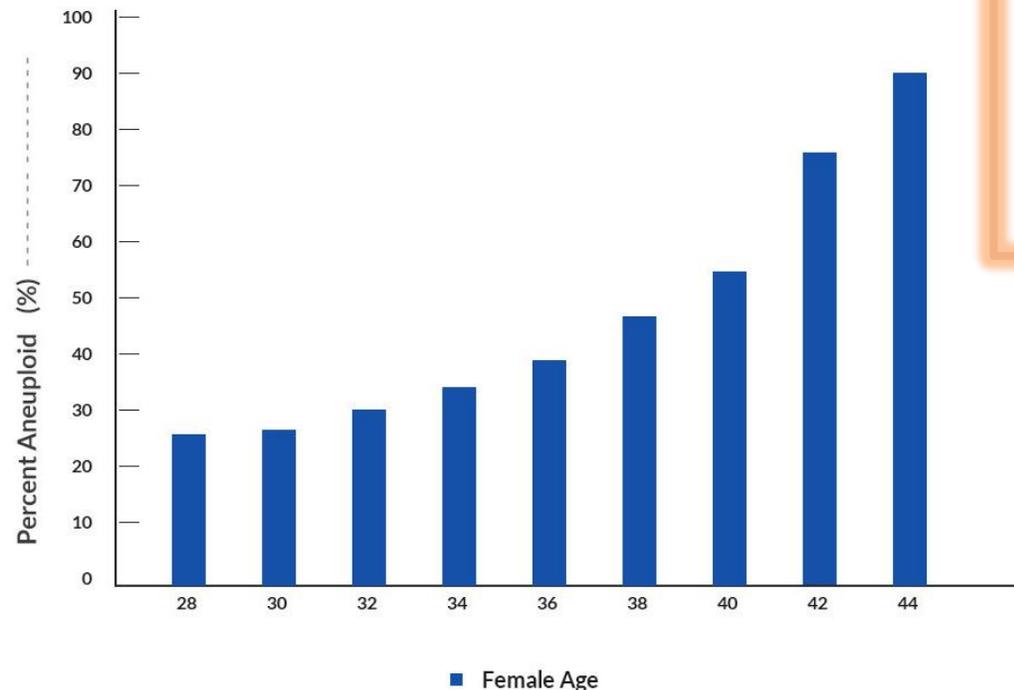
PRENATAL



Detectar precozmente anomalías congénitas con el fin de:

- Brindar tratamiento prenatal o perinatal
- Tomar acciones al momento del parto para controlar la afección
- Interrupción voluntaria del embarazo
- Preparación emocional para los progenitores

Percent of embryos with aneuploidy by female age



- ✓ Edad materna avanzada
- ✓ Abortadoras recurrentes
- ✓ Antecedentes familiares
- ✓ Voluntad o ansiedad materna

Estimación de Riesgos para Cromosomopatías



Para poder prevenir o reducir el impacto de las anomalías congénitas es necesario identificar aquellas gestaciones que presentan un riesgo incrementado respecto a la población general y conocer sus causas.

Marcadores Bioquímicos

Prueba de cribado para cromosomopatías			
Trimestre gestacional	Tipo de prueba	Marcador	Semana
Primer trimestre	Ecográfico	Edad + SN	11-13
	Serológico	Edad + BHCG + PAPP-A	11-13
	Combinado	Edad + BHCG + PAPP-A + SN	11-13
Segundo trimestre	Doble	AFP + HCG	15-18
	Triple	AFP + HCG + E3	15-18
	Cuádruple	AFP + HCG + E3 + inhibina -A	15-18
Primer y segundo trimestre	Serológica Integrado	PAPP-A + BHCG	11-13
	Integrado	AFP + HCG + E3 + inhibina -A	15-18
		SN + PAPP-A + BHCG	11-13
		AFP + HCG + E3 + INHIBINA -A	15-18

E3: estriol no conjugado ; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo
SN: sonulscencia nual



Marcadores ecográficos

TEST COMBINADO DEL 1er TRIMESTRE (SEMANA 10 y 12): EDAD MATERNA + + β -HGC + PAPP-A + TN

Tasa de detección

96-98%

CRIBADO BIOQUÍMICO EN EL 2do TRIMESTRE (SEMANA 16-20): EDAD MATERNA + β -HGC + PAPP-A + α FP

60-65%

MODELO MATEMÁTICO – MODELO DE BAYÉS

Marcadores ecográficos (TN) + Marcadores bioquímicos (β -HGC + PAPP-A) + Edad Materna (SEMANA 12)



RIESGO INDIVIDUAL

BAJO



NO MAS PRUEBAS
CONTROLES NORMALES

INTERMEDIO



OTROS MARCADORES
EXTRAS

ALTO

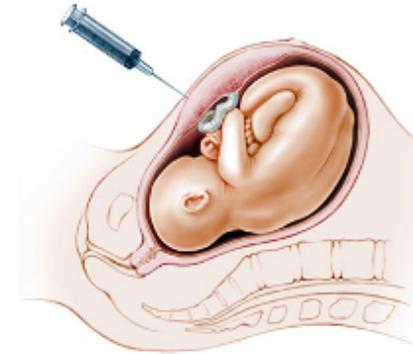


PRUEBA INVASIVA

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL

Técnicas invasivas

- ✓ Riesgo genético mayor al riesgo de la prueba invasiva
- ✓ Cribado combinado de alto riesgo
- ✓ Malformación ecográfica
- ✓ Antecedentes familiares fuertes
- ✓ Ansiedad o angustia materna



BIOPSIA CORIAL

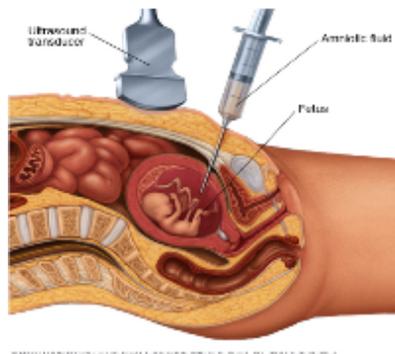
Semana 10-13

Más precoz

Técnica agresiva

Contaminación materna

Células del trofoctodermo



AMNIOCENTESIS

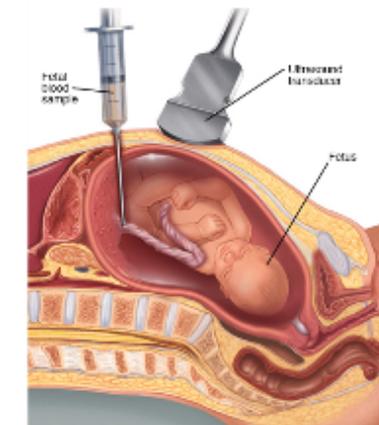
Semana 15-20

Técnica más habitual

Menor riesgo (expertiz)

Más fiabilidad diagnóstica

Células epiteliales (piel y sistema urinario)



CORDOCENTESIS

Semana 18-20

Dificultad técnica

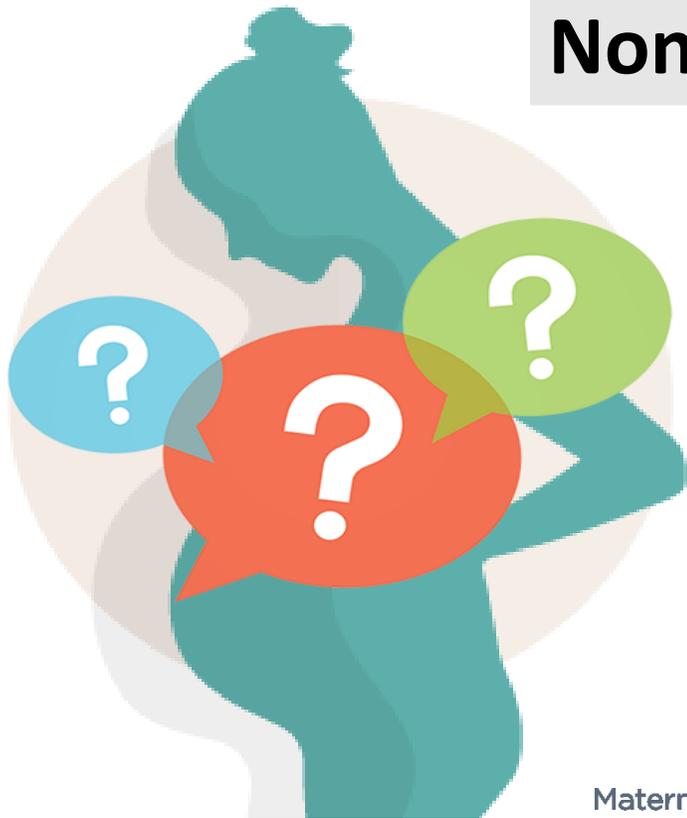
Riesgo fetal alto

Sólo para técnicas diagnósticas específicas

Non-Invasive Prenatal Screening (NIPS)

BMJ

RESEARCH



Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study

Rossa W K Chiu, professor,¹ Ranjit Akolekar, clinical research fellow,⁴ Yana W L Zheng, student,¹ Tak Y Leung, professor,² Hao Sun, assistant professor,¹ K C Ai fellow,¹ Attie T J I Go, professor,⁵ Elizabeth T Lai, William W K Lo, consultant,⁶ Wing C Leung, consultant,⁹ Helena Lam, consultant,¹⁰ Yu Y Kun Yugt, professor,⁴ Ryoko Minekawa, postdoctoral associate professor,² Jun Wang, professor,¹² Tze K Lau, professor,⁷ Kypros H Nicolaides, professor,³ Y M Dennis Lo, professor^{1,3,7}

Análisis Trisomía 21: 753 embarazadas
Sensibilidad: 100%
Especificidad: 97.9%

¹Centre for Research into Circulating Fetal Nucleic Acids, Li Ka Shing Institute of Health Sciences, Department of Clinical Pathology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China
²Department of Obstetrics and Gynaecology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China

ABSTRACT
Objectives To validate the clinical efficacy and practical feasibility of massively parallel maternal plasma DNA sequencing to screen for fetal trisomy 21 among high risk pregnancies clinically indicated for amniocentesis or chorionic villus sampling.

Conclusion Multiplexed maternal plasma DNA sequencing analysis could be used to rule out fetal trisomy 21 among high risk pregnancies. If referrals for amniocentesis or chorionic villus sampling were based on the sequencing test results, about 98% of the invasive diagnostic procedures could be avoided.

