

QF-PCR: esperienza su 43.000 casi.

Gianfranco Voglino

www.promea.net

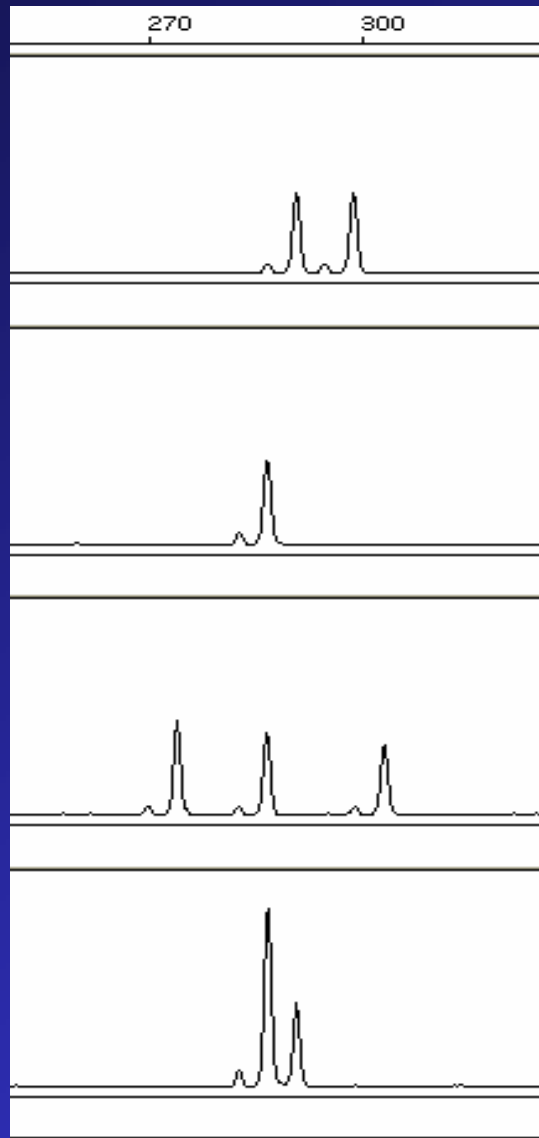
Nottola, 9 giugno 2009

Prenatale non invasiva per trisomia 21.

da N. Wald, SURUSS, 2003

<i>Screening+ Maternal Age</i>	<i>NT</i>	<i>PAPP-A</i>	<i>fβ-hCG</i>	<i>AFP</i>	<i>t-hCG</i>	<i>uE3</i>	<i>Inh-A</i>	<i>DR%</i>	<i>FPR%</i>
NT da sola	X							85	20.0
Test combinato	X	X	X					85	6.1
Dual test			X	X				85	13.1
Triplo test				X	X	X		85	9.3
Quad test				X	X	X	X	85	6.3
Test integrato biochimico		X	X	X	X	X	X	85	2.7
Test integrato completo	X	X	X	X	X	X	X	85	1.2
DR% a FPR = 5% 1° trim	60	79	65	61	61		61		
DR% a FPR = 5% 2° trim			61	42	53	52	59		

