

Siset
Training Center
4-8 giugno
Roma



SOCIETÀ ITALIANA
PER LO STUDIO
DELL'EMOSTASI E
DELLA TROMBOSI

Diagnosi genetica delle coagulopatie emorragiche

Maurizio Margaglione

Genetica Medica
Università degli Studi di Foggia

Roma, 4 giugno 2018

בְּרִית מִילָה, berit milah; "patto della circumcissione"



Leviticus 12:

ב דְּבַר אֶל־בְּנֵי יִשְׂרָאֵל לֵאמֹר אִשָּׁה כִּי
תִּזְרִיעַ וְיִלְדָה זָכָר וְטָמְאָה שִׁבְעַת יָמִים
כַּיְמֵי נִדַת דְּוֹתָהּ תִּטְמָא: ג וּבַיּוֹם הַשְּׁמִינִי
יִמּוֹל בְּשָׂר עֶרְלָתוֹ: ד וּשְׁלֹשִׁים יוֹם
וּשְׁלֹשַׁת יָמִים תֵּשֵׁב בְּדַמֵּי טְהָרָה
בְּכָל־קֹדֶשׁ לֹא־תִגַּע וְאֶל־הַמִּקְדָּשׁ לֹא
תָבֹא עַד־מִלֵּאת יְמֵי טְהָרָה:
ה וְאִם־נִקְבָּה תֵלֵד וְטָמְאָה שִׁבְעִים
כַּנְּדֻתָּהּ וּשְׁשִׁים יוֹם וּשְׁשַׁת יָמִים תֵּשֵׁב
עַל־דַּמֵּי טְהָרָה:

Già 2000 anni fa circa, le autorità religiose ebraiche non ammettevano alla pratica della circumcissione un neonato figlio di una donna:

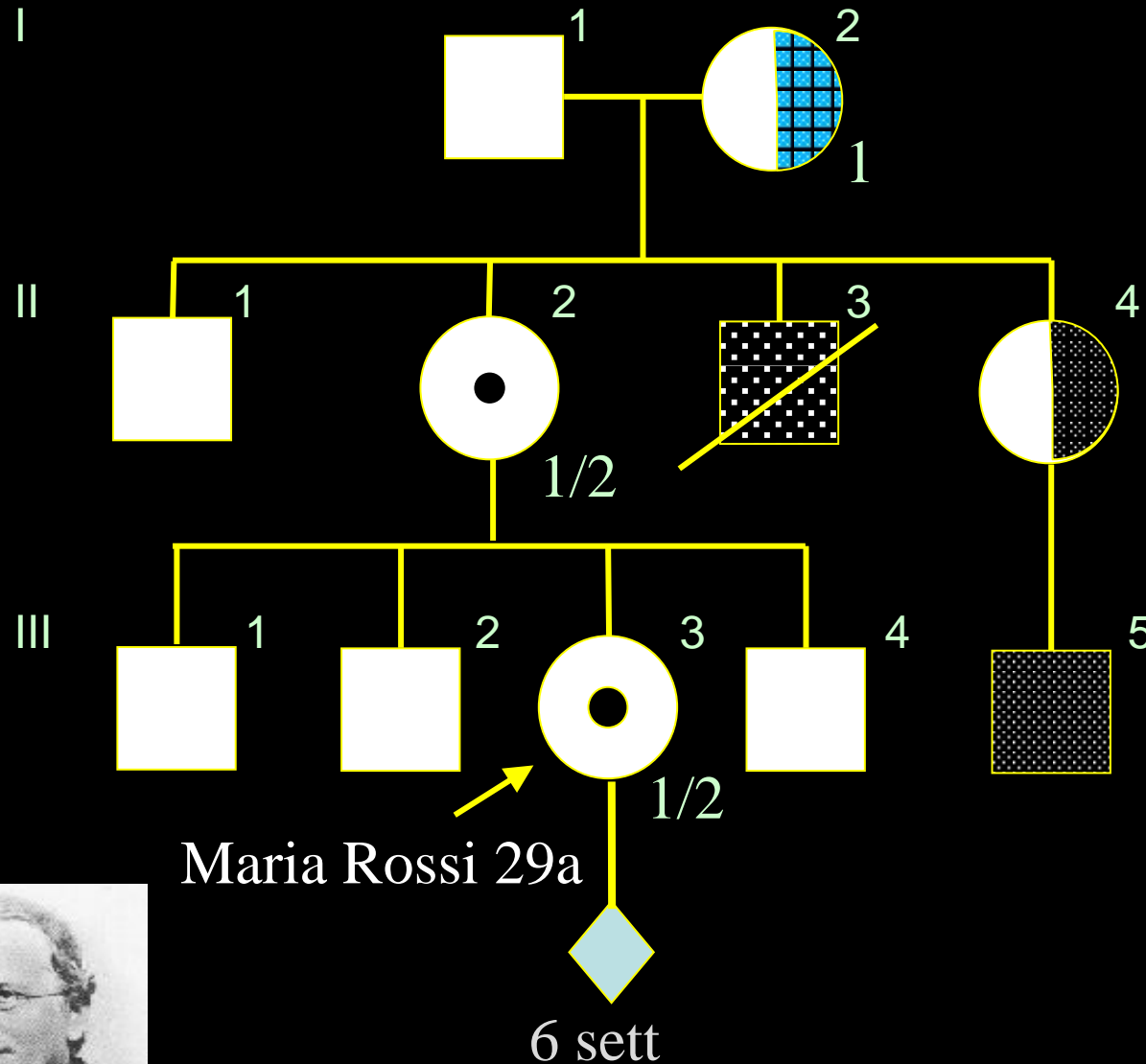
- che aveva perso già due figli per emorragia;
- la cui sorella aveva perso il proprio figlio per emorragia dopo la circumcissione .

Quando una donna è una portatrice di emofilia?

- **Figlia biologica di un emofilico**
- **Madre biologica di più di un emofilico**
- **Madre biologica di un emofilico e con un altro familiare emofilico**
- **Madre biologica di un emofilico**
- **Sorella di un emofilico**



Qual'è il rischio di Maria di essere carrier di HA?



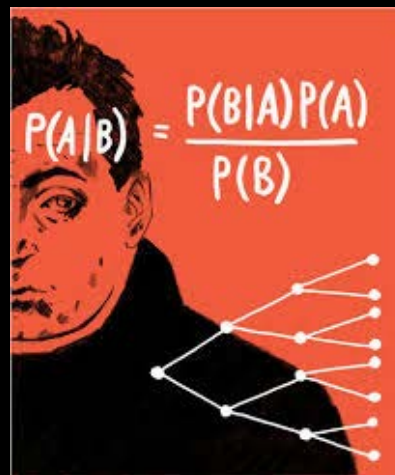
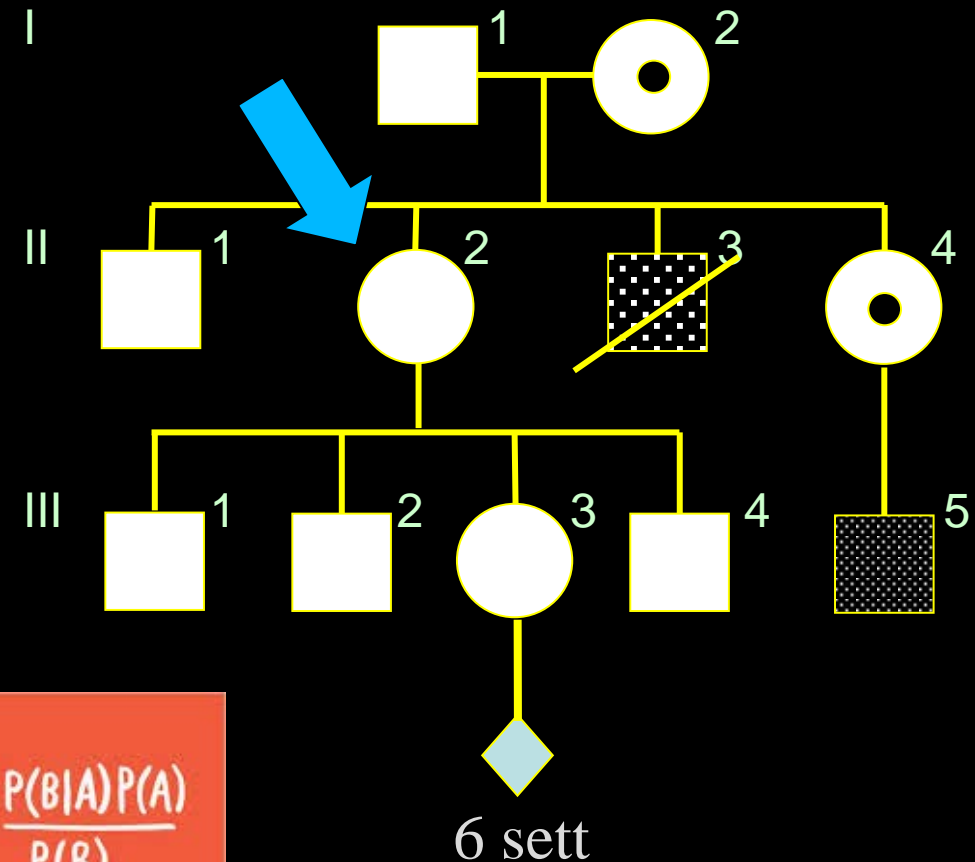
- 1 1/2
- 2 1/4 *
- 3 1/8
- 4 1/9
- 5 1/18

Probabilità di essere portatrice: $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$



Qual'è il rischio di Maria di essere carrier di HA?

- ha 1 fratello con HA
- ha 3 figli maschi sani
- è un carrier?





