SESIÓN GENERAL ANÁLISIS CLÍNICOS

DEL CARIOTIPO AL EXOMA: ¿FIN DE LA ODISEA DIAGNÓSTICA?

Hospital General Universitari d'Alacant

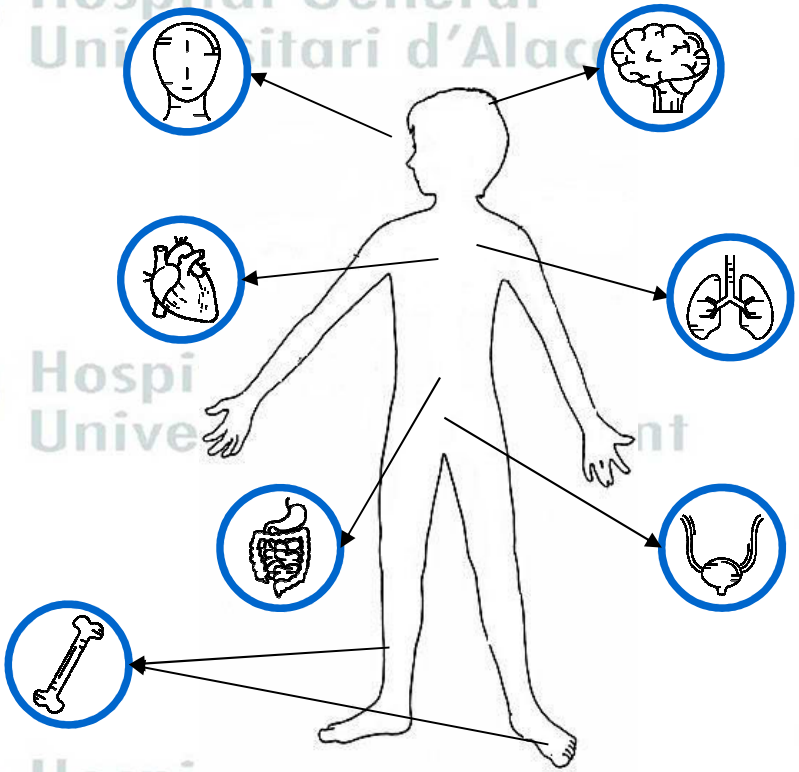
R-4 Jean Michell Santoyo García
R-4 Eloy Oliveira López

CASO CLÍNICO

- Paciente varón nacido en marzo 2002
  - Síndrome dismórfico congénito
  - Alteración global del desarrollo

- Antecedentes Prenatales
  - 20 sg Hidronefrosis bilateral
  - Amniocentesis 46,XY
- Antecedentes Familiares
  - Padres primos hermanos
  - Tío paterno Síndrome de Down
  - Hermanos menores sanos

- Patología multisistémica



GENERALITAT VALENCIANA
Hospital General Universitari d'Alacant

CASO CLÍNICO

- Patología multisistémica
  - ↑ Episodios asistenciales
  - ↑ Especialidades médicas

- 2015 Neuropediatría HGUA
- Consulta por disfagia a sólidos
- Sin diagnóstico o causa primaria de la patología
- Se sospecha causa genética

DISMORFIAS

Dolicocefalia
Asimetría facial
Paladar ojival
Retrognatia
Hipertelorismo
Exoftalmos
Raíz nasal ancha
Labios finos
Orejas Implantación baja
malrotadas y grandes

NEUROLÓGICO

Hipotonía central
Discapacidad intelectual
Retraso psicomotor y del habla
Disfagia
Parálisis nervio hipogloso
Hipoacusia bilateral
Defectos del campo visual

GENITOURINARIO

Criptorquidia
Hipospadias
Hidronefrosis bilat.
ITUs recurrentes

CARDÍACO

Comunicación interauricular
Defecto de tabique ventricular
Válvula aórtica bicúspide

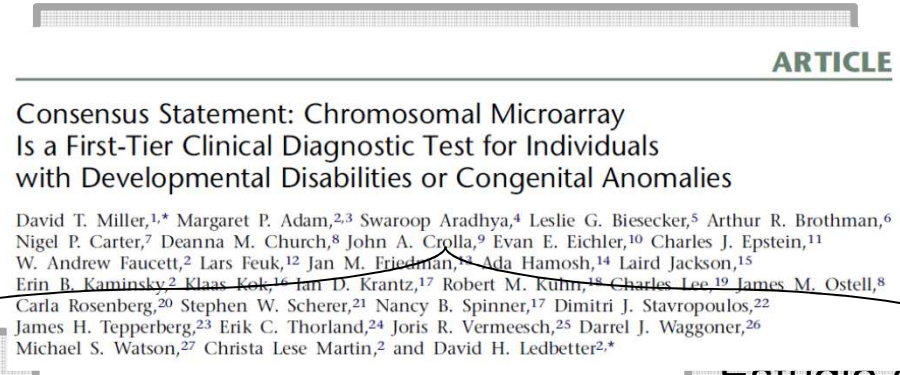
DIGESTIVO

Enfermedad de Hirschsprung
Reflujo gastroesofágico
Estreñimiento
GEAs de repetición
Vómitos

ALT. ESQUELÉTICAS

Craneosinostosis
Dismetría EEII
Actitud escoliótica
Seno dérmico
Agenesia dental
Malformación pies

ALGORITMO TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO



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] W. Andrew Faucett,[2] Lars Feuk,[12] Jan M. Friedman,[13] Ada Hamosh,[14] Laird Jackson,[15] Erin B. Kaminsky,[2] Klaas Kok,[16] Ian D. Krantz,[17] Robert M. Kuhn,[18] Charles Lee,[19] James M. Ostell,[8] Carla Rosenberg,[20] Stephen W. Scherer,[21] Nancy B. Spinner,[17] Dimitri J. Stavropoulos,[22] James H. Tepperberg,[23] Erik C. Thorland,[24] Joris R. Vermeesch,[25] Darrel J. Waggoner,[26] Michael S. Watson,[27] Christa Lese Martin,[2] and David H. Ledbetter[2,*]

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

Cariotipo
Array CGH
X-frágil

Estudio genético dirigido

¿Diagnóstico?

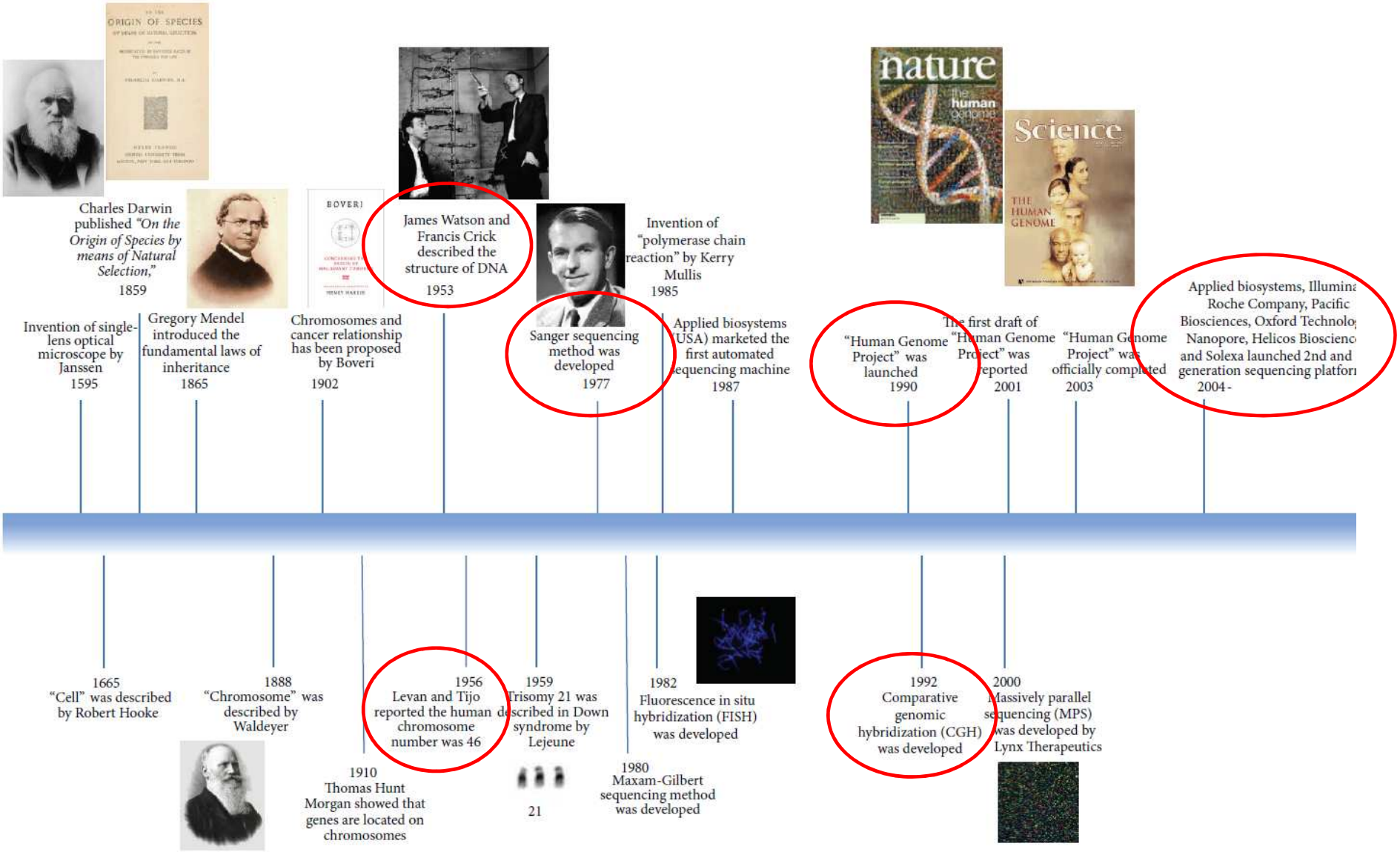
SI

NO

Asesoramiento genético
Estudios familiares

Reevaluar paciente
Nuevos estudios genéticos

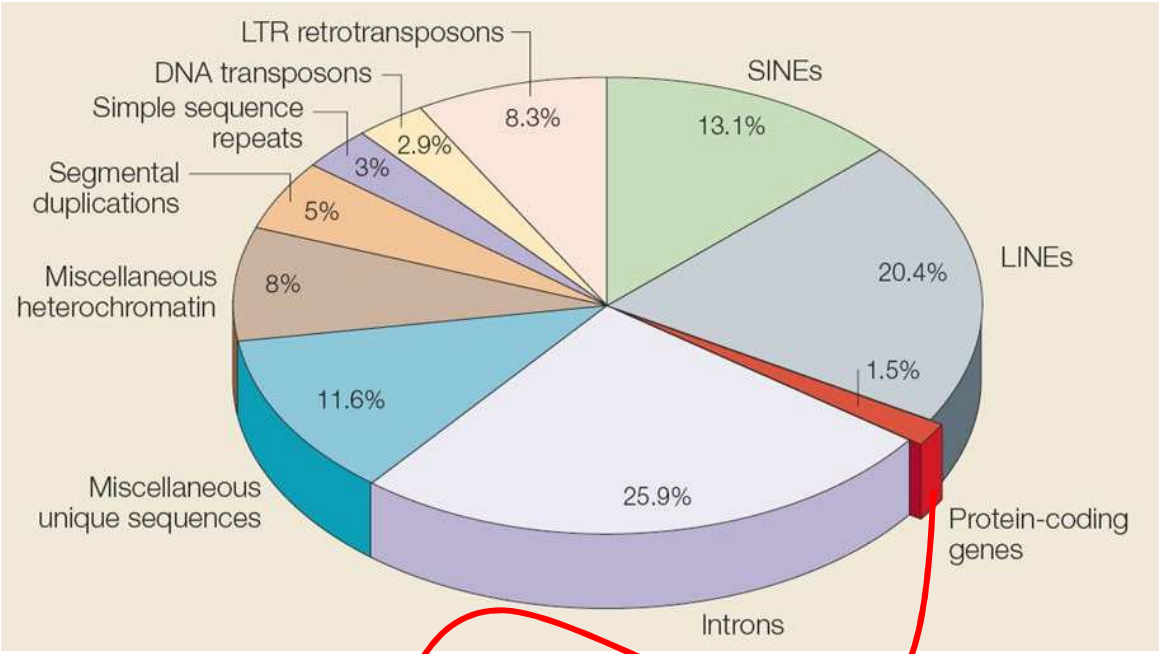
HITOS EN EL DESARROLLO DE LA GENÉTICA



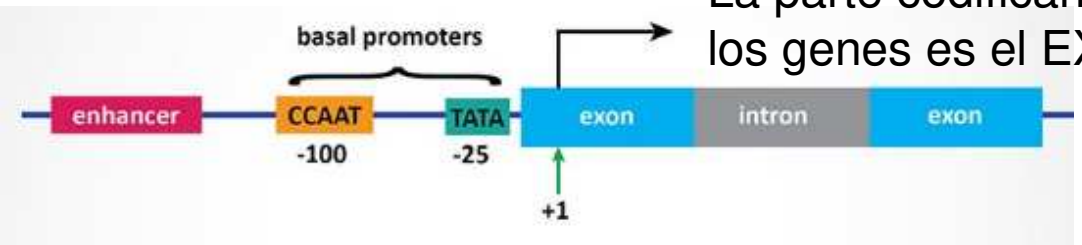
EL GENOMA HUMANO

Es la secuencia de bases del ADN de los cromosomas y las mitocondrias

Longitud = 3.200.000.000 pares de bases



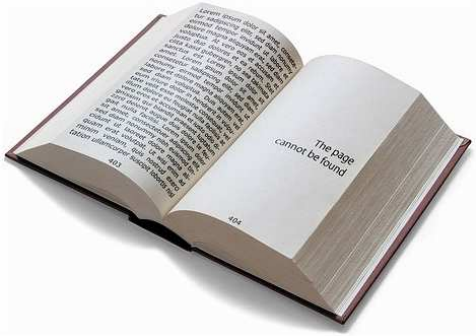
20.000 genes
(1,5% del total)



