

DIAGNOSI FETALE



60 YEARS
DNA DISCOVERY

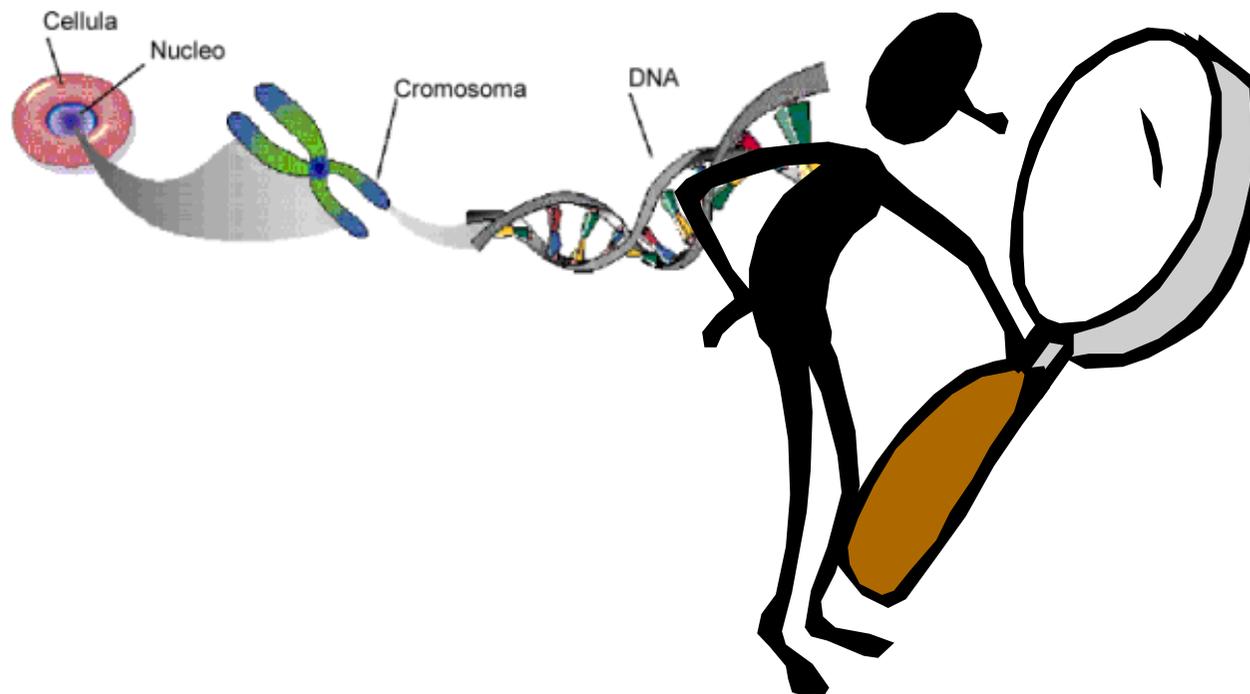


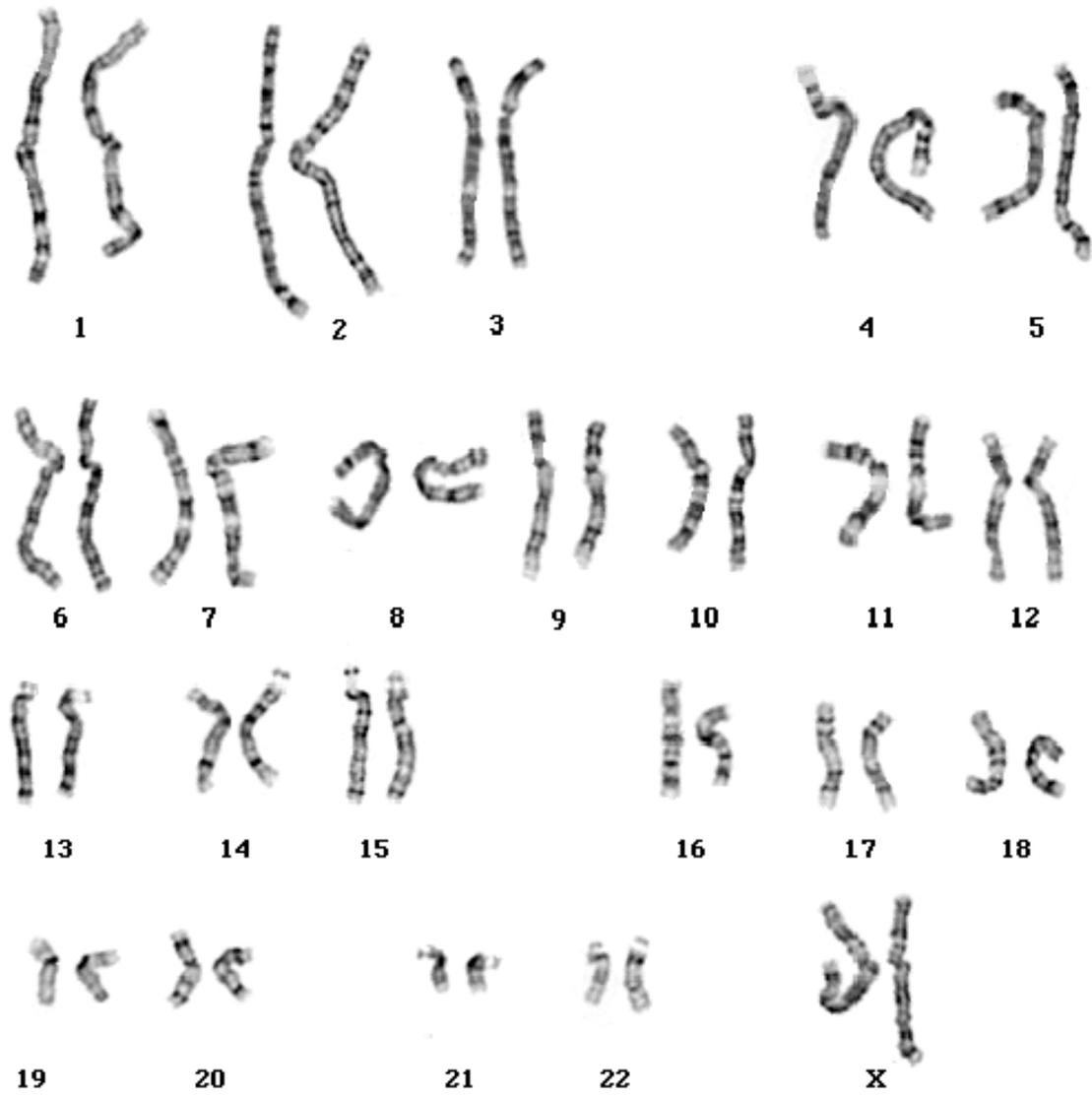
Quando il cariotipo non ce la fa



La Citogenetica Molecolare

Abbina la possibilità di un'analisi del DNA, propria