

# Lo screening con ricerca del DNA fetale su sangue materno

## Prospettive in **DIAGNOSI PRENATALE**

---

Marina Baldi  
[baldi@laboratorio-genoma.it](mailto:baldi@laboratorio-genoma.it)

Ferrara, 21 novembre 2015

## NATI VIVI

La frequenza delle alterazioni del cariotipo alla nascita, in assenza di diagnosi prenatale, è circa dell'1%.

### *Frequenza delle anomalie cromosomiche nei nati vivi*

Anomalie cromosomiche		Frequenza (%)
<b>Numeriche</b>	<i>autosomiche</i>	<b>0,15</b>
	<i>cromosomi del sesso</i>	<i>Maschi</i> <b>0,11</b>
		<i>Femmine</i> <b>0,07</b>
<b>Strutturali</b>	<i>bilanciate</i>	<b>0,52</b>
	<i>sbilanciate</i>	<b>0,06</b>
<b>Totali</b>		<b>0,91</b>



# DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

## INDICAZIONI

- \* età materna avanzata ( $\geq$  a 35 anni);
- \* genitori con precedente figlio affetto da patologia cromosomica;
- \* genitore portatore di riarrangiamento strutturale, non associato a effetto fenotipico;
- \* aborto spontaneo ricorrente;
- \* sindromi mendeliane da rotture cromosomiche (anemia di Fanconi, atassia teleangectasia);



# INCIDENZA SINDROME DI DOWN

<b>ETA' MATERNA</b>	<b>INCIDENZA</b>
inferiore a 30 anni	1 su 1500
30 - 34 anni	1 su 580
35 - 39 anni	1 su 280
40 - 44 anni	1 su 70
oltre 45 anni	1 su 38

“nessuna età materna è risparmiata dal rischio di avere prole con anomalie cromosomiche”



**NIPT:**

**TEST DI SCREENING PRENATALE PER LA  
SINDROME DI DOWN, ALTRE ANOMALIE  
CROMOSOMICHE E DIVERSE MALATTIE  
GENETICHE**

*The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*

**A New Era in Noninvasive Prenatal Testing**



*The* **NEW ENGLAND**  
**JOURNAL** *of* **MEDICINE**

ESTABLISHED IN 1812

FEBRUARY 27, 2014

VOL. 370 NO. 9

## **DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening**

Diana W. Bianchi, M.D., R. Lamar Parker, M.D., Jeffrey Wentworth, M.D., Rajeevi Madankumar, M.D., Craig Saffer, M.D., Anita F. Das, Ph.D., Joseph A. Craig, M.D., Darya I. Chudova, Ph.D., Patricia L. Devers, M.S., C.G.C., Keith W. Jones, Ph.D., Kelly Oliver, B.S., Richard P. Rava, Ph.D., and Amy J. Sehnert, M.D., for the CARE Study Group\*

**La NIPT non è più il futuro ma il presente  
della diagnosi prenatale**

# Anomalie cromosomiche rilevate

## ANEUPLOIDY

- Trisomy 21 (Down Syndrome)
- Trisomy 18 (Edwards Syndrome)
- Trisomy 13 (Patau Syndrome)
- Monosomy X (Turner Syndrome)
- XXX (Trisomy X)
- XXY (Klinefelter Syndrome)
- XYY (Jacobs Syndrome)



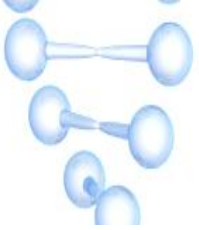
## Microdeletion Syndromes (optional)

- 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge)
- 1p36 deletion syndrome
- Angelman syndrome (15q11.2 deletion syndrome);
- Prader-Willi syndrome (15q11.2 deletion syndrome);
- Cri du Chat syndrome (5p- syndrome);
- Wolf-Hirschhorn syndrome (4p- syndrome)

## Other ANEUPLOIDY (optional)

- Trisomy 9
- Trisomy 16

**ATTENDIBILITA' FINO 99%**



## Applicazioni diagnostiche della NIPD su cfDNA

Determinazione del sesso fetale nelle gravidanze a rischio per malattie genetiche X-linked

Determinazione del genotipo fetale RHD (Rh blood group, D antigen) in donne Rh D-negative

Malattie autosomiche dominanti (Acondroplasia, Morbo di Huntington, ecc) di origine paterna o de novo

Malattie autosomiche recessive (-talassemia, Fibrosi Cistica, ecc) mediante esclusione della mutazione paterna (Coppia con difetti molecolari diversi ) analisi indiretta





# IN COSA CONSISTE?

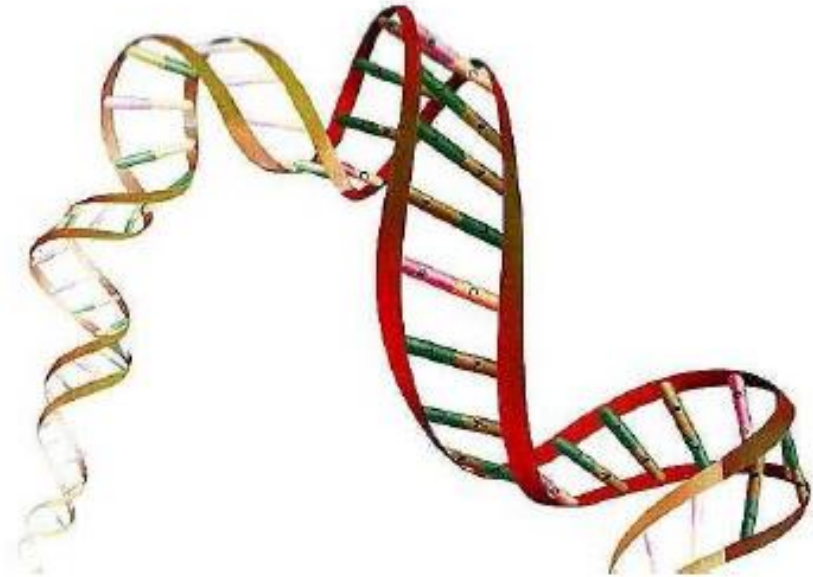
un test prenatale non invasivo  
basato su analisi di DNA  
FETALE LIBERO ISOLATO DAL  
PLASMA MATERNO (cffDNA).



## Cell-free DNA (cfDNA)

• Deriva da degradazione di cellule della placenta dovuta a processi apoptotici delle cellule del trofoblasto.

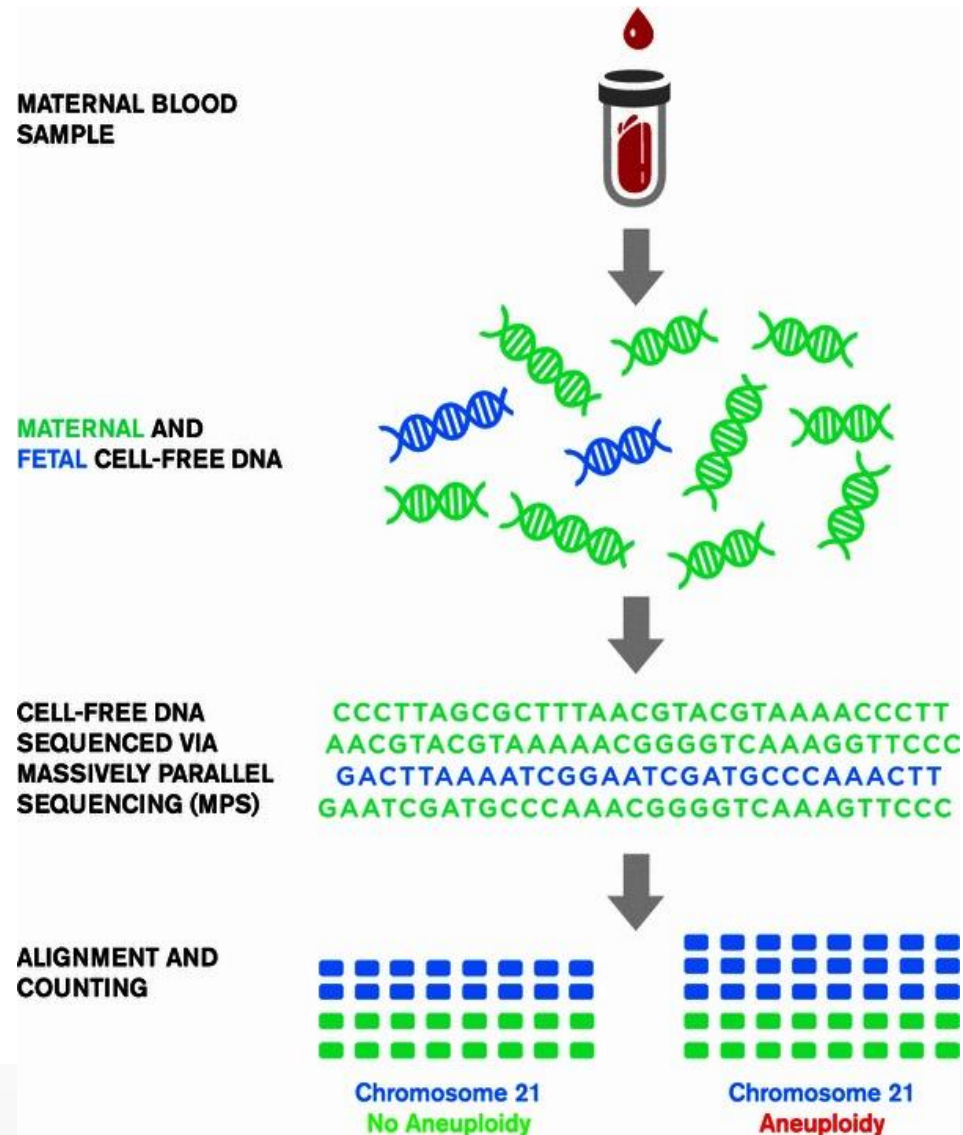
Rilasciato nel flusso sanguigno come piccoli frammenti di DNA (150-200bp)



Il cf DNA è presente sin dalla V settimana di gravidanza. L'analisi del cfDNA fetale è affidabile dopo 10 settimane di gestazione cfDNA fetale non è più presente già pochi giorni dopo il parto

# cfDNA test: come funziona?

Un campione di sangue a 10 settimane o più di gravidanza viene purificato dal componente del plasma di sangue intero materno. Il DNA libero viene analizzato da Next Generation Sequencing (NGS) tecnica e basata sul sequenziamento massivo di ogni cromosoma. L'analisi dei dati viene effettuata utilizzando un algoritmo bioinformatica.





• LA DIAGNOSI PRENATALE NON INVASIVA E' UN TEST SEMPLICE E SICURO.

• SENZA ALCUN RISCHIO DI ABORTO A DIFFERENZA DEI TEST DI DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA COME AMNIOCENTESI E LA AVILLOCENTESI.

• E' UN TEST VELOCE ESITI IN 3/7 GIORNI LAVORATIVI.

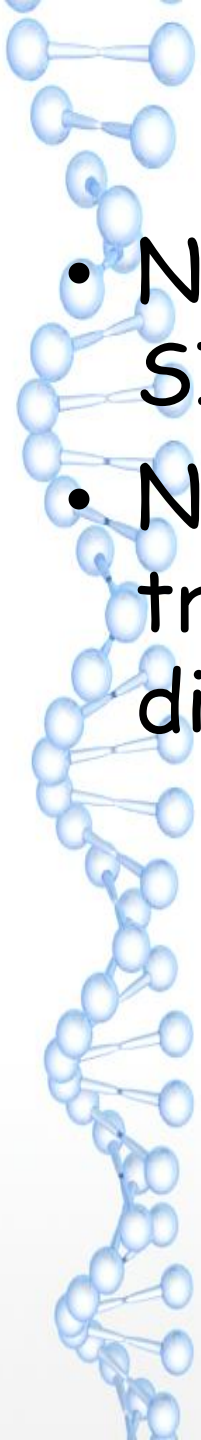


# A quali pazienti dovrebbe essere offerto?

- pazienti a partire dalla 10 settimane di gestazione che soddisfino uno dei seguenti criteri:
- Rischi materni legati all'età ( $\geq 35$  anni)
- Risultati positivi sullo screening del siero materno
- Gravidanza precedente con aneuploidie
- Gravidanze a basso rischio
- Gravidanza da FIVET (inclusa eterologa)



Ansia



- NIPT è adatto sia per le gravidanze SINGOLE che GEMELLARI
- Nelle gravidanze in cui vi è il trasferimento di più embrioni il tasso di falsi positivi è leggermente più alto



# ISPD Position Statement

April, 2013

International Association  
for Prenatal Diagnosis



- dimostrato che il test prenatale non invasivo basato sul sequenziamento massivo del DNA circolante fetale libero (cfDNA) nel plasma materno sia altamente efficace per il rilevamento aneuploidie"
- metodo più efficace per lo screening per la trisomia 21 e trisomia 18, 13"
- Sia test migliore per le gravidanze ad alto rischio





## Consulenza genetica pre-test irrinunciabile

Un accurato studio della storia familiare deve essere ottenuta prima del test per valutare l'appropriatezza dell'approccio diagnostico per riconoscere o escludere la presenza all'interno della famiglia di particolari anomalie congenite

La NIPT deve essere una scelta informata basata sul contesto clinico





# Consulenza genetica

aspettative  
storia familiare

dubbi  
sentimenti  
richieste



Processo di  
comunicazione  
bidirezionale



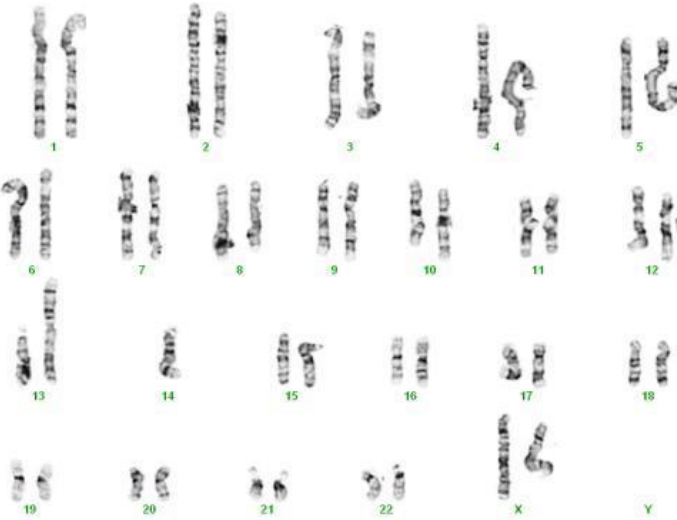
**Non-direttivo**



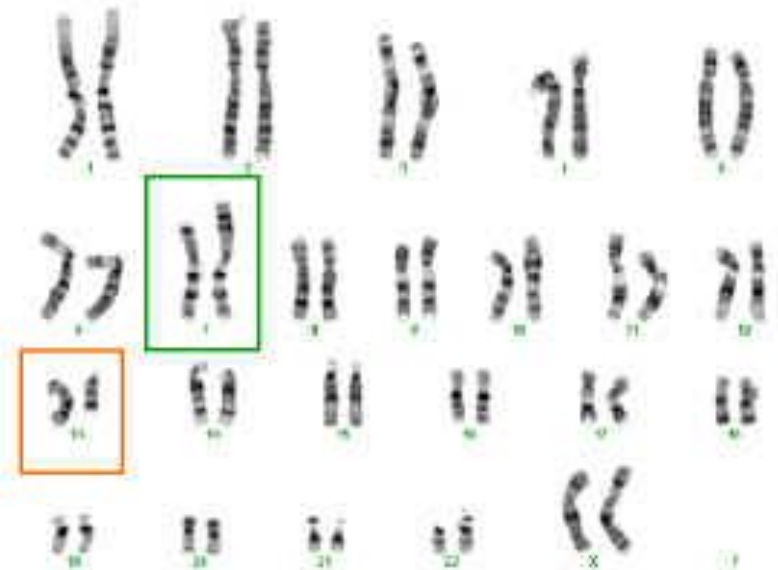
educazione  
probabilità di eredo-  
familiarità  
rischio individuale  
opzioni preventive



# La NIPT non è in grado di evidenziare traslocazioni bilanciate o sbilanciate



(c) 2005, Janet M. Cowan, Ph.D.

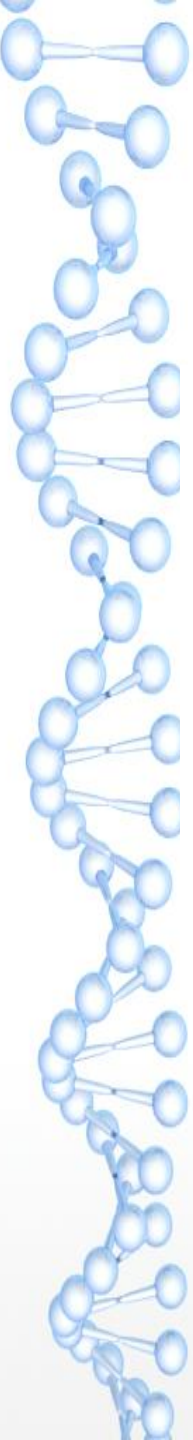


La NIPT non è in grado di evidenziare traslocazioni sbilanciate

Non è adatta quando uno dei genitori è portatore di anomalie cromosomiche bilanciate

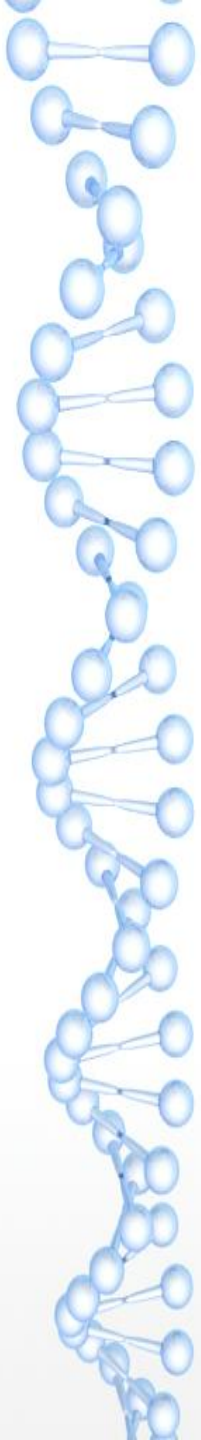
I genitori eterozigoti per una traslocazione bilanciata hanno un rischio di patologia fetale sbilanciata del 5-10%. Tuttavia tale rischio varia ampiamente in rapporto al tipo di riarrangiamento

NON è indicato nella ricerca di malattie genetiche/ereditare



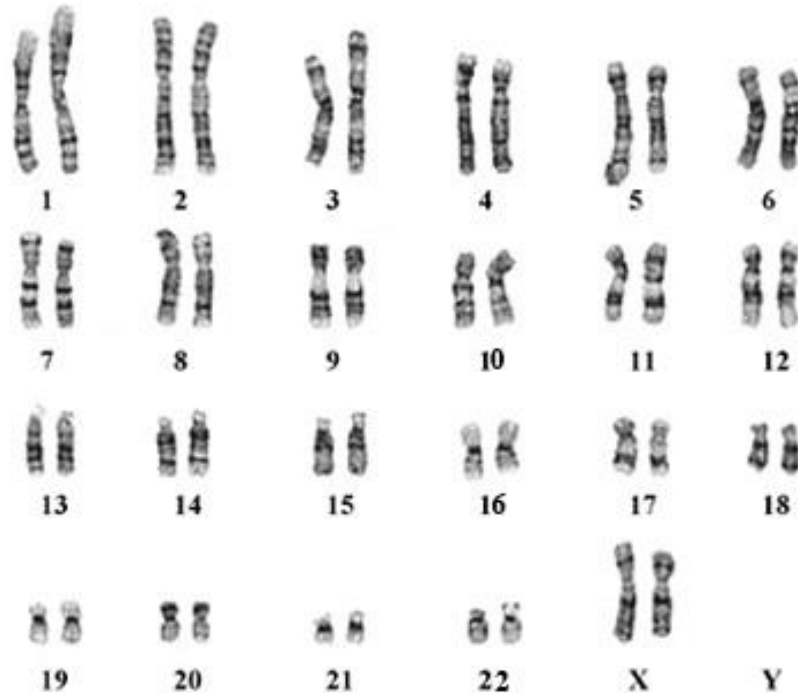
Quando il test è positivo necessita di conferma con approccio invasivo

il test Non INVASIVO non sostituisce la DPN che deve rimanere una opzione percorribile in caso di anomalie ecografiche fetali



# Il Cariotipo Fetale Molecolare (array-CGH)

# Il Cariotipo Fetale **TRADIZIONALE**



- ✓ **FINALITA'**: evidenziare la presenza di eventuali anomalie cromosomiche fetali.
- ✓ **TECNICA**: comporta la **coltura delle cellule fetali** presenti nel liquido amniotico o nei villi coriali e la valutazione dell'assetto cromosomico tramite l'analisi al microscopio dei cromosomi in metafase.

