



AZIENDA OSPEDALIERA
UNIVERSITARIA SENESE



U.O.C. Genetica Medica

USL7

AZIENDA USL 7 DI SIENA
U.O. Ginecologia e Ostetricia Valdelsa



La diagnosi prenatale:
presente e futuro

Congresso

23 settembre 2009

Ospedale Valdelsa, auditorium

QF-PCR:
esperienza senese e europea

Ilaria Longo
Genetica Medica AOUS

QF-PCR

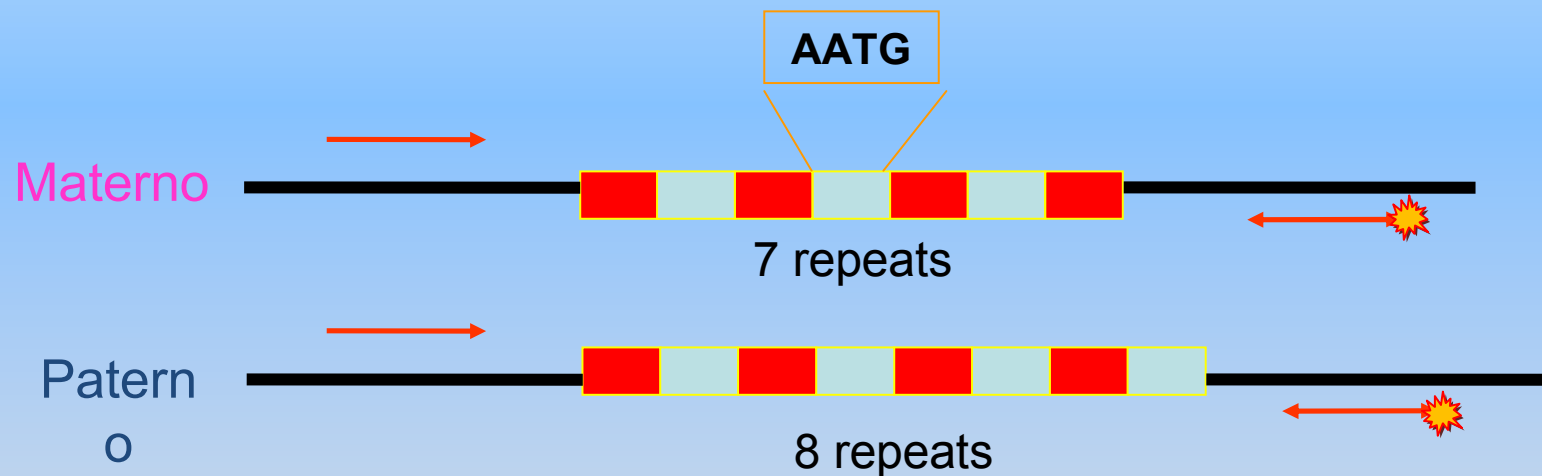
(Quantative Fluorescent PCR)

Tecnica di biologia molecolare usata per identificare le aneuploidie dei cromosomi 13, 18, 21, X e Y

- **Rapida**
- **Efficiente**
- **Accurata**



Amplificazione QF-PCR con Short Tandem Repeats (STRs)



Eterozigote o diallelico = Due alleli di lunghezza differente

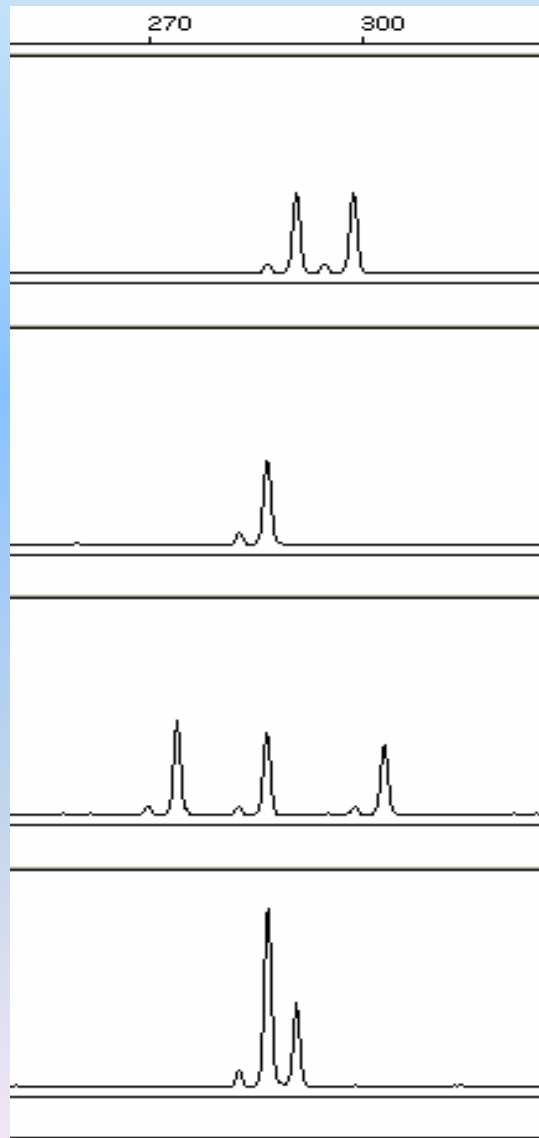
Omozigote o monoallelico = Due alleli della stessa lunghezza