Calcolo Bayesiano

	II-1 Carrier	II-1 Non Carrier
Rischio a Priori	$1/2$	$1/2$
Informazione condizionale (3 figli sani)	$(1/2)^3$	1^3
Rischio congiunto	$1/8$	$1/2 = 4/8$
Rischio congiunto finale	$1/9$	$8/9$

$1/9 (= 11,1\%)$





Calcolo Bayesiano

	II-1 Carrier	II-1 Non Carrier
Rischio a Priori	1/2	1/2
Informazione condizionale (3 figli sani, FVIII)	$(1/2)^3 \times 1/3$	$1^3 \times 1$
Rischio congiunto	1/24	$1/2 = 12/24$
Rischio congiunto finale	1/13	12/13

1/13 (= 7,7%)





Calcolo Bayesiano

	II-1 Carrier	II-1 Non Carrier
Rischio a Priori	1/2	1/2
Informazione condizionale (3 figli sani, FVIII, no IVS-22)	$(1/2)^3 \times 1/3 \times 1/2$	$1^3 \times 1 \times 1$
Rischio congiunto	1/48	$1/2 = 24/48$
Rischio congiunto finale	1/25	24/25

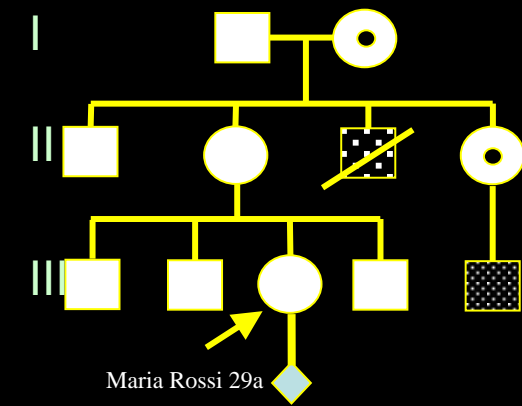
1/25 (= 4,0%)





Calcolo Bayesiano

Probabilità a posteriori



Dati utili per il calcolo del rischio di essere portatrice

- **Anamnesi familiare:** la madre è portatrice (rischio a priori è del 50%) però ha 3 figli sani.
- **Dati di laboratorio:** a causa della inattivazione della X, una parte delle cellule epatiche esprimono l'allele mutato e non producono FVIII: 2/3 delle portatrici hanno livelli ridotti di FVIII.
- **Dati genetici:** il 50% dei casi di HA grave è causato dall'inversione del IVS-22

Maria è portatrice? 25% (Mendel) → 4% (Bayes)

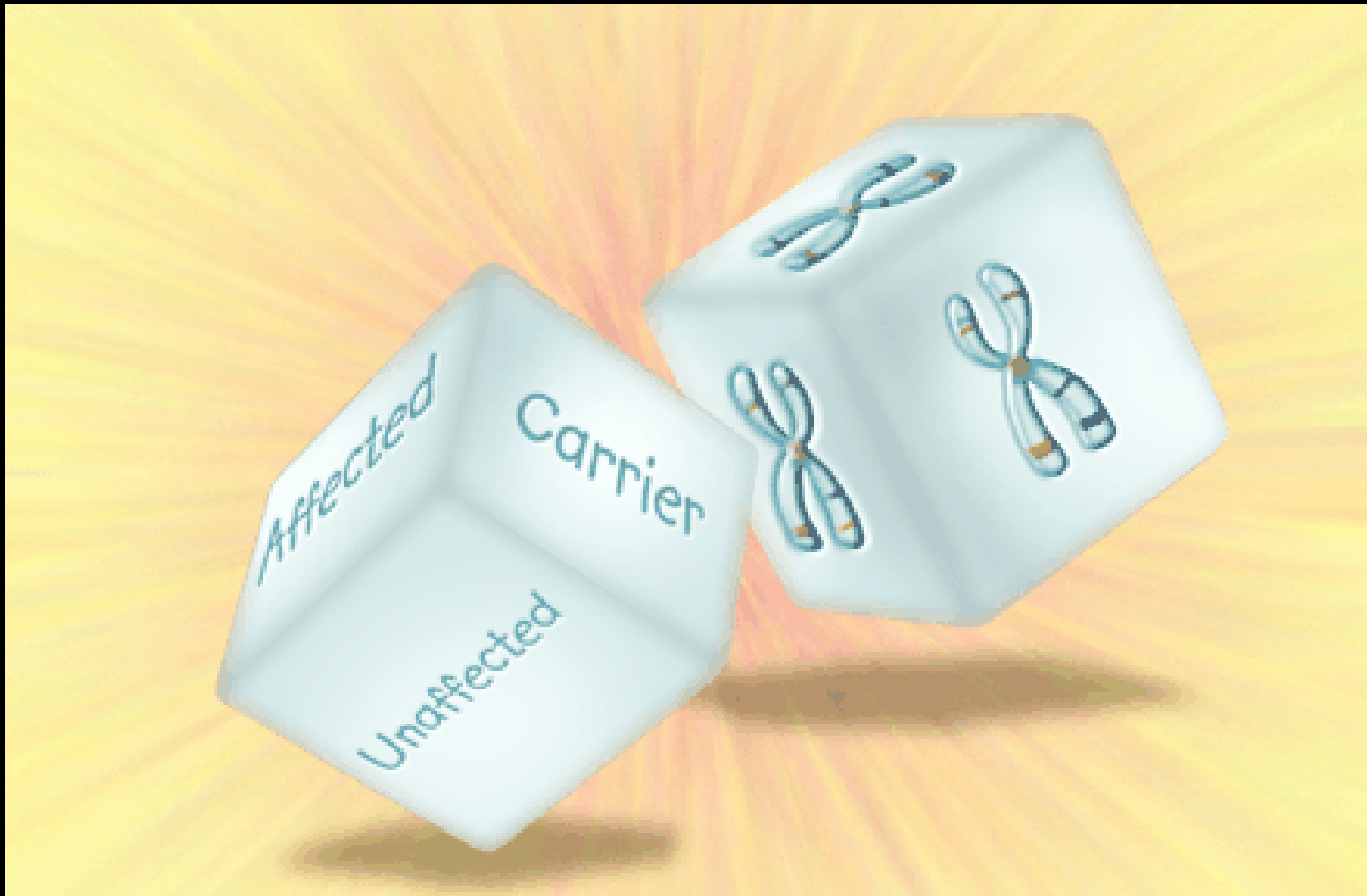
Nessuno dei dati precedenti permette una diagnosi certa!!!



Leggi di Mendel (\pm teorema di Bayes)

=

previsione probabilistica del fenotipo

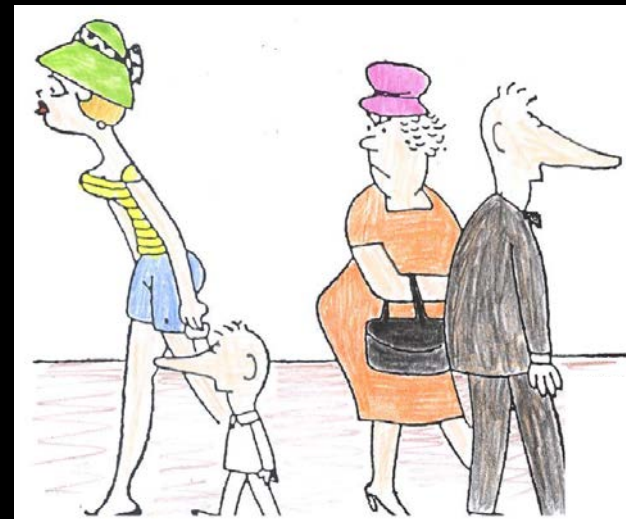


Anamnesi familiare negativa

Unico caso in famiglia

Implicazioni per il rischio di ricorrenza nella famiglia

- ▶ Autosomico recessiva ?
- ▶ X-linked ?
- ▶ Autosomico dominante: mutazione *de novo*, penetranza incompleta ?
- ▶▶ Falsa paternità/adozione ?



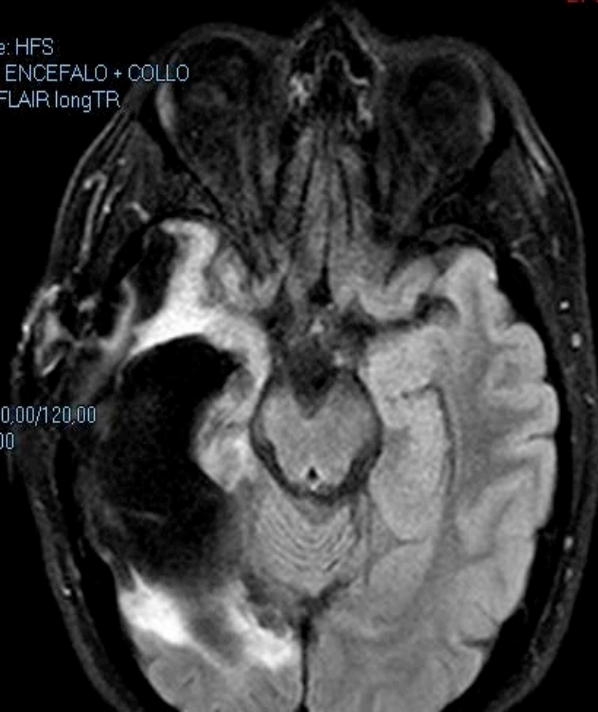
Diagnosi genetica

➤ **Diagnosi di una malattia genetica?**



Malattia Genetica

Ec:1
Fr:1
Pos. paziente: HFS
Desc. studio: ENCEFALO + COLLO
Desc. serie: FLAIR longTR
< 301 - 9 >