# Il Cariotipo Fetale TRADIZIONALE

## Difficoltà Tecniche

### TEMPI LUNGI DI ATTESA PER I RISULTATI

- ✓ Le **colture cellulari** impongono **lunghi tempi di attesa** (**15-20 giorni**), necessari per lo sviluppo delle colonie di cellule fetali.
- ✓ E' possibile ottenere una risposta rapida (24/48 ore) **preliminare** dalle aneuploidie cromosomiche più comuni (cromosomi 13, 18, 21, X e Y), mediante la tecnica QF-PCR, ma i risultati sono **parziali** e comunque necessitano di una **conferma** dal cariotipo.
- ✓ A volte è possibile che le cellule poste in coltura **non crescano** adeguatamente, con conseguente necessità di ripetizione del prelievo al fine di allestire nuove colture cellulari.
- ✓ Questo problema avviene **1 volta su 500** in caso di cariotipo da liquido amniotico e **1 volta su 100** in caso di

# Il Cariotipo Fetale **TRADIZIONALE**

## LIMITI DI ACCURATEZZA DELL'ESAME

✓ **Limiti di risoluzione:**

✓ **Necessità di approfondimenti diagnostici di 2<sup>a</sup> livello**

✓ **Markers:** piccoli porzioni cromosomiche soprannumerarie;

✓ **anomalie cromosomiche strutturali** come inversioni o traslocazioni, apparentemente bilanciate.



# Il Cariotipo Fetale MOLECOLARE

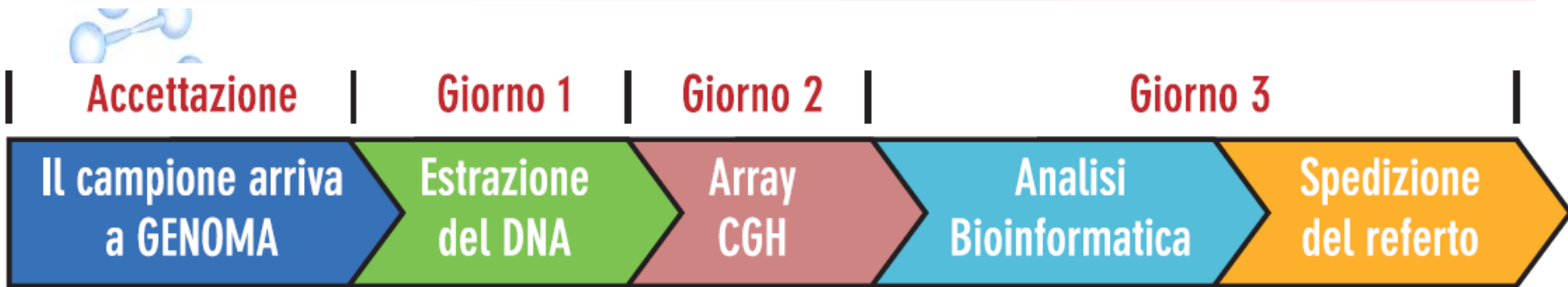


**Il Cariotipo Fetale**  
***Molecolare***

L'ANALISI APPROFONDATA  
DI **TUTTI** I CROMOSOMI E DI **100 PATOLOGIE**  
IN SOLI **3 GIORNI**

# Il Cariotipo Fetale MOLECOLARE

RISULTATI IN SOLI 3 GIORNI



- ✓ Impiegando una tecnica molecolare, che **non necessita di coltura cellulare**, con il Cariotipo Molecolare è possibile ottenere un'analisi cromosomica approfondita in soli **2-3 giorni**, a differenza dei 15-20 giorni necessari con la tecnica tradizionale, riducendo al minimo i tempi di attesa dei risultati.
- ✓ Con indubbi **vantaggi** :
  - ❖ Esclusione di patologie cromosomiche entro pochi giorni dal prelievo



# Il Cariotipo Fetale MOLECOLARE

## ESAME APPROFONDITO DEI CROMOSOMI

Il cariotipo tradizionale è limitato nelle sue possibilità diagnostiche dal potere di risoluzione del microscopio. Il cariotipo molecolare, invece, permette:

- ✓ Una risoluzione **100 volte maggiore** (~100 Kb)
- ✓ L'identificazione di alterazioni cromosomiche **submicroscopiche**
- ✓ Lo screening di oltre **100 patologie** cromosomiche da microdelezione / duplicazione e di oltre **150 geni**
- ✓ La verifica della patogenicità dell'anomalia cromosomica riscontrata mediante una sofisticata **analisi bioinformatica**

È ideale per **approfondimenti diagnostici di 2° livello**, in casi di:

- ✓ **difetti dello sviluppo** (ritardo di crescita) e/o della **struttura fetale** evidenziati tramite ecografia;
- ✓ **feto con anomalie cromosomiche** individuate attraverso l'analisi citogenetica tradizionale quali:
  - riarrangiamenti sbilanciati
  - riarrangiamenti de novo apparentemente bilanciati
  - *Markers* cromosomici



# Il Cariotipo Fetale MOLECOLARE

## ELEVATA ACCURATEZZA

- ✓ Tecnica completamente automatizzata
- ✓ L'interpretazione dei risultati non è soggettiva
- ✓ Non necessita di coltura cellulare
- ✓ Nessun rischio di artefatti "in vitro"

## RISULTATO ASSICURATO

Il Cariotipo Molecolare, non è soggetto al rischio di mancata crescita della coltura cellulare e, di conseguenza, di ripetizione del prelievo, garantisce un risultato in quasi la **totalità** dei casi.



# Il Cariotipo Fetale MOLECOLARE

## LIMITI

---

I **limiti** di tale tecnica in ambito prenatale sono rappresentati dall'impossibilità di identificare:

- ✓ **Riarrangiamenti cromosomici bilanciati** (non patologici);
- ✓ **Mosaicismi** (cioè la presenza cioè di due linee cellulari con differente assetto cromosomico) con una linea cellulare scarsamente rappresentata (inferiore al 10% circa).



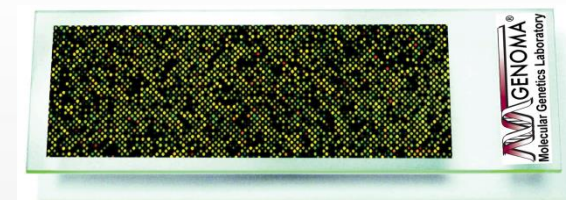
# Il Cariotipo Fetale MOLECOLARE

Da non confondere con la QF-PCR

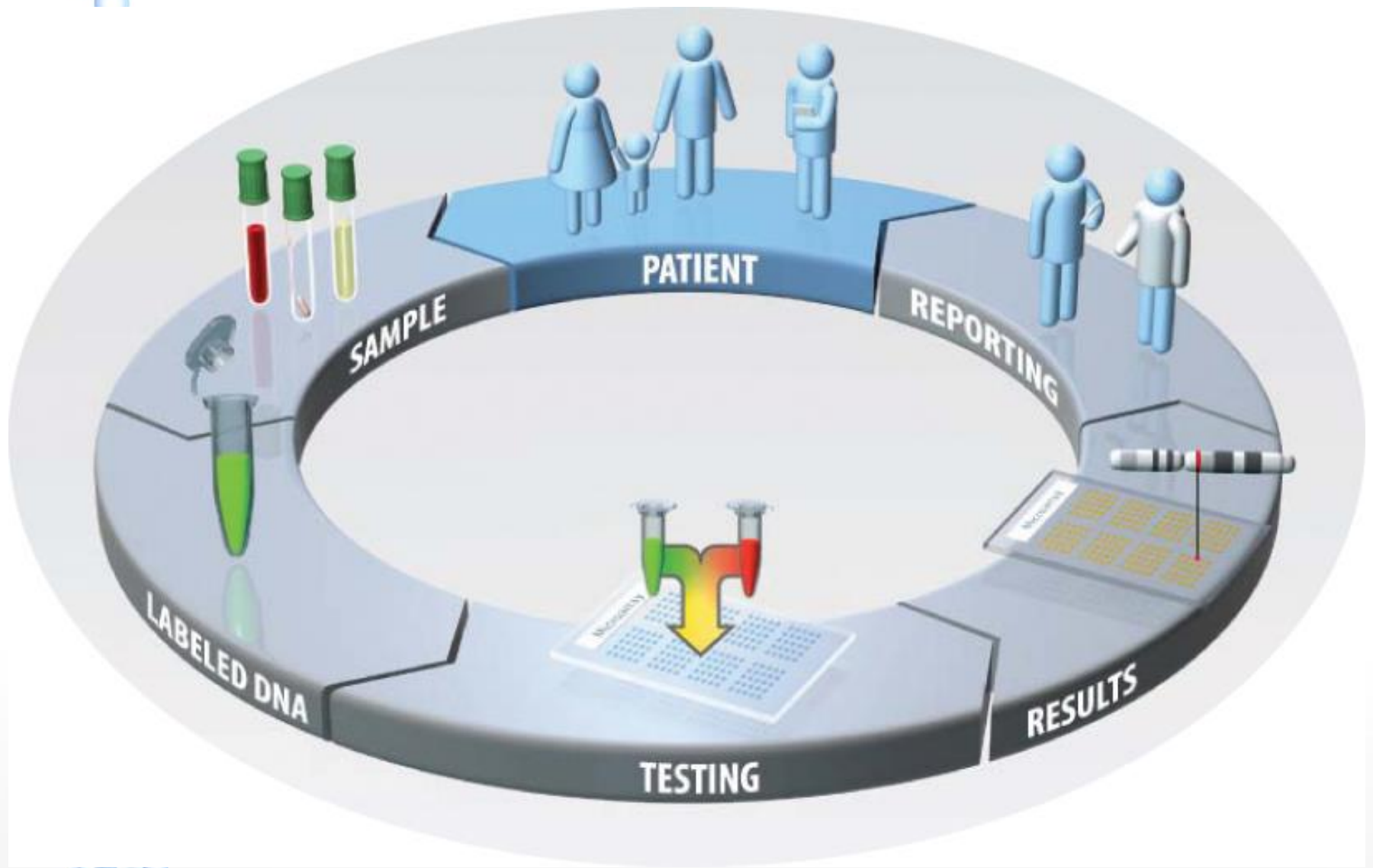
- ✓ **Quantitative Fluorescent - Polimerase Chain Reaction o QF-PCR** : è una tecnica molecolare che permette di ottenere una risposta rapida (24/48 ore) preliminare sulle aneuploidie cromosomiche più comuni (es. Trisomia 21, 18, 13, Monosomia X, Klinefelter - XXY).
- ✓ Tale tecnica veniva offerta dal ns. Centro come **esame preliminare** rapido, assieme al cariotipo tradizionale.
- ✓ I risultati della QF-PCR sono **parziali** (limitati ai soli cromosomi 13, 18, 21, X , Y).
- ✓ La QF-PCR non permette di evidenziare alterazioni cromosomiche **submicroscopiche**, ma si limita a determinare il numero di alcuni cromosomi.
- ✓ La QF-PCR necessita di una **conferma** dal cariotipo.



# Cariotipo MOLECOLARE: **la procedura**



# Cariotipo MOLECOLARE: **la procedura**

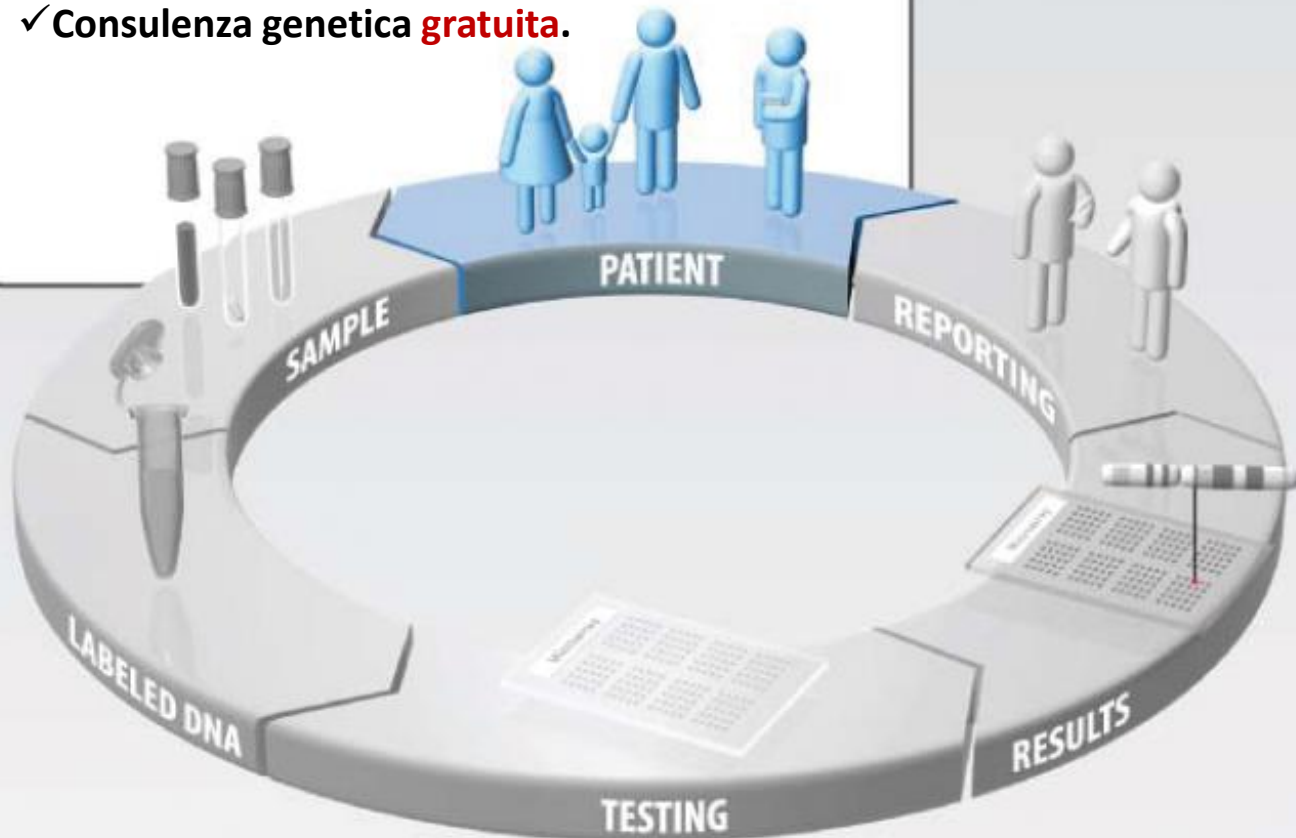




# Cariotipo MOLECOLARE: **la procedura**

## Discussione con i pazienti:

- ✓ Benefici ed i limiti della tecnica;
- ✓ Consenso Informato;
- ✓ Brochures;
- ✓ Consulenza genetica **gratuita**.

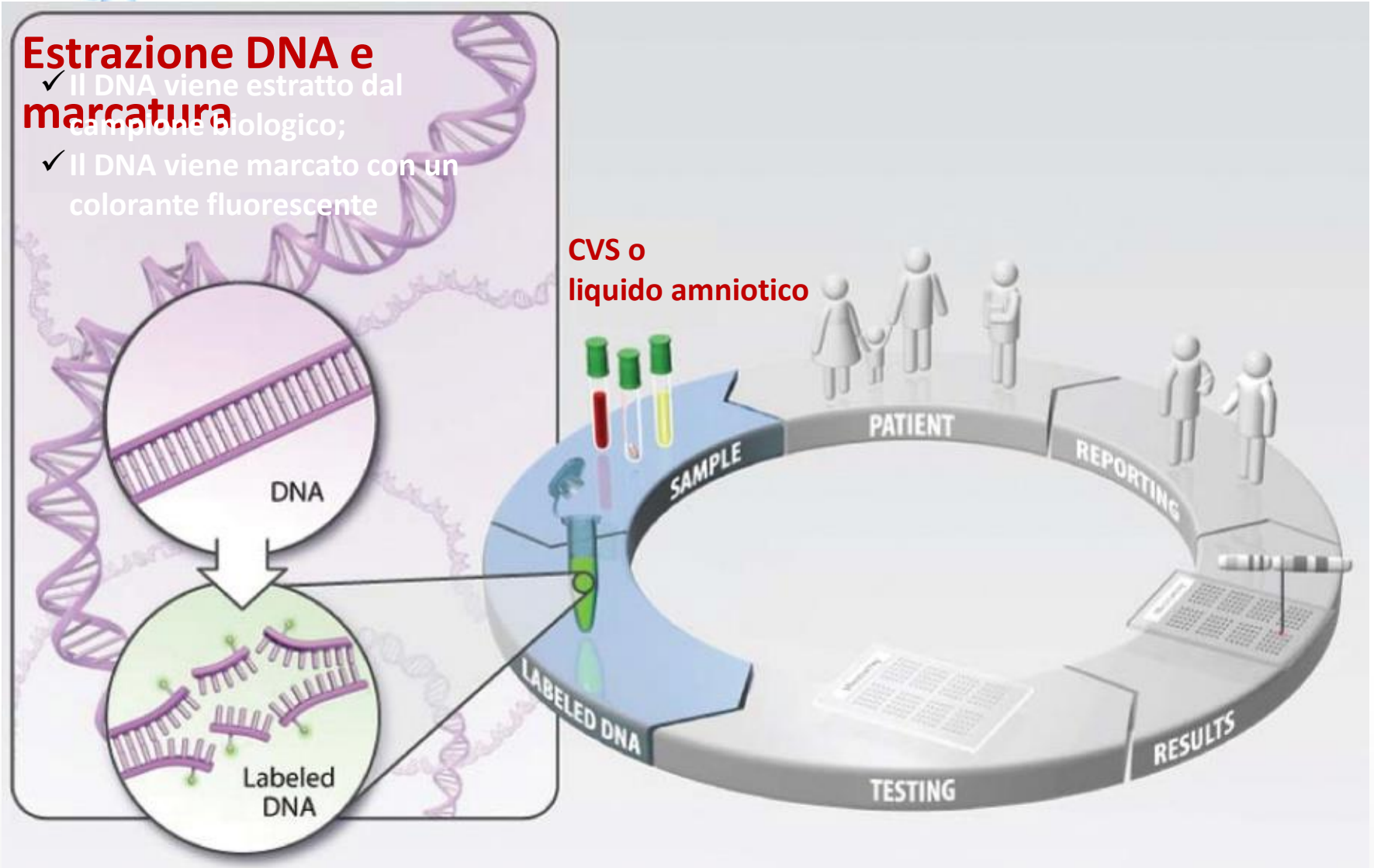


# Cariotipo MOLECOLARE: **la procedura**

## **Estrazione DNA e marcatura**

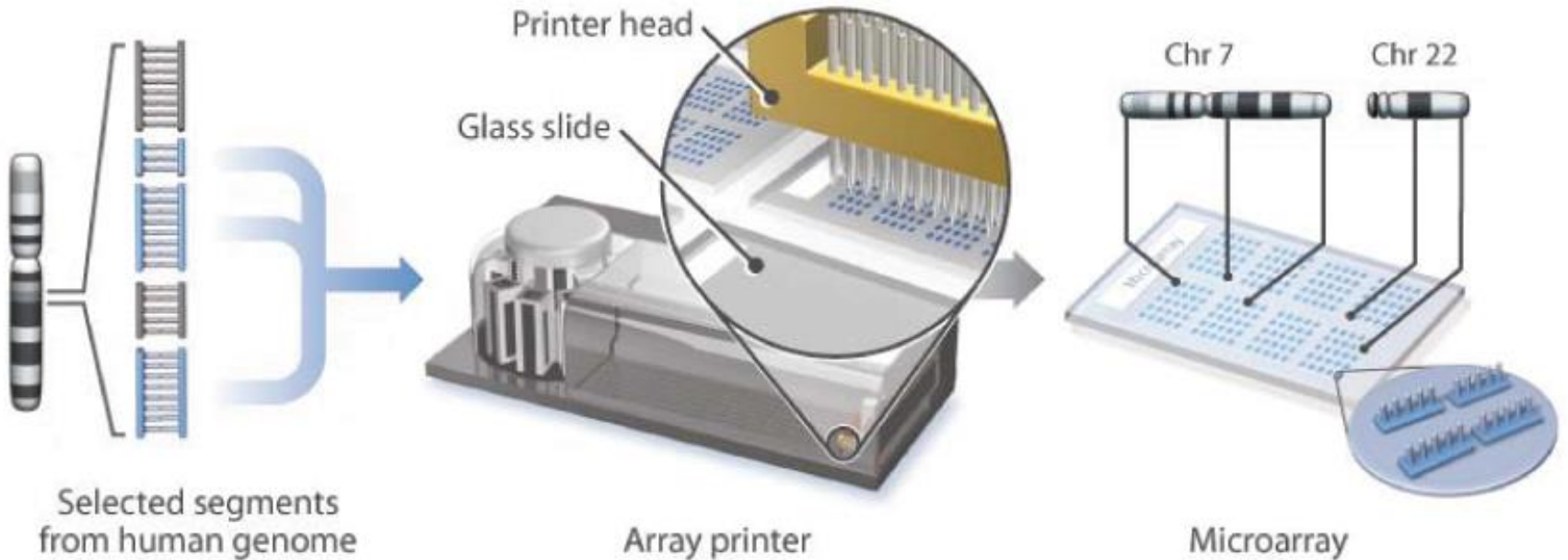
- ✓ Il DNA viene estratto dal campione biologico;
- ✓ Il DNA viene marcato con un colorante fluorescente

**CVS o liquido amniotico**



# Cariotipo MOLECOLARE: **la procedura**

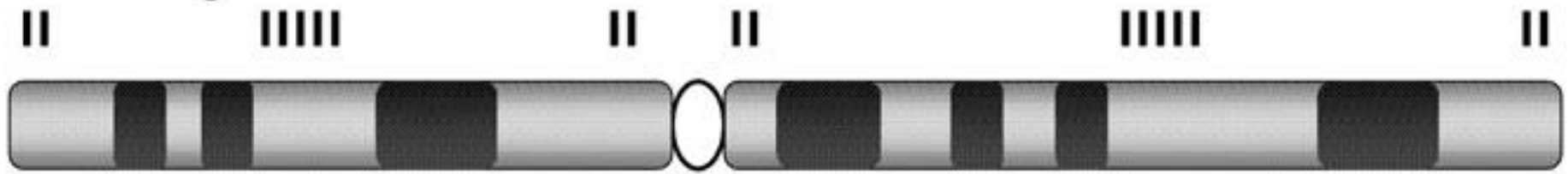
## Cos'è un Microarray?