Trisomico = triallelico o diallelico (2:1 - 1:2)

PROCEDURE ANALITICHE QF-PCR

- Estrazione DNA
- Amplificazione: 2 multiplex con almeno 15 STR (tetra e pentanucleotidi repeats) marcati in 5' con FAM, HEX, TET
- Elettroforesi capillare (Sequenziatore Automatico) ed elaborazione dati GeneScan 3.1.2

Pattern QF-PCR



Eterozigote
1:1

Omozigote
Non informativo

Trisomico
Triallelico 1:1:1

Trisomico
Dialelico 2:1 o (1:2)

ANEUFAST®

IVD/CE 98/79/CE - ISO 9001:2000, 13485:2003

- 2 mix di screening S1 - S2 (+ 4 dedicate 21, 18, 13, XY)

30 STR tetra e pentanucleotidi di cui:

9 per il cromosoma X (3 pseudoautosomici*)

5 per il cromosoma Y* - SRY

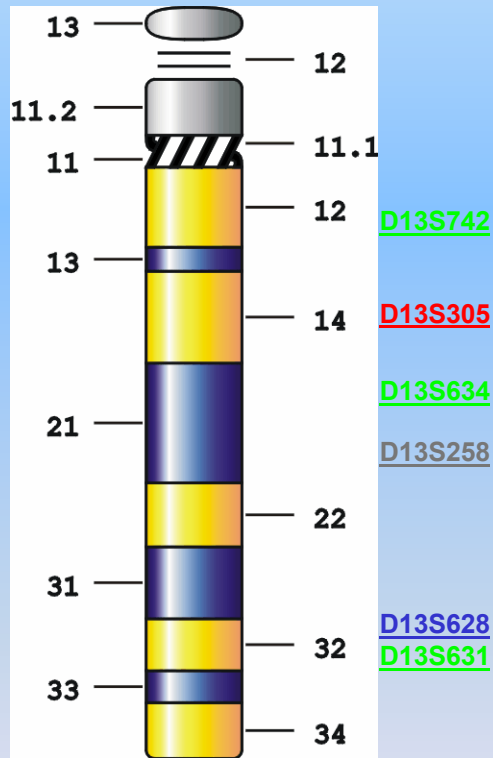
7 specifici per il cromosoma 21