delle tecniche di biologia molecolare, con la struttura cromosomica il cui studio è oggetto della citogenetica classica

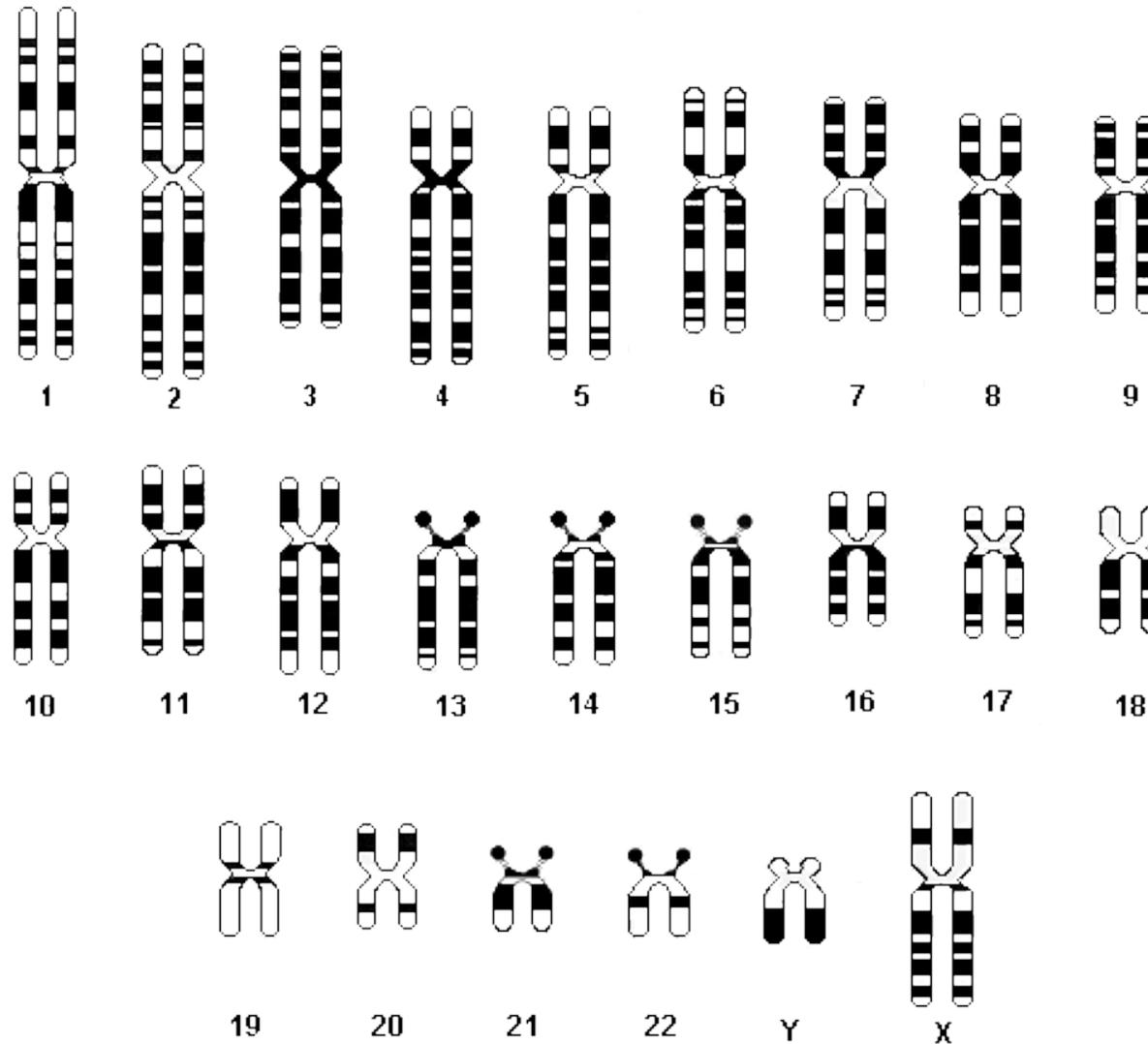




La Citogenetica Classica

Analisi convenzionale (microscopio ottico)