# Cariotipo Molecolare: differenti tipi di piattaforme array



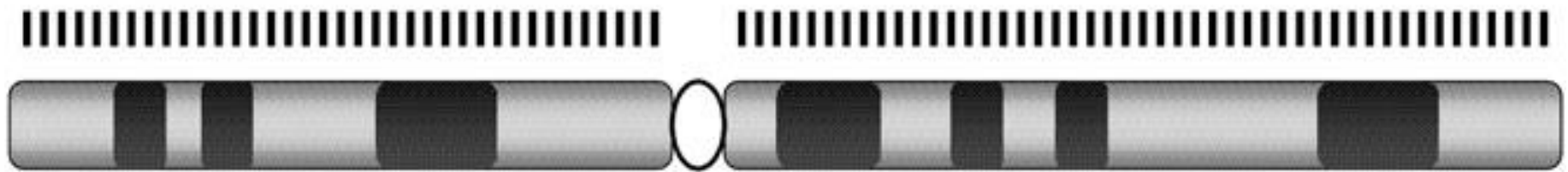
*Targeted* es. **GoldChip; BOBs**



Con i **targeted arrays** si analizzano solo regioni note, associate a patologie ben definite, e non l'intero genoma.

**Tale test è a bassa risoluzione e non può sostituire il cariotipo classico**

*Whole Genome*

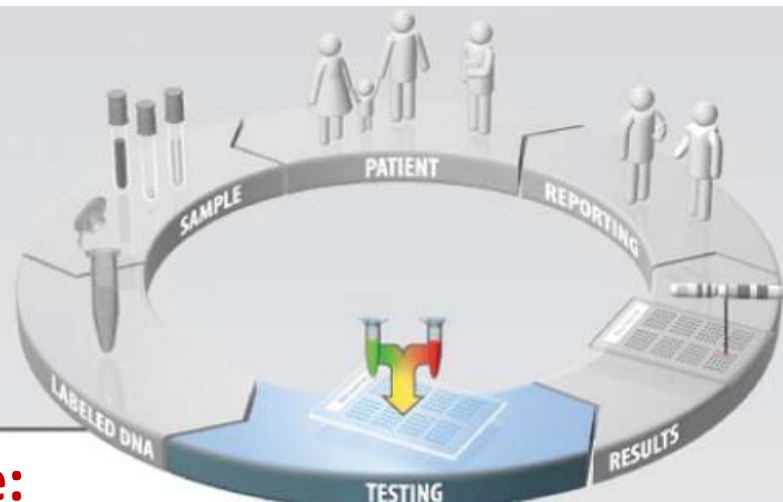


Con i **whole-genome arrays** si analizza l'intero genoma, ad una risoluzione media di circa 100 Kb – 1 Mb

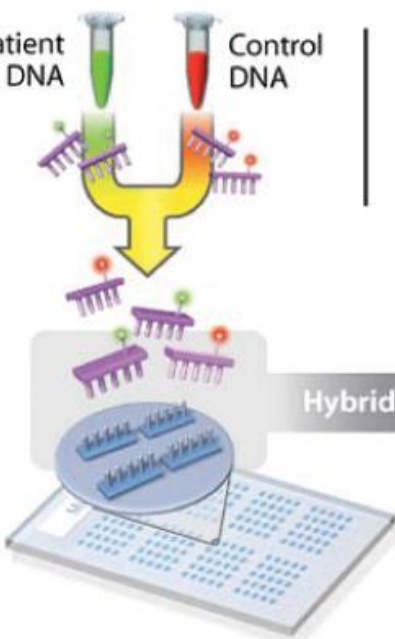
**Tale test può sostituire il cariotipo classico**



# Cariotipo MOLECOLARE: **la procedura**

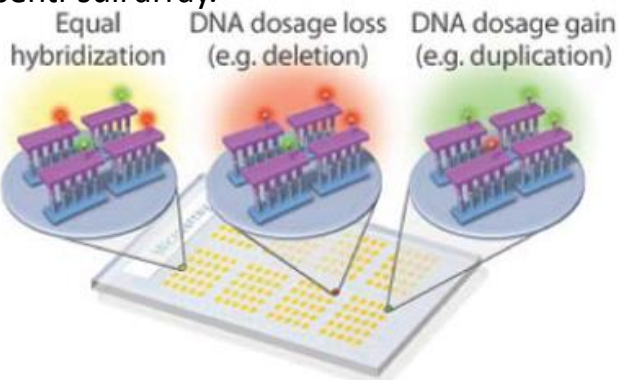


Patient DNA      Control DNA

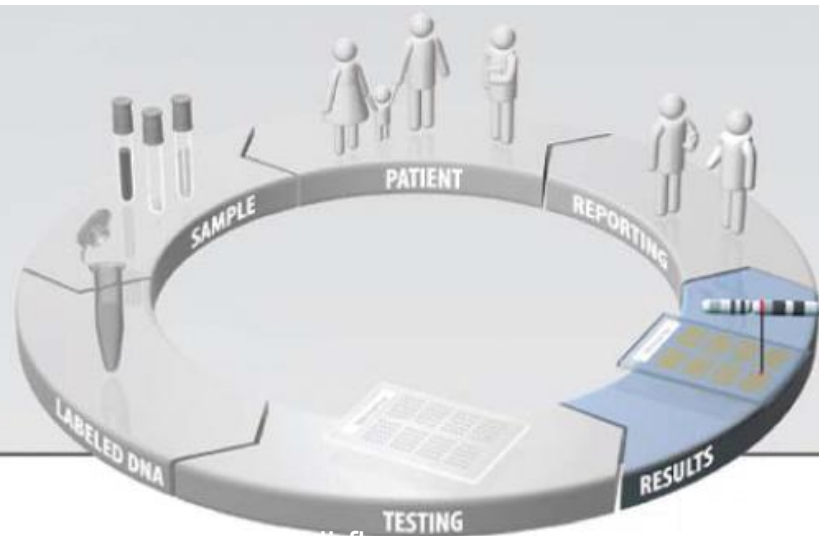


## Ibridazione:

Dopo la marcatura, il **DNA test** ed il **reference DNA** vengono mescolati in parti uguali e fatti incubare (**Ibridazione**) su un microarray. Al termine, sia il DNA test che quello di controllo si legheranno ai cloni presenti sull'array.



# Cariotipo MOLECOLARE: **la procedura**

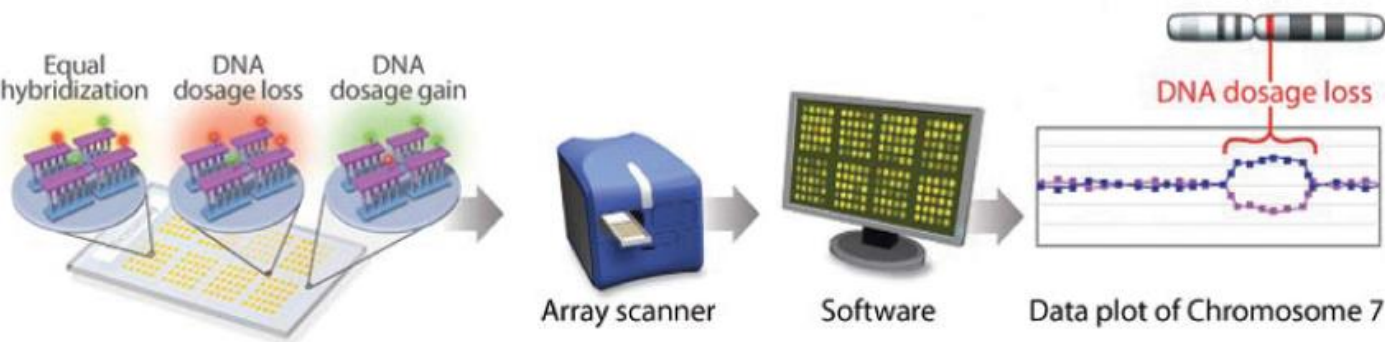


## Risultati:

✓

✓

Equal hybridization    DNA dosage loss    DNA dosage gain

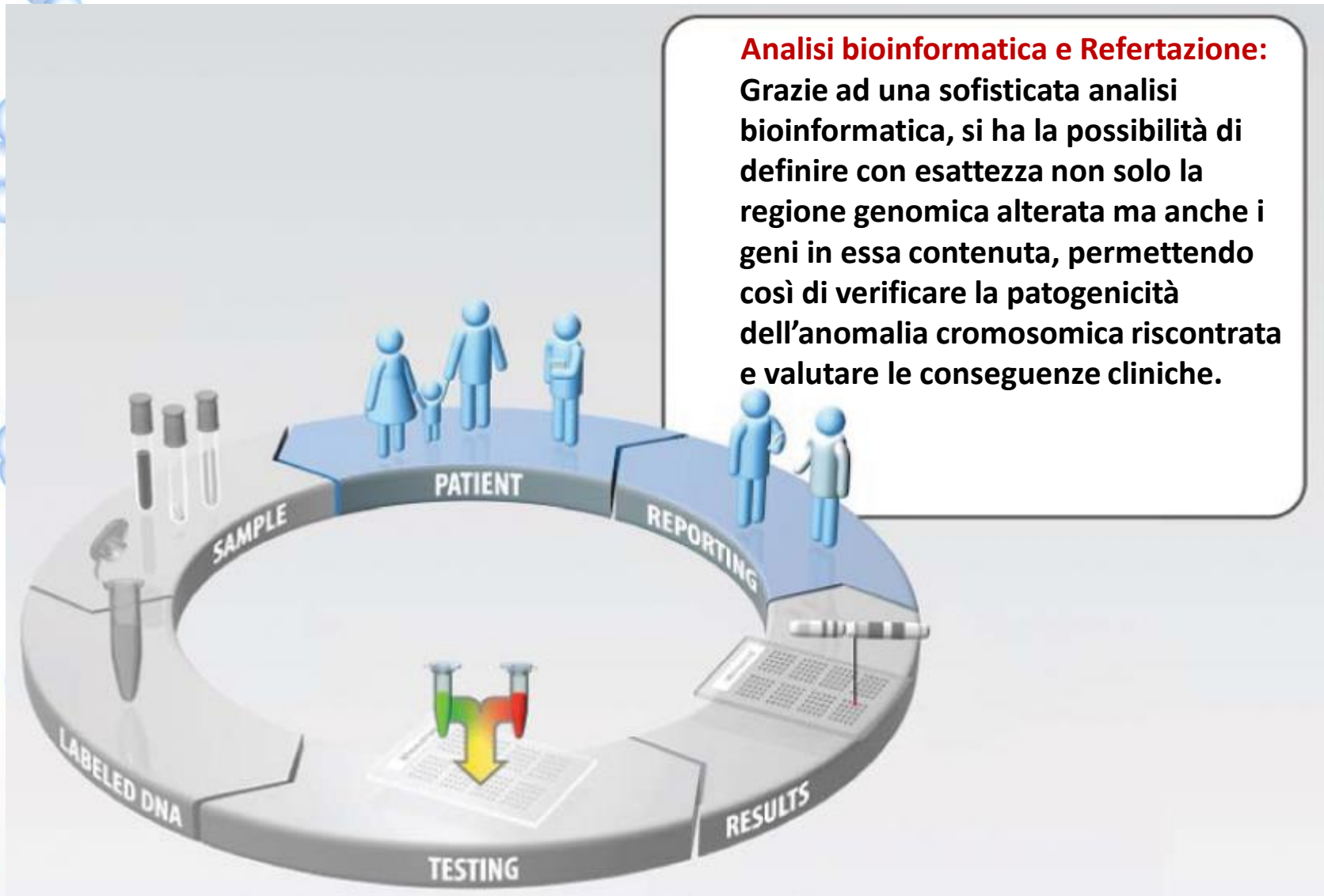


**GIALLO:** L'eguale ibridizzazione tra DNA Test and DNA di Controllo produce un segnale fluorescente giallo. (risultato **Normale**)

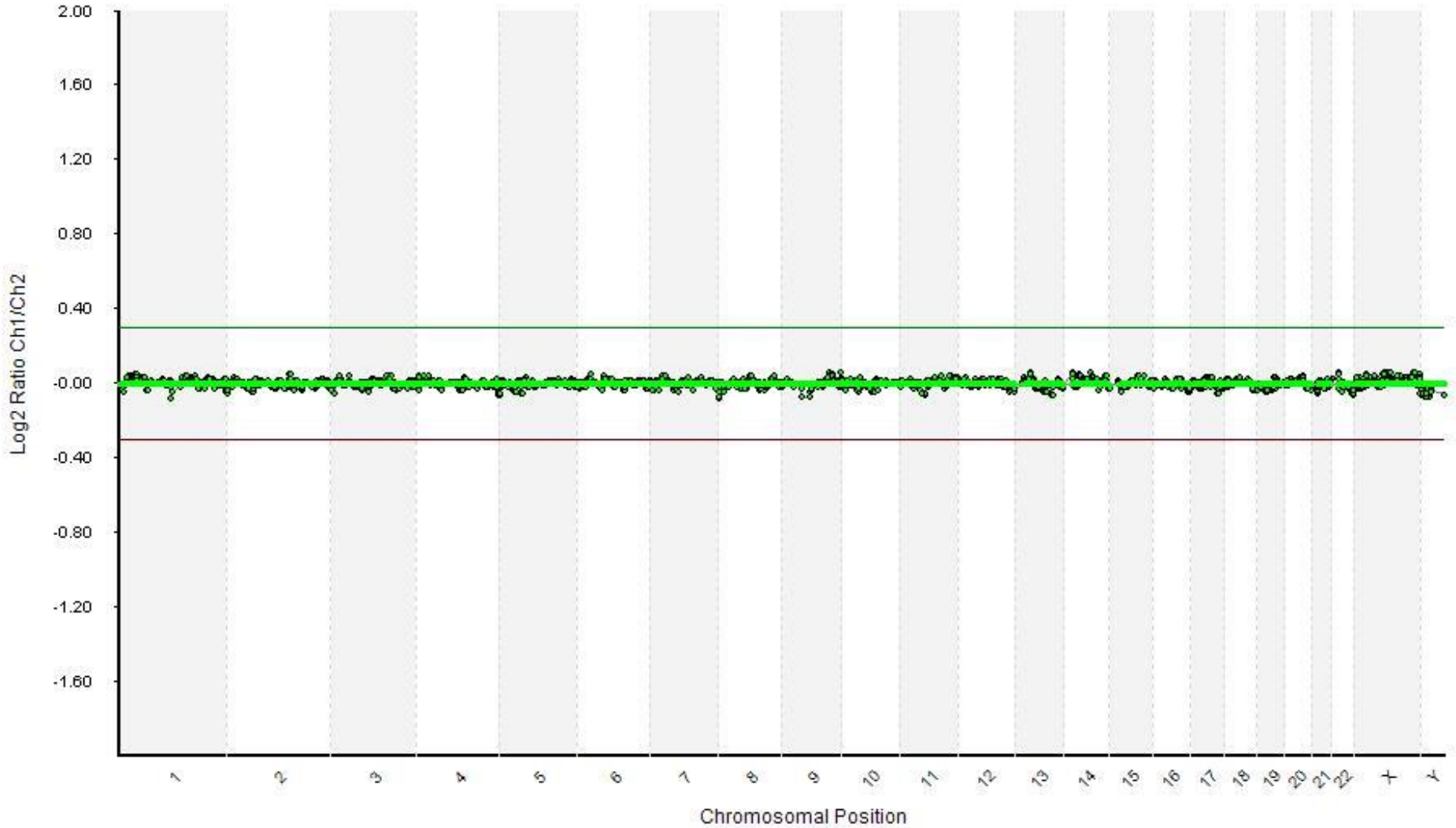
**ROSSO:** La presenza di una quantità inferiore di DNA Test produce un segnale fluorescente rosso (**DELEZIONE**)