La parte codificante de los genes es el EXOMA → 85% de las alteraciones asociadas a enfermedades mendelianas

TIPOS DE MUTACIÓN SEGÚN EL MECANISMO CAUSAL

- Mutación
  - Genómica
    - Poliploidía
    - Aneuploidía
  - Cromosómica
    - Deleciones o duplicaciones
    - Inversiones
    - Translocaciones
  - Génica
    - Sustitución de bases
    - Inserción o deleción de bases
    - Mutaciones dinámicas



CARIOTIPO

Describe las características de los cromosomas en metafase, ordenados de acuerdo a su morfología y tamaño (ISCN*-1995, 2005)

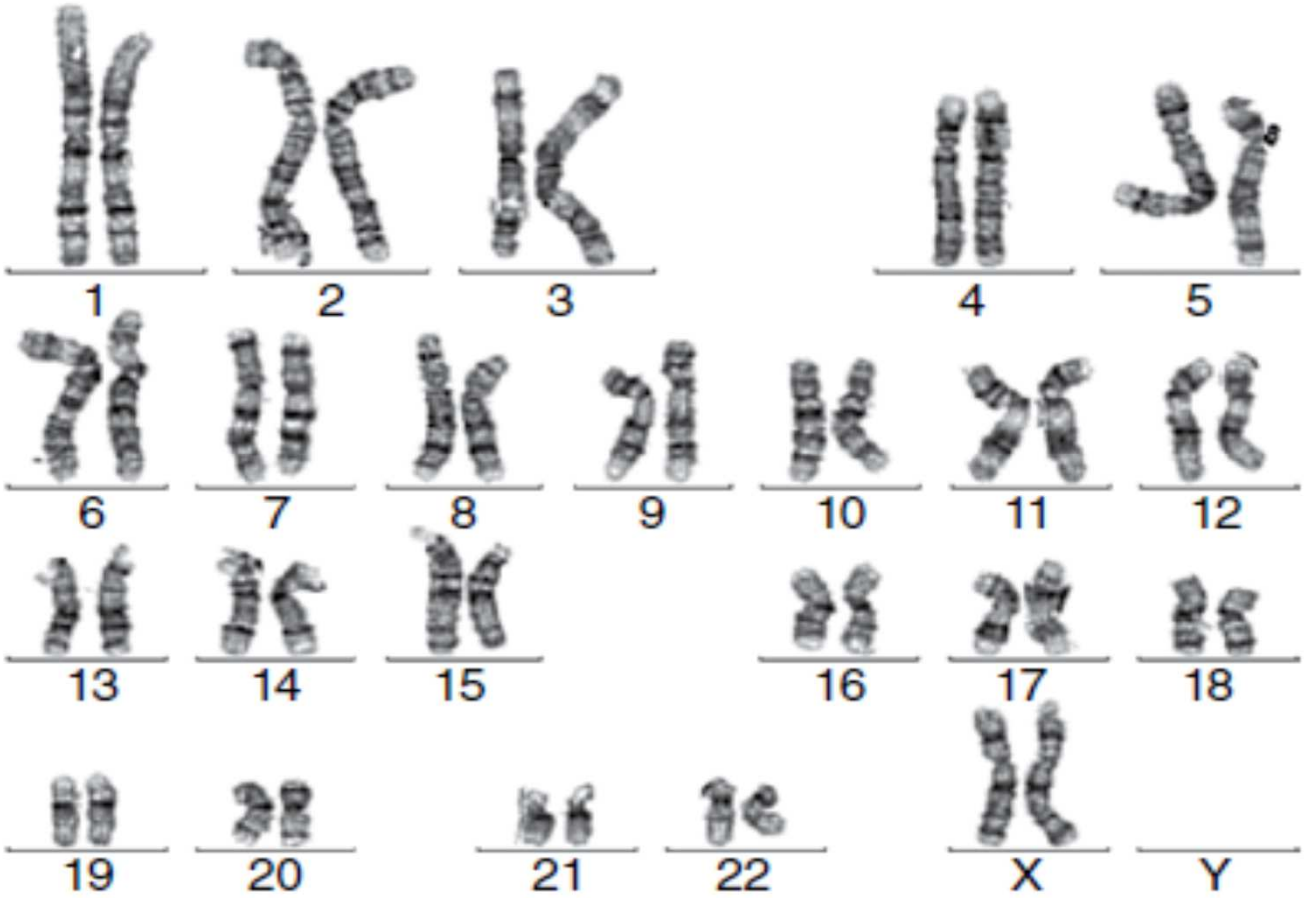


Fig. Cariograma de una mujer: 46,XX

¿Qué se puede ver?

- Dotación cromosómica
- Alteraciones estructurales
- Mosaicismo

El cariotipo está indicado en multitud de situaciones clínicas

Limitaciones

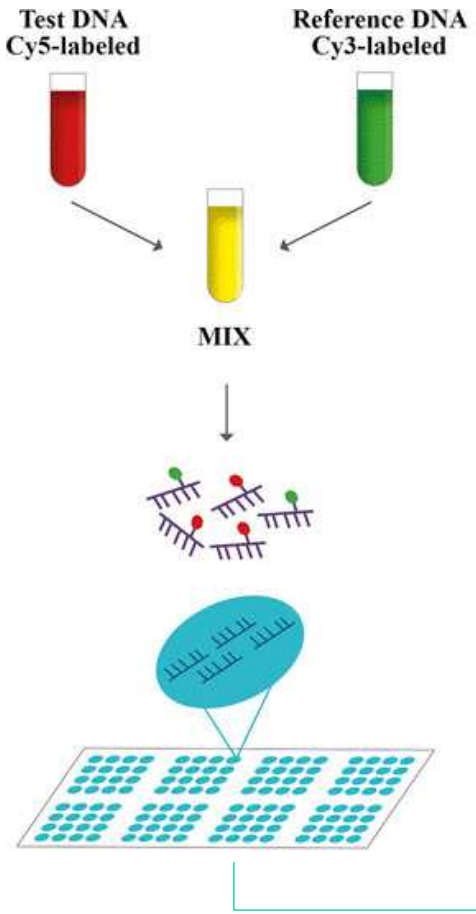
- Rendimiento (2 -4%)
- Resolución → 5-10 Mb
- Técnica laboriosa y subjetiva
- Necesita personal con experiencia

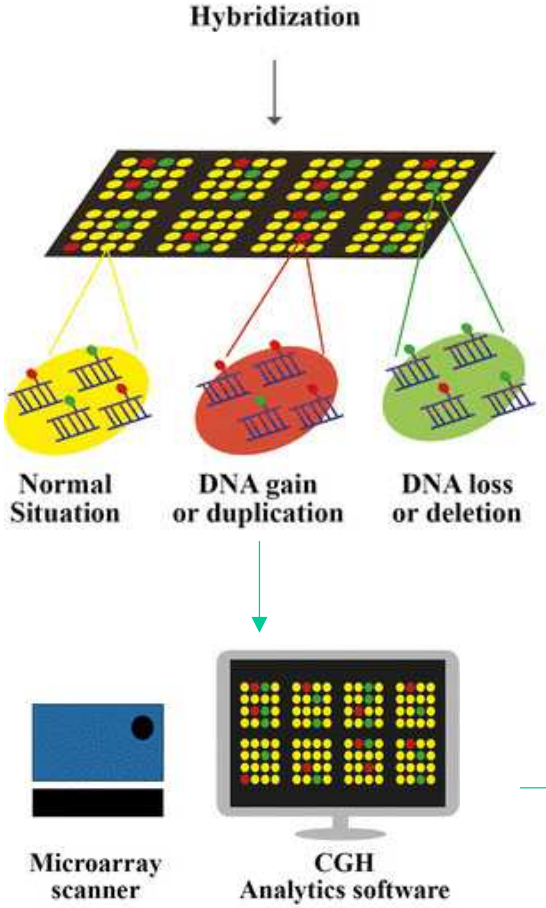
* Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana

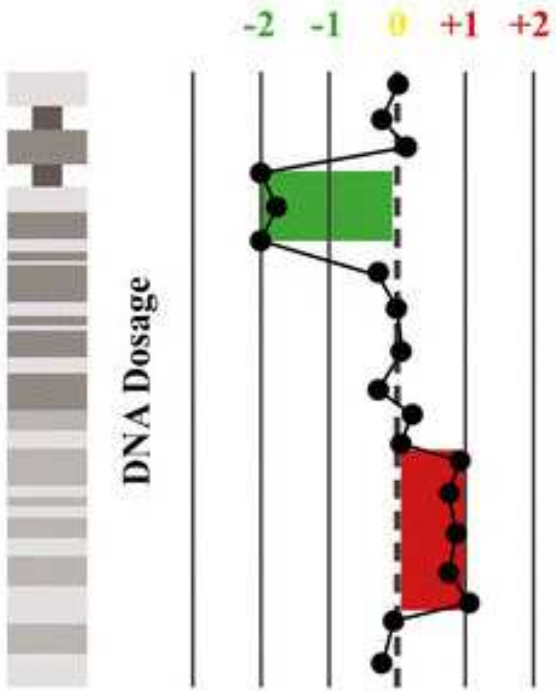
ARRAY CGH (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION)

Hibridación competitiva del ADN del paciente y un ADN control sobre un soporte físico donde se colocan sondas con una secuencia y una localización conocida

Detecta variaciones en el número de copias (CNV)