ideogrammi



p = braccio corto
q = braccio lungo

numerazione delle bande dal
centromero al telomero

Cariotipo Tradizionale

Vantaggi

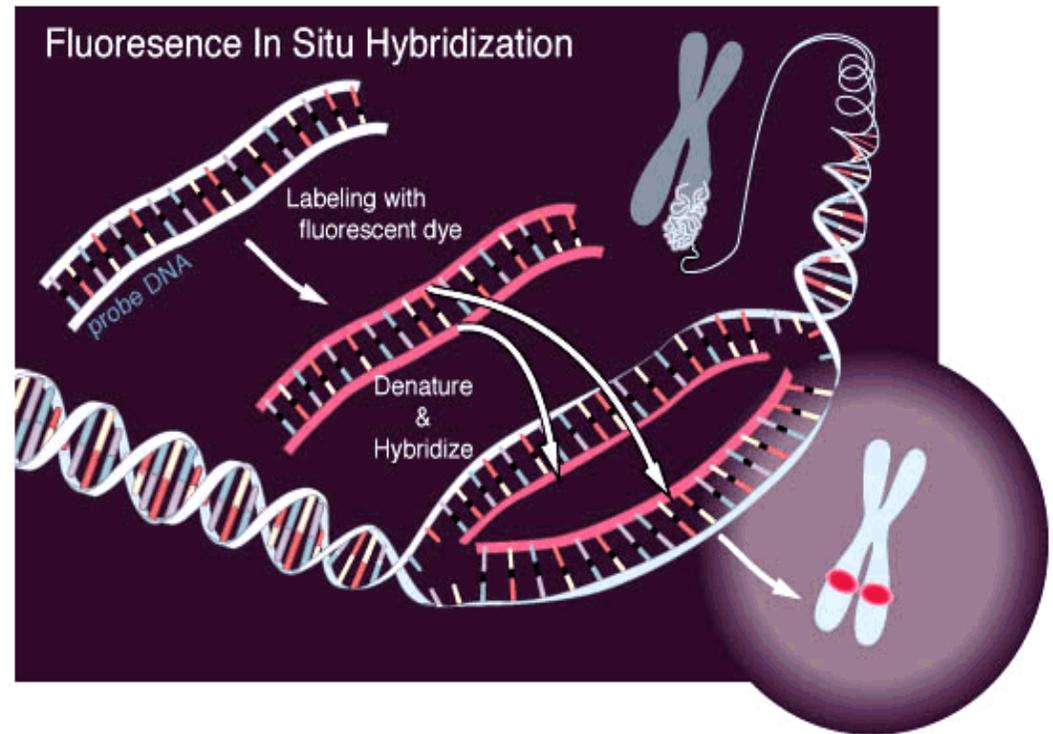
- Capacità di analizzare l'intero genoma in un esperimento
- Tecnica consolidata, rivela poliploidie e anomalie bilanciate
- Rivela mosaicismi anche inferiori al 20%

Svantaggi

- Necessita di coltura cellulare, con tempi di analisi prolungati
- Limitata risoluzione, non rivela delezioni o duplicazioni di piccole dimensioni < 10-15 megabasi

La Citogenetica Molecolare

- **Permette un'analisi molecolare di tutti i cromosomi consentendo di mettere in evidenza riarrangiamenti molto piccoli, di alcune migliaia di basi**



Tecniche di citogenetica molecolare

- **FISH.** fluorescence in situ hybridization
- **a-CGH.** microarrays comparative genomic hybridization

QF-PCR

Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) è una tecnica semplice e rapida che consente la diagnosi molecolare delle aneuploidie più comuni (trisomia 21, 13, 18 e aneuploidie dei cromosomi sessuali)

Questo tipo di approccio non richiede colture cellulari: la diagnosi può essere completata in 2 giorni



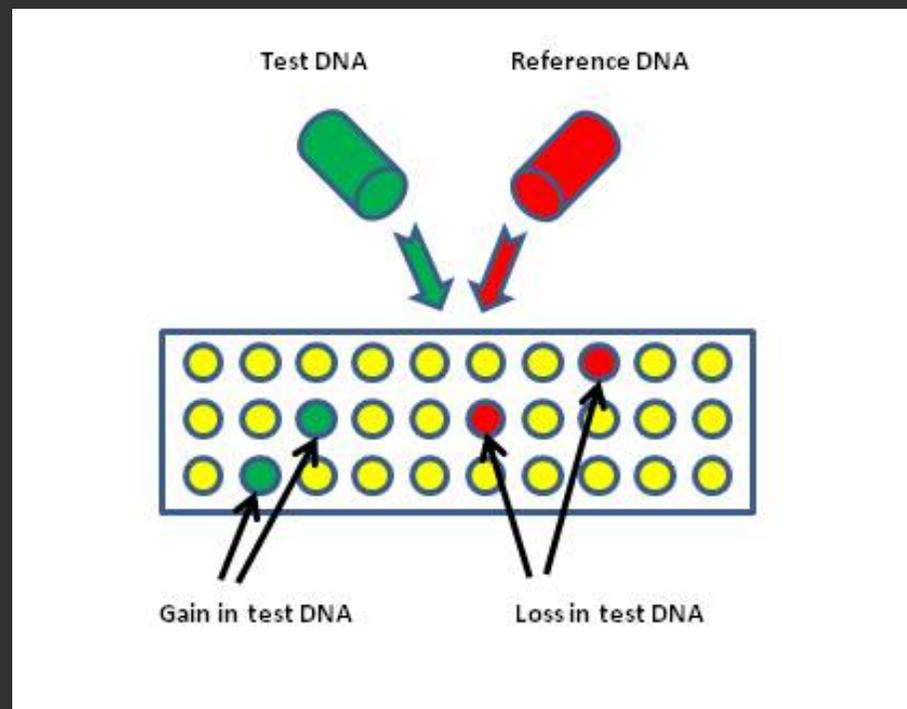
Il metodo si basa sull'amplificazione di brevi sequenze del DNA che contengono blocchi ripetuti di 2-6 basi (marcatori STRs). Queste sequenze sono specifiche per il cromosoma che si intende analizzare. Usando marcatori per i cromosomi 21, 13, 18, X e Y è possibile diagnosticare le aneuploidie più frequenti.