DFOV 23.0 x 23.0 cm

SW 5.00 mm



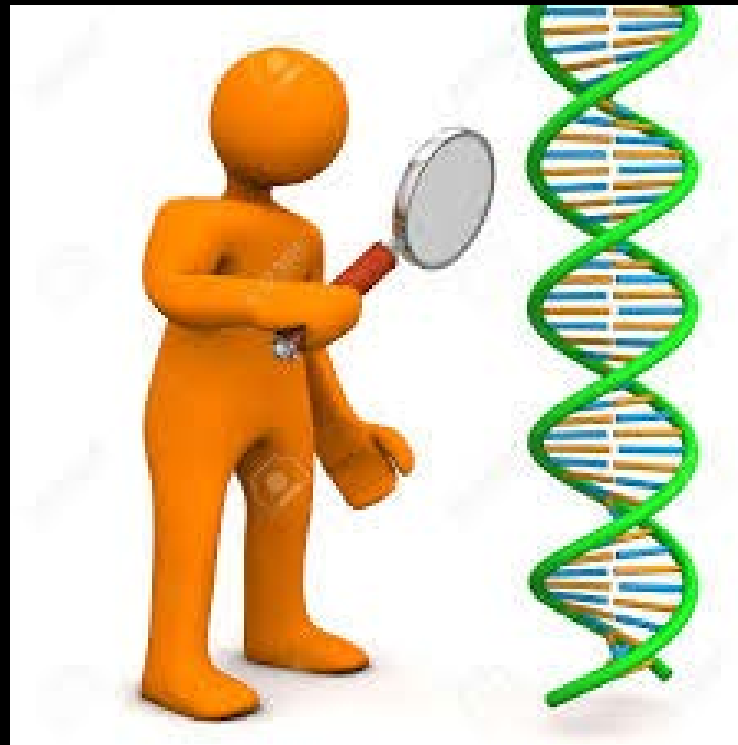
R

11000,00/2800,00/120,00
Et: 29 TA: 90,00
400x400
Enc: ^
1nex



Diagnosi genetica

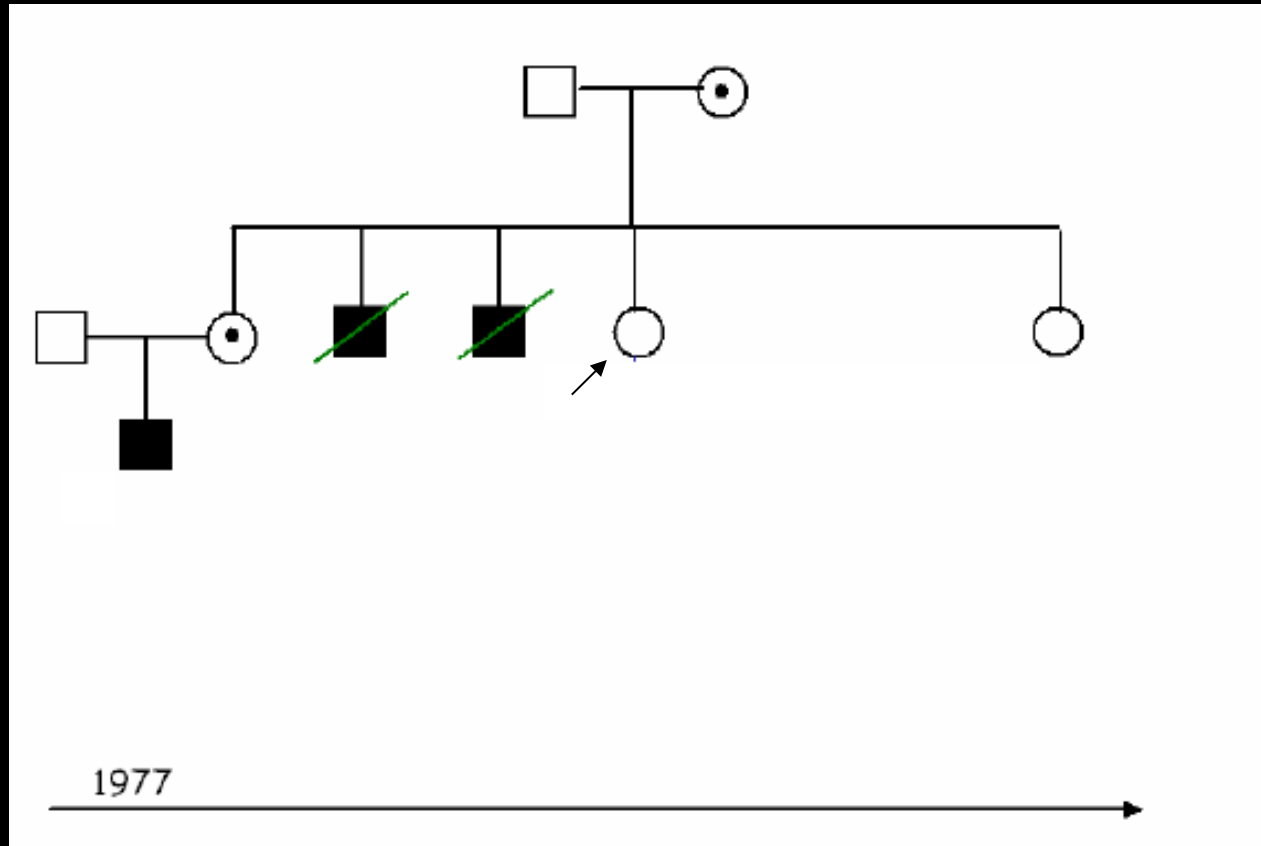
- **Diagnosi di una malattia genetica?**
- **Diagnosi che si effettua con un test genetico?**



Cos'è cambiato nella diagnosi genetica dell'Emofilia

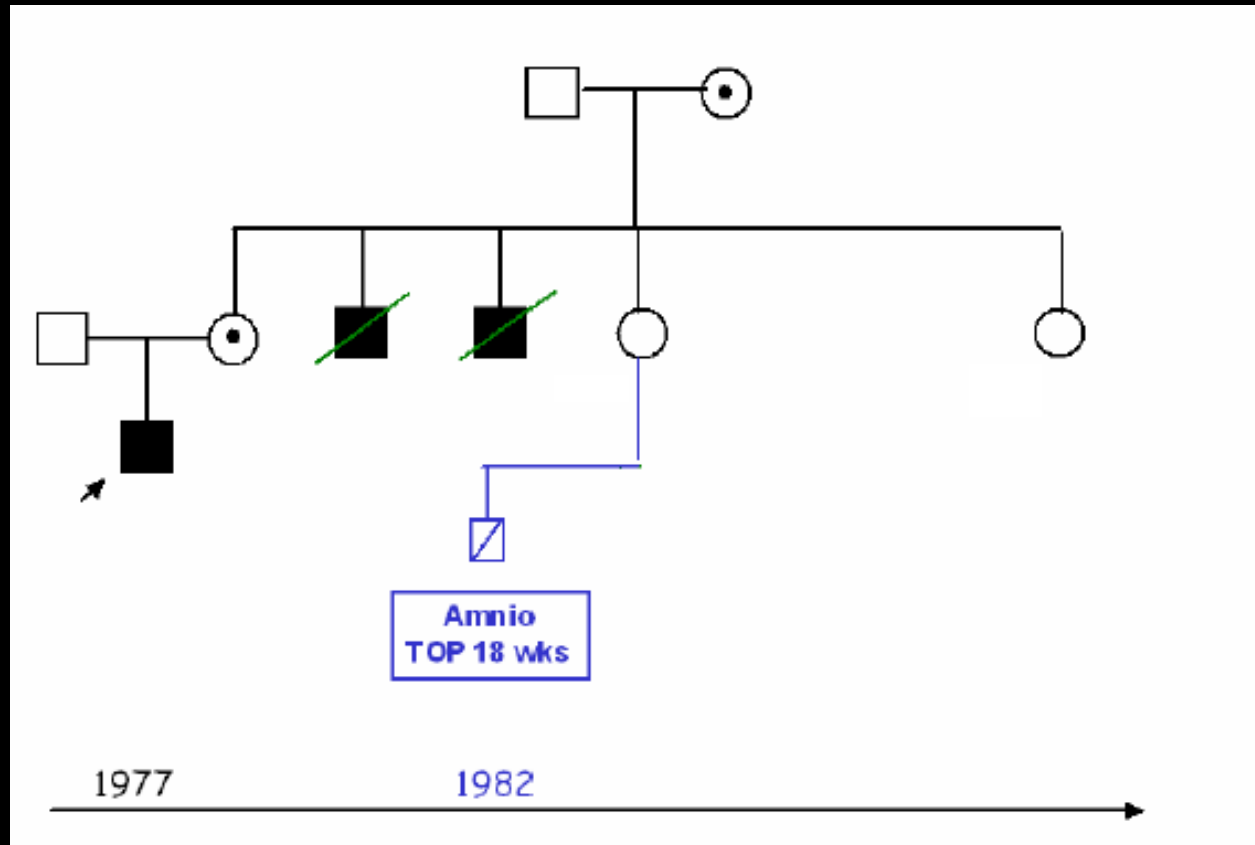


Cos'è cambiato nella diagnosi genetica dell'Emofilia



Leggi di Mendel (± teorema di Bayes)