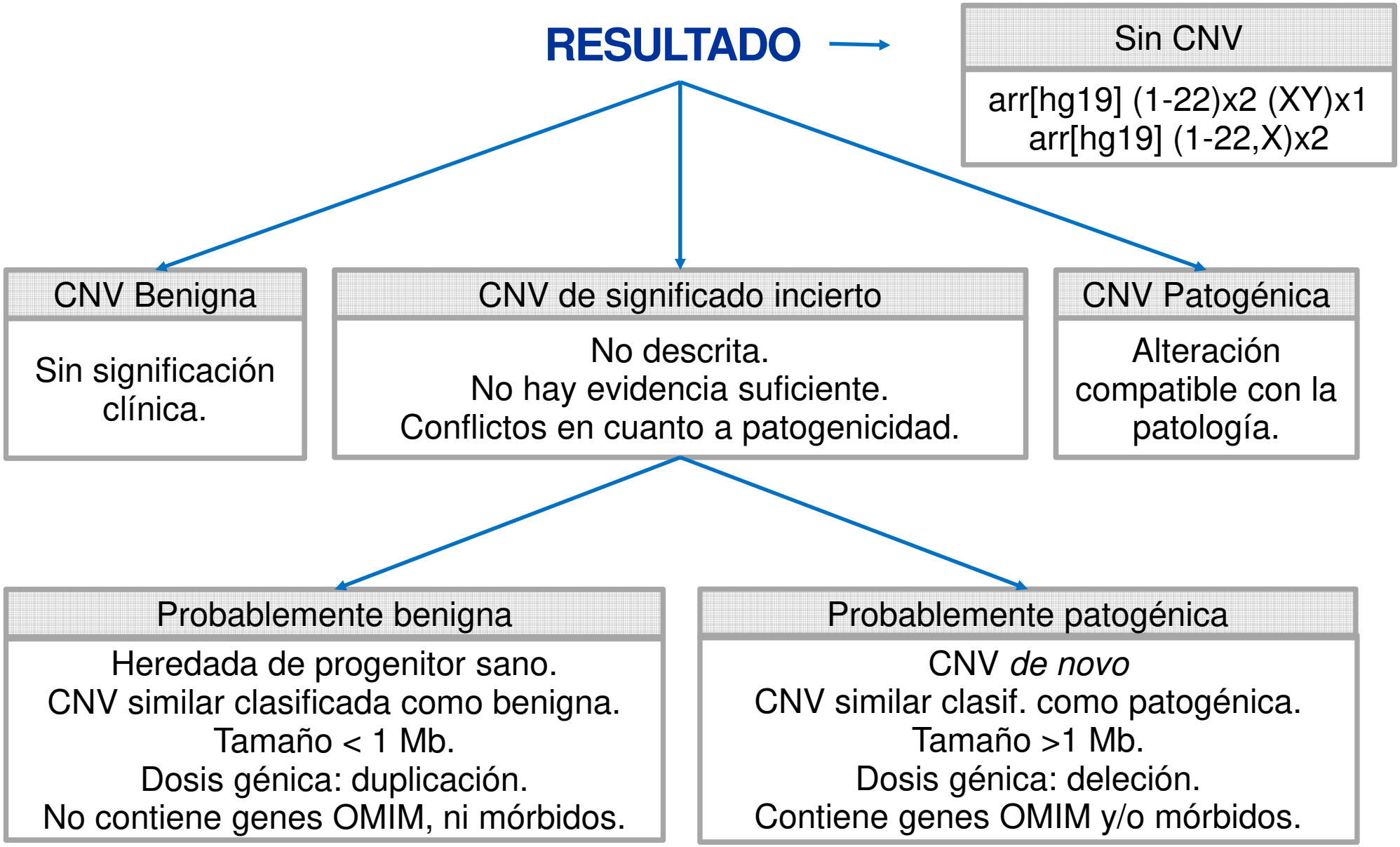


Verde: deleción
Rojo: duplicación

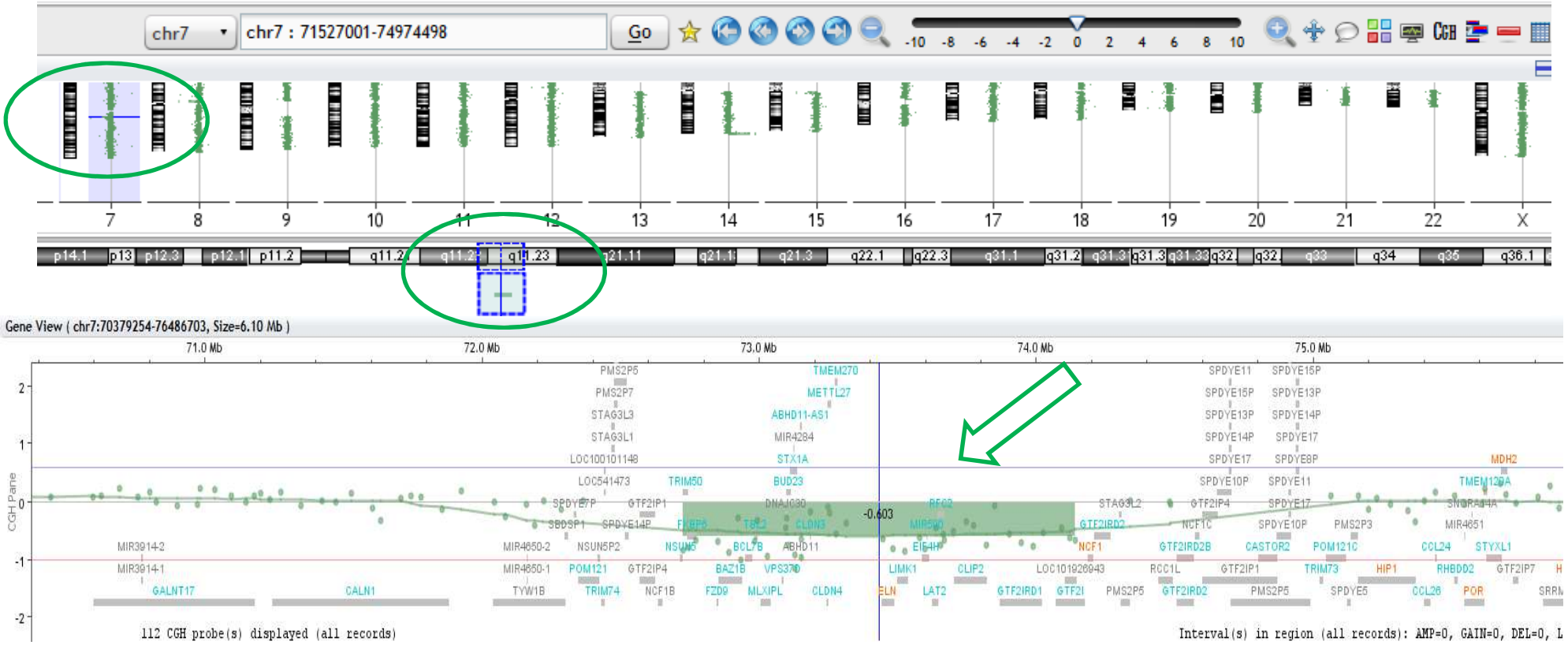
60 000 – 400 000 sondas

Rendimiento diagnóstico:
15 – 20%

TIPOS DE CNV


RESULTADO
Sin CNV
arr[hg19] (1-22)x2 (XY)x1
arr[hg19] (1-22,X)x2
CNV Benigna
Sin significación clínica.
CNV de significado incierto
No descrita.
No hay evidencia suficiente.
Conflictos en cuanto a patogenicidad.
CNV Patogénica
Alteración compatible con la patología.
Probablemente benigna
Heredada de progenitor sano.
CNV similar clasificada como benigna.
Tamaño < 1 Mb.
Dosis génica: duplicación.
No contiene genes OMIM, ni mórbidos.
Probablemente patogénica
CNV *de novo*
CNV similar clasif. como patogénica.
Tamaño >1 Mb.
Dosis génica: deleción.
Contiene genes OMIM y/o mórbidos.

ARRAY CGH - ANÁLISIS DE RESULTADOS



Label Benign, Ignorada, Likely benign, Likely pathogenic, Pathogenic, Variant of unknown significance , Unlabeled

Label	Region type	Location	Comment	Log ratio	No. of probes	Size	Band	ISCN	cDGVc9	bDDDx2	cbClinGenr7	pClinGenr7	uClinGenr7	bClinGenc7	lpClinGenc7	pClinGenc7	uClinGenc7
Likely benign	Loss	4: 71.162.798 - 71.275.324		-0.979078	5	112,5 Kb	4q13.3	arr[GRCh37] 4q13.3(71162798_71275324)x1~2									
Pathogenic	Loss	7: 72.726.578 - 74.139.390		-0.60337	43	1.412,8 Kb	7q11.23	arr[GRCh37] 7q11.23(72726578_74139390)x1~2									

All syndromes (9) | ClinGen Curated - Feb-16 (2) | ClinGen Curated - Mar-18 (2) | ClinGen Curated - Nov-18 (2) | DECIPHER v8.7 (1) | DECIPHER v9.21 (1) | DECIPHER v9.25 (1)

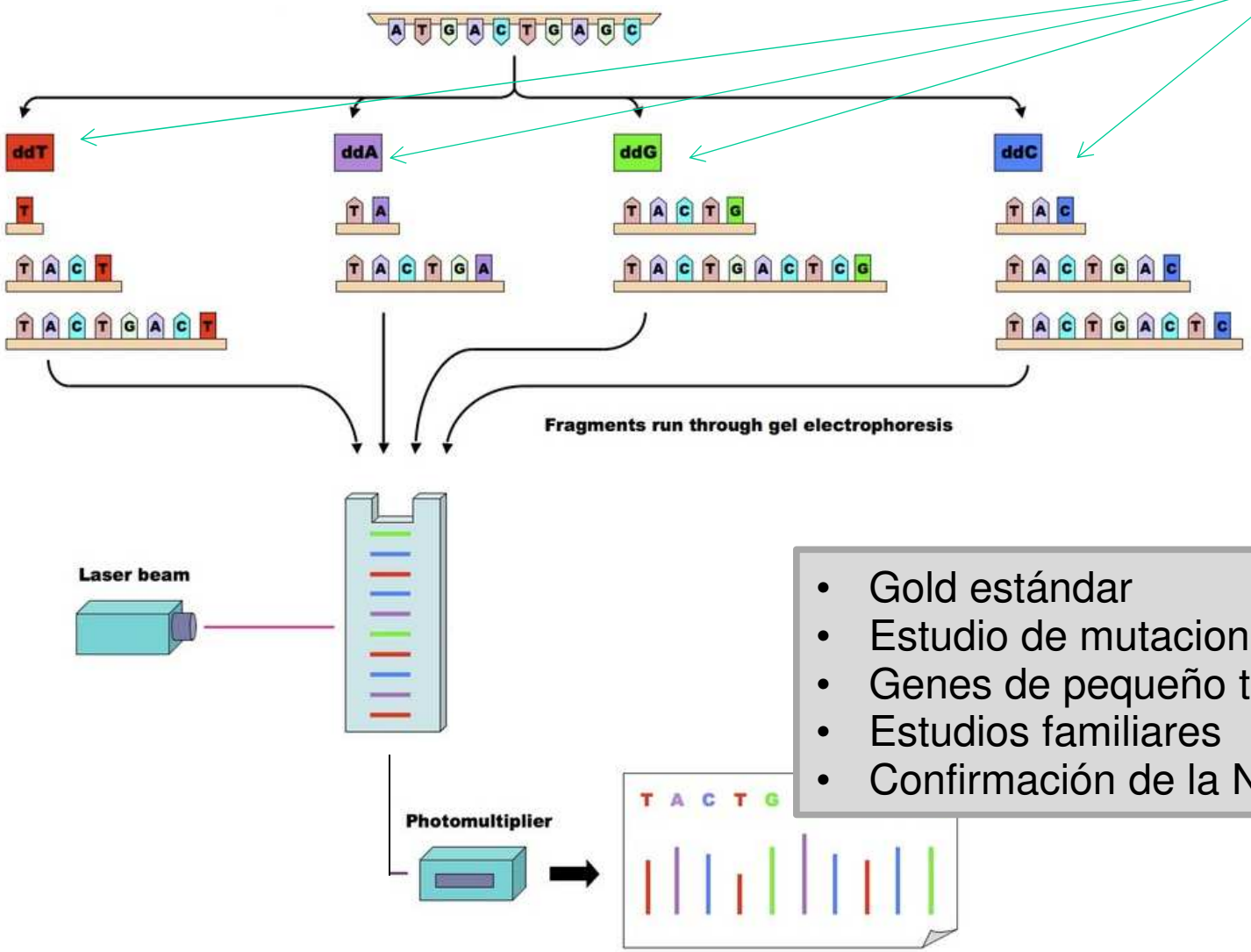
Description	Protein-coding Ensembl genes	Ensembl genes with OMIM Morbid references	Location	Syndrome list	Externa
Williams-Beuren Syndrome (WBS)	GTF2IRD1 MLXIPL BAZ1B ELN RFC2 BUD23 FKBP6	194050 123700 185500 194050	7: 72,744,455 - 74,142,672	DECIPHER v8.7	-- Exte

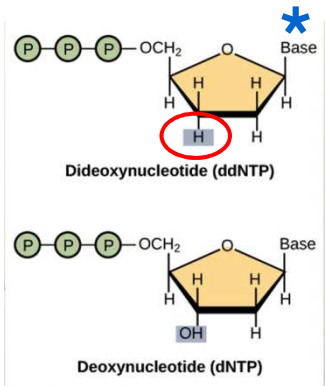
SECUENCIACIÓN DE ADN

Métodos y técnicas bioquímicas utilizadas para determinar el orden de las bases (A, C, G y T) en una molécula de ADN

Terminadores irreversibles

SECUENCIACIÓN SANGER

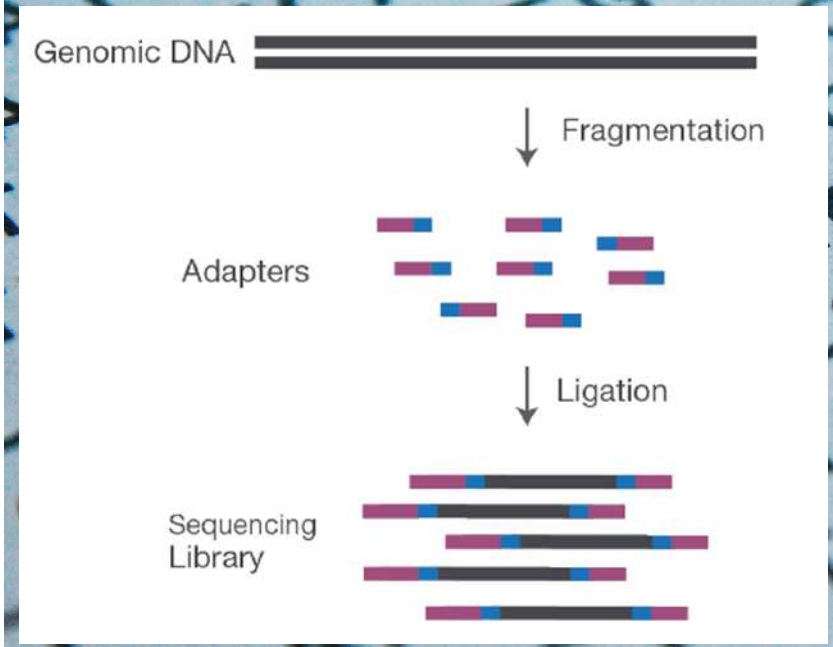




- Gold estándar
- Estudio de mutaciones puntuales
- Genes de pequeño tamaño
- Estudios familiares
- Confirmación de la NGS

SECUENCIACIÓN MASIVA (NEXT GENERATION SEQUENCING)

1. Preparación de librerías
2. Amplificación de clusters
3. Obtención de la secuencia
4. Alineamiento y análisis de datos