CGH microarray

Screening dell'intero genoma

Array-CGH

Risoluzione teoricamente illimitata

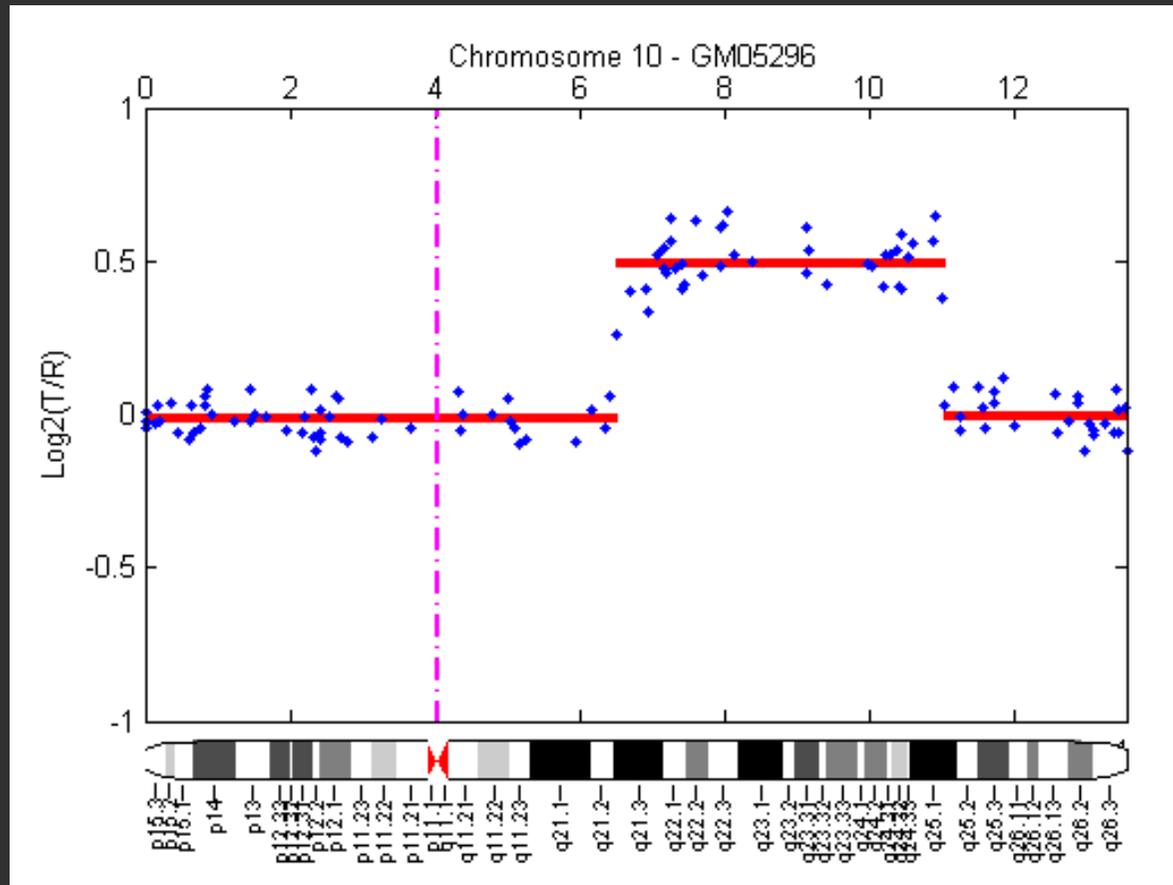


CGH microarray

Screening dell'intero genoma

Array-CGH

Duplicazione 10q



Array-CGH o Cariotipo Molecolare

Vantaggi

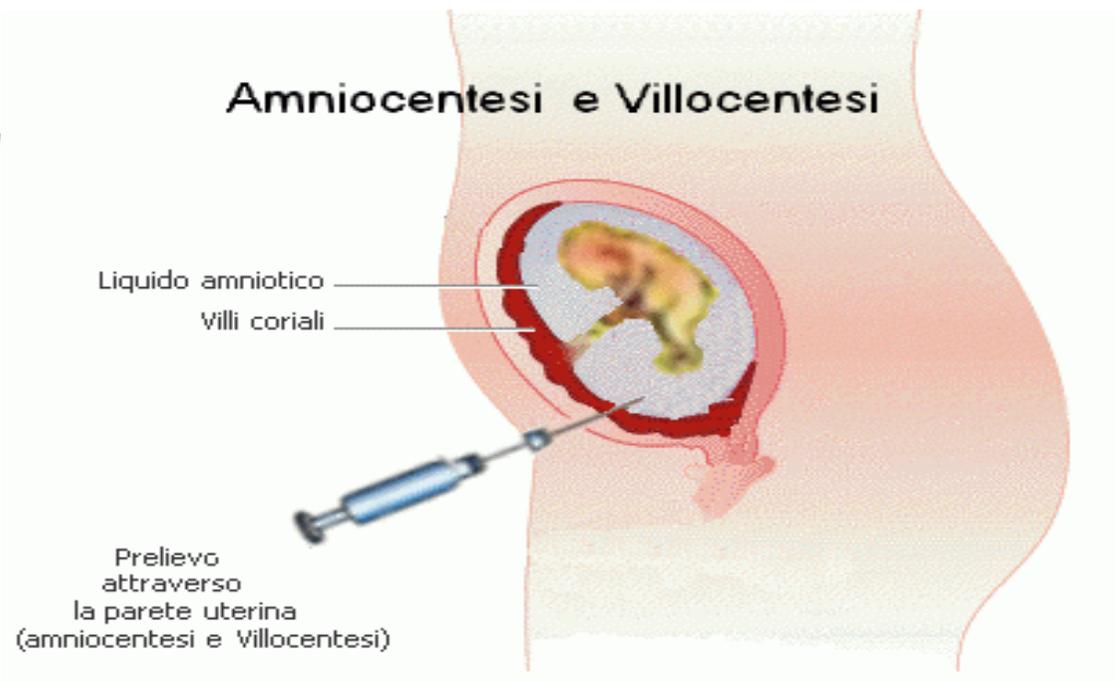
- Non ha bisogno di coltura cellulare
- Capacità di analizzare l'intero genoma in un esperimento
- Elevata specificità, sensibilità e risoluzione
- Rapidità

