

SISSET

*Siset Training Center:*

**CORSO MALATTIE EMORRAGICHE**

Firenze, 26-30 settembre 2016

# La genetica dell'emofilia e la diagnosi prenatale

**Sabrina Frusconi**  
**SOD DIAGNOSTICA GENETICA**  
**AUOC FIRENZE**

# Emofilia B



E' causata da mutazioni che interessano il gene che codifica il fattore IX, le quali riducono o eliminano la funzione di questo nel plasma

- 1:20000-30000 maschi
- Disordine X-linked recessivo

Xq27.1-Xq27.2



# Emofilia A

E' causata da mutazioni che interessano il gene che codifica il fattore VIII, le quali riducono o eliminano la funzione di questo nel plasma

- 1:5000-10000 maschi
- Disordine X-linked recessivo

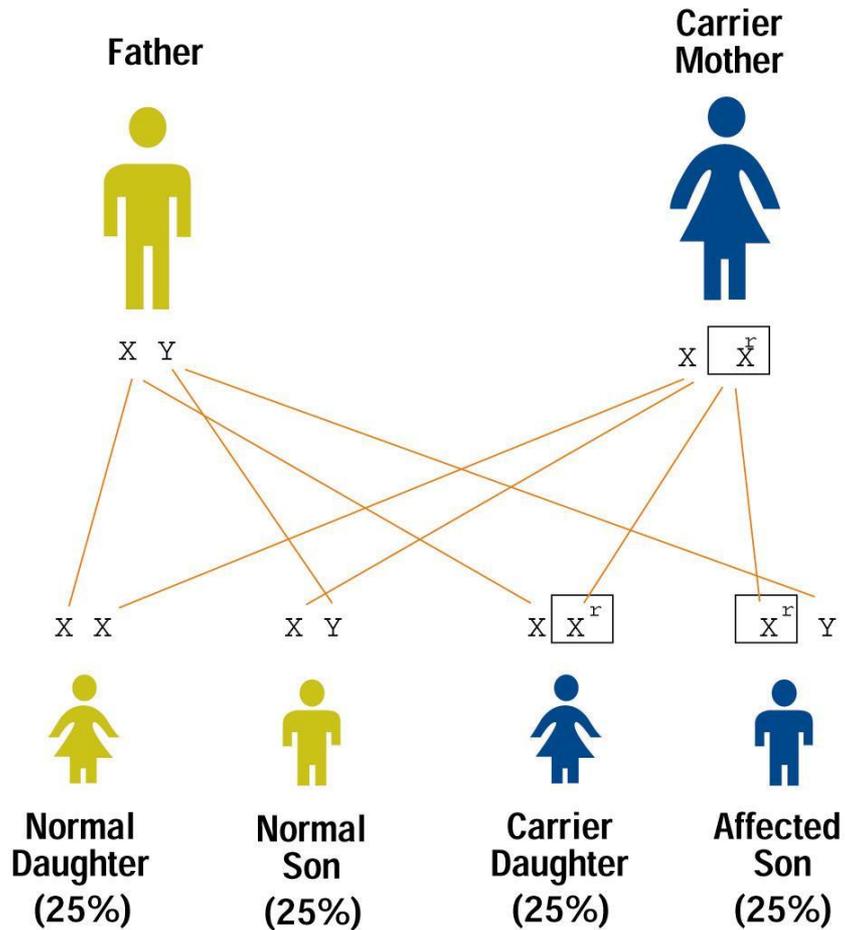
Xq28



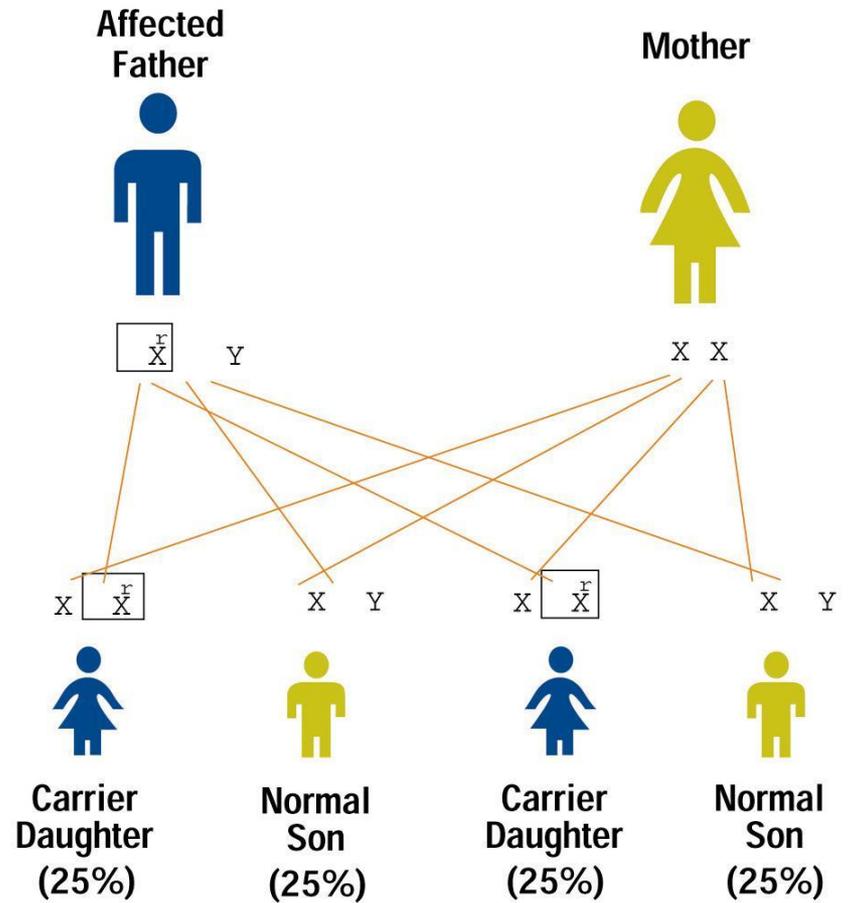
# Ereditarietà X-Linked recessiva e rischio di ricorrenza



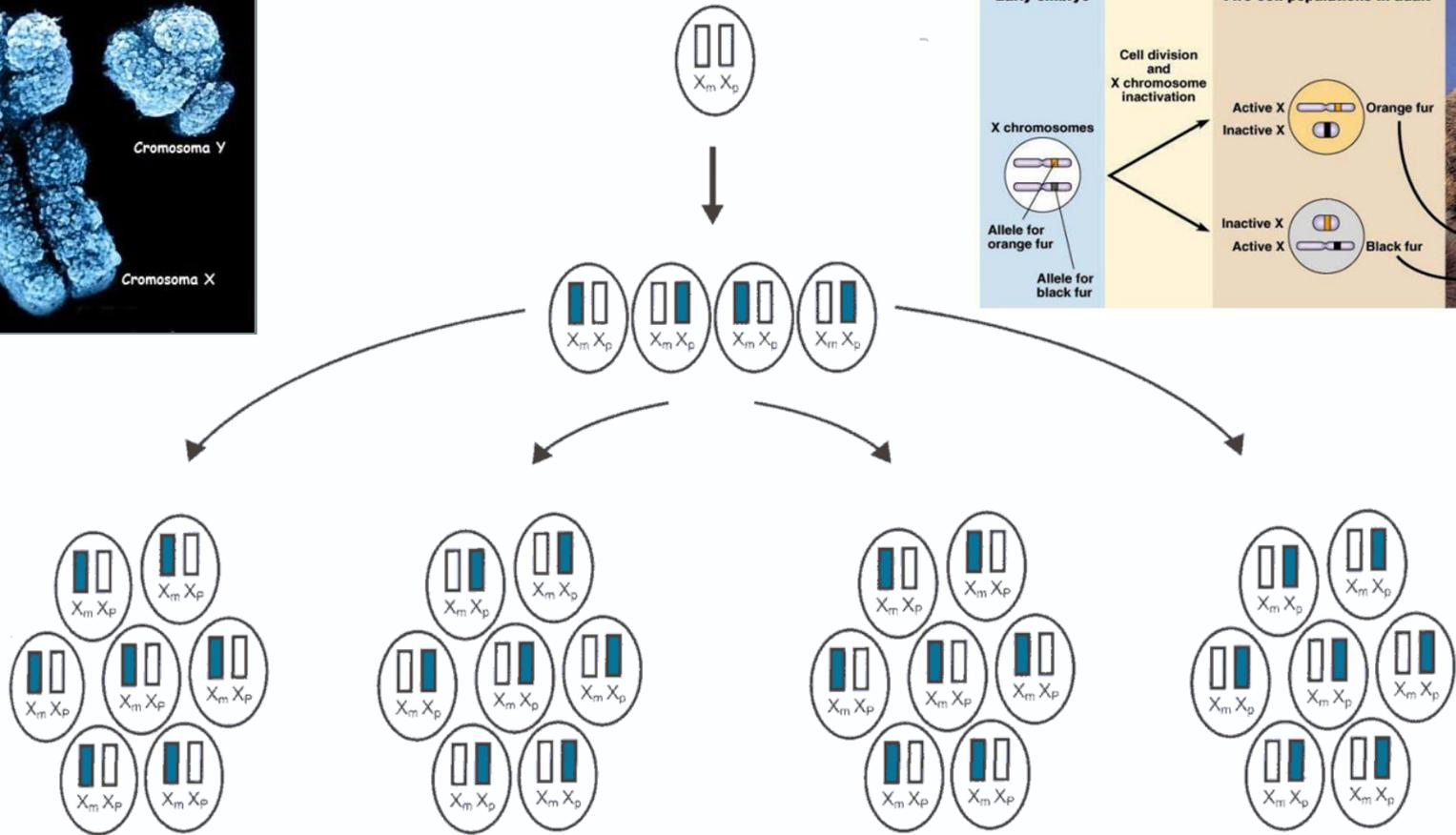
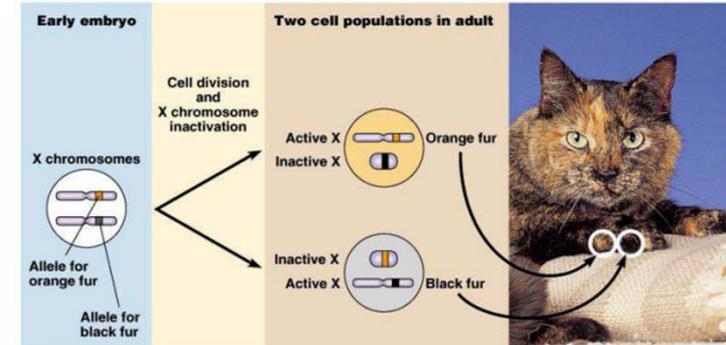
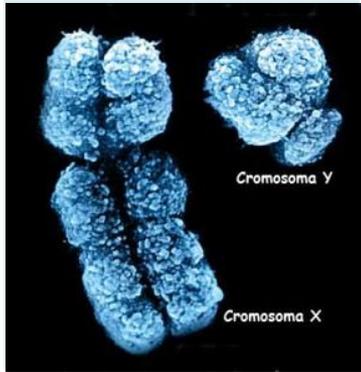
## Segregation of X-Linked Recessive Trait (Carrier Mother)



## Segregation of X-Linked Recessive Trait (Affected Father)



# Inattivazione del cromosoma X o Lyonizzazione



Un mammifero femmina eterozigote per un locus X-linked ha circa metà delle cellule somatiche embrionali che esprimono un fenotipo e metà che esprimono l'altro: mosaicismo

**Lyonizzazione estrema**

# EZILOGIA EMOFILIA A



E' causata da **mutazioni** che interessano il gene che codifica il fattore VIII, le quali riducono o eliminano la funzione di questo nel plasma

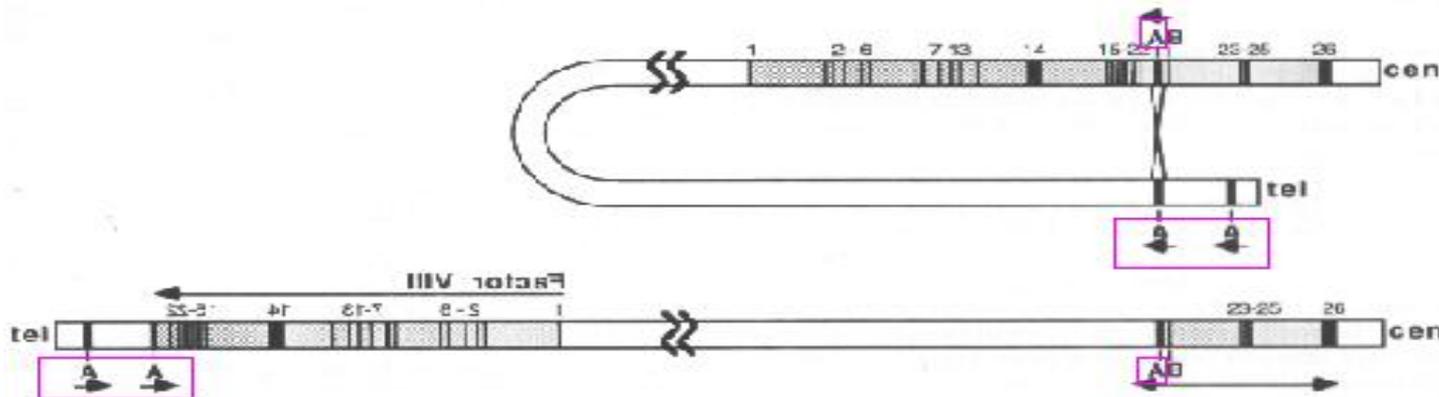
1) **Inversione** dell'introne 22 e dell'introne 1



Il **45-50%** dei pazienti con forma severa

Il **2-5%** dei pazienti con forma severa

Circa il **30%** dei pazienti del Nord Italia con forma moderata: duplicazione esone 13

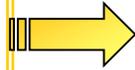


# EZIOLOGIA EMOFILIA A



Sono state caratterizzate oltre 2000 mutazioni

## MUTAZIONE GENICA



Consiste in un cambiamento della sequenza delle basi che comporta un'alterazione dell'informazione genetica.

### Sostituzioni:

Mutazione *nonsense*: si ha l'interruzione prematura della catena polipeptidica e, generalmente, una proteina non funzionale

Mutazione *missense*: la proteina prodotta differisce da quella normale per un aminoacido.

### Delezioni e inserzioni:

Consistono nell'aggiunta o nella eliminazione di una o più basi.

Sostituzioni

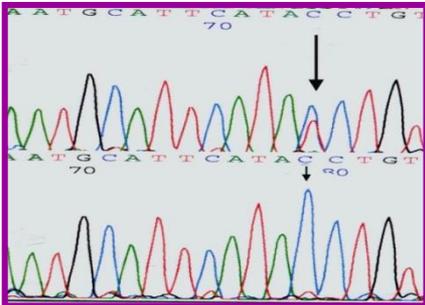
Delezioni

Inserzioni

HAMSTeRS mutation database <http://hadb.org.uk/>

HGMD Human Gene Mutation Database <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>

CDC Hemophilia A Mutation Project (CHAMP) <http://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>



# Test Genetici: Perché?

**UKHCDO**  
UNITED KINGDOM HAEMOPHILIA CENTRE DOCTORS' ORGANISATION

**CMGS**  
CLINICAL MOLECULAR GENETICS SOCIETY

## Practice Guidelines for the Molecular Diagnosis of Haemophilia A.

Guidelines prepared by Steve Keeney, Mike Mitchell and Anne Goodeve on behalf of the UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO), the Haemophilia Genetics Laboratory Network and the Clinical Molecular Genetic Society. All network members contributed to amending and approving the text. **UPDATED July 2010**

*It is recommended that all children with haemophilia are investigated to establish the causative FVIII gene (F8) mutation. Genetic analysis is required to reliably determine female carrier status.... Female relatives may request carrier analysis when a male relative is first diagnosed as having haemophilia, when they wish to start a family, or frequently, when in early pregnancy.*

**Studiare le femmine a rischio per escludere/identificare le portatrici**

**Effettuare la diagnosi prenatale**

**Comprendere i meccanismi eziopatogenetici**

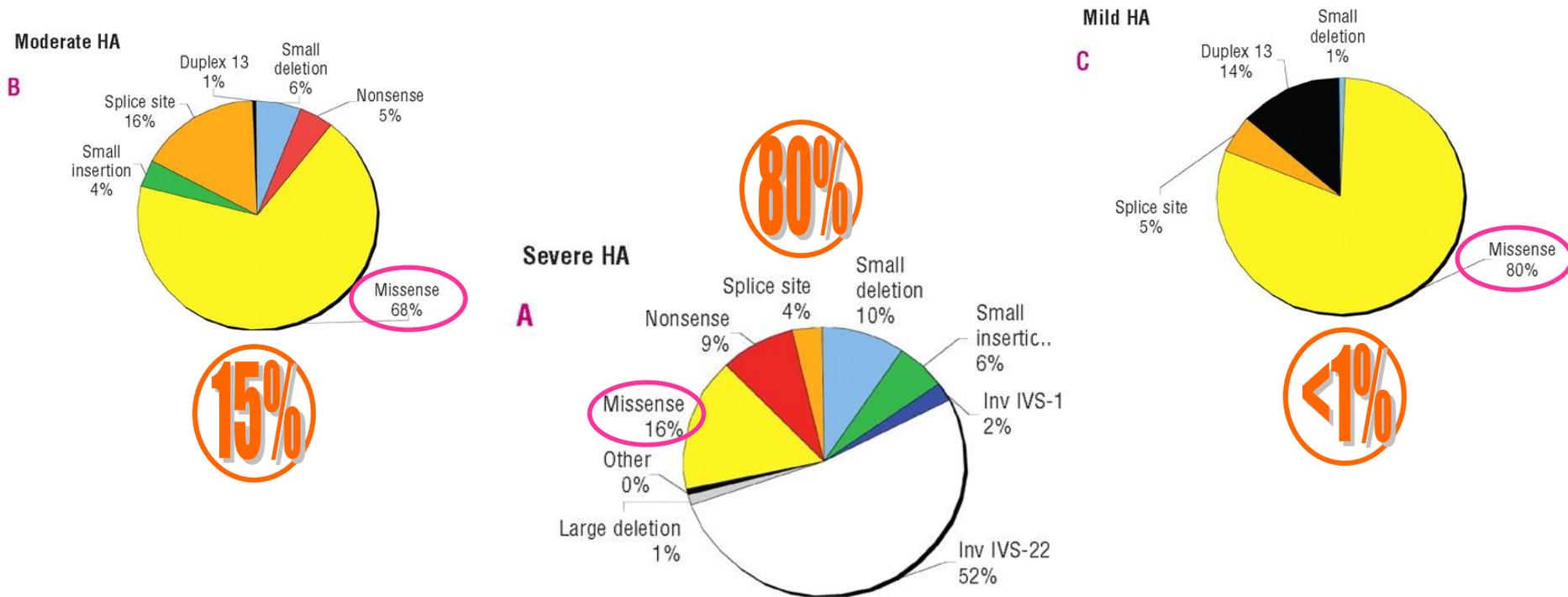
**Correlare genotipo-fenotipo**

# CORRELAZIONE GENOTIPO FENOTIPO



E' stata dimostrata un'associazione tra il tipo di mutazione e il fenotipo

Inversioni, delezioni, inserzioni, non sense sono in genere associate a fenotipo severo



# Blood

## **F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis**

Samantha C. Gouw, H. Marijke van den Berg, Johannes Oldenburg, Jan Astermark<sup>4</sup> Philip G. de Groot, Maurizio Margaglione, Arthur R. Thompson, Waander van Heerde, Jorien Boekhorst, Connie H. Miller, Saskia le Cessie and Johanna G. van der Bom

This systematic review was designed to provide more precise effect estimates of inhibitor development for the various types of *F8* gene mutations in patients with severe hemophilia A. The primary outcome was inhibitor development and the secondary outcome was high-titer-inhibitor development. A systematic literature search was performed to include cohort studies published in peer-reviewed journals with data on inhibitor incidences in the various *F8* gene mutation types and a mutation detection rate of at least 80%. Pooled odds ratios (ORs) of inhibitor development for different types of *F8* gene mutations were calculated with intron 22 inversion as the reference. Data were included from 30 studies on 5383 patients, including 1029 inhibitor patients. The inhibitor risk in large deletions and nonsense mutations was higher than in intron 22 inversions (pooled OR = 3.6, 95% confidence interval [95% CI], 2.3-5.7 and OR = 1.4, 95% CI, 1.1-1.8, respectively), the risk in intron 1 inversions and splice-site mutations was equal (pooled OR = 0.9; 95% CI, 0.6-1.5 and OR = 1.0; 95% CI, 0.6-1.5), and the risk in small deletions/insertions and missense mutations was lower (pooled OR = 0.5; 95% CI, 0.4-0.6 and OR = 0.3; 95% CI, 0.2-0.4, respectively). The relative risks for developing high titer inhibitors were similar.