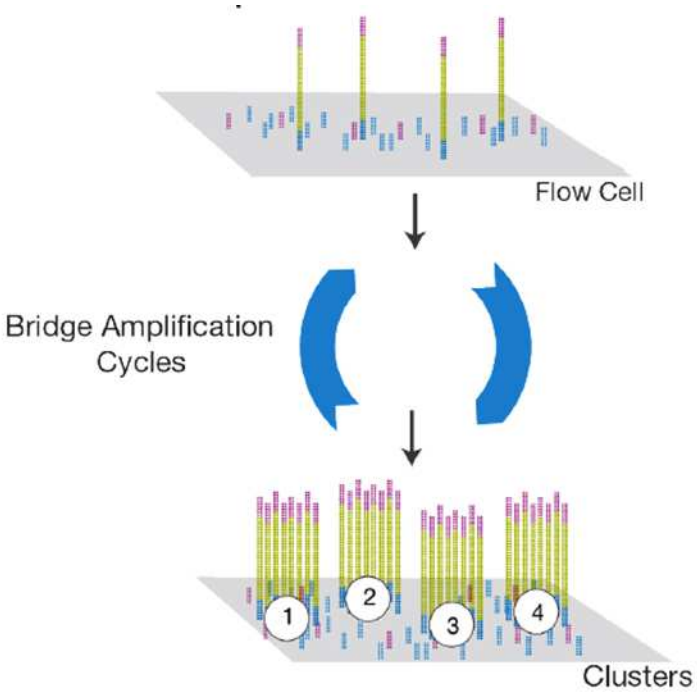


El ADN genómico se fragmenta

Se adicionan adaptadores a los extremos de los fragmentos

SECUENCIACIÓN MASIVA (NEXT GENERATION SEQUENCING)

1. Preparación de librerías
2. Amplificación de clusters
3. Obtención de la secuencia
4. Alineamiento y análisis de datos



Las librerías se cargan en la cubeta de reacción

Cada fragmento se multiplica clonalmente

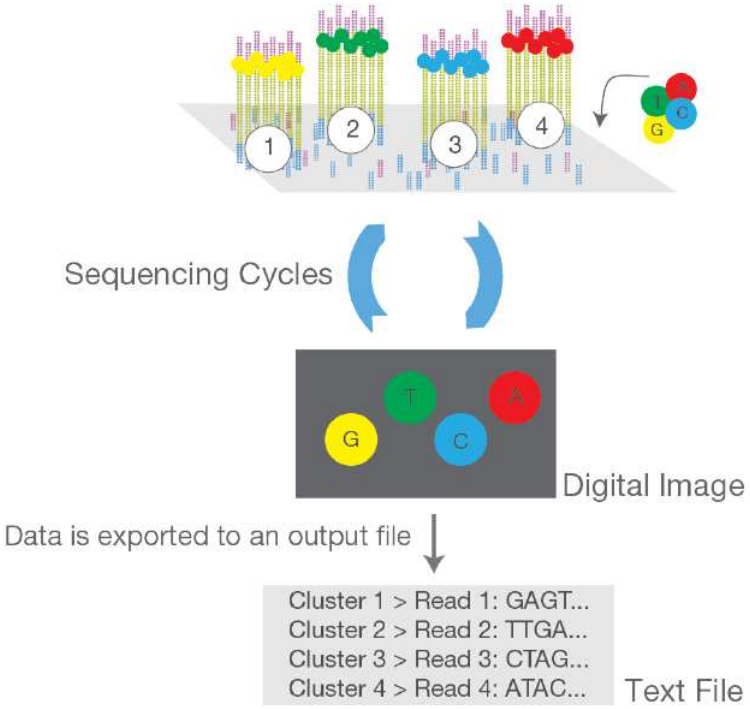
SECUENCIACIÓN MASIVA (NEXT GENERATION SEQUENCING)

1. Preparación de librerías
2. Amplificación de clusters
3. Obtención de la secuencia
4. Alineamiento y análisis de datos

Se añaden la polimerasa y los nucleótidos marcados (nt*)

Se registra el espectro de emisión de cada cluster cada vez que se incorpora un nt*

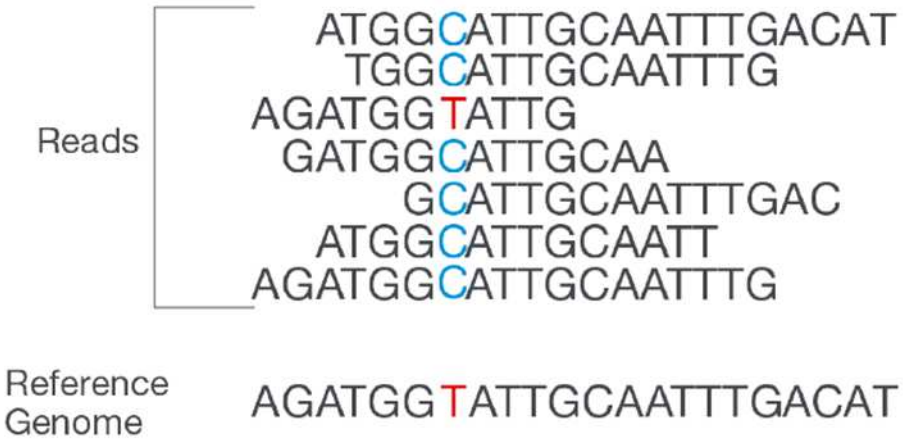
Se repite “n” veces, hasta obtener la secuencia de los fragmentos



SECUENCIACIÓN MASIVA (NEXT GENERATION SEQUENCING)

1. Preparación de librerías
2. Amplificación de clusters
3. Obtención de la secuencia
4. Alineamiento y análisis de datos

Las lecturas se alinean a una secuencia de referencia



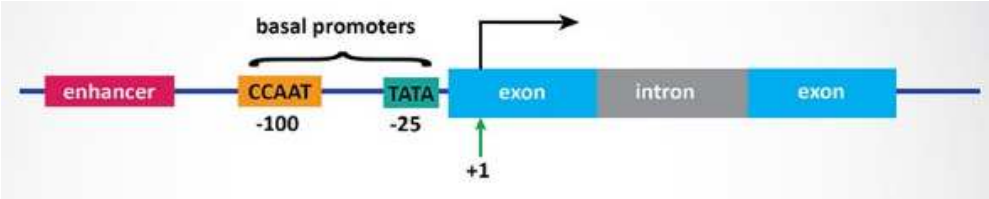
Se identifican las diferencias

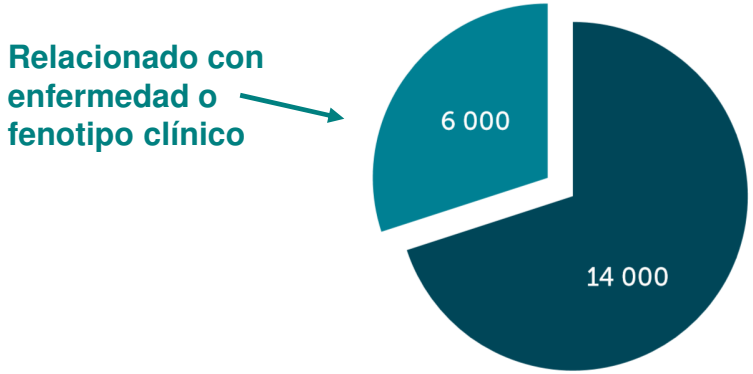
Indicaciones:
- Genes de gran tamaño
- Múltiples genes
- Identificación de nuevos genes candidatos

SECUENCIACIÓN DE EXOMAS

20.000 genes
(1,5% del total)

La parte codificante de los genes es el EXOMA





Exoma clínico (CES)	Exoma completo (WES)	Exoma trío
• > 6.000 genes mórbidos • Análisis dirigido mediante código HPO*	• > de 20.000 genes • Análisis más complejo. Incluye genes menos conocidos y VOUS*	• Exoma de probando y progenitores

*Human Phenotype Ontology

* Variants of unkown significance

GENOTIPO-FENOTIPO

<u>Indicaciones:</u>
- Trastornos graves del neurodesarrollo
- Enfermedades hereditarias con extrema heterogeneidad genética
- Pacientes con afectación de varios sistemas no relacionados

INTERPRETACIÓN DE VARIANTES

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

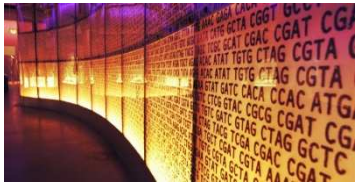
Sue Richards, PhD[1], Nazneen Aziz, PhD[2,16], Sherri Bale, PhD[3], David Bick, MD[4], Soma Das, PhD[5], Julie Gastier-Foster, PhD[6,7,8], Wayne W. Grody, MD, PhD[9,10,11], Madhuri Hegde, PhD[12], Elaine Lyon, PhD[13], Elaine Spector, PhD[14], Karl Voelkerding, MD[13] and Heidi L. Rehm, PhD[15]; on behalf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

Variantes

i. Patogénica
ii. Probablemente patogénica
iii. De significado incierto
iv. Probablemente benigna
v. Benigna.

vi. Polimorfismos asociados a enfermedad

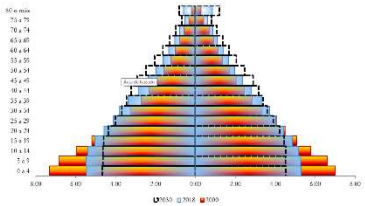
HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE VARIANTES



BD de enfermedades

ClinVar
OMIM
HGMD

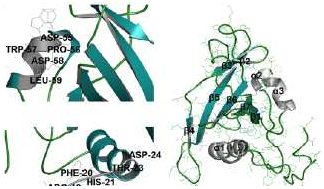
HGVS
ClinGen
Decipher



BD poblacionales

ExAC
ESP
1000 Genomes

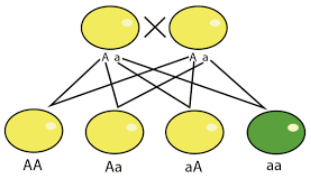
gnomeAD
dBSNP



Predictores *in silico* de patogenicidad

SIFT
Polyphen
Mut. Taster

UMD predictor
PROVEAN
VEP



Datos de segregación / Variantes *de novo*

Publicaciones

CLASIFICACIÓN DE VARIANTES

CLASE 1

Vari

1.
2.
3.

CLASE 2

Varia

1.
2.
3.

génica

CLASE 3

Variante de significado incierto

1. **No publicada en BD**
2. **Rara (0,1 – 1,0%)**
3. Evidencias de patogenicidad

   Localizada en dominio muy conservado o funcional

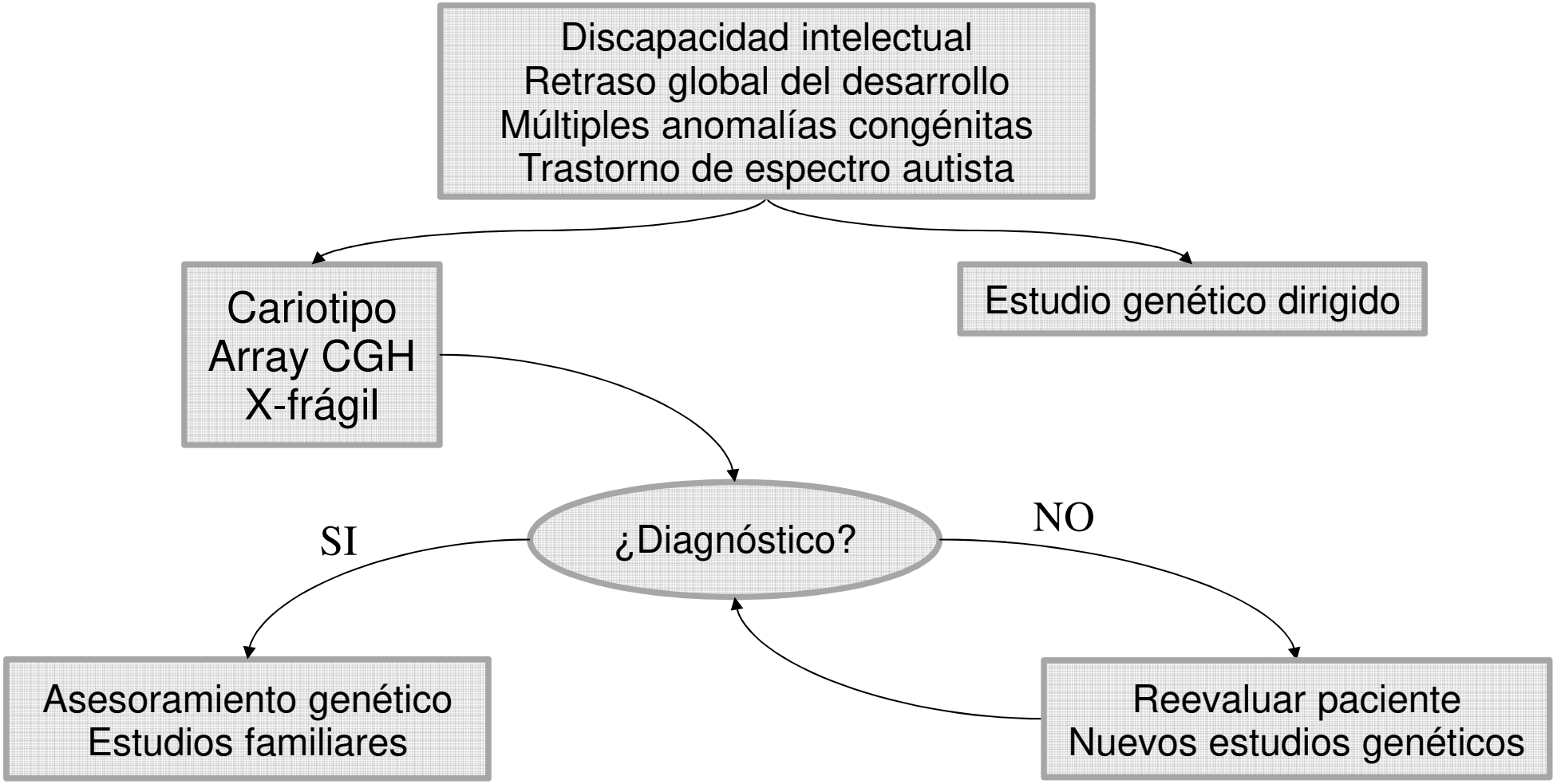
   Variante missense: (otro aa, pero misma posición)