Svantaggi

- Incapacità di rilevare riarrangiamenti bilanciati e poliploidie
- Limitata abilità di individuare mosaicismi. Presenza di polimorfismi del numero di copie (CNV), spesso di difficile interpretazione

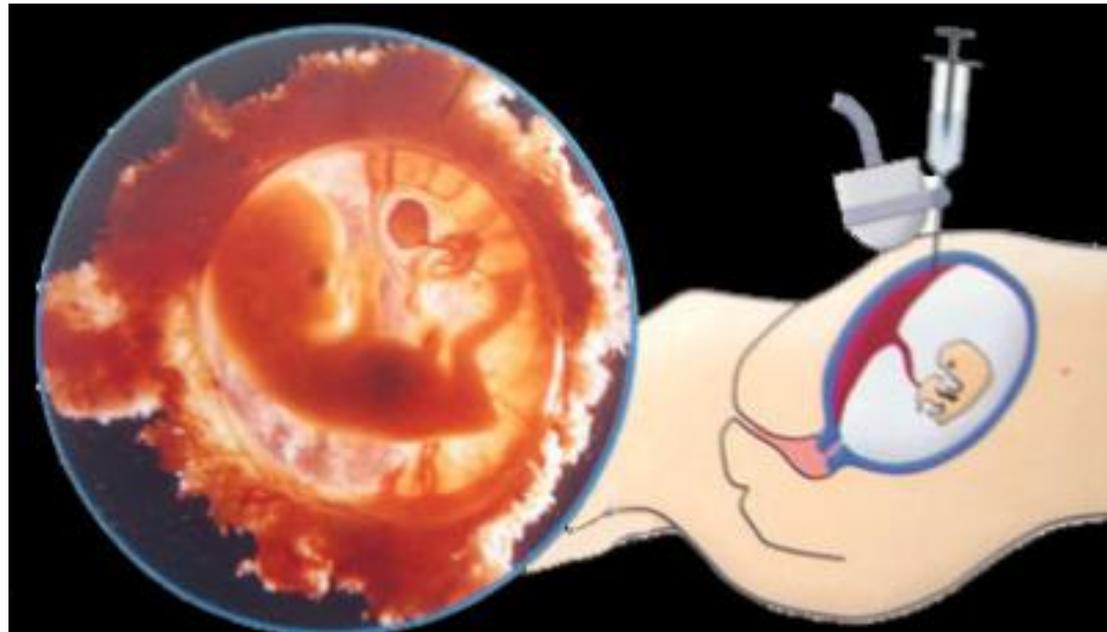
Diagnosi fetale

- La diagnosi fetale comprende l'insieme delle procedure che permettono di riconoscere la presenza nel feto di anomalie congenite



Diagnosi fetale nel primo trimestre

Una biopsia di villi coriali placentari viene fatta per via transaddominale ed è prelevata per l'analisi genetica.



Diagnosi fetale nel primo trimestre

Analisi genetiche possibili

- QF-PCR, analisi dei cromosomi 21 (associati alla sindrome di Down), i cromosomi 18, i cromosomi 13 ed il/i cromosoma/i X
- Malattie monogeniche ereditarie
- Cariotipo tradizionale
- Cariotipo molecolare mediante la tecnica Array-CGH.
- **Prenatal2FastTest:**



Cariotipo tradizionale + Array-CGH

Diagnosi fetale nel secondo trimestre

Una campione di liquido amniotico viene prelevato per via transaddominale ed è utilizzato per l'analisi genetica.



Diagnosi fetale nel secondo trimestre

Analisi genetiche possibili

- QF-PCR, analisi dei cromosomi 21 (associati alla sindrome di Down), i cromosomi 18, i cromosomi 13 ed il/i cromosoma/i X
- Malattie monogeniche ereditarie
- Cariotipo tradizionale e dosaggio AFP
- Cariotipo molecolare mediante la tecnica Array-CGH.
- **Prenatal2FastTest:**