Ácidos nucleicos circulantes en plasma (CNAs)

Descubiertos en 1948

1989 se asocia a cáncer (Biopsia líquida)

1997 Lo et al. ,presencia de CNAs fetales en plasma materno

Proviene de la apoptosis del trofoblasto (origen placentario)

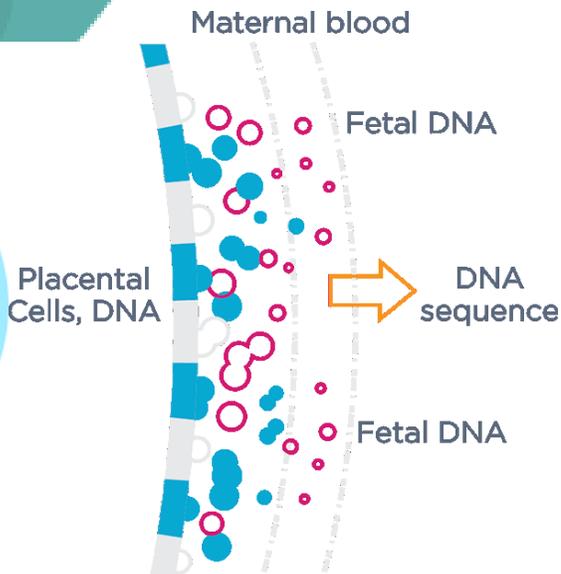
Supone entre un 5-8% del ADN total materno

Crece durante el embarazo

Puede detectarse precozmente (semana 9)

Desaparece luego del parto

Contenido de ADN mayor que en células fetales



Non-Invasive Prenatal Screening (NIPS)

NIPT



Integrated screening



Serum integrated screening



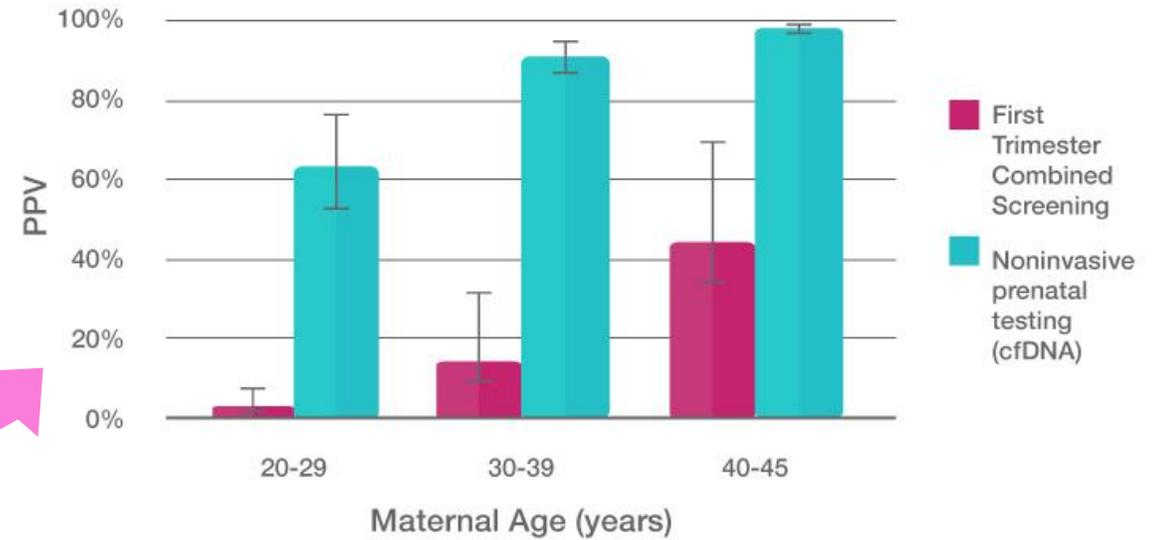
Quad screening



First trimester screening



Trisomy 21 PPVs: NIPT vs. First Trimester Combined Screening



$$PPV: VP / (VP + FP)$$

Tasa de Falsos Positivos:
 Screening combinado: 3-5%
 NIPS: 0.5%

VISION

· HÉRITAS PRENATAL ·

www.heritas.com.ar/vision

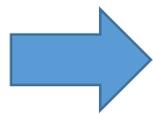
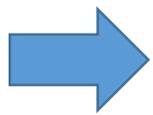
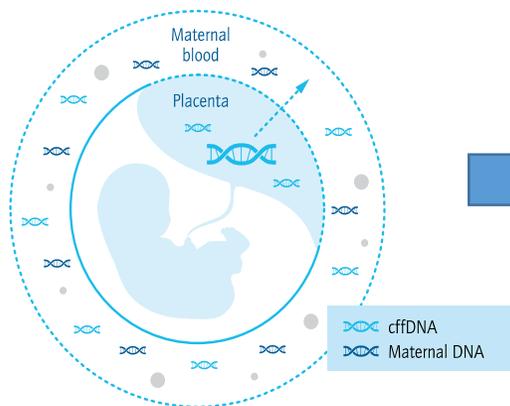
Twitter @heritasArg

El test

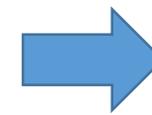
Héritas Prenatal Visión es un ensayo no invasivo conocido como NIPT (Non Invasive Prenatal Testing) que fue desarrollado por nuestro equipo de Heritas, siendo el primero de este tipo en ser desarrollado **completamente en el país**.

Esto significa que tu muestra **NO** es enviada al exterior para tu tranquilidad. De esta manera, los datos se conservan confidencial acorde a las leyes Argentinas vigentes de protección de datos personales.

Flujo de trabajo NIPS



```
ATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA
TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGT
GAACTGTCAAAACTTTTAACACCG
TGTTGCTTCGGCGGCGCCCGCAAGC
GGCCTGCCGTGGCAGATCCCCAACG
TCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA
CAGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
CGATACTTCTGAGTGTTCTTAGCGA
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGA
ACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCAT
CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGA
GATGAAGAACGCAGCGAAACGCGA
```



Extracción cfADN

- Sangre entera colectada en tubos especiales para evitar liberación del ADN genómico materno
- Se separa el plasma y se extrae ADN libre

Biblioteca y Secuenciación

- Preparación de bibliotecas Truseq Nano y enriquecimiento de regiones de interés
- Secuenciación con secuenciador Illumina® NextSeq500, HO 1x75pb

Análisis Bioinformático

- Conteo estadístico de secuencias para cada cromosoma y comparación contra la DB euploide
- Sistema de cuádruple puntaje e inspección visual de los plots
- Determinación de %FF y sexo fetal por machine learning

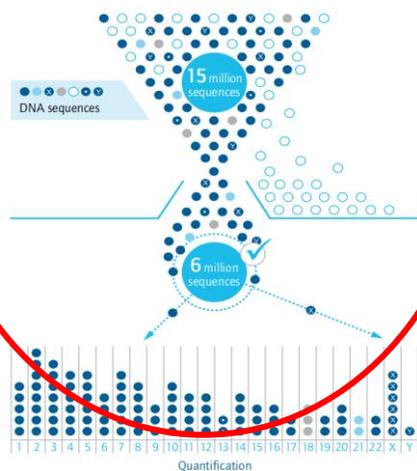
Análisis Genético

- Análisis de resultados y confección de reporte en contexto clínico
- Asesoramiento genético a cargo de médico genetista especialista

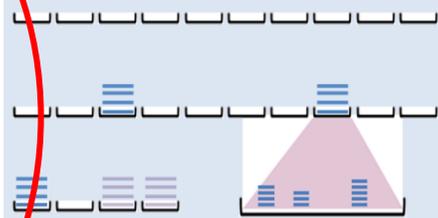
Non-Invasive Prenatal Screening (NIPS)

➤ Metodología de secuenciación

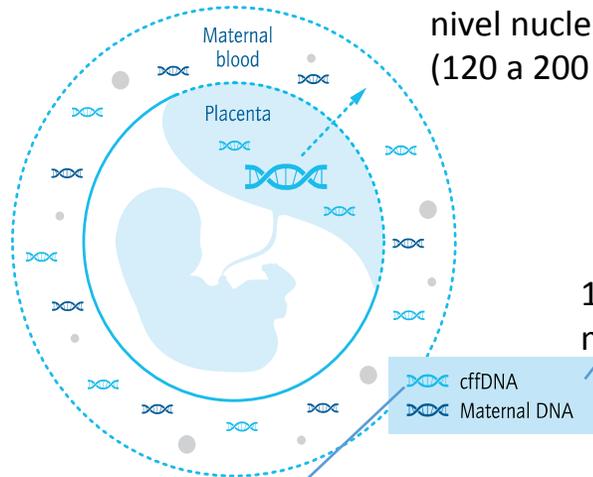
Whole Genome Sequencing



Targeted Sequencing Limited to Few Chromosomes, Loci



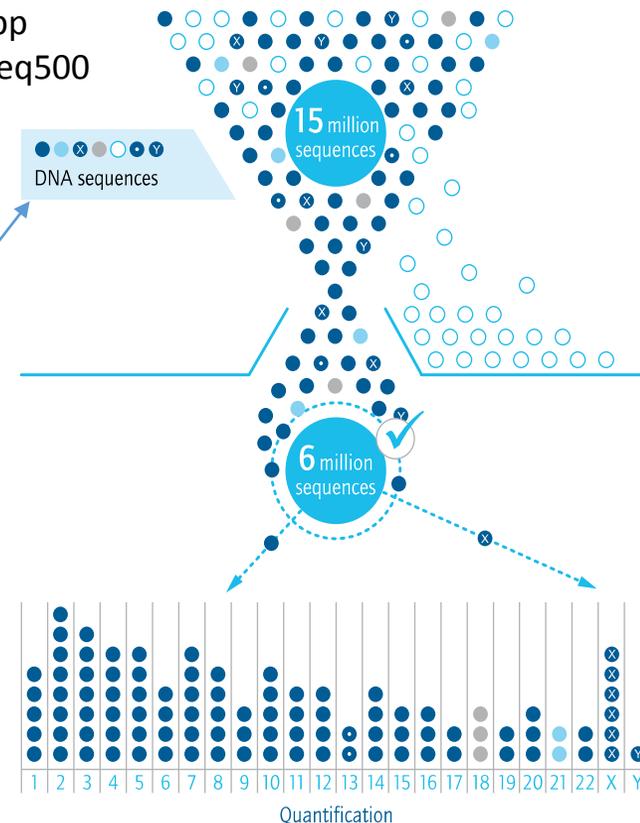
Target Sequencing



DNA ya fragmentado a nivel nucleosomas (120 a 200 bp)

1/3 a 1/4 unique mapped reads

Illumina Single reads
1x75 bp
NextSeq500



5-10% cffDNA

Depende de

1. Edad gestacional (minimo 10 semanas)

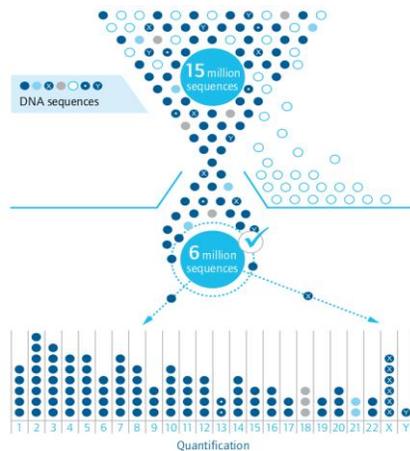
2. High BMI,

Menos del 3% --- falsos negativos!!