Pattern QF-PCR



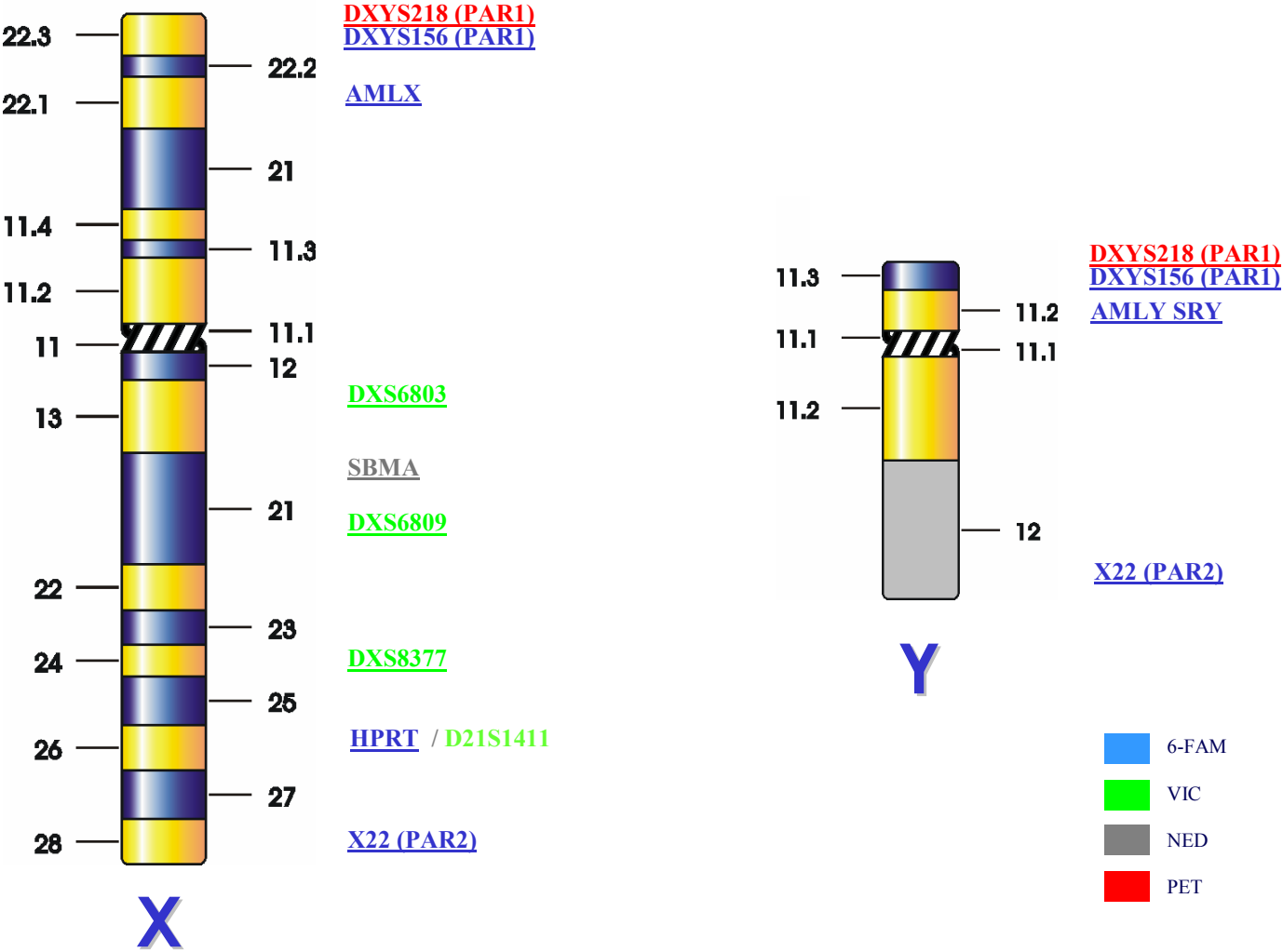
Eterozigote
1:1

Omozigote
Non informativo

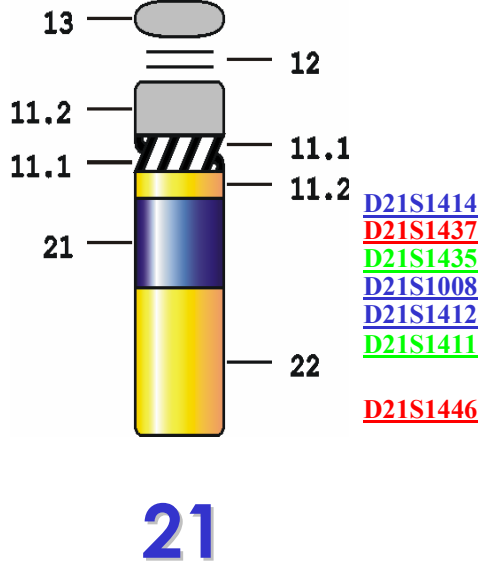
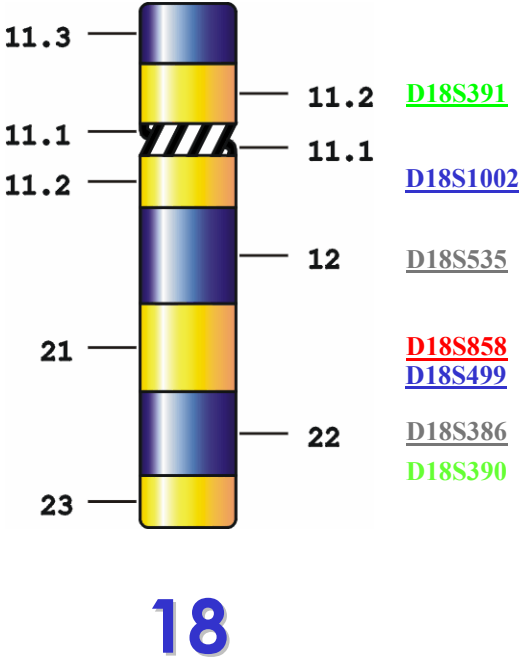
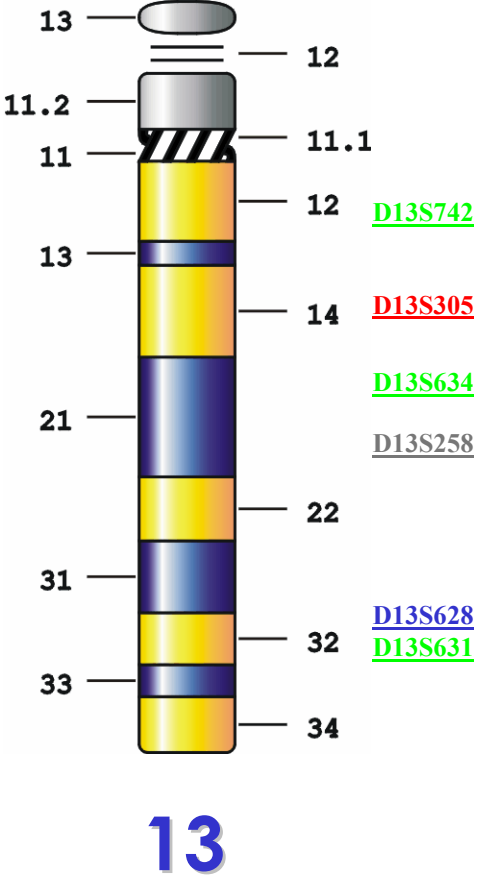
Trisomic
Triallelico 1:1:1

