

Le malattie rare: esperienze a confronto

Genova, 15 dicembre 2016



Le problematiche della diagnostica

Domenico Coviello

Le malattie rare: esperienze a confronto

Genova, 15 dicembre 2016



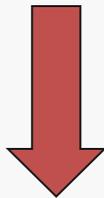
Le problematiche della diagnostica

Parte I – problematiche professionali

LABORATORIO DI GENETICA MEDICA

TEST GENETICI

- * consulenza pre-test
- * informazione



ANALISI DI
LABORATORIO



- * consulenza
post-test
- * interpretazione
risultati

LABORATORIO DI GENETICA MEDICA

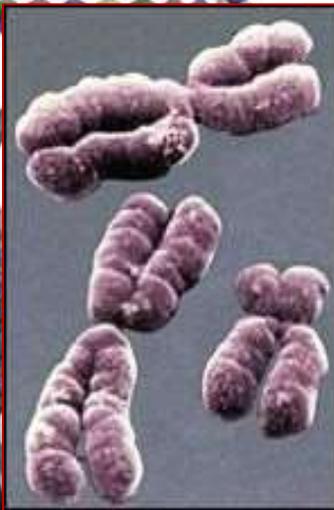
Settore di Citogenetica

Target Sequence

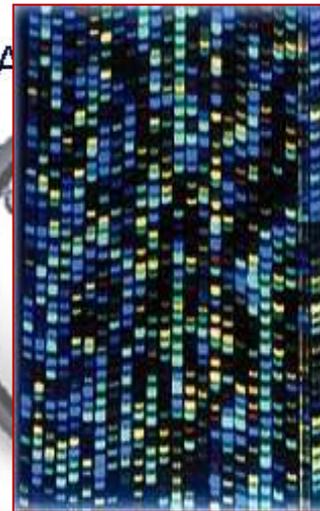
Supercoiled
DNA Strand



Chromosome



DNA



Double Helix
DNA Strand

Settore di Genetica Molecolare

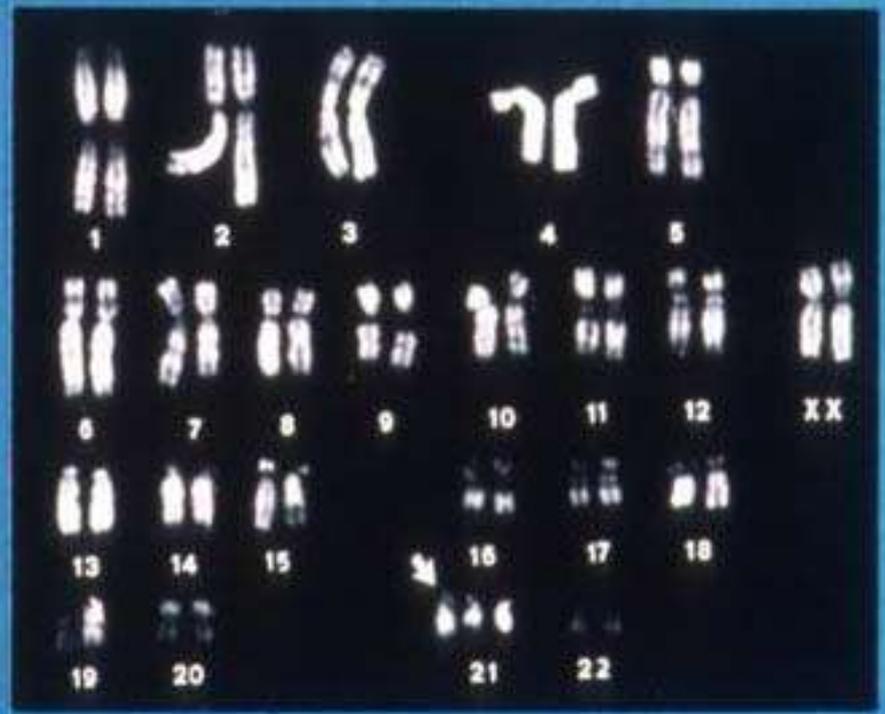
Tipologia diagnostica del Laboratorio di Genetica Medica

- Conferma di diagnosi clinica**
- Diagnosi su sospetto clinico**
- Individuazione della causa della malattia**
- Test genetico di screening**
- Diagnosi presintomatica**
- Test predittivo**
- Test farmacogenetici**

Conferma di diagnosi clinica

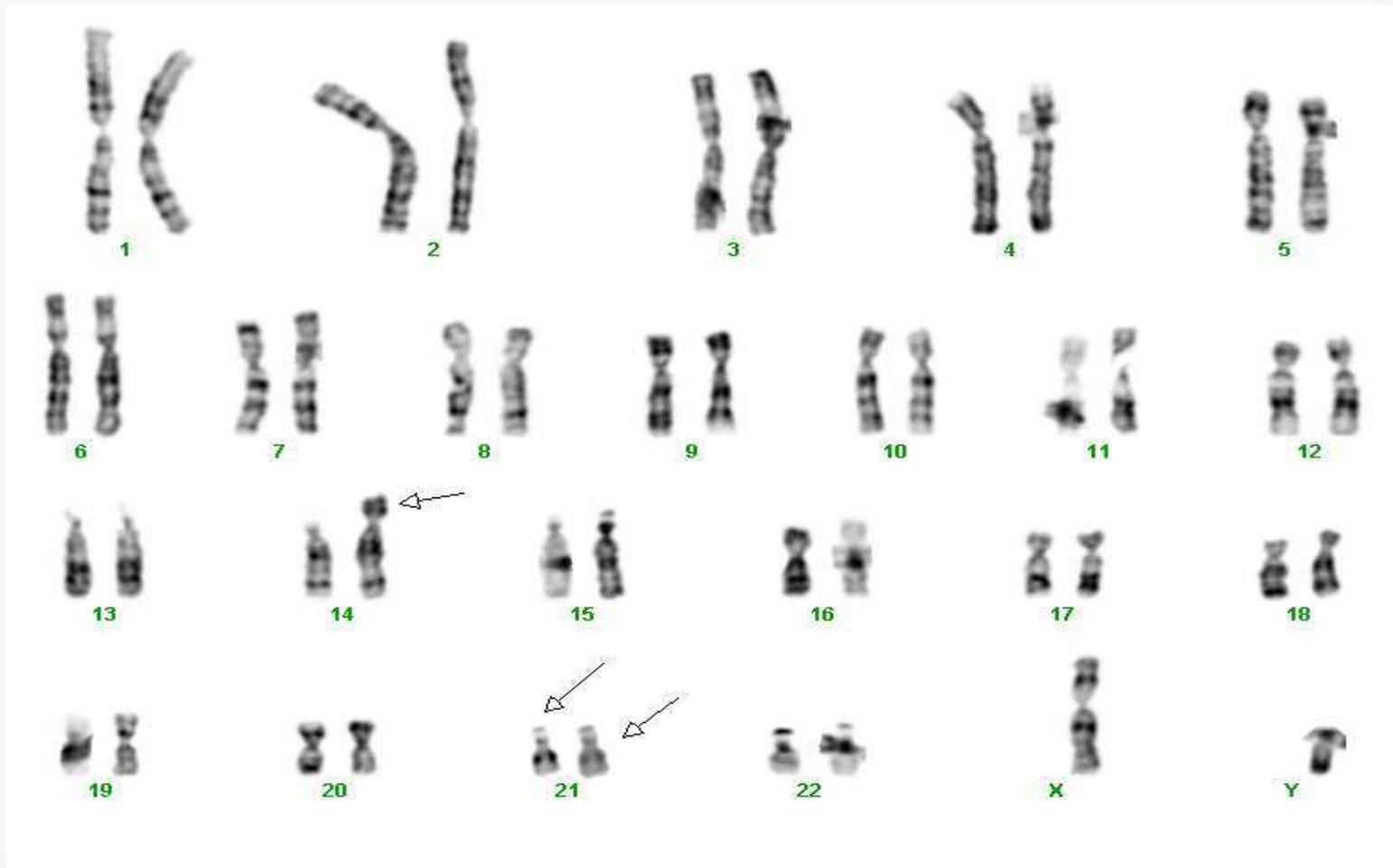


Conferma di diagnosi clinica



46,XY,t(14;21)

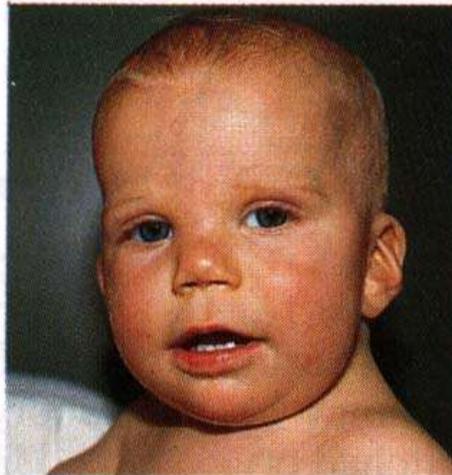
Trisomia 21 da traslocazione



Tipologia diagnostica del Laboratorio di Genetica Medica

- Conferma di diagnosi clinica
- **Diagnosi su sospetto clinico**
- Individuazione della causa della malattia
- Test genetico di screening
- Diagnosi presintomatica
- Test predittivo
- Test farmacogenetici