Cariotipo tradizionale + Array-CGH

Diagnosi genetica fetale in sintesi

classical cytogenetics

molecular cytogenetics

1960

1980

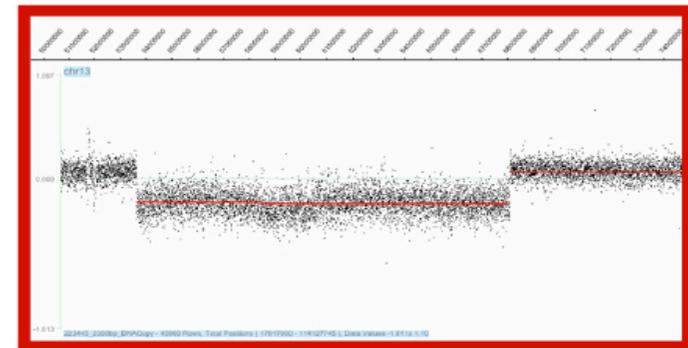
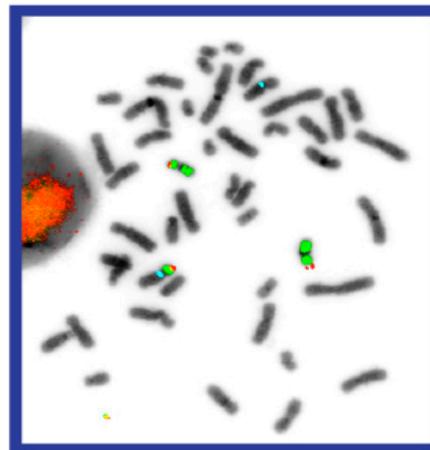
1990

2000

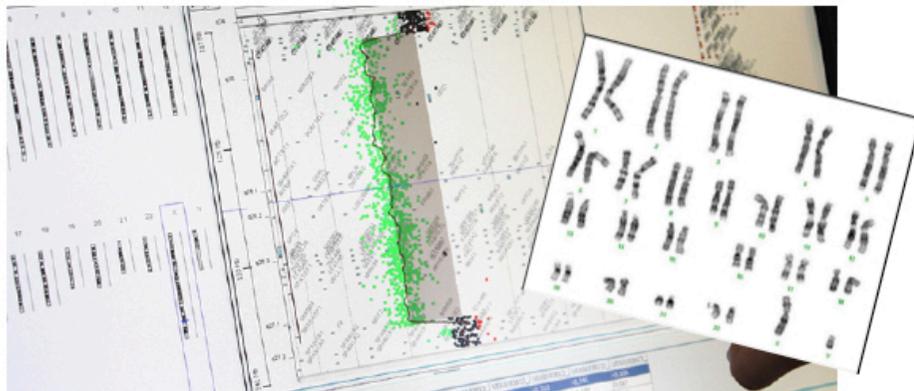
Chromosome banding

FISH

Array- CGH



Poliambulatorio Privato
CENTRO PALMER S.r.l.



**DIAGNOSI GENETICA
PRENATALE
CARIOTIPO +
ARRAY-CGH**

*Una scelta di qualità:
combina i vantaggi delle due
tecniche, ne riduce i limiti,
aumenta la capacità di
diagnosticare i difetti congeniti*

Prenatal 2^{fast test}®

L'indagine analizza contemporaneamente il ¹CARIOTIPO e il ²DNA del feto con una tecnica di ibridazione genomica comparativa su array (a-CGH)

¹ Il cariotipo standard identifica le anomalie di numero e di struttura dei cromosomi, comprese quelle bilanciate, ad una risoluzione uguale o superiore alle 10 MB. Non identifica i riarrangiamenti al di sotto di tale risoluzione (microriarrangiamenti).

² L'array-CGH identifica gli sbilanciamenti genomici ad una risoluzione media di ~200 kb. Non identifica i riarrangiamenti bilanciati e i mosaicismi (presenza di popolazioni cellulari geneticamente diverse) molto diluiti.

La tecnica è rapida (Fast). Il risultato dell'analisi dei VILLI CORIALI è disponibile in 5 giorni*, mentre è di 16 giorni* sugli AMNIOCITI.

Prenatal 2^{fast test}®

combina i vantaggi di due tecniche oggi ampiamente standardizzate nelle applicazioni prenatali e ne riduce i rispettivi limiti.

E' raccomandato nelle gravidanze a rischio in base ai risultati delle indagini ecografiche, delle analisi biochimiche, della storia familiare della coppia e per età materna. L'utilizzo della tecnica è preceduto dalla consulenza pre-test che chiarisce i limiti e i benefici dell'analisi sulla base della specifica informativa.

La consegna del referto è accompagnata da una consulenza conclusiva.

*Lavorativi dal ricevimento del campione in laboratorio

® submitted

La diagnosi genetica fetale cambia marcia.

A partire dagli anni '70 fino ad oggi l'analisi genetica del feto era basata sul cariotipo, di fatto un'analisi genomica a bassissima risoluzione. Questa analisi era incentrata sullo studio, al microscopio, dei cromosomi. Oggi la genetica molecolare ha reso disponibile uno strumento innovativo che analizza gli sbilanciamenti del numero di copie delle sequenze genomiche ad una risoluzione all'incirca 100 volte superiore rispetto a quella possibile con le analisi tradizionali dei cromosomi. Queste tecniche permettono di ottenere un significativo guadagno di informazione, evitando di incorrere in errori di interpretazione basati sull'esperienza individuale, e offrono un importante supporto all'interpretazione delle anomalie cromosomiche identificate con le tecniche standard.

Al momento non è ancora possibile sostituire il cariotipo tradizionale con la tecnica degli array-CGH, in quanto alcuni limiti degli array-CGH possono essere superati solo dalle analisi cromosomiche standard. Da ciò deriva la necessità di integrare le due tecniche, utilizzandole sullo stesso campione, per ottimizzare il risultato diagnostico e ottenere uno screening avanzato del genoma del feto.