7 specifici per il cromosoma 18

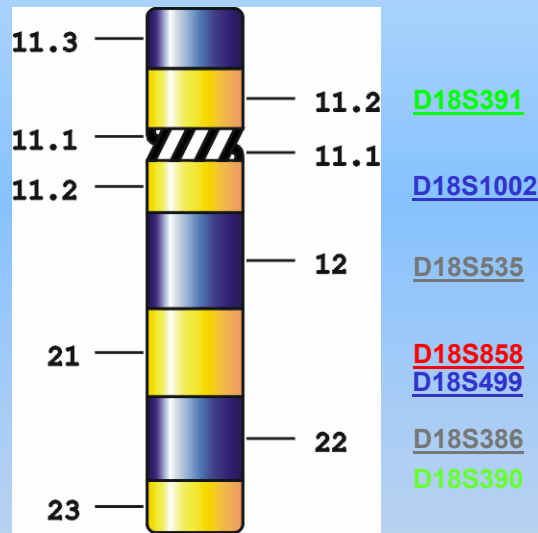
6 specifici per il cromosoma 13

www.aneufast.com

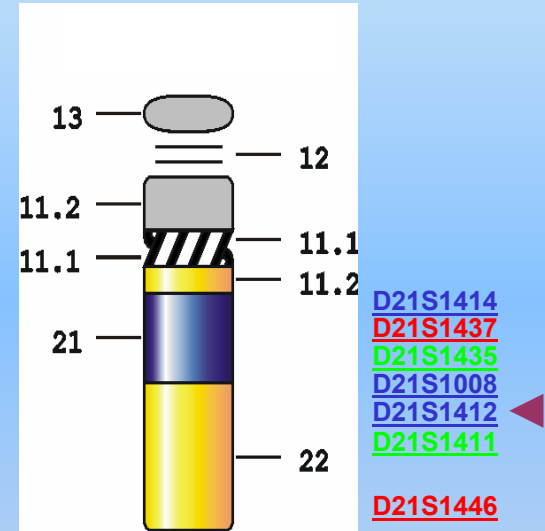
STRs utilizzati nelle multiplex QF-PCR



13



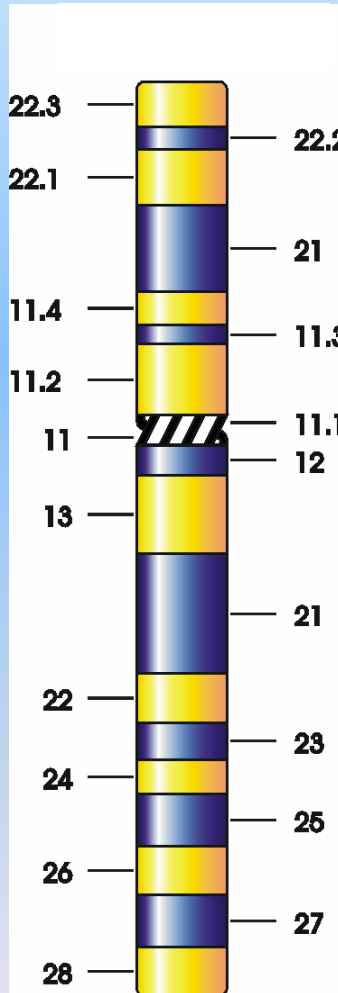
18



21

- 6-FAM
- VIC
- NED
- PET

STRs utilizzati nelle multiplex QF-PCR



X

[DXYS218 \(PAR1\)](#)
[DXYS156 \(PAR1\)](#)

[AMLX](#)

[DXS6803](#)

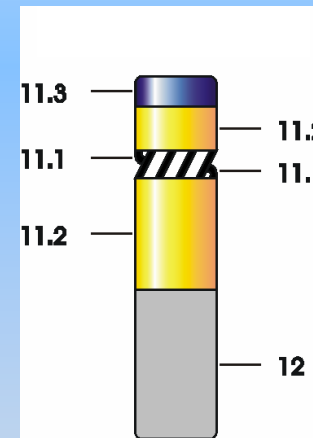
[SBMA](#)

[DXS6809](#)

[DXS8377](#)

[HPRT](#) / [D21S1411](#)

[X22 \(PAR2\)](#)



Y

[DXYS218 \(PAR1\)](#)
[DXYS156 \(PAR1\)](#)

[AMLY SRY](#)

[X22 \(PAR2\)](#)

- 6-FAM
- VIC
- NED
- PET

I 17 marcatori di S1 e S2 sono sufficienti per un risultato definitivo in circa il 96% dei casi.