   Variante *de novo* heredada

   Variante intrónica con efectos sobre el splicing

   Elimina un codón de parada

ALGORITMO TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO



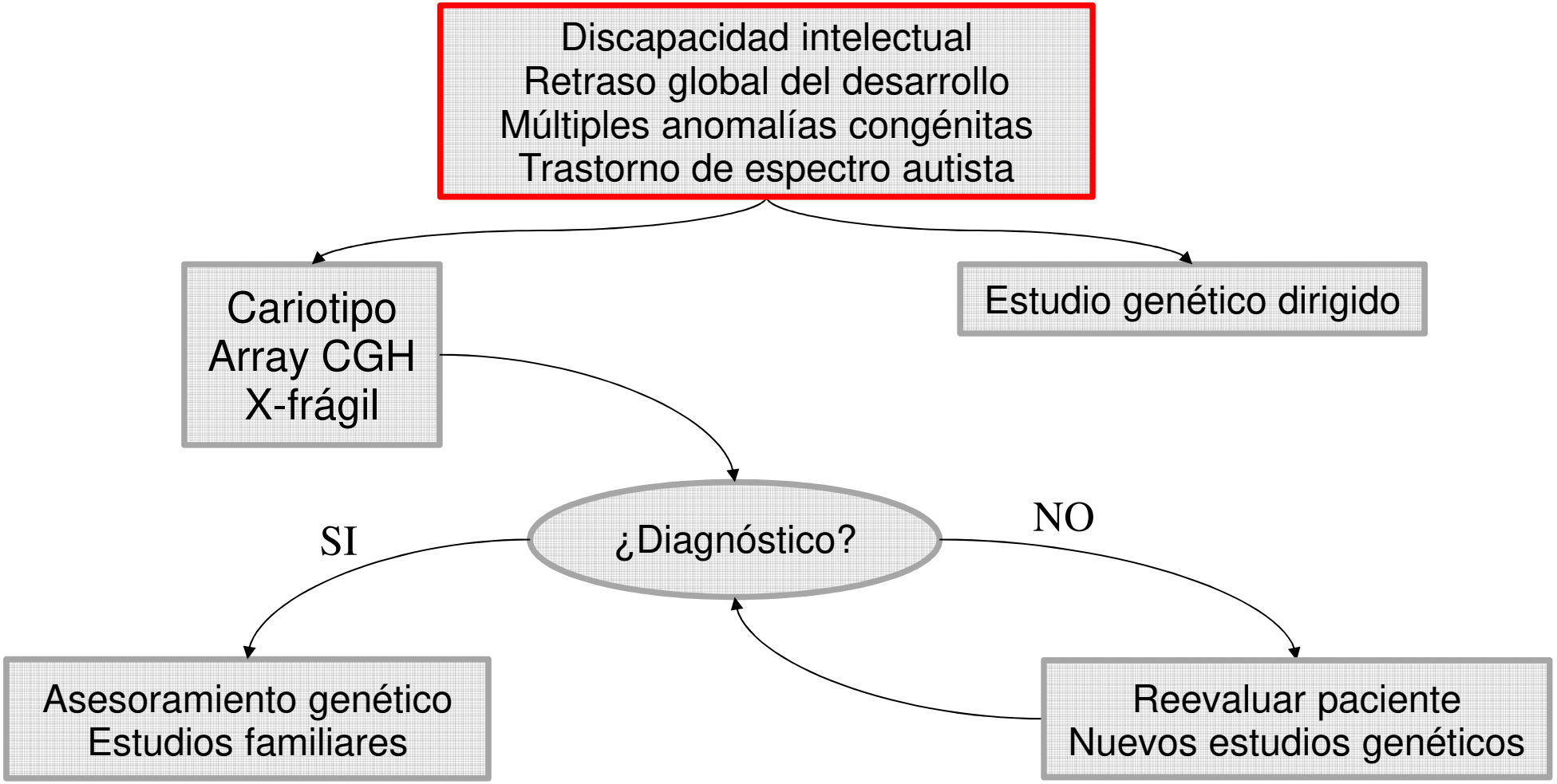
ARTICLE

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] W. Andrew Faucett,[2] Lars Feuk,[12] Jan M. Friedman,[13] Ada Hamosh,[14] Laird Jackson,[15] Erin B. Kaminsky,[2] Klaas Kok,[16] Ian D. Krantz,[17] Robert M. Kuhn,[18] Charles Lee,[19] James M. Ostell,[8] Carla Rosenberg,[20] Stephen W. Scherer,[21] Nancy B. Spinner,[17] Dimitri J. Stavropoulos,[22] James H. Tepperberg,[23] Erik C. Thorland,[24] Joris R. Vermeesch,[25] Darrel J. Waggoner,[26] Michael S. Watson,[27] Christa Lese Martin,[2] and David H. Ledbetter[2,*]

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

ALGORITMO TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO



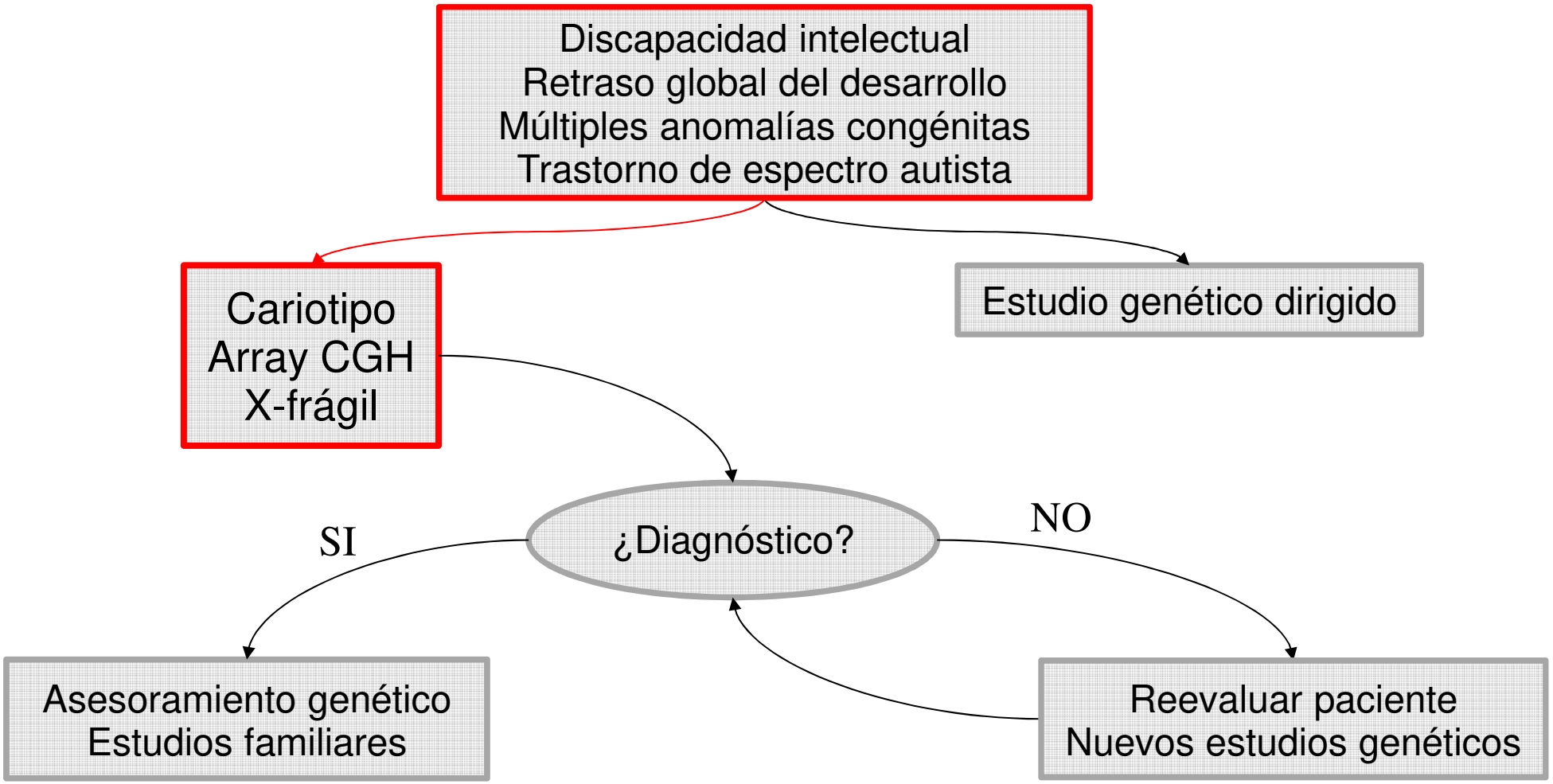
ARTICLE

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] W. Andrew Faucett,[2] Lars Feuk,[12] Jan M. Friedman,[13] Ada Hamosh,[14] Laird Jackson,[15] Erin B. Kaminsky,[2] Klaas Kok,[16] Ian D. Krantz,[17] Robert M. Kuhn,[18] Charles Lee,[19] James M. Ostell,[8] Carla Rosenberg,[20] Stephen W. Scherer,[21] Nancy B. Spinner,[17] Dimitri J. Stavropoulos,[22] James H. Tepperberg,[23] Erik C. Thorland,[24] Joris R. Vermeesch,[25] Darrel J. Waggoner,[26] Michael S. Watson,[27] Christa Lese Martin,[2] and David H. Ledbetter[2,*]

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

ALGORITMO TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO



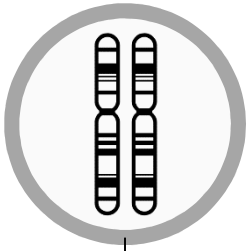
ARTICLE

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] W. Andrew Faucett,[2] Lars Feuk,[12] Jan M. Friedman,[13] Ada Hamosh,[14] Laird Jackson,[15] Erin B. Kaminsky,[2] Klaas Kok,[16] Ian D. Krantz,[17] Robert M. Kuhn,[18] Charles Lee,[19] James M. Ostell,[8] Carla Rosenberg,[20] Stephen W. Scherer,[21] Nancy B. Spinner,[17] Dimitri J. Stavropoulos,[22] James H. Tepperberg,[23] Erik C. Thorland,[24] Joris R. Vermeesch,[25] Darrel J. Waggoner,[26] Michael S. Watson,[27] Christa Lese Martin,[2] and David H. Ledbetter[2,*]

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

ESTUDIOS GENÉTICOS



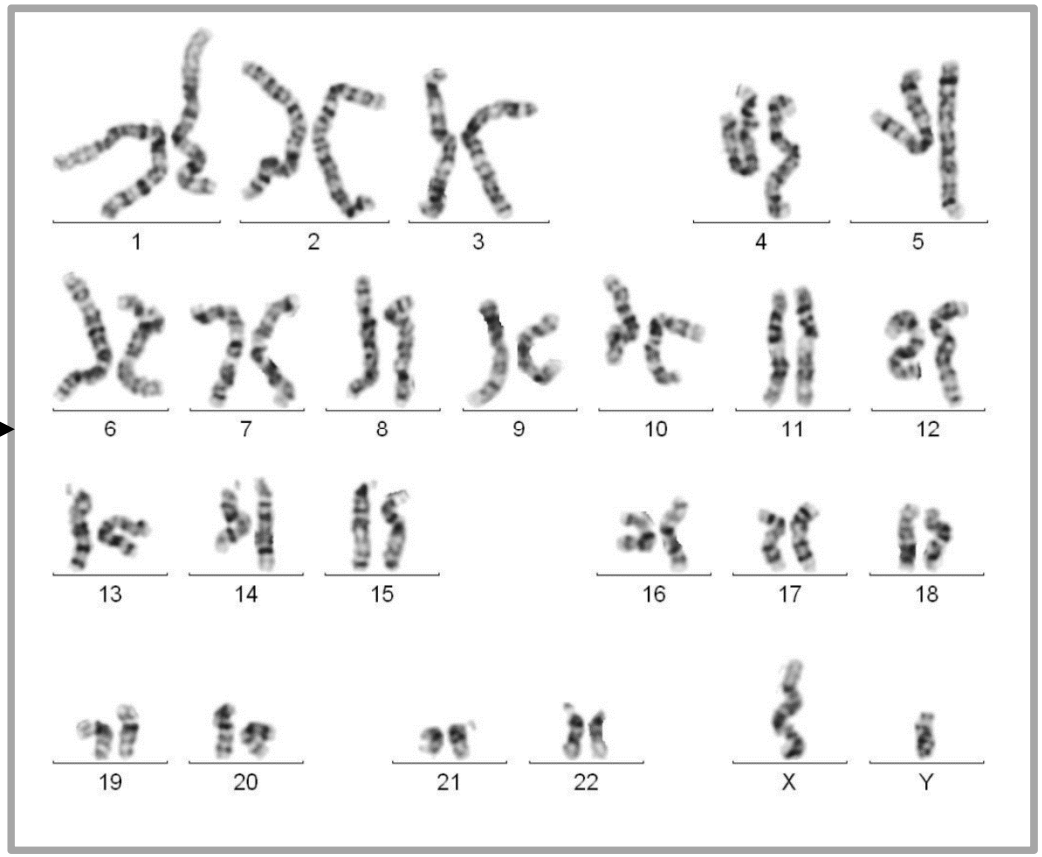
CARIOTIPO

RESULTADO

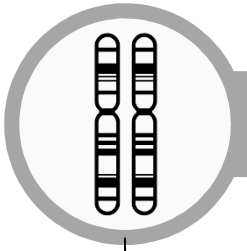
46,XY

INTERPRETACIÓN

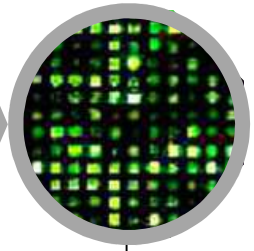
Sin anomalías numéricas
Sin anomalías estructurales
Sin mosaicismos