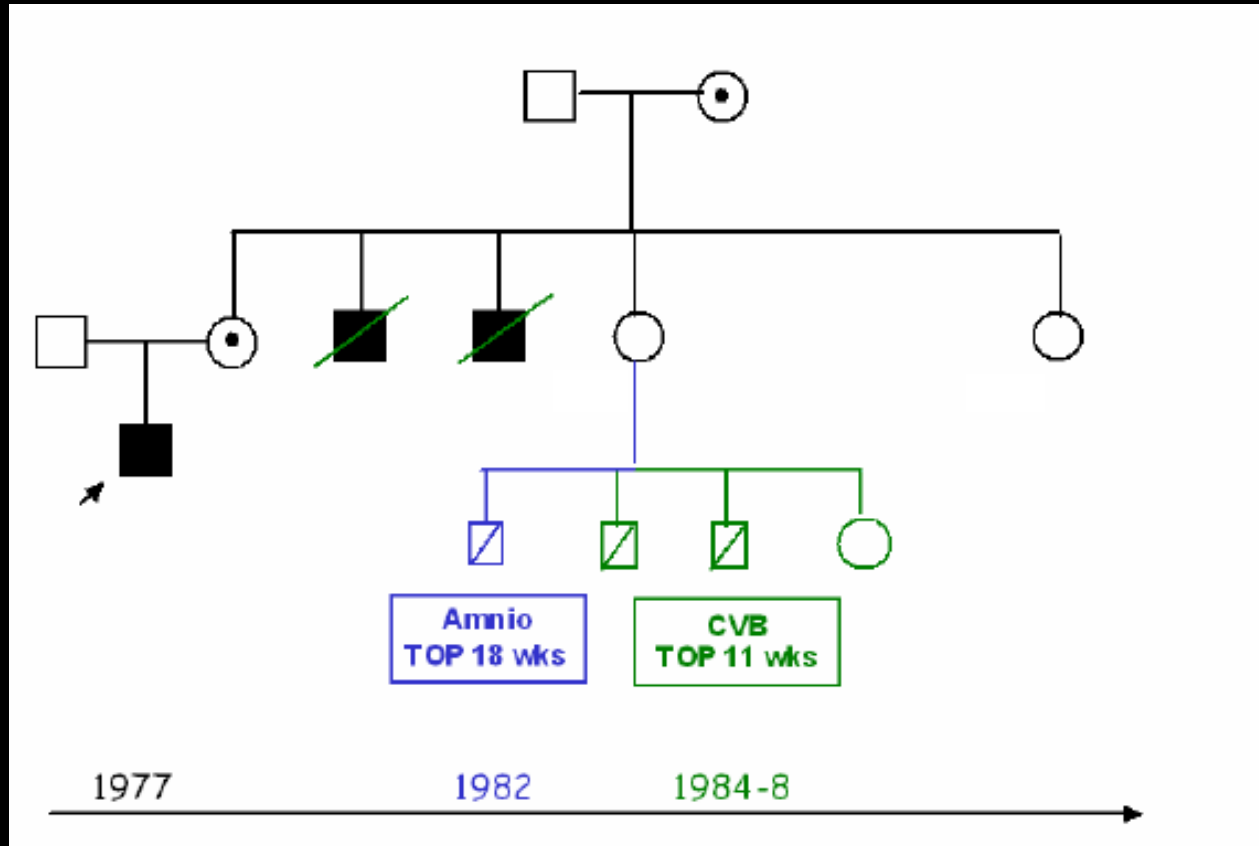
Cos'è cambiato nella diagnosi genetica dell'Emofilia



Diagnosi prenatale invasiva: amniocentesi

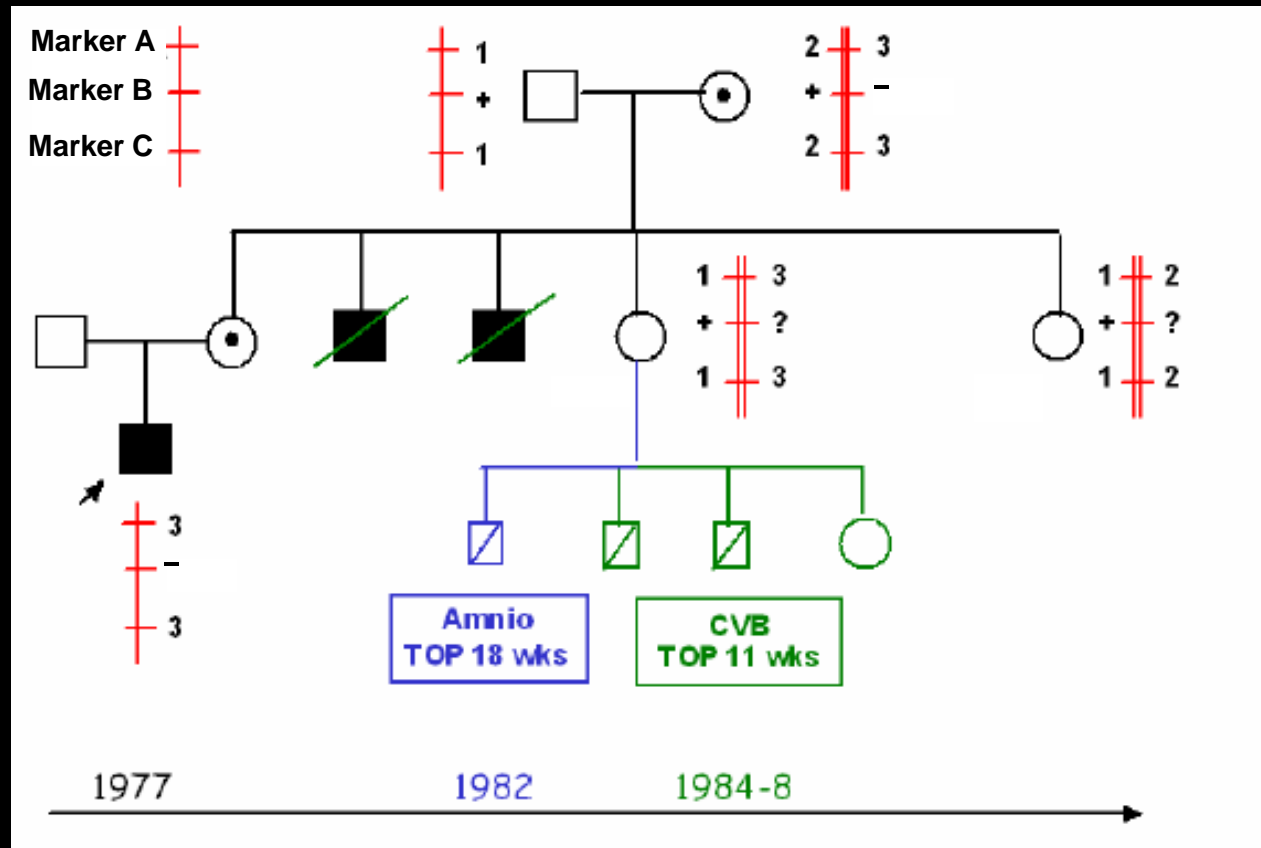


Cos'è cambiato nella diagnosi genetica dell'Emofilia



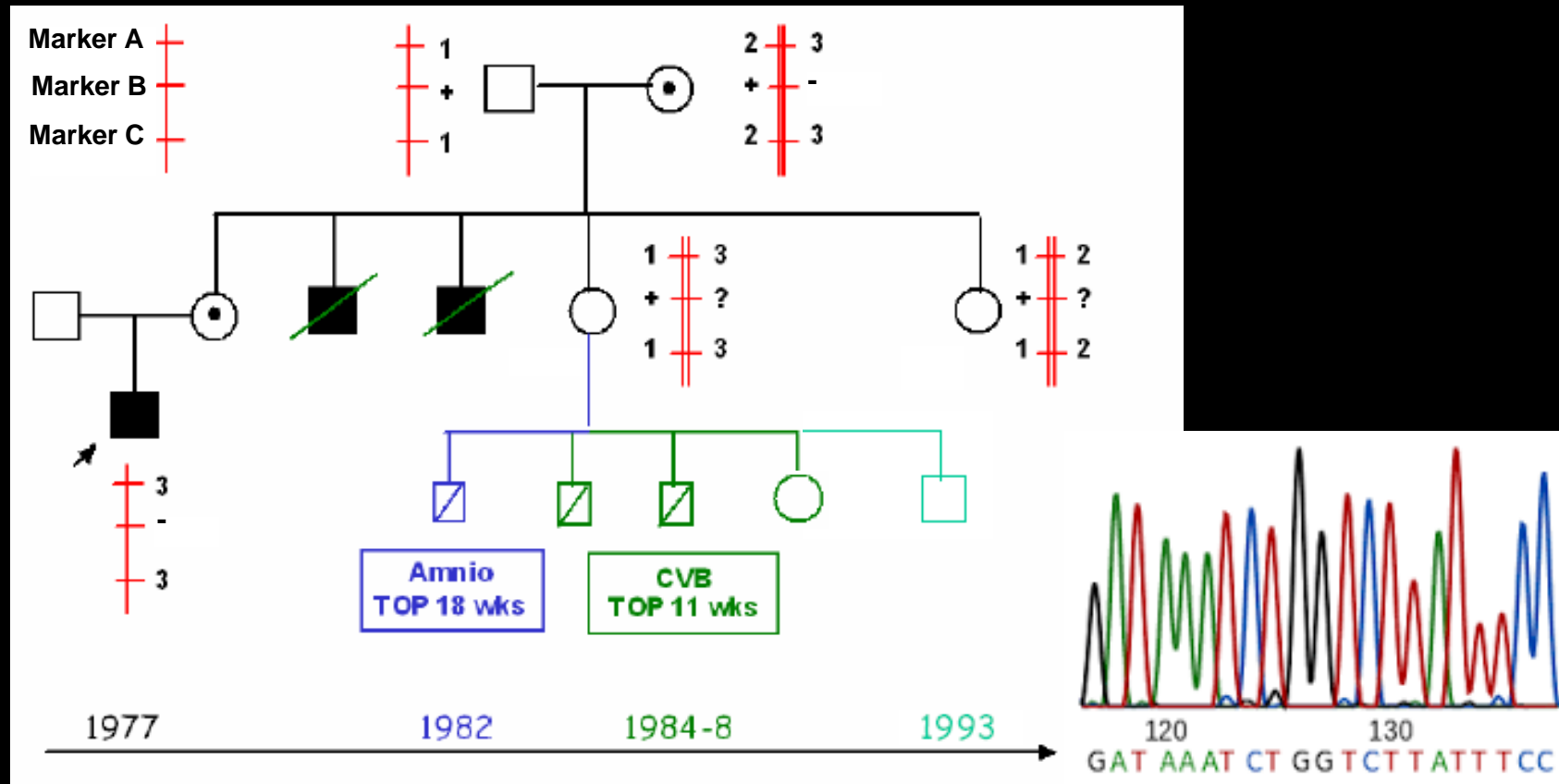
Diagnosi prenatale invasiva: villocentesi