Diagnosi su sospetto clinico



B. Monosomy X (Turner syndrome; 45, XO)

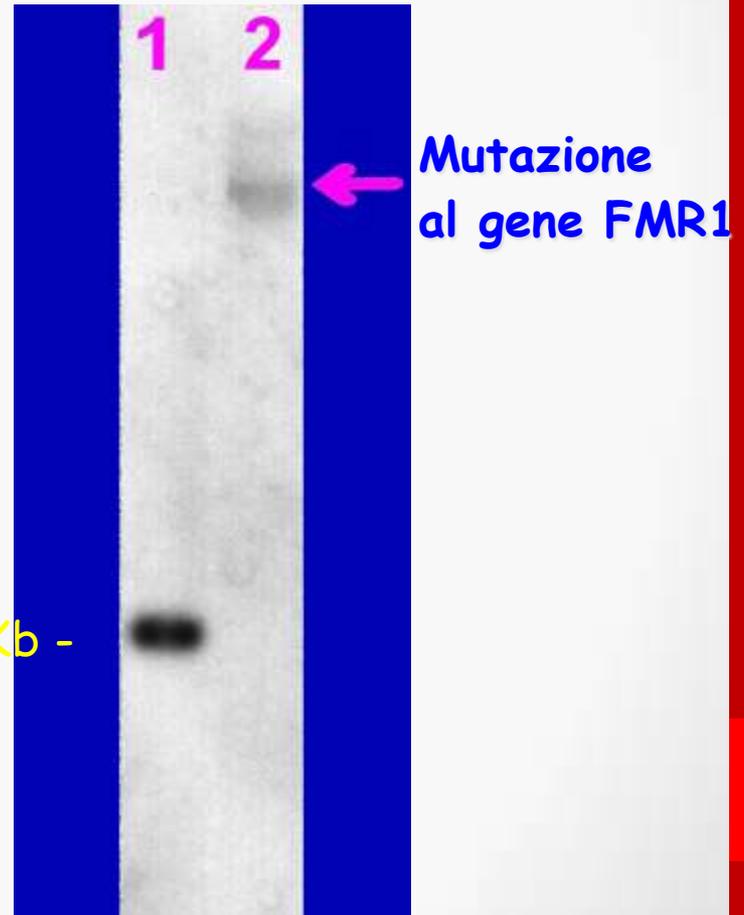
Tipologia diagnostica del Laboratorio di Genetica Medica

- Conferma di diagnosi clinica
- Diagnosi su sospetto clinico
- Individuazione della causa della malattia
- Test genetico di screening
- Diagnosi presintomatica
- Test predittivo
- Test farmacogenetici

Individuazione della causa della malattia

Ritardo mentale

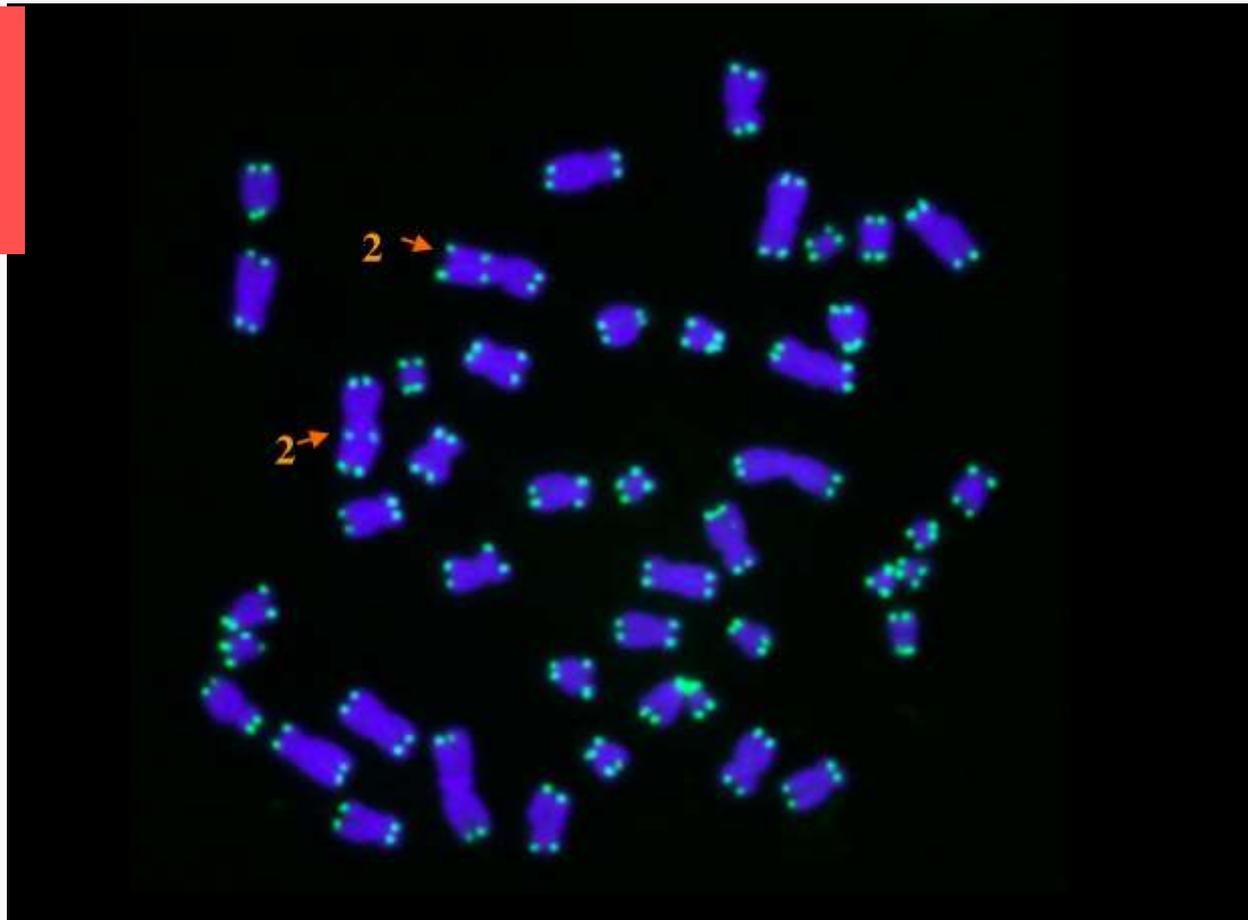
legato all' X



Individuazione della causa della malattia

Ritardo mentale da delezioni subtelomeriche

Analisi
mediante
FISH



Tipologia diagnostica del Laboratorio di Genetica Medica

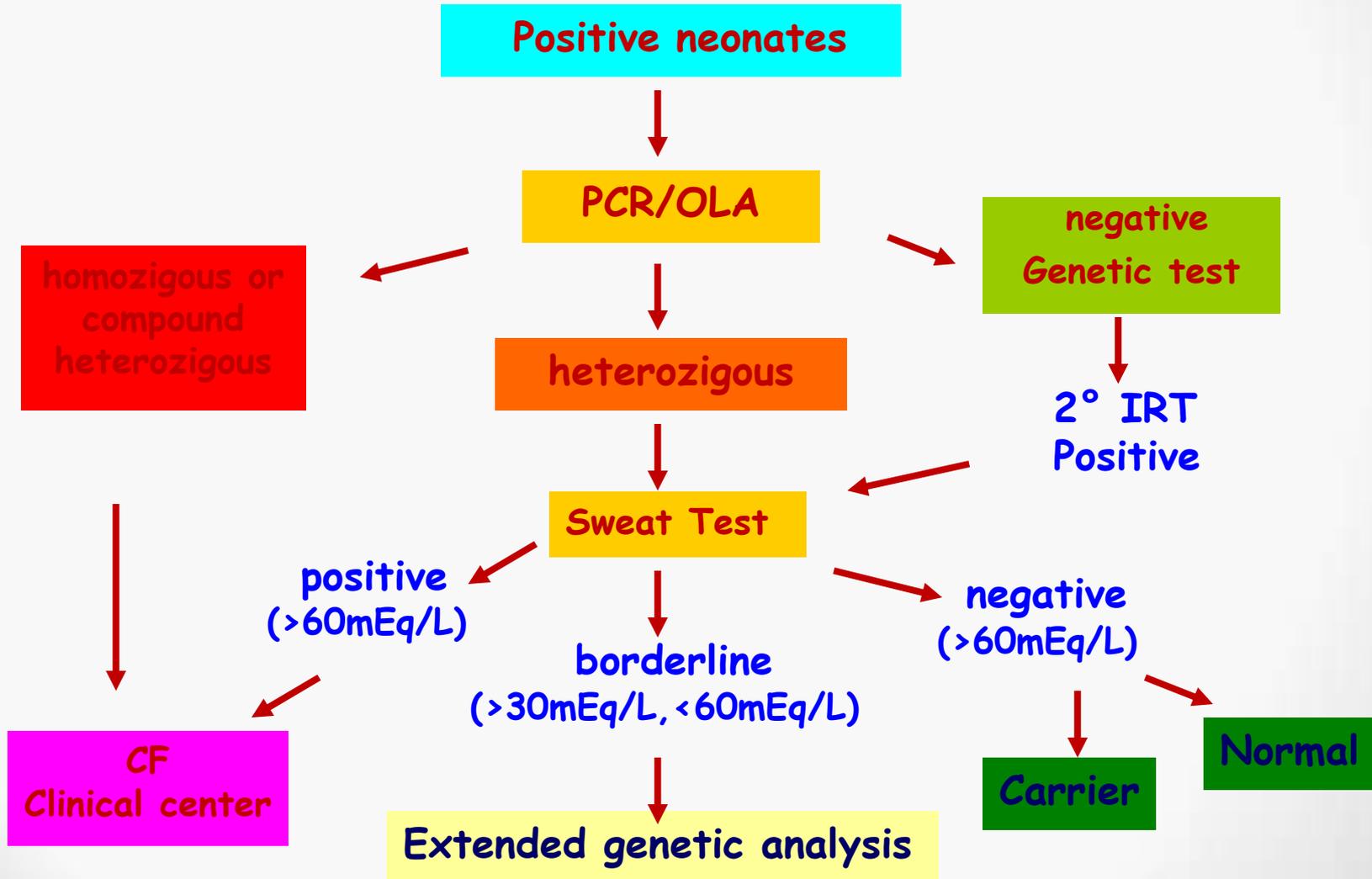
- Conferma di diagnosi clinica
- Diagnosi su sospetto clinico
- Individuazione della causa della malattia
- **Test genetico di screening**
- Diagnosi presintomatica
- Test predittivo
- Test farmacogenetici