# Blood

## **Factor VIII gene (F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A**

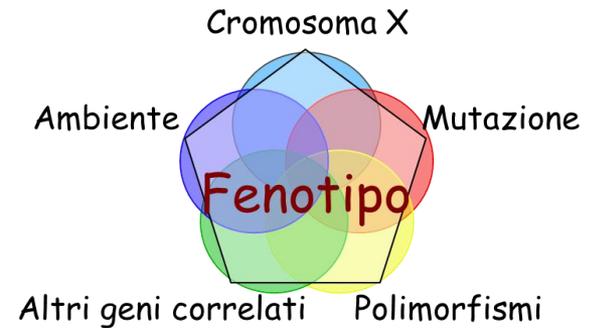
Corien L et al et al for the INSIGHT Study Group September 12, 2013; **Blood: 122 (11)**

Neutralizing antibodies (inhibitors) toward factor VIII form a severe complication in nonsevere hemophilia A, profoundly aggravating the bleeding pattern. Identification of high-risk patients is hampered by lack of data that take exposure days to therapeutic factor VIII concentrates into account. In the INSIGHT study, we analyzed the association between *F8* mutation and inhibitor development in patients with nonsevere hemophilia A (factor VIII 2-40 IU/dL). This analysis included 1112 nonsevere hemophilia A patients from 14 centers in Europe and Australia that had genotyped at least 70% of their patients. Inhibitor risk was calculated as Kaplan-Meier incidence with cumulative number of exposure days as the time variable. During 44 800 exposure days (median, 24 exposure days per patient; interquartile range [IQR], 7-90), 59 of the 1112 patients developed an inhibitor; cumulative incidence of 5.3% (95% confidence interval [CI], 4.0-6.6) after a median of 28 exposure days (IQR, 12-71). The inhibitor risk at 50 exposure days was 6.7% (95% CI, 4.5-8.9) and at 100 exposure days the risk further increased to 13.3% (95% CI, 9.6-17.0). Among a total of 214 different *F8* missense mutations 19 were associated with inhibitor development. These results emphasize the importance of *F8* genotyping in nonsevere hemophilia A.

# CORRELAZIONE GENOTIPO FENOTIPO



Una determinata mutazione si manifesta sempre con lo stesso fenotipo e/o con la comparsa di inibitori?



HGV cDNA Name	HGV Protein Name	Mutation Ty	Exon	Codon	Nucleotide Change	Predicted AA Change	Domain	Subtype	FVIII:C	Severity from Factor Level	History of Inhibitor	RACE
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	1-5	Moderate	No	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	1-5	Moderate	Yes	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	1-5	Moderate	No	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	>5	Mild	No	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	1-5	Moderate	No	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	>5	Mild	No	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	1-5	Moderate	No	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	1-5	Moderate	No	OTH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	1-5	Moderate	Yes	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	1-5	Moderate	No	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	1-5	Moderate	No	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	>5	Mild	No	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	>5	Mild	No	WNH
c.6506G>A	p.Arg2169His	Missense	23	2150	CGT CAT	Arg His	C1	Light chain	>5	Mild	No	WNH

HGVs cDNA	hg19 Coordinates	HGVs Protein	Mature Protein	Mutation Type	Mechanism	Reported Severity	History of Inhibitor
c.1437_1438del	154194250_154194251	p.Leu480Valfs*5	Leu461Valfs*5	Frameshift	Deletion	Severe	Yes
c.1438_1439del	154194249_154194250	p.Leu480Valfs*5	Leu461Valfs*5	Frameshift	Deletion	Severe	No
c.2014_2016del	154176070_154176072	p.Phe672del	Phe653del	Small structural change (in-frame, <50 bp)	Deletion	Severe	No
c.2015_2017del	154176069_154176071	p.Phe672del	Phe653del	Small structural change (in-frame, <50 bp)	Deletion	Moderate	No

Perche' solo in alcuni pazienti (20-30%  
severa;10-15% emofilici) riscontriamo **inibitori**?



Profilassi

Intensità  
del trattamento

Tipo di prodotto

Infezioni  
Infiammazioni

FVIII  
Tipo di  
mutazione

Livello FVIII

Storia familiare  
positiva per inibitori

Etnia

Polimorfismi

Altri geni  
correlati

# SEQUENZIAMENTO NGS

Le tecnologie NGS consentono l'esecuzione di indagini che in precedenza erano tecnicamente infattibili o economicamente proibitive:  
rivoluzione nel campo del sequenziamento



*Ieri...*



*Oggi..*



*Sanger vs NGS*

Processivita'  
Costo a campione  
Diagnosi Prenatale  
Mosaicismi  
> Detection rate



## The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort

Jan Astermark, et al.

Studies of determinants of development of inhibitory Abs to factor VIII in people with hemophilia A indicate a complex process involving multiple factors. The Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort was formed to extend our understanding of the genetic background of risk. The study group contains 833 subjects from 3 independent cohorts: brother pairs and singletons with and without a history of inhibitors, as well as 104 brother pairs discordant for inhibitor status. Using an Illumina iSelect platform, 13 331 single-nucleotide polymorphisms from 1081 genes, primarily immune response and immune modifier genes, were typed. Each cohort was analyzed separately with results combined using a meta-analytic technique. After adjustment for potential confounders, 53 single-nucleotide polymorphisms were found to be significant predictors of inhibitor status using the criteria of odds ratios in the same direction in all cohorts or allowing for a 20% interval around an odds ratio 1 in 1 of the 3 and significant in at least 2. Of the 53 markers, 13 had meta  $P < .001$ . Eight of the 53 were significant predictors among the discordant pairs. Results support the complexity of the immune response and encourage further research with the goal of understanding the pathways involved.

Table 1. Summary of polymorphic immune response genes reported in the literature to be associated with increased (risk) or decreased (protective) frequency of inhibitors in the literature

Gene	Type of polymorphism	Effect	Reference
<i>Interleukin 10 (IL-10)</i>	Microsatellite	Risk	40
	SNP	Risk	41
	SNP	Risk	42
	SNP Haplotype	Risk	43
	SNP Haplotype	Risk	44
	SNP Haplotype	Risk	45
<i>Interleukin 1<math>\alpha</math> (IL-1<math>\alpha</math>)</i>	SNP Haplotype	Risk	43
	SNP Haplotype	Risk	46
<i>Interleukin 1<math>\beta</math> (IL-1<math>\beta</math>)</i>	SNP Haplotype	Protective	43
<i>Interleukin 2 (IL-2)</i>	SNP Haplotype	Protective	43
<i>Interleukin 5 (IL-5)</i>	SNP	Risk	47
<i>Interleukin 12A (IL-12A)</i>	SNP Haplotype	Risk	43
<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>	NA	Protective	48
<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math> (TNFA)</i>	SNP	Risk	45
	SNP	Risk	41
	SNP	Risk	49
	SNP	Risk	50
<i>Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 (CTLA4)</i>	SNP	Protective	51
<i>CD40/CD40L</i>	NA	Protective	48
<i>CD44</i>	SNPs (2)	Risk	33
<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, M (PTPRM)</i>	SNP	Risk	33
<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 21 (TNFRSF21)</i>	SNP	Risk	33
<i>Mitogen-activated Protein Kinase 9 (MAPK9)</i>	SNP	Risk	33
<i>Immunoglobulin Superfamily, Member 2 (IGSF2)</i>	SNP	Protective	33
<i>Macrophage Scavenger Receptor 1 (MSR1)</i>	SNP	Protective	33
<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, E (PTPRE)</i>	SNP	Protective	33
<i>Heme Oxygenase-1-Encoding (HMOX1)</i>	Microsatellite	Risk	23
<i>Fc <math>\gamma</math> Receptors 2A (FCGR2A)</i>	SNP	Risk	52

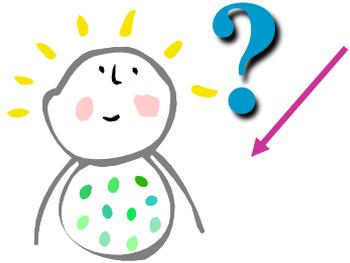
For the HIGS combined cohort study, only SNPs associated with inhibitors in the subgroup of discordant brother pairs are shown.<sup>33</sup>

Predizione del rischio individuale; nei pazienti ad alto rischio personalizzazione dell'approccio terapeutico. L'identificazione dei pathways immunologici che intervengono nella comparsa degli inibitori puo' fornire nuovi bersagli terapeutici per prevenire lo sviluppo degli inibitori stessi

# Test genetici: quando? POSTNATALE



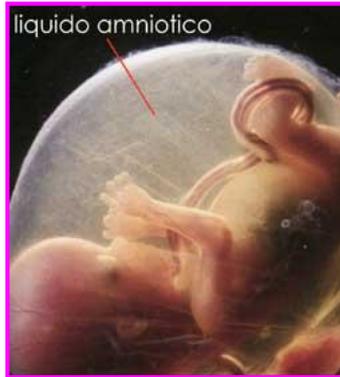
## PRENATALE



**II TRIMESTRE**  
(15<sup>a</sup>-18<sup>a</sup> settimana)

Liquido  
amniotico

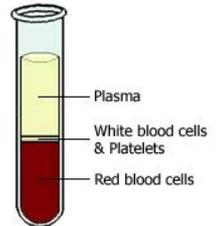
**I TRIMESTRE**  
(10<sup>a</sup>-13<sup>a</sup> settimana)  
Villo coriale



▲ cff DNA



Maternal  
DNA



PDG



La mutazione dovrebbe essere stata precedentemente caratterizzata

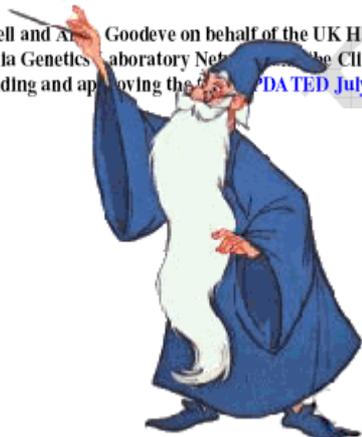
## 2.2 Genetic testing/counseling and prenatal diagnosis

1. Where available and possible, genetic testing for carrier status should be offered to at-risk female family members of people with haemophilia to facilitate genetic counseling, and if desired by the family, prenatal diagnosis.
4. Prenatal diagnosis is usually offered when termination of the pregnancy would be considered if an affected fetus was identified. However, it may also be done to help the family prepare and to plan delivery. Assisted delivery is best avoided in an affected fetus.

Genetic analysis is required to reliably determine female carrier status, as Lyonisation can markedly skew female FVIII:C levels. Female relatives may request carrier analysis when a male relative is first diagnosed as having haemophilia, when they wish to start a family, or frequently, when in early pregnancy.

### Practice Guidelines for the Molecular Diagnosis of Haemophilia A.

Guidelines prepared by Steve Keeney, Mike Mitchell and Alan Goodeve on behalf of the UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO), the Haemophilia Genetics Laboratory Network and the Clinical Molecular Genetics Society. All network members contributed to amending and approving the guidelines. DATED July 2010



## WFH GUIDELINES

### Guidelines for the management of hemophilia

A. SRIVASTAVA,\* A. K. BREWER,† E. P. MAUSER-BUNSCHOTEN,‡ N. S. KEY,§ S. KITCHEN,¶ A. LLINAS,\*\* C. A. LUDLAM,†† J. N. MAHLANGU,‡‡ K. MULDER,§§ M. C. POON¶¶ and A. STREET\*\*\*; TREATMENT GUIDELINES WORKING GROUP ON BEHALF OF THE WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA

\*Department of Hematology, Christian Medical College, Vellore, India; †Department of Oral Surgery, The Royal Infirmary, Glasgow, Scotland; ‡Van Greveldkliniek and Department of Hematology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands; §Department of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC USA; ¶Sheffield Haemophilia and Thrombosis Centre, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, UK; \*\*Department of Orthopaedics and Traumatology, Fundación Santa Fe University Hospital Fundación Cosme y Damián and Universidad de los Andes and Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia; ††Comprehensive Care Haemophilia and Thrombosis Centre, Royal Infirmary, Edinburgh, UK; ‡‡Haemophilia Comprehensive Care Centre, Johannesburg Hospital and Department of Molecular Medicine and Haematology, Faculty of Health Sciences, National Health Laboratory Services and University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa; §§Bleeding Disorders Clinic, Health Sciences Center, Winnipeg, Canada; ¶¶Departments of Medicine, Pediatrics and Oncology, and Southern Alberta Rare Blood and Bleeding Disorders Comprehensive Care Program, University of Calgary, Foothills Hospital and Calgary Health Region, Calgary, Canada; and \*\*\*Haematology, Alfred Hospital, Melbourne, Victoria Australia

DNA-based mutation analysis to identify the specific mutation responsible for hemophilia in a particular family is becoming technically easier and more widely available. This facilitates identification of carriers and prenatal diagnosis for male fetuses.

#### 13.1 Diagnostic turn around times

In line with the white paper publication “*Our inheritance, our future: realising the potential of genetics in the NHS*” (2003) the diagnostic turn around time (TAT) for non urgent investigations where the mutation is unknown is up to 8 weeks. For urgent samples, e.g. PND, the recommended TAT is 3 working days, assuming the mutation in the family is known.

For confirmation of a known mutation in a family the recommended TAT is 2 weeks although this is currently under review as it may not represent the best use of resources.

# DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA: ITER DIAGNOSTICO

1. Valutazione dello stato di portatrice
2. CVS per determinazione del sesso fetale (QF-PCR) e contaminazione
3. Se maschio si esegue la diagnosi prenatale
4. Se femmina nessun test

## Linee guida per la diagnosi molecolare di Emofilia A

a cura di M. Aquila, P. Bicchieri, S. Frusconi, A.M. Lombardi per la Commissione Genetica dell'AICE



## Practice Guidelines for the Molecular Diagnosis of Haemophilia A.

Guidelines prepared by Steve Keeney, Mike Mitchell and Anne Goodeve on behalf of the UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO), the Haemophilia Genetics Laboratory Network and the Clinical Molecular Genetics Society. All network members contributed to amending and approving the text. **UPDATED July 2010**

# DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA



21 gravidanze

10 maschi



4 feti affetti



6 feti sani

11 femmine

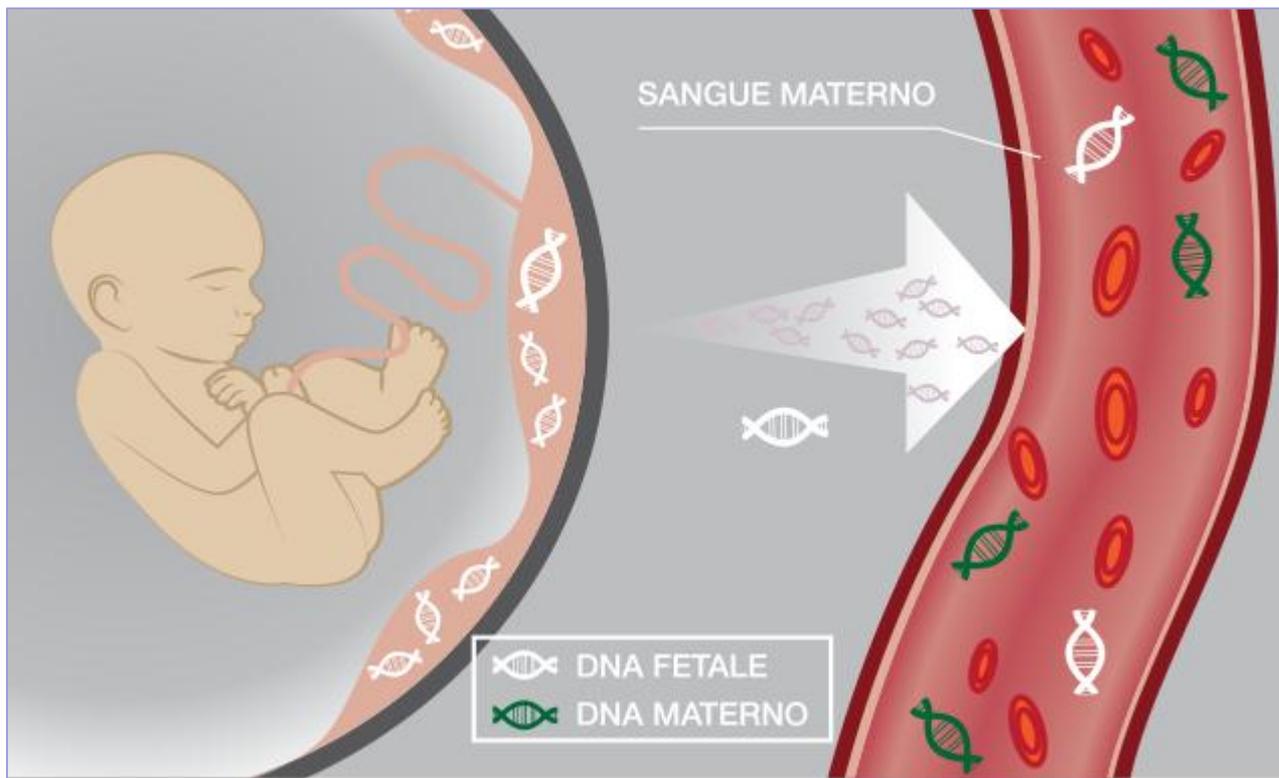


Test molecolare  
non effettuato



1 ITG per  
47,XX+21

- Paziente non caratterizzato: circa 30 richieste di diagnosi prenatale in epoca gestazionale > 8 settimane.....



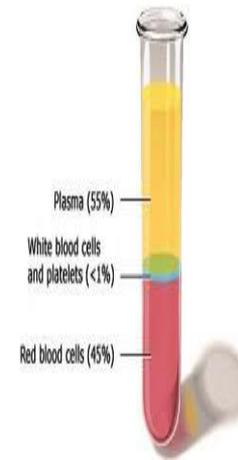
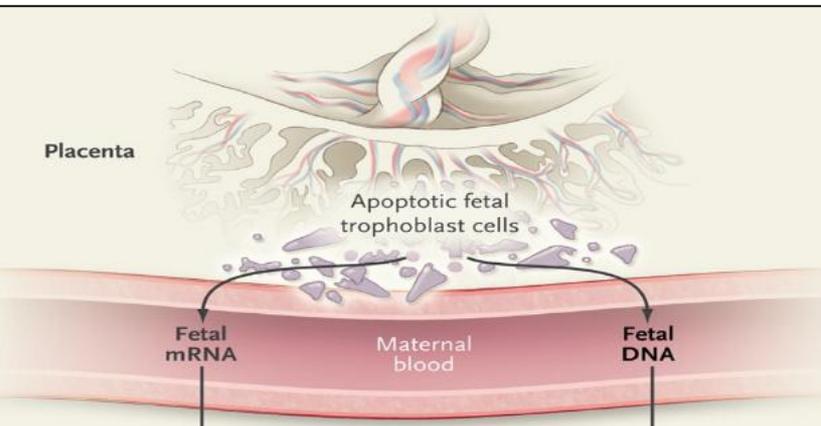
## DNA fetale nel sangue materno

*Determinazione non invasiva del sesso genetico fetale*

*Determinazione non invasiva del rischio di aneuploidie fetali*

# DNA libero circolante nel plasma materno

- DNA libero circolante: DNA materno + DNA fetale
- Origine: apoptosi del citotrofoblasto
- Frammentato (143 bp in media)
- Presente a partire dalla 5<sup>a</sup> settimana di gravidanza
- La quantità di *cffDNA* aumenta con l'età gestazionale
- Il DNA di origine fetale è in percentuale variabile : 5-15% del DNA circolante totale (10-20° settimana di gestazione)



[Lancet](#). 1997 Aug 16;350(9076):485-7.