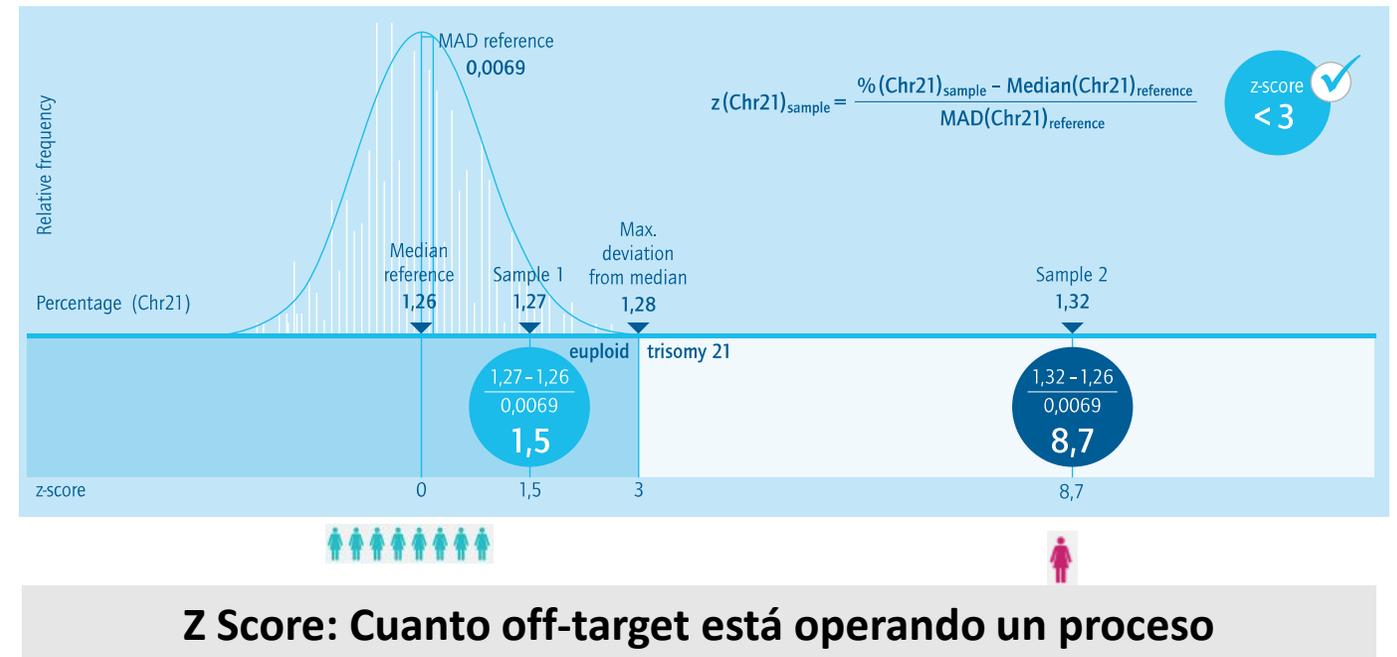
Construcción de la BD euploide y validación

➤ Metodología de secuenciación

Whole Genome Sequencing



➤ Base de datos de referencia euploide: 68 mujeres embarazadas



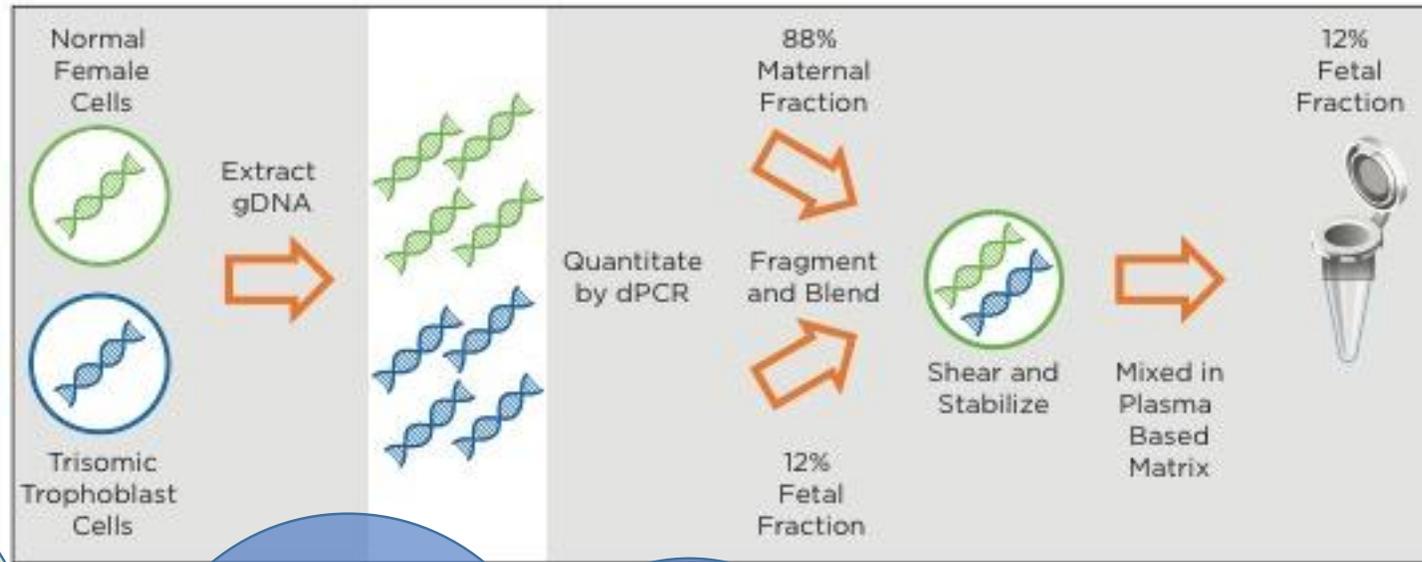
➤ Validación con controles comerciales

- 6 controles SeraCare® NGS
- Trisomías T21, T18, T13 a diferentes FF
- **Ensayos de sensibilidad y especificidad**

➤ Cohorte de validación

16 mujeres embarazadas con riesgo aumentado de presentar aneuploidías

CONTROLES POSITIVOS



T18
12%

T21
8%

T21
4%

T21
2%

T21
1%

T13
12%

Utilizados para puesta a punto y como controles interno

%FF: FRACCIÓN FETAL

% de fragmentos de ADN de origen fetal en relación al monto total de ADN que contiene el plasma materno

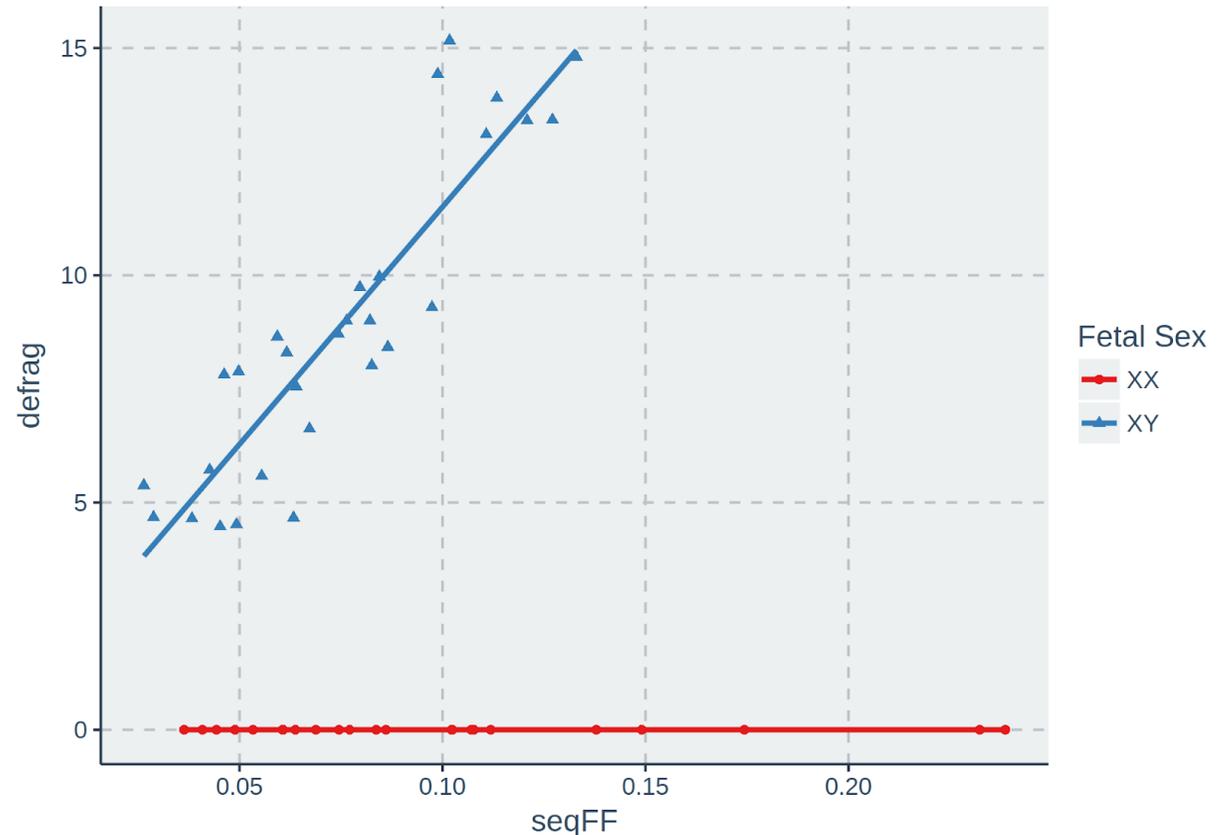
SeqFF (Sequenom) Kim SK, et. al.

Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. Prenat Diagn. 2015 Aug;35(8):810-5. doi: 10.1002/pd.4615. Epub 2015 Jun 3

Defrag (wisecondor) Roy Straver, et. al.

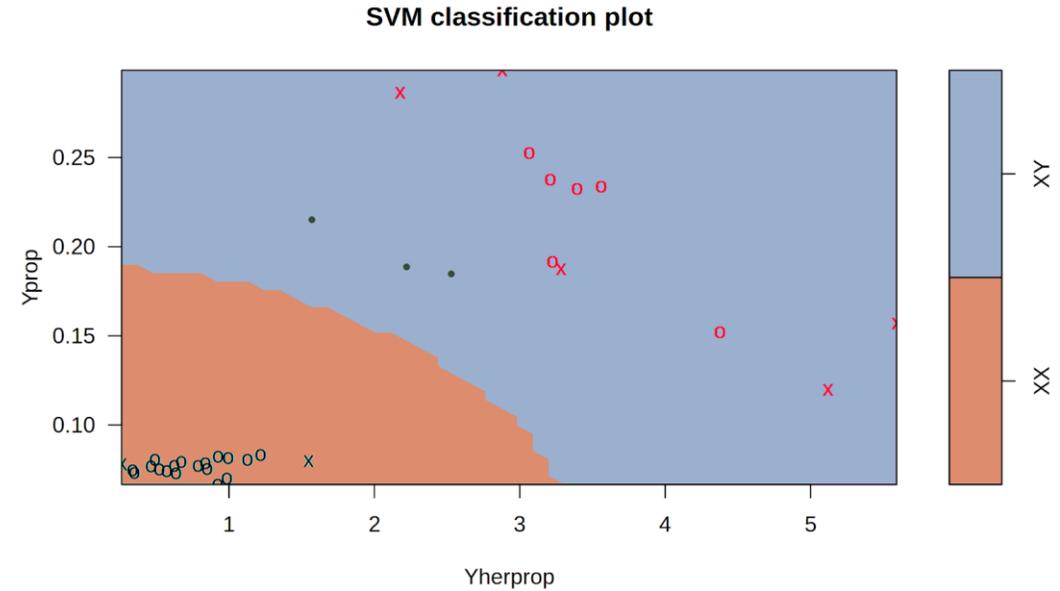
WISECONDOR: detection of fetal aberrations from shallow sequencing maternal plasma based on a within-sample comparison scheme, Nucleic Acids Research, Volume 42, Issue 5, 1 March 2014, Pages e31, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt992>

SeqFF vs defrag (Wisecondor, only XY)



SEXO FETAL

Reference	
Prediction	XX XY
XX	13 0
XY	0 7
Accuracy	: 1
95% CI	: (0.8316, 1)
No Information Rate	: 0.65
P-Value [Acc > NIR]	: 0.0001812
Kappa	: 1
McNemar's Test P-Value	: NA
Sensitivity	: 1.00
Specificity	: 1.00
Pos Pred Value	: 1.00
Neg Pred Value	: 1.00