Test genetici di screening

- * permettono di identificare o escludere, precocemente, genotipi associati ad una malattia o ad essa predisponenti
- * lo scopo è di curare, prevenire, ridurre l'insorgenza o la gravità di una malattia

Neonatal screening Program for CF: ImmunoReactive Tripsin (Guthrie card)

IRT/IRT + DNA (31 mutations)



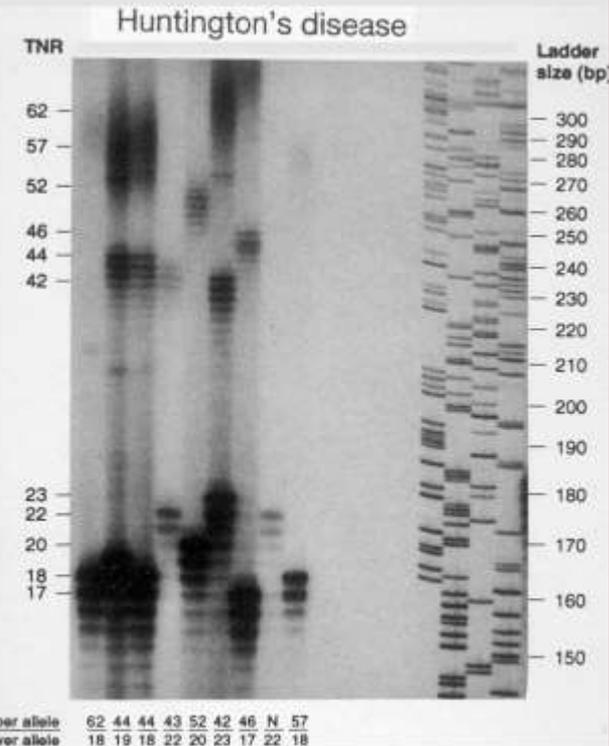
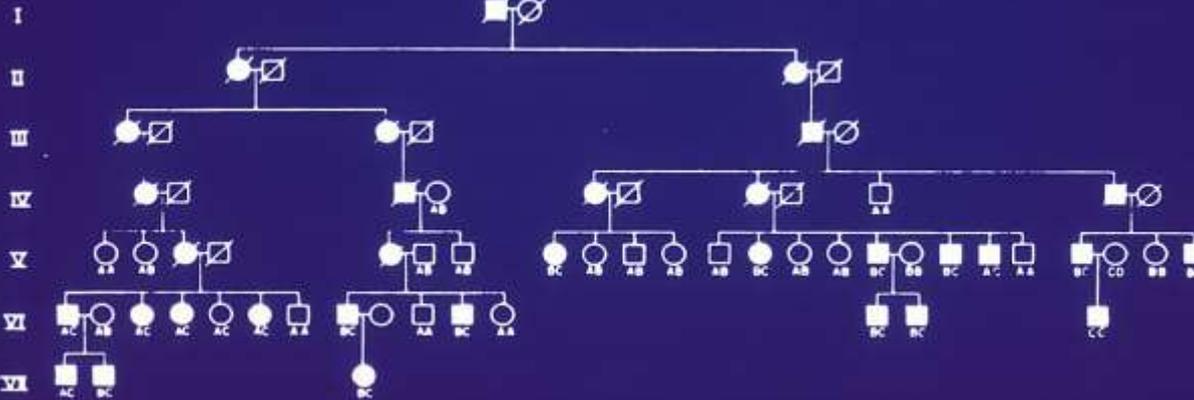
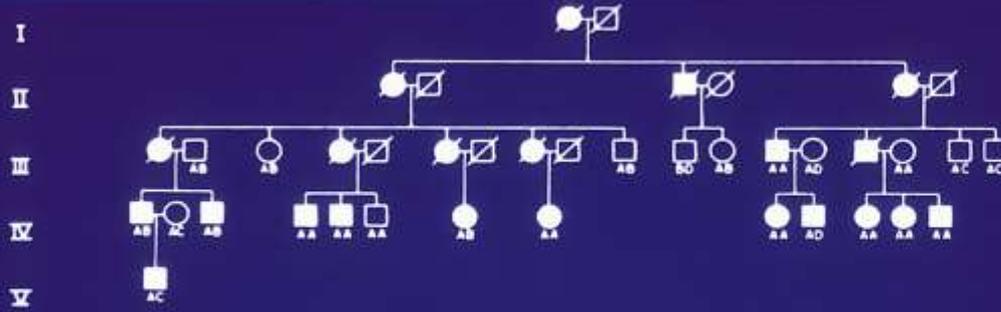
Tipologia diagnostica del Laboratorio di Genetica Medica

- Conferma di diagnosi clinica
- Diagnosi su sospetto clinico
- Individuazione della causa della malattia
- Test genetico di screening
- **Diagnosi presintomatica**
- Test predittivo
- Test farmacogenetici

Test presintomatici o preclinici

- *identificano una mutazione che porta inevitabilmente alla comparsa di una malattia nel corso della vita
- *possono essere effettuati in epoca preclinica, cioè prima che si manifesti la malattia

Corea di Huntington



Andrew S.E., al. *nature genetics* volume 4 august 1993

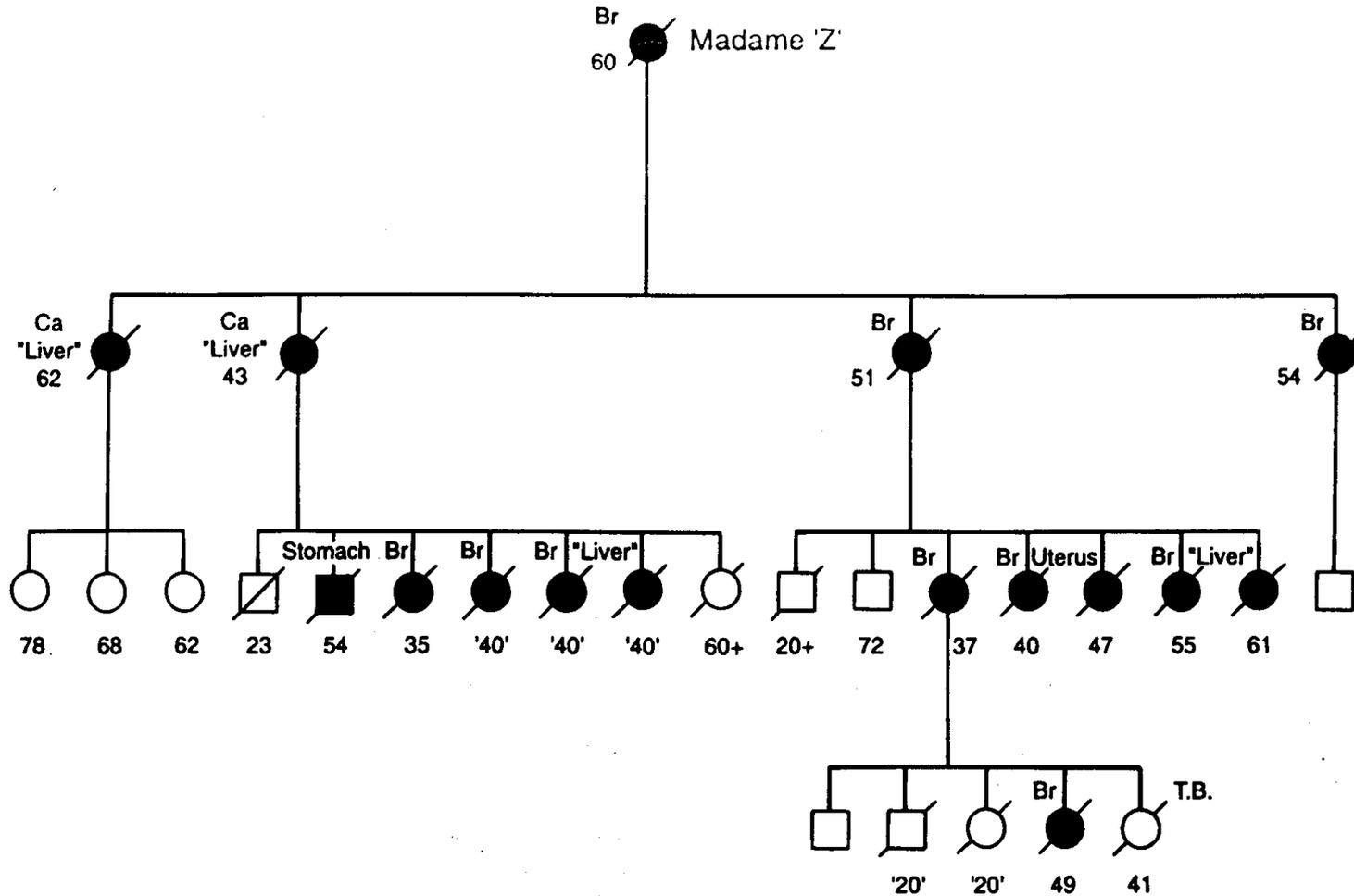
Tipologia diagnostica del Laboratorio di Genetica Medica