Trisomic
Dialelico 2:1 o (1:2)

Selection of STRs for Multiplex QF-PCR



Selection of STRs for Multiplex QF-PCR

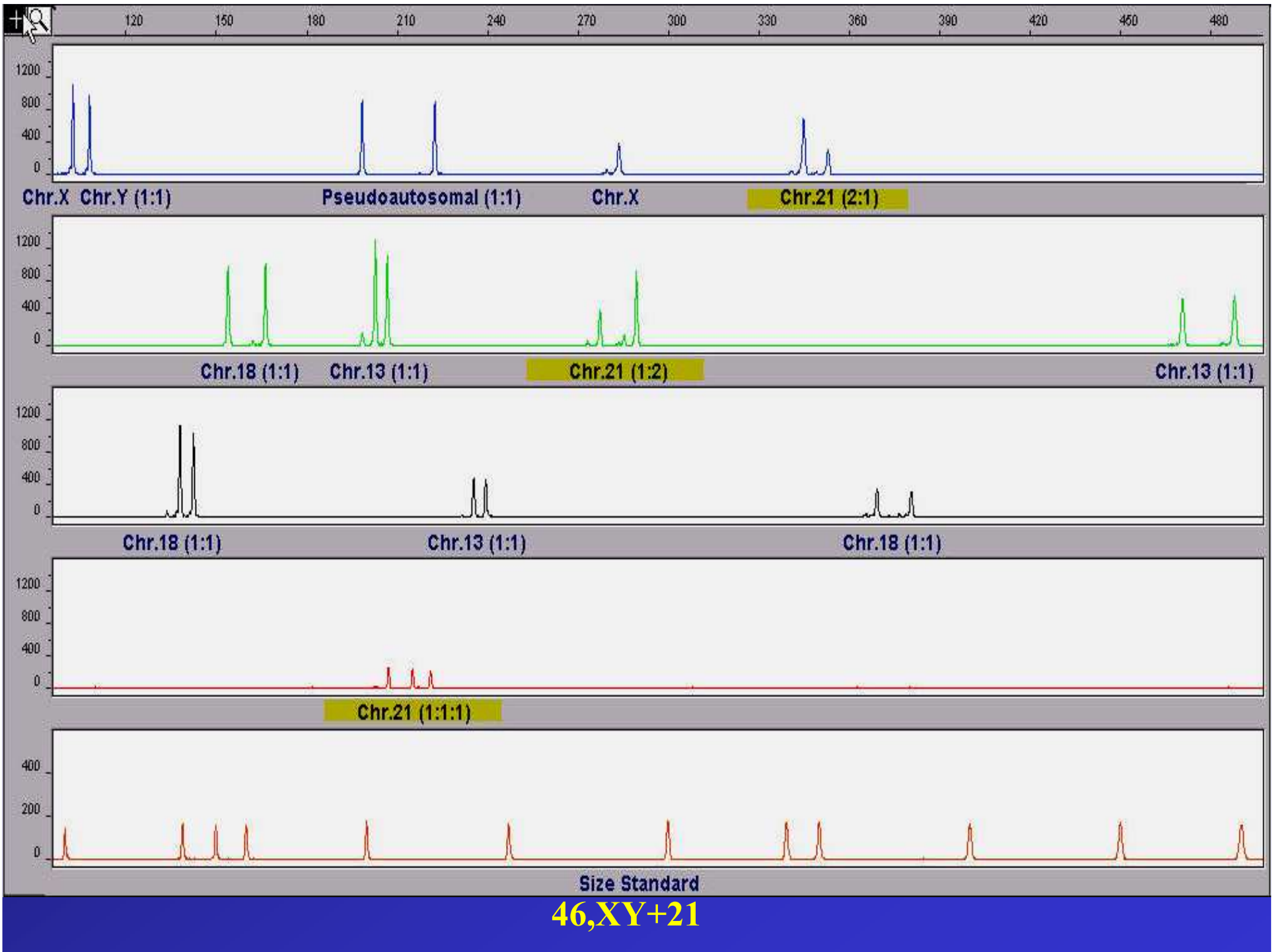


- 6-FAM
- VIC
- NED
- PET

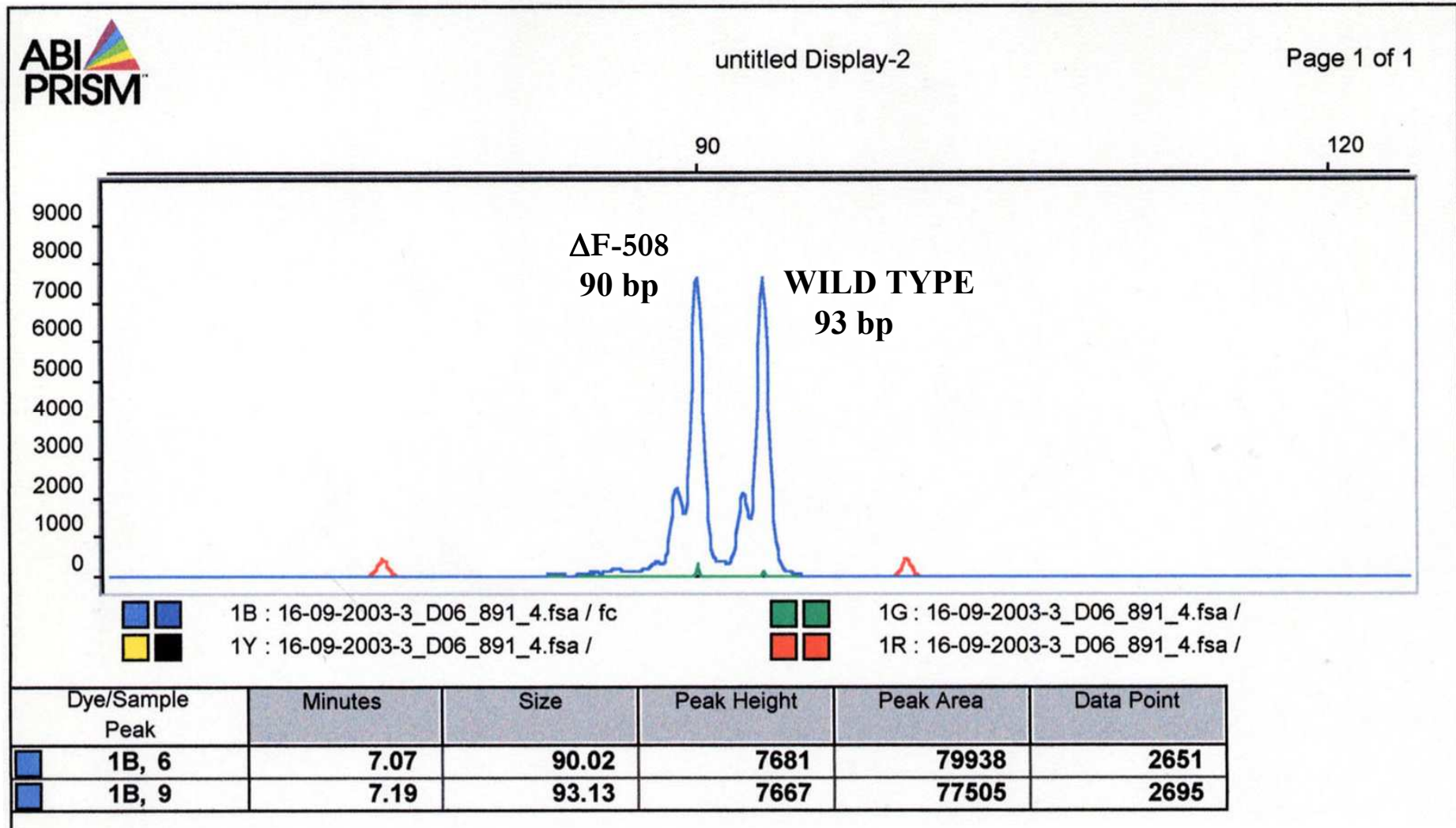
PROCEDURE ANALITICHE QF-PCR

- Estrazione DNA. Bollitura in presenza di Chelex-100 (10')
- Amplificazione controllata: 2 multiplex con almeno 15 STR (tetra e pentanucleotidi repeats) marcati in 5' con FAM, HEX, TET (~ 1,5 h)
- Elettroforesi capillare (ABI PRISM 3100[®]) ed elaborazione dati GeneScan 3.1.2 (15')