Le linee-guida alla base di questa proposta sono state pubblicate dal Gruppo di Citogenetica della Società Italiana di Genetica Umana (*Ultrasound Obstet Gynecol* 2012; 39: 364-386)

Al fine di fornire una corretta percezione di questa proposta è stato sviluppato il "Prenatal2FastTest®" che consente di offrire una diagnosi prenatale ad elevata risoluzione, che combina al cariotipo la tecnica dell'array-CGH. Questa analisi, quando effettuata sui villi coriali, è anche rapida, in quanto permette di concludere la diagnosi mediamente in 5 giorni. Il test viene offerto insieme alla consulenza genetica.

Prenatal2FastTest® è stato ideato presso il Gruppo Pavanello Sanità di Padova (www.gruppopavanello.it) e GenArte di Roma (www.artemisialab.it), con il supporto dei maggiori esperti del settore

Ultrasound Obstet Gynecol 2012; 39: 364-386
Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ug.11092

Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011

A. NOVELLI¹, F. R. GRATTI², L. BALLARATI³, L. BERNARDINI¹, D. BIZZOCO⁴, L. CAMURRI⁵, R. CASALONE⁶, L. CARDARELLI⁷, P. CAVALLI⁸, R. CICCONE⁹, M. CLEMENTI¹⁰, L. DALPRÀ¹¹, M. GENTILE¹², G. GELLI¹³, P. GRAMMATICO¹⁴, M. MALACARNE¹⁵, A. M. NARDONE¹⁶, V. PECILE¹⁷, G. SIMONI², O. ZUFFARDI⁹ and D. GIARDINO³

EXPERT
REVIEWS

The future of prenatal diagnosis: karyotype, microarray or both? Technical and ethical considerations

Expert Rev. Proteomics 10(2), 131-134 (2013)

Antonio Novelli¹,
Pietro Cavalli² and
Laura Bernardini¹

¹Mendel Laboratory, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, Viale dei Cappuccini, s.n.c. 71013 San Giovanni Rotondo, Foggia, Italy
²Azienda Istituto Ospitalieri - Medical Genetics, Cremona, Italy

Evaluation of: Wapner RJ, Martin CL, Levy B et al. Chromosomal microarray versus karyotype for prenatal diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 367(23), 2175-2184 (2012).

Prenatal diagnosis is now offered to high-risk pregnancies, including advanced maternal age ultrasound anomalies and positive Down's syndrome screening, and karyotype on cultured fetal material is the test of choice to screen these pregnancies. However, microscope analysis can detect gross chromosome abnormalities, highlighting the need for more sensitive techniques. It has recently been established that the higher resolution of microarray-based platforms increase the diagnostic yield, offering more information to couples, and it is being discussed.

Prenatal2FastTest®

Cariotipo tradizionale + Array-CGH

Table 3. Frequency and Clinical Interpretation of Microdeletions and Duplications on Chromosomal Microarray in the 3822 Samples with a Normal Karyotype, According to Indication for Prenatal Testing

| Indication for Prenatal Diagnosis | Normal Karyotype | Common Benign | Pathogenic | Uncertain Clinical Significance (N=130) | | Total Known Pathogenic and Potential for Clinical Significance* |
|---------------------------------------|------------------|---------------|------------|---|-------------------------------------|---|
| | | | | Likely to Be Benign | Potential for Clinical Significance | |
| | no. | no. (%) | no. (%) | no. (%) | no. (%) | no. (%) [95% CI]† |
| Any | 3822 | 1234 (32.3) | 35 (0.9) | 69 (1.8)‡ | 61 (1.6) | 96 (2.5) [2.1–3.1] |
| Advanced maternal age | 1966 | 628 (31.9) | 9 (0.5) | 37 (1.9) | 25 (1.3) | 34 (1.7) [1.2–2.4] |
| Positive on Down's syndrome screening | 729 | 247 (33.9) | 3 (0.4) | 13 (1.8) | 9 (1.2) | 12 (1.6) [0.9–2.9] |
| Anomaly on ultrasonography | 755 | 247 (32.7) | 21 (2.8) | 16 (2.1) | 24 (3.2) | 45 (6.0) [4.5–7.9] |
| Other§ | 372 | 112 (30.1) | 2 (0.5) | 3 (0.8) | 3 (0.8) | 5 (1.3) [0.6–3.1] |

7-8%

13-14%

* Total includes those predetermined as known to be pathogenic and those classified by the clinical advisory committee as clinically relevant.
 † CI denotes confidence interval.
 ‡ Includes 36 samples determined likely to be benign by the study geneticist and 33 determined by the independent clinical advisory committee on the basis of size, gene content, inheritance, the literature, and ultrasonography findings.
 § Other indications include family history, previous pregnancy with chromosomal abnormalities, and elective decision.

Wapner RJ et al. N Engl J Med 2012;367



Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011

A. NOVELLI¹, F. R. GRATI², L. BALLARATI³, L. BERNARDINI¹, D. BIZZOCO⁴, L. CAMURRI⁵, R. CASALONE⁶, L. CARDARELLI⁷, P. CAVALLI⁸, R. CICCONE⁹, M. CLEMENTI¹⁰, L. DALPRÀ¹¹, M. GENTILE¹², G. GELLI¹³, P. GRAMMATICO¹⁴, M. MALACARNE¹⁵, A. M. NARDONE¹⁶, V. PECILE¹⁷, G. SIMONI², O. ZUFFARDI⁹ and D. GIARDINO³