- Conferma di diagnosi clinica
- Diagnosi su sospetto clinico
- Individuazione della causa della malattia
- Test genetico di screening
- Diagnosi presintomatica
- Test predittivo
- Test farmacogenetici

Test predittivi di suscettibilità genetica

- * individuano genotipi che predispongono ad un aumentato rischio di sviluppare una specifica patologia se esposti a fattori ambientali o ad altri fattori genetici scatenanti

Family tree of "Madame Z" by Broca - 1866



Breast and uterus cancer

Tipologia diagnostica del Laboratorio di Genetica Medica

- Conferma di diagnosi clinica
- Diagnosi su sospetto clinico
- Individuazione della causa della malattia
- Test genetico di screening
- Diagnosi presintomatica
- Test predittivo
- Test farmacogenetici

Test farmacogenetici

* finalizzati a identificare variazioni di sequenza del DNA con lo scopo di predire la risposta “individuale” ai farmaci in termini di efficacia, interazione tra molecole e rischio relativo di eventi avversi

HIV + ABACAVIR

* *L'associazione degli antigeni: HLA-B5701 + HLA-DR7 + HLA-DB3 provoca nel 100% dei casi ipersensibilità all' ABACAVIR.*

* Tale associazione non è mai stata riscontrata nei soggetti tolleranti al farmaco

Association between presence of HLA-B5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. S. Mallal et al.-The Lancet 359, 727-732,2002

Tot. 200 ipersensibili tolleranti

Test genetici -> diagnosi

Per interpretare correttamente un genotipo occorre conoscere in modo approfondito:

- * la malattia che si sta analizzando
- * la natura della mutazione
- * le caratteristiche del test che si sta utilizzando

Test genetici

Nuovi problemi e conflitti

- * Diritto alla salute
- * Diritto alla “privacy genetica”

Via via che scopriamo i segreti del genoma dobbiamo assicurarci:

- * che la nostra privacy non verrà violata
- * che le classi privilegiate non saranno le uniche ad averne benefici
- * che non saranno discriminati individui o gruppi di popolazione

Bill Clinton

Società Italiana di Genetica Umana (S.I.G.U.)

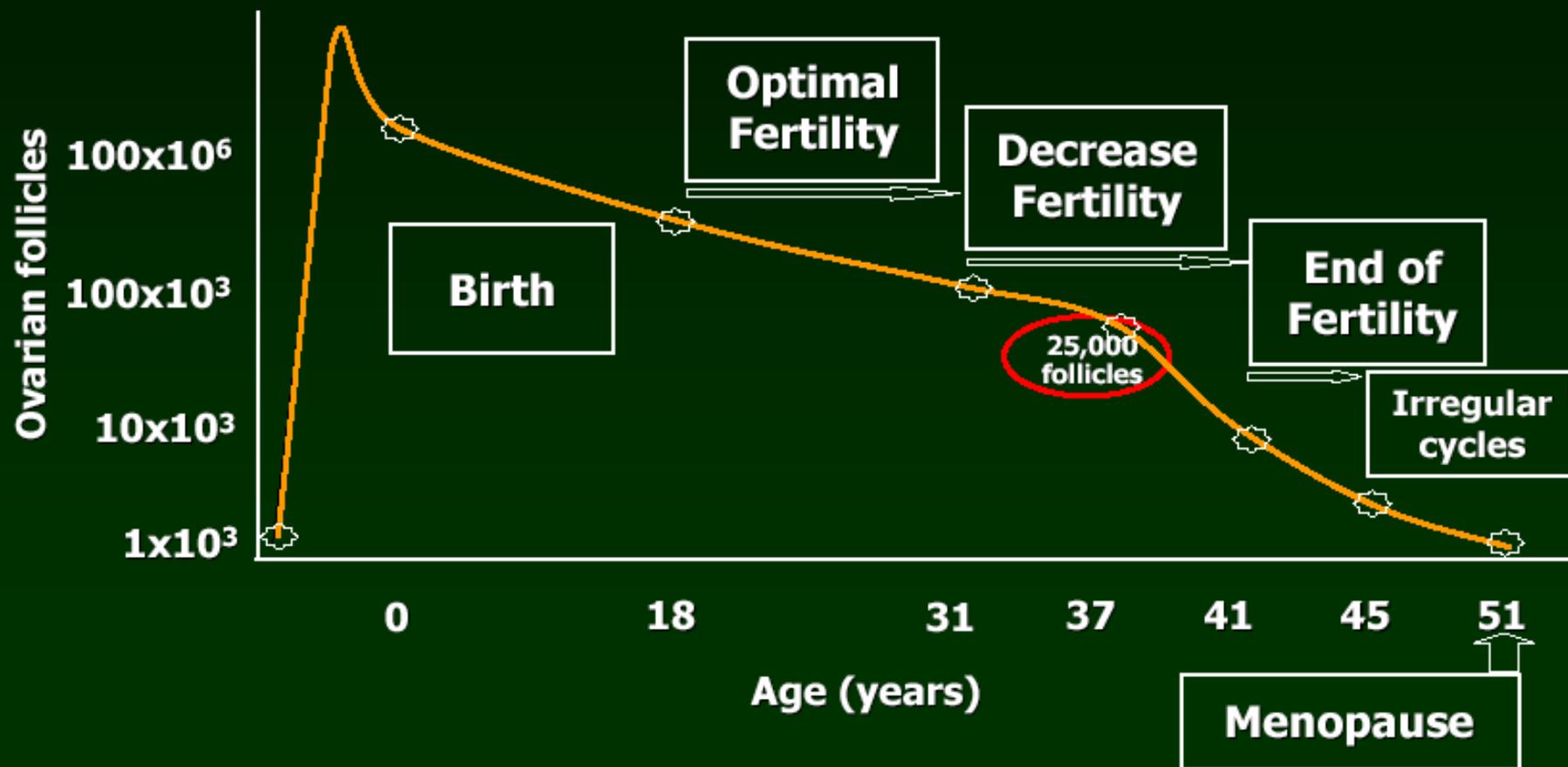
- * L' esecuzione dei test genetici, spesso, non è seguita da informazioni idonee, né dalla Consulenza Genetica.
- * L' attenzione nei confronti di certi test genetici, lungi dall'esprimere l'inaugurazione di una nuova forma di medicina preventiva, è mirata ad *interessi di mercato*. La *vendita dei test genetici via internet* rappresenta l'espressione più emblematica di questa tendenza affaristica che ha investito la genetica molecolare



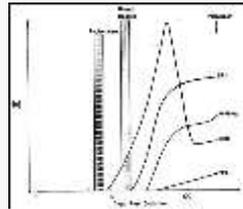
...ma le malattie rare
continuano a rimanere orfane

Relazione tra patrimonio follicolare e fertilità

te Velde, *Maturitas*, 1998



The prenatal diagnosis menu



biochemical screening



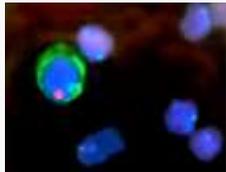
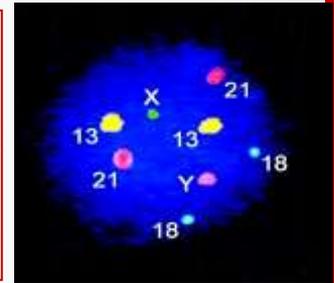
ultrasound



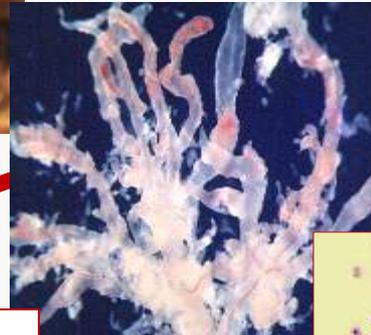
3D-ultrasound



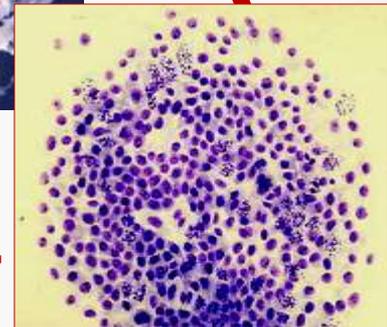
cytogenetic analyses



circulating
• fetal cells
• fetal DNA
• fetal RNA



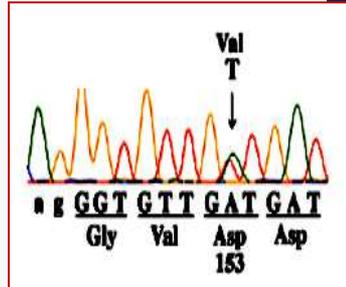
chorionic villi



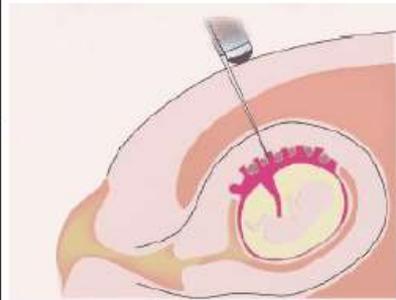
amniocytes



molecular tests

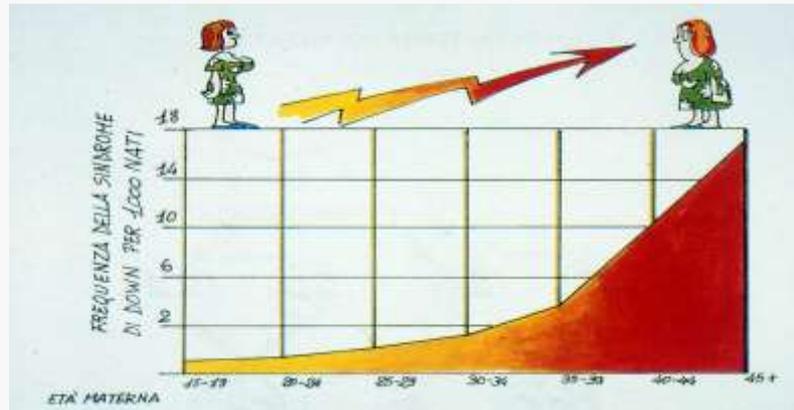


Prenatal diagnosis sampling

Sampling procedure			
Getational weeks	10-12 [^]	15-18 [^]	20-22 [^]