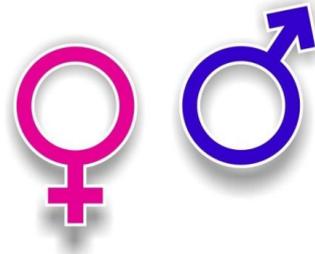
## Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum.

[Lo YM](#), [Corbetta N](#), [Chamberlain PF](#), [Rai V](#), [Sargent IL](#), [Redman CW](#), [Wainscoat JS](#).

Nuffield Department of Clinical Biochemistry, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, UK.

# DETERMINAZIONE NON INVASIVA DEL SESSO FETALE DA DNA FETALE CIRCOLANTE estratto da plasma materno

*Il cffDNA costituisce circa il 5-15% del DNA totale del plasma*



**Obiettivo:** introduzione come **TEST DIAGNOSTICO**

**Target:** donne in gravidanza (≥ 8-10 settimana) con feto a rischio per malattie X-linked

**METODICA:** - REAL-TIME PCR

Amplificazione (PCR) di sequenze specifiche del cromosoma Y → valutazione presenza o assenza di amplificato

- 1) SRY (Yp11.3)
- 2) DYS14 (Yp11.2)



**GENE MULTICOPIA (n copie: 11-78), PER RIDURRE LA POSSIBILITÀ DI FALSI NEGATIVI**

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Se SRY e DYS14 si amplificano: FETO ♂

Se sia SRY che DYS14 non si amplificano: FETO ♀ ...o DNA fetale assente/insufficiente??



## Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis

Caroline F. Wright, Yinghui Wei, Julian PT Higgins and Gurdeep S. Sagoo



**3,4% falsi negativi**

1,2% falsi positivi

Results: Ninety studies, incorporating 9,965 pregnancies ...Overall mean sensitivity was 96.6% and mean specificity was 98.9%.

These results vary very little with trimester or week of testing, indicating that the performance of the test is reliably high.

**ACCURATO DOPO LA 7a SETTIMANA DI GRAVIDANZA**

La **determinazione precoce non invasiva del sesso genetico fetale** si è rivelata una metodica con una sensibilità del 99.8% (N=603; 1 falso negativo e 5 fallimenti sperimentali)

In assenza di un controllo interno specifico per il DNA fetale (indicatore della presenza del DNA fetale) non si può avere la certezza assoluta dell'accuratezza del risultato qualora tutti i marcatori in esame risultino negativi nell'amplificazione.

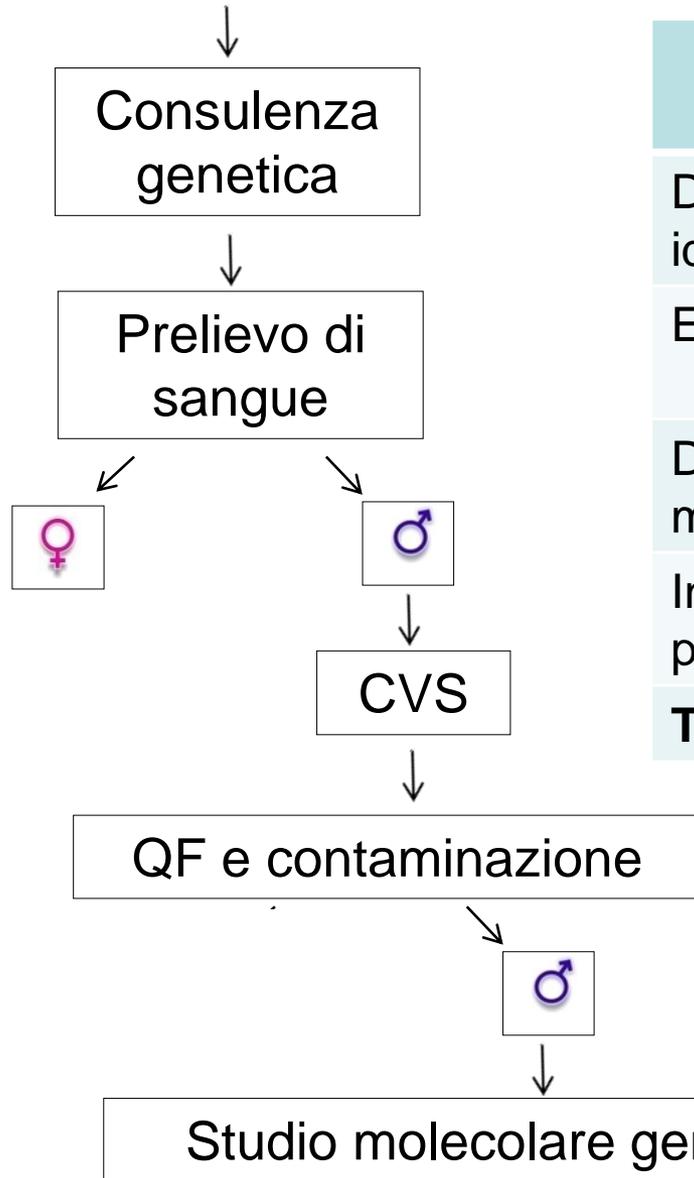
## RICERCA DI CONTROLLI INTERNI PER IL DNA FETALE

- ❖ Distinzione del DNA fetale da quello materno sfruttando il diverso pattern di metilazione di specifici geni → GENE RASSF1A

# DETERMINAZIONE NON INVASIVA DEL SESSO FETALE DA DNA FETALE CIRCOLANTE ESTRATTO DA PLASMA MATERNO

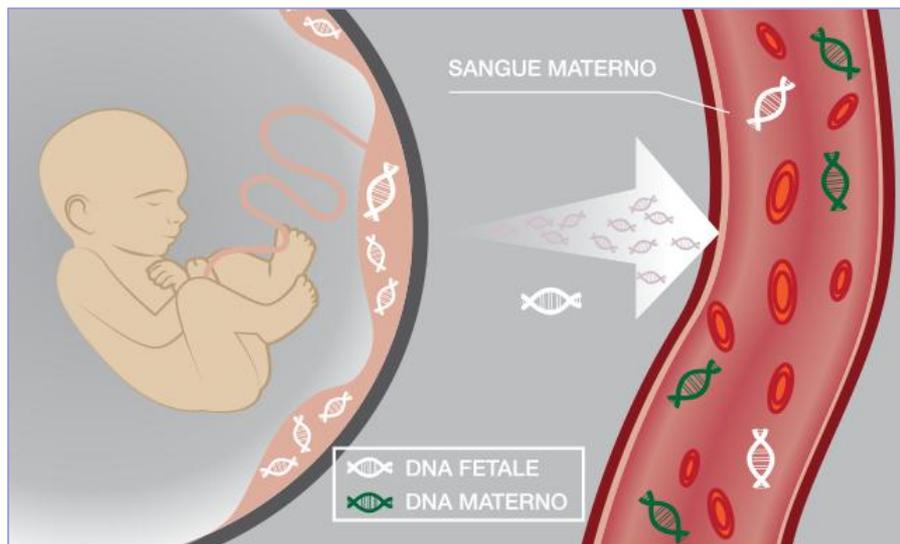


2014: DNA fetale circolante alla decima settimana di gestazione



Motivo di invio	N° casi	Sesso genetico
Deficit 21 idrossilasi	5	3F 2M
Emofilia	17	9M 8F
Distrofia muscolare	12	5M (1ND) 6F
Incontinentia pigmenti	2	1F 1M
<b>TOTALE</b>	<b>36</b>	

Riduzione diagnosi prenatale invasiva (8/17 donne NON si sono sottoposte a diagnosi invasiva)



## DNA fetale nel sangue materno

*Determinazione non invasiva del sesso genetico fetale*

*Determinazione non invasiva del rischio di aneuploidie fetali*

Dal 2007 la Regione Toscana offre lo screening del I trimestre di gravidanza a tutte le donne e ha stabilito come cut-off per l'accesso alla diagnosi prenatale invasiva un rischio  $>1:250$ .

Dal 2012 al 2014 la SOD Diagnostica Genetica ha effettuato l'analisi citogenetica su **3700 campioni di villo coriale**.

Il **35%** dei campioni di villo coriale è affetto per screening del primo trimestre positivo. La percentuale di gravidanze con il test di screening positivo e un feto aneuploide è risultata pari al **15%**

**1295 villi con test positivo**  
**194 con feto aneuploide**

*“Ricerca di DNA fetale circolante nel plasma materno: prospettive per la diagnosi non invasiva di Sindrome di Down (trisomia 21), Sindrome di Edwards (trisomia 18), Sindrome di Patau (trisomia 13)”*

Centro Unico Diagnosi Prenatale  
Ospedale Palagi, Firenze  
**Dr. E. Periti**



SOD Diagnostica Genetica  
AOUC Careggi, Firenze  
**Dr.ssa F. Torricelli**

Ospedale Misericordia  
**Dr. E. Colosi**

Università di Napoli Federico II  
Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche  
**Dr.ssa A. Conti**

La Regione Toscana ha finanziato il progetto “Ottimizzazione e validazione di un test di screening per la diagnosi prenatale non invasiva delle aneuploidie cromosomiche”  
**Delibera n. 932 del 11/11/2013**

**2617 donne reclutate da Settembre 2012:**

381 selezionate per lo studio di validazione (di cui 60 ‘aneuploidì’)

### **Criteri di arruolamento**

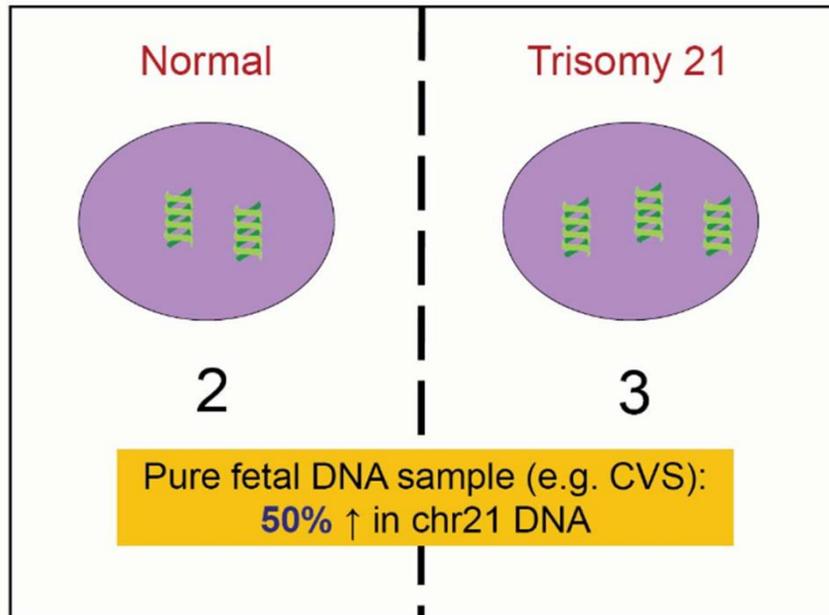
Età > 18 anni  
Gravidanza singola  
Storia clinica negativa per malattia oncologica pregressa o in atto

### **Follow-up**

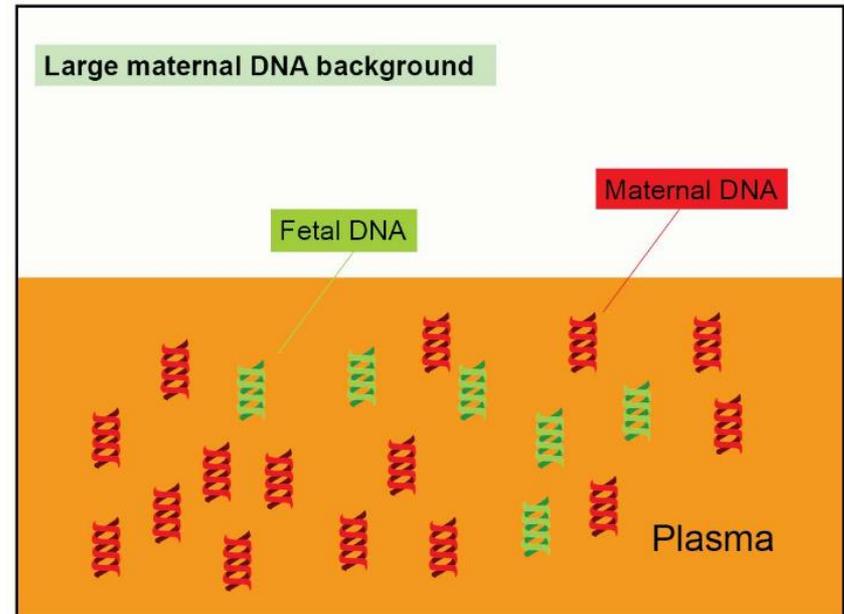
- QF-PCR/cariotipo  
- alla nascita

## Aspetti tecnici

### CVS o LA



### DNA totale libero circolante



Sample	Fetal DNA content	↑ chr21 (%)	↑ chr21 (fold)
CVS	100%	50%	1.5
Maternal plasma	~ 10%	5%	1.05

E' quindi necessaria una metodica in grado di evidenziare variazioni molto piccole di DNA

## NGS e test prenatali non invasivi

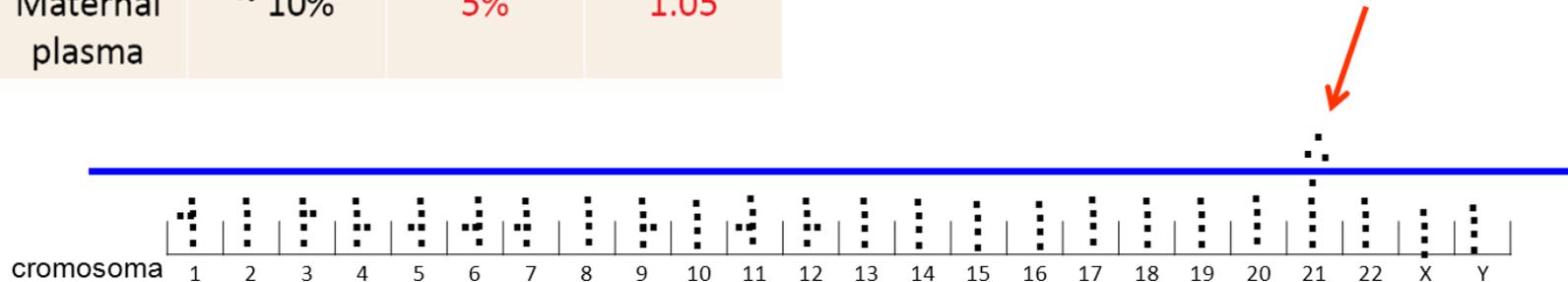
Le nuove tecnologie di sequenziamento consentono di ottenere grandi quantità di dati di sequenza in un singolo esperimento



Questo approccio consente di identificare le aneuploidie più frequenti **sequenziando, mappando e contando** le molecole di DNA per evidenziare «variazioni nel numero di copie» di uno specifico cromosoma, a partire da DNA totale circolante nel plasma materno

Sample	Fetal DNA content	↑ chr21 (%)	↑ chr21 (fold)
Maternal plasma	~ 10%	5%	1.05

NGS permette di identificare la differenza dovuta ad un incremento del 5% di DNA fetale



Il **DNA totale circolante** (materno e fetale) viene sequenziato, e il **numero** delle sequenze è **quantitativamente comparato** con il **n° di sequenze «atteso»** per quel cromosoma in un campione euploide.

# RISULTATI STUDIO DI VALIDAZIONE DEL NIPT

54 campioni esclusi (n. reads <math>10^6</math>)

381 CAMPIONI SEQUENZIATI

327 (86%) IDONEI (n. reads >math>10 \times 10^6</math>)

	T21	T18	T13	Monosomia X
<b>VP</b>	43	6	7	2
<b>VN</b>	281	321	318	322
<b>FP</b>	3	0	2	1
<b>FN</b>	0	0	0	2*
<b>Sensibilità</b>	99,9%	99,9%	99,9%	50%
<b>Specificità</b>	98,9%	99,9%	99,4%	99,7%

I FP sono identificabili perché presentano valori ai limiti

Relativamente alla monosomia X (e in generale a tutte le aneuploidie dei cromosomi sessuali: SCA), le linee guida del Ministero della Salute - Consiglio Superiore di Sanità - Sezione I - "Screening non invasivo basato sul DNA (Non Invasive Prenatal Testing - NIPT), del maggio 2015, riportano che il NIPT mostra una ridotta specificità, con una FPR cumulativa >1%, ascrivibile non solo ai mosaicismi confinati alla placenta, ma anche ai mosaicismi costituzionali della madre, presenti in circa l'8,6% dei NIPT positivi per una SCA (Nielsen et al. 1991; Thompson e Thompson, 2001; Wang et al, 2014). Di conseguenza, "al momento, lo screening basato sul NIPT non ha ragioni di essere esteso oltre le T21, T18, T13". Pertanto, in accordo a tali linee guida, il risultato relativo alle aneuploidie dei cromosomi sessuali, allo stato attuale, non viene refertato.

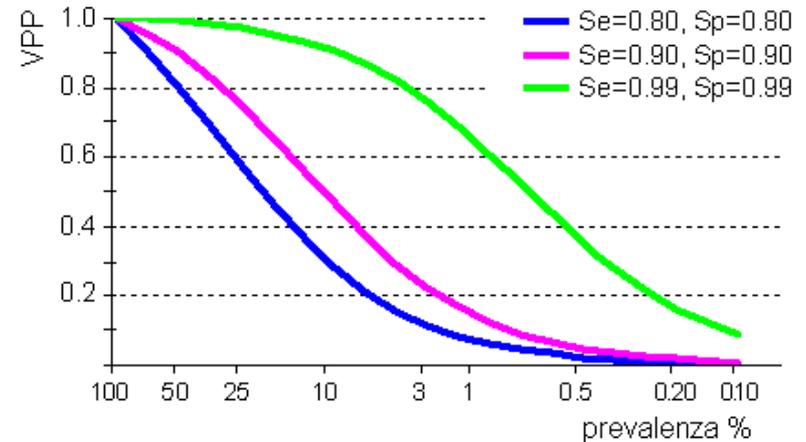
\*RAPIDR li identifica come feti ♂

# NIPT: PPV e NPV

Il **valore predittivo positivo** dipende dalla Sensibilità e dalla Specificità del test: in particolare, esso aumenta con l'aumentare di questi due parametri.

É però importante sottolineare che il **valore predittivo positivo** dipende anche da un fattore indipendente dal test: **la prevalenza della malattia** nella popolazione sottoposta a screening.