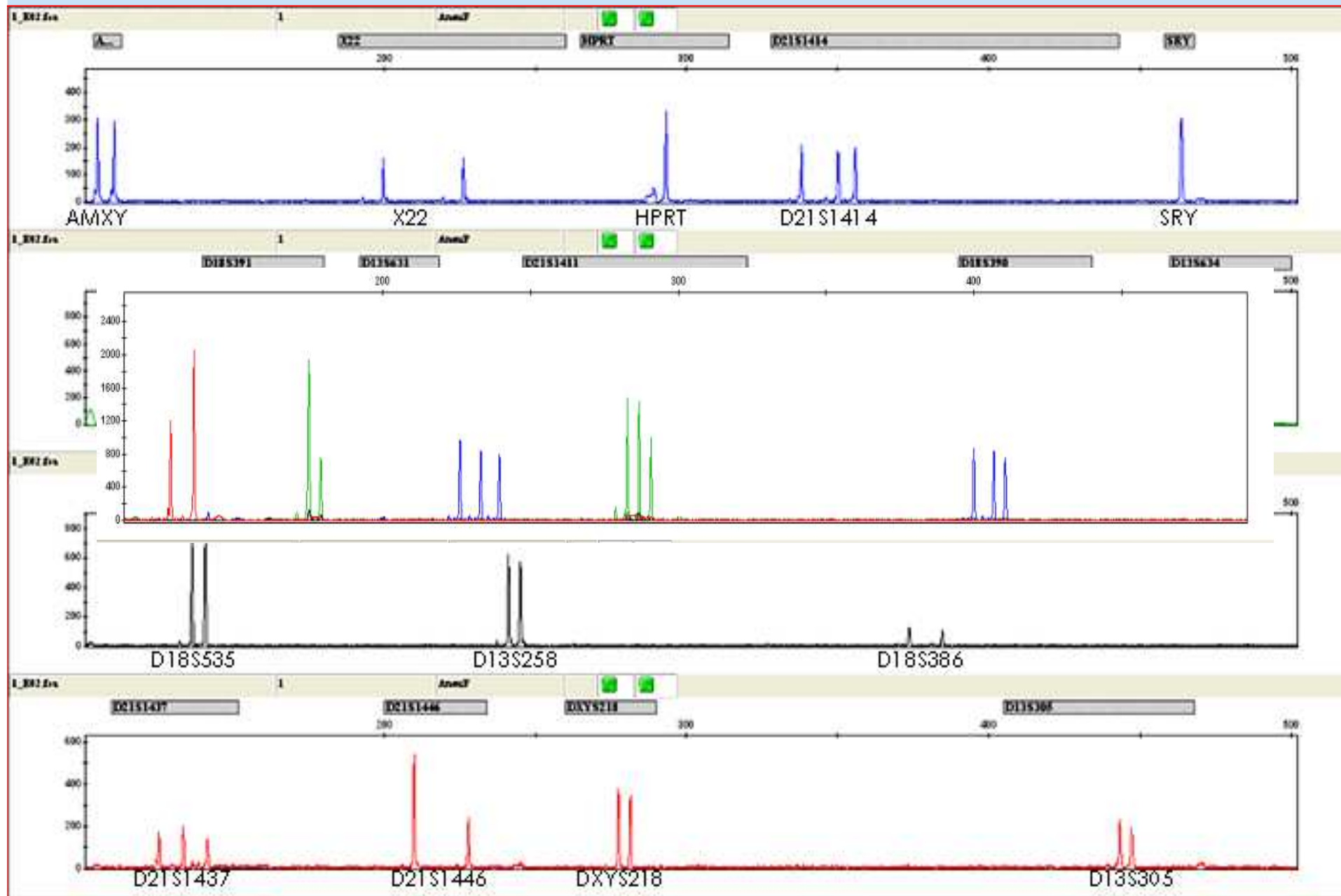
Negli altri casi verranno usati i marcatori addizionali presenti nei pannelli cromosoma specifici dell'Aneufast QF-PCR Kit (M13, M18, M21 and MXY).

| S1 | S2 | MXY | M21 | M18 | M13 |
|----------|----------|---------|----------|----------|---------|
| AMXY | SRY | SRY | D21S1411 | D18S386 | D13S631 |
| D21S1411 | X22 | AMXY | D21S1435 | D18S391 | D13S634 |
| D21S1446 | DXYS218 | HPRT | D21S1437 | D18S858 | D13S742 |
| D13S631 | HPRT | SBMA | D21S1412 | D18S499 | D13S628 |
| D13S305 | D21S1411 | DXS6803 | D21S1008 | D18S1002 | |
| D18S535 | D21S1435 | DXS6809 | | | |
| D18S391 | D13S634 | DXS8377 | | | |
| | D13S258 | | | | |
| | D18S386 | | | | |
| | D18S390 | | | | |

La combinazione dei marcatori inclusi nell'Aneufast QF-PCR Kit consente di identificare le aneuploidie dei cromosomi 13, 18, 21, X e Y con il 100% di sensibilità e specificità.