Cos'è cambiato nella diagnosi genetica dell'Emofilia



Diagnosi prenatale invasiva + identificazione indiretta

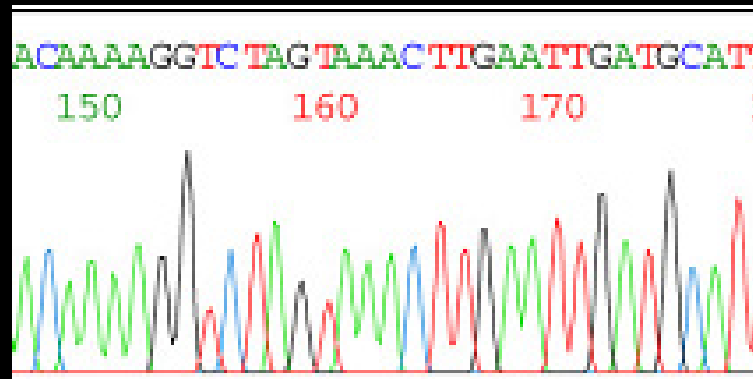
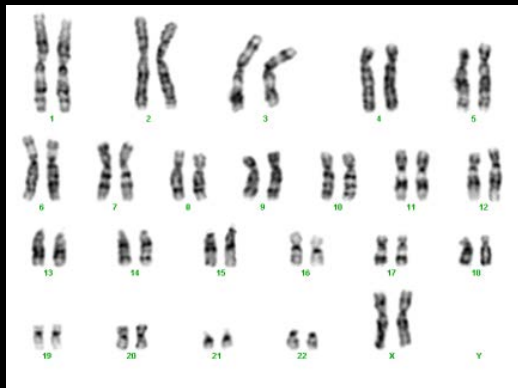
Cos'è cambiato nella diagnosi genetica dell'Emofilia



Diagnosi prenatale invasiva + identificazione diretta

Diagnosi genetica

- Diagnosi di una malattia genetica?
- Diagnosi che si effettua con un test genetico?
- Cos'è un test genetico?



What is genetic testing?

Genetic testing is a type of medical test that identifies changes in chromosomes, genes, or proteins. The results of a genetic test can confirm or rule out a suspected genetic condition or help determine a person's chance of developing or passing on a genetic disorder.

Several methods can be used for genetic testing:

- Molecular genetic tests.
- Chromosomal genetic tests.
- Biochemical genetic tests.



DISEASE SEVERITY

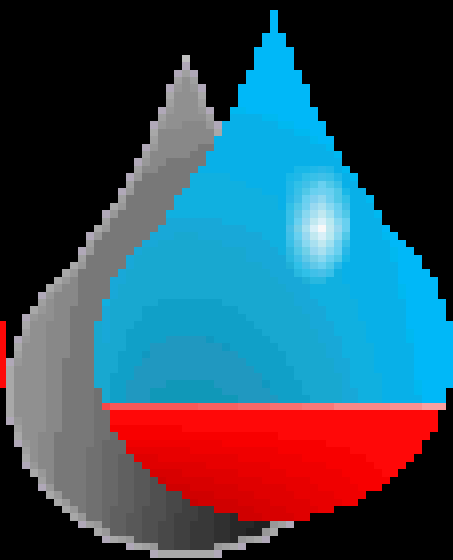
Degrees of severity in haemophilia

Factor VIII or IX activity



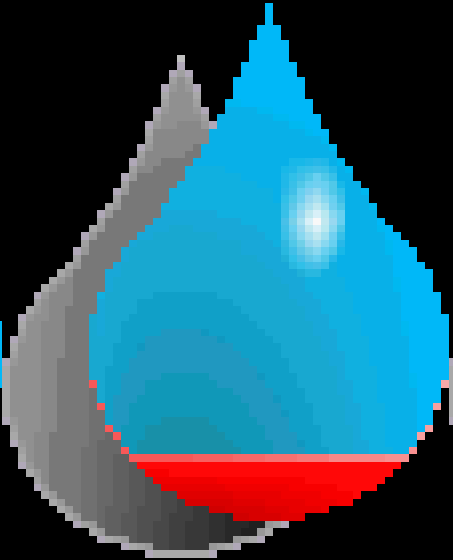
Normal

50-150%



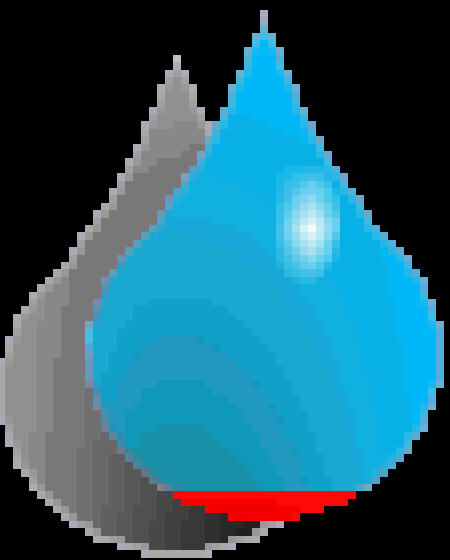
Mild

5-50%



Moderate

2-5%



Severe

<1%

Perché eseguire un test genetico?

- Identificazione dei carrier
- Predizione della risposta terapeutica o dell'insorgenza delle complicanze
- Diagnosi prenatale



Perché eseguire un test genetico?

➤ Identificazione dei carrier



Perché eseguire un test genetico?

- **Identificazione dei carrier**
- **Predizione della risposta terapeutica o dell'insorgenza delle complicanze**