Valore predittivo positivo (VPP) in rapporto alla sensibilità e specificità del test ed alla prevalenza della malattia



$$PPV = \frac{(\text{Sensibilità} \times \text{prevalenza})}{((\text{Sensibilità} \times \text{prevalenza}) + (1 - \text{specificità}) \times (1 - \text{prevalenza}))}$$

$$NPV = \frac{\text{Specificità} \times (1 - \text{prevalenza})}{((1 - \text{sensibilità}) \times \text{prevalenza} + \text{specificità} \times (1 - \text{prevalenza}))}$$

## T21: valore predittivo positivo e negativo nella nostra casistica

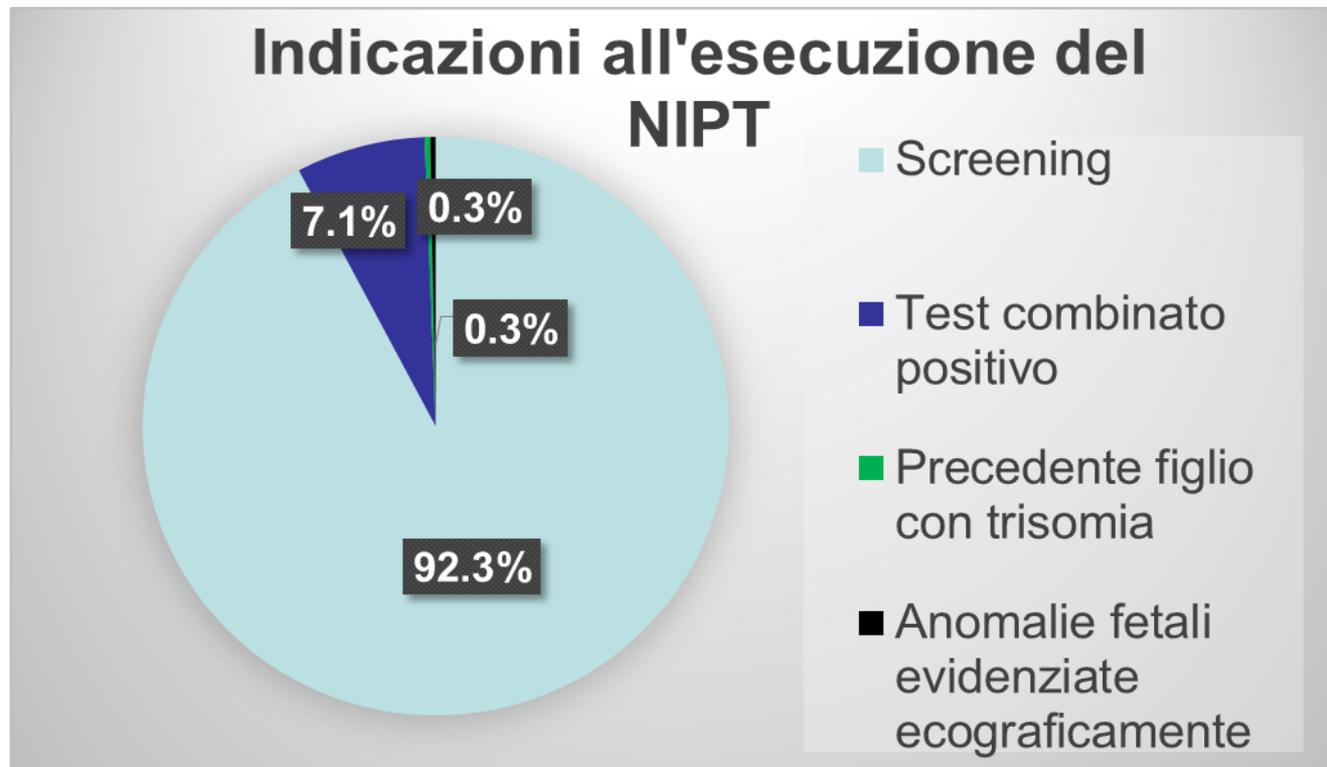
Età materna	Prevalenza_T21	Sensibilità_T21	Specificità_T21	PPV_T21	NPV_T21
20	1,250: 1000	> 99.9%	99,3%	15,17%	> 99.9%
<b>25</b>	<b>1,408: 1000</b>	<b>&gt; 99.9%</b>	99,3%	<b>16,77%</b>	> 99.9%
30	2,128: 1000	> 99.9%	99,3%	23,35%	> 99.9%
35	5,405: 1000	> 99.9%	99,3%	43,70%	> 99.9%
36	6,667: 1000	> 99.9%	99,3%	48,95%	> 99.9%
<b>37</b>	<b>8,696: 1000</b>	<b>&gt; 99.9%</b>	99,3%	<b>55,61%</b>	> 99.9%
38	11,111: 1000	> 99.9%	99,3%	61,61%	> 99.9%
39	15,385: 1000	> 99.9%	99,3%	69,06%	> 99.9%
<b>40</b>	<b>20,000: 1000</b>	<b>&gt; 99.9%</b>	99,3%	<b>74,46%</b>	> 99.9%

## T13: valore predittivo positivo e negativo nella nostra casistica

Età materna	Prevalenza_T13	Sensibilità_T13	Specificità_T13	PPV_T13	NPV_T13
20	1,54: 10000	> 99.9%	98,75%	1,22%	> 99.9%
<b>25</b>	<b>1,79: 10000</b>	<b>&gt; 99.9%</b>	98,75%	<b>1,41%</b>	> 99.9%
30	2,70: 10000	> 99.9%	98,75%	2,12%	> 99.9%
<b>35</b>	<b>6,67: 10000</b>	<b>&gt; 99.9%</b>	98,75%	<b>5,07%</b>	> 99.9%
36	8,33: 10000	> 99.9%	98,75%	6,25%	> 99.9%
37	1,111: 1000	> 99.9%	98,75%	8,17%	> 99.9%
38	1,429: 1000	> 99.9%	98,75%	10,27%	> 99.9%
39	1,887: 1000	> 99.9%	98,75%	13,1%	> 99.9%
<b>40</b>	<b>2,500: 1000</b>	<b>&gt; 99.9%</b>	98,75%	<b>16,70%</b>	> 99.9%

# Da novembre 2014: INTRODUZIONE DEL NIPT PER LE TRISOMIE 21, 18 E 13 (SODc DIAGNOSTICA GENETICA, AOUC)

985 casi analizzati (novembre 2014- maggio 2016)



70 casi con test positivo

# CASI AD 'ALTO RISCHIO' PER ANEUPLOIDIE

Codice campione	Epoca gestazionale (settimane)	Indicazione	Frazione fetale	Esito NIPT (alto rischio)	z-score	n. reads filtrate	Coverage	Follow-up
A84	25+2	screening	8,3%	T21	z-score 21: 14,8	42,7	1,2X	T21 confermata con DPI
A492	11+0	screening	9,1%	T21	z-score 21: 12,6	32,2	0,9X	Interruzione di gravidanza (no DPI)
A679	12+2	TC positivo (1:2 per T21)	5,0%	T21	z-score 21: 9,8	23,3	0,6X	T21 confermata con DPI
B3	14+2	TC positivo (1:4 per T21)	6,7%	T21	z-score 21: 13,1	35,7	1,0X	T21 confermata con DPI
B20	14+0	TC positivo (1:121 per T21)	4,2%	T13	z-score 13: 13,5	37,8	1,0X	T13 mosaico con CVS, confermato su LA
A705	18+2	screening	4,3%	T13	z-score 13: 6,8	78,8	2,2X	T13 non confermata con DPI (FP)

**LA RACCOLTA DEI DATI DI FOLLOW-UP PER CASI A 'BASSO RISCHIO' E' IN CORSO (AD OGGI NESSUNA SEGNALAZIONE DI CASI FALSI NEGATIVI)**

# Non-invasive prenatal testing performance when fetal cell-free DNA is absent

Tamara Takoudes; Boston Maternal-Fetal Medicine,

We are aware that several factors influence the fraction of fetal cfDNA present in maternal blood. Such factors include gestational age and maternal weight,<sup>3</sup> as well as sample collection and shipping issues that may lead to maternal cell hemolysis. Some commercial labs assert that the accuracy of cfDNA testing is influenced by the amount of fetal cfDNA that is present relative to maternal cfDNA. In these labs that report fetal fraction, the performance claims for NIPT are based on requiring a minimal amount of fetal cfDNA to be present for testing. We are also aware that some commercial laboratory providers assert that measurement of fetal cfDNA is unnecessary and that reliable results can be provided without knowledge of the amount of the fetal cfDNA analyte in a sample.

Non-pregnant patient #1

	Test Result	Details
Lab A	No	Insufficient fetal cfDNA for accurate NIPT evaluation
Lab B	No	Unable to report due to low fetal fraction (fetal fraction reported to be 0.6%)
Lab C	Yes	Negative, consistent with female fetus (fetal fraction 4.3% reported on request)
Lab D	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)
Lab E	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)

Non-pregnant patient #2

	Test Result	Details
	No	Insufficient fetal cfDNA for accurate NIPT evaluation
	No	Unable to report due to low fetal fraction (fetal fraction reported to be 0.6%)
	Yes	Negative, consistent with female fetus (fetal fraction 3.9% reported on request)
	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)
	Yes	No aneuploidy detected, two sex chromosomes (XX)

## Determinazione non invasiva del rischio di aneuploidie fetali

**E' un test di screening e non un test diagnostico e non può sostituire il test combinato**

**Non valuta la presenza/assenza di una condizione genetica, ma fornisce una valutazione del RISCHIO per le aneuploidie oggetto dell'indagine**

**E' sempre necessario confermare un risultato positivo/alto rischio con DP invasiva**

**Deve essere offerta in un contesto di una consulenza pre e post-test**

### **OBIETTIVO COMUNE**

**RIDURRE IL RICORSO ALLE TECNICHE INVASIVE SELEZIONANDO PIU' ACCURATAMENTE LE DONNE A RISCHIO**

Divieto di produzioni di più di tre embrioni: rimosso con sentenza della corte costituzionale 151/2009

Obbligo di contemporaneo impianto di tutti gli embrioni prodotti: rimosso con sentenza della corte costituzionale 151/2009. Dopo la Sentenza della Corte Costituzionale nr. 151 In Italia finalmente si apre la possibilità di effettuare la PDG .....ma solo nelle coppie infertili/sterili

Divieto di eterologa: dichiarato incostituzionale dalla Corte Costituzionale l'8 aprile 2014

Divieto di accesso alla procreazione medicalmente assistita alle coppie fertili ma portatrici di malattie genetiche (già condannato sempre dalla Corte europea dei diritti dell'uomo). Il Tar del Lazio (sentenza del 2008) ha sollevato dubbi di costituzionalità. Bocciatura arrivata nel 2012 anche dalla Corte Europea dei diritti dell'uomo. 14 Maggio 2015 sentenza della Corte Costituzionale n.96 che ha dichiarato l'illegittimità del divieto fino ad ora contenuto nella legge 40.

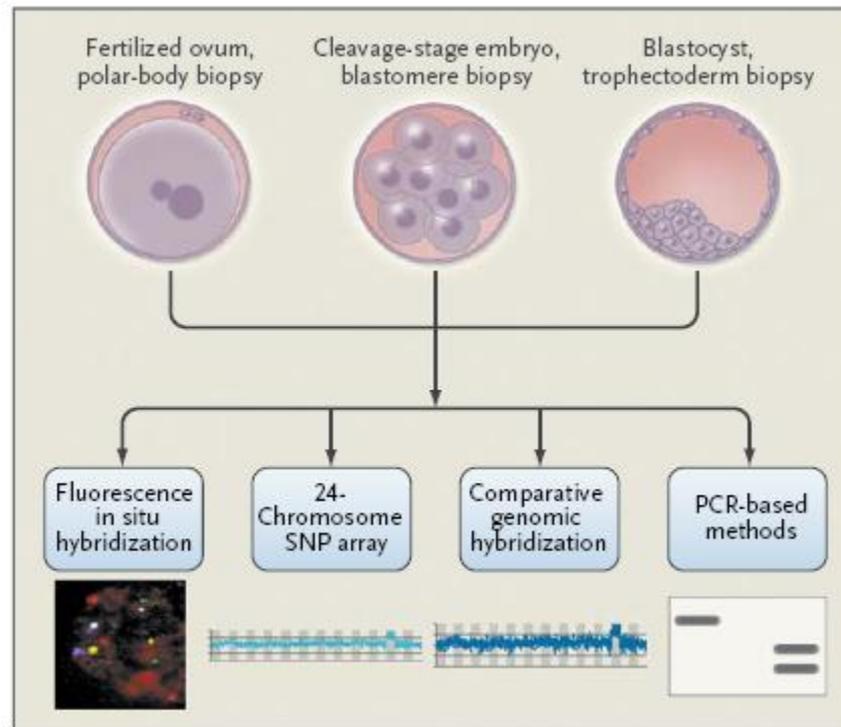
Divieto di utilizzo degli embrioni per la ricerca scientifica **In vigore**

Divieto di accesso alla fecondazione assistita per single e coppie dello stesso sesso: **In vigore**

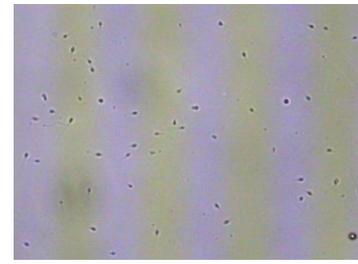
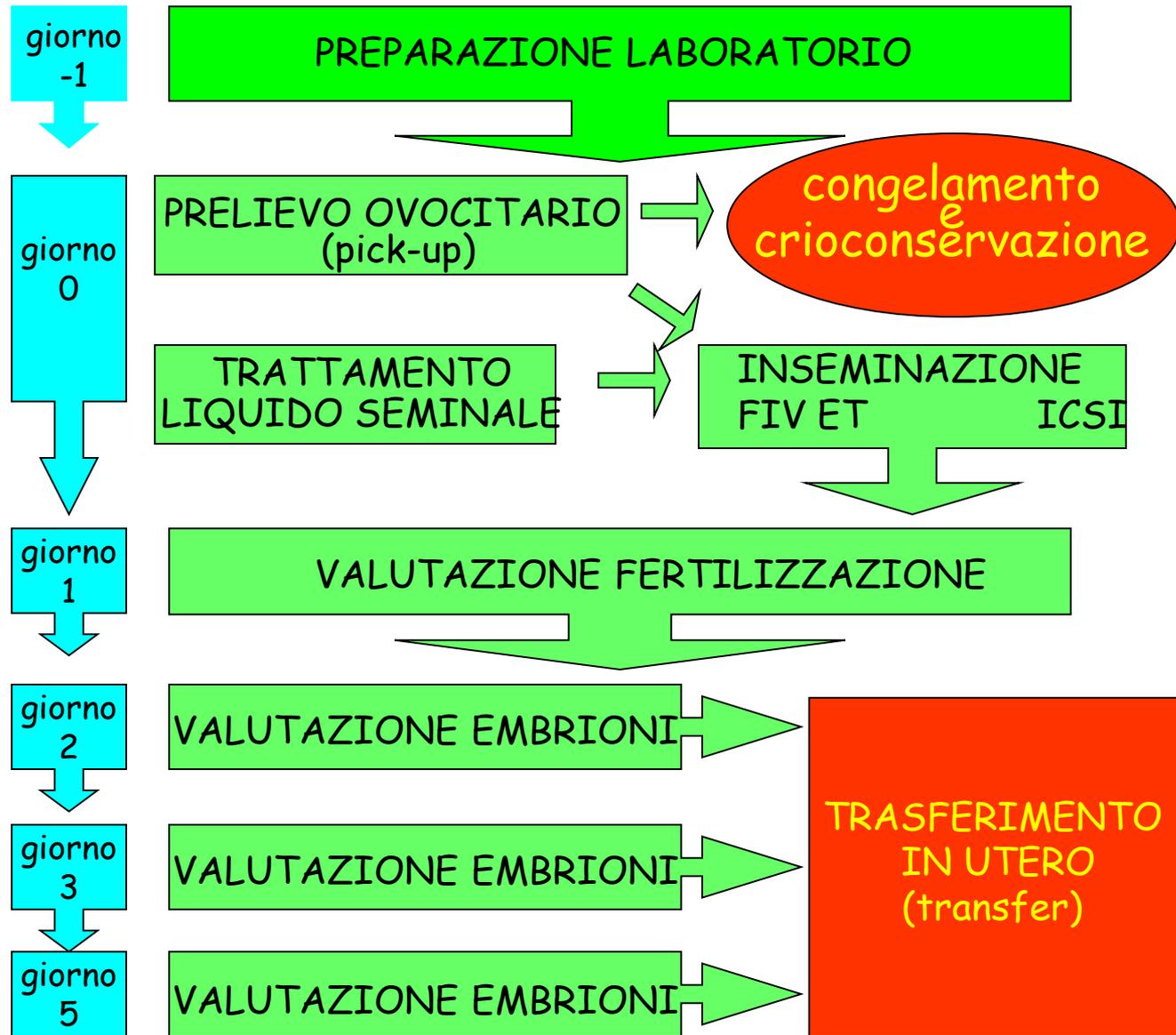
# DIAGNOSI GENETICA PREIMPIANTO



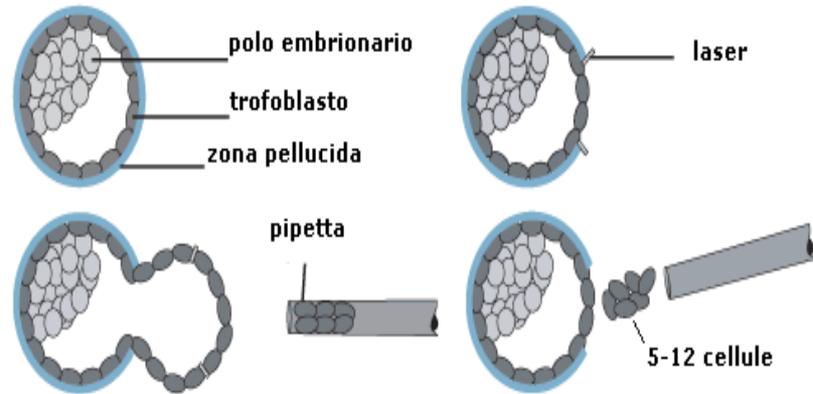
Per **PDG** si intende l'insieme di procedure che consentono di diagnosticare una malattia genetica nell'embrione, prima del suo impianto nell'utero materno. Per molte coppie la PGD offre una **alternativa piu' accettabile** rispetto alla diagnosi prenatale ed all'interruzione di una gravidanza già avviata.



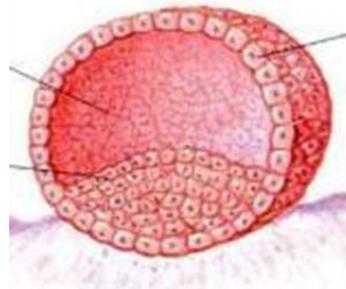
# LA PDG si effettua su embrioni prodotti attraverso le procedure di PROCREAZIONE MEDIALMENTE ASSISTITA (PMA)



# DIAGNOSI SU BLASTOCISTI



- Quinta giornata (120 cellule)
- Apertura nella zona pellucida
- Espansione del blastocele e fuoriuscita spontanea delle cellule del **trofoectoderma**
- Informazioni **sul corredo paterno e materno**



- Piu' cellule (5-10 vs 1-2)
- Il 95% delle blastocisti sottoposte a **vittrificazione** sopravvivono (Schoolcraft et al 2009)

La coltura prolungata degli embrioni fino allo stadio di blastocisti è finalizzata a **generare embrioni ad alto potenziale di impianto**. Il ricorso ad una coltura embrionaria prolungata è sempre piu' diffuso anche al **fine di ridurre l'incidenza di gravidanze multiple** (elective single embryo transfer)



ARTICLE

Genomic DNA in human blastocoele fluid

S Palini <sup>a,\*</sup>, L Galluzzi <sup>b,1</sup>, S De Stefani <sup>a</sup>, M Bianchi <sup>b</sup>, D Wells <sup>c</sup>,  
M Magnani <sup>b</sup>, C Bulletti <sup>a</sup>

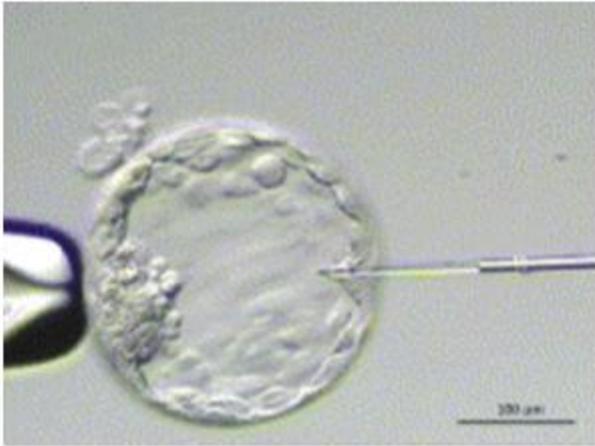


FIGURE 2: Aspiration of the blastocoele fluid using the ICSI pipette (source: [15]).