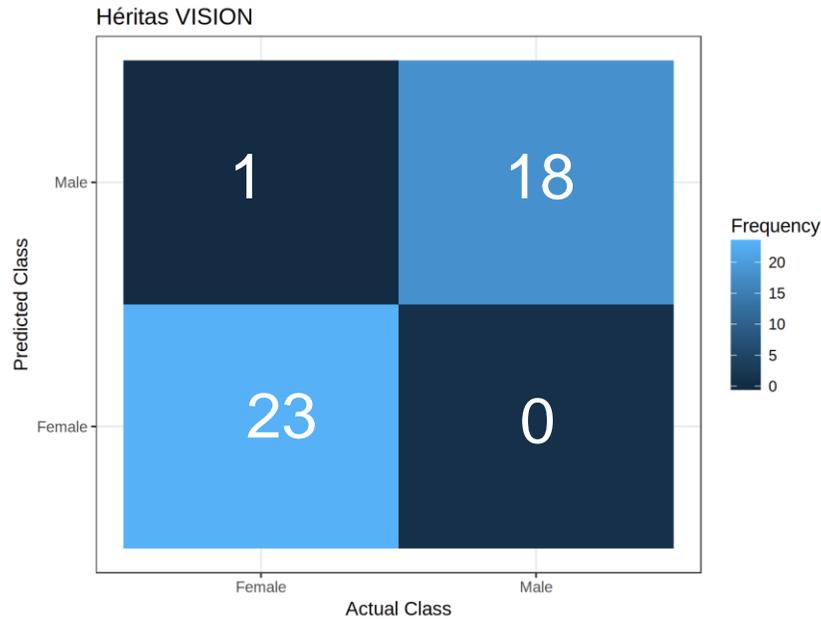


$$YHeritasProportion = (gcorrectedchrYreads / MAPQ30reads) * 1000 / FF$$

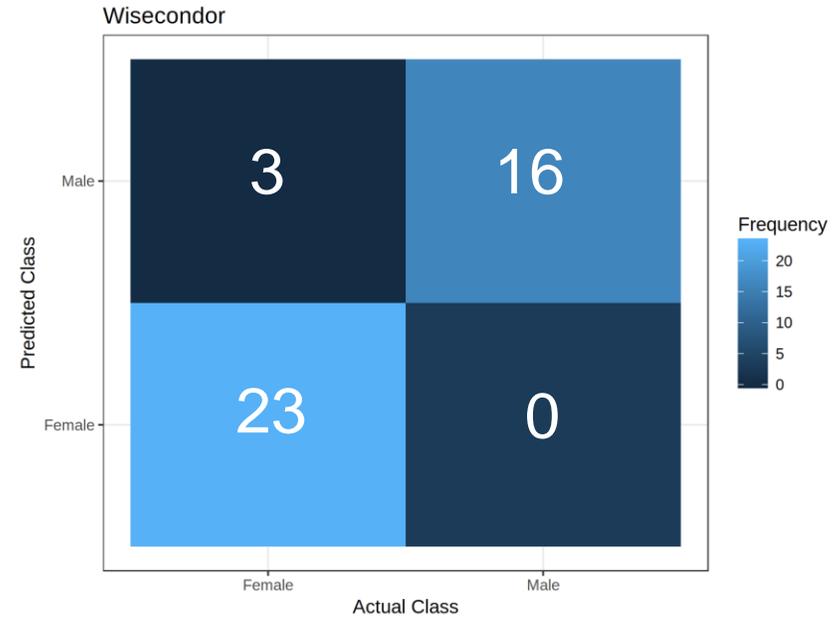
$$YProportion = gcorrectedchrYreads / rawchrYreads$$

- Support Vector Machine
- Fetal gender assignment by ultrasound

➤ Validación de sexo fetal con 44 muestras de cohorte externa*



Sensitivity : 0.9583
Specificity : 1.0000
Pos Pred Value : 1.0000
Neg Pred Value : 0.9474



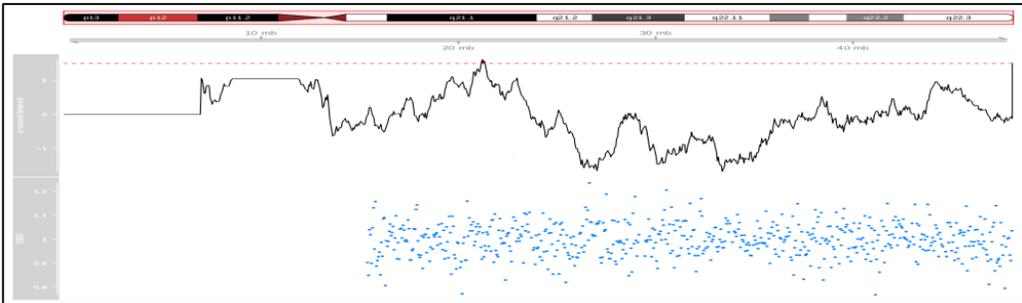
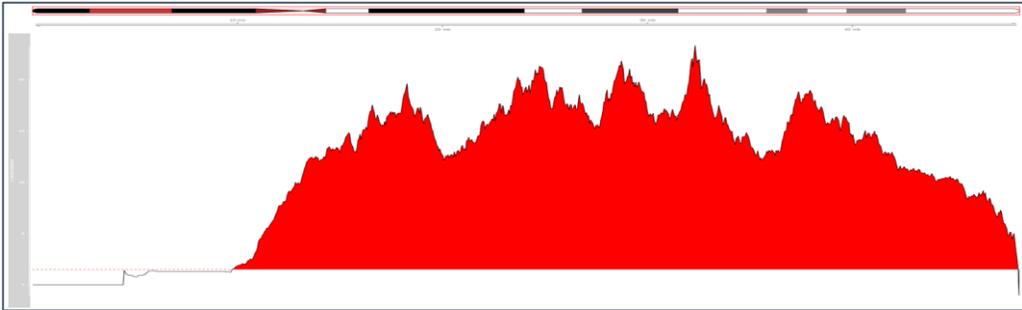
Sensitivity : 0.8846
Specificity : 1.0000
Pos Pred Value : 1.0000
Neg Pred Value : 0.8421

* Bayindir B, et al; Noninvasive prenatal testing using a novel analysis pipeline to screen for all autosomal fetal aneuploidies improves pregnancy management. Eur J Hum Genet. 2015 Oct;23(10):1286-93.

Puntajes para detección de aneuploidías fetales

* Scores	Normal	Trisomy
Z Score	< 2.5	> 3
ZZ Score	< 2.5	> 3
BM Score (Bin Median)	< 1	> 1.5
OM Score (Other Median)	-	< 1

*[Eur J Hum Genet.](#) 2015 Oct;23(10):1286-93. doi: 10.1038/ejhg.2014.282. Epub 2015 Jan 14.



- **Autosomal representation (AR) chr21:** % reads mapped chr21 / all autosomal reads
- **Z-score chr21:** $(AR \text{ chr21} - \text{median}(AR \text{ chr21 DB })) / SD (AR \text{ chr21 DB })$
- **ZZ-score chr21:** $(Z\text{-score chr 21} - \text{median} (Z\text{-scores autosomes })) / SD (Z\text{-scores autosomes })$
- **BM chr21:** median of z-scores measured per 5Mb bin in the autosome of interest
- **OM:** median of the 5Mb Z-scores over the remaining bins

El uso de 4 puntajes permite discriminar CNVs maternos

- RESULTADOS POSIBLES:**
- DETECTADO
 - NO DETECTADO
 - NO DETERMINADO



VISION
HÉRITAS PRENATAL

Disponible: mayo 2017

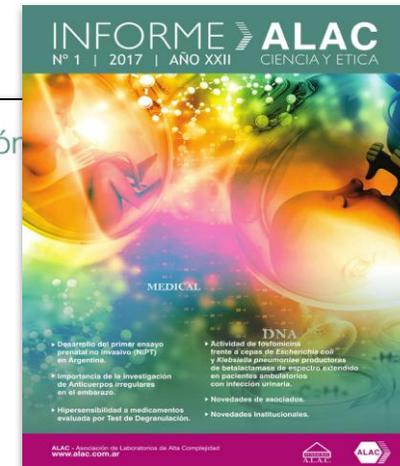
- Trisomía 21, 18 y 13
- Monosomía del X
- Sexo fetal
- Otras Trisomías (7, 9, 15, 16, y 22)
- Hallazgos incidentales con alteración ecográfica

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

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

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

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

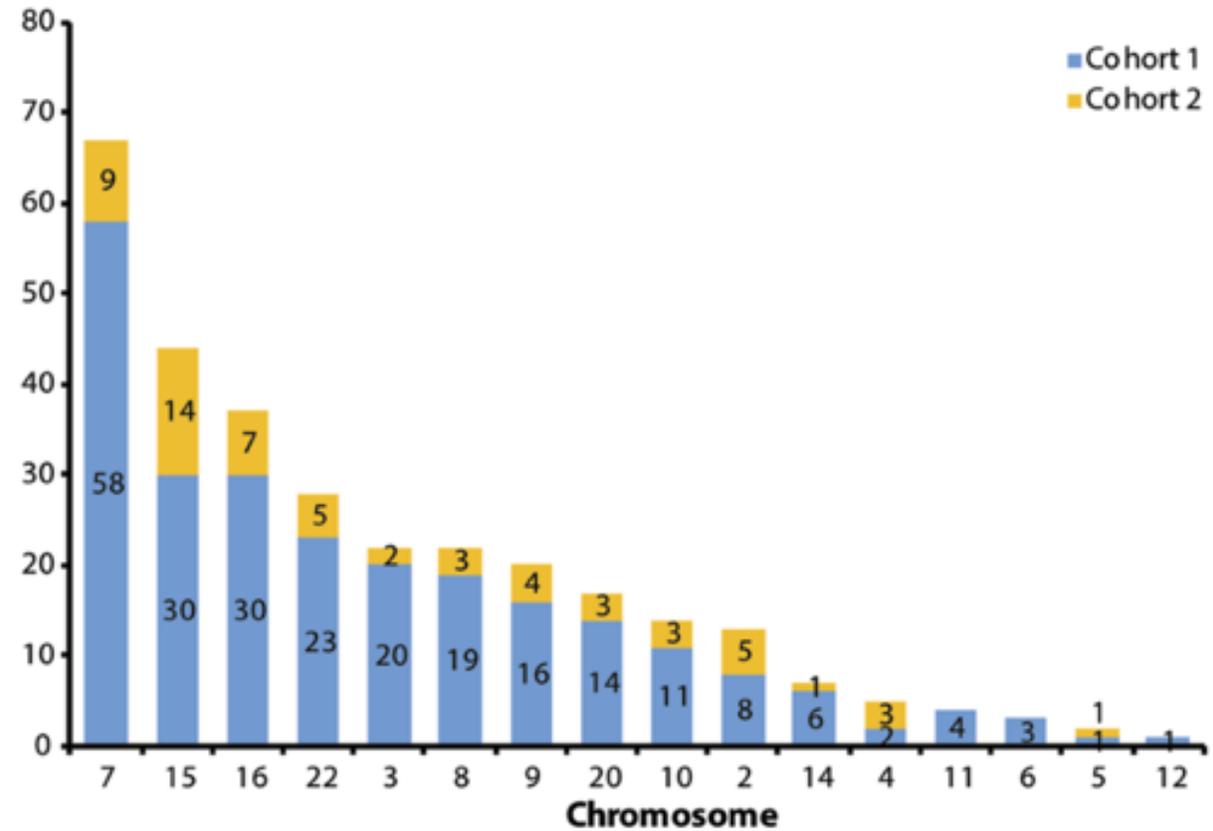
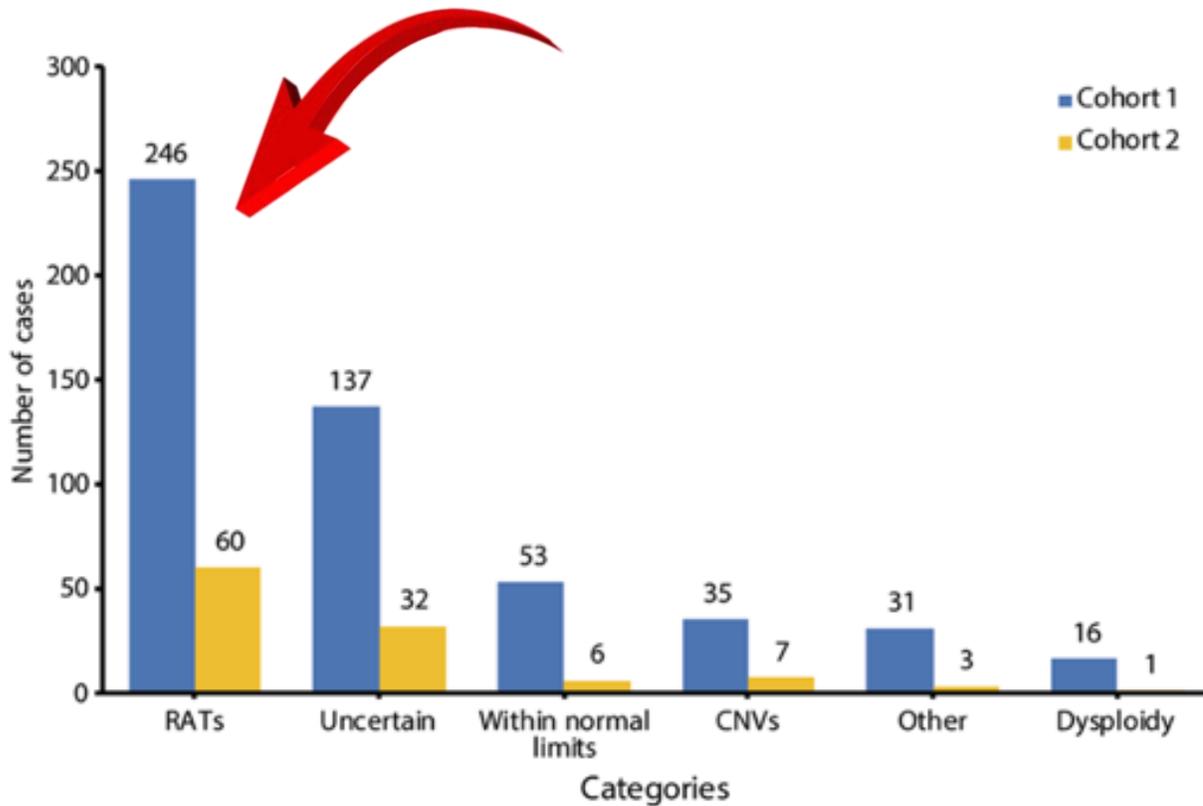