Different type of tissues used for prenatal diagnosis	Corionic Villi First trimester	Amniotic Fluid Second trimester	Fetal blood
			

Anomale cromosomiche e Gravidanza fisiologica



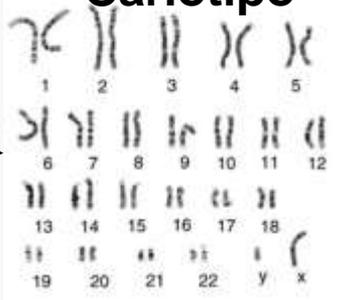
<35a

Eta' materna

>35a

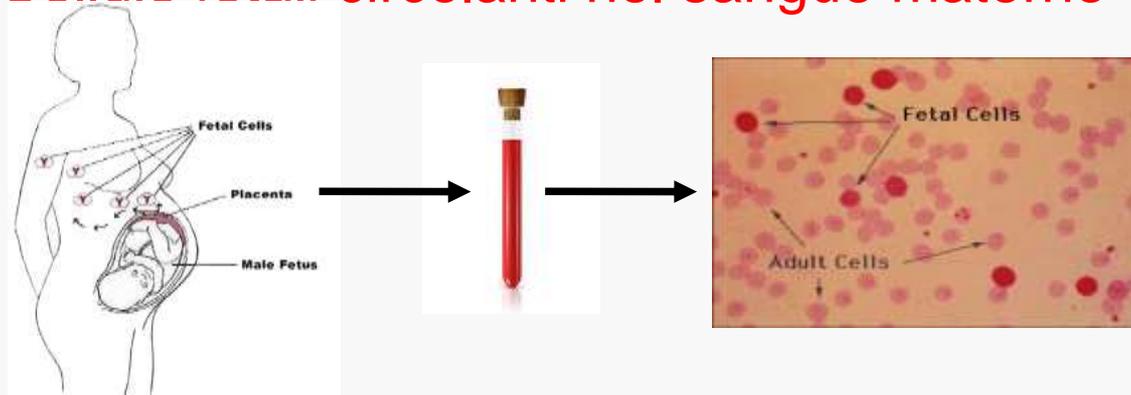
Screening prenatale
 Diagnosi Prenatale Invasiva
 (villocentesi/amniocentesi)

Cariotipo



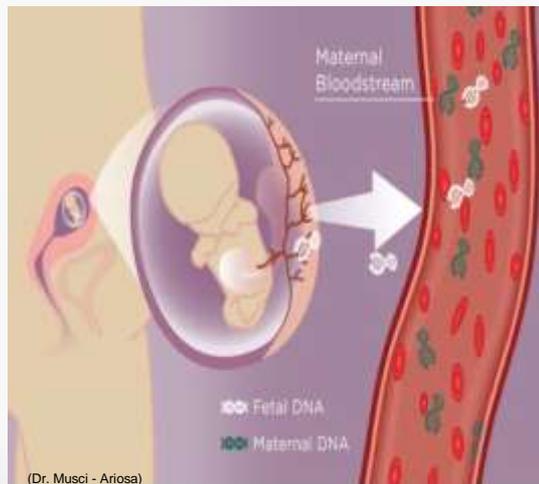
Metodo	Tipo di analisi	Trimestre di gravidanza	Sensibilita' (DR)	Falsi Positivi	Rischio di aborto spontaneo
NT	Non Invasivo	I trimestre	64-70%	5%	0%
Combinato	Non Invasivo	I trimestre	85-90%	5%	0%
Trtitest	Non Invasivo	II trimestre	70%	5%	0%
Quadritest	Non Invasivo	II trimestre	81%	5%	0%
Integrato sierologico	Non Invasivo	II trimestre	85-88%	5%	0%
Integrato	Non Invasivo	II trimestre	94-96%	5%	0%
Villocentesi	Invasivo	I trimestre	~100%	<0,1%	1-2%
Amniocentesi	Invasivo	II trimestre	~100%	<0,1%	0,5-1%

Cellule fetali circolanti nel sangue materno

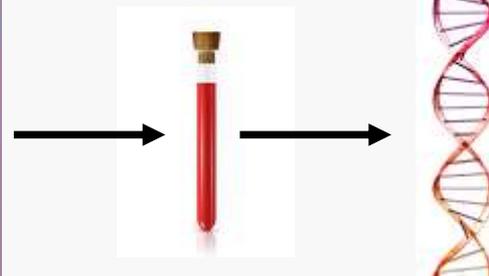


- difficoltà di isolamento
- difficoltà di analisi

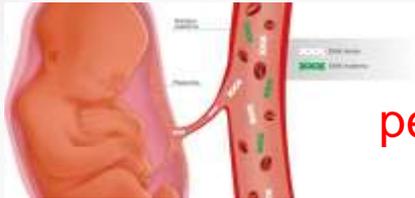
DNA fetale libero circolante nel sangue materno (cffDNA)



(Dr. Musci - Ariosa)



- origina dalla **placenta**
- frammenti 145-200bp
- 970 volte di più rispetto a DNA fetale cellulare
- 10% del DNA libero circolante totale
- aumenta nel corso della gravidanza
- rilevabile dalla 5[°]-7[°] settimana
- assente a 24h dal parto



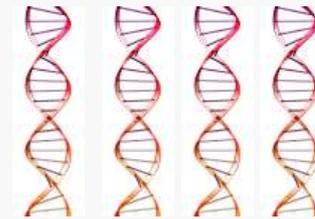
Test prenatale non invasivo (NIPT) per la ricerca delle piu' comuni aneuploidie fetali (trisomia 21, 18, 13)



prelievo di
sangue (5-10ml)



estrazione DNA
libero circolante
(madre + feto)



Amplificazione cfDNA
(madre + feto)



NGS

- Sequenziamento
- Allineamento
- Conta



analisi bioinformatica



referto

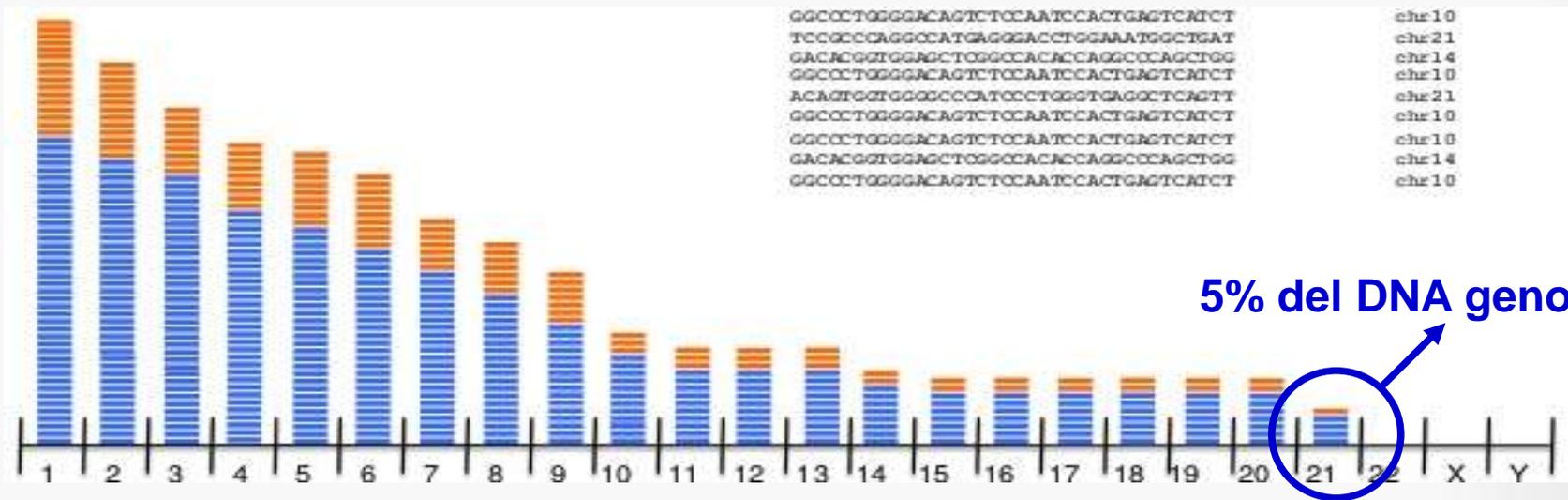
Indagine Prenatale Non Invasiva

Analisi NGS Sequenziamento



Generate $n \times 10^6$ sequenze

Allineamento



NO DISTINZIONE tra cfDNA materno (90%) e cfDNA fetale (10%)

Analisi NGS

Conta

1ml plasma = cfDNA equivalente 100 cellule (90% materno – 10% fetale)