DNA libero è presente nel blastocele: nuovo approccio PGD non invasivo

NIPD (Non-invasive prenatal diagnosis) per confermare i risultati della PDG

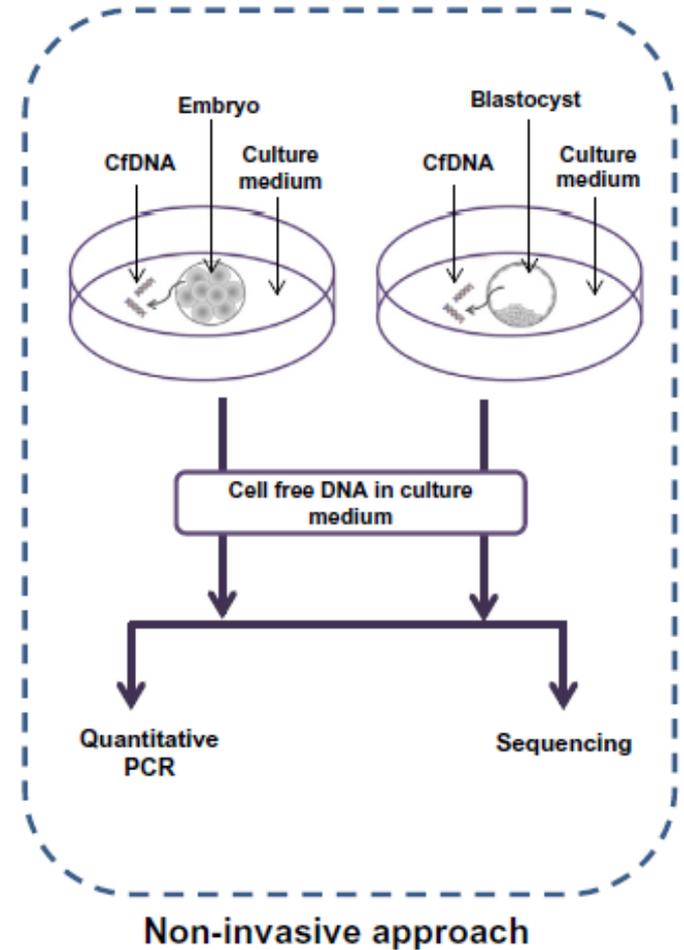
OBIETTIVO COMUNE  
RIDURRE IL RICORSO ALLE TECNICHE  
INVASIVE



EDITORIAL

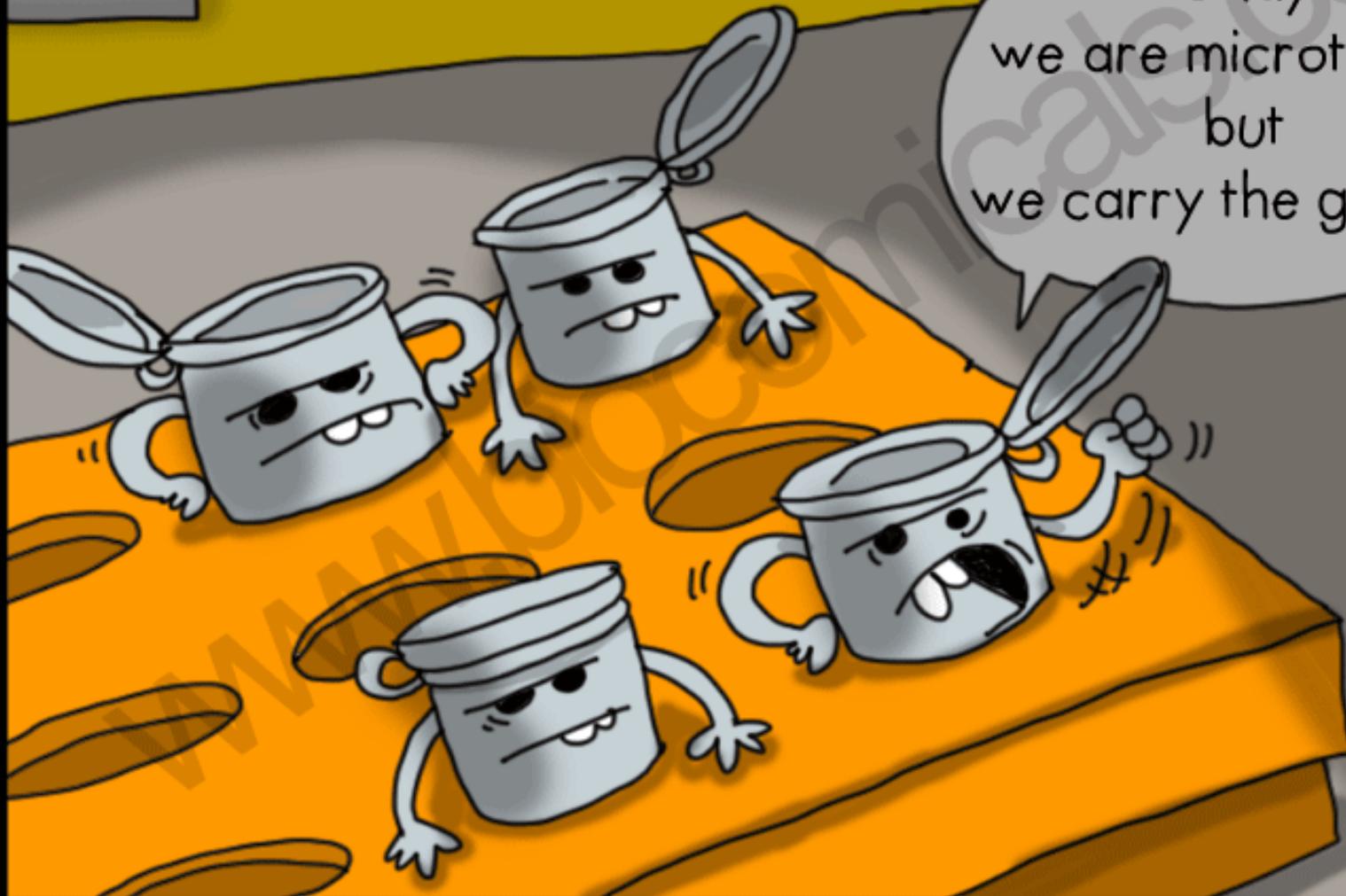
Embryonic DNA sampling without biopsy: the beginnings of non-invasive PGD?

Hypothesis

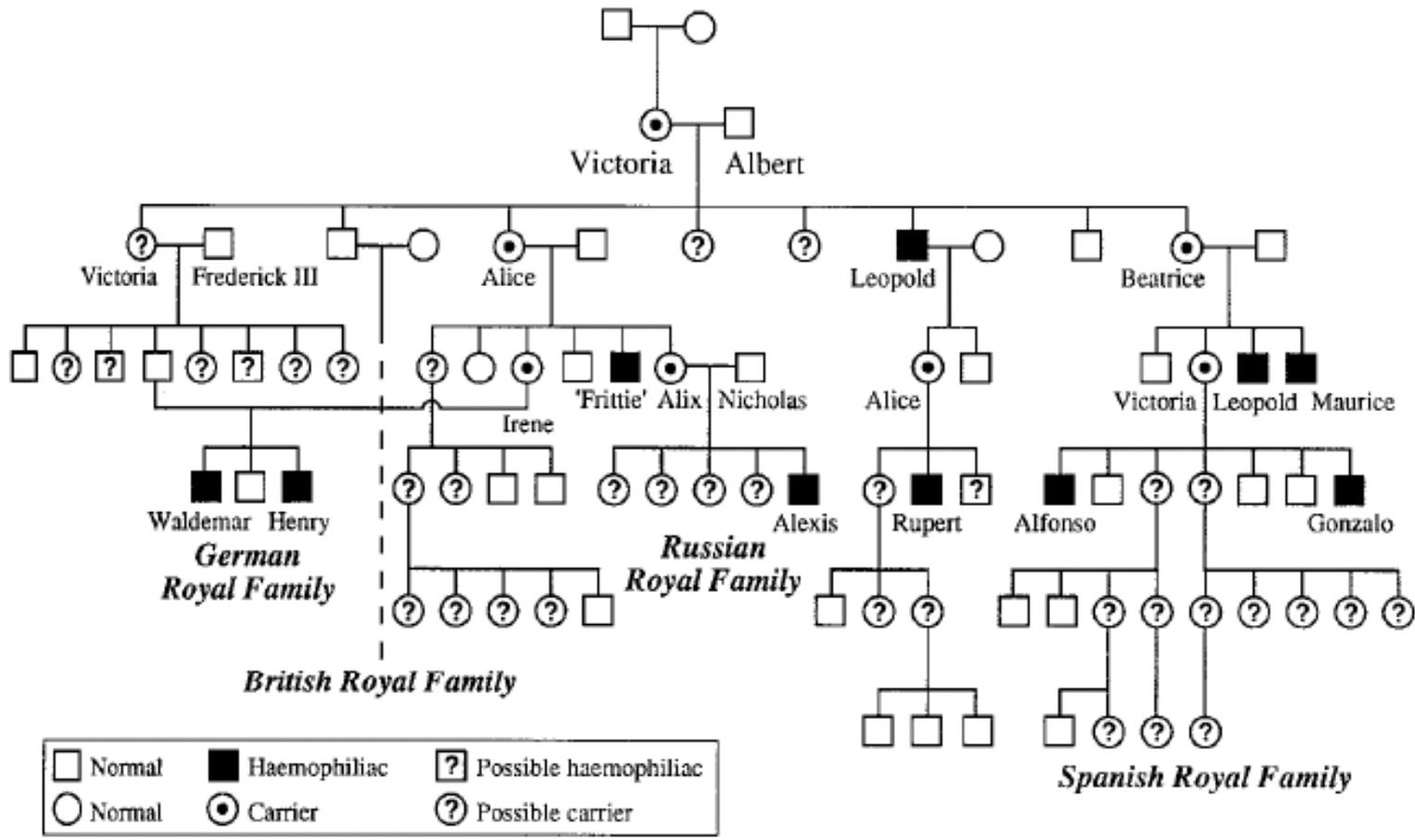


**Do not judge a tube By it's size.**

Okay  
we are microtubes...  
but  
we carry the genome!



# Ereditarietà X-Linked recessiva



La malattia dei re

# Caso sporadico



**Warning:** This report is based on knowledge and data that are not firmly established. Consequently, medical decisions must not be made on the basis of this report.

## F8 Variation

### Class 3-Unknown pathogenicity

Transversion from T to A in exon 16.

Missense substitution.

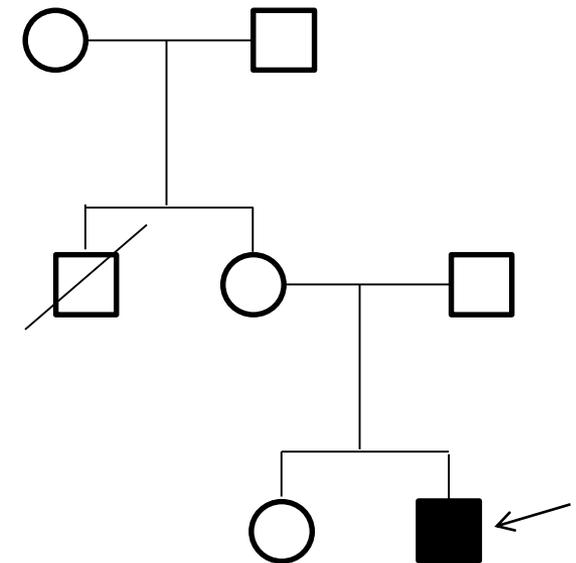
Val at position 1838 is changed to Glu.

According to the HGVS recommendations version 2.0, this variation must be labelled:

DNA Level (cDNA): **NM\_000132.3:c.5513T>A**

DNA Level  
(genomic): **ChrX(GRCh37):g.154133159A>T**

Protein Level: **p.Val1838Glu**



### Pathogenicity clues

- Moderately conserved nucleotide (phyloP: 2.55 [-14.1;6.4])
- Highly conserved amino acid, up to Chicken (considering 9 species)
- Moderate physicochemical difference between Val and Glu (Grantham dist.: 121 [0-215])
- Align GVGD: C65 (GV: 0.00 - GD: 121.34)
- SIFT: Deleterious (score: 0, median: 3.58)
- MutationTaster: disease causing (p-value: 1)

# Casi sporadici: 30%



**Se in una famiglia vi è solo un maschio affetto**

La mutazione è presente in quanto:

- a) La madre è portatrice
- b) Madre con mosaicismo germinale
- c) La mutazione è avvenuta durante la gametogenesi materna: mutazione de novo
- d) La mutazione è avvenuta dopo il concepimento ed il figlio maschio è a mosaico

In caso di mosaicismo, il rischio di ricorrenza dipende dal numero di cellule germinali che portano la mutazione.

Origine della mutazione	Rischio della nonna materna di essere portatrice	Rischio della sorella del paziente di essere portatrice	Rischio della figlia del paziente di essere portatrice	Rischio del fratello del paziente di essere affetto
Madre portatrice	Fino al 100%	50%	100%	50%
Madre è a mosaico	Non è a rischio	Fino al 50%	100%	Fino al 50%
Figlio con mutazione de novo	Non è a rischio	Non è a rischio	100%	Non è a rischio
Figlio è a mosaico	Non è a rischio	Non è a rischio	Fino al 100%	Non è a rischio

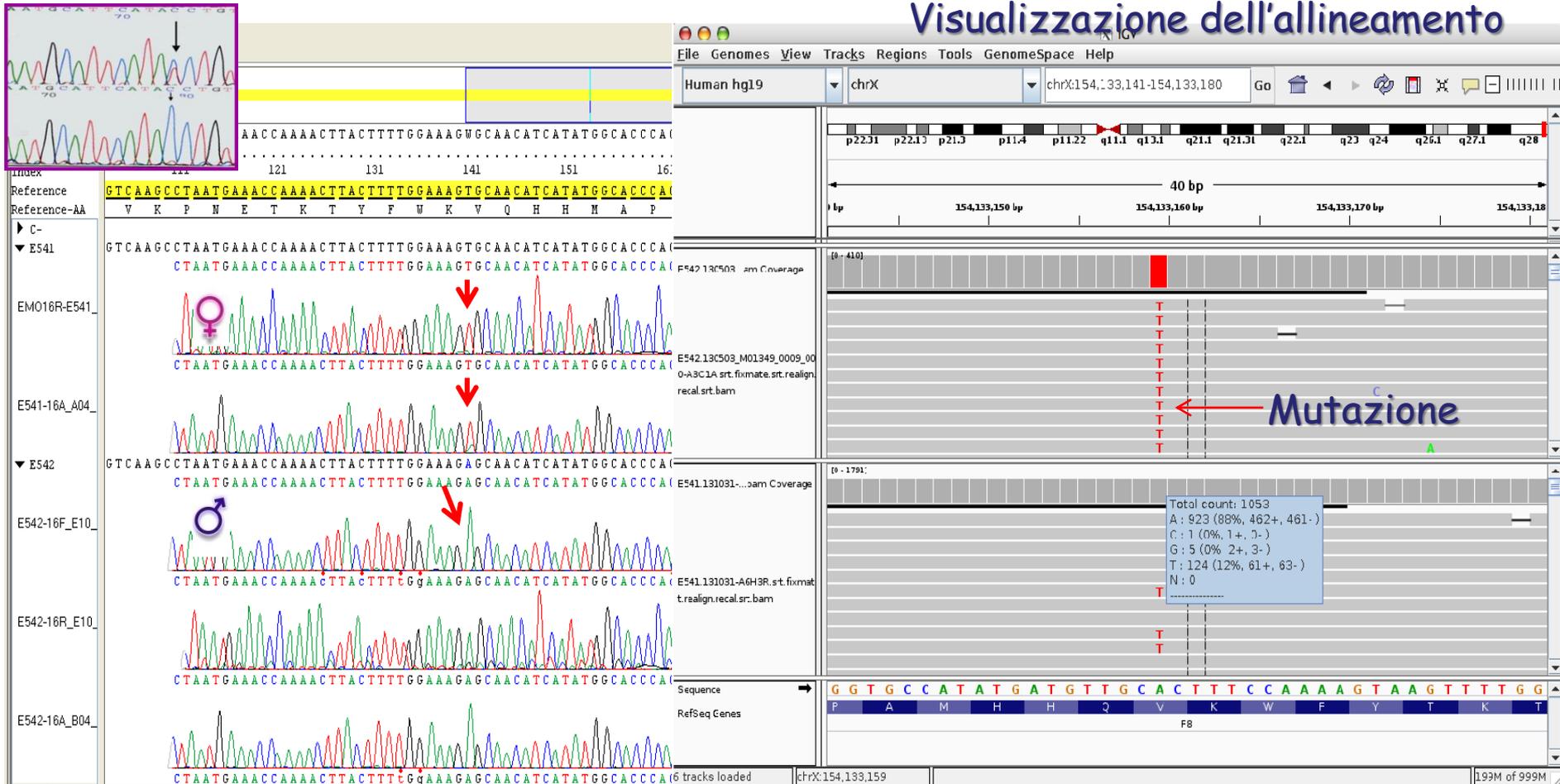
# Caso sporadico



**NEXT GENERATION SEQUENCING** = approccio molecolare ad elevata processività che consente il sequenziamento del genoma a diverse profondità di lettura (coverage)

**PROFONDITA' DI COVERAGE**

**NUMERO DI VOLTE CHE LA REGIONE DI INTERESSE VIENE SEQUENZIATA**  
**Visualizzazione dell'allineamento**

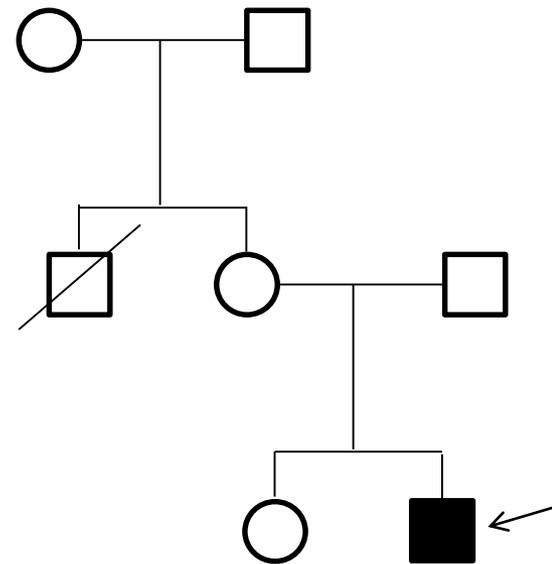


None of the latter three methods are in routine diagnostic use and may need to be developed specifically for a given family investigation.