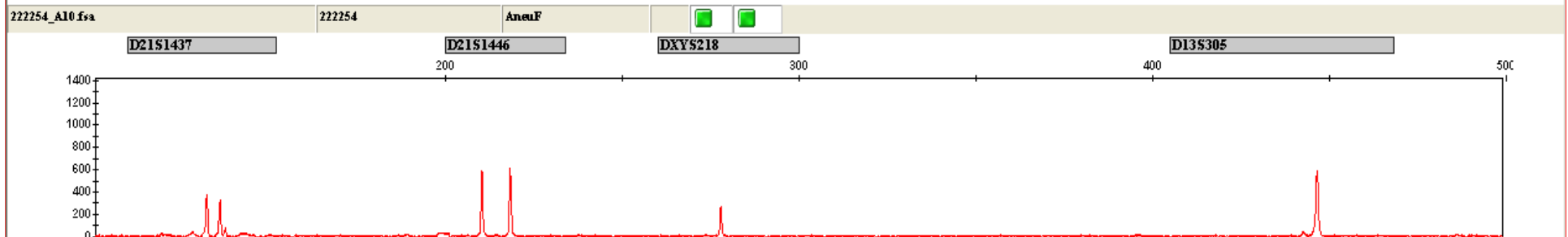
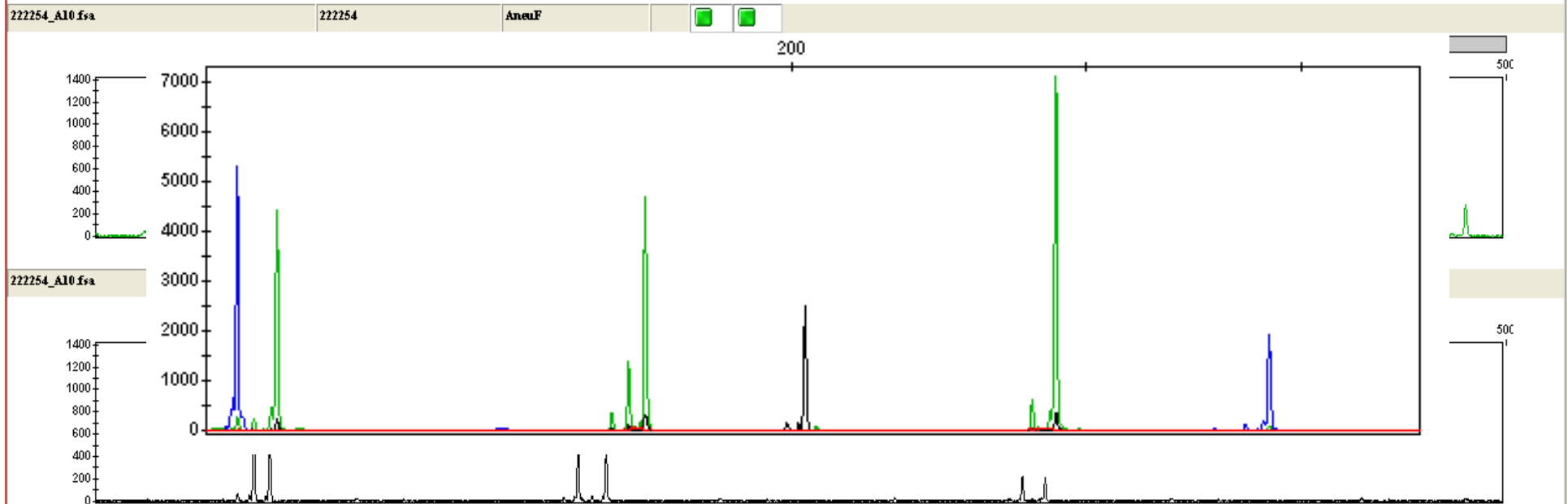
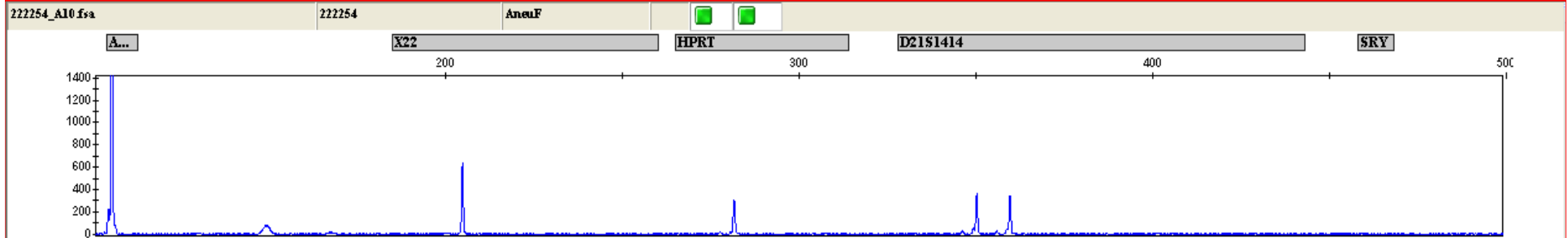
47,XY+21