PREGNANCY

Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of fetoplacental disease

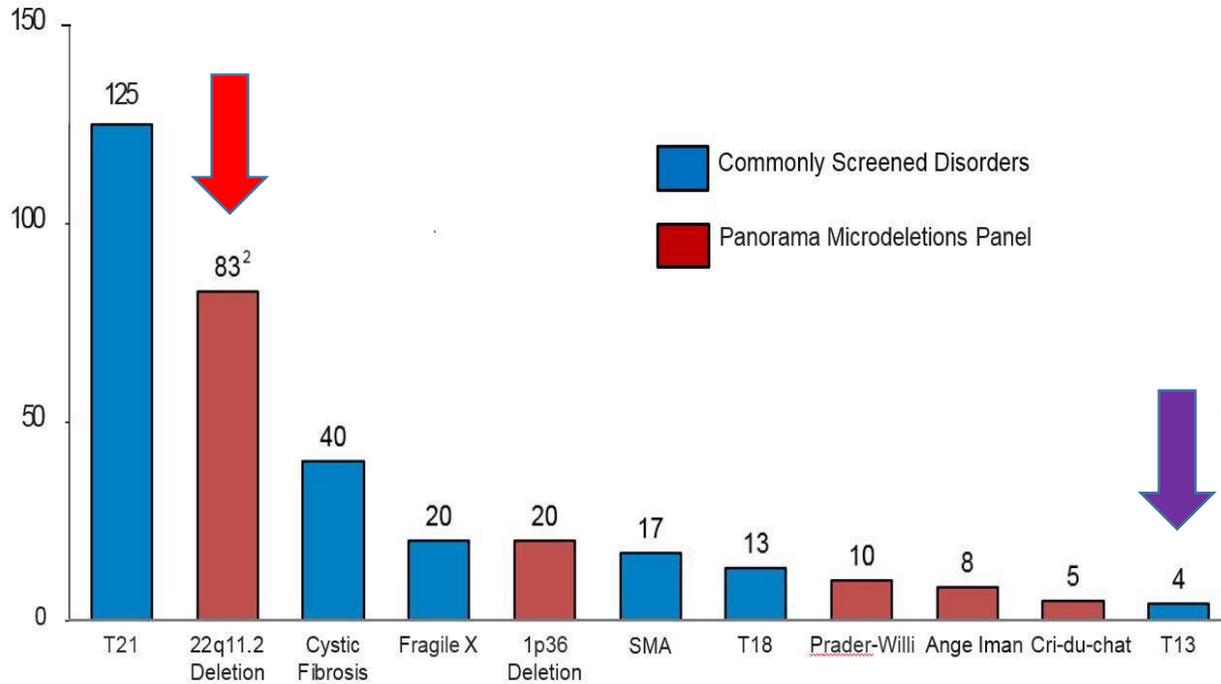
Mark D. Pertile,^{1,2*} Meredith Halks-Miller,^{3,4*} Nicola Flowers,¹ Catalin Barbacioru,⁴ Sarah L. Kinnings,³ Darcy Vavrek,³ William K. Seltzer,³ Diana W. Bianchi^{5,6†}

N=89,817



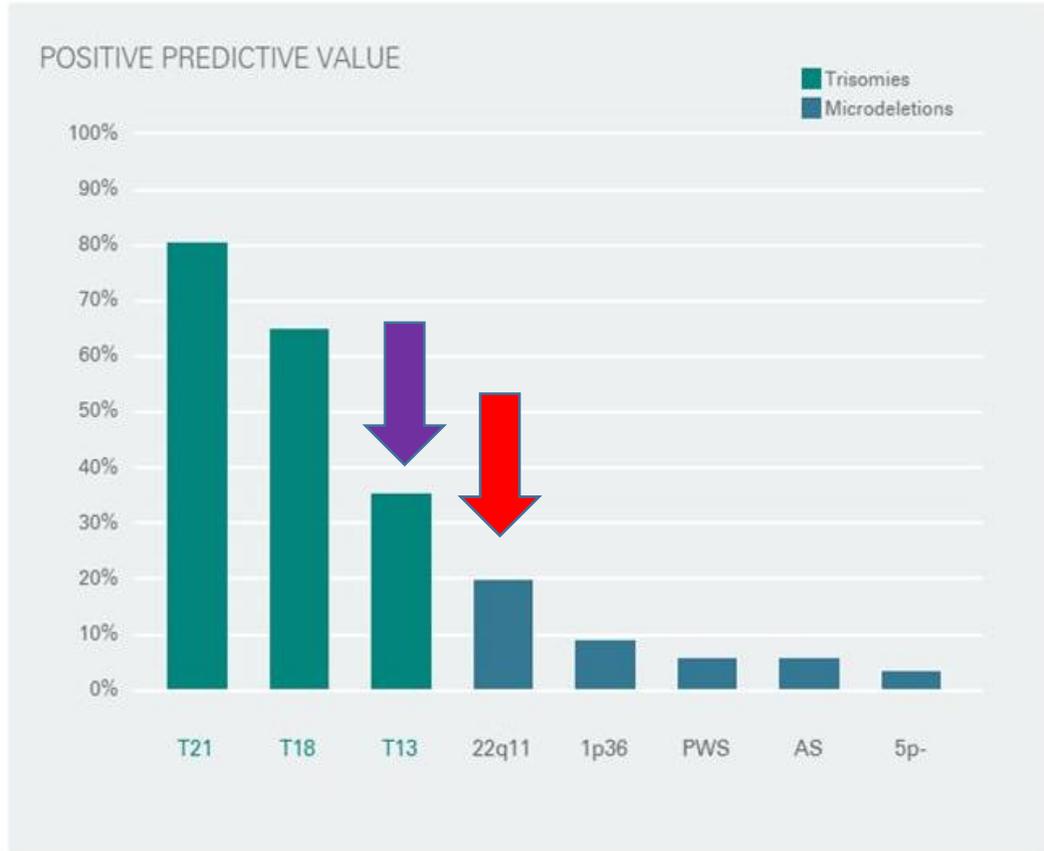
Microdelecciones???

Incidence out of 100,000 Births¹



1. Hall. Panorama™ Non-invasive Prenatal Screening for Microdeletion Syndromes. 2013.
2. Gross, et al. Clinical experience with single-nucleotide polymorphism-based non-invasive prenatal screening for 22q11.2 deletion syndrome. Ultrasound Ob Gyn, 2016.

POSITIVE PREDICTIVE VALUE (PPV) OF THEORETICAL GENETIC TEST WITH FALSE-POSITIVE RATE (FPR) OF 0.1%*



External Quality Assessment (EQA) – College of American Pathologists (CAP) 2018 - NIPT-A – 1er envío



CAP

Page 2

Results must be received at the CAP no later than midnight, Central Time by the due date below:

May 29, 2018

**NIPT-A
2018**

Last Updated: May 29, 2018

KIT 31636440 7 02 75

CAP # 7194540 - 01 SEQ # 01

Products:NIPT

CIBIC Centro de Diagnostico

Laura Ghidara

TEL# 54-341449

21



COLLEGE of AMERICAN
PATHOLOGISTS

Challenges:

- Extracción de 3 muestras de ADN circulante a partir de plasma (1mL)
- A informar:
 - ✓ Edad Gestacional , Edad Materna
 - ✓ % Fracción Fetal en ADN circulante
 - ✓ Aneuploidias posibles T21, T18 y T13
 - ✓ Sexo fetal
 - ✓ Interpretación del resultado

VISION

▪ HÉRITAS PRENATAL ▪

Resumen resultados CAP

VISION
HÉRITAS PRENATAL



COLLEGE of AMERICAN
PATHOLOGISTS

VISION NIPT completó con éxito todos los resultados de Proficiencia de calidad externa del esquema 2018 de la CAP



Edad Gestacional



% Fracción Fetal



Aneuplodías



Sexo Fetal

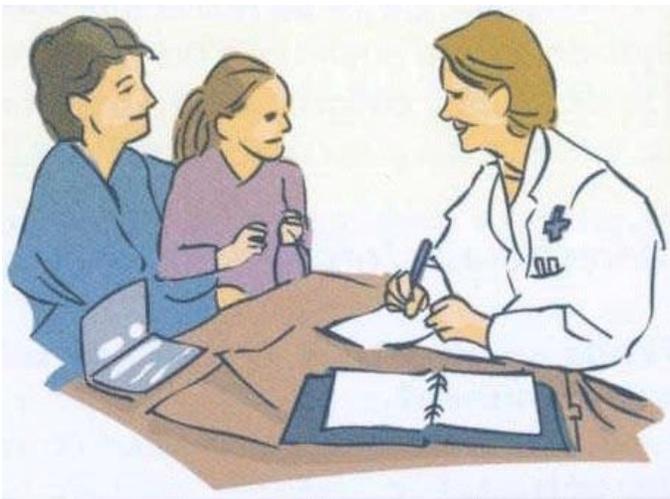


Interpretación



NOVIEMBRE 2018 → EMQN
NOVIEMBRE 2018 → CAP-NIPT-B

Consentimiento informado



	Sistema de Gestión Integrado Registro	RG 552
		Rev. 07
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TEST PRENATAL NO-INVASIVO HERITAS PRENATAL VISION		Sector: SAB

Para completar por personal de Cíbic S.A.