*Mosaicism*

Germline and somatic mosaicism may complicate any genetic diagnosis in haemophilia A. Particular attention should be given to the possibility of mosaicism in sporadic haemophilia where the mother of an affected male does not appear to carry the mutation in her leucocyte DNA, particularly where the apparently *de novo* mutation is a point mutation [41].

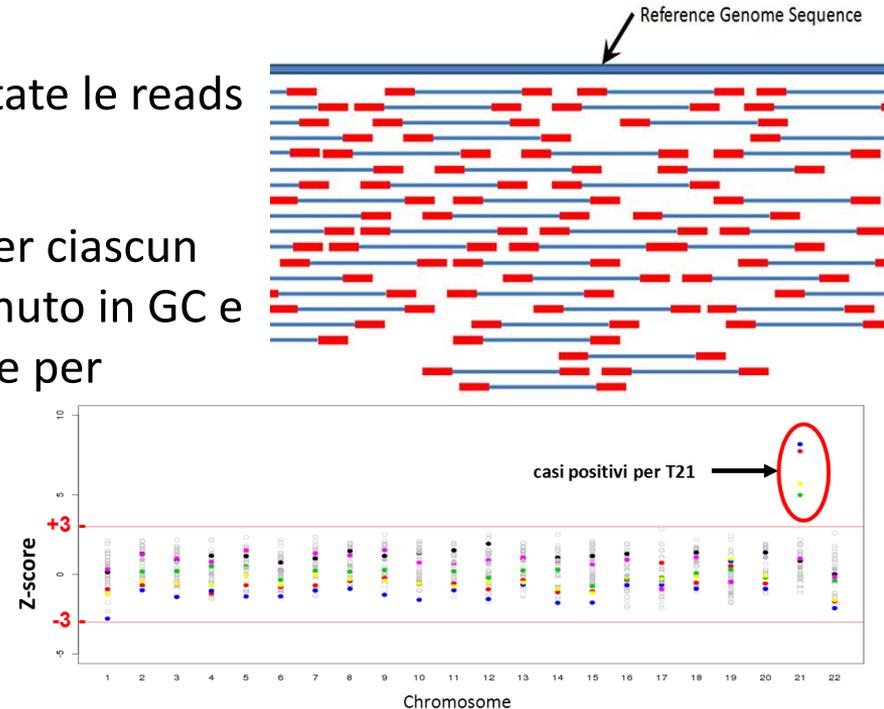
It is recommended not to state that the mother of a haemophilic is not a carrier, even when the mutation is not identified in her somatic DNA. Specific reference to the possibility of germline mosaicism should be added.



Origine della mutazione	Rischio della nonna materna di essere portatrice	Rischio della sorella del paziente di essere portatrice	Rischio della figlia del paziente di essere portatrice	Rischio del fratello del paziente di essere affetto
Madre portatrice	Fino al 100%	50%	100%	50%
Madre è a mosaico	Non è a rischio	Fino al 50%	100%	Fino al 50%
Figlio con mutazione de novo	Non è a rischio	Non è a rischio	100%	Non è a rischio
Figlio è a mosaico	Non è a rischio	Non è a rischio	Fino al 100%	Non è a rischio

# NGS e test prenatali non invasivi

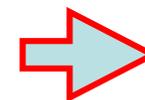
- **Allineamento** : le molecole di DNA sequenziate (reads) vengono allineate al genoma di riferimento
- **Counting**: Per ogni cromosoma vengono contate le reads che mappano sul quel cromosoma (count)
- **Normalizzazione**: I valori di count ottenuti per ciascun cromosoma vengono normalizzati per contenuto in GC e dimensioni della libreria ( n° di reads ottenute per ciascun campione)
- **Analisi statistica**: calcolo dello Z-score



$$\text{Z-score (chr21)} = \frac{\# \text{ medio di reads chr21} - \# \text{ medio di reads ref dataset chr21}}{\text{SD ref dataset chr21}}$$

- Z-score tra -3 and +3 : euploide
- Z score >3 : trisomia
- Z score <-3: monosomia

Zscore = 3



$P_{\text{aneuploidia}} = 0.999$

## T18: valore predittivo positivo e negativo nella nostra casistica

Età materna	Prevalenza_T18	Sensibilità_T18	Specificità_T18	PPV_T18	NPV_T18
20	5,00: 10000	> 99.9%	99,38%	7,47%	> 99.9%
<b>25</b>	<b>5,71: 10000</b>	<b>&gt; 99.9%</b>	99,38%	<b>8,44%</b>	> 99.9%
30	8,33: 10000	> 99.9%	99,38%	11,86%	> 99.9%
<b>35</b>	<b>2,128: 1000</b>	<b>&gt; 99.9%</b>	99,38%	<b>25,59%</b>	> 99.9%
36	2,703: 1000	> 99.9%	99,38%	30,41%	> 99.9%
37	3,571: 1000	> 99.9%	99,38%	36,63%	> 99.9%
38	4,545: 1000	> 99.9%	99,38%	42,41%	> 99.9%
39	5,882: 1000	> 99.9%	99,38%	48,83%	> 99.9%
<b>40</b>	<b>7,692: 1000</b>	<b>&gt; 99.9%</b>	99,38%	<b>55,56%</b>	> 99.9%

# PROSPETTIVE DI IMPLEMENTAZIONE DEL NIPT NEL SSR TOSCANO (II)

Il SSR toscano ha pianificato un periodo pilota di due anni per valutare l'introduzione del NIPT per lo screening delle trisomie 21, 18 e 13 come test contingente (delibera RT n. 422 del 07/04/2015).

Le modalità di erogazione del NIPT sono le seguenti:

a) Rischio dopo Test Combinato  $>1:10$  → indagine prenatale invasiva.

b) Rischio dopo Test Combinato compreso tra  $1:11$  ed  $1:250$  → viene offerta la scelta tra diagnosi prenatale invasiva e NIPT

c) Rischio dopo Test Combinato compreso tra  $1:251$  ed  $1:1000$  → NIPT

d) Rischio dopo Test Combinato  $>1:1000$  → non vengono offerti ulteriori esami. In questo caso le gestanti potranno accedere al NIPT pagando l'intera tariffa.

e) Donne di età  $\geq 35$  anni è offerta la scelta tra diagnosi prenatale invasiva e NIPT indipendentemente dal risultato del test combinato.

# META-ANALISI

## (37 pubblicazioni selezionate)

	DETECTION RATE (95% CI)	FALSE POSITIVE RATE (95% CI)
TRISOMIA 21	99,2% (98,5-99,6%)	0,09% (0,05-0,14)
TRISOMIA 18	96,3% (94,3-97,9%)	0,13% (0,07-0,20%)
TRISOMIA 13	91,0% (85,0-95,6%)	0,13% (0,05-0,26%)
MONOSOMIA X	90,3% (85,7-94,2)	0,23% (0,14-0,34%)
ALTRE ANEUPLOIDIE DEI CROMOSOMI SESSUALI	93% (85,8-97,8%)	0,14% (0,06-0,24%)

(Gil et al. 2015)

# FALSI POSITIVI / FALSI NEGATIVI

## FALSI POSITIVI

### POSSIBILI SPIEGAZIONI (“biologiche” più che “tecniche”!)

- Mosaicismi confinati alla placenta
- Anomalie cromosomiche materne
- Presenza di tumore solido materno
- Vanishing twin

## FALSI NEGATIVI o MANCATA RISPOSTA

- Fallimenti tecnici
- Insufficiente quantità di ccfDNA fetale nel plasma materno (frazione fetale)

$$FF(\%) = \frac{\text{ccfDNA fetale}}{\text{ccfDNA totale (fetale + materno)}}$$

**Cut-off per NIPT: 3-4%**

# DETERMINAZIONE DELLA FRAZIONE FETALE (FF)

PROMOTORE DEL GENE *RASSF1A*  
(marcatore fetale 'epigenetico')

IPERMETILATO NEL  
DNA FETALE  
(PLACENTA)

IPOMETILATO NEL  
DNA MATERNO

DIGESTIONE CON UN  
COCKTAIL DI ENZIMI DI  
RESTRIZIONE  
METILAZIONE-SENSIBILE

NON SUBISCE  
DIGESTIONE

VIENE DIGERITO

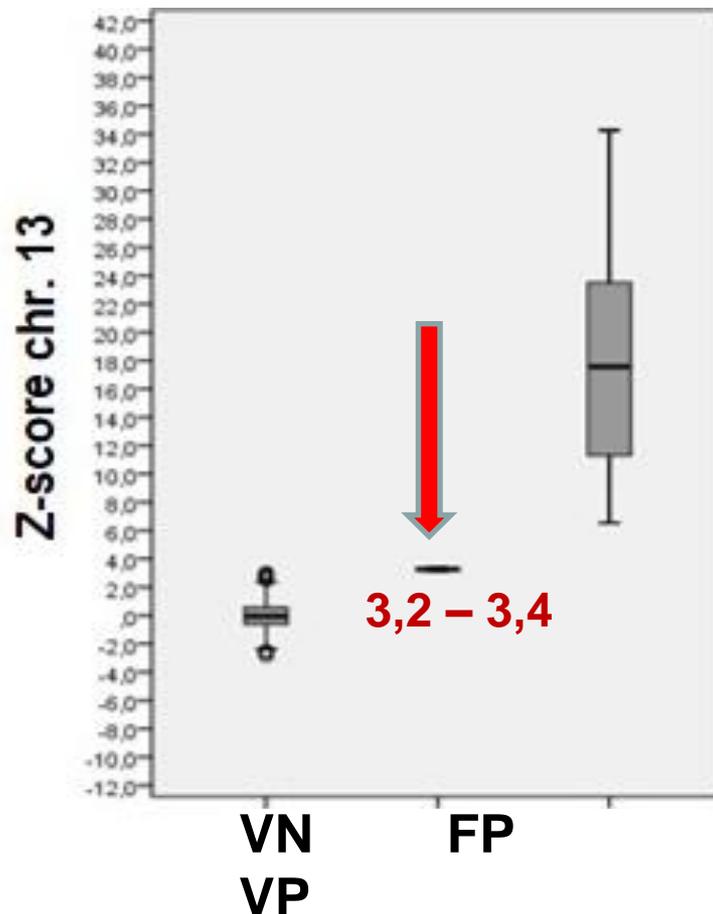
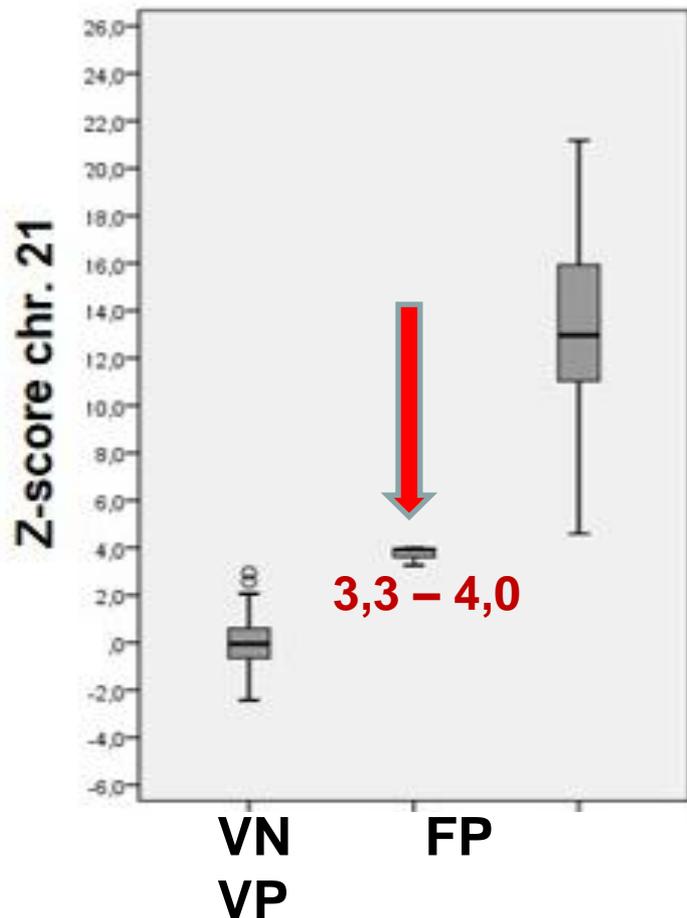
Digital PCR

AMPLIFICAZIONE E DOSAGGIO  
DEL DNA 'FETALE'

IN PARALLELO A *RASSF1A* SI  
AMPLIFICANO ALTRI FRAMMENTI  
PER IL DOSAGGIO DEL DNA TOTALE  
(*TERT*, *B-ACTINA*, *ERV-9*), PER POTER  
CALCOLARE LA FF (%)

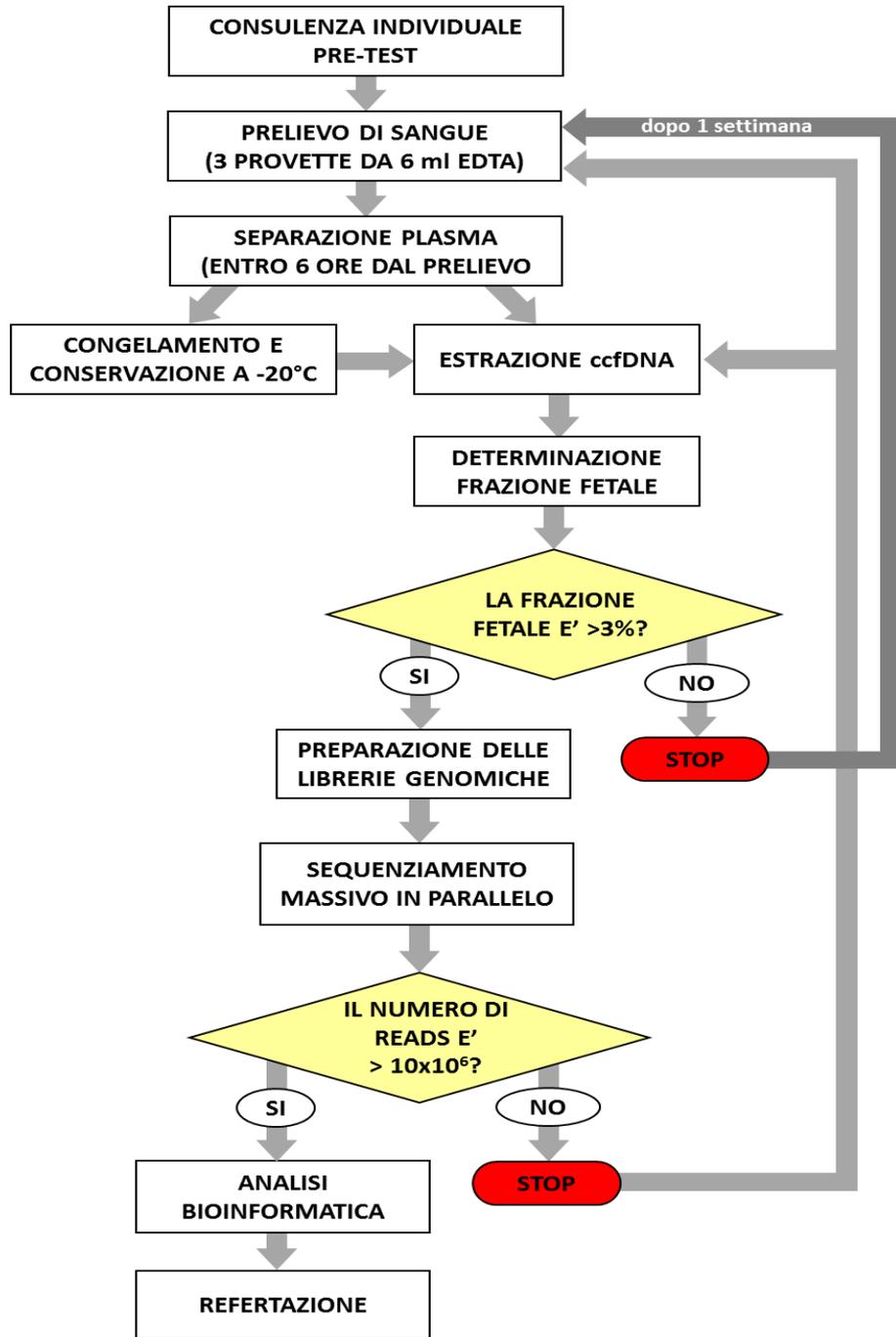


# RISULTATI STUDIO DI VALIDAZIONE DEL NIPT (II): distribuzione Z-score nei VN vs FP vs VP

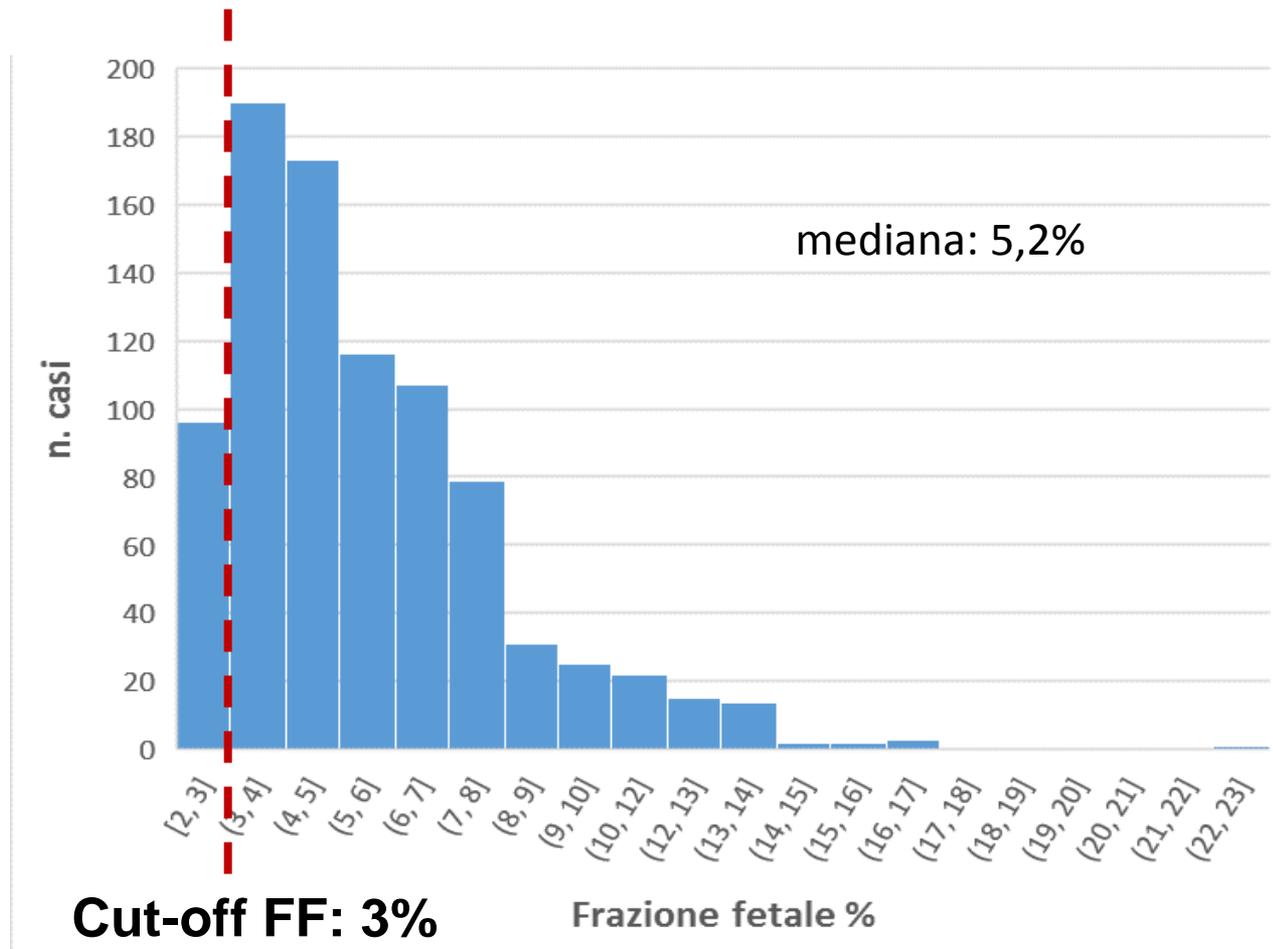


Approccio cautelativo per applicazione clinica: se non si risolvono ripetendo l'esame, meglio classificarli come 'alto rischio'