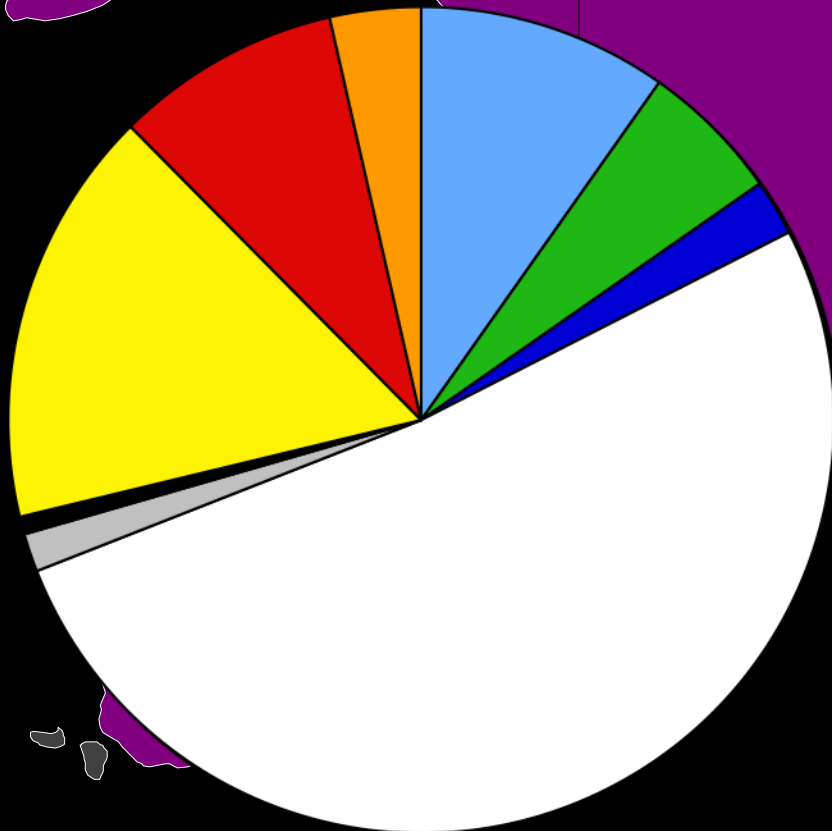


The Italian AICE-Genetic Hemophilia A database

Tipo di mutazione

Gravi

Moderati/Lievi



■ Inv IVS-22

■ Nonsense

■ Small ins

■ Inv IVS-1

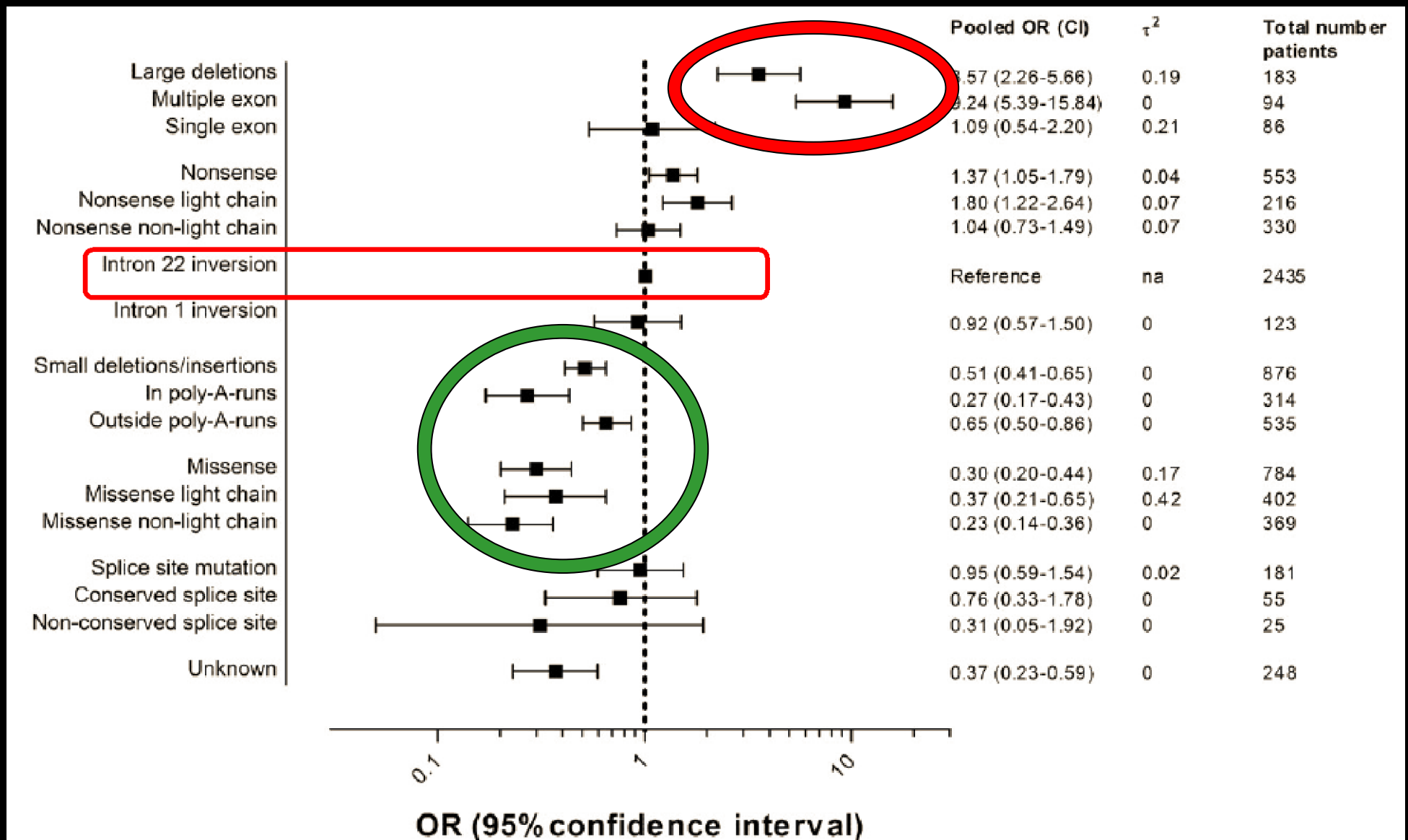
■ Missense

■ Small del

■ Splice site

■ Large del

Fattori di rischio per la formazione di inibitori FVIII



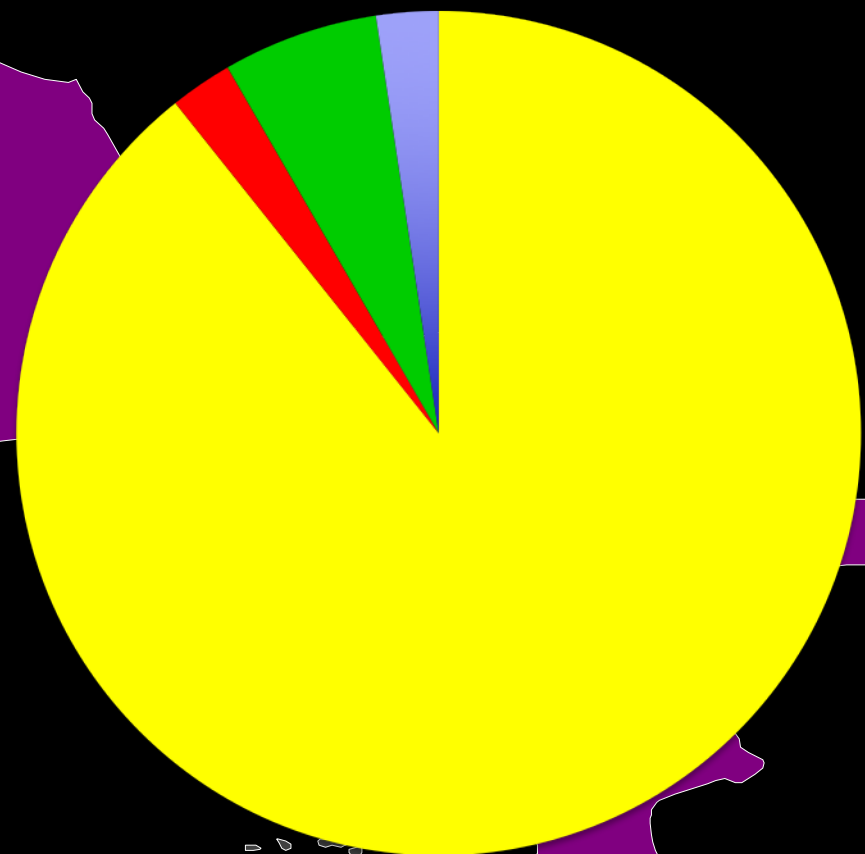
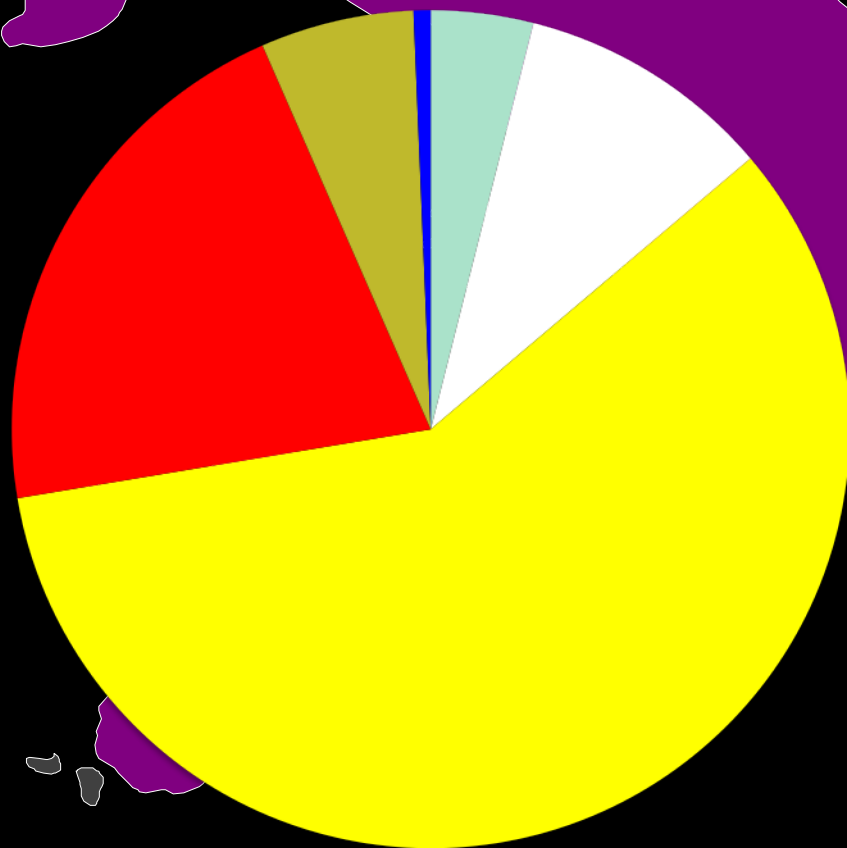
Meta-analisi di 30 studi con 5383 pazienti HA gravi

The Italian AICE-Genetic Hemophilia B database

Tipo di mutazione

Gravi

Moderati/Lievi



Data from Belvini et al, Haematologica 2005



Fattori di rischio per la formazione di inibitori FIX

Table 1. Italian patients with haemophilia B and inhibitors

Case number	Mutation	Age at detection of inhibitor	Previous treatment at inhibitor onset	Exposure days (ED) at inhibitor onset	Peak titre (BU)	Allergic reaction	Immune tolerance and treatment for bleeding
1*	Trp194Stop	17	Plasma, PCC	15	140	NO	NO
2	Trp194Stop	2	rFIX	8	90	NO	YES, eradication after 1,598 ED with rFIX (200 U/kg/day), on prophylaxis thrice weekly
3	Arg248Stop	12	PCC, pdFIX	30	2.6	NO	YES, eradication after 26 ED with pdFIX (50 U/kg every other day), thereafter treatment on demand since 8 years
4	Arg248Stop	1	rFIX	19	1.6	YES	YES, treatment with FEIBA and rFVIIa previously, eradication after 5 ED with pdFIX (50 U/kg/day), on prophylaxis twice weekly thereafter since 3 years
5, cousin of case 6	Arg252Stop	6	pdFIX	43	117	NO	YES, treatment with FEIBA and rVIIa previously, eradication after 153 ED with rFIX (80U/kg/day), on prophylaxis thrice weekly thereafter since 4 years
6, cousin of case 5	Arg252Stop	2	pdFIX	22	11	NO	YES, treatment with FEIBA and rFVIIa previously, disappearance after ~ 150 ED with rFIX (80 U/kg/day), relapse on IT, still ongoing after 2 years
7*, uncle of case 8	Exons A-H deletion	44	PCC	7	25	YES	NO
8, nephew of case 7	Exons A-H deletion	5	rFIX	4	1.7	YES	NO, rFVIIa on demand
9	Complete gene deletion	27	pdFIX	48	18	NO	NO, pdFIX on demand
10	Complete gene deletion	5	rFIX	31	6.4	NO	NO, rFVIIa on demand



Fattori di rischio per la formazione di inibitori FIX

Classe di mutazione e inibitori nell'Emofilia B

USA

Svezia

Mutation type	No. of patients (%)	No. of patients with inhibitors (%)
Missense	159 (70.4)	0
Nonsense	25 (11.1)	8 (32.0)
Frameshift	10 (4.4)	0
Splice site change	6 (2.7)	0
Large deletion	14 (6.2)	7 (50.0)
Small deletion	5 (2.2)	0
Synonymous	3 (1.3)	0
Promoter	3 (1.3)	0
No mutation	1 (0.4)	0
Total	226 (100)	15 (6.6)

Mö-ID	Mutation	Protein change
2	del total	–
68	del total	–
82	del exons A–D, F–H	–
44	20398 del 1 bp (fs)	fs Thr 140, stop 156
44	20398 del 1 bp (fs)	fs Thr 140, stop 156
1	30950 del 8 bp (fs)	fs Asp 276, stop 288
4	C 6460 T	Arg 29, stop
69	C 6460 T	Arg 29 - stop
5	G 20561 A	Trp 194, stop
3	C 30863 T	Arg 248, stop