¹Mendel Laboratory, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy; ²TOMA Advanced Biomedical Assays S.p.A., Busto Arsizio (VA), Italy; ³Laboratory of Medical Cytogenetics and Molecular Genetics, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy; ⁴Artemisia Fetal-Maternal Medical Centre, Rome, Italy; ⁵Genetics Department, RDI Rete Diagnostica Italiana, Padova, Italy; ⁶SS Dipartimentale Genetica Azienda Osp. Universitaria Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese, Italy; ⁷Laboratorio Citotest, Consorzio GENiMED, Sarmeola di Rubano, Padova, Italy; ⁸Servizio di Genetica, AO Istituti Ospitalieri, Cremona, Italy; ⁹Biologia Generale e Genetica Medica, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy; ¹⁰U.O. Complessa di Genetica Clinica, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova, Padova, Italy; ¹¹Dipartimento di Neuroscienze e Biotecnologie Mediche, Università di Milano-Bicocca, Monza, Italy; ¹²Dipartimento di Genetica Medica, Ospedale Di Venere, ASL Bari, Italy; ¹³UOSD di Genetica Medica, Centro per la Salute della Donna S. Anna, ASL Rome, Italy; ¹⁴Medical Genetics, Department of Molecular Medicine, Sapienza University, San Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy; ¹⁵Laboratorio di Genetica, Ospedale Galliera, Genova, Italy; ¹⁶Laboratory of Medical Genetics, Fondazione PTV-Policlinico Tor Vergata, Rome, Italy; ¹⁷S.C. Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Burlo Garofalo, Trieste, Italy

KEYWORDS: microarray; position statement; prenatal diagnosis; SIGU; ultrasound fetal abnormalities

ABSTRACT

A precise guideline establishing chromosomal microarray analysis (CMA) applications and platforms in the prenatal setting does not exist. The controversial question is whether CMA technologies can or should soon replace standard karyotyping in prenatal diagnostic practice. A review of the recent literature and survey of the knowledge and experience of all members of the Italian Society of Human Genetics (SIGU) Committee were carried out in order to propose recommendations for the use of CMA in prenatal testing. The analysis of datasets reported in the medical literature showed a considerable 6.4% incidence of pathogenic copy number variations (CNVs) in the group of pregnancies with sonographically detected fetal abnormalities and normal karyotype. The reported CNVs are likely to have a relevant role in terms of nosology for the fetus and in the assessment of reproductive risk for the couple. Estimation of the frequency of copy number variations of uncertain significance (VOUS) varied depending on the different CMA platforms used, ranging from 0–4%, obtained using targeted arrays, to 9–12%, obtained using high-resolution whole genome single nucleotide polymorphism (SNP) arrays. CMA analysis can be considered a second-tier diagnostic test

to be used after standard karyotyping in selected groups of pregnancies, namely those with single (apparently isolated) or multiple ultrasound fetal abnormalities, those with de novo chromosomal rearrangements, even if apparently balanced, and those with supernumerary marker chromosomes. Copyright © 2012 ISUOG. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

BACKGROUND

In the last few years chromosomal microarray analysis (CMA) technology (array comparative genomic hybridization, aCGH; single nucleotide polymorphism array, SNP array) has acquired increasing relevance, becoming a fundamental diagnostic tool in medical genetics. In fact, technological evolution and experimental optimization have resulted in a notable simplification of analytic protocols, leading to a decrease in costs and enabling the progressive spread of this technology in many laboratories all over the world. Encouraging results, in terms of detection rate, were obtained in patients affected by unexplained developmental delay/intellectual disability (DD/ID), autism spectrum disorders (ASD) or multiple congenital anomalies (MCA), in whom

Correspondence to: Dr A. Novelli, Istituto CSS Mendel, Viale Regina Margherita, 261, 00198 Roma, Italy (e-mail: a.novelli@css-mendel.it)

Accepted: 22 December 2011

Prenatal2FastTest®



For reprint orders, please contact reprints@expert-reviews.com

EXPERT
REVIEWS

The future of prenatal diagnosis: karyotype, microarray or both? Technical and ethical considerations

Expert Rev. Proteomics 10(2), 131–134 (2013)

Antonio Novelli*¹,
Pietro Cavalli² and
Laura Bernardini¹

¹Mendel Laboratory, IRCCS Casa
Sollievo della Sofferenza Hospital,
Viale dei Cappuccini, s.n.c.71013 San
Giovanni Rotondo, Foggia, Italy

²Azienda Istituti Ospitalieri – Medical
Genetics, Cremona, Italy

Evaluation of: Wapner RJ, Martin CL, Levy B *et al.* Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 367(23), 2175–2184 (2012).

Prenatal diagnosis is now offered to high-risk pregnancies, including advanced maternal age, ultrasound anomalies and positive Down's syndrome screening, and karyotype on cultured fetal material is the test of choice to screen these pregnancies. However, microscope analysis can only detect gross chromosome abnormalities, highlighting the need for more sensitive techniques. It has recently been established that the higher resolution of microarray-based platforms can increase the diagnostic yield, offering more information to couples, and it is being discussed as a



Prenatal2FastTest®



- Unisce i vantaggi di entrambe le tecniche e ne riduce i limiti
- Aumenta la diagnosi di difetti congeniti fetali/RM
- E' una scelta di qualità
- Raccomandato specialmente con evidenze ecografiche, anomalie del volume amniotico, età materna avanzata, anomalie cromosomiche familiari

Diagnosi fetale Consulenza genetica

Tutte le procedure di diagnosi fetale devono essere accompagnate da informazione dettagliata circa rischi, limiti e benefici, dalla accettazione della procedura da parte del paziente.

Le conclusioni delle indagini genetiche fetali devono essere comunicate con consulenza genetica.