ESTUDIOS GENÉTICOS



46,XY



ARRAY CGH

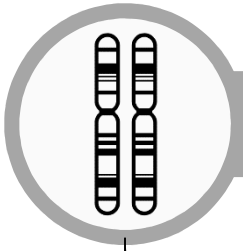
RESULTADOS

Fórmula normal de varón
arr[hg19] (1-22)x2,(XY)x1

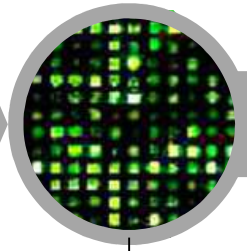
INTERPRETACIÓN

No se detectan variaciones de número de copias

ESTUDIOS GENÉTICOS



46,XY



arr[hg19] (1-22)x2,(XY)x1

SÍNDROME DEL X FRÁGIL

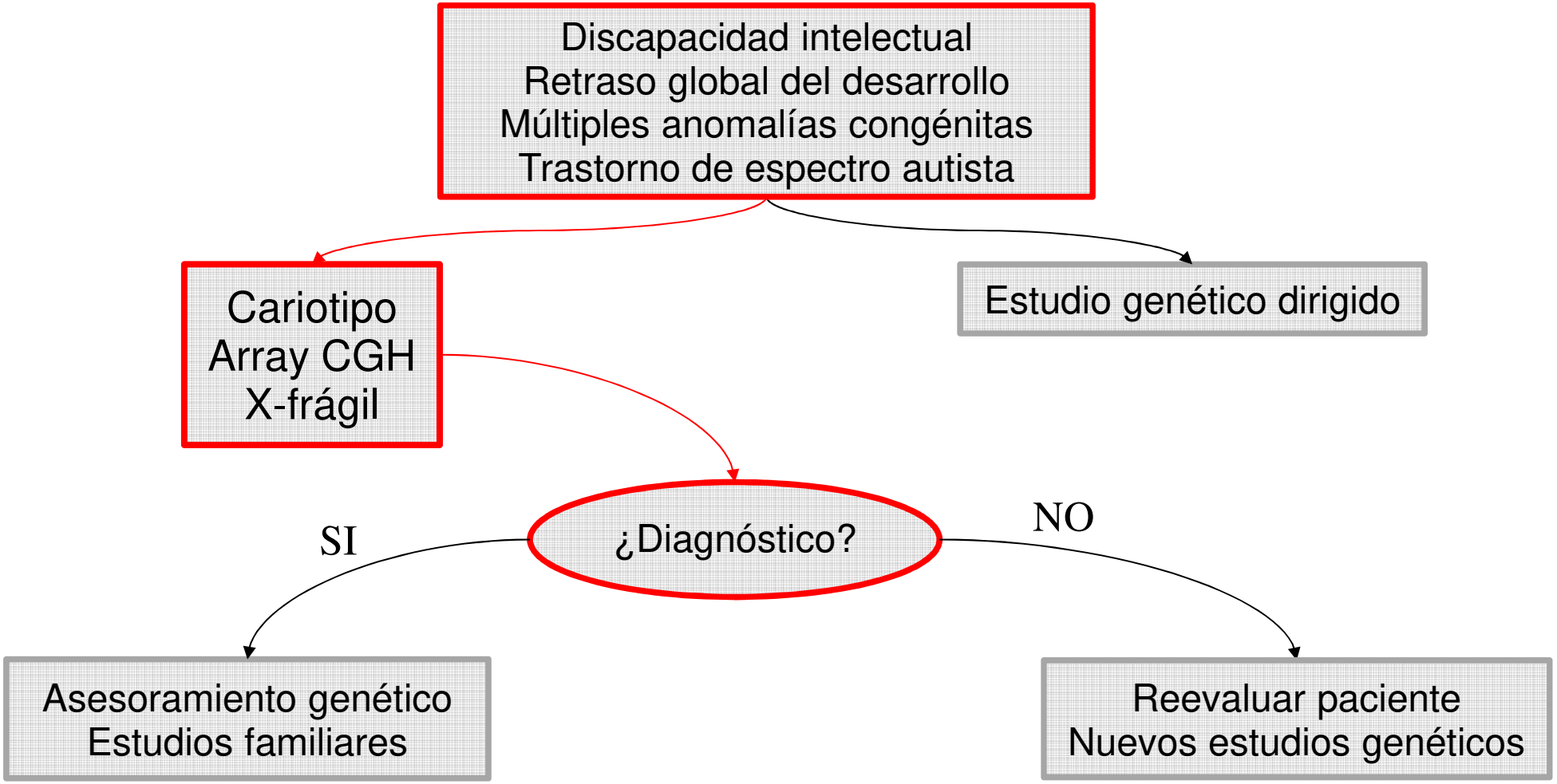
RESULTADOS

1 alelo de 22 +/-1 tripletes CGG

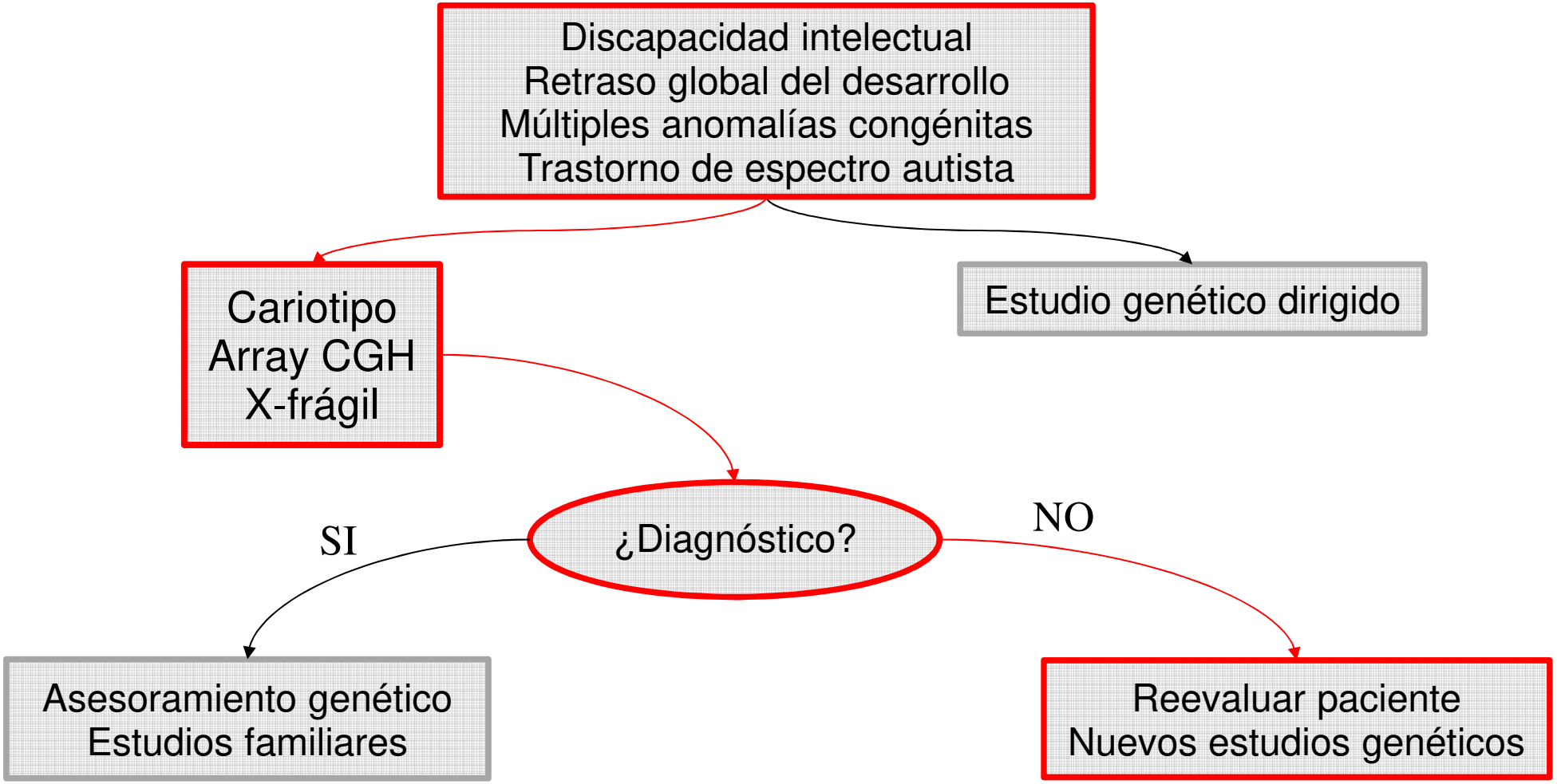
INTERPRETACIÓN

Exón 1 gen FMR1 para expansiones FRAXA dentro de la normalidad

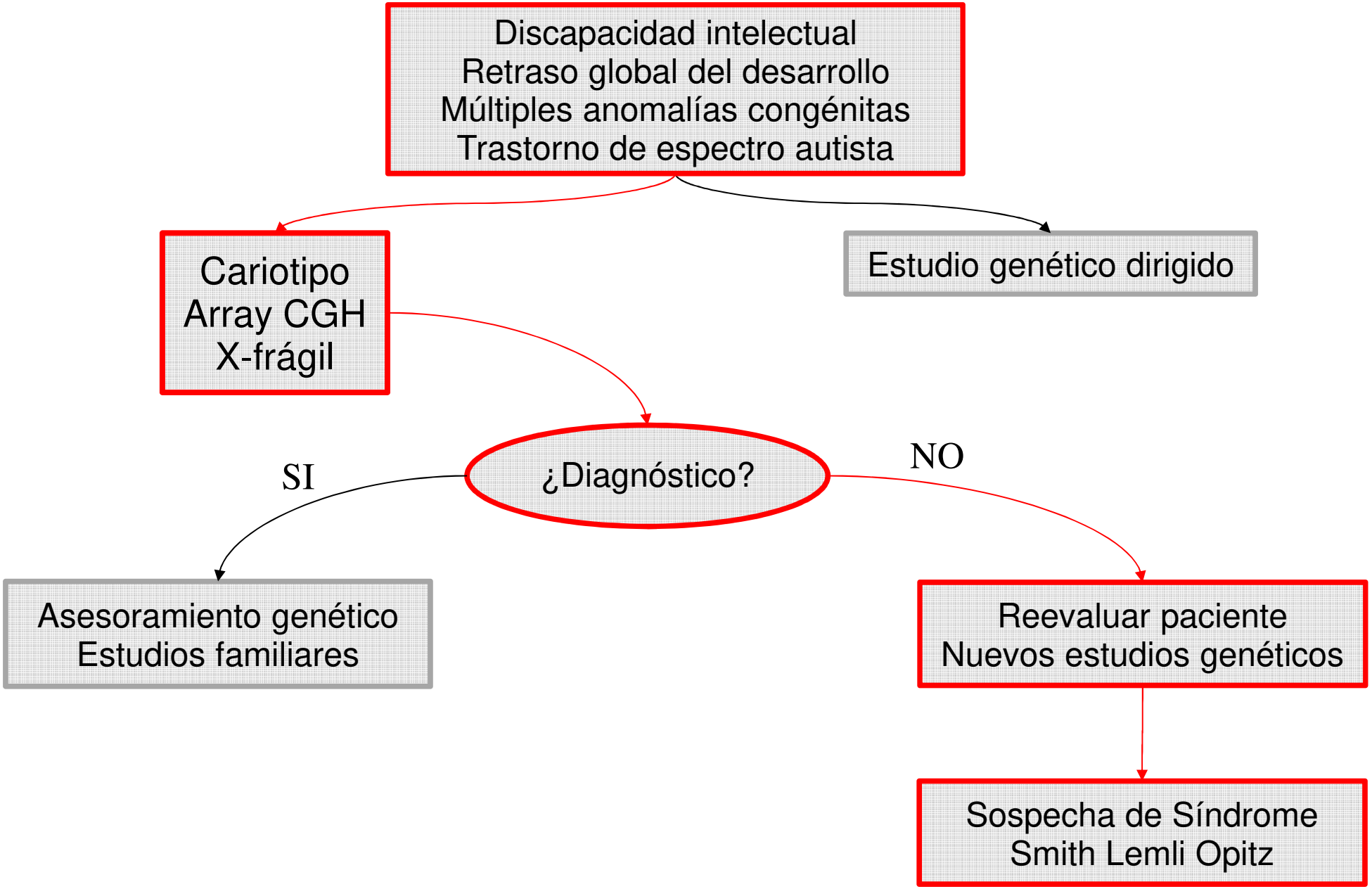
ALGORITMO TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO



ALGORITMO TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO



ALGORITMO TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO



SOSPECHA DE SÍNDROME DE SMITH LEMLI OPITZ (SLO)

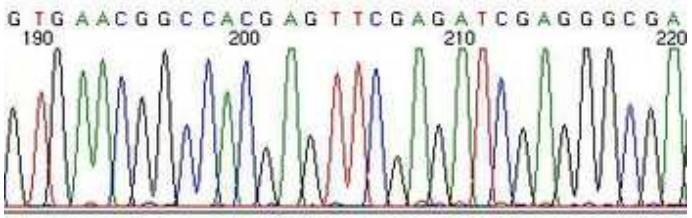
- Síndrome polimalformativo con retraso del neurodesarrollo

- Fenotipo SLO vs Paciente:
  - Dismorfias
  - Defectos septales
  - Criptorquidia +/- Hipospadias
  - Hipotonía + Disfagia
  - E. Hirschsprung
  - Alteraciones esqueléticas

Gen DHCR7 (OMIM *602858)
- 7-Dehidrocolesterol reductasa
- Mutaciones en homocigosis/heterocigosis compuesta
- Herencia Autosómica Recesiva
- Consanguinidad

Mutaciones DHCR7

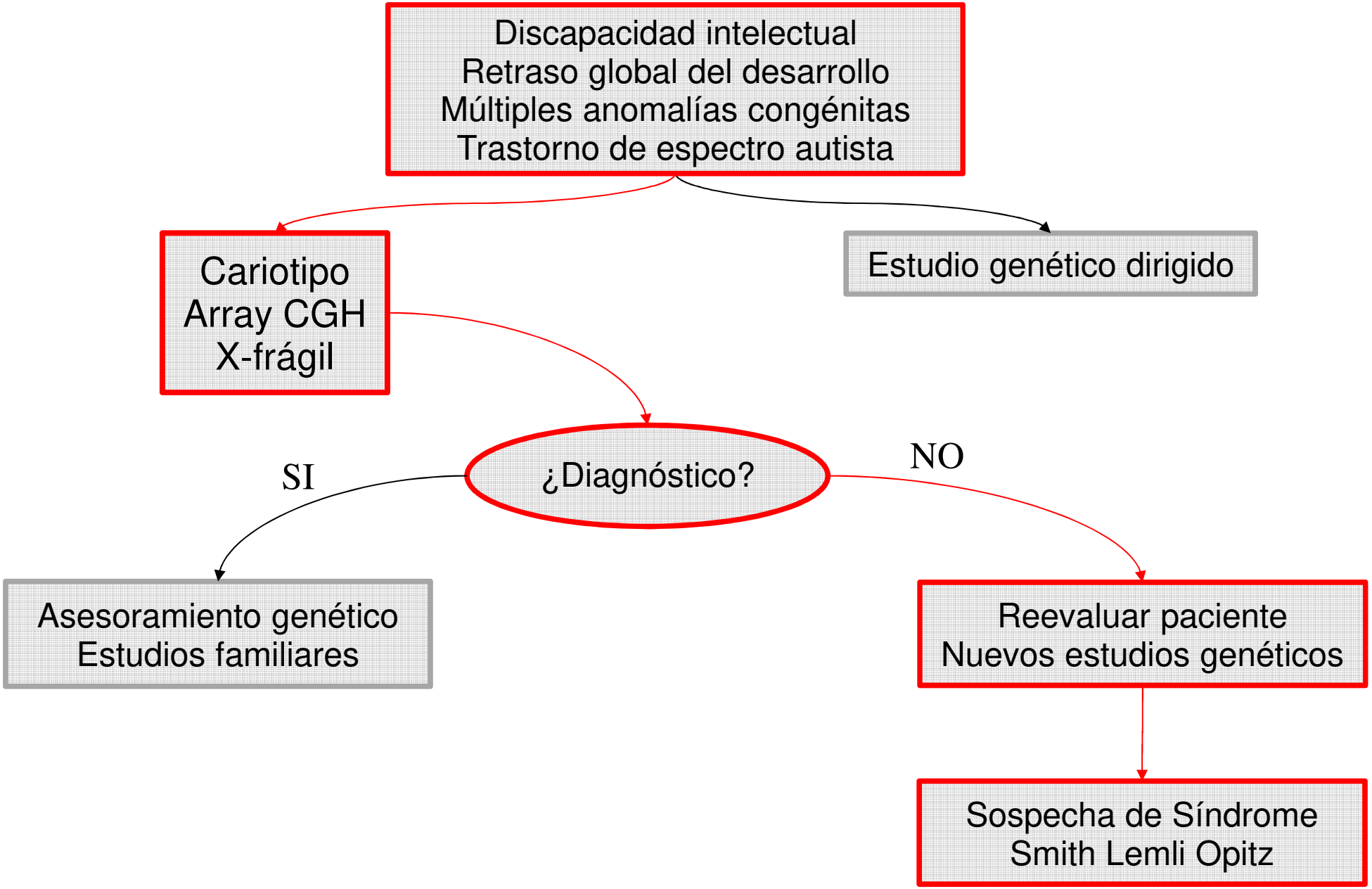
Secuenciación Sanger



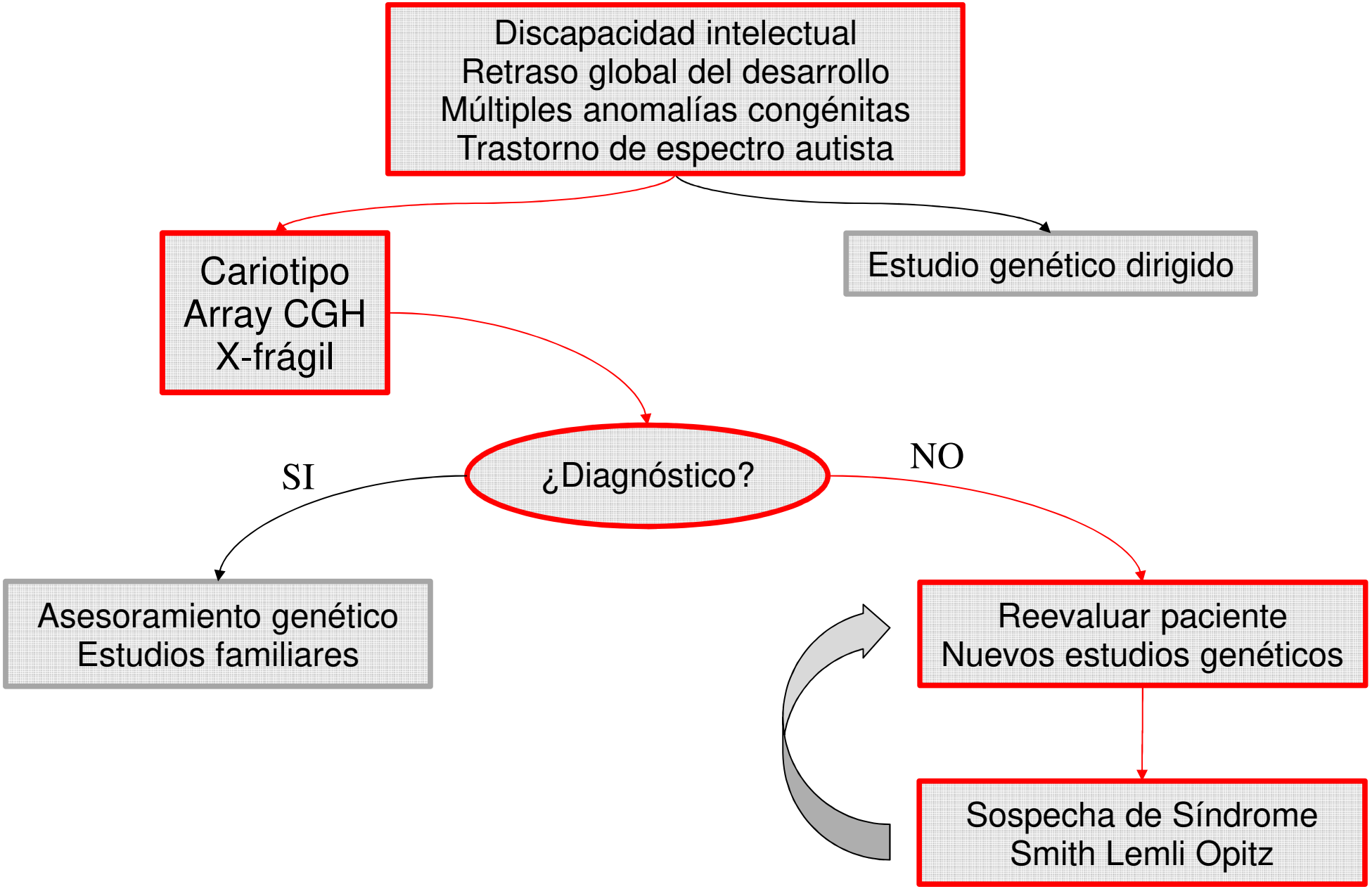
RESULTADO

No informativo
No se detecta mutación patogénica

ALGORITMO TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO



ALGORITMO TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO



NUEVOS ESTUDIOS GENÉTICOS: EXOMA CLÍNICO

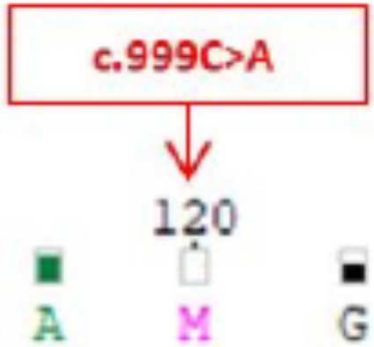
Disponibilidad de Exoma Clínico

- NGS + Análisis 1200 genes relacionados con trastornos del neurodesarrollo
- Unidad genómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

RESULTADO

Variante en heterocigosis c.999C>A (p.Y333*) en el gen HNRNPK

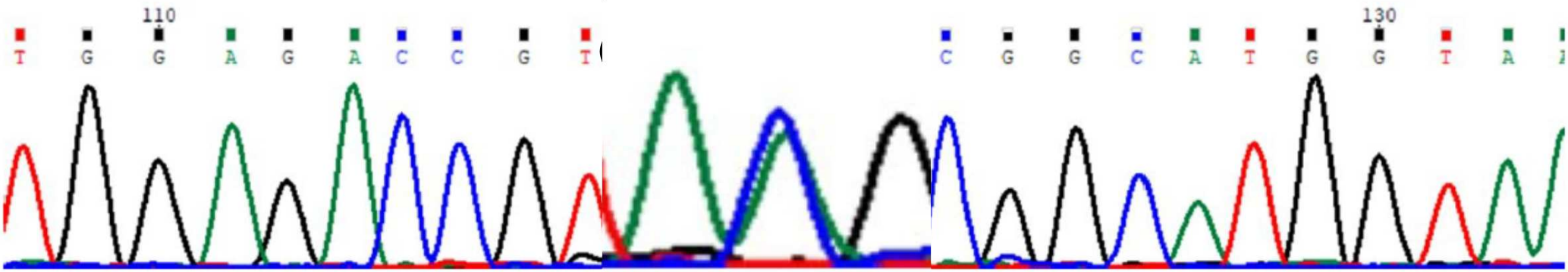
Variante no desc D, gnomAD, 1000G)
Predicción in s mbio patogénico
Gen relaci ome Au-Kline



TAC → Tirosina
TAA → Stop

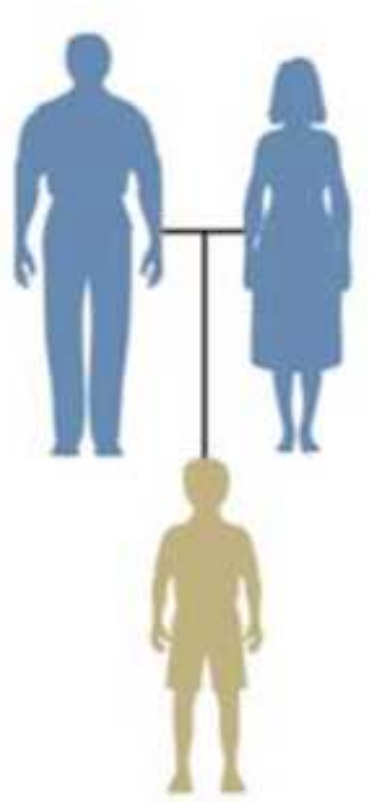
INTERPRETACIÓN

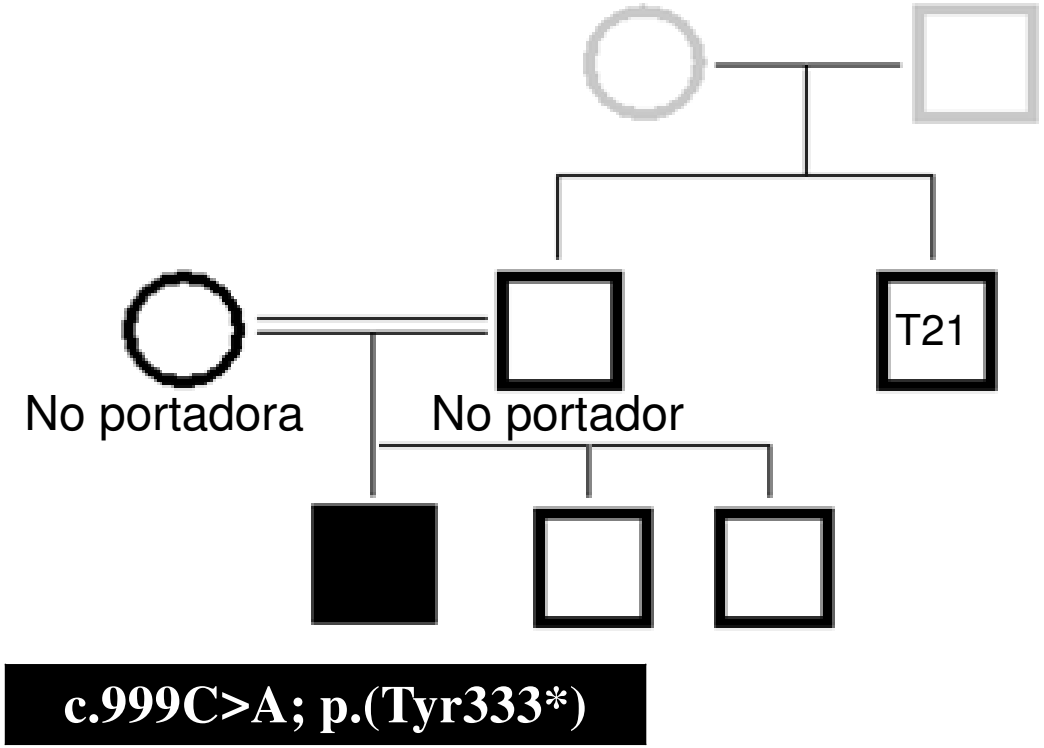
riante probablemente patogénica



ESTUDIO SEGREGACIÓN

- Secuenciación directa exón 12 gen HNRNPK en familiares de primer grado.
- Progenitores no portadores:
  - Origen *aparentemente de Novo*
  - No Riesgo de Recurrencia
- **Refuerza patogenicidad variante**
- Asesoramiento Genético