Gravidanza Normale

Cr. 21 materni	Cr.21 fetali
90x2=180	10x2=20

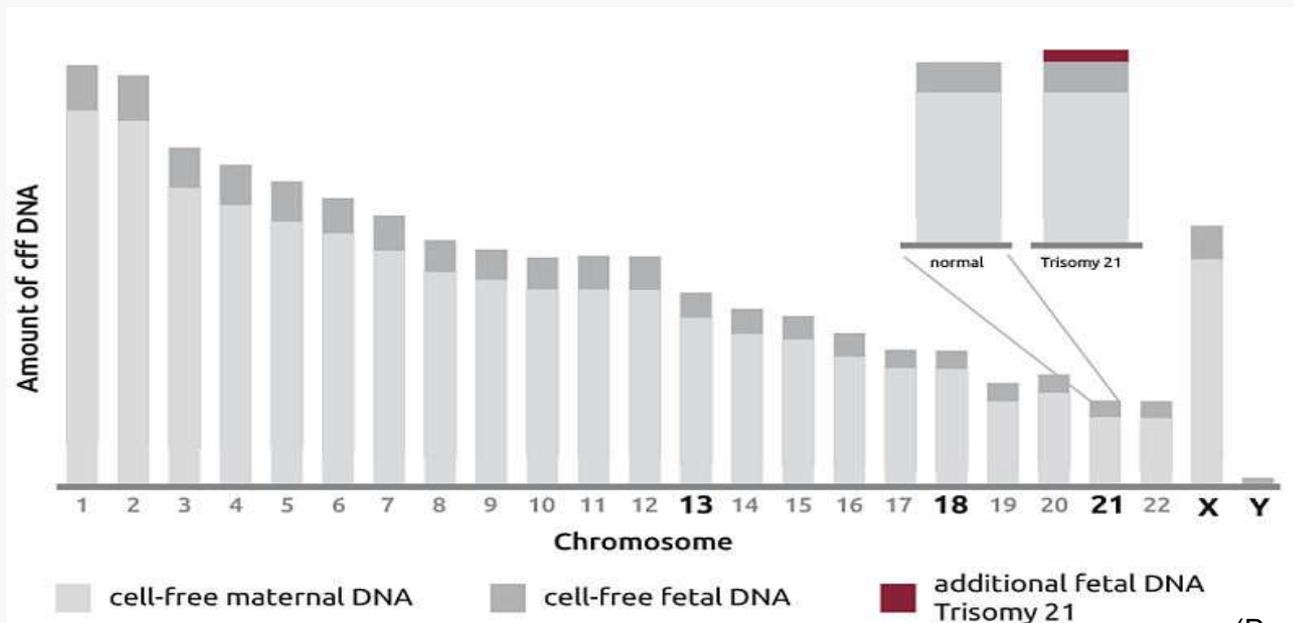
Totale Cr.21 =200

Gravidanza Tri21

Cr. 21 materni	Cr.21 fetali
90x2=180	10x3=30

Totale Cr.21 =210

0,05%



(Paerinatal)

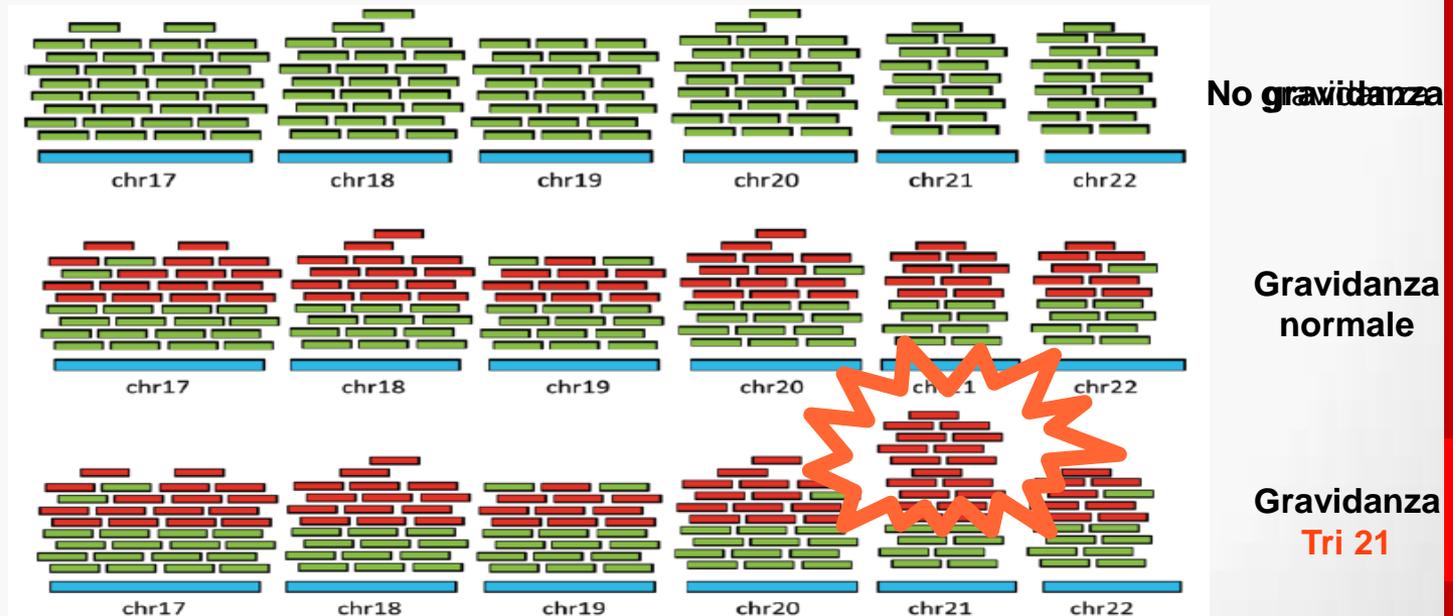
Analisi NGS

Analisi bioinformatica

$$\% \text{ chrN} = \frac{\text{Unique count for chrN}}{\text{Total unique count}}$$

$$\text{chrN z-score for test sample} = \frac{\% \text{ chrN}_{\text{sample}} - \text{mean } \% \text{ chrN}_{\text{reference}}}{\text{S.D. } \% \text{ chrN}_{\text{reference}}}$$

 cfDNA feto
 cfDNA madre



Test prenatale non invasivo (NIPT) per trisomia 21, 18, 13

Cromosoma	Sensibilita'	Falsi Negativi	Specificita'	Falsi Positivi
21	99,3%	0,7%	99,9%	<0,1%
18	97,4%	2,6%	99,9%	0,1%
13	97,4%	2,6%	99,9%	0,1%

(Taylor-Philips, BMJ,2016)

- **SICURO** = prelievo di sangue (non invasivo)
- **ACCURATO** = specificita' e sensibilita' elevate
- **PRECOCE** = dalla 10 sett. di gestazione
- **RAPIDO** = risultato in 7-10gg
- **LIMITATO** ai cromosomi analizzati (50% anomalie CC)
- **FALSI POSITIVI** (es.: mosaicismo placentare)
- **GEMELLARITA'** = no analisi singolo gemello
- **NO RISULTATO** = ~2% (es.:elevata BMI)

TEST DI SCREENING - NO TEST DIAGNOSTICO

POSITIVO → **DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA**
(amniocentesi)



Colloquio pre e post test

Vantaggi



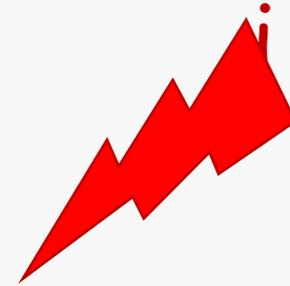
Limiti

Consenso informato

fattori
genetici



fattori
ambiental



Egypt Divided / Qatar's Ambition / Rot in the ANC

TIME

Want to Know My Future?

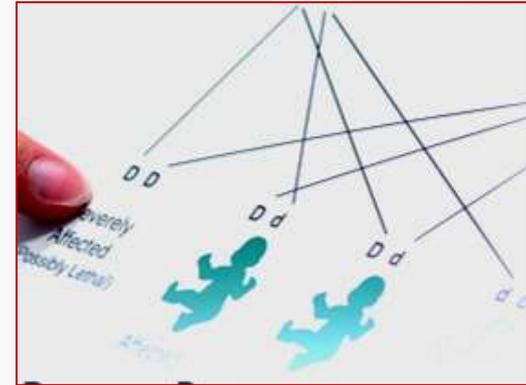


New genetic tests can point to risks—
but not always a cure

BY BONNIE ROCHMAN



Ethical, Legal, and Social Issues
raised by Human Genome Project
Research



Genetics vs Gen-Ethics



Le malattie rare: esperienze a confronto

Genova, 15 dicembre 2016



Le problematiche della diagnostica

Parte II – problematiche organizzative

Centri di Genetica

- Piano nazionale Malattie Rare: 1 ogni 2-4 milioni di abitanti
- Centro di Genetica:
 - Strutture Cliniche
 - Strutture di Laboratorio
- Eccellenza:
 - Qualificazione professionale
 - Attuazione di un sistema di gestione della Qualità
 - Accreditemento (istituzionale, professionale, ...)
 - Certificazione (ISO9001, Joint Commssion, ecc..)



Senza del Consiglio dei Ministri

SEGRETERIA DELLA CONFERENZA PERMANENTE
DEI RAPPORTI TRA LO STATO LE REGIONI
E LE PROVINCE AUTONOME

Punto n. 5

CONFERENZA STATO-REGIONI
Seduta del 15 luglio 2004

Oggetto: Accordo tra il Ministro della salute , le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano sul documento recante: "Linee- guida per le attività di genetica medica".
Accordo ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997, n.281.

Esiti istruttori: Si sancisce l'accordo sul testo trasmesso dalla Segreteria della Conferenza Stato-Regioni con nota del 5 luglio u.s..