Código 2235	Nro. de Ingreso Cíbic:
--------------------	------------------------

Nombre y Apellido: _____

Fecha de nacimiento: _____

Edad materna: _____ DNI: _____

FUM: _____ Fecha última Ecografía fetal: _____

Semanas de gestación: _____ Altura: _____ Peso: _____

Embarazo gemelar (marque lo que corresponda) SI [] Monocorial [] Bicorial [] No sabe []

NO []

Indicación del estudio:

Edad materna avanzada: SI [] NO []

Screening 1er trimestre alterado: SI [] NO []

Anomalías ecográficas fetales: SI [] NO []

Bajo riesgo/voluntad materna: SI [] NO []

Observaciones: _____

Al firmar abajo, yo, la paciente que se somete a la prueba, reconozco que:

Se me ha brindado la oportunidad de formular preguntas y conversar con mi médico sobre los beneficios y limitaciones de la(s) prueba(s) genética(s) que me realizarán según se indica en el formulario de prueba correspondiente.

He conversado con el médico que solicita la prueba acerca de la fiabilidad de los resultados DETECTADA, SOSPECHADA, NO-DETECTADA y NO-DETERMINADA y el nivel de certeza que ofrece cada uno de estos resultados. Se me ha informado acerca de la disponibilidad y la importancia del asesoramiento genético, he tenido al menos una consulta con personal médico entrenado en asesoramiento de riesgo genético.

He leído este documento en su totalidad y habiendo entendido todo lo expuesto en el mismo, acepto expresamente someterme a la prueba genética por mi médico solicitada y conversaré sobre los resultados con un profesional médico.

Marque según corresponda

Deseo saber **aneuploidías en los cromosomas 21, 18, 13, y X** SI [] NO []

Deseo saber **aneuploidías en los cromosomas 7, 9, 14, 15, 16 y 22** SI [] NO []

Deseo saber **el sexo fetal** SI [] NO []

Deseo saber **hallazgos incidentales de aneuploidías en otros cromosomas y/o microdeleciones/microduplicaciones patogénicas por sospecha ecográfica *** SI [] NO []

***Este ítem será considerado únicamente ante presentación de reporte ecográfico, donde se expliciten claramente los hallazgos ecográficos evidenciados.**

Modelos de reporte



Información de la Paciente

Apellido Paciente: Fecha de toma de muestra: 20.07.18
 Nombre Paciente: Edad materna: 31
 ID acceso: Médico referente:
 Gestación: Única Día de reporte: 6.08.18
 IMC (kg/m²): 19,34

RESULTADOS DEL ANÁLISIS

EDAD GESTACIONAL
14 sem

FRACCIÓN ADN FETAL
8.47 %

**ANEUPLOIDÍAS
NO
DETECTADAS**

HALLAZGOS INCIDENTALES

NO DETECTADOS

CRÓMOSOMA Y

DETECTADO

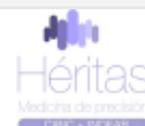
CRÓMOSOMAS ANALIZADOS SIN HALLAZGOS RELEVANTES

21, 18, 13, X, 7, 9, 14, 16, 16, 22

Resultados detallados

Condición testeada	% Riesgo a priori *	% Riesgo personalizado **	Resultado
Trisomía 21	0.17%	< 0.01%	NO DETECTADA
Trisomía 18	0.08%	< 0.01%	NO DETECTADA
Trisomía 13	0.08%	< 0.01%	NO DETECTADA
Monosomía X			NO DETECTADA
Otras Trisomías			NO DETECTADAS

(*) Riesgo a priori calculado según: Snijders RJ, Sundberg K, Holzgreve W, Henry G, Nicolaides KH. Maternal age and gestation-specific risk for trisomy 21. Ultrasound Obstet Gynecol. 1999;13(3):167-70. APA Nicolaides, K. H. (2003). Screening for chromosomal defects. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 21(4), 313-321. (**) Riesgo personalizado calculado según: Skkama-radtz B, Johansson LF, De boer EN, et al. NIPTRIC: an online tool for clinical interpretation of non-invasive prenatal testing (NPT) results. Sci Rep. 2016;6:38059.



Información de la Paciente

Apellido Paciente: Fecha de toma de muestra: 14.07.18
 Nombre Paciente: Edad materna: 32
 ID acceso: Médico referente:
 Gestación: Única Día de reporte: 6.08.18
 IMC (kg/m²): 25

RESULTADOS DEL ANÁLISIS

EDAD GESTACIONAL
17 sem

FRACCIÓN ADN FETAL
8.32 %

**ANEUPLOIDÍAS
DETECTADA**

Trisomía 18

HALLAZGOS INCIDENTALES

NO DETECTADOS

CRÓMOSOMA Y

NO DETECTADO

CRÓMOSOMAS ANALIZADOS SIN HALLAZGOS RELEVANTES

21, 13, X, 7, 9, 14, 16, 16, 22

Resultados detallados

Condición testeada	% Riesgo a priori *	% Riesgo personalizado **	Resultado
Trisomía 21	< 0.01%	< 0.01%	NO DETECTADA
Trisomía 18	0.04%	> 99.99%	DETECTADA
Trisomía 13	0.04%	< 0.01%	NO DETECTADA
Monosomía X			NO DETECTADA
Otras Trisomías			NO DETECTADAS

(*) Riesgo a priori calculado según: Snijders RJ, Sundberg K, Holzgreve W, Henry G, Nicolaides KH. Maternal age and gestation-specific risk for trisomy 21. Ultrasound Obstet Gynecol. 1999;13(3):167-70. APA Nicolaides, K. H. (2003). Screening for chromosomal defects. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 21(4), 313-321. (**) Riesgo personalizado calculado según: Skkama-radtz B, Johansson LF, De boer EN, et al. NIPTRIC: an online tool for clinical interpretation of non-invasive prenatal testing (NPT) results. Sci Rep. 2016;6:38059.



POSTNATAL



Establecer las bases moleculares de la patología del paciente
Brindar herramientas que puedan utilizarse para la prognosis, tratamiento y asesoramiento familiar
Diferentes técnicas moleculares en función de la anomalía que se quiera identificar



**Cariotipo
FISH**



**Array (BACs, oligos,
SNPs, de expresión,
etc)**



**PCR (distintos
tipos)**



**Secuenciador
Sanger**



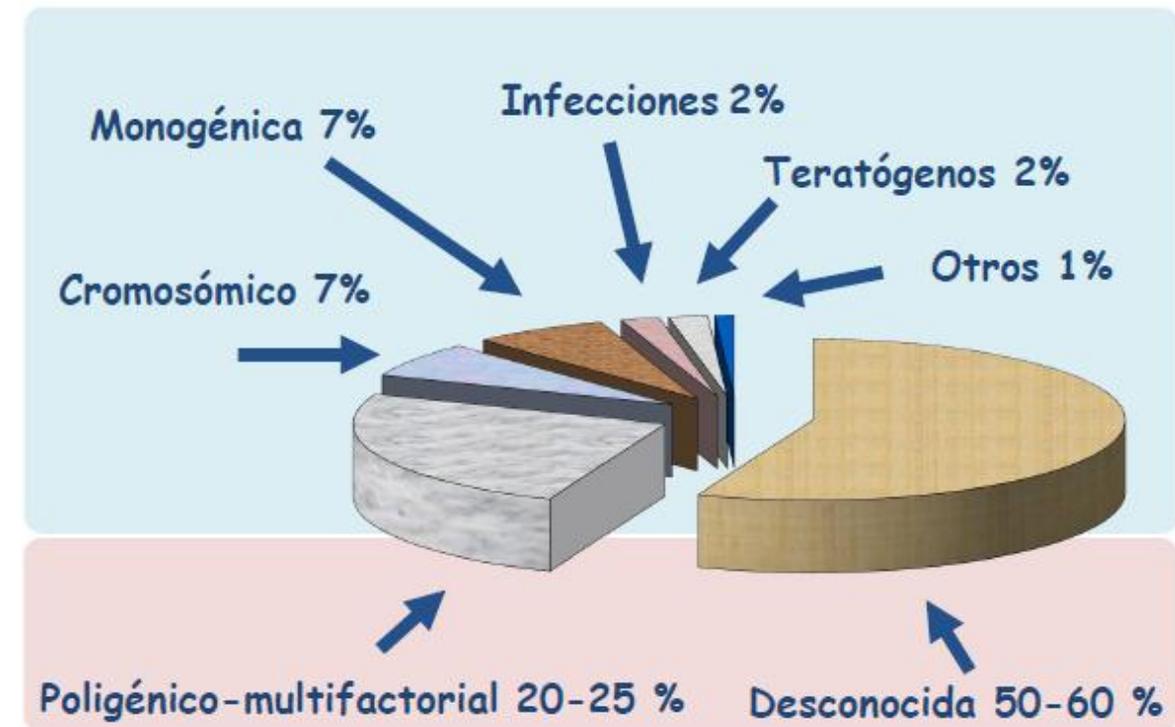
**Next Generation
Sequencing**

Anomalías Congénitas

Definición de la OMS

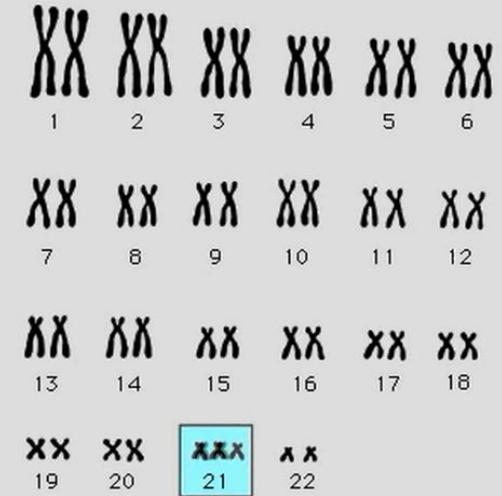
“Las anomalías congénitas se denominan también defectos de nacimiento, trastornos congénitos o malformaciones congénitas. Se trata de anomalías estructurales o funcionales, como los trastornos metabólicos, que ocurren durante la vida intrauterina y se detectan durante el embarazo, en el parto o en un momento posterior de la vida”

- Se manifiestan de forma prenatal (ej.: polidactilia) o al nacimiento (ej.: sordera congénita)
- Afectan un 2-3% de los RN
- La etiología de las anomalías congénitas es en gran parte desconocida, siendo algunas de ellas de origen genético.