# WORK-FLOW DEL NIPT



# FRAZIONE FETALE (FF)



- **9,1% CAMPIONI CON FF < 3%: le signore sono state richiamate per eseguire un 2° prelievo a distanza di 1 settimana**
- **Nel 52,4% dei casi la FF si è riconfermata <3% anche nel 2° campione.**

# Referto

**Materiale esaminato: DNA da plasma materno**

**N° p rotocollo:** [REDACTED]

Kit utilizzato	TruSeq Nano DNA; NextSeq 500 High Output Kit 1X75 (Illumina)
Metodica determinazione frazione fetale	Droplet Digital PCR
Sonde utilizzate	beta-ACTINA-Custom TaqMan probe FAM-MGBNFQ (LifeTech); RASSF1A-Custom TaqMan probe VIC-MGBNFQ (LifeTech); SRY-PrimePCR Custom Assay FAM-IBFQ (Biorad); TERT-PrimePCR ddPCR Copy Number Assay FAM-IBFQ (Biorad).
Metodica utilizzata:	Sequenziamento Massivo in Parallelo a basso coverage di librerie genomiche
Risultato	BASSO RISCHIO PER ANEUPLOIDIE FETALI DEI CROMOSOMI 21,18, 13
Valore predittivo negativo del test	Trisomia 21: >99%  Trisomia 18: >99%  Trisomia 13: >99%

# Referto



**Azienda  
Ospedaliero  
Universitaria  
Careggi**

**Dipartimento dei Servizi - Area Diagnostica di Laboratorio**

**SODc Diagnostica Genetica**

**Direttore: Dott.ssa Francesca Torricelli**

## Segreteria

**Indirizzo:** Largo Brambilla, 3 - 50134 Firenze - **Orario:** 8.30 - 15.30 - **Tel.:** 055 - 7949363 - **Fax.:** 055 - 7949686

**E-mail:** [genetica@ao-u-careggi.toscana.it](mailto:genetica@ao-u-careggi.toscana.it) - [www.ao-u-careggi.toscana.it](http://www.ao-u-careggi.toscana.it)

Data di Stampa: 30/09/2015

Ore: 14:23

Sig.ra

Id.:5820163

Strutt. inviante:

Data Nascita:

Urgenza

Richiesta: 02064145

11/09/2015

Prelievo: 10/09/2015 Ore: 12:16

Motivo Invio: Età materna maggiore o eguale a 35 anni alla nascita

E' stata eseguita analisi mediante digital PCR per la quantificazione del DNA totale e fetale nel campione in esame e per la stima della frazione fetale.

Il campione presenta una frazione fetale stimata del 3.8%, sufficiente per eseguire il sequenziamento.

Il sequenziamento a basso coverage di librerie genomiche ottenute da DNA libero circolante nel plasma materno e l'analisi bioinformatica dei dati hanno evidenziato un contributo apparentemente normale dei cromosomi 21, 18 e 13.

I risultati ottenuti sono indicativi di basso rischio per aneuploidie fetali dei cromosomi indagati.

Si consiglia ulteriore valutazione da parte dello specialista di riferimento.

**Limiti:** Il test eseguito è un test di screening e non un test diagnostico, tuttavia presenta un'accuratezza del 99.4% per l'identificazione dei casi a rischio di trisomia 21 e 18 e del 98.8% per l'identificazione dei casi a rischio di trisomia 13. Il valore predittivo negativo del test è calcolato considerando: sensibilità e specificità della metodica, prevalenza dell'aneuploidia stimata sulla base della fascia d'età. Risultati falsi positivi possono essere dovuti a gravidanze gemellari o iniziate come tali con perdita ad epoche precoci di gravidanza di un embrione o a mosaicismi confinati alla placenta. Il test non può escludere la presenza di mosaicismi, riarrangiamenti cromosomici, aneuploidie segmentali e poliploidie.

# Referto

Relativamente alla monosomia X (e in generale a tutte le aneuploidie dei cromosomi sessuali: SCA), le linee guida del Ministero della Salute - Consiglio Superiore di Sanità - Sezione I - "Screening non invasivo basato sul DNA (Non Invasive Prenatal Testing - NIPT), del maggio 2015, riportano che il NIPT mostra una ridotta specificità, con una FPR cumulativa >1%, ascrivibile non solo ai mosaicismi confinati alla placenta, ma anche ai mosaicismi costituzionali della madre, presenti in circa l'8,6% dei NIPT positivi per una SCA (Nielsen et al. 1991; Thompson e Thompson, 2001; Wang et al, 2014). Di conseguenza, "al momento, lo screening basato sul NIPT non ha ragioni di essere esteso oltre le T21, T18, T13". Pertanto, in accordo a tali linee guida, il risultato relativo alle aneuploidie dei cromosomi sessuali, allo stato attuale, non viene refertato.

**Note:** Allineamento delle sequenze al genoma umano di riferimento (hg19) con BWA, processamento dell'allineamento con SAMTOOLS e Picardtools, conteggio delle sequenze allineate con BEDTools e analisi statistica dei dati con il pacchetto RAPIDR. I saggi custom per digital PCR sono stati disegnati in accordo a quanto descritto in letteratura (Fan HC 2009; Tong YK 2010; Chan KC2006).

**Data validazione:** 18/09/2015

**Responsabile dell'indagine**

Dott.ssa Costanza Giuliani

**Direttore SOD**

Dott.ssa Francesca Torricelli

**Riferimenti bibliografici:**

# EMOFILIA



L'emofilia e' una malattia congenita, cronica, per la quale **non esiste**, al momento, **un TRATTAMENTO DEFINITIVO**

Obiettivi principali del trattamento sono la **prevenzione e terapia delle manifestazioni emorragiche** e delle complicanze croniche

La terapia attuale (trattamento sostitutivo a domanda o profilattico) aumenta la sopravvivenza e migliora la qualità della vita ma :

Emivita breve (FVIII 12-14 h, FIX circa 18 h )

Immunogenicità (sviluppo di inibitori con una incidenza del 25-30% nell'Emofilia A)

Costi (trattamento profilattico circa 100.000Euro/anno)

In tutto il mondo la terapia è disponibile solo per circa il 30% degli emofilici

Emorragie (Rosendaal et al. 2004-2005)

Emartri e disabilità

# TERAPIA GENICA



Caratteristiche che rendono l'emofilia adatta allo sviluppo di tecniche di terapia genica:

Malattia monogenica

E' sufficiente una piccola quantità di prodotto per far cambiare il quadro clinico del paziente

La struttura del gene codificante per il FVIII è completamente nota e clonabile

FVIII è sintetizzato da epatociti, fibroblasti, miociti: disponibilità di targets diversi

Disponibilità di modelli animali: topo e cane

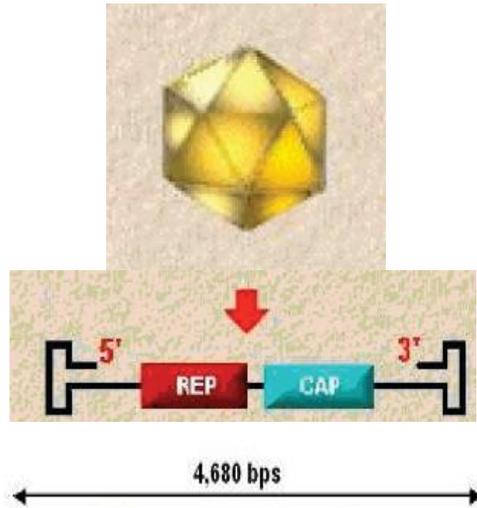
Semplice valutazione della efficacia della procedura mediante il dosaggio del FVIII circolante nel plasma

## OBIETTIVO

Mantenere i livelli di FVIII > 1%

Trasformare il fenotipo severo in moderato

# VETTORI ADENO ASSOCIATI (AAV)



- virus a **DNAss**,
- capside icosaedrico
- no envelope
- genoma fiancheggiato da **sequenze ITRs**, che contengono la sequenza di packaging
- solo due tipi di geni: **cap** (proteine del capside) e **rep** (proteine necessarie per la replicazione e l'integrazione)
- **8 diversi sierotipi**

- **Virus difettivi**: per replicare necessita della presenza di un adenovirus o di un herpes simplex virus (virus helper)
- **in assenza di AV o HSV, i virus AAV integrano** stabilmente nel genoma della cellula ospite con un'alta frequenza, in una regione precisa del cromosoma 19 (q13.3-qter)
- una successiva co-infezione con AV o HSV attiva la replicazione del virus integrato a cui segue lisi cellulare e rilascio di particelle infettive.

# LIMITI DELLA TERAPIA GENICA



I principali **problemi** riscontrati nell'applicazione della terapia genica sono:

- \* I **livelli plasmatici** di FVIII e FIX non sono tali da poter eliminare la terapia sostitutiva
- \* **Durata** dell'espressione limitata
- \* Reazione immunitaria (sviluppo **inibitori**)
- \* Sicurezza della procedura: rischio di integrazione nelle **cellule germinali** e trasmissione alla progenie

Clinical Trial	Number of patients	Method	Deficit	Safety	Duration of expression	Expression of transgene product	Status
Transkaryotic Therapy (TKT), 1998	6	Non-viral DNA-based vector into fibroblast, BDD, ex-vivo	FVIII	No significant side-effect	< 6 months	0.8-4% in 4 patients	Closed (Roth, Blood 2002)
Avigen, 1999	8	rAAV2 intramuscular injection (10-50 injections), in vivo	FIX	No significant side-effect	Transient	<1.6%	Closed (Manno, Blood 2003)
Chiron, 1999	13	Moloney murine leukemia virus-MLV (retroviral vector) BDD, in vivo	FVIII	Detection of <b>vector genome in semen</b> of one patient	< 13 weeks	1-2%	Trial terminated (Powell, Blood 2003)
GenStar, 2001	1	Adenoviral vector, promoter albumina, peripheral venous infusion, in vivo	FVIII	Increase <b>AST/ALT, Thrombocytopenia and fever</b>	Transient	3%	Closed (Data not Published)
Avigen, 2001	7	rAAV2 bolus infusion into hepatic artery, in vivo	FIX	Detection of <b>vector genome in semen</b> of patient, increase ALT in patients	Up to 10 weeks in 1 patients	3-11% in 2 patients	Trial suspended (hepatic toxicity)

# The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

DECEMBER 22, 2011

VOL. 365 NO. 25

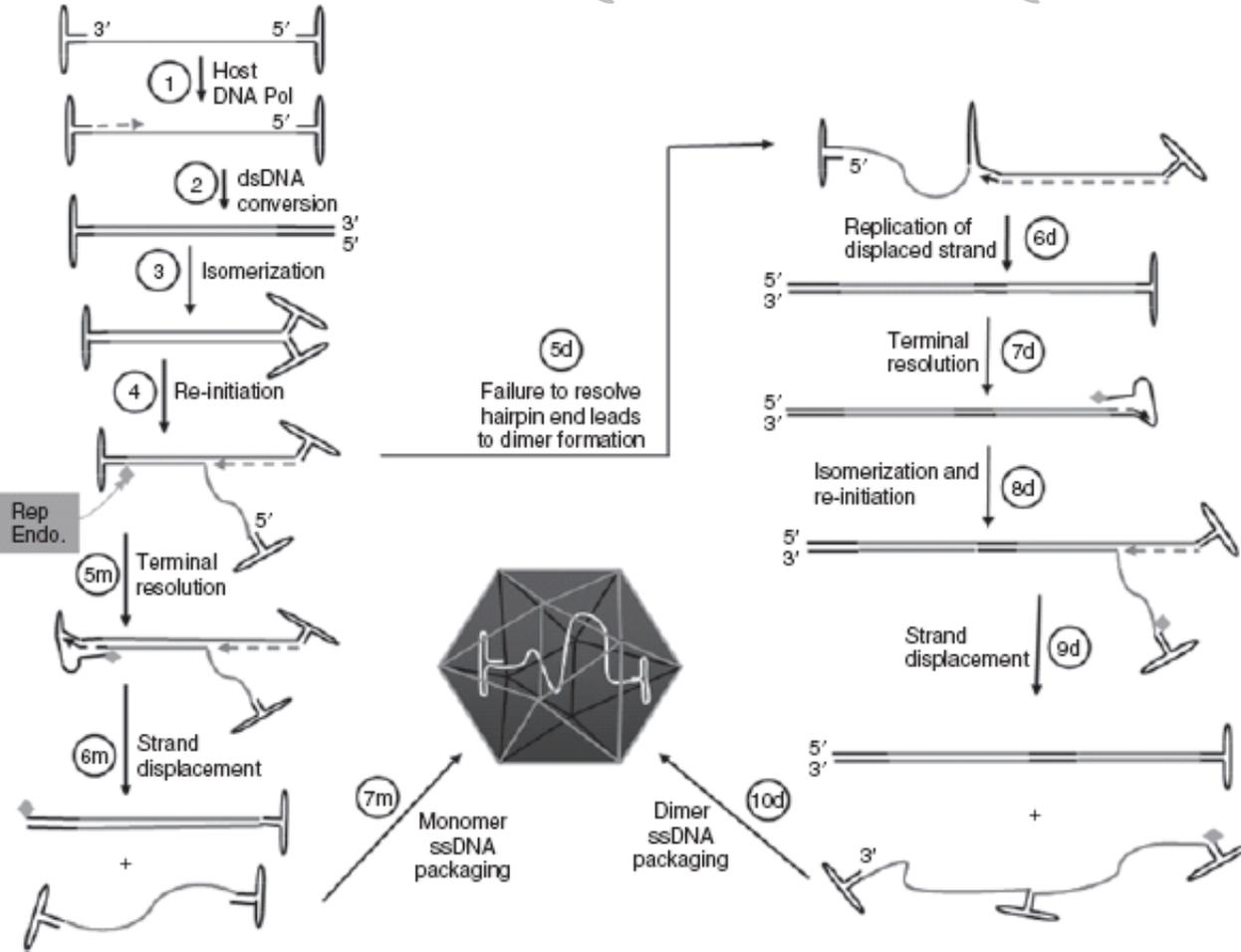


## Adenovirus-Associated Virus Vector–Mediated Gene Transfer in Hemophilia B

Amit C. Nathwani, M.B., Ch.B., Ph.D., Edward G.D. Tuddenham, M.B., B.S., M.D., Savita Rangarajan, M.B., B.S., Cecilia Rosales, Ph.D., Jenny McIntosh, Ph.D., David C. Linch, M.B., B.Chir., Pratima Chowdary, M.B., B.S., Anne Riddell, B.Sc., Arnulfo Jaquilmac Pie, B.S.N., Chris Harrington, B.S.N., James O'Beirne, M.B., B.S., M.D., Keith Smith, M.Sc., John Pasi, M.D., Bertil Glader, M.D., Ph.D., Pradip Rustagi, M.D., Catherine Y.C. Ng, M.S., Mark A. Kay, M.D., Ph.D., Junfang Zhou, M.D., Yuny Spence, Ph.D., Christopher L. Morton, B.S., James Allay, Ph.D., John Coleman, M.S., Susan Sleep, Ph.D., John M. Cunningham, M.D., Deokumar Srivastava, Ph.D., Etiena Basner-Tschakarjan, M.D., Federico Mingozzi, Ph.D., Katherine A. High, M.D., John T. Gray, Ph.D., Ulrike M. Reiss, M.D., Arthur W. Nienhuis, M.D., and Andrew M. Davidoff, M.D.

- \* Gli autori si sono focalizzati sul **virus adeno associato di tipo 8** che ha una minore sieroprevalenza nella popolazione generale: ad esempio, tra i donatori e gli emofilici B l'immunità contro tale virus si riscontra solo nel 2-5% dei soggetti
- \* **Caratteristiche biologiche** distinte dagli altri sierotipi :
  - Differente tropismo dagli altri sierotipi. AAV8 ha un alto tropismo epatico: **somministrazione del vettore nella vena periferica** (approccio semplice, non invasivo e sicuro per i pazienti con diatesi emorragica)
  - Rapido processo di disassemblaggio del capsid e liberazione del genoma virale

# Self complementary AAV-8 (scAAV)



• I vettori AAV self-complementary consentono l'espressione del transgene a livelli più alti rispetto ai vettori AAV single-strand.

• La sintesi dello strand complementare o il base pairing con una genoma complementare coinfectante è uno step limitante nella trasduzione di rAAV e ciò riduce la sua efficacia in numerosi tipi cellulari.