SÍNDROME DE AU-KLINE (OMIM #616580)

- Enfermedad sindrómica compleja con alteraciones del neurodesarrollo
- Descrito por Au et al. en 2015
- Fenotipo solapante Kabuki-Like
- Recategorización de otros síndromes y filiación molecular gracias a NGS

Hum Mutat. 2015 October ; 36(10): 1009–1014. doi:10.1002/humu.22837.

GeneMatcher Aids in the Identification of a New Malformation Syndrome with Intellectual Disability, Unique Facial Dysmorphisms, and Skeletal and Connective Tissue Abnormalities Caused by *De Novo* Variants in *HNRNPK*

P.Y. Billie Au[#1], Jing You[#2,3], Oana Caluseriu[4], Jeremy Schwartzentruber[5], Jacek Majewski[5], Francois P. Bernier[1,6], Marcia Ferguson[7], Care for Rare Canada Consortium, David Valle[3,8,9], Jillian S. Parboosingh[1,6], Nara Sobreira[3], A. Micheil Innes[#1,6], and Antonie D. Kline[#7]

Phenotypic spectrum of Au–Kline syndrome: a report of six new cases and review of the literature

P. Y. Billie Au[1,2] · Caitlin Goedhart[2] · Marcia Ferguson[3] · Jeroen Breckpot[4] · Koenraad Devriendt[4] · Klaas Wierenga[5] · Elizabeth Fanning[5] · Dorothy K. Grange[6] · Gail E. Graham[7] · Carolina Galarreta[8] · Marilyn C. Jones[8] · Usha Kini[9] · Helen Stewart[9] · Jillian S. Parboosingh[1,2] · Antonie D. Kline[3] · A. Micheil Innes[1,2] · Care for Rare Canada Consortium

Received: 14 November 2017 / Revised: 3 April 2018 / Accepted: 11 April 2018
© European Society of Human Genetics 2018

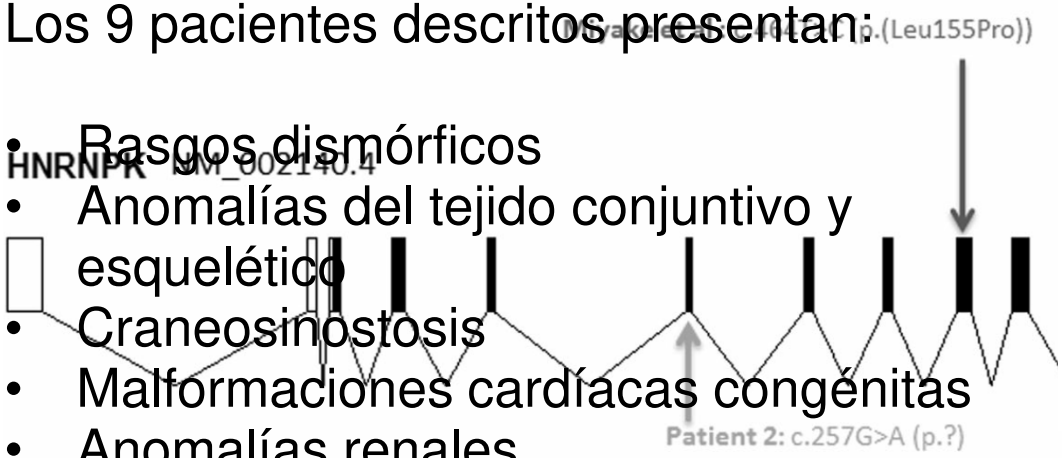
SÍNDROME DE AU-KLINE (OMIM #616580)

Gen **HNRNPK** (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K)

- Proteína de unión a ARN de estructura muy conservada
- Regulación
  - Expresión génica
  - Migración celular
- Expresión en todos los tejidos
- Justifica afectación multisistémica
- Mutaciones de pérdida de función
  - Mutaciones puntuales
  - Deleciones 9q21.32-q21.33

Los 9 pacientes descritos presentan:

- Rasgos dismórficos
- Anomalías del tejido conjuntivo y esquelético
- Craneosinostosis
- Malformaciones cardíacas congénitas
- Anomalías renales



Au et all. *Phenotypic spectrum of Au-Kline syndrome: a report of six new cases and review of the literature.* Eur J Hum Genet 2018 Sep;26(9):1272-1281

CONCORDANCIA FENOTÍPICA PACIENTE – AU-KLINE

DISMORFIAS

Dolicocefalia
Asimetría facial
Paladar ojival
Retrognatia
Hipertelorismo
Exoftalmos
Raíz nasal ancha
Labios finos
Orejas Implantación baja
malrotadas y grandes

NEUROLÓGICO

Hipotonía central
Discapacidad intelectual
Retraso psicomotor y del habla
Disfagia
Parálisis nervio hipogloso
Hipoacusia bilateral
Defectos del campo visual

GENITOURINARIO

Criptorquidia
Hipospadias
Hidronefrosis bilat.
ITUs recurrentes

CARDÍACO

Comunicación interauricular
Defecto de tabique ventricular
Válvula aórtica bicúspide

DIGESTIVO

Enfermedad de Hirschsprung
Reflujo gastroesofágico
Estreñimiento
GEAs de repetición
Vómitos

ALT. ESQUELÉTICAS

Craneosinostosis
Dismetría EEII
Actitud escoliótica
Seno dérmico
Agenesia dental
Malformación pies

CONCORDANCIA FENOTÍPICA PACIENTE – AU-KLINE

DISMORFIAS

Dolicocefalia
Asimetría facial
Paladar ojival
Retrognatia
Hipertelorismo
Exoftalmos
Raíz nasal ancha
Labios finos
Orejas Implantación baja malrotadas y grandes

NEUROLÓGICO

Hipotonía central
Discapacidad intelectual
Retraso psicomotor y del habla
Disfagia
Parálisis nervio hipogloso
Hipoacusia bilateral
Defectos del campo visual

GENITOURINARIO

Criptorquidia
Hipospadias
Hidronefrosis bilat.
ITUs recurrentes

CARDÍACO

Comunicación interauricular
Defecto de tabique ventricular
Válvula aórtica bicúspide

DIGESTIVO

Enfermedad de Hirschsprung
Reflujo gastroesofágico
Estreñimiento
GEAs de repetición
Vómitos

ALT. ESQUELÉTICAS

Craneosinostosis
Dismetría EEII
Actitud escoliótica
Seno dérmico
Agenesia dental
Malformación pies

RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

Laboratorio de biología molecular

Abordaje	Casos año 2016	Casos año 2017	Casos año 2018
Realización de Cariotipo, array y X-frágil	465	489	505

RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

17.6% | 18.6% | 19.4%

**Vianna GS. Genet Mol Res. 2016 Feb 19;15(1)*

Abordaje	Casos año 2016	Casos año 2017	Casos año 2018
Derivación de la Secuenciación del Exoma	0	7	19

RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

4/7 57.1% | 8/19 42.1%

*Smith HS, Genet Med. 2019 Jan;21(1):3-16

CONCLUSIONES

- Los trastornos del neurodesarrollo son un reto diagnóstico desde un punto de vista clínico.

- El primer escalón diagnóstico consigue un rendimiento en torno al 15-20%.

- La obtención de una causa molecular supone el fin del proceso diagnóstico y mejora el seguimiento del paciente.

- En nuestro caso clínico se ha conseguido hacer el diagnóstico genotipo-fenotipo, de un síndrome extremadamente raro, el síndrome de Au-Kline.

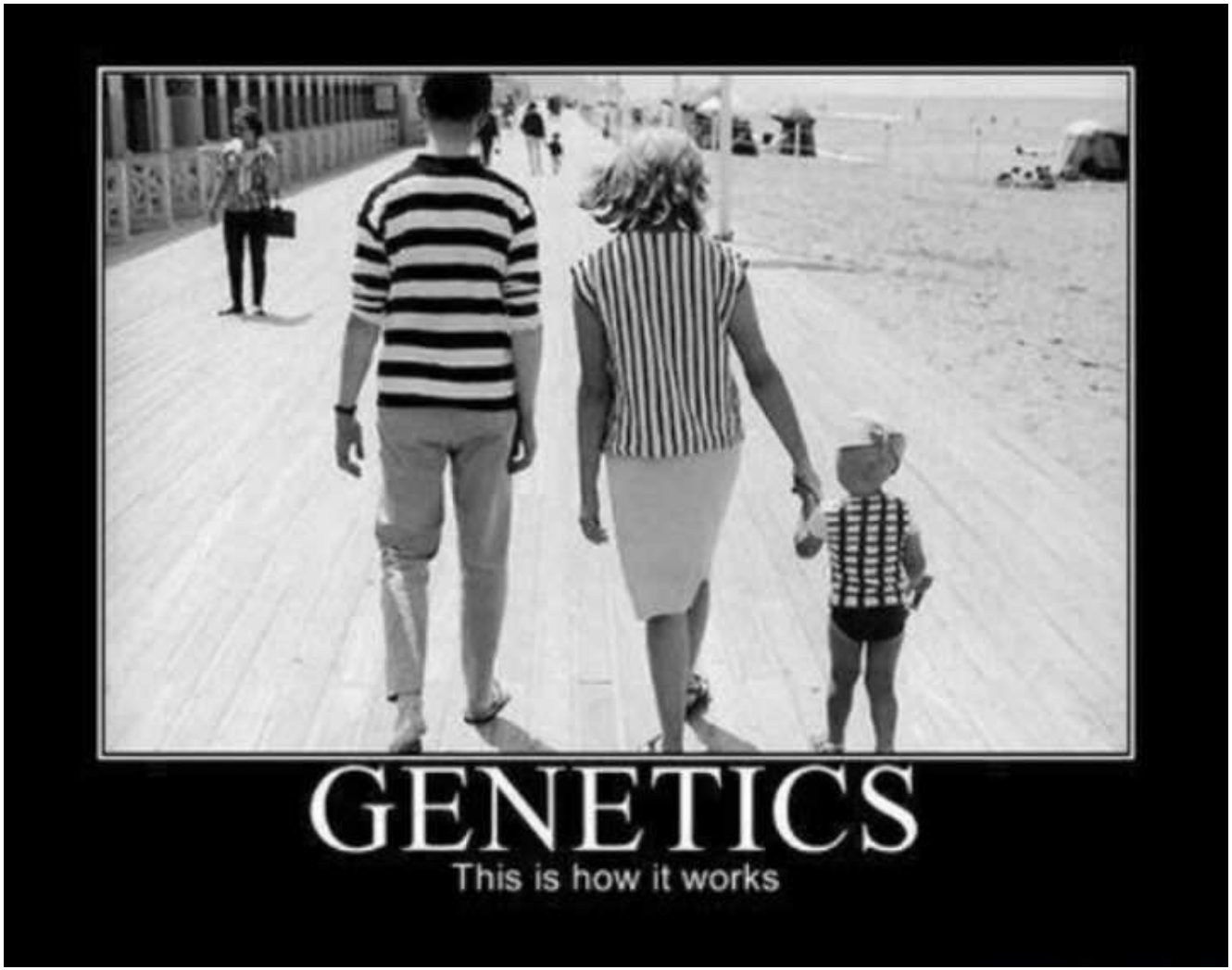
- La NGS, a través de la secuenciación del exoma, ha supuesto una mejora en el diagnóstico de estos pacientes.

AGRADECIMIENTOS

Servicio de Pediatria
Servicio de Análisis Clínicos

AGRADECIMIENTOS

Servicio de Pediatria
Servicio de Análisis Clínicos



GRACIAS POR VUESTRA ATENCIÓN