Li et al, Am J hematomol 2014

Ljung et al, Br J Haematol 2001

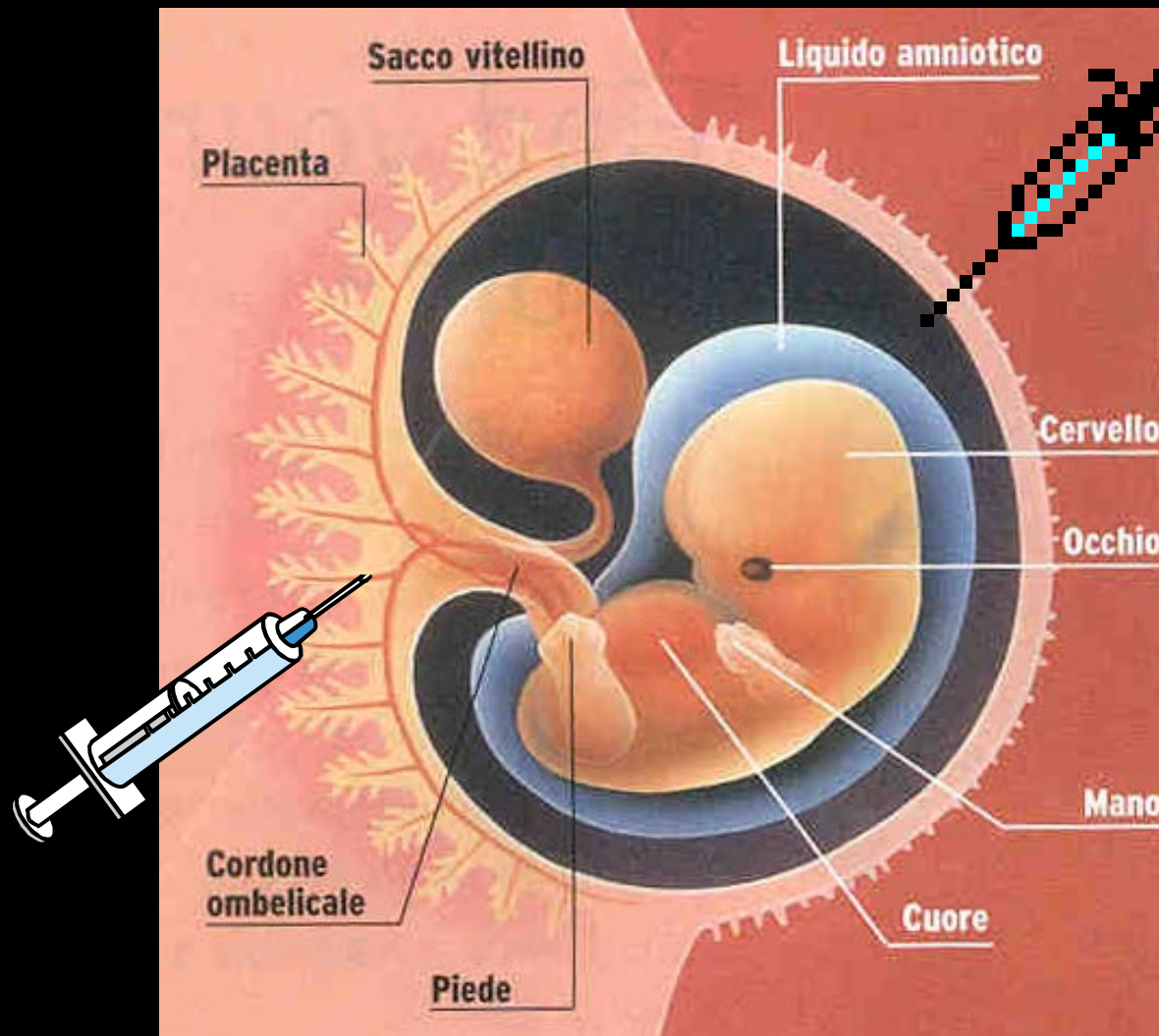


Perché eseguire un test genetico?

- **Identificazione dei carrier**
- **Predizione della risposta terapeutica o dell'insorgenza delle complicanze**
- **Diagnosi prenatale**



Diagnosi prenatale: prelievo



DIAGNOSI PRENATALE: RISCHI

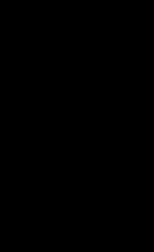
Tutte le tecniche attualmente in uso, che hanno lo scopo di ottenere campioni di DNA fetale per la diagnosi prenatale, sono invasive e non prive di rischi per il feto e la donna.



Identificazione diretta della mutazione

Pro

- ✦ Informativa in “tutti” i casi
- ✦ Non necessari più familiari affetti



Identificazione diretta della mutazione

Contro

- ✦ **La mutazione dev'essere conosciuta**
- ✦ **Approccio differente nei diversi casi**
- ✦ *Tempi per la risposta*



Un centro per la diagnosi di portatrice e per la diagnosi prenatale di emofilia necessita della collaborazione delle seguenti strutture:

- Centro per la diagnosi e terapia dell' emofilia.
- Laboratorio di biologia molecolare per lo studio del DNA.
- Reparto di ostetricia per il prelievo dei villi coriali o del liquido amniotico.
- Laboratorio di citogenetica per lo studio del cariotipo e la determinazione del sesso nel feto.



Diagnosi genetica

- **Diagnosi di una malattia genetica?**
- **Diagnosi che si effettua con un test genetico?**
- **Cos'è un test genetico?**
- **Conseguenze?**



Problemi correlati ai test genetici

Mutazioni difficili da interpretare

- mutazioni missenso: sempre patogenetiche?
- mutazioni eterozigoti in geni recessivi: fattori di rischio?
- alleli intermedi: significato?

Tipo di mutazione identificata

- Mutazione causale riportata in letteratura
- Mutazione possibilmente causale ma non riportata in letteratura
- Mutazione di incerto significato clinico
- Mutazione possibilmente benigna ma non riportata in letteratura (sporadica/polimorfismo?)
- Mutazione possibilmente benigna riportata in letteratura (sporadica/polimorfismo)



Problemi correlati ai test genetici

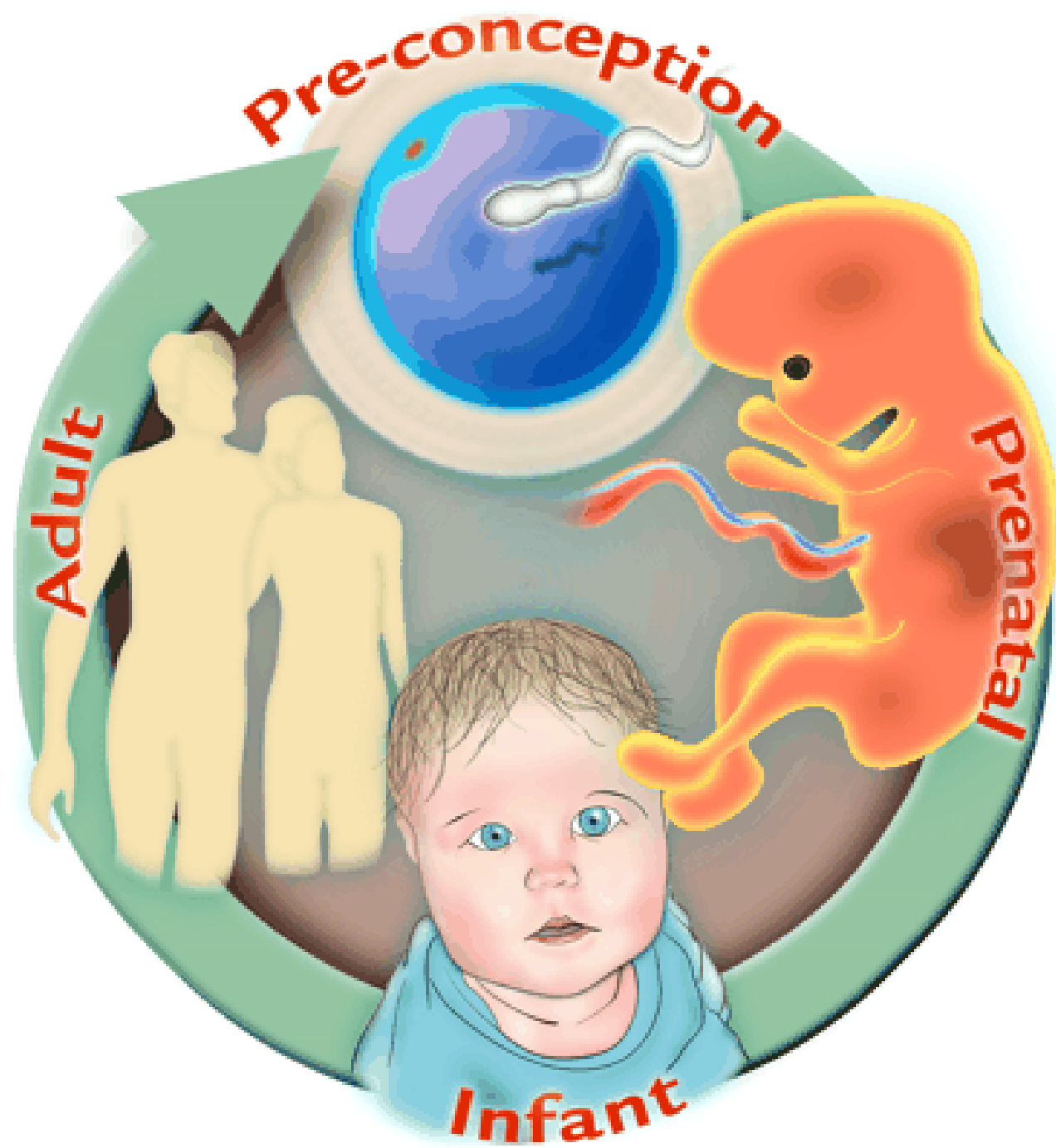
Eterogeneità genetica allelica, mutazioni difficili da individuare

- geni di dimensioni notevoli, no hot spots, mutazioni private
- mutazioni introniche o in sequenze regolatorie
- delezioni o moltiplicazioni (multi)esoniche in eterozigosi
- identificazione di alleli intermedi (per mutazioni dinamiche)

Eterogeneità genetica di locus

- lo stesso fenotipo può essere causato da **mutazioni in geni distinti** (alcuni possono essere ancora non identificati)
- trans-eterozigosità / ereditarietà digenica → 2 mutazioni in 2 geni distinti contribuiscono alle manifestazioni cliniche e possono influenzare la gravità del fenotipo
- ereditarietà triallelica: in aggiunta a due mutazioni in un singolo gene, una terza mutazione in un gene distinto è necessaria per determinare il fenotipo patologico o la sua espressione





Test genetico

Analisi di un gene specifico, il suo prodotto o funzione, o di ogni altro tipo d'indagine di DNA, RNA o dei cromosomi, finalizzata a individuare o escludere una mutazione associata a una malattia genetica.