www.promea.net/qfpcr/

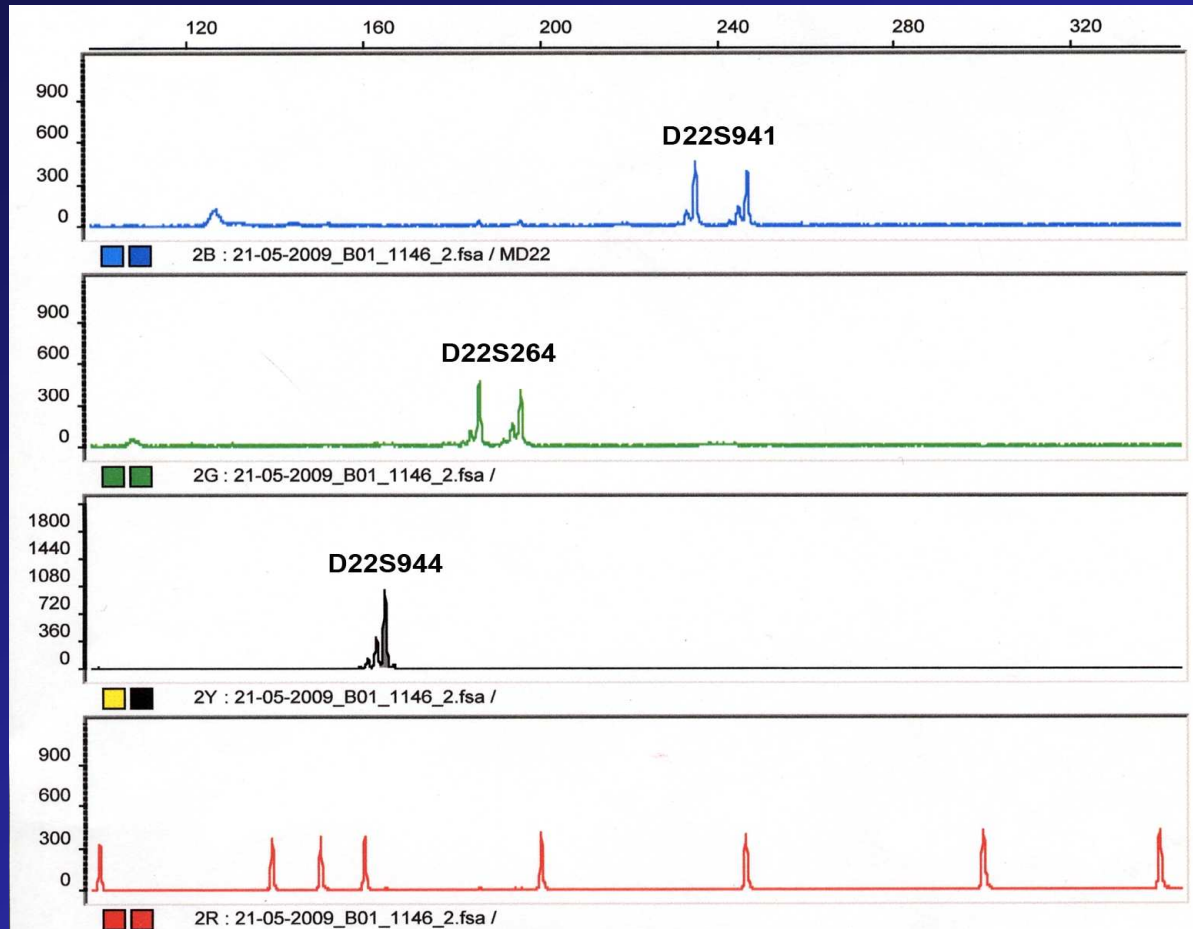


Fibrosi cistica



CATCH 22

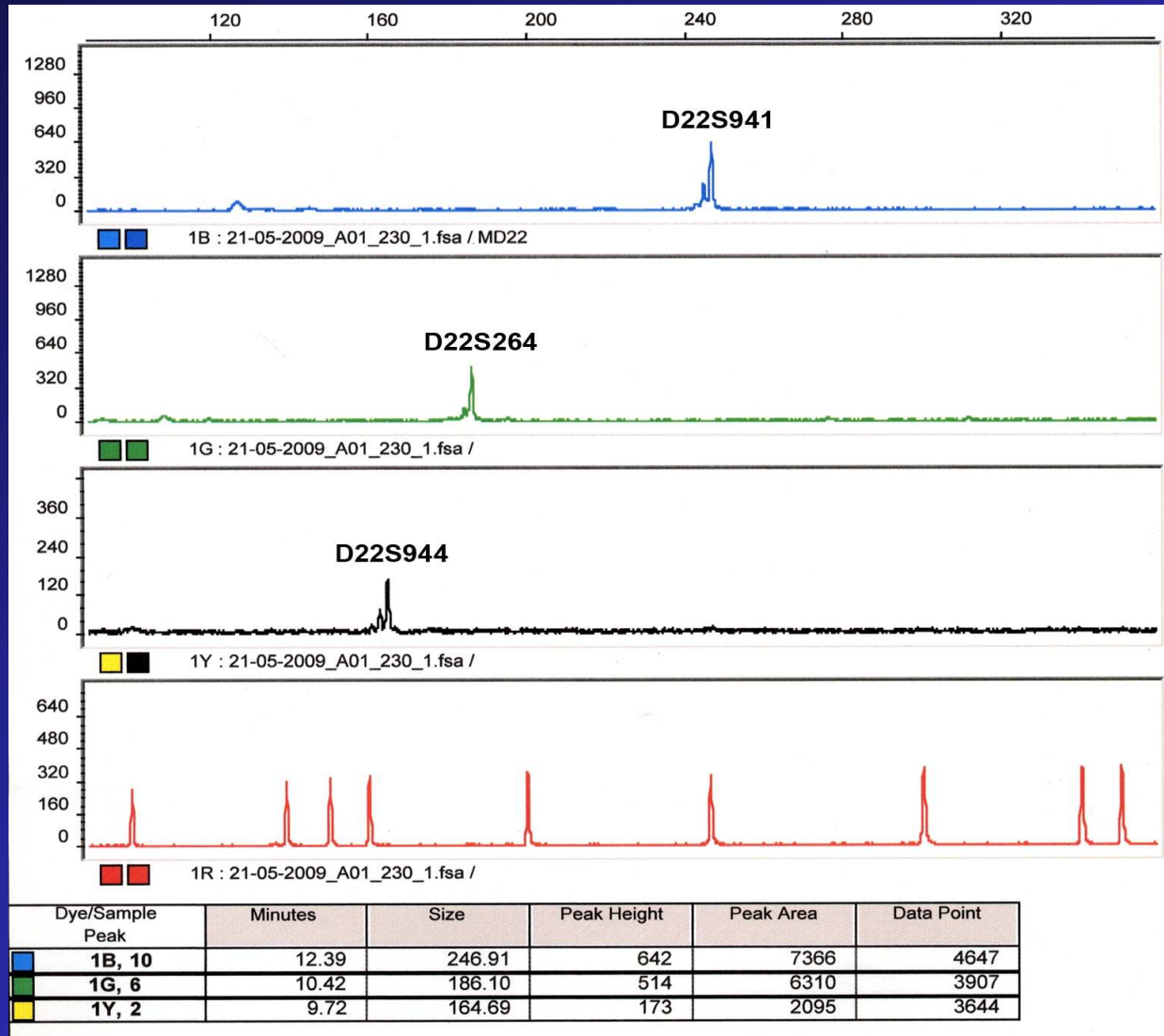
Assenza di microdelezione cromosoma 22

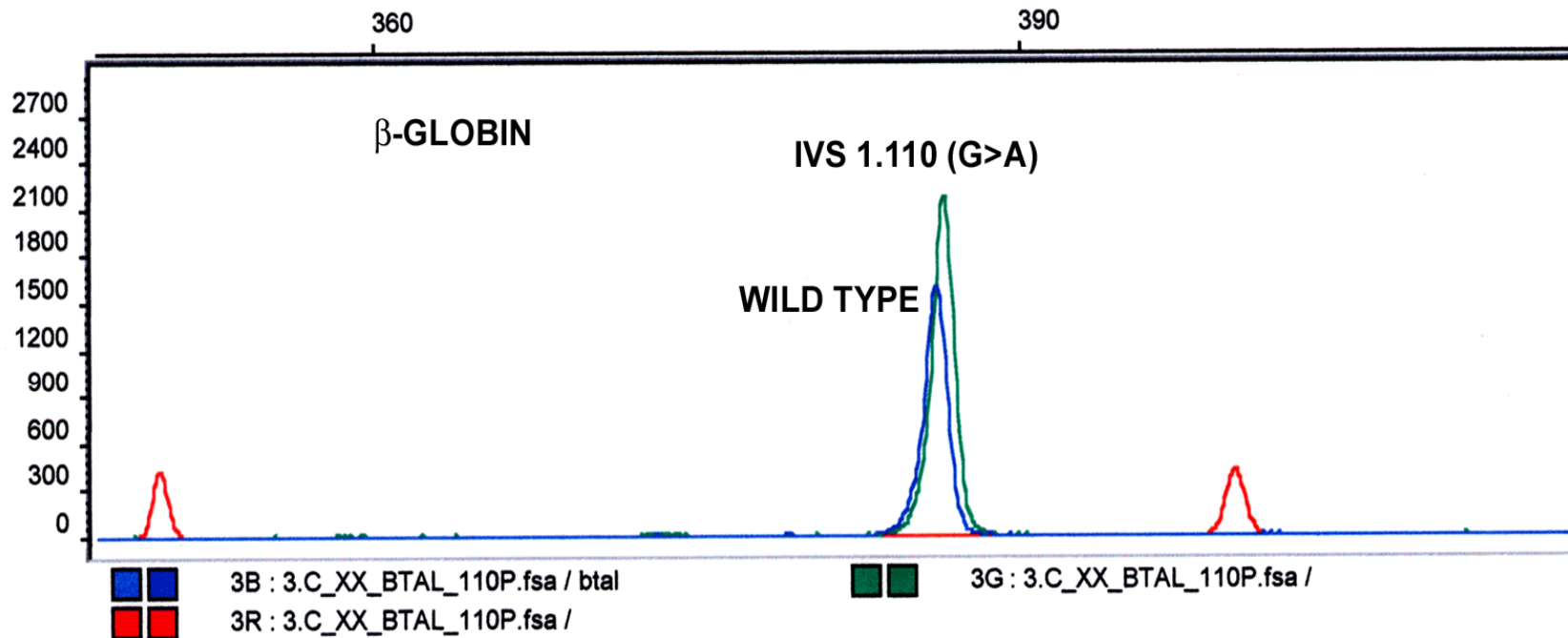


Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
2B, 17	12.01	235.17	476	4992	4502
2B, 19	12.37	246.92	400	4450	4640
2G, 5	10.43	186.19	480	5528	3910
2G, 8	10.73	195.46	405	4827	4024
2Y, 3	9.73	164.65	1033	10380	3648