ARTICLE

Genetic testing in Italy, year 2004

Bruno Dallapiccola^{*,1,2,3}, Isabella Torrente^{1,2}, Arnaldo Morena^{1,2}, Franca Dagna-Bricarelli⁴
and Rita Mingarelli^{1,2}

¹Istituto CSS-Mendel, Viale Regina Margherita, Rome, Italy; ²Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy; ³Department of Public Health and Pathology, La Sapienza University, Genoa, Italy; ⁴AO Galliera, Department of Human Genetics, Genoa, [Italy](#)

Table 1 Territorial distribution of medical genetic centres, living population, and average size of the population served by each centre in Italy

<i>Area</i>	<i>Region</i>	<i>Living population</i>	<i>Medical genetic centres</i>	<i>Population/no. centres ratio</i>
Northern	Emilia Romagna	4 151 369	20	207.568
	Friuli Venezia Giulia	1 204 718	7	172.103
	Liguria	1 592 309	11	144.755
	Lombardia	9 393 092	42	223.645
	Piemonte	4 330 172	14	309.298
	Trentino Alto Adige	974 613	3	324.871
	Valle D'Aosta	122 868	1	122.868
	Veneto	4 699 950	27	174.072
Total		26 469 091	125	211.753
Central	Lazio	5 269 972	27	195.184
	Marche	1 518 780	3	506.260
	Toscana	3 598 269	16	224.892
	Umbria	858 938	5	171.788
Total		11 245 959	51	220.509
Southern	Abruzzo	1 299 272	3	433.091
	Basilicata	596 546	3	198.849
	Calabria	2 009 268	5	401.854
	Campania	5 788 986	22	263.136
	Molise	321 953	2	160.977
	Puglia	4 068 167	18	226.009
Total		14 084 192	53	265.739
Islander	Sardegna	1 650 052	6	275.009
	Sicilia	5 013 081	21	238.718
Total		6 663 133	27	246.783
Total Italy		58 462 375	256	228.369

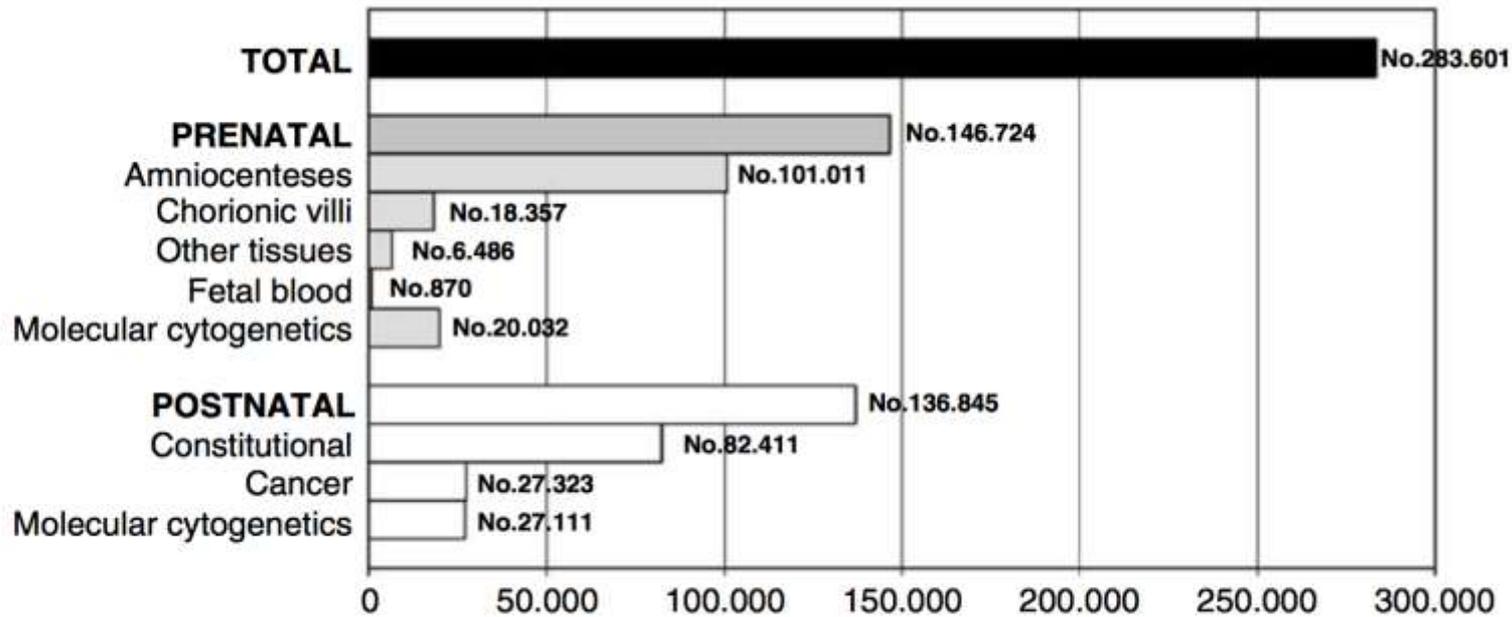


Figure 1 Cytogenetic tests in Italy in year 2004.

Table 3 Top 10 prenatal molecular genetic tests in Italy, year 2004

<i>Disease/gene</i>	<i>No. of tests</i>	<i>No. of centres</i>	<i>No. of regions</i>
Cystic fibrosis (CFTR)	5956	27	12
Duchenne muscular dystrophy (DMD)	3767	12	9
Genetic deafness (GJB2)	3659	10	6
Mental retardation (FMR1)	2417	16	11
Aneuploidy chromosomes 13,18,21,X,Y	1488	1	1
Mental retardation (FMR2)	1010	1	1
β -Thalassemia (HBB)	830	15	9
Uniparental disomy	386	12	7
Achondroplasia/Hypochondroplasia (FGFR3)	220	11	8
Spinal muscular atrophy (SMN1)	75	11	8

Table 4 Top 10 postnatal molecular genetic tests in Italy, year 2004

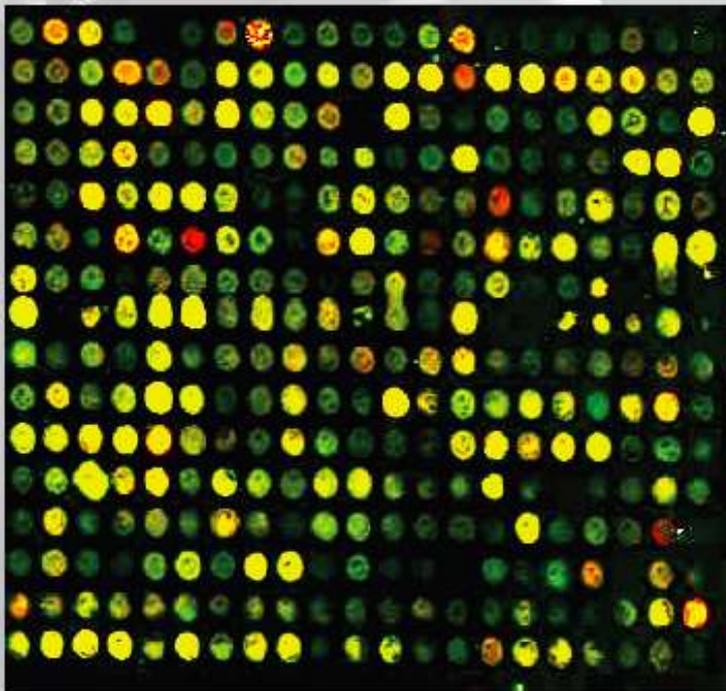
<i>Disease/gene</i>	<i>No. of tests</i>	<i>No. of centres</i>	<i>No. of regions</i>
Cystic Fibrosis (CFTR)	38 971	82	17
HLA	17 099	8	7
Coagulation factor V(Factor V Leiden)	15 366	46	14
Coagulation Factor II (F2)	13 968	43	14
Methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)	13 667	47	14
Leukemia (different genes)	6 093	10	8
Mental retardation (FMR1)	5 166	47	14
Azoospermia Yq loci	4 723	70	16
Haemochromatosis (HFE)	4 302	45	15
Genetic deafness (GJB2)	3 125	40	14

Riorganizzazione della Genetica

- Modello Hub and Spoke
- Potenziamento e messa in rete dei centri clinici
- Riduzione del numero dei laboratori
 - Certificazione e sistema qualità
 - Automazione e riorganizzazione del personale
 - Collaborazione tra laboratorio e clinica per i nuovi studi di Genomica

DNA Microarrays

Diverse migliaia (fino anche a 30.000 geni) possono essere rilevati simultaneamente in un unico esperimento



2 diversi canali possono essere utilizzati simultaneamente per visualizzare le differenze nei profili di espressione di 2 campioni.