P. Harper. *J Med Genet* 34, 749-757, 1997

Qualsiasi test che produca dati genetici

Commissione europea - Bruxelles 2004

“25 raccomandazioni concernenti le implicazioni etiche giuridiche e sociali dei test genetici”



La natura dell'informazione genetica

L'informazione genetica è diversa o uguale alle altre informazioni mediche?

Eccezionalità genetica o semplice informazione medica?



Test genetici: perché sono diversi dalle consuete analisi di laboratorio?

- I risultati sono **permanenti** per l'individuo sottoposto al test
- Possono essere eseguiti con **finalità diagnostiche** ma anche **predittive** per patologie future
- I risultati possono avere **conseguenze importanti per altri membri familiari**, solitamente figli, ma talvolta fratelli e genitori
- Occasionalmente alcune forme di test genetico possono rivelare informazioni non desiderate (paternità)

Ogni molecola di DNA di una persona è un possibile diario di eventi futuri, piuttosto che la memoria del passato



Problemi etici

Indagini

- Indagini su soggetti non interessati alla consulenza
- Indagini su minori o disabili
- Indagini invasive

Risultati

- Risultati di difficile interpretazione
- Risultati che aprono problemi inattesi
- Risultati che hanno ripercussioni su soggetti non interessati alla consulenza
- Risultati che riguardano minori o disabili
- Diagnosi preclinica o diagnosi di predisposizione a malattie gravi



“Il test genetico deve essere considerato un servizio integrato, nel senso che deve essere preceduto e seguito da una informazione specifica (consulenza genetica collegata al test genetico)”

Conferenza Stato-Regioni, 15 luglio 2004, Linee-Guida per le Attività di Genetica Medica

Il pubblico riceva informazioni sempre corrette e aggiornate sui limiti e sugli obblighi imposti dalle disposizioni vigenti al trattamento dei propri dati di natura genetica (Art. 90 del Dlgs 196 del 2003 e disposizioni presenti nella “Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici” - G.U. n. 65 del 19-3-2007), in particolare sull’obbligo che venga fornita una completa informativa e acquisito sempre un consenso scritto prima dell’esecuzione del test

Commissione Ministero della Salute per la Genetica nel Servizio Sanitario Nazionale



Consulenza genetica

Il “counseling” genetico **fornisce** informazioni **pratiche** alle persone sul proprio rischio di sviluppare o trasmettere una malattia ereditaria o un difetto congenito.

Il “counseling” genetico **discute** il meccanismo di ereditarietà della malattia, la sua incidenza, il rischio di trasmissibilità, i test per identificarne lo stato di malattia o di portatore e gli eventuali metodi di prevenzione e terapia.

Il consulente genetista ha un approccio teso a fornire informazioni alle persone e discutere con loro perchè siano in grado di prendere in autonomia una decisione “informata”.



Consulenza genetica

Consulenza pre-test:

- Identificazione dei possibili test genetici utili
- Informazione sulle potenzialità e limiti dei test identificati
- Scelta del consultando se sottoporsi o no al test

Consulenza post-test:

- Interpretazione e comunicazione dei risultati del test
- Suggerimenti su eventuali protocolli terapeutici o preventivi
- Supporto psicologico



Reazioni psicologiche riscontrabili in sede di consulenza genetica

Reazioni emotive:

- Rabbia
- Ansia
- Negazione
- Vergogna
- Fatalismo
- Cambio della percezione di sé
- Sensi di colpa (parentali e di sopravvivenza)

Reazioni elaborate:

- Intellettualizzazione
- Razionalizzazione
- Ricerca di significati
- Cambio del ruolo sociale
- Cambio nella religiosità
- Paura della discriminazione umana e sociale

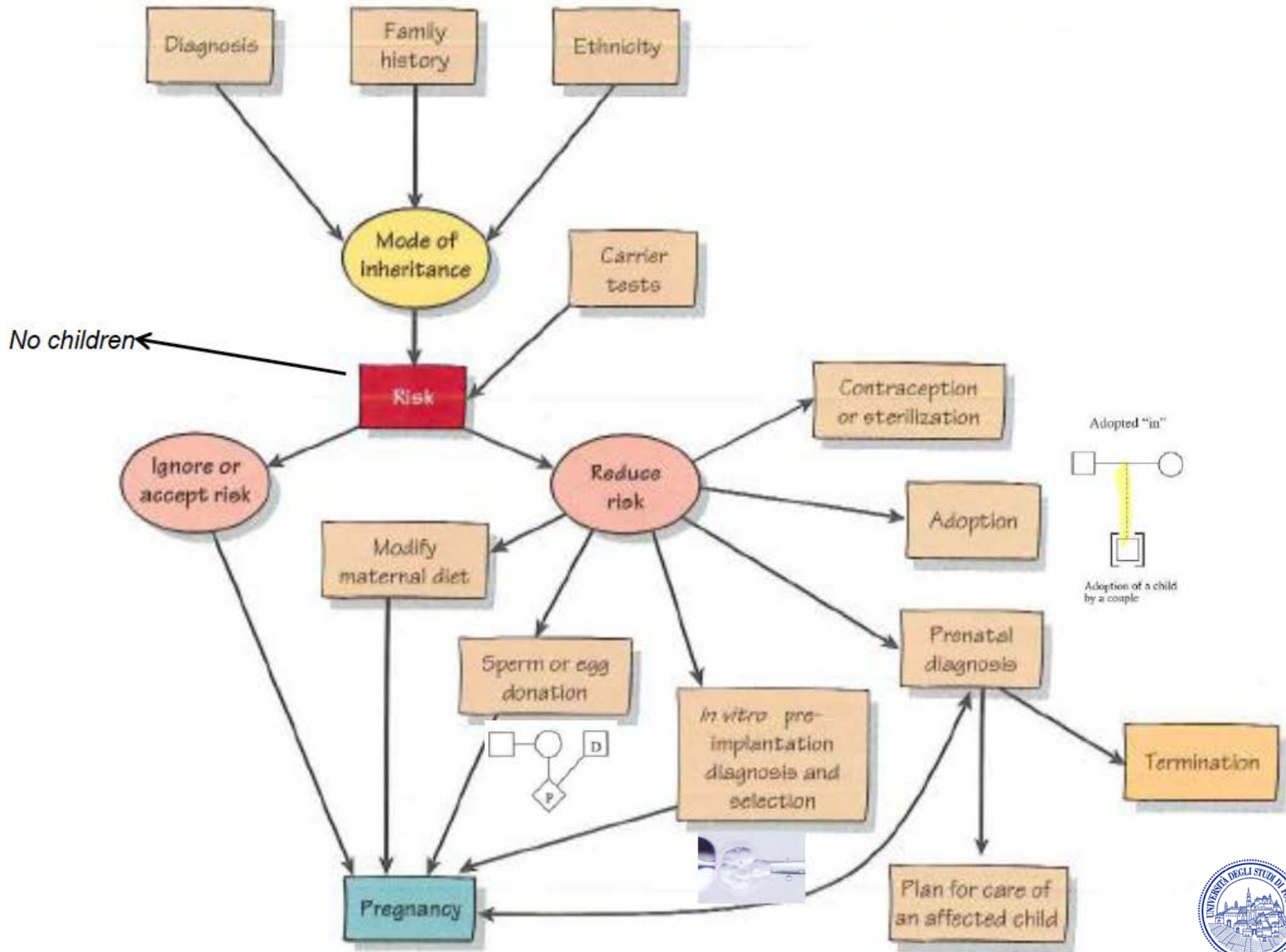


Consulenza genetica:

altri fattori che condizionano la decisione

- Conoscenza della malattia
- Decorso della malattia
- Possibilità terapeutiche
- Limitazioni sociali che impone
- Concetto di “condizione accettabile”
- Motivi religiosi/morali
- Numero di figli
- Presenza di figli sani





Altre opzioni

- Diagnosi Prenatale / aborto
- Adozione
- *Inseminazione artificiale da donatore*
- *Fertilizzazione in vitro con ovocellula da donatrice*
- Ignorare il rischio
- Astenersi dal concepire
 - contraccezione o sterilizzazione



Consulenza Genetica

Parere unanime sul fatto che durante la consulenza genetica non si deve:

- indirizzare il consultando verso una scelta ben precisa;
- esprimere giudizio in merito alle scelte del consultando;
- rispondere a domande del tipo “Lei al mio posto cosa farebbe?” ma, piuttosto, illustrare e discutere le possibili conseguenze delle differenti scelte possibili.

Non orientata e non coercitiva