# Selezione dei pazienti



## \* Criteri di inclusione

- 1) Maschi di età  $\geq 18$  anni
- 2) Emofilia B severa
- 3) No inibitori

## \* Criteri di esclusione

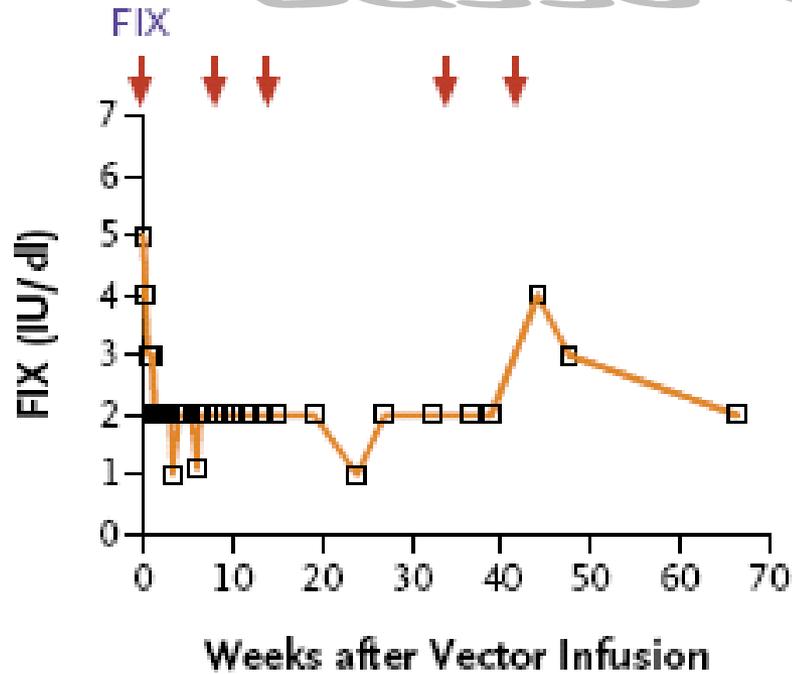
- 1) Infezione attiva Epatite B, C
- 2) Immunità preesistente nei confronti di AAV8
- 3) Disfunzioni epatiche o patologie concomitanti

Characteristic	Vector Dose, $2 \times 10^{11}$ vg/kg		Vector Dose, $6 \times 10^{11}$ vg/kg		Vector Dose, $2 \times 10^{12}$ vg/kg	
	Participant 1	Participant 2	Participant 3	Participant 4	Participant 5	Participant 6
<b>At baseline</b>						
Age (yr)	31	64	43	29	32	27
Mutation in FIX gene	31280G→A E387K	2bp deletion, frame shift	30097G→T W215C	31290G→A A309T	20518C→T R180W	-52 del C
FIX prophylaxis	Twice weekly	Twice weekly	Twice weekly	Targeted (average, weekly)	Twice weekly	Thrice weekly
Hepatitis C status	Negative	Positive, spontaneous clearance	Positive, clearance with interferon plus anti-viral therapy	Positive, spontaneous clearance	Positive, clearance with interferon plus anti-viral therapy	Negative
Antibody titer (relative units) †						
AAV2 IgG	5	20	77	12	10	22
AAV8 IgG	1	12	37	1	5	8
<b>After gene transfer</b>						
Maximum FIX level (IU/dl) ‡	2	2	3	4	8	12
Duration of FIX expression (mo)	>15	>11	>9	>8	>6	>5
FIX expression on in vivo transduction-inhibition assay (% of control value) §	138	116	42	109	92	93
Peak alanine aminotransferase value (IU/liter) ¶	36	20	39	34	202	36

# Basso dosaggio



Participant 1



**\*Sospensione del trattamento profilattico**

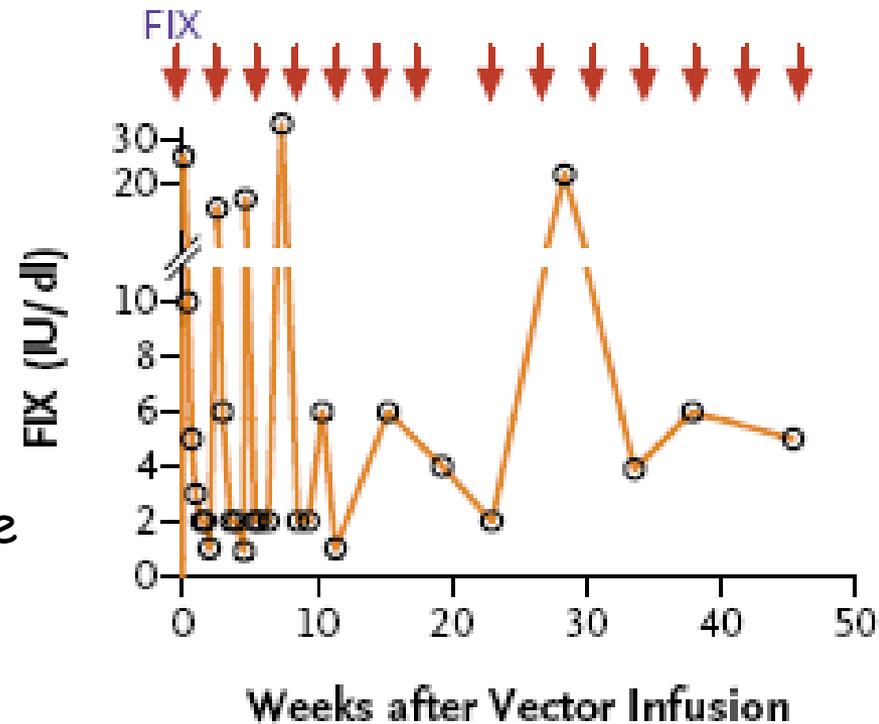
\*L'attività del FIX dopo circa 2 settimane si è stabilizzata al 2% ed è rimasta a questo livello per più di 16 mesi

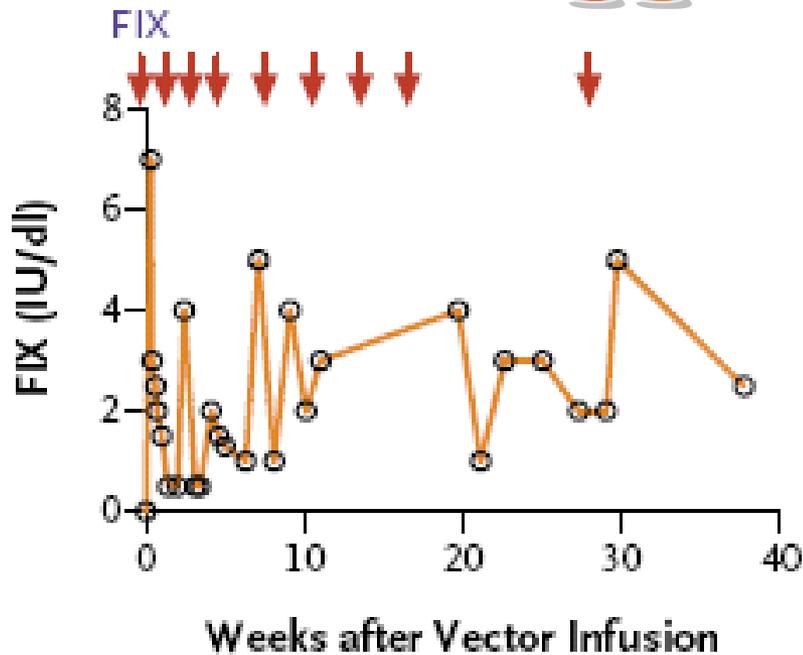
\*L'attività del FIX dopo circa 18 giorni pari a circa 1%

**\*Aumentato l'intervallo tra le somministrazioni profilattiche a circa 2 settimane**

\*A 23 settimane dal gene transfer e a 3 settimane dall'ultima somministrazione profilattica, il livello di FIX pari al 2%: sintesi endogena

Participant 2





\*Nelle prime 5 settimane, in assenza di terapia sostitutiva, l'attività del FIX era < 1% (titolo anticorpale, più alto rispetto agli altri partecipanti)

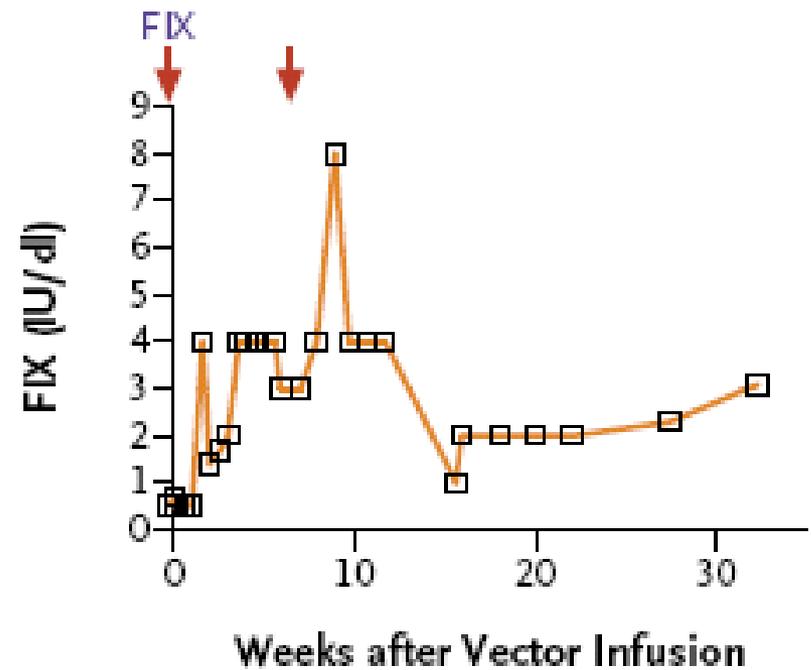
**\*Aumentato l'intervallo tra le somministrazioni profilattiche a circa 2 settimane**

\* In seguito aumento dei livelli plasmatici: sintesi endogena

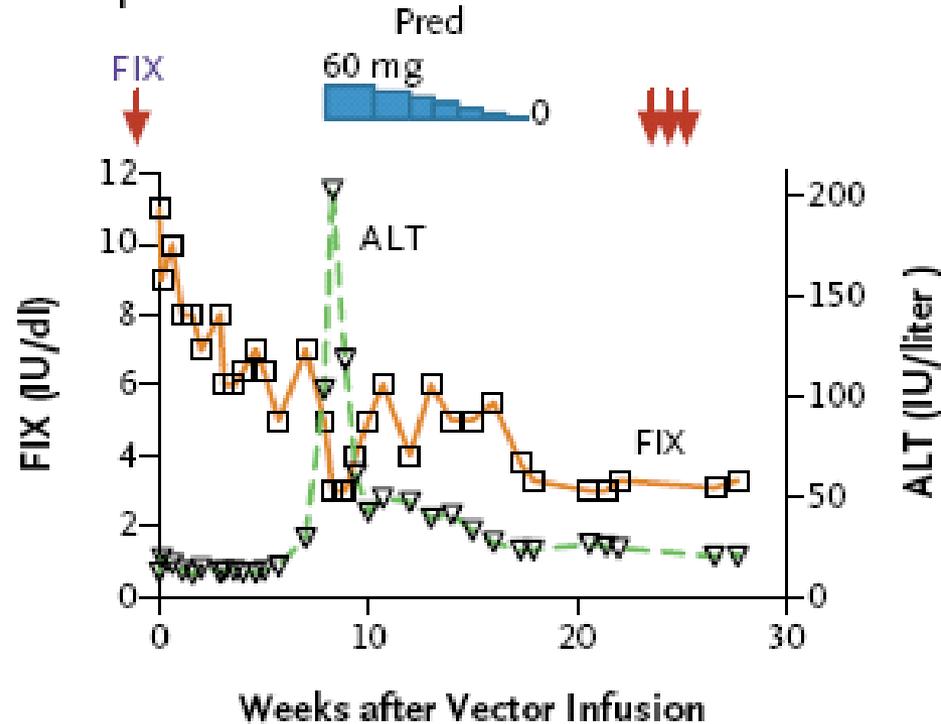
Participant 4

\*Dopo 4 settimane il livello di FIX è passato da <1% a 4%. Dopo 3 mesi è sceso al 2-3%

**\*Il paziente ha ricevuto una sola somministrazione di FIX per prevenire una emorragia dopo una caduta**



## Participant 5



**\*14 giorni dopo il gene transfer i livelli plasmatici pari al 7% (stabile per 7 settimane)**

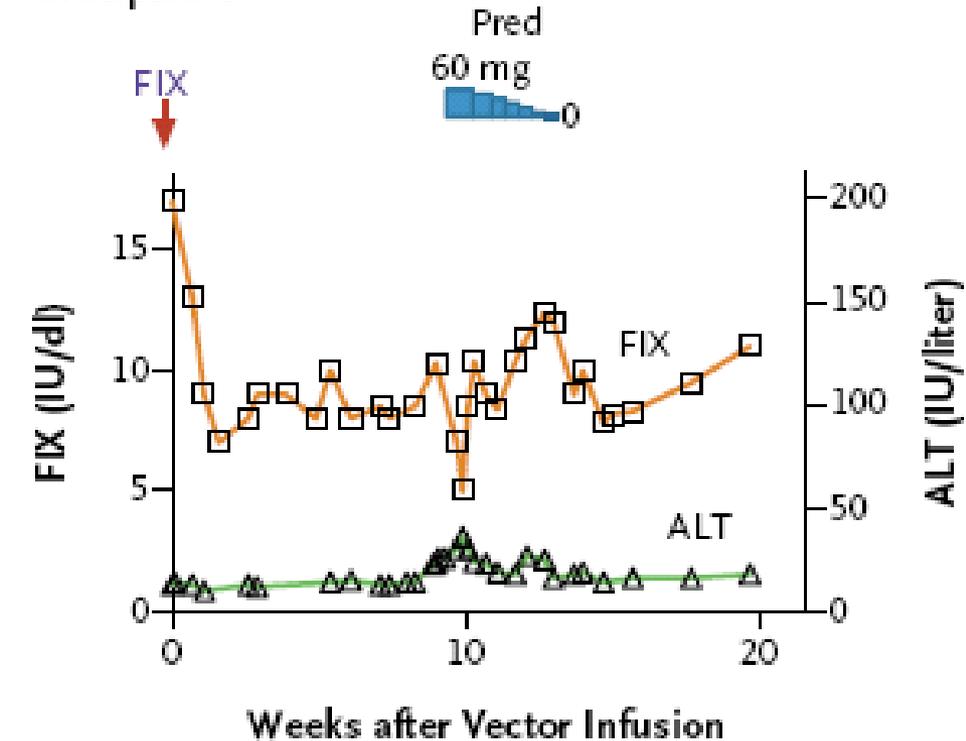
**\*Al 49° giorno si è avuto un innalzamento delle transaminasi ed il livello di FIX è sceso al 3%**

**\* 3 somministrazioni in 6 mesi**

**\*Per 8 settimane i livelli compresi tra 8 e 12 %. Dopo 10 settimane diminuito a 5%: glicocorticoidi per sospetta risposta immunitaria**

**\*Alla nona settimana innalzamento delle ALT ed in seguito il livello di FIX è sceso al 3%**

## Participant 6



Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer  
in Hemophilia B

Amit C. Nathwani, M.B., Ch.B., Ph.D., Edward G.D. Tuddenham, M.B., B.S., M.D., Savita Rangarajan, M.B., B.S.,  
Cecilia Rosales, Ph.D., Jenny McIntosh, Ph.D., David C. Linch, M.B., B.Chir., Pratima Chowdhary, M.B., B.S.,  
Anne Riddell, B.Sc., Arnulfo Jaquilmac Pie, B.S.N., Chris Harrington, B.S.N., James O'Beirne, M.B., B.S., M.D.,  
Keith Smith, M.Sc., John Pasi, M.D., Bertil Glader, M.D., Ph.D., Pradip Rustagi, M.D., Catherine Y.C. Ng, M.S.,  
Mark A. Kay, M.D., Ph.D., Junfang Zhou, M.D., Yunyu Spence, Ph.D., Christopher L. Morton, B.S., James Allay, Ph.D.,  
John Coleman, M.S., Susan Sleep, Ph.D., John M. Cunningham, M.D., Dheekumar Srivastava, Ph.D.,  
Etiena Basner-Tschakarjan, M.D., Federico Mingozzi, Ph.D., Katherine A. High, M.D., John T. Gray, Ph.D.,  
Ulrike M. Reiss, M.D., Arthur W. Nienhuis, M.D., and Andrew M. Davidoff, M.D.

# Terapia genica

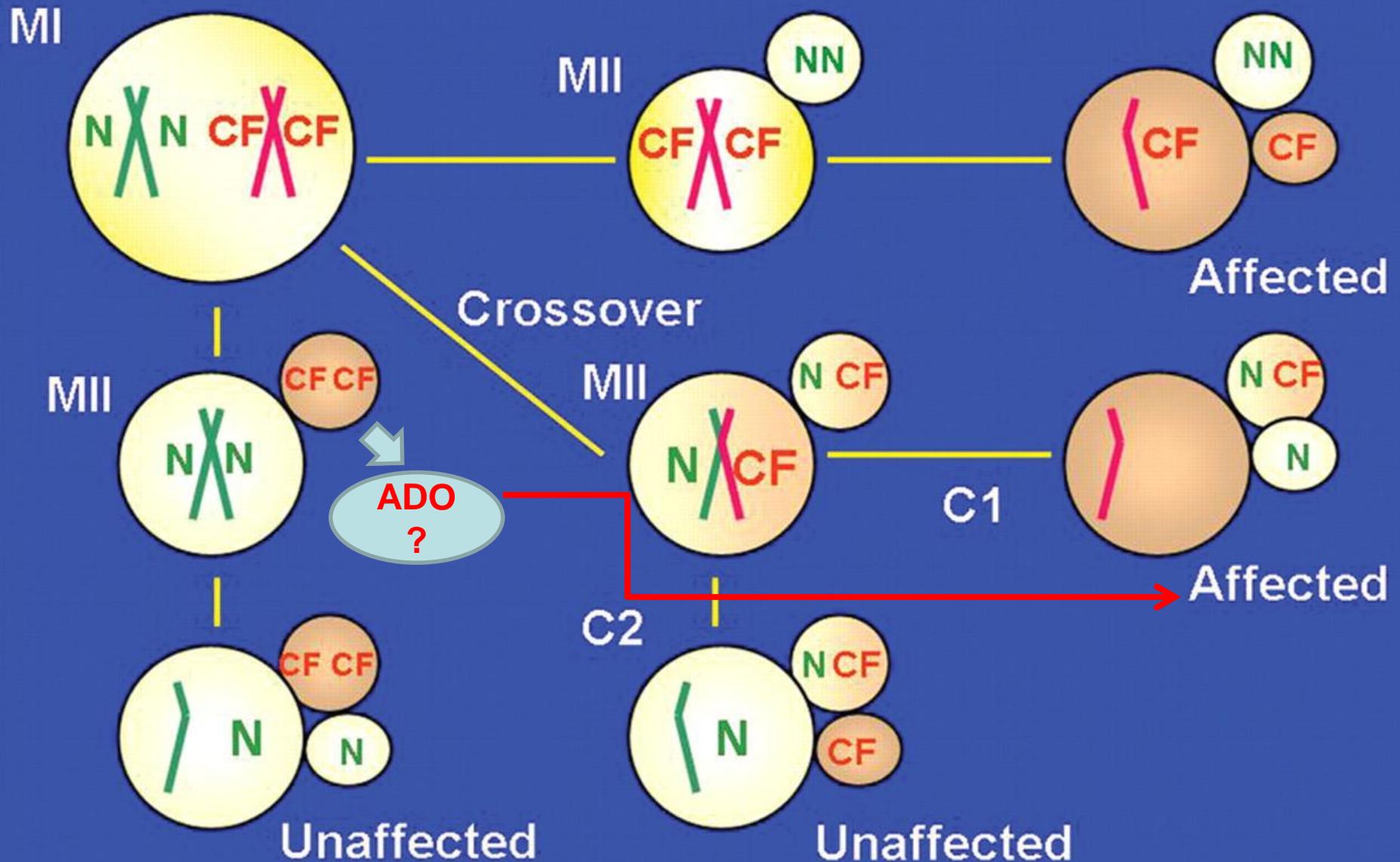


- \* L'incremento dei livelli di FIX è dose dipendente  
(nel gruppo ad alto dosaggio picchi di espressione 8-12%)
- \* 4/6 soggetti hanno interrotto la profilassi (no emorragie spontanee)
- \* In 2/6 soggetti e' stato aumentato l'intervallo delle somministrazioni profilattiche
- \* In nessuno dei soggetti si e' avuta una risposta immunitaria contro il transgene
- \* Somministrazione a livello della vena periferica
- \* Espressione a lungo termine del transgene a livelli terapeutici

Trasformare il fenotipo severo  
in moderato



# Principle of PB based PGD for single gene disorders - example of PGD for CFTR mutation



# CARATTERISTICHE DEL VETTORE IDEALE



**Efficiente** (trasdurre un numero di cellule elevato)

Dovrebbe garantire una **prolungata produzione della proteina terapeutica** (a livelli adeguati)

Capace di incorporare **DNA di varie dimensioni**

Dovrebbe garantire **l'espressione del gene terapeutico**

**Non** dovrebbe essere **patogeno**

In grado di raggiungere specificamente le **cellule bersaglio**

**Ben tollerato**

**Non** dovrebbe avere componenti che inducono **risposta immune**



# VETTORI PER TERAPIA GENICA



VETTORE	VANTAGGI	SVANTAGGI
<b>Retrovirus</b> (RNA ss)	Alta efficienza nella transduzione / Espressione prolungata del transgene	Potenziale mutagenesi / Necessità di cellule in mitosi / Piccola taglia del DNA insert
<b>Adenovirus</b> (DNA ds)	Alta efficienza nella transduzione/ Ampio range di targets/ Non necessarie cell in mitosi/ Basso rischio mutagenesi in quanto il DNA non si integra (episoma)	Espressione transitoria in quanto si ha una progressiva perdita dell'episoma/ Immunogenicità / Effetto citopatico diretto del virus
<b>Adeno- associated virus</b> (DNA ss)	Non necessarie cell in mitosi / Integrazione sito- specifica	Potenziale mutagenesi se integrazione non sito- specifico/ Piccola taglia del DNA insert
<b>Vettori non virali</b> (Plasmidi, oligonucleotidi RNA/DNA)	Non rischio infettivo / Non limitate dimensioni gene insert/ Sintetici	Bassa efficienza/ Limitato range targets/ Espressione transitoria