Hubrecht
Institute
Developmental Biology
and Stem Cell Research

The revolution of Next-Generation Sequencing Technology



454/Roche



Solexa/Illumina



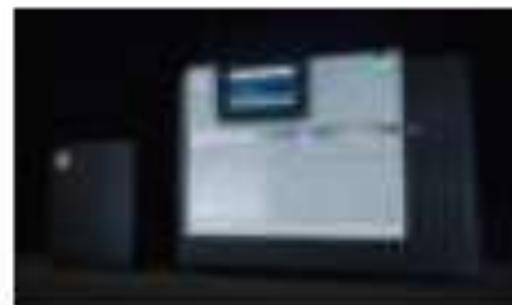
Solid/AB



IonTorrent



Heliscope

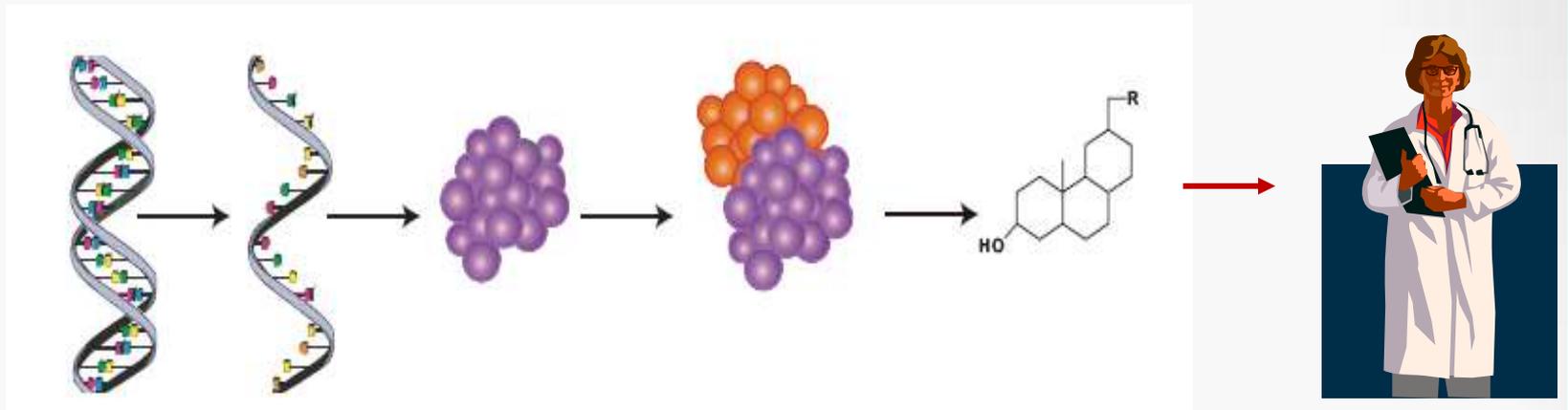


Pacific Biosciences



BILLIONS of BASES per run

Systems Biology e Patobiologia



Genomica



Proteomica

Nativa

Modificata



Metabolomica

Metabonomica



Fenomica

Patofenomica



Transcrittoma



Genomica Funzionale/Proteomica

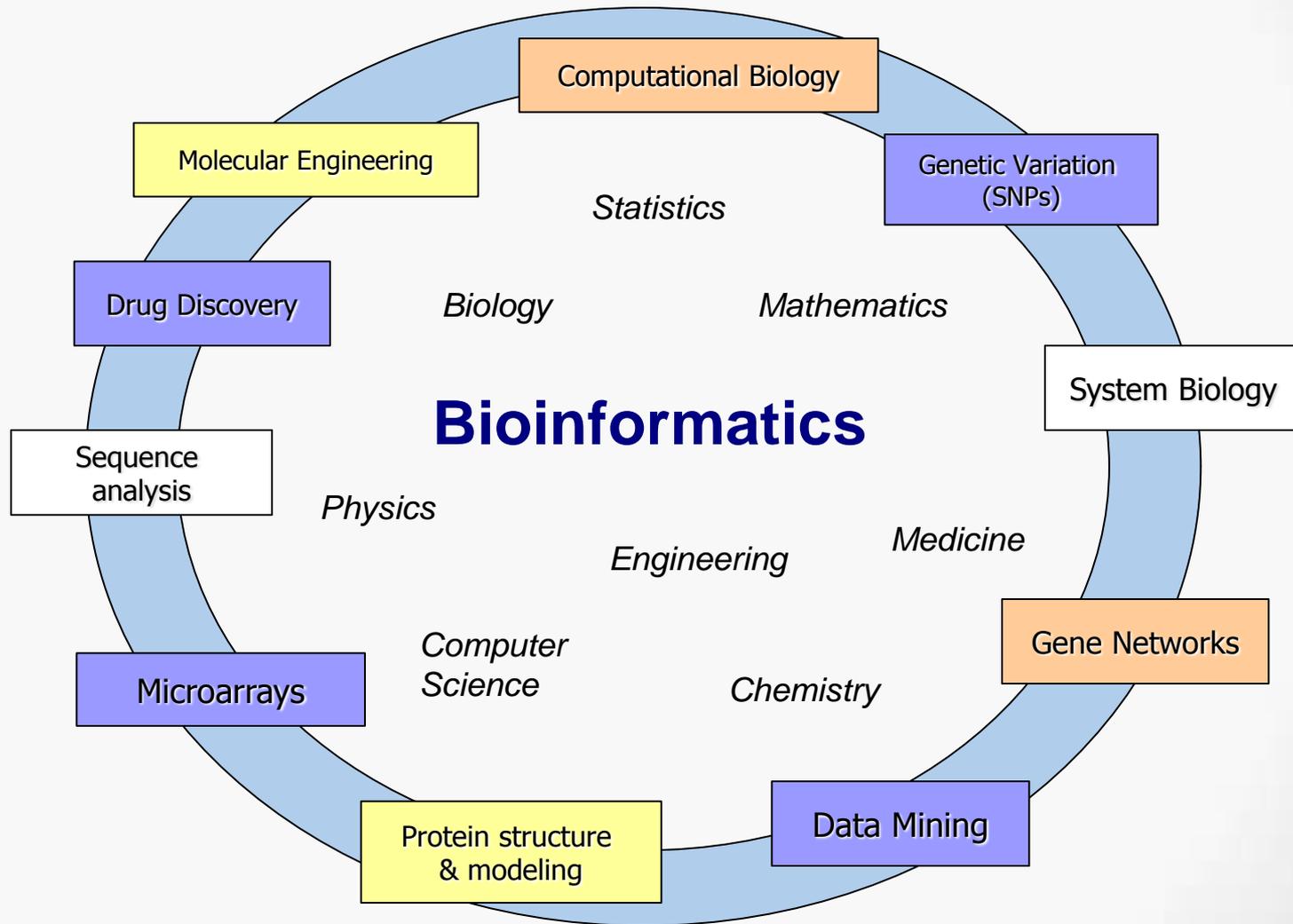


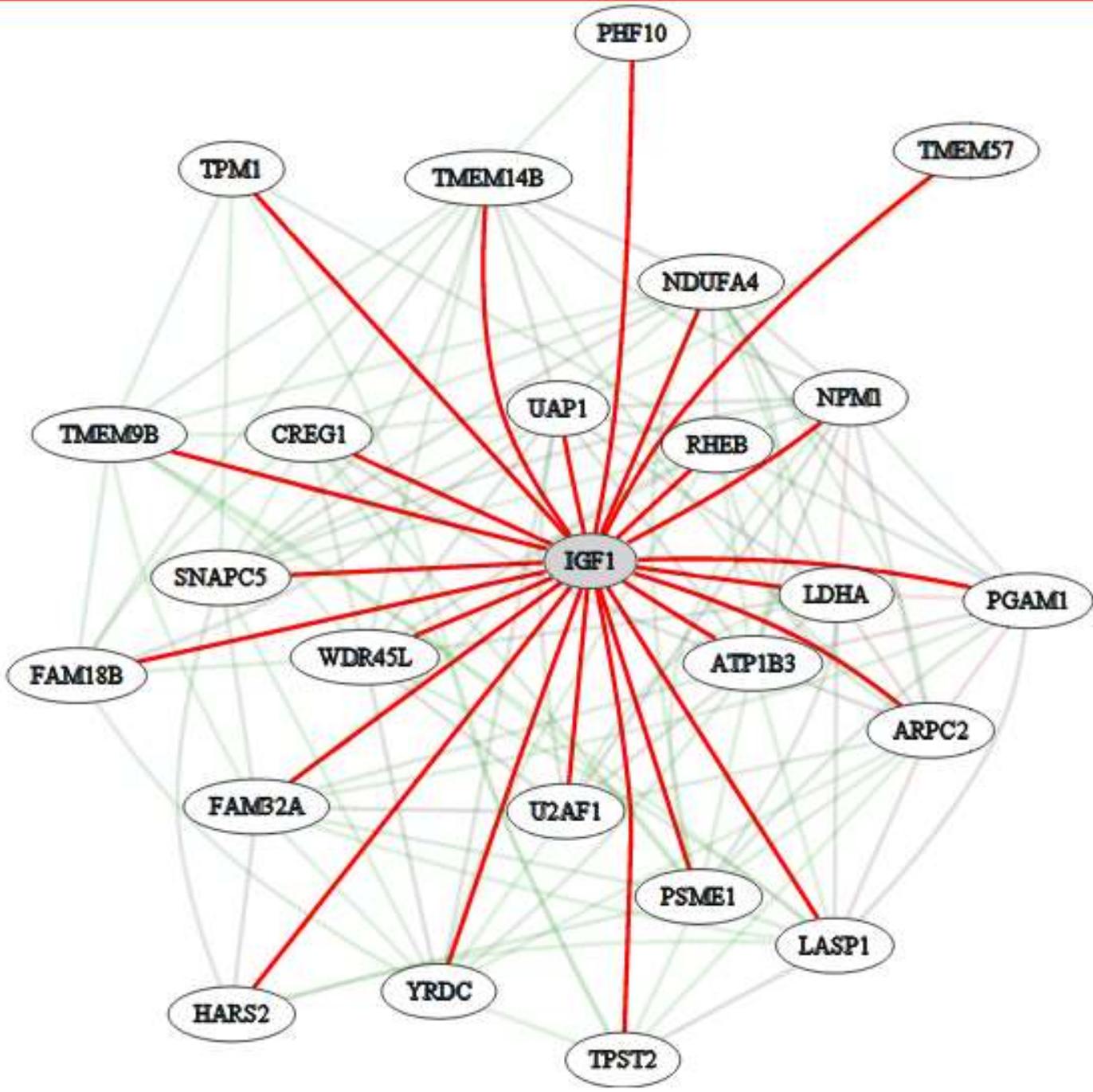
Variazioni Ambientali



Systems Biology/Patobiologia

Scenario





Grazie per l'attenzione



E.O. Ospedali Galliera