**VERDE:** La presenza di una quantità superiore di DNA Test produce un segnale fluorescente verde (**DUPLICAZIONE**)

# Cariotipo MOLECOLARE: **la procedura**

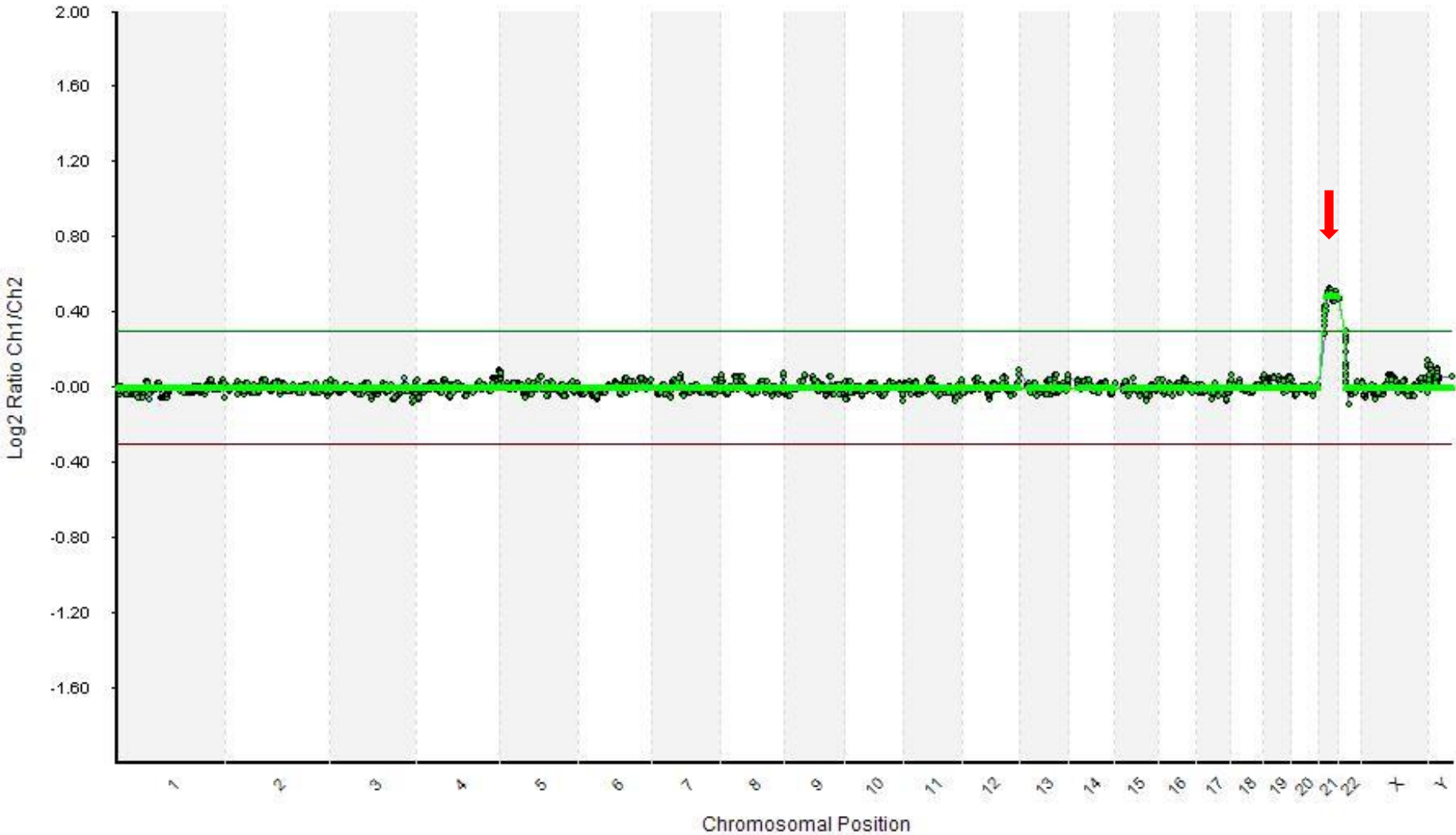


# DNA (Amniotic fluid) from a normal fetus

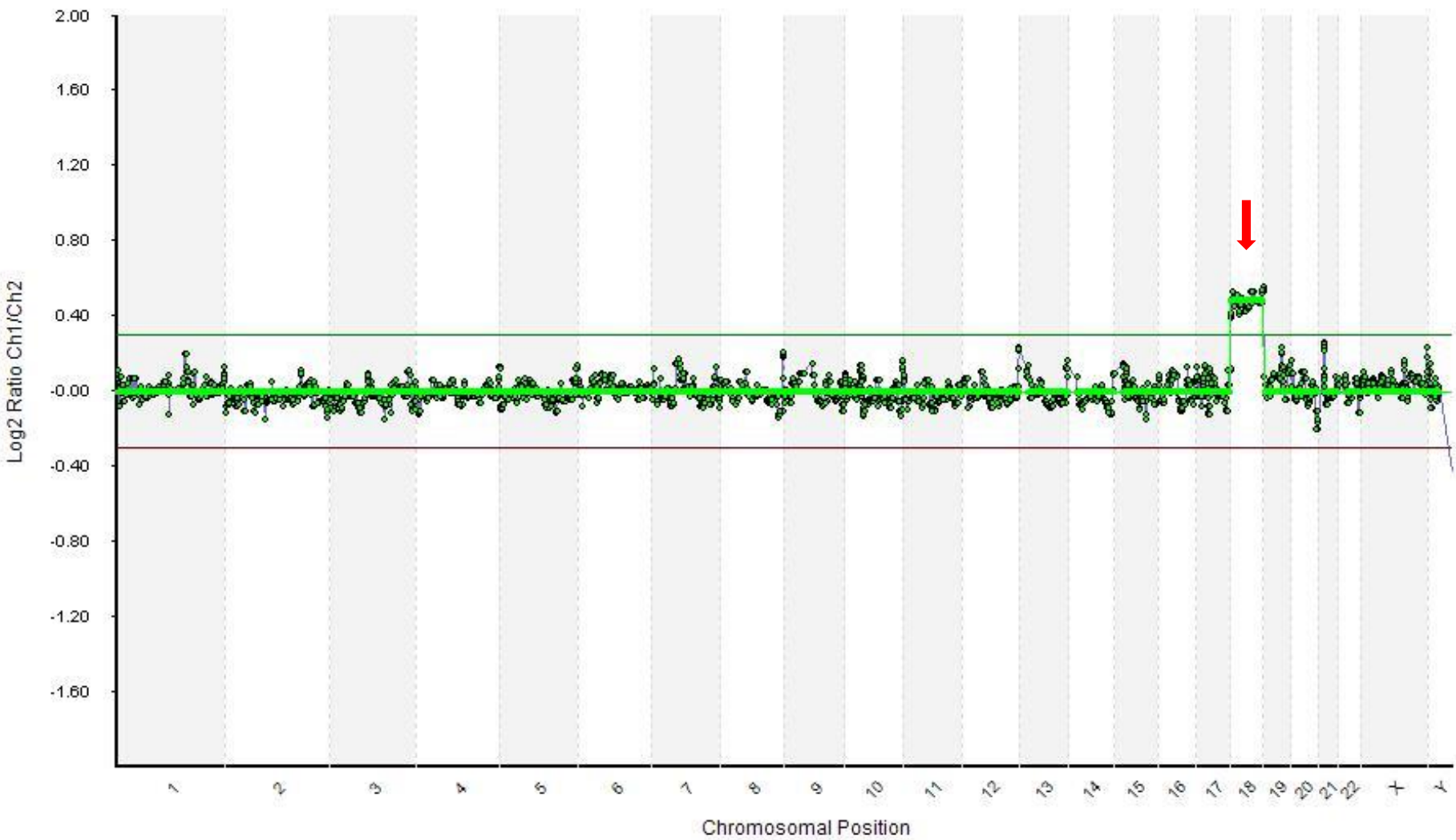




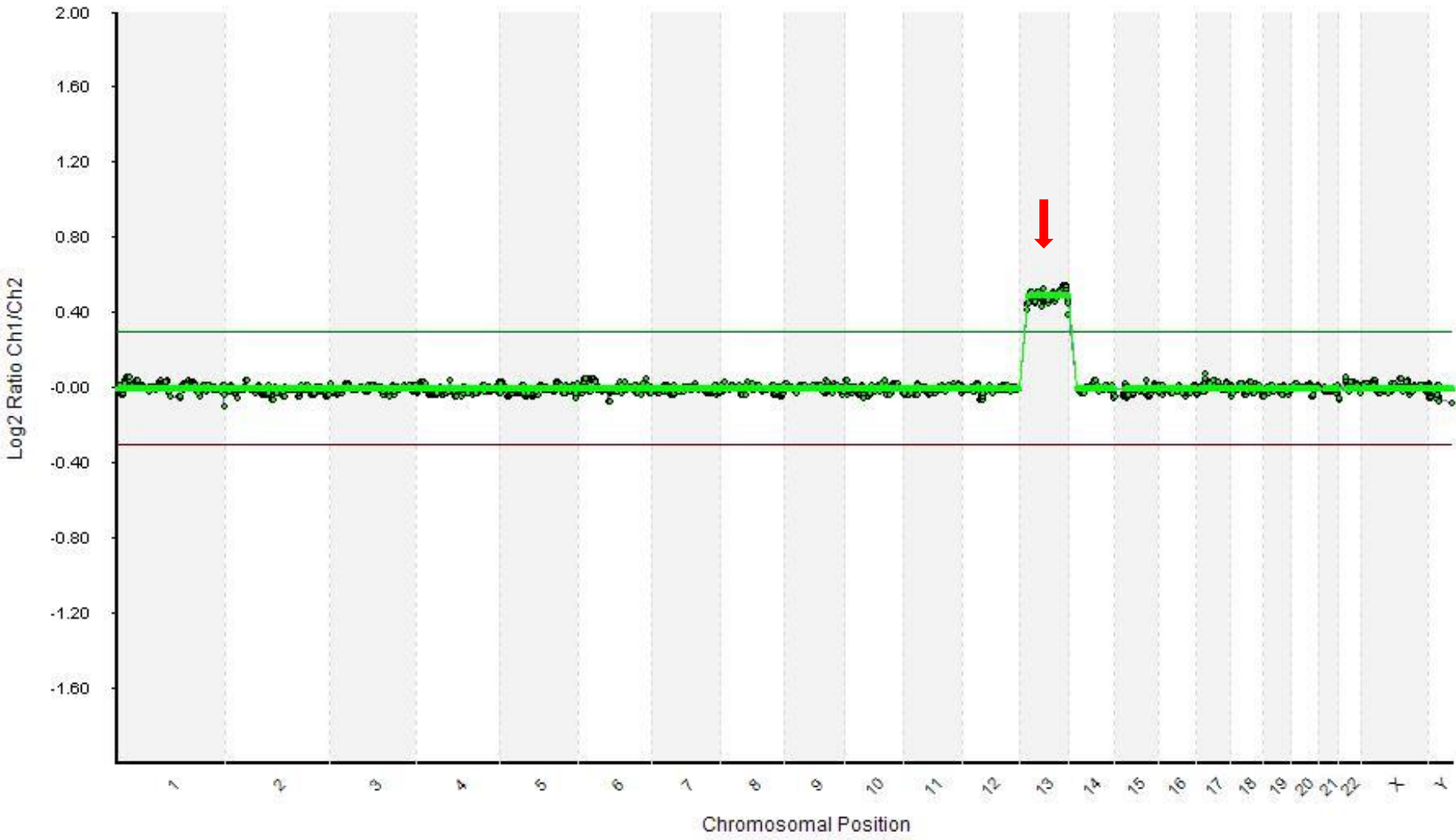
# DNA (Amniotic fluid) from a fetus with trisomy 21



# DNA (Amniotic fluid) from a fetus with trisomy 18



# DNA (CVS) from a fetus with trisomy 13



ARTICLE

# Chromosomal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with *a priori* low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities

Francesco Fiorentino<sup>\*1</sup>, Stefania Napoletano<sup>1</sup>, Fiorina Caiazzo<sup>1</sup>, Mariateresa Sessa<sup>1</sup>, Sara Bono<sup>1</sup>, Letizia Spizzichino<sup>1</sup>, Anthony Gordon<sup>2</sup>, Andrea Nuccitelli<sup>1</sup>, Giuseppe Rizzo<sup>1</sup> and Marina Baldi<sup>1</sup>


In this study, we aimed to explore the utility of chromosomal microarray analysis (CMA) in groups of pregnancies with *a priori* low risk for detection of submicroscopic chromosome abnormalities, usually not considered an indication for testing, in order to assess whether CMA improves the detection rate of prenatal chromosomal aberrations. A total of 3000 prenatal samples were processed in parallel using both whole-genome CMA and conventional karyotyping. The indications for prenatal testing included: advanced maternal age, maternal serum screening test abnormality, abnormal ultrasound findings, known abnormal fetal karyotype, parental anxiety, family history of a genetic condition and cell culture failure. The use of CMA resulted in an increased detection rate regardless of the indication for analysis. This was evident in high risk groups (abnormal ultrasound findings and abnormal fetal karyotype), in which the percentage of detection was 5.8% (7/120), and also in low risk groups, such as advanced maternal age (6/1118, 0.5%), and parental anxiety (11/1674, 0.7%). A total of 24 (0.8%) fetal conditions would have remained undiagnosed if only a standard karyotype had been performed. Importantly, 17 (0.6%) of such findings would have otherwise been overlooked if CMA was offered only to high risk pregnancies. The results of this study suggest that more widespread CMA testing of fetuses would result in a higher detection of clinically relevant chromosome abnormalities, even in low risk pregnancies. Our findings provide substantial evidence for the introduction of CMA as a first-line diagnostic test for all pregnant women undergoing invasive prenatal testing, regardless of risk factors.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 5 December 2012; doi:10.1038/ejhg.2012.253

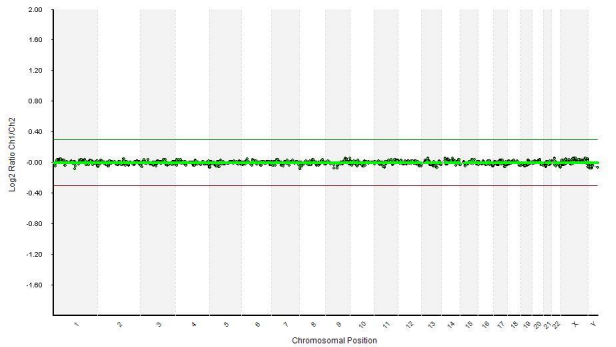
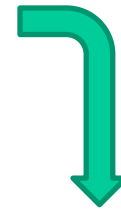
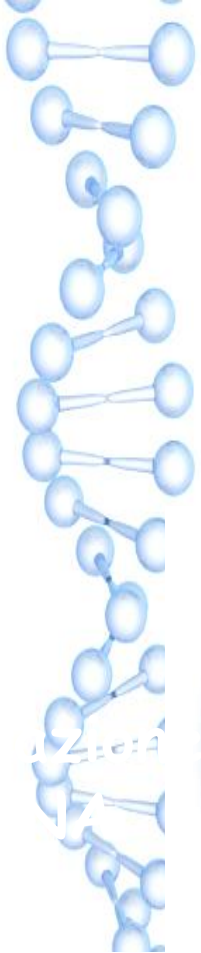
<sup>1</sup>GENOMA- Molecular Genetics Laboratory, Rome, Italy; <sup>2</sup>Bluegenome Ltd, Cambridge, UK

\*Correspondence: Dr F Fiorentino, GENOMA- Molecular Genetics Laboratory, Via Po 102, Rome 00198, Italy. Tel: +39068811270; Fax: +390664492052; E-mail: fiorentino@laboratorigenoma.it

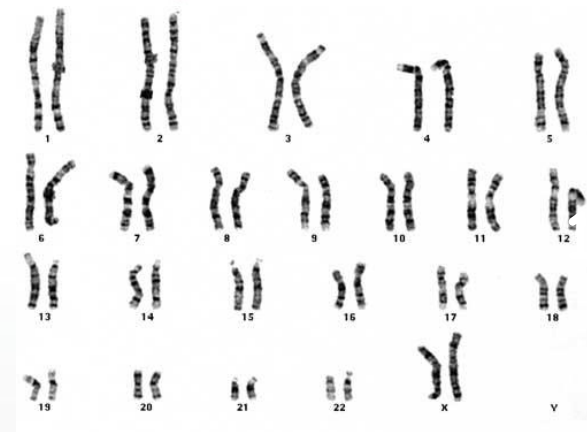
# Aim of the study

- 
- ⑧ To perform a **prospective blind study**, comparing the results obtained using a BAC-based CMA platform with those obtained from a standard G-banding karyotype.
  - ⑧ We aimed to assess the **feasibility** of offering CMA in prenatal diagnosis on routine basis.
  - ⑧ Questions to address:
    - 1) CMA **accuracy** in detection of common and submicroscopic chromosome abnormalities in prenatal samples;
    - 2) if the technique **improves** the detection rate of genetic aberrations or, on the contrary, whether CMA **misses** potential pathogenic chromosomal abnormalities, compared with conventional karyotyping;
    - 3) if there is an increase in **results of unclear clinical relevance**;
    - 4) whether CMA should be applied to all prenatal samples as **first-line test** or its use should be **limited to specific indications** (e.g., in cases of abnormal ultrasound findings but normal karyotype).

# Studio prospettico cariotipo molecolare (Array-CGH)



Confronto Risultati



Cariotipo Classico

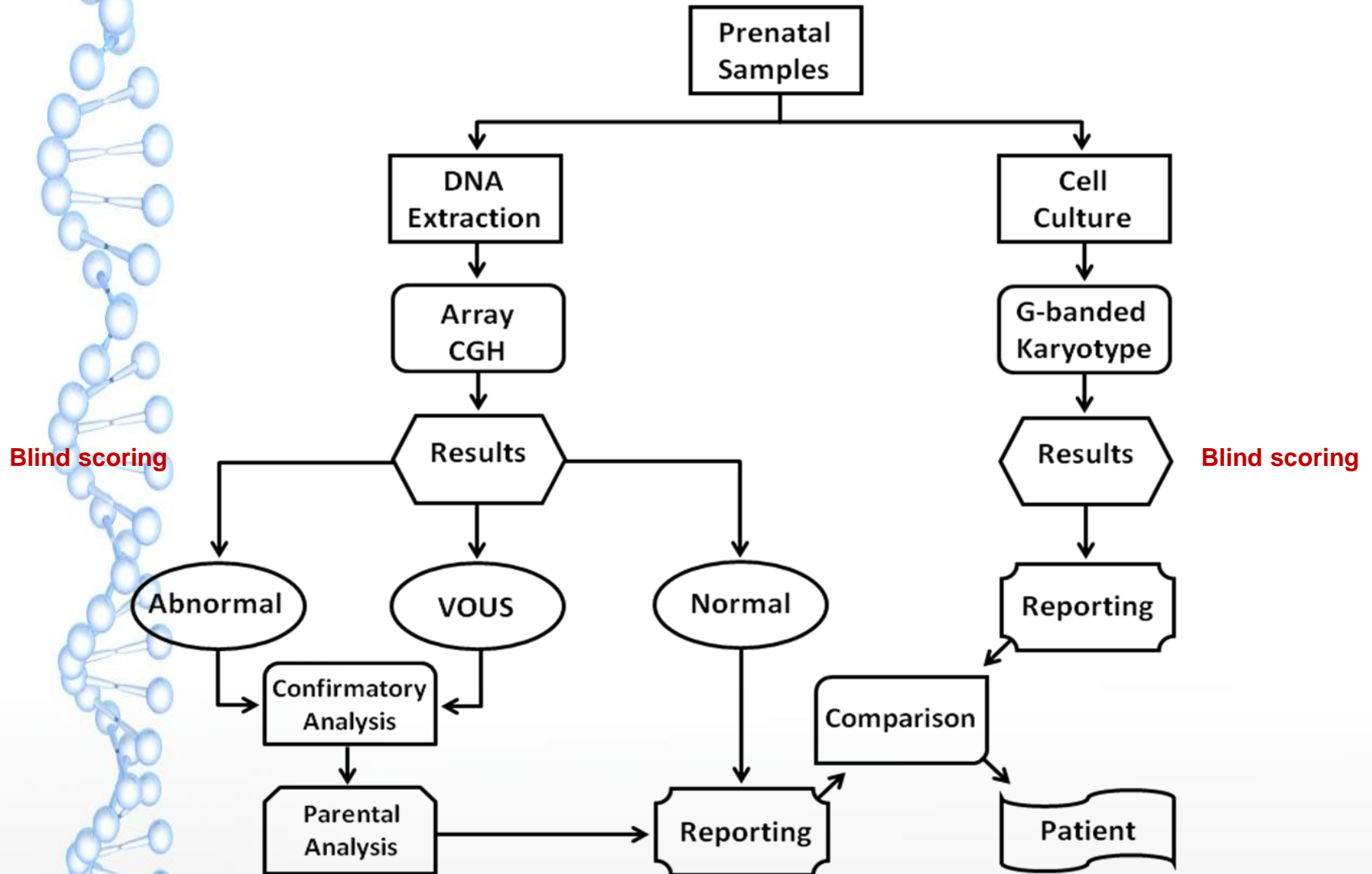
Cariotipo Molecolare



# Patients recruitment and inclusion criteria

- ✎ CMA was offered as an option to couples undergoing invasive prenatal diagnosis, in addition to conventional karyotype.
- ✎ Participation to the study was on **voluntary** basis;
- ✎ CMA cost was not charged;
- ✎ Pre- and post test **genetic counselling**;
- ✎ Informed consent;
- ✎ Patients were asked if they were wishing to be informed on results of unclear clinical significance;
- ✎ Prenatal samples were sent to a GENOMA's lab between **October 2010 and March 2012** from **167** healthcare providers.