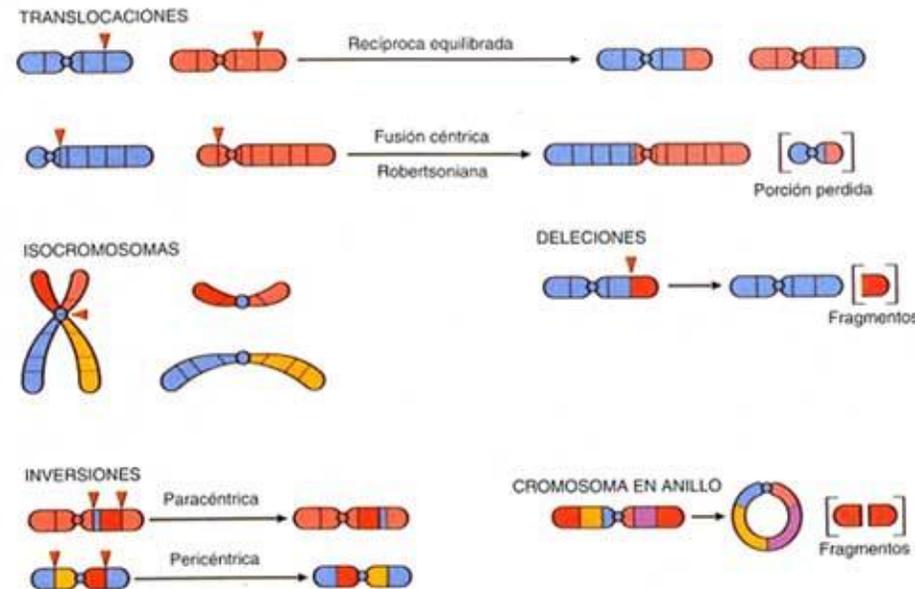
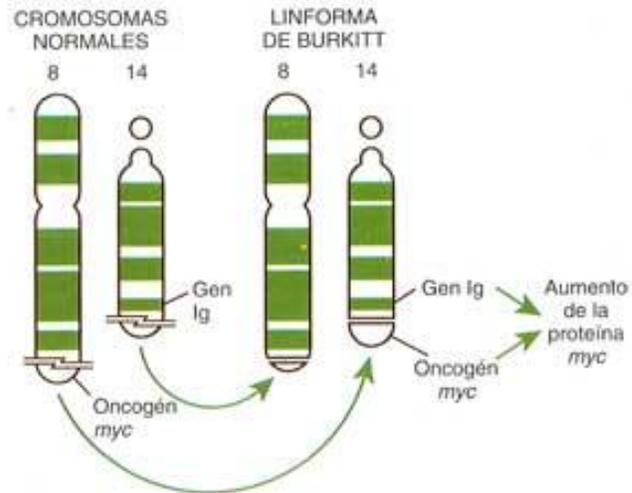


Anomalías Cromosómicas

NUMÉRICAS



ESTRUCTURALES



Anomalías Numéricas

- Hay múltiples variaciones en el número de copia en nuestro genoma en población general
 - Algunas se asocian claramente a patologías bien caracterizadas (Ej. Sme de DiGeorge)
 - CNVs: Copy Number Variations, deleciones o duplicaciones
- Conceptos generales:
- Poliploidías/Aneuploidía

Nature Reviews Genetics | AOP, published online 3 February 2015; doi:10.1038/nrg3871

ANALYSIS

A copy number variation map of the human genome

Mehdi Zarrei¹, Jeffrey R. MacDonald¹, Daniele Merico¹ and Stephen W. Scherer^{1,2}

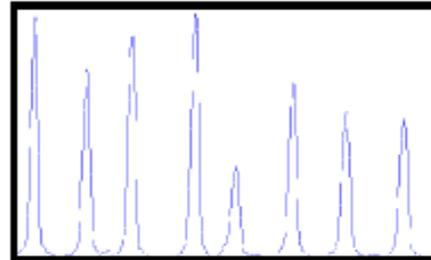
Abstract | A major contribution to the genome variability among individuals comes from deletions and duplications — collectively termed copy number variations (CNVs) — which alter the diploid status of DNA. These alterations may have no phenotypic effect, account for adaptive traits or can underlie disease. We have compiled published high-quality data on healthy individuals of various ethnicities to construct an updated CNV map of the human genome. Depending on the level of stringency of the map, we estimated that 4.8–9.5% of the genome contributes to CNV and found approximately 100 genes that can be completely deleted without producing apparent phenotypic consequences. This map will



Métodos de detección de CNVs

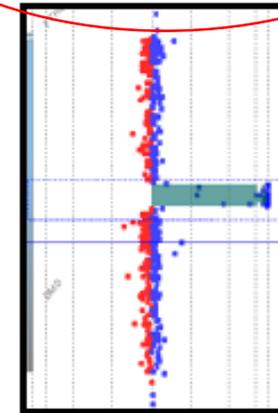
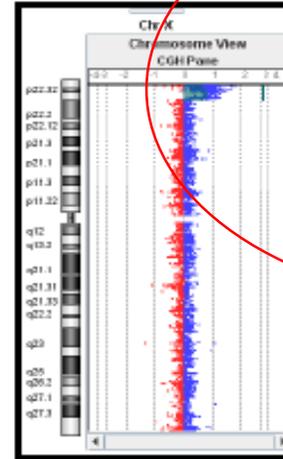
MLPA:

Resolución: 130-1 pb
Región investigada: 100 locus
(dos kits)
Tasa diagnóstica: 9-12%



Array:

Resolución: >200 Kb
Región investigada: todo el genoma
Tasa diagnóstica: 15-20%



Citogenética:

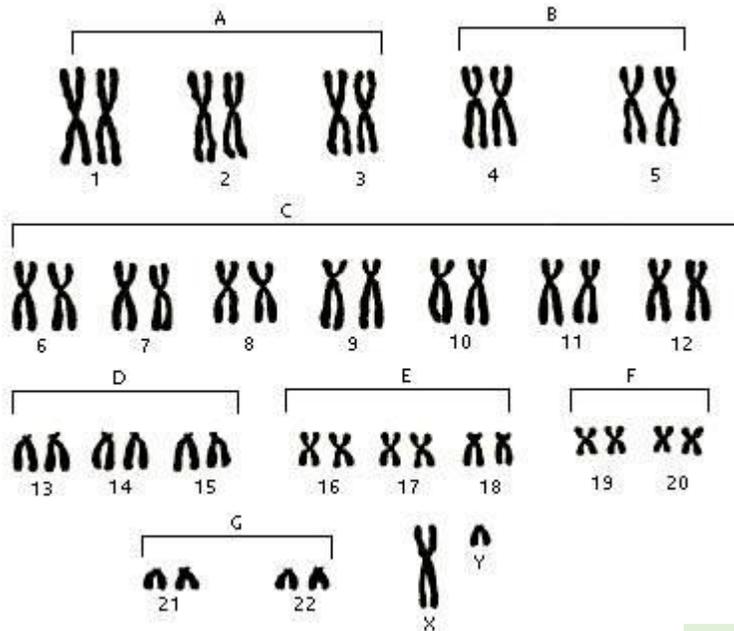
Resolución: >6-10 Mb
Región investigada: todo el genoma
Tasa diagnóstica: 3%



Array con cobertura exónica 500 genes:

Resolución: >200 Kb- exónica
Región investigada: todo el genoma
Tasa diagnóstica: >20%?

CARIOTIPO vs CGH ARRAY

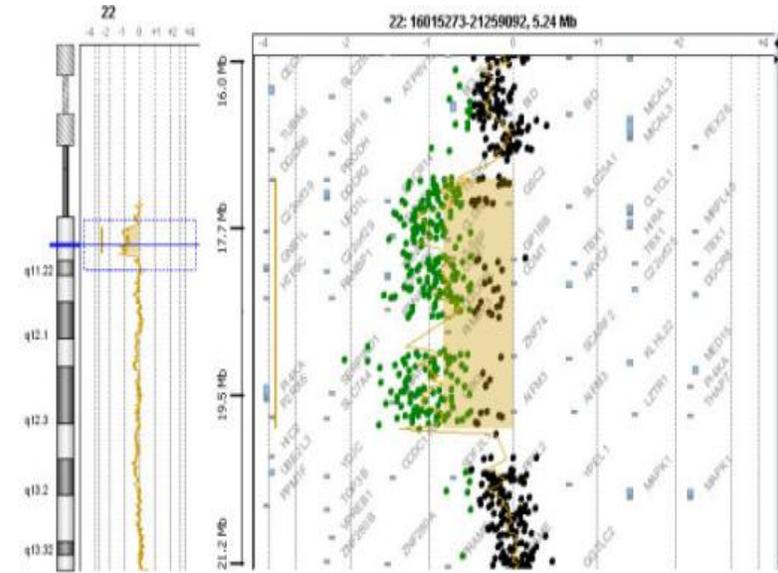


Resolución: >6-10 Mb
Región investigada: todo el genoma
Tasa diagnóstica: 3%



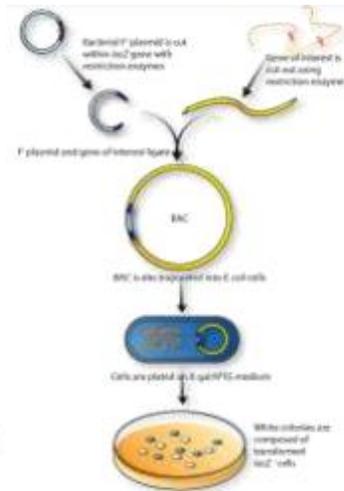
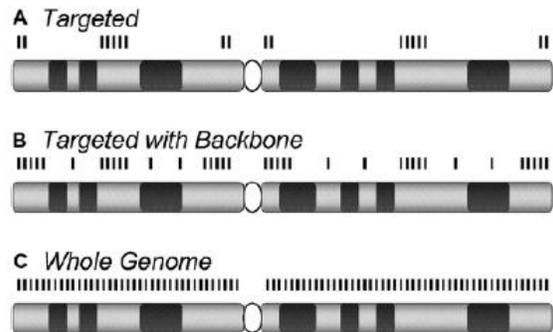
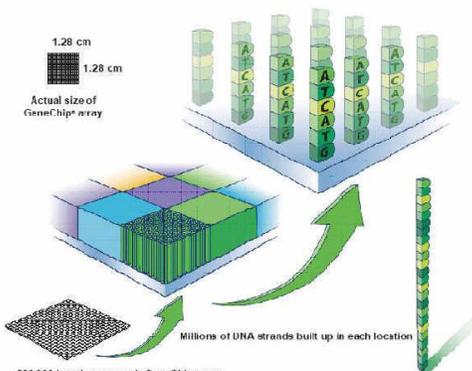
Mayor resolución (100 veces más)
Más rápido y menos engorroso
El tipo de muestra es menos problemática

Mayor número de variantes VOUS
NO detecta anomalías equilibradas
NO da información posicional



Resolución: >200 Kb
Región investigada: todo el genoma
Tasa diagnóstica: 15-20%

Características de los arrays



TIPOS



UTILIZADOS EN



ORIGINAL

Array CGH como primera opción en el diagnóstico genético: 1.000 casos y análisis de coste-beneficio[☆]



Neus Castells-Sarret^{a,b,*}, Anna M. Cueto-González^{a,c}, Mar Borregan^c, Fermina López-Grondona^a, Rosa Miró^b, Eduardo Tizzano^{a,d} y Alberto Plaja^{a,b}

