

I TEST GENETICI

Cos' è un test genetico?

<<l'analisi di un gene, del suo prodotto o della sua funzione, oppure di DNA o dei cromsomi, finalizzata a individuare o a escludere un'alterazione di solito associata ad una malattia>>

**Devono essere suggeriti dal genetista
dopo un'attenta consulenza genetica**

LA CONSULENZA GENETICA

Persone che hanno avuto nella propria famiglia una patologia grave o hanno un figlio affetto da malformazioni congenite desiderano conoscere le conseguenze della patologia, i trattamenti e la probabilità che si ripeta.