ANEUPFAST®



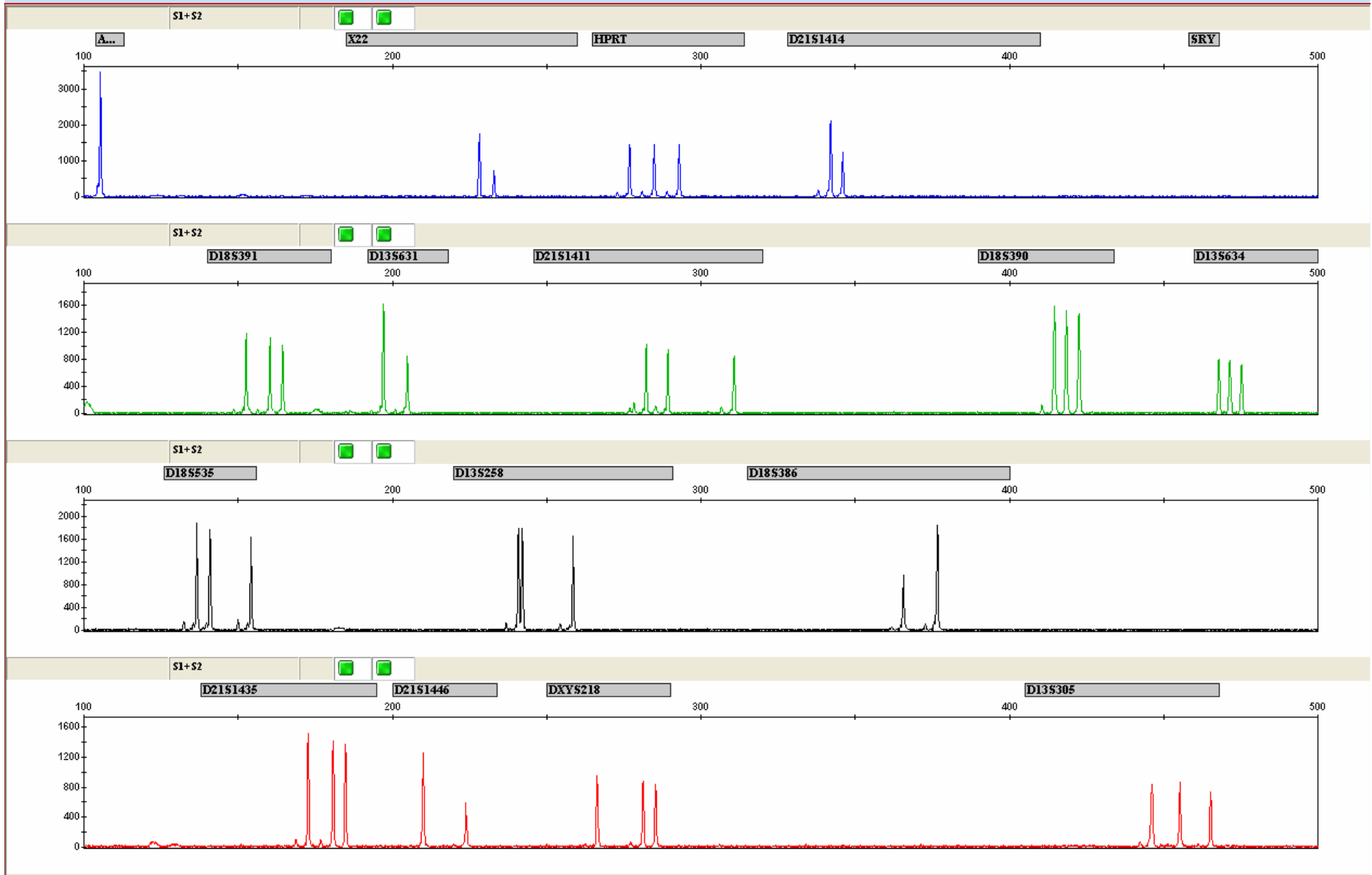
45, X

Aneufast®



69,XXX

Aneufast®



Evoluzione della diagnosi prenatale nel mondo

BARCELONA
ESHG 2008

Kathy Mann
London

Dal maggio 2007 il Sistema sanitario inglese offre

il solo test di QF-PCR alle gravide con aumento di rischio per s. di Down
ai test non invasivi

riservando la QF-PCR seguita dal cariotipo a:

- feti con anomalie ecografiche compresa TN maggiore di 3mm (prima 14 sett.) o maggiore di 6 mm (tra 14 e 20)
- Feti con due o più soft markers
- genitore portatore di riarrangiamento
- altre gravidanze indicanti un aumento di rr per sbilanciamento cr.

Information for Health Care Professionals

Guidelines for QF-PCR testing alone for women at increased risk for Down's syndrome

In line with imminent National Screening Committee guidelines on fetal chromosome analysis, from 1st May 2007 the South East England Genetics Clinical Network will offer rapid aneuploidy exclusion using Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) alone for women found to be at increased risk of Down's syndrome following a nationally recognised screening test.

The purpose of this information leaflet is to provide information to support this change in policy from dual testing to the introduction of single testing using QF-PCR for rapid prenatal diagnostic testing for trisomy 21 (Down's syndrome), trisomy 18 (Edwards syndrome) and trisomy 13 (Patau's syndrome). The National Screening Committee (NSC) is producing guidelines for standards required for the offer of universal Down's syndrome screening and the introduction of rapid aneuploidy exclusion testing. These will be found at <http://www.screening.nhs.uk/downs/home.htm>

QF-PCR and what it detects.