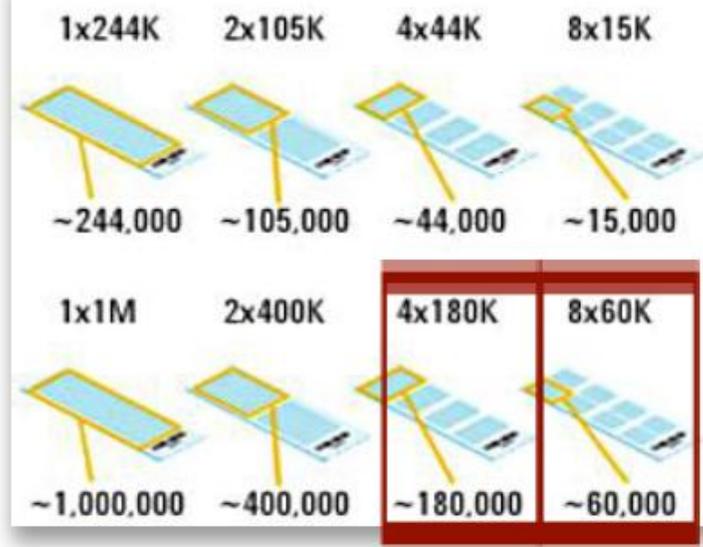
^a Àrea de Genètica Clínica i Molecular, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España

^b Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Bioquímica, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^c Facultat de Medicina, Departament de Ciències Bàsiques, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^d CIBERER, Barcelona, España

Recibido el 5 de abril de 2017; aceptado el 12 de mayo de 2017



FORMATO Y RESOLUCIÓN

Flujo de trabajo CGH



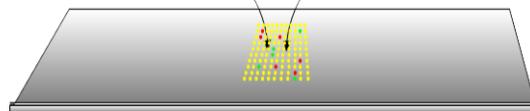
Extracción ADN

- Sangre entera con EDTA
- Sangre en papel
- Biopsia en parafina

ADN referencia

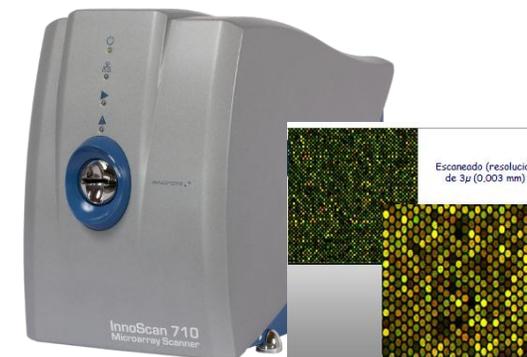


ADN muestra



Digestión, marcaje e hibridación

- Fragmentación del ADN
- Marcaje diferencial de muestra/referencia
- Hibridación de muestra/referencia



Obtención de datos

- Escaneo de la imagen
- Extracción de datos con software

- ✓ Resolución a lo largo de todo el genoma de 150Kb
- ✓ Resolución en zonas de interés de 50Kb
- ✓ Resolución 100 veces mayor que el cariotipo convencional
- ✓ Aumento del rédito diagnóstico en un 15% en relación al cariotipo convencional

American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants

Hutton M. Kearney, PhD¹, Erik C. Thorland, PhD², Kerry K. Brown, PhD³, Fabiola Quintero-Rivera, MD⁴, and Sarah T. South, PhD⁵, A Working Group of the American College of Medical Genetics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee

Disclaimer: These ACMG Standards and Guidelines are developed primarily as an educational resource for clinic



CONSIDERACIONES:

- Familiarización con los síndromes de genes contiguos
- Tamaño y naturaleza de la CNV
- Contenido genético
- Presencia en bases de datos de población control

RECOMMENDATIONS FOR SYSTEMATIC EVALUATION AND CLINICAL INTERPRETATION OF CNVs

Familiarization with well-established contiguous gene syndromes

Approaching a large segmental deletion or duplication by interrogation of single genes within the interval may not reveal the associated syndromic deletion/duplication. It is necessary that recurrent and clinically characterized deletion/duplication syndromes, any associated low copy repeat sequences, and critical regions be recognized and carefully mapped before offering clinical interpretations of microarray data. The following represent helpful reviews but do not substitute for continuing education and monitoring of the rapidly expanding medical literature: OMIM,⁷ GeneReviews,⁸ DECIPHER,⁹ and recently published reviews.^{10,11}

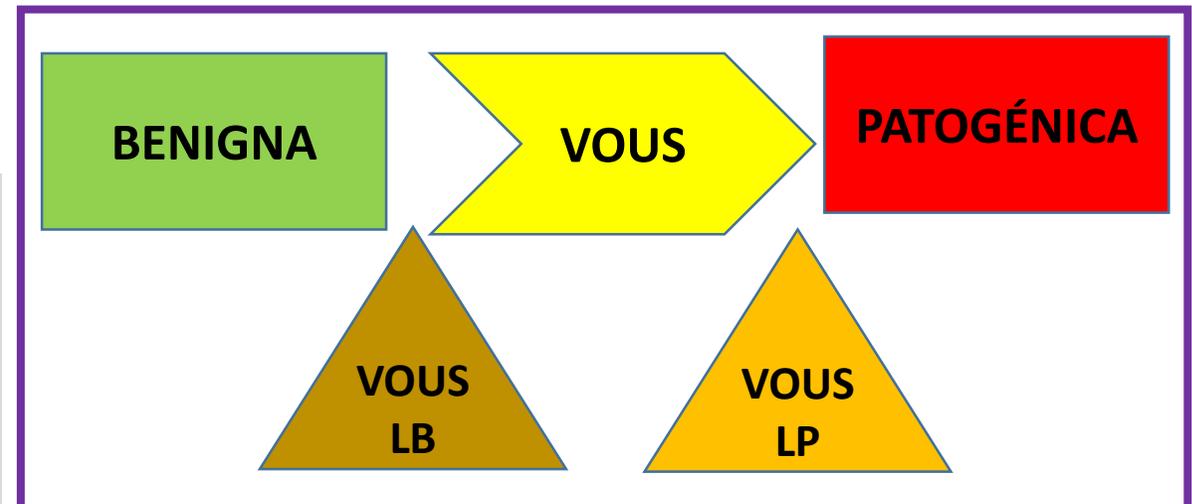
Consideration of CNV size

Although generalizations drawn between CNV size and sig-

(3) Copy number gains involving only part of a gene may result in gene disruption or altered coding sequence and should not be dismissed without further investigation when involving genes with reported haploinsufficiency.¹⁷ (4) Single-copy deletions of genes associated with recessive disease may only suggest carrier status for the condition. (5) Small CNVs involving only intronic sequence may have no effect on gene function.

Genes with no reported mutations in the medical literature. Avoid, or use great caution when, inferring a pathogenic role for a gene based solely on predicted gene function or functions characterized in model organisms or in vitro studies. This inference is speculative until well characterized in the human population.

No genes in interval. Generally, it is acceptable to adopt a laboratory policy not to report these CNVs, as there is no relevant literature to interrogate. An exception might be made if the CNV exceeds a size cutoff established by the laboratory or is located in close proximity to a well-characterized region with clear relevance to the reason for referral (e.g., a deletion bordering a holoprosencephaly locus in a patient with a holopros-



Interpretación de variantes

Database of Genomic Variants

A curated catalogue of human genomic structural variation

About the Project Downloads Links Statistics FAQ
Genome Browser Query Tool Submissions Contact Us Training Resources

DB resultados de estudios de individuos controles en un formato normalizado

ISCA Database Search

The ISCA Database Search is currently utilizing the following databases: ISCA/NCBI: November 6, 2012, OMIM: December 6, 2012, UCSC: January 3, 2013. Please contact us at clingen@clinicalgenome.org if you have any questions.

Enter search parameters

Genome Build GRCh37/hg19

Locati



About Browse DDD(UK)

Search DECIPHER

Genome Browser

Jump to position, gene or band

Go

Please enter a position, gene name, or chromosome band name in the box above to load a genome browser for that position

OMIM®

Online Mendelian Inheritance in Man®

An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders

Updated October 17, 2018

Catálogo de genes y enfermedades genéticas



GeneReviews®

Margaret P Adam, Editor-in-Chief; Senior Editors: Holly H Ardinger, Roberta A Pagon, and Stephanie E Wallace. Molecular Genetics: Lora JH Bean and Karen Stephens. Anne Amemiya, Genetic Counseling.

Seattle (WA): [University of Washington, Seattle](http://University_of_Washington_Seattle); 1993-2018.

ISSN: 2372-0697

[Copyright and Permissions](#)

Revisiones expertas de enfermedades en un formato estandarizado y con un enfoque muy clínico y aplicado

CGH array...CUANDO?



- Discapacidad intelectual / Retraso global del desarrollo (incidencia 1-3%)
- Trastorno espectro autista (incidencia 0,7%)
- Anomalías congénitas (incidencia 2-3%)
- Talla baja
- Epilepsia
- Dismorfias
- Cromosoma marcador
- Cariotipo alterado para definir región involucrada

ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013

Sarah T. South, PhD^{1,2}, Charles Lee, PhD³, Allen N. Lamb, PhD^{1,2}, Anne W. Higgins, PhD⁴ and Hutton M. Kearney, PhD⁵; for the Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee

Microarray methodologies, including array comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism-detecting arrays, are accepted as an appropriate first-tier test for the evaluation of imbalances associated with intellectual disability, autism, and multiple congenital anomalies. This technology also has applicability in prenatal specimens. To assist clinical laboratories in validation of

microarray methodologies for constitutional applications, the American College of Medical Genetics and Genomics has produced the following revised professional standards and guidelines.

Genet Med advance online publication 26 September 2013

Key Words: constitutional; guidelines; microarray; postnatal; prenatal; standards

ARTICLE

Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies

David T. Miller,^{1,*} Margaret P. Adam,^{2,3} Swaroop Aradhya,⁴ Leslie G. Biesecker,⁵ Arthur R. Brothman,⁶ Nigel P. Carter,⁷ Deanna M. Church,⁸ John A. Crolla,⁹ Evan E. Eichler,¹⁰ Charles J. Epstein,¹¹

The American Journal of Human Genetics 86, 749–764, May 14, 2010

Chromosomal microarray (CMA) is increasingly utilized for genetic testing of individuals with unexplained developmental delay/intellectual disability (DD/ID), autism spectrum disorders (ASD), or multiple congenital anomalies (MCA). Performing CMA and G-banded karyotyping on every patient substantially increases the total cost of genetic testing. The International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Consortium held two international workshops and conducted a literature review of 33 studies, including 21,698 patients tested by CMA. We provide an evidence-based summary of clinical cytogenetic testing comparing CMA to G-banded karyotyping with respect to technical advantages and limitations, diagnostic yield for various types of chromosomal aberrations, and issues that affect test interpretation. CMA offers a much higher diagnostic yield (15%–20%) for genetic testing of individuals with unexplained DD/ID, ASD, or MCA than a G-banded karyotype (~3%, excluding Down syndrome and other recognizable chromosomal syndromes), primarily because of its higher sensitivity for submicroscopic deletions and duplications. Truly balanced rearrangements and low-level mosaicism are generally not detectable by arrays, but these are relatively infrequent causes of abnormal phenotypes in this population (<1%). Available evidence strongly supports the use of CMA in place of G-banded karyotyping as the first-tier cytogenetic diagnostic test for patients with DD/ID, ASD, or MCA. G-banded karyotype analysis should be reserved for patients with obvious chromosomal syndromes (e.g., Down syndrome), a family history of chromosomal rearrangement, or a history of multiple miscarriages.



Mauricio Grisolia



María Florencia Gosso



Guadalupe Méjico



Cristian Rohr



Bianca Brun



Diego Llarrull



Priscila Aldabe



Nadia Cambados



Dalmacio Pereyra



Jorgelina Batuecas



Paula Ceccatto



Ivana Canonero



Laura Kahane



Ana Laura Ruggieri



María Fernanda Madeira





Distribuidor Exclusivo



<http://heritas.com.ar/>



@HeritasArg