# Workflow of prenatal samples in the prospective study



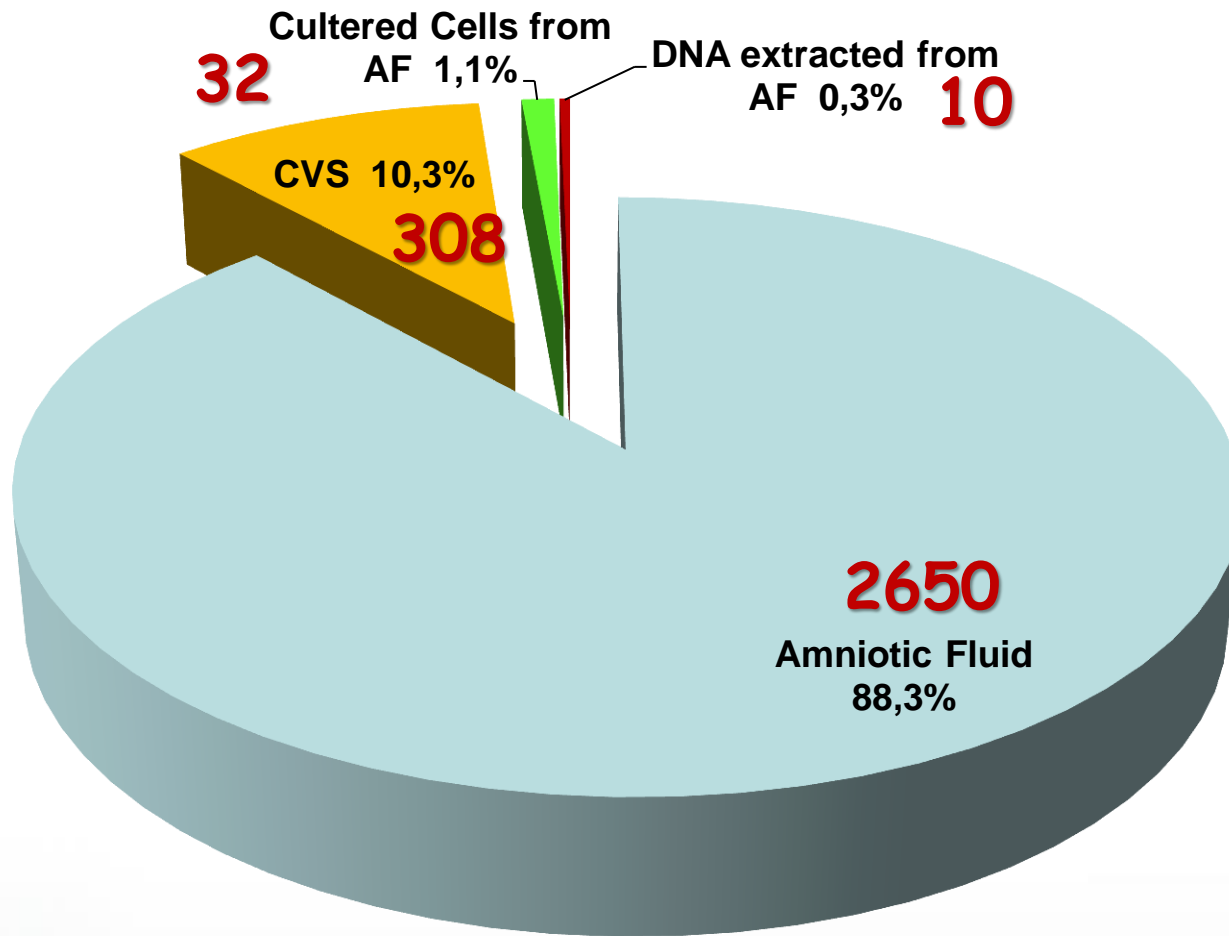


# Materials and Methods

- ❧ DNA was extracted from **5 ml** of AF and **2 mg** of CVS using the **QIAamp DNA Blood Mini Kit** (Qiagen)
- ❧ **Gender** determination of the fetus by a PCR protocol involving amplification of the ***Amelogenin*** gene and X, Y STR markers.
- ❧ Testing for **maternal cell contamination (MCC)** using a PCR-based protocol including the short tandem repeat (STR) markers for chromosomes 13, 18 and 21.
- ❧ **CMA** using whole-genome BAC arrays **CytoChip Focus Constitutional (~1 Mb resolution)** (BlueGnome, Cambridge, UK).
- ❧ If CNVs were clinically significant, **confirmatory studies** were also performed:

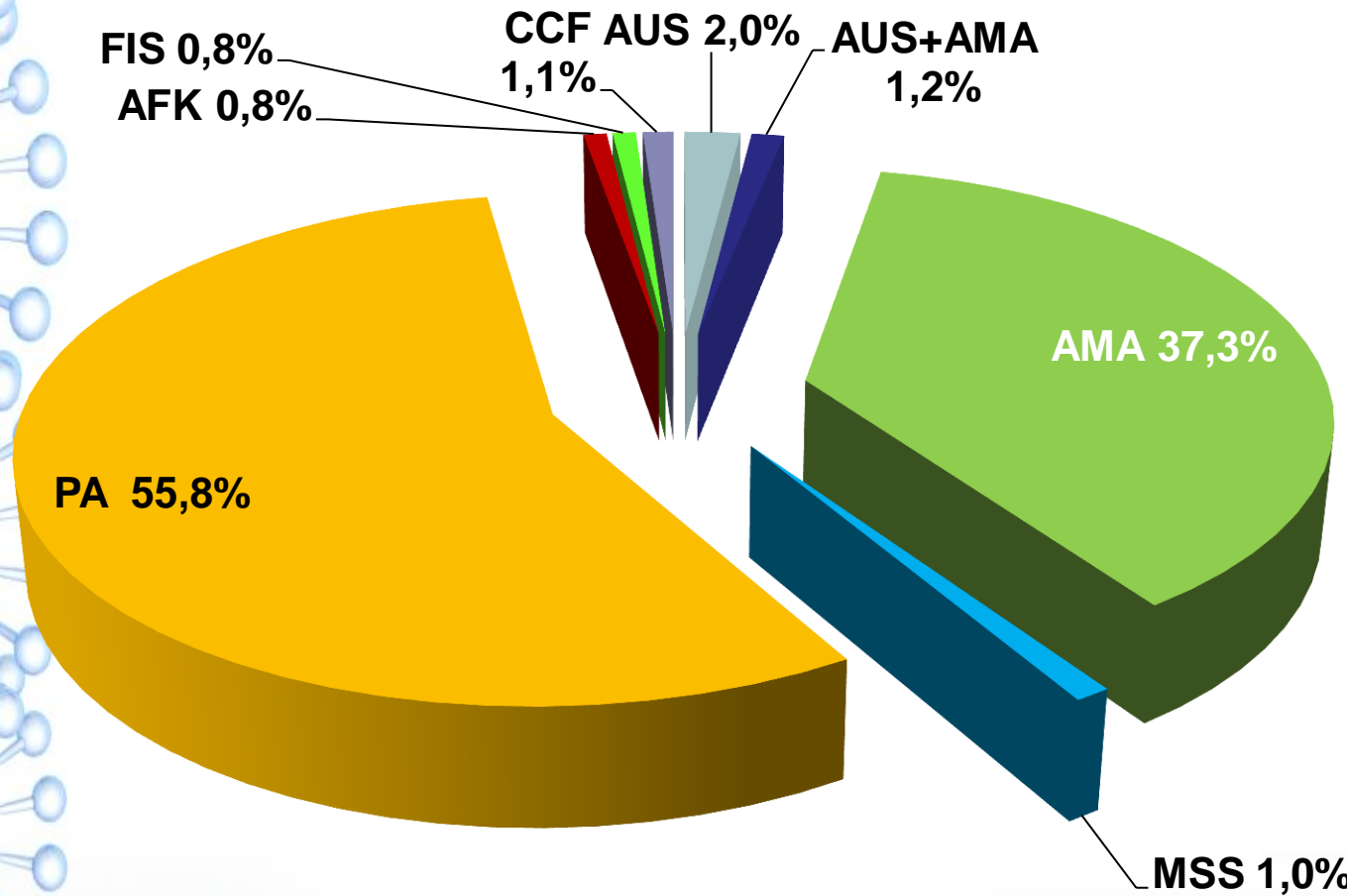
❧ “dye swap” confirmation

# Prenatal samples analysed



**3000** prenatal samples (referred from October 2010 to March 2012)

# Indication for prenatal diagnosis



**AMA:** advanced maternal age  
**PA:** parental anxiety  
**AUS:** abnormal ultrasound findings  
**AFK:** a known abnormal fetal karyotype

**MSS:** Abnormal maternal serum screening test  
**FIS:** Family history of a genetic condition or chr. abn.  
**CCF:** Cell culture failure



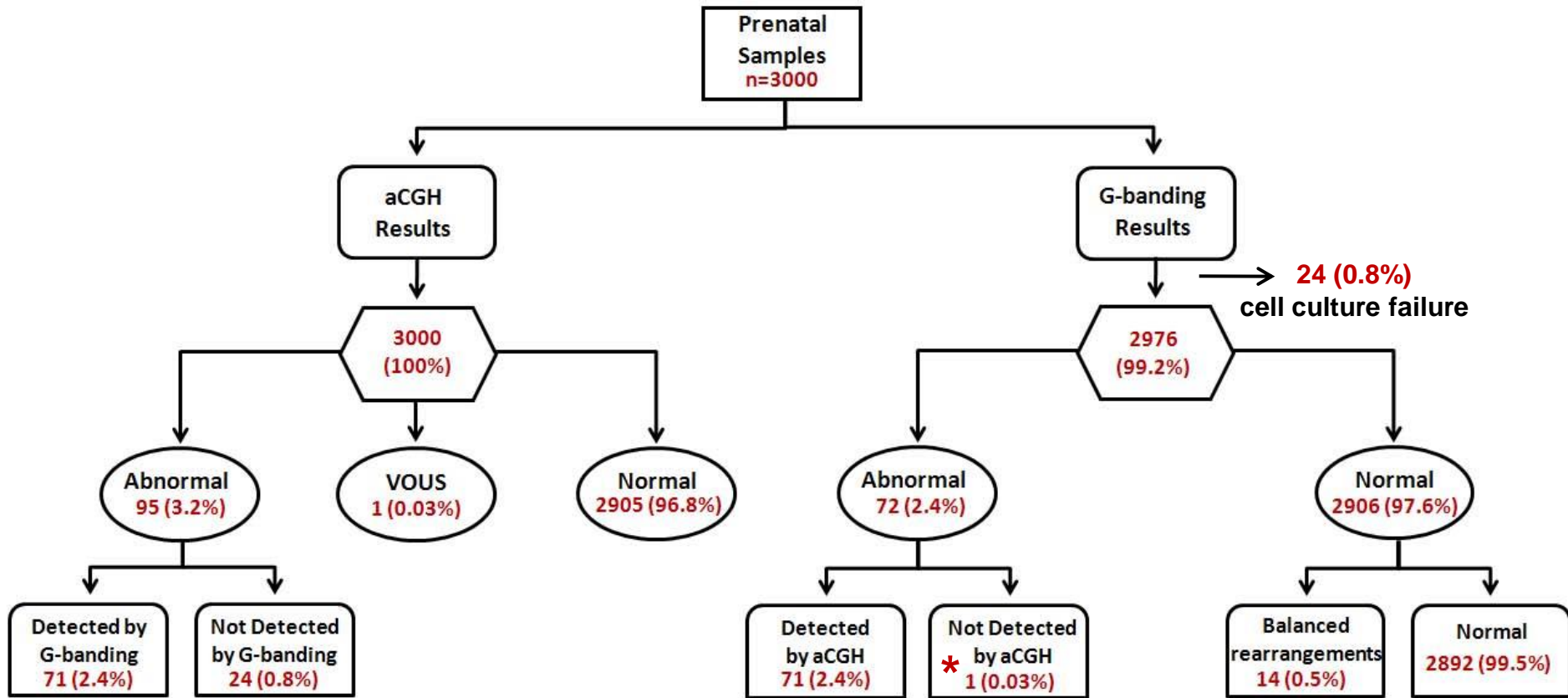
# CMA results turnaround time

**2.5 working days**

Chromosome abnormality type	Average turnaround time* (SD)	Min	Max
Normal	2.4 ( $\pm 0.5$ )	2	3
Abnormal results with microscopic aberrations	2.2 ( $\pm 0.4$ )	2	3
Abnormal results with submicroscopic aberrations	6.3 ( $\pm 1.0$ )	5	7
<b>Total</b>	<b>2.5 (<math>\pm 0.6</math>)</b>	<b>2</b>	<b>7</b>

\* Working days

# Results

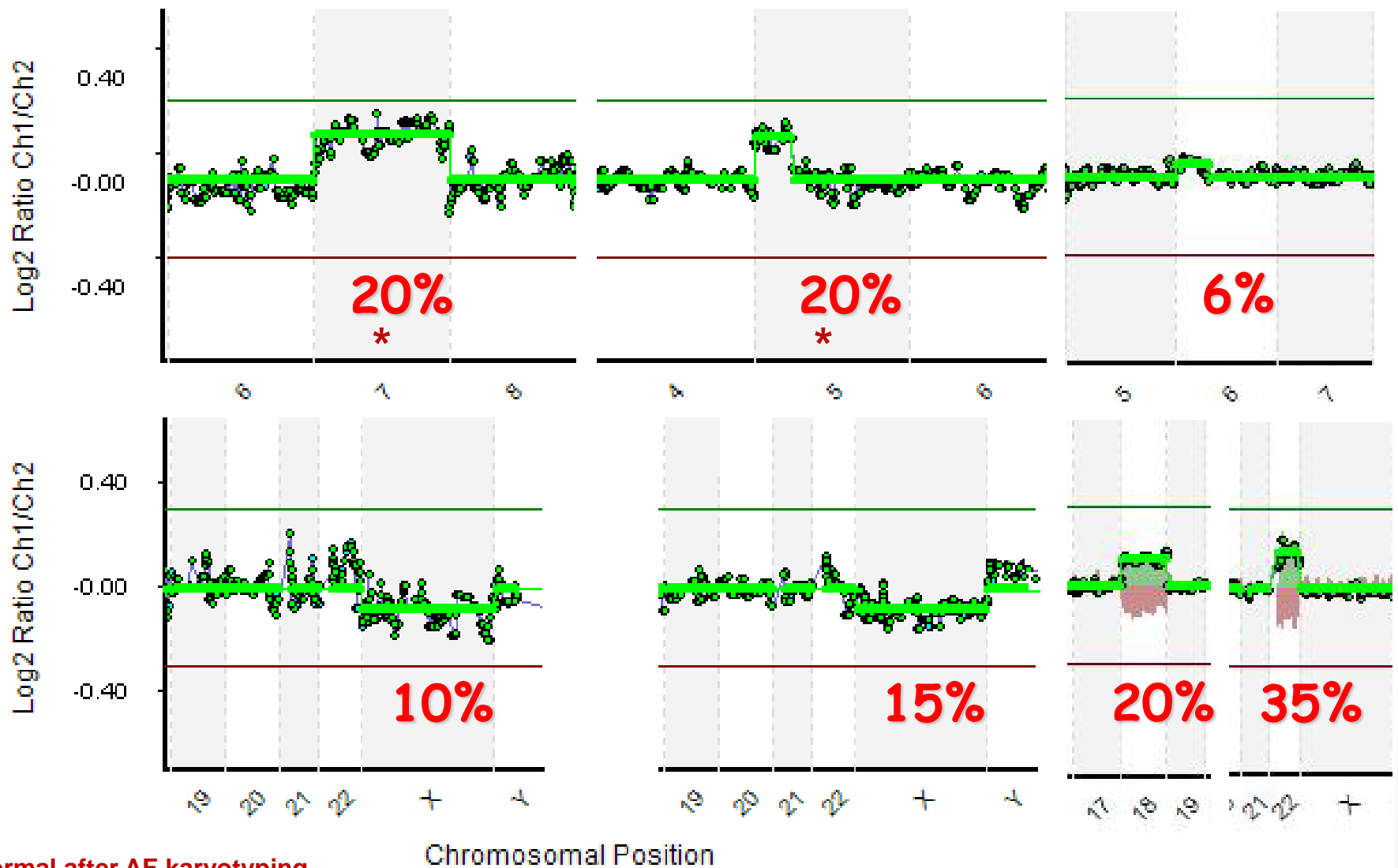


\* *In vitro* artefact

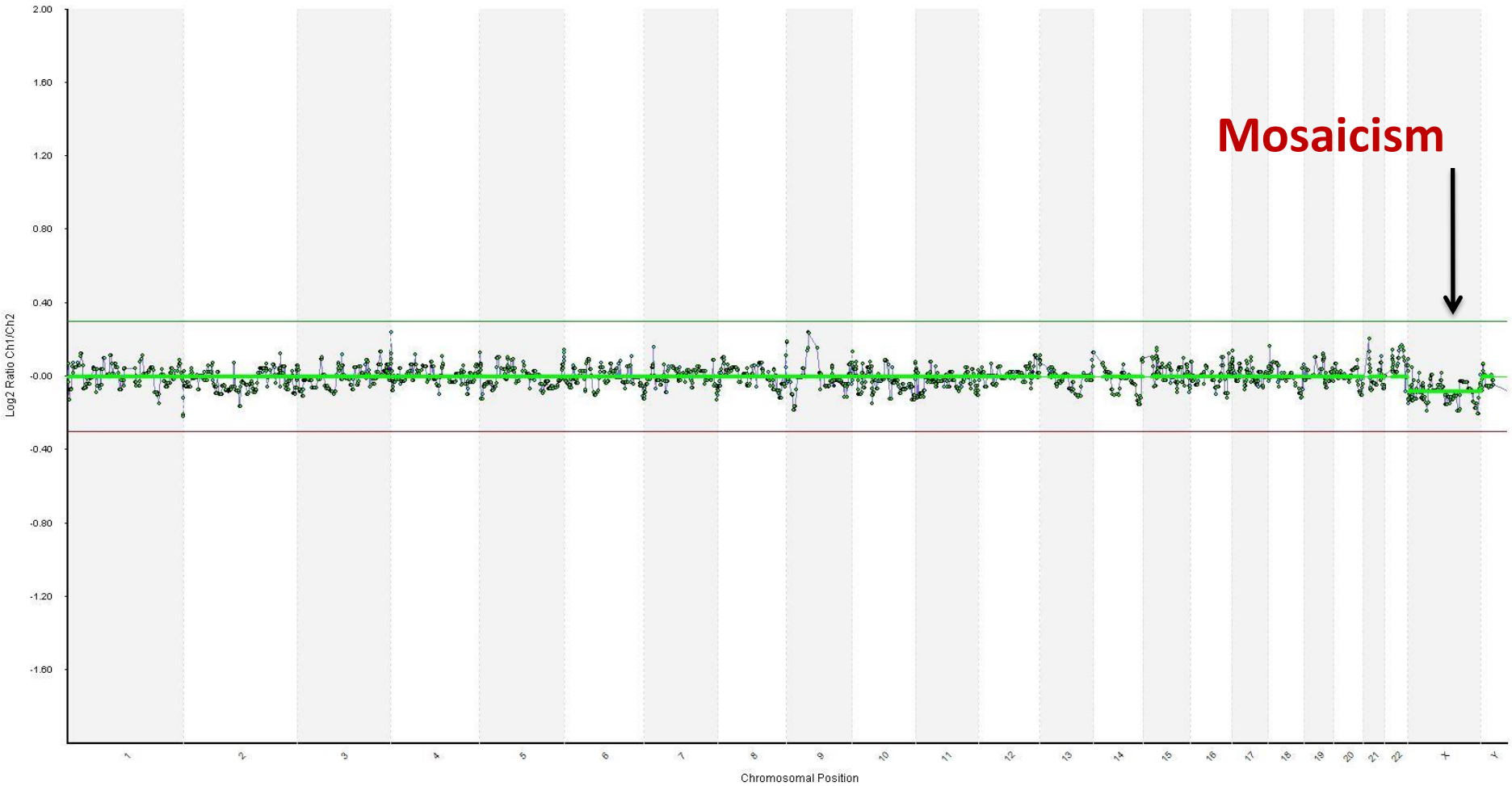
# Results comparison between G-banding and array-CGH

Chromosomal abnormality	G-banding	CMA
<b>Autosomal aneuploidy</b>	<b>54 (1.8%)</b>	<b>54 (1.8%)</b>
✓ Trisomy 21	35	35
✓ Trisomy 18	9	9
✓ Trisomy 13	3	3
✓ Other (mosaic)	7	7
<b>Sex Chromosome aneuploidy</b>	<b>9 (0.3%)</b>	<b>9 (0.3%)</b>
✓ 45,X	2	2
✓ 47,XXY	1	1
✓ 47,XXX	2	2
✓ 47,XYY	2	2
✓ Other (mosaic)	2	2
<b>Microscopic segmental deletions or duplications</b>	<b>8 (0.3%)</b>	<b>8 (0.3%)</b>
✓ mosaic	2	2
<b>Microdeletion / microduplication</b>	<b>24 (0.8%)</b>	<b>ND</b>
Known syndromes	18	ND
Pathogenic CNVs	6	ND
<b>Total</b>	<b>95 (3.2%)</b>	<b>71 (2.4%)</b>
<b>Mosaicism findings</b>	<b>11 (0.4%)</b>	<b>11 (0.4%)</b>