This is a rapid molecular test that can identify the number of copies of specific chromosomes present in a sample. Within the context of the new guidelines for the national Down's syndrome screening programme QF-PCR will be used to detect trisomies 13, 18, and 21, i.e. the most common clinically significant chromosomal abnormalities. It will not be used to detect abnormalities in other chromosomes or to routinely determine the chromosomal sex.

How QF-PCR works.

All chromosomes have blocks of DNA ("markers") containing repeated sequences, where the number of repeats varies from one chromosome to another. For instance, at a particular place on chromosome 21, a marker may have 5 repeats on one chromosome 21, 4 on another and so on. Using a genetic analyser the relative size and number of peaks for any one marker can be used to quantify the number of chromosomes present.

Evoluzione della diagnosi prenatale nel mondo

VIENNA
ESHG 2009

Nijmegen
and
Stockholm

Dal 2008 in Nijmegen e Stoccolma offrono

alternativamente il solo test QF-PCR oppure cariotipo
dopo consulenza genetica

In Nijmegen il 66% delle donne hanno scelto solo QF-PCR

In Stoccolma il 57% delle donne hanno scelto solo QF-PCR

Evoluzione della diagnosi prenatale nel mondo

Esperienza
ITALO-SPAGNOLA

PRENATAL DIAGNOSIS

Prenat Diagn 2009; **29**: 40–49.

Published online in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/pd.2192

Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience[†]

Vincenzo Cirigliano^{1,2*}, Gianfranco Voglino³, Elena Ordoñez^{1,2}, Antonella Marongiu³, M. Paz Cañadas¹, Maijo Ejarque¹, Laura Rueda^{1,2}, Elisabet Lloveras⁴, Carme Fuster² and Matteo Adinolfi⁵

¹*Departament de Genètica Molecular, General Lab, 08029 Barcelona, Spain*

²*Unitat de Biologia, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

³*Molecular Genetics and Cytogenetics Lab, Promea S.p.A., 10126 Turin, Italy*

⁴*Departament de Citogenètica, General Lab, 08029 Barcelona, Spain*

⁵*The Galton Laboratory, University College London, NW1 2HE London, UK*

Utilizzo clinico della QF-PCR

Trisomie 13, 18, 21 e triploidie su 43.000 prenatali

| <i>Cariotipo</i> | <i>QF-PCR</i> | <i>Citogenetica</i> |
|---------------------------|---------------|---------------------|
| 47,XX,+21; 47,XY,+21 | 753 | 753 |
| 47,XX,+18; 47,XY,+18 | 299 | 299 |
| 47,XX,+13; 47,XY,+13 | 127 | 127 |
| 69,XXX; 69,XXY; 69,XYY | 103 | 103 |
| Aneuploidie totali | 100% | 1282 |

Cirigliano, Voglino et. al. (2008). 58th Am Soc Human Genetics, Philadelphia, 11-1

Utilizzo clinico della QF-PCR

Aneuploidie dei cromosomi X Y

| <i>Cariotipo</i> | <i>QF-PCR</i> | <i>Citogenetica</i> |
|---------------------------|---------------|---------------------|
| 45,X | 106* | 107 |
| 47,XXY | 66 | 66 |
| 47,XYY | 48 | 48 |
| 47,XXX | 36* | 32(+ 4 mos. X/XX) |
| 49, XXXXX - 49,XXXXY | 5 | 5 |
| 48,XXYY | 2 | 2 |
| 48,XXY,+21 - 48,XXY,+18 | 7 | 7 |
| 48,XXX,+18 | 2 | 2 |
| 46,X,+21 | 1 | 1 |
| 70,XXY,+21 | 1 | 1 |
| 68,XX | 1 | 1 |
| Aneuploidie totali | 99,2% | 274 |

CASISTICA ANALIZZATA

Motivo di Accesso

Sensibilità QF-PCR rispetto al cariotipo

Età Materna

Test biochimici positivi

Storia familiare Positiva

Ansia materna

100%

TN aumentata

97%

Marcatori ecografici

95%



ALTRI VANTAGGI....