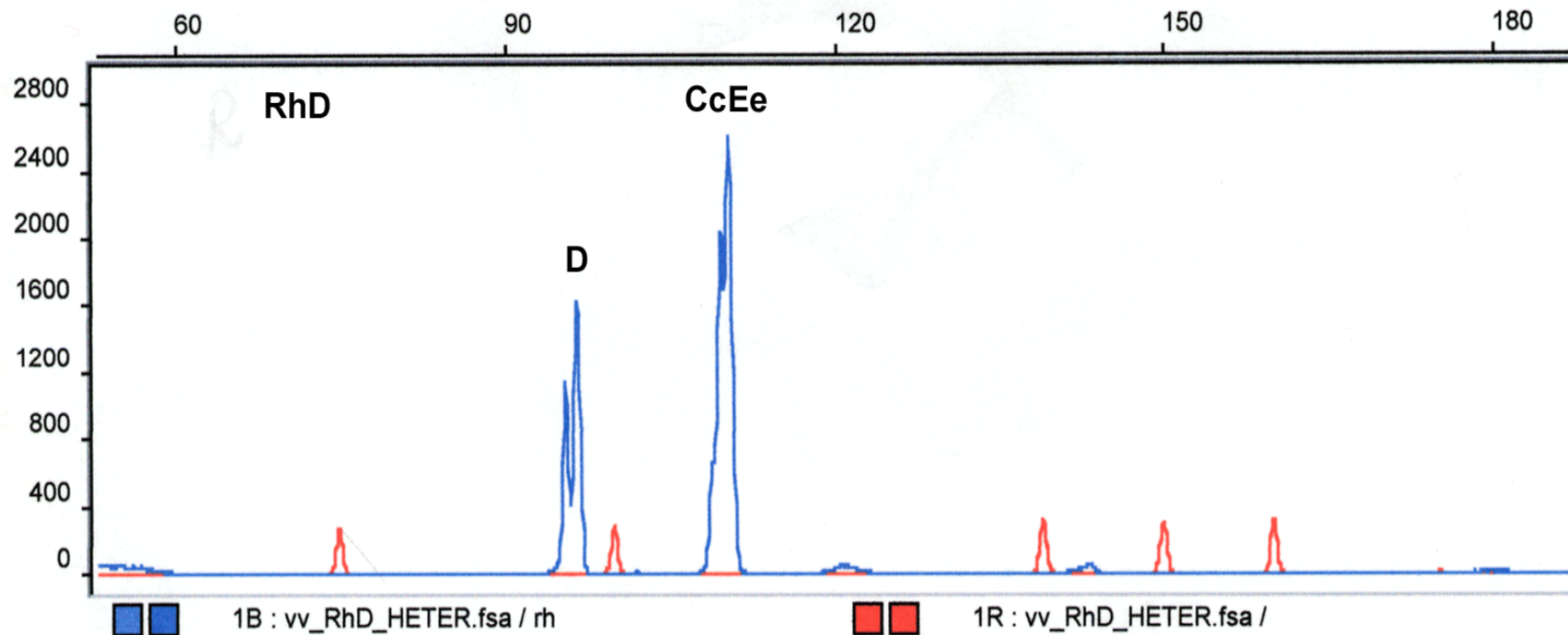
CATCH 22

Presenza di microdelezione cromosoma 22





Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
3B, 37	18.89	386.13	1615	27372	7084
3G, 123	18.90	386.54	2190	35542	7089
3R, 11 •	17.66	350.00	432	5600	6623
3R, 12 •	19.34	400.00	432	6114	7251



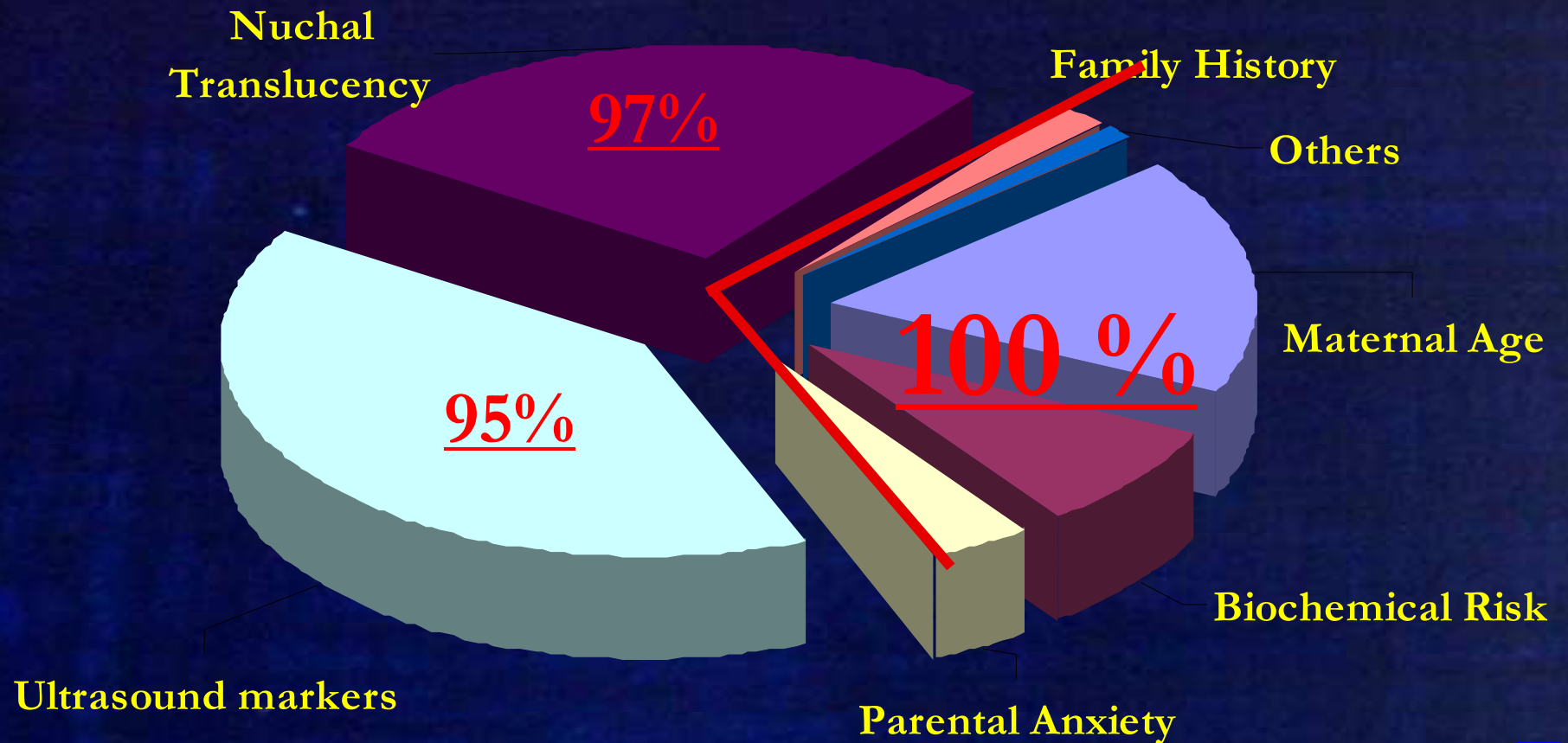
Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
1B, 2	8.60	96.60	1639	16452	3226
1B, 4	9.14	110.45	2634	30419	3427