# Examples of chromosomal mosaicism in prenatal samples

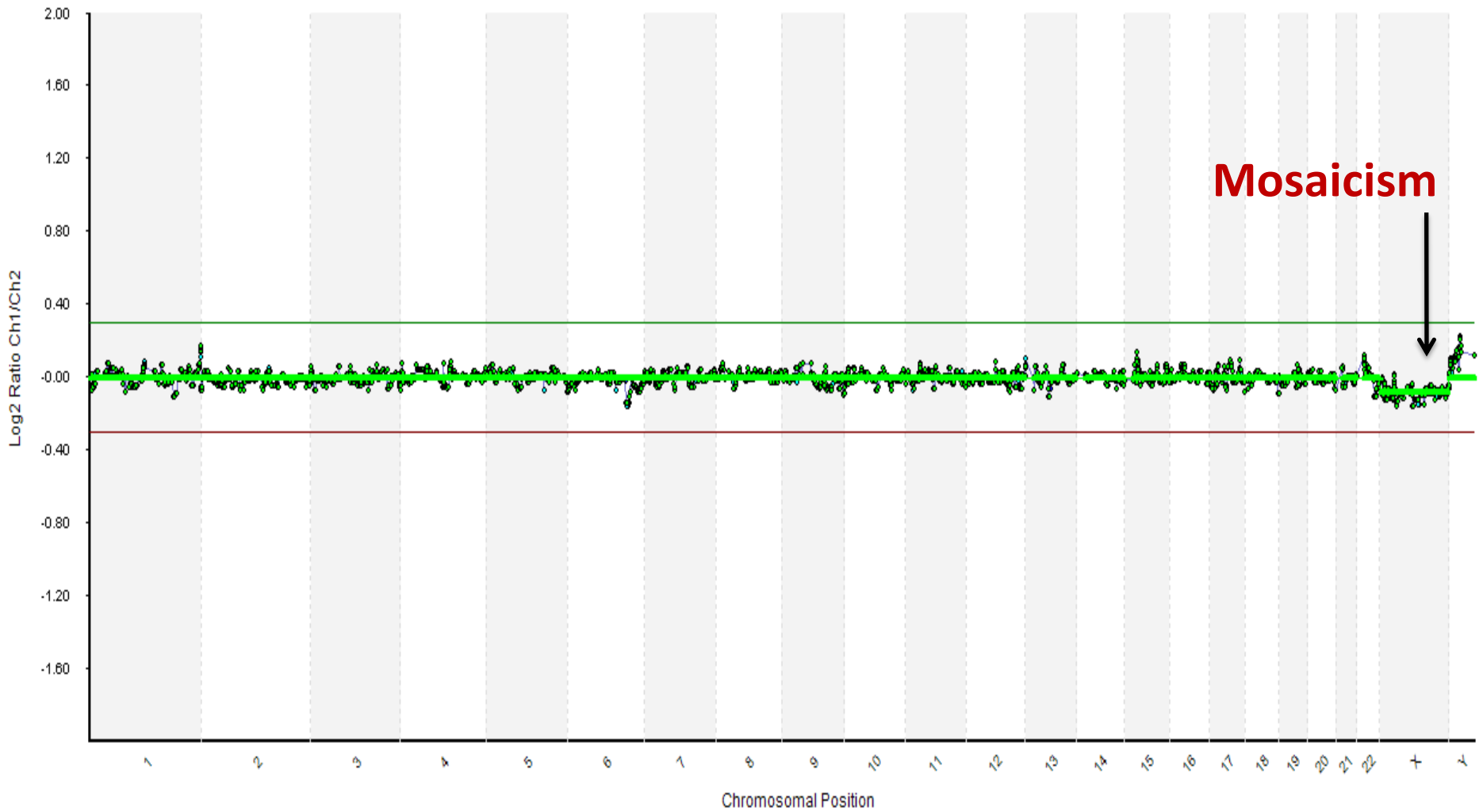


# DNA (Amniotic fluid) from a fetus X0 mosaic (10%)

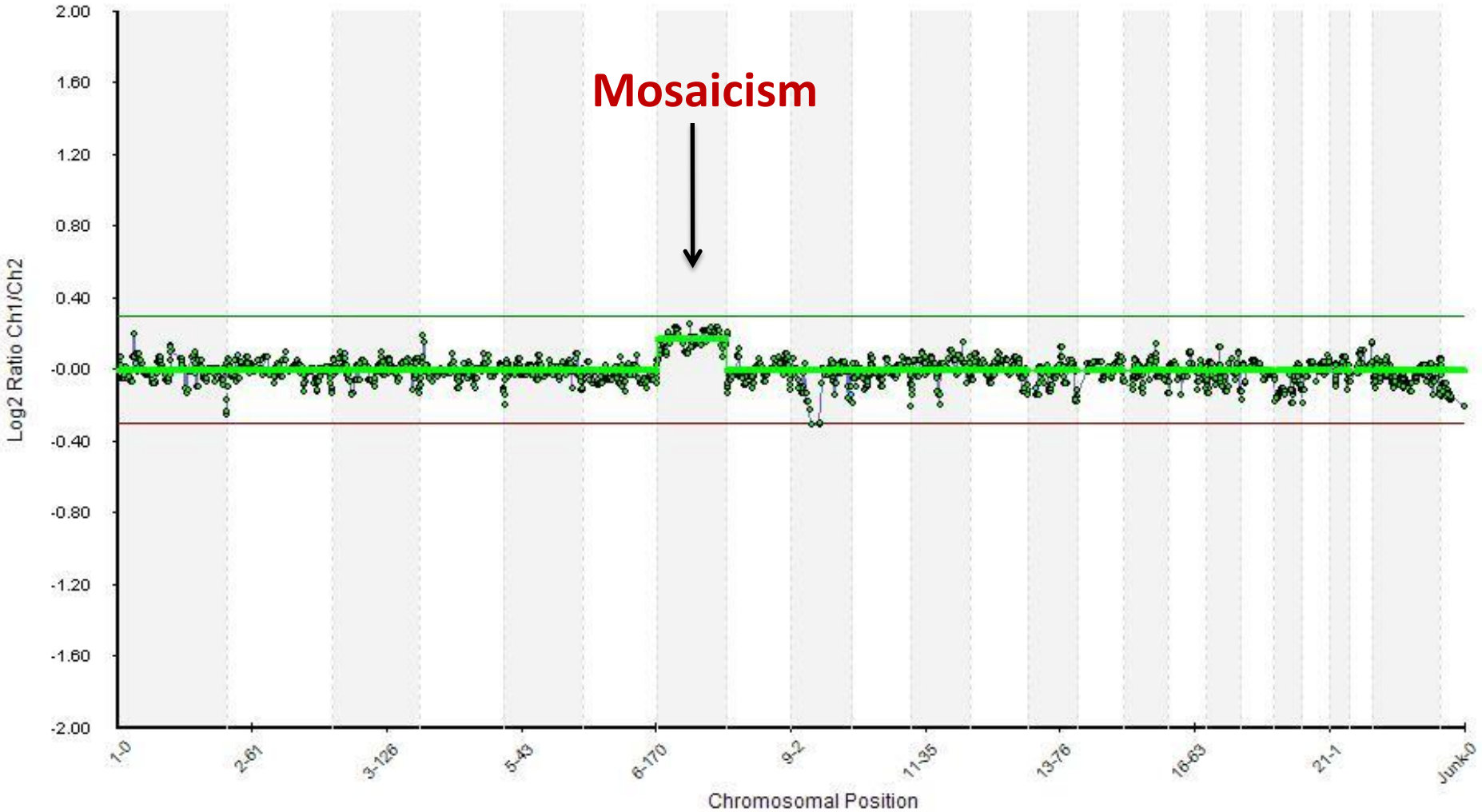




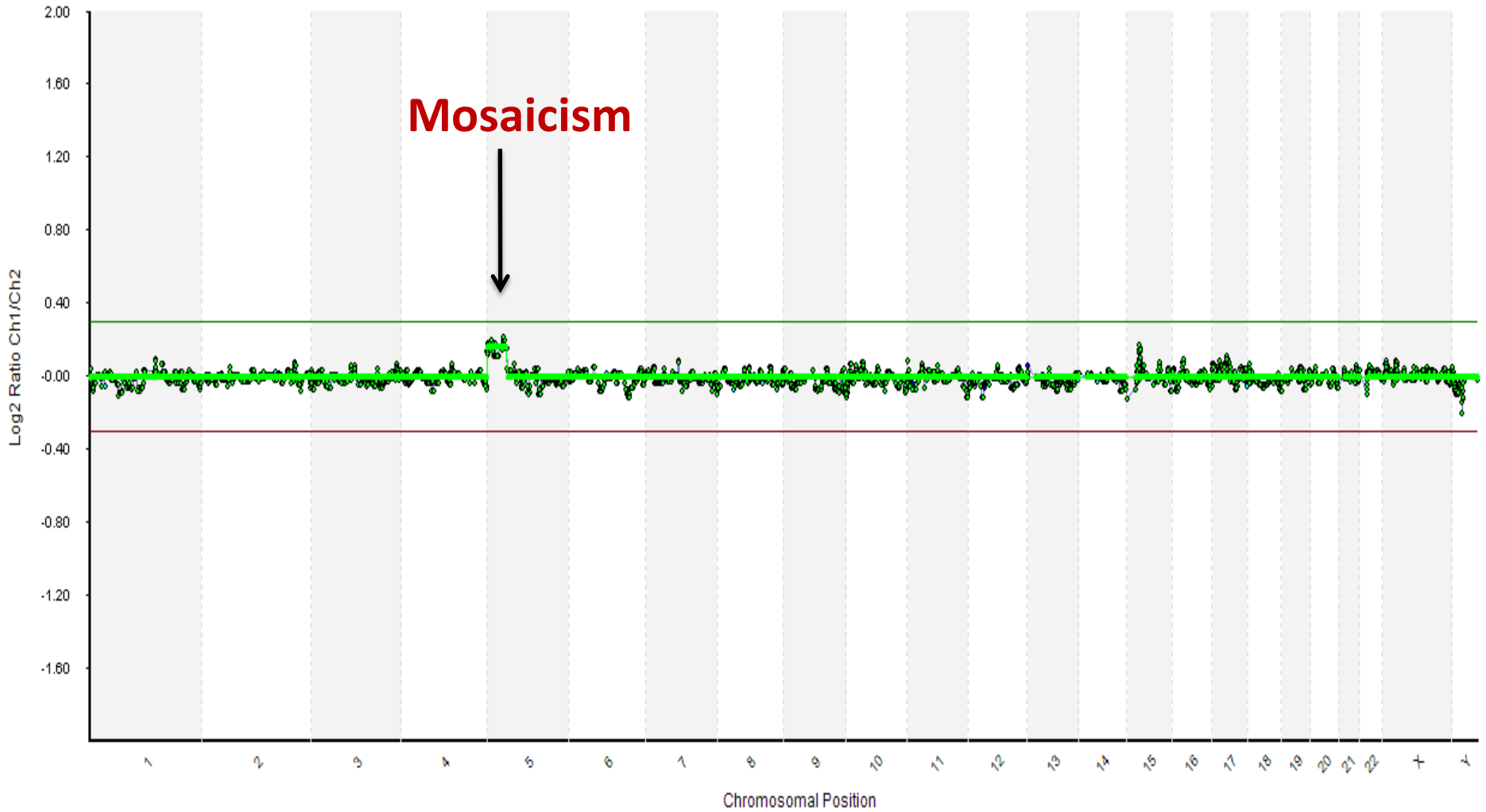
# DNA (Amniotic fluid) from a fetus X0 mosaic (15%)



# DNA (CVS) from a fetus 47,XX,+7 mosaic (20 %)



# DNA (CVS) from a fetus 47,XX,+5p mosaic (20 %)





# Results comparison between G-banding and CMA:

## Not concordant results

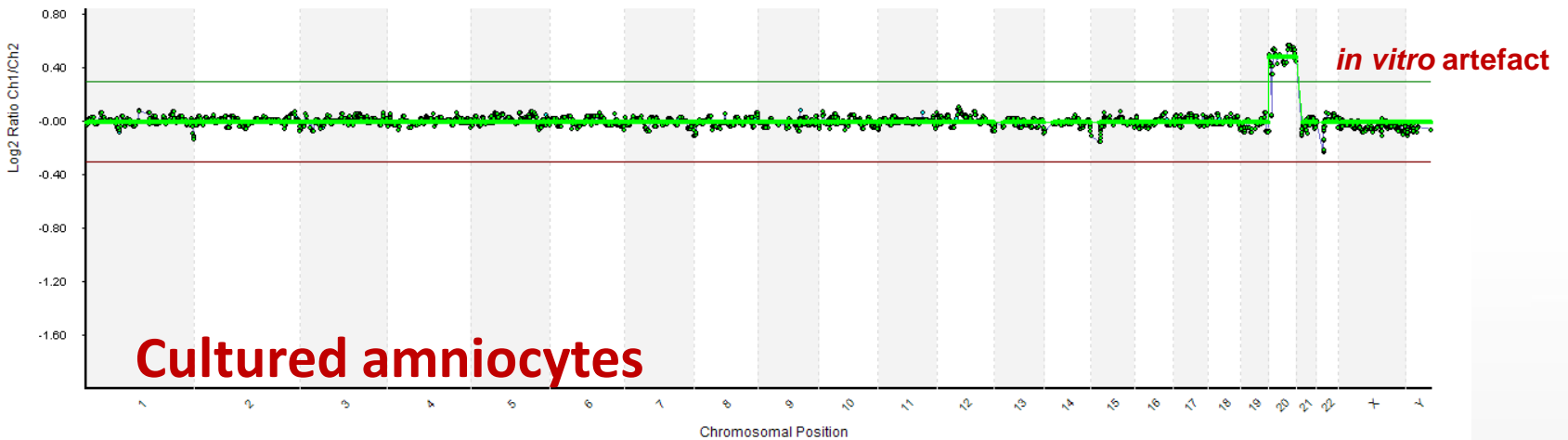
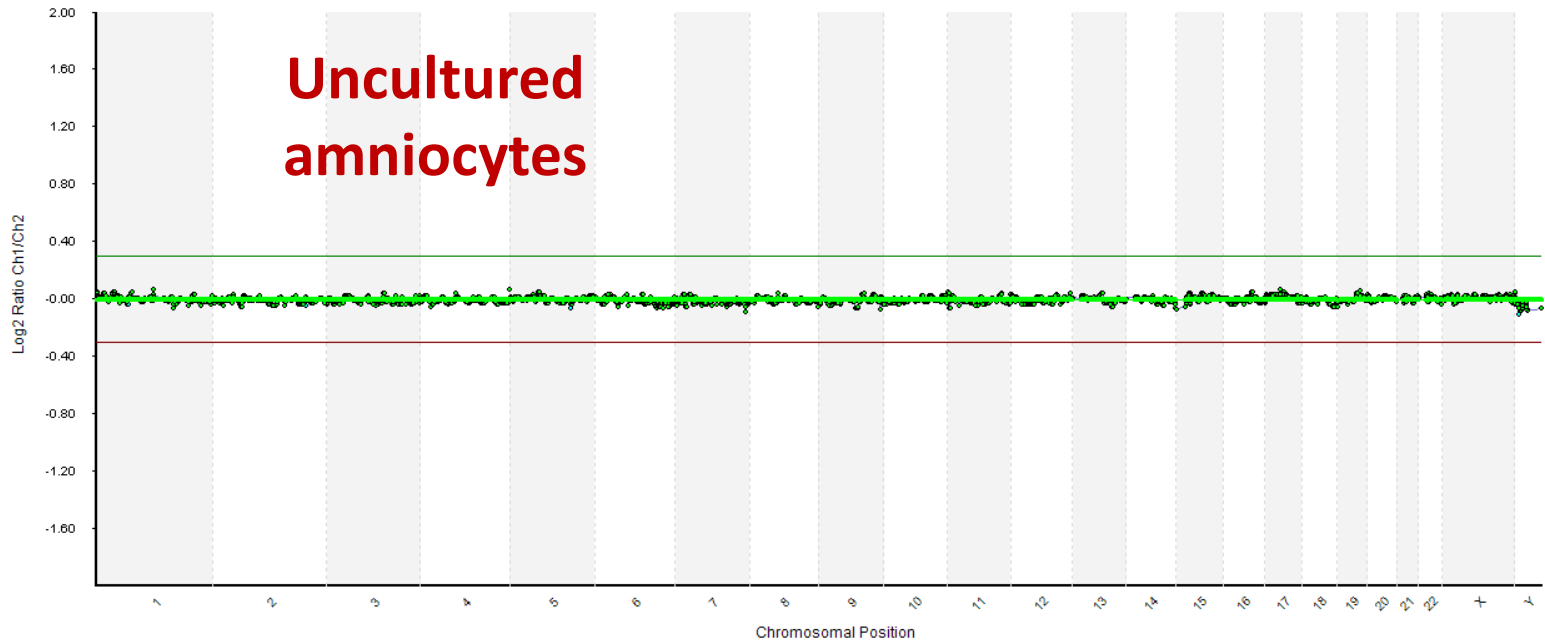
Sample type	No. of samples	Indication	Chromosomal findings		Concordance	Final diagnosis
			G-banding results	aCGH result		
AF	1	PA	46,XX (16%) /47,XX+20(84%)	46, XX	N	46,XX <sup>§</sup>
CA	1	AMA, AK	Suspected duplication 5q	46,XY,dup(15)(q24.2q26.3)	N	Dup.15q24.2-qter

\* Normal after AF karyotyping

<sup>§</sup> *in vitro* artefact



# *In vitro* artefact in cultured amniocytes





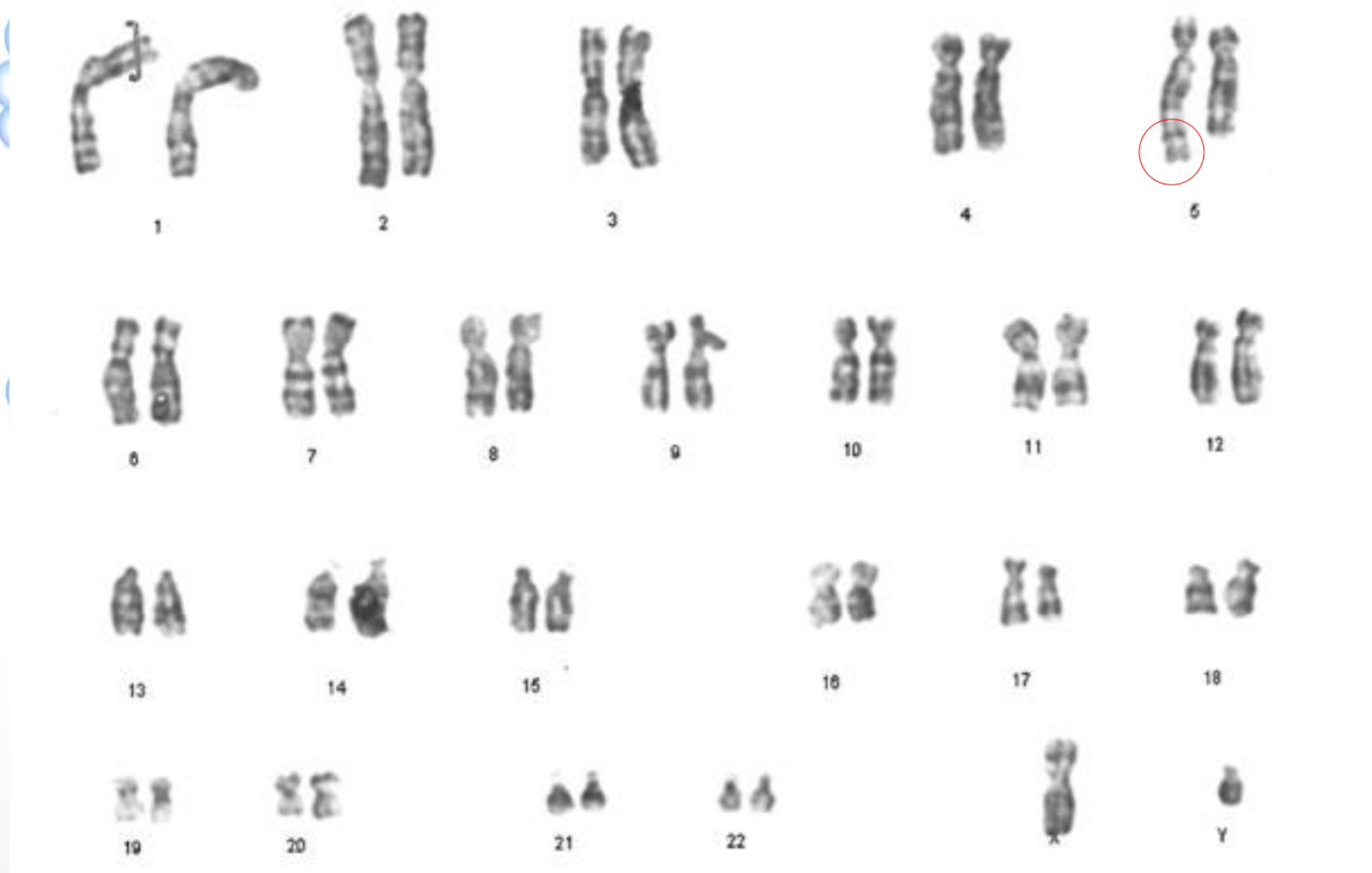
# Results comparison between G-banding and CMA: **Not concordant results**

Sample type	No. of samples	Indication	Chromosomal findings		Concordance	Final diagnosis
			G-banding results	aCGH result		
AF	1	PA	46,XX (16%) /47,XX+20(84%)	46, XX	N	46,XX <sup>§</sup>
CA	1	AMA, AK	Suspected duplication 5q	46,XY,dup(15)(q24.2q26.3)	N	Dup.15q24.2-qter

\* Normal after AF karyotyping

<sup>§</sup> *in vitro* artefact

# Karyotype from a fetus with a suspected partial dupl chr 5q

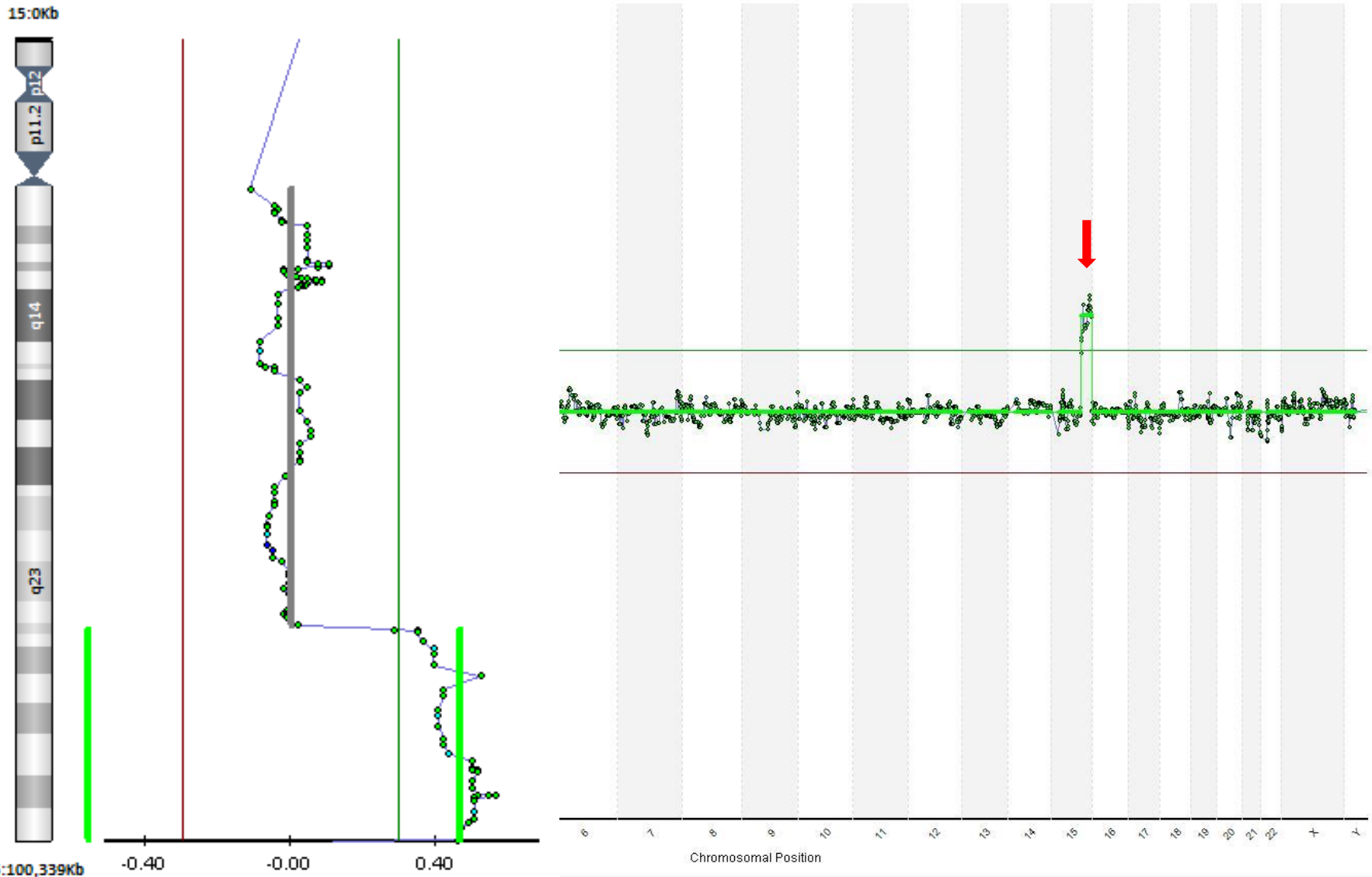


# Clinically significant CMA findings in prenatal samples not detected by conventional karyotyping

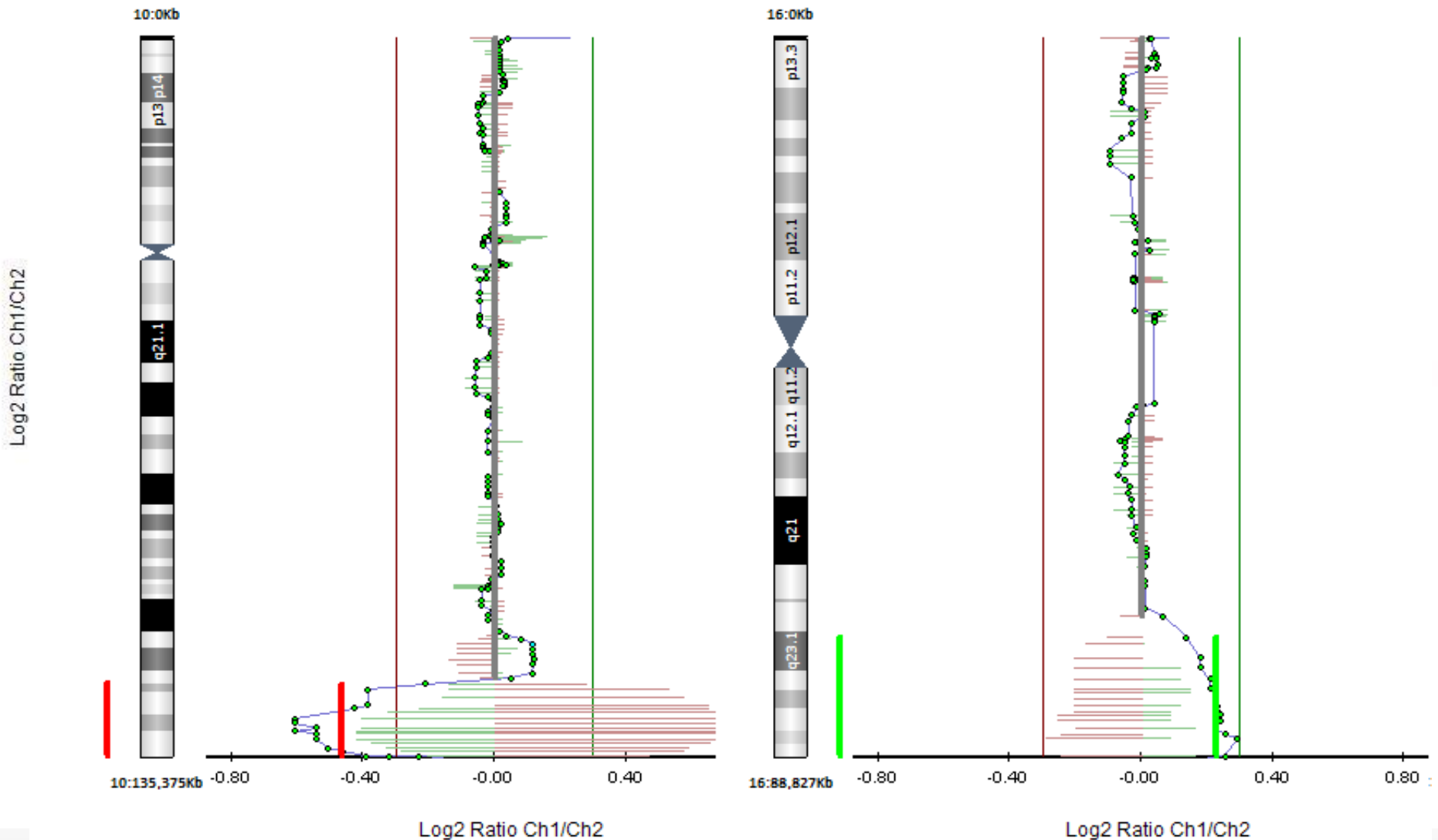
Sample type	No. of samples	Indication	CMA results			Parental analysis	Interpretation
			Location	Gain / Loss	Size (Mb)		
AF	1	AMA + AUS (single umbilical artery)	17p12	Loss	3.4	Inherited	Hereditary neuropathy (HNPP)
AF	4	AMA - PA	17p12	Gain	0.35-1.1	Inherited	Charcot-Marie-Tooth 1A (CMT1A)
AF	3	PA	Xp21.2-p21.1	Gain	0.1-0.45	<i>De novo</i>	Dupl. Ex. 56-77, Dupl. Ex 54-59; Del ex. 48-50 of the DMD gene
AF	2	AUS (tetralogy of Fallot)	22q11.21	Loss	0.67	<i>De novo</i>	22q11.2 microdeletion (DIGEORGE)
AF	2	AMA	22q11.21	Gain	0.67	Inherited	22q11.2 microduplication syndrome
AF	2	AMA	15q13.1-q13.3	Loss	2.9-3.1	<i>De novo</i>	15q13.3 microdeletion syndrome
CVS	1	AMA + AUS (abnormal NT)	5q35.2-q35.3	Loss	1.7	<i>De novo</i>	SOTOS Syndrome
AF	1	PA	Xq22.2	Gain	0.54	<i>De novo</i>	Pelizaeus-Merzbacher syndrome
AF	1	PA	15q11.2-q13.1	Loss	4.6	Inherited	15q11-q13 duplication syndrome
CVS	1	AFK	6q14.3q15	Loss	5.2	<i>De novo</i>	Clinically significant CNV
AF	1	AMA	Xp11.3-p11.23	Loss	3.3	<i>De novo</i>	Clinically significant CNV
AF	1	PA	2p24.3-p24.2	Loss	2.5	<i>De novo</i>	Clinically significant CNV
CVS	1	PA	19q13.41q13.43	Gain	7.5	<i>De novo</i>	Clinically significant CNV
CVS	1	PA	7q36.1q36.3	Gain	7.3	<i>De novo</i>	Clinically significant CNV
			9p24.3p23	Loss	9.6		
CVS	1	AMA + AUS (Cystic Hygroma)	10q26.12- 10q26.3	Loss	13.6	<i>De novo</i>	Clinically significant CNV
			16q23.1-q24.3	Gain	14.6		
CVS	1	AUS (abnormal NT)	8p23.3-p23.1	Loss	6.5	<i>De novo</i>	Inv dup del(8p)
			8p22-p21.1	Gain	14.6		



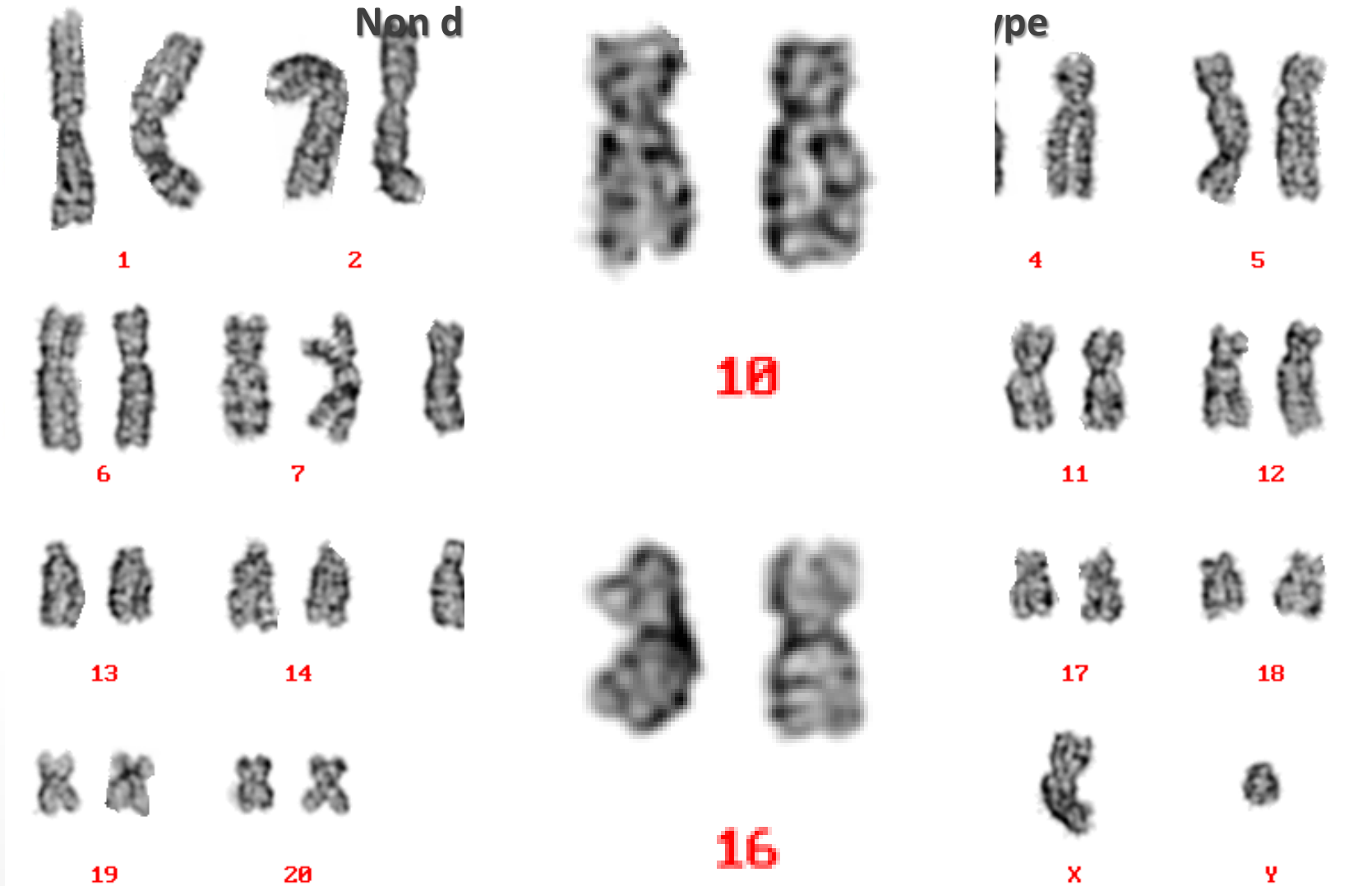
# DNA (Amniotic fluid) from a fetus with a suspected partial dupl chr 5q, diagnosed as dup15(q24.1->qter) by array-CGH



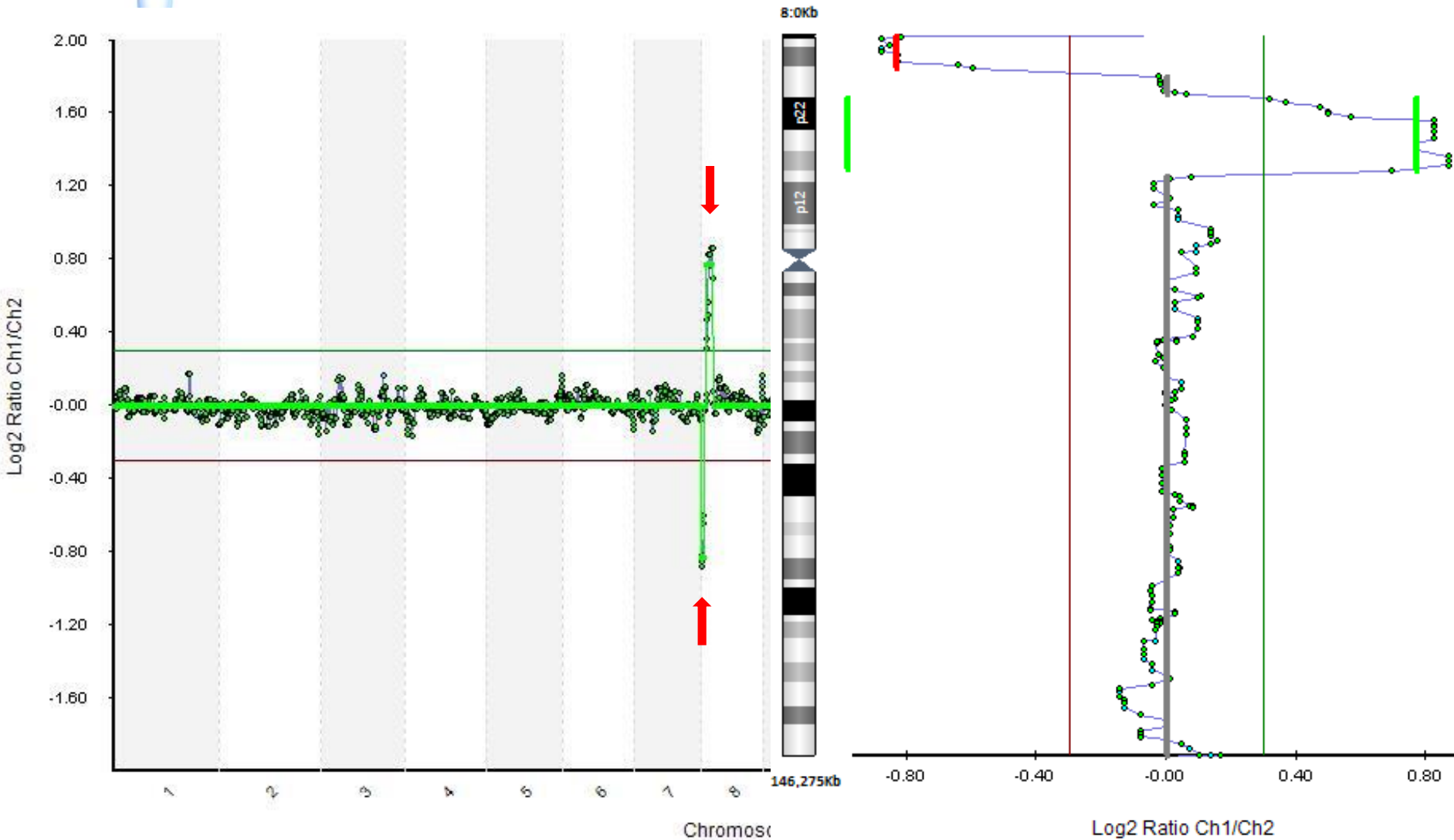
# CVS with a de novo unbalanced translocation resulting in 13.6 Mb deletion 10q26.12-q26.3 and a 14.6 Mb duplication 16q23.1-q24.3



**CVS with a de novo unbalanced translocation resulting in 13.6 Mb deletion 10q26.12-q26.3 and a 14.6 Mb duplication 16q23.1-q24.3 (ultrasound evidence: Cystic Hydroma)**



**CVS with a *de novo* Inv dup del(8p) not detected by conventional Karyotype because of a cell culture failure (abnormal nuchal translucency)**



# CMA results according to the indication

Indication	No. of Samples analysed (%)	No. Samples with a pathogenic CNV (%)			aCGH detection rate
		detected by conventional karyotyping	not detected by conventional karyotyping	Total	
AUS (abnormal ultrasound findings)	95 (3.2)	20 (76.9)	6 (23.1)	26 (27.4)	6.3%
AMA (advanced maternal age)	1118 (37.3)	28 (82.4)	6 (17.6)	34 (3.0)	0.5%
PA (parental anxiety)	1675 (55.8)	17 (60.7)	11 (39.3)	28 (1.7)	0.7%
AFK (abnormal fetal karyotype)	25 (0.8)	3 (75.0)	1 (25.0)	4 (16.0)	4.0%
MSS (Abnormal maternal serum screening test)	29 (1.0)	3 (100.0)	0 (0.0)	3 (10.3)	0.0%
FIS (Family history of a genetic condition )	25 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0%
CCF (Cell culture failure)	33 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0%
<b>High risk pregnancies (AUS + AFK)</b>	<b>120 (4.0)</b>	<b>23 (76.7)</b>	<b>7 (23.3)</b>	<b>30 (25.0)</b>	<b>5.8%</b>
<b>Low risk pregnancies (AMA + PA + MSS + FIS + CFF)</b>	<b>2880 (96.0)</b>	<b>48 (73.8)</b>	<b>17 (26.2)</b>	<b>65 (2.3)</b>	<b>0.6%</b>
<b>Total</b>	<b>3000</b>	<b>71 (74.7)</b>	<b>24 (25.3)</b>	<b>95 (3.2)</b>	<b>0.8%</b>

# Risultati degli studi prospettici pubblicati sull'impiego del cariotipo molecolare in diagnosi prenatale

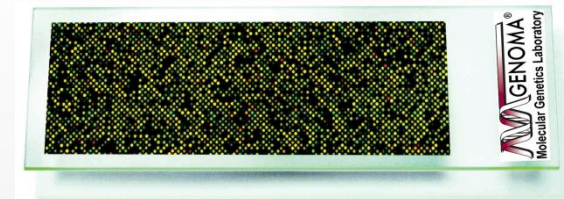
Articolo	Nr. di campioni prenatali analizzati (%)	Nr. di alterazioni cromosomiche submicroscopiche patogeniche (%)	Nr. di varianti a significato clinico incerto (%)
Sahoo <i>et al.</i> (2006)	98	0 (0.0)	2 (2.0)
Shaffer <i>et al.</i> (2008)	151	2 (1.3)	1 (0.7)
Kleeman <i>et al.</i> (2009)	50	1 (2.0)	0 (0.0)
Coppinger <i>et al.</i> (2009)	244	5 (2.0)	1 (0.4)
Van de Veyver <i>et al.</i> (2009)	300	2 (0.7)	3 (1.0)
Maya <i>et al.</i> (2010)	269	3 (1.1)	0 (0.0)
Park <i>et al.</i> , (2011)	4.033	11 (0.3)	NR
Fiorentino <i>et al.</i> (2011)	3.000	24 (0.8)	1 (0.03)
Armengol <i>et al.</i> (2012)	906	14 (1.5)	6 (0.7)
Lee <i>et al.</i> , (2012)	3.171	34 (1.1)	5 (0.2)
Breman <i>et al.</i> , (2012)	1.115	25 (2.2)	18 (1.6)
Shaffer <i>et al.</i> , (2012)	3877	208 (5.4)	15 (0.4)
Wapner <i>et al.</i> , (2012)	3822	96 (2.5)	33 (0.9)
<b>Total</b>	<b>21.036</b>	<b>425 (2.0)</b>	<b>85 (0.5)</b>

# Conclusioni

- I risultati di questo studio hanno dimostrato l'utilità dell'uso dell'aCGH in diagnosi prenatale.
- La tecnica si è dimostrata accurata, capace di evidenziare sia le alterazioni cromosomiche evidenziabili mediante il cariotipo classico, che le microdelezioni/duplicazioni;
  - Possibilità di identificare i mosaicismi a bassa percentuale (10%)
  - Corretta classificazione delle anomalie cromosomiche
  - Assenza di artefatti *in vitro*
- Aumentata sensibilità ed accuratezza della diagnosi prenatale
- Maggiore detection rate con la possibilità di evidenziare microdelezioni/duplicazioni;
- Nessuna anomalia cromosomica è sfuggita all'analisi, in confronto con il cariotipo classico;
- Nessun aumento apprezzabile dei risultati di dubbia rilevanza clinica
- I risultati del nostro studio forniscono una ulteriore prova circa la possibilità di utilizzare il cariotipo molecolare come test di primo livello, in sostituzione del cariotipo tradizionale



# I timori verso la nuova tecnologia





## I timori verso il cambio di tecnologia

Alcuni timori verso l'uso del cariotipo molecolare:

### ✓ **Analisi dei cromosomi troppo approfondita**

- *CNVs di dubbio significato clinico (0% in questo studio, 0.3% dati cumulativi).*

*Grazie ad una sofisticata **analisi bioinformatica**, si ha la possibilità di verificare la patogenicità dell'anomalia cromosomica riscontrata e valutare le conseguenze cliniche.*

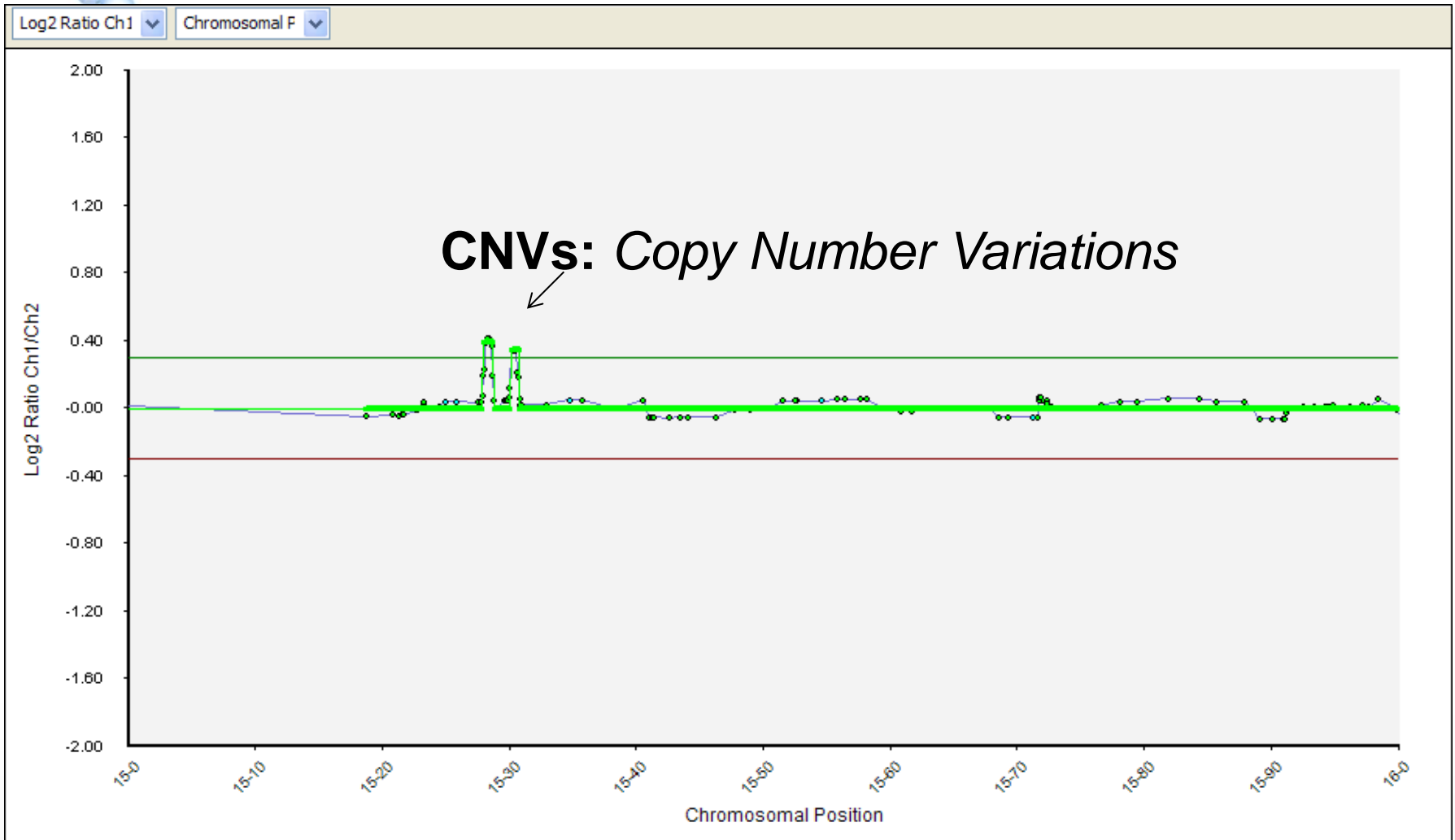
### ✓ **Difficoltà nella gestione del risultato**

- *Consulenza genetica (pre- o post- analisi) **gratuita***
- *Consenso informato*
- *Materiale informativo (brochures, **Prenatal Book**)*

### ✓ **Limiti della metodica**

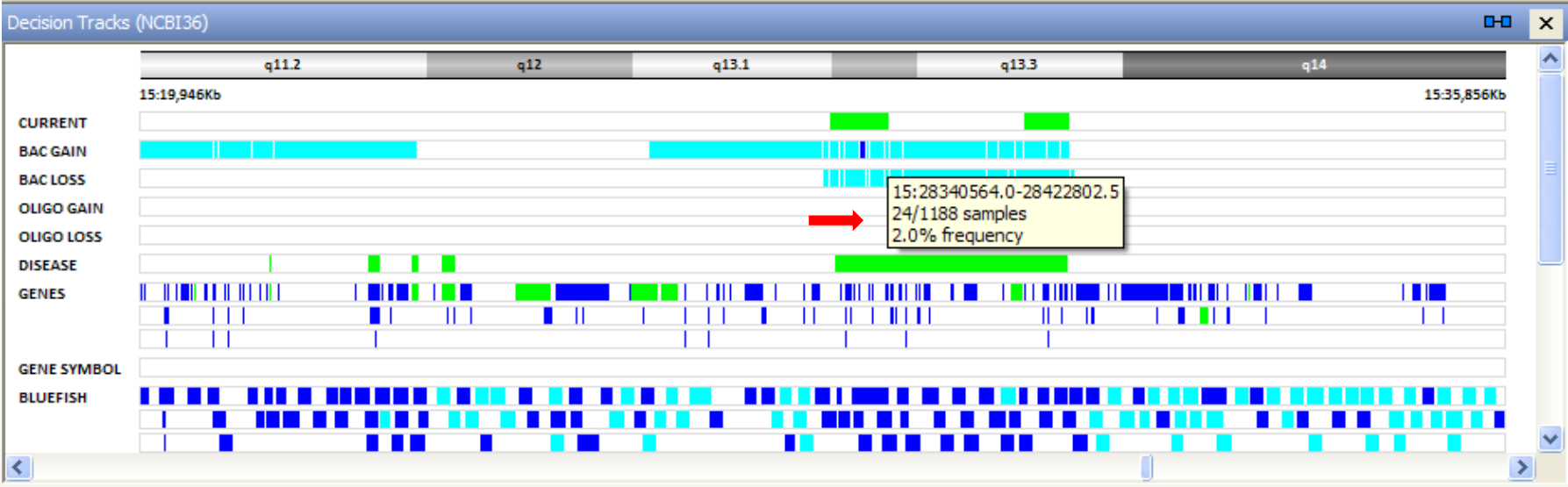
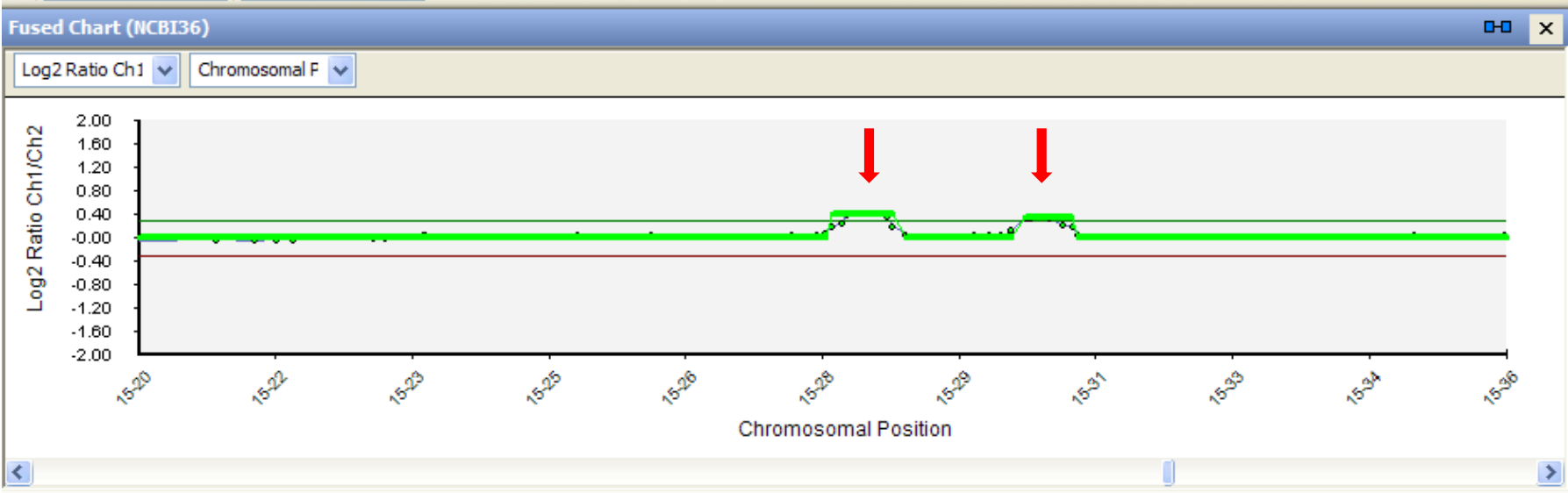
- *Impossibilità di evidenziare le traslocazioni bilanciate (7/1037, 0.7%)*
  - *Se de novo, sarebbe comunque suggerito aCGH*
  - *Se ereditario, informazione utile per prossima gravidanza della coppia, ma non rilevante per i fini che si perseguono con la diagnosi prenatale*
- *Mosaicismi inferiori al 10%*
- *Disomia uniparentale (UPD)*

# Cariotipo MOLECOLARE: **Analisi Bioinformatica**

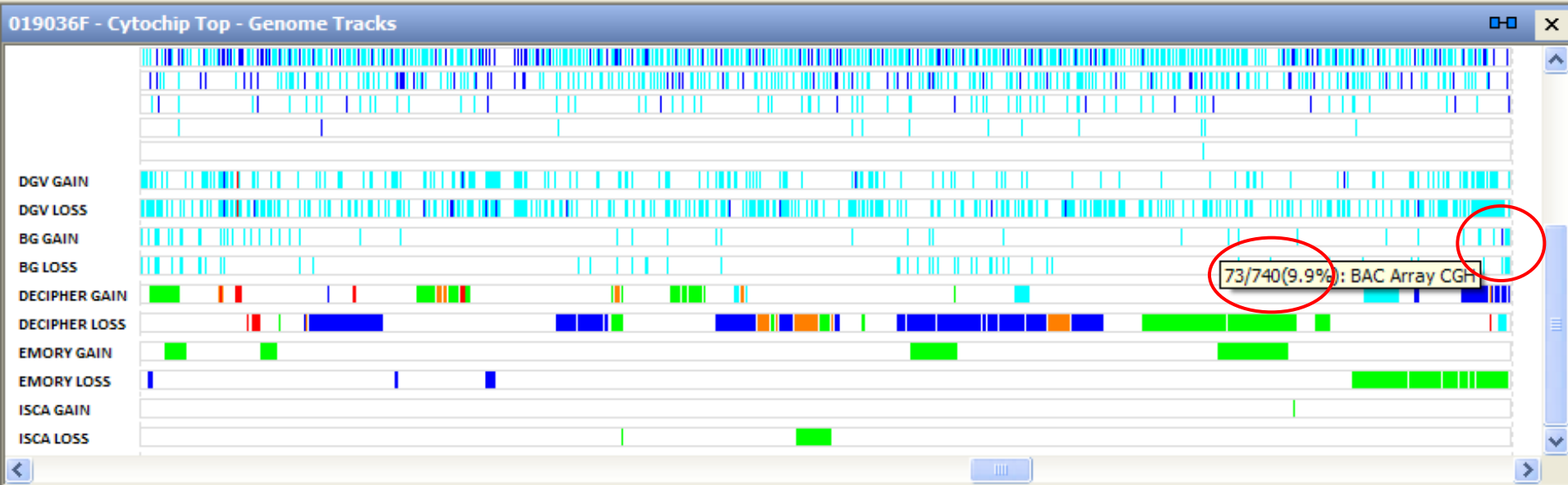
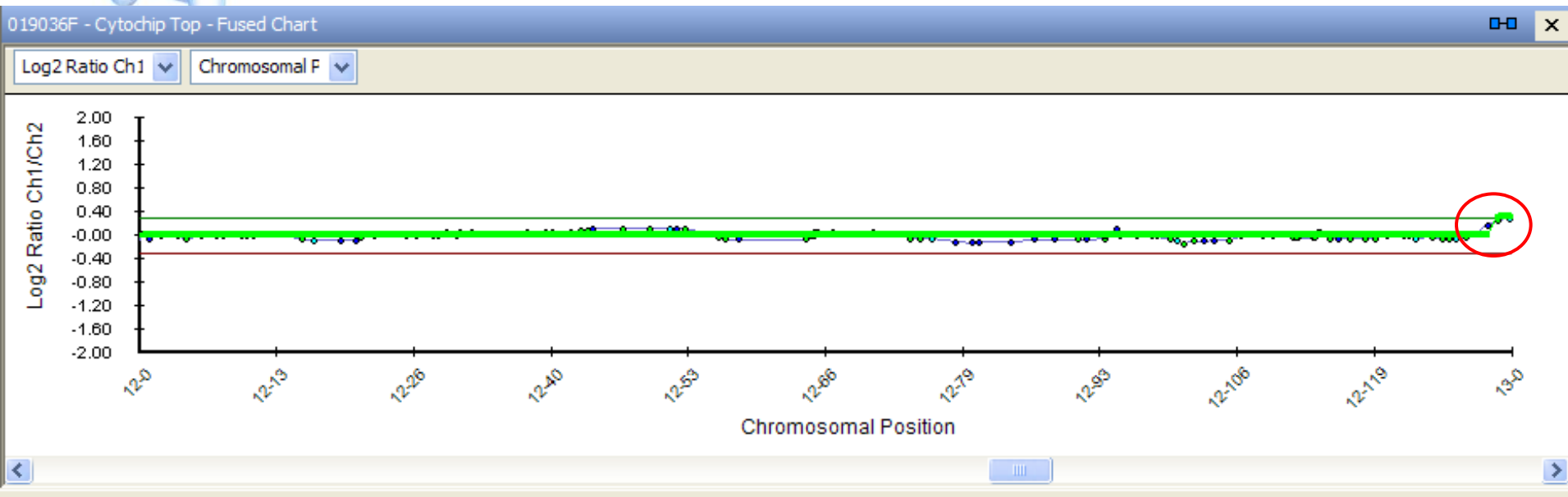


C46347 - 027034F - Fused Chart (NCBI36) - 19/05/2011

# Cariotipo MOLECOLARE: **Analisi Bioinformatica**



# Cariotipo MOLECOLARE: **Analisi Bioinformatica**

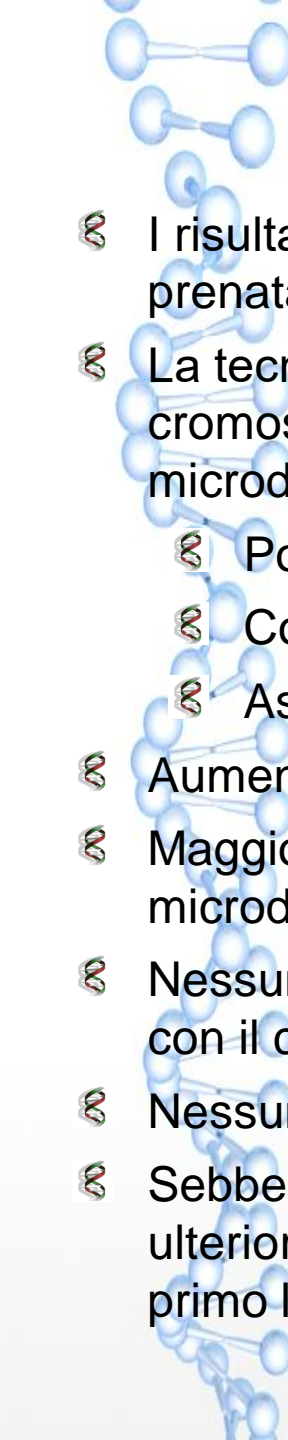




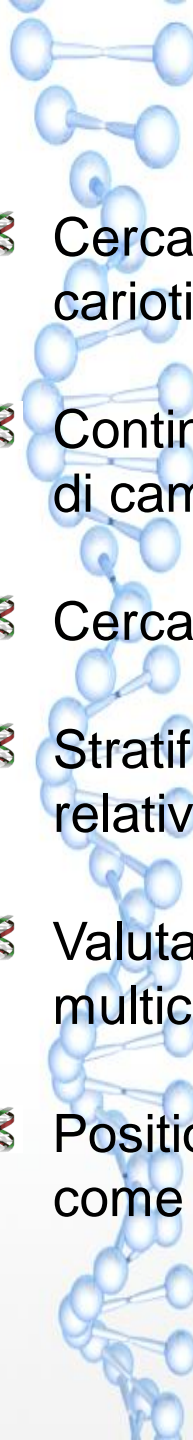
# Considerazioni sui CNVs

- Uno dei principali motivi che ancora fanno avere dei timori sull'introduzione dell'aCGH nella routine clinica di diagnosi prenatale sono i cosiddetti **CNVs a significato clinico dubbio**, e cioè quelle alterazioni cromosomiche per le quali l'effetto fenotipico non è noto.
- Tali CNVs potrebbero rendere difficoltosa la gestione del risultato e produrre ansietà nei pazienti
- Nel ns. studio prospettico abbiamo evidenziato tale genere di CNVs in 2 casi.
- L'estensione del test ai genitori ed un'opportuna **analisi bioinformatica** ha permesso di classificare tali CNVs come patogenici, seguendo i criteri riportati da Miller *et al.* (2010).
- La maggior parte (**13%**) dei CNVs evidenziati nello studio sono risultati dei polimorfismi senza significato clinico.
- Comunque, i risultati di dubbia rilevanza clinica possono essere occasionalmente essere evidenziati anche con il cariotipo tradizionale.
- I **CNVs a significato clinico dubbio** possono essere gestiti in maniera simile, fornendo al paziente una appropriata consulenza genetica

# Conclusioni

- 
- I risultati di questo studio hanno dimostrato l'utilità dell'uso dell'aCGH in diagnosi prenatale.
  - La tecnica si è dimostrata accurata, capace di evidenziare sia le alterazioni cromosomiche evidenziabili mediante il cariotipo classico, che le microdelezioni/duplicazioni;
    - Possibilità di identificare i mosaicismi a bassa percentuale (10%)
    - Corretta classificazione delle anomalie cromosomiche
    - Assenza di artefatti *in vitro*
  - Aumentata sensibilità ed accuratezza della diagnosi prenatale
  - Maggiore detection rate con la possibilità di evidenziare microdelezioni/duplicazioni;
  - Nessuna anomalia cromosomica patogenica è sfuggita all'analisi, in confronto con il cariotipo classico;
  - Nessun aumento apprezzabile dei risultati di dubbia rilevanza clinica
  - Sebbene ulteriori studi sono necessari, i risultati del nostro studio forniscono una ulteriore prova circa la possibilità di utilizzare il cariotipo molecolare come test di primo livello, anche in sostituzione del cariotipo tradizionale

# Propositi Futuri

- 
- ❧ Cercare di trasformare la routine prenatale di citogenetica classica in cariotipo molecolare.
  - ❧ Continuare lo studio prospettico per un altro anno, ampliando il numero di campioni prenatali analizzati (3000-4000).
  - ❧ Cercare collaborazioni per organizzare studi prospettici multicentrici.
  - ❧ Stratificazione dei dati per categoria di indicazione, al fine di valutare il relativo detection rate per ciascuna indicazione.
  - ❧ Valutazione finale dell'insieme dei dati e confronto con quelli di altri studi multicentrici in corso.
  - ❧ Position statement sull'indicazione sull'uso del cariotipo molecolare come test di 1<sup>a</sup> livello



# Grazie per l'attenzione!

**Roma**



**Milano**



**Marina Baldi**

**[baldi@laboratoriogenoma.it](mailto:baldi@laboratoriogenoma.it)**