Grazie alla QF-PCR è possibile dare una risposta quando

Il campione è scarso per la messa in coltura

La crescita cellulare è scarsa o troppo lenta

La coltura risulta contaminata (batteri, funghi ec)

COMPLIANCE

- ansietà materna per test biochimici positivi
- ansietà per età materna (es. primipare > 40 aa)
- pregresse gravidanze con aneuploidia

Non ci sono diagnosi incerte

Consulenza più chiara

Decisione più serena per i genitori

U.O.C. Genetica Medica

Responsabile

Alessandra Renieri

Medici

Francesca Mari, Annabella Marozza, Maria Antonietta Mencarelli, Marzia Pollazzon, Vera Uliana

Biologi

Mirella Bruttini, Roberta Mancini, Massimo Molinelli, Lucia Pucci, Ilaria Longo, Ilaria Meloni, Francesca Ariani

Tecnico

Antonella Marconi

Infermiere

Clementina Bonsera, Antonella Ciacci

Personale amministrativo

Alessio Fabbiano

Dottorandi di ricerca

Mariangela Amenduni, Roberta De Filippis, Vittoria Di Sciglio, Eleni Katzaki, Elena Marcocci, Mafalda Mucciolo, Dalila Rondinella, Ariele Rosseto, Filomena Tiziana Papa

U.O.C. Genetica medica

Terzo lotto, piano primo - Telefono: 0577 585316

Orari: dal lunedì al venerdì, 9-19

E-mail: geneticamed@unisi.it

Progetto grafico e stampa a cura dell'Ufficio relazioni con il pubblico
Ultima revisione 24 dicembre 2008



AZIENDA OSPEDALIERA
UNIVERSITARIA SENESE
Policlinico Santa Maria alle
Scotte



U.O.C. Genetica Medica
Responsabile prof.ssa Alessandra Renieri



Analisi prenatale in 48 ore

Servizio di consulenza genetica

Responsabili: dott.ssa Francesca Mari, dott. Renato Scarinci

Servizio diagnostico

Responsabili: dott.ssa Mirella Bruttini, dott.ssa Ilaria Longo,
dott.ssa Roberta Mancini, dott.ssa Lucia Pucci



Cos'è l'analisi di QF-PCR?

La QF-PCR è un metodo rapido di genetica molecolare in grado di diagnosticare entro 48-72 ore le anomalie di numero dei cromosomi più frequentemente riscontrate in diagnostica prenatale:

- la trisomia 21 o Sindrome di Down
- la trisomia 13 o Sindrome di Patau
- la trisomia 18 o Sindrome di Edwards
- le anomalie di numero del cromosoma X (sindrome di Klinefelter e di Turner)
- poliploidie

Non è però in grado di evidenziare i riarrangiamenti cromosomici strutturali, che sono molto rari e di difficile interpretazione relativamente alla previsione di malattia del nascituro.

Perché scegliere la QF-PCR invece che il cariotipo?

Il cariotipo consente di avere una risposta dopo 20 giorni mentre la QF-PCR in 48-72 ore.

Il cariotipo può generare tre tipi di risposte:

- A) feto normale
- B) feto affetto da malattia predittibile
- C) feto con fenotipo non predittibile.

La QF-PCR può generare solo due tipi di risposte:

- A) feto normale
- B) feto affetto da malattie predittibili che coprono il 99% delle possibilità. La QF-PCR consente pertanto una scelta serena e consapevole relativamente alla prosecuzione di gravidanza ad una età gestazionale precoce.

Cosa fare per avere l'analisi di QF-PCR ?

Durante la consulenza genetica prenatale verrà offerta la possibilità di scegliere tra le due opzioni: cariotipo e QF-PCR. Al momento del prelievo verrà fatto firmare il consenso informato appropriato.

L'analisi può essere effettuata su un normale prelievo ottenuto tramite villocentesi o amniocentesi. L'analisi può essere effettuata anche quando la quantità di prelievo è insufficiente per condurre una tradizionale analisi di cariotipo.

Dati degli ultimi 12 mesi:

Donne che hanno scelto solo QF-PCR

- Nottola amnio 24/70 (35%)
- Siena amnio 71/159 (45%)
- Siena CVS 24/98 (25%)

In conclusione

Il servizio offerto a livello di laboratorio è in linea con i più moderni laboratori a livello europeo.



Utilizzo clinico della QF-PCR

Trisomie 13, 18, 21 e triploidie su 43.000 prenatali

| <i>Cariotipo</i> | <i>QF-PCR</i> | <i>Citogenetica</i> |
|---------------------------|---------------|---------------------|
| Mosaicismi | 43 | 72 |
| 92,XXXX | - | 2 |
| Altre aneuploidie | - | 39 |
| Traslocazioni bilanciate | - | 47 |
| Traslocazioni sbilanciate | 15 | 32 |
| Contaminazioni materne | 352 | 29 |
| Fallimenti totali | 21 | 52 |
| Totale | 1612 | 1745 |

Utilizzo clinico della QF-PCR

Trisomie 13, 18, 21 e triploidie su 43.000 prenatali

| | |
|---|-----------|
| Cariotipi anomali | 1612/1745 |
| Sensibilità | 92% |
| Sensibilità <i>vs</i> significato clinico | 95% |
| Specificità | 100% |
| PPV | 100% |
| NPV | 99,7% |