CARATTERISTICHE QF-PCR.

- **RAPIDITA' DI ESECUZIONE: 3-12 ORE DAL PRELIEVO**
- **TEST POSSIBILE DALLA 11a ALLA 34a SETTIMANA**
- **RICHIEDE MINIME QUANTITA' DI MATERIALE:**
 - 0,5 -1,5 ml di liquido amniotico
 - 1-2 CVS (endocervicali o celomatiche)
 - 10 µl di sangue fetale
- **STATO MICROSATELLITARE DEL CAMPIONE**
- **DIAGNOSI DI TRISOMIE CRIPTICHE**
- **POSSIBILITA' DI LAVORARE SU MATERIALE INCLUSO**
- **100% SENSIBILITA' PER I CROMOSOMI 21, 18, 13, X,Y**
- **99,7% RISPETTO AL CARIOTIPO TRADIZIONALE**

Applicazione clinica della QF-PCR

Sensibilità





PROMEA

22.598 IPD (16.307 AF + 6.291 CVS)

(* 5+2 FALSE NEGATIVES)

<u>INDIC.</u>	N.	+ 21	+ 18	+ 13	TRIPL	X	XXY	XXX	XYY	<u>TOT</u> <u>ANEUP</u>
AGE	15314 68%	166 (3 mos)	32	7	2	2 (4 mos)	24	5	5	243 2%
BIOCH TEST*	3960 18%	92	21	12	5	7 (3 mos)	1	-	2	140 4%
ANX	2274 10%	-	-	-	-	-	4	2	1	7 .03%
ECHO GEN	861 4%	60 (2 mos)	39	22 (1mos)	19 (1mos 21)	3	3	2	-	148* ⁽⁵⁾ 17%
NT+ <u>NT<4 mm</u>	393 2%	56	4	6	-	10 (5 mos)	-	-	-	76* ⁽²⁾ 19%
<u>NT>4mm</u> (Hygroma)	244 1%	65 (2 mos)	45	19	3	45 (4 mos)	-	-	-	177 73%

QF-PCR NEI CONFRONTI DEL CARIOTIPO COLTURALE (46 CROMOSOMI)

Molecular Human Reproduction, Vol. 10: 839-846, 2004
Annals New York Academy of Sciences, Vol. 1075: 288-298, 2006
Prenatal Diagnosis, Vol. 29: 40-49, 2009.

SENSIBILITA' **93,2%**

SPECIFICITA' **100%**

PPV **100%**

NPV **99,7%**

COMPLIANCE

- ✓ Cariotipo + QF-PCR (cariotipo patologico in 7-9 giorni)†
 - ansietà materna per test biochimici positivi
 - ansietà per età materna (es. primipare > 40 aa)†
 - dati ecografici
 - pregresse gravidanze con aneuploidia
 - gravidanze multiple (mono/dizigotiche)†
 - indagini prenatali per malattie genetiche (FC, Hb,)†

COSTI OPERATIVI E PERSONALE

(~10.000 ESAMI/ANNO)

- ✓ PCR MULTIPLEX + AMMORTAMENTO STRUMENTO € 35
- ✓ UN OPERATORE PUO' ESEGUIRE:
 - 10 CAMPIONI/GIORNO (ABI PRISM 310) → 3 tecnici
 - 50 CAMPIONI/GIORNO (ABI PRISM 3100) → 4 tecnici

CARIOTIPO TRADIZIONALE:

- *REATTIVI E STRUMENTI € 80-100 ca /cariotipo*
- *Circa 13 tecnici*



PROMEA

Via Menabrea, 14 Torino

Operatori di laboratorio:

Antonella Marongiu

Annalisa Murro

Antonella Arrigone

Mariangela Muti

Stefania Bosso

Oreste Gregori

Fathima Mohamed H.

Abdullahi

Mariantonietta Patruno

Valeria Antinoro

Gianfranco Voglino

Composizione ed
elaborazione grafica:

Ettore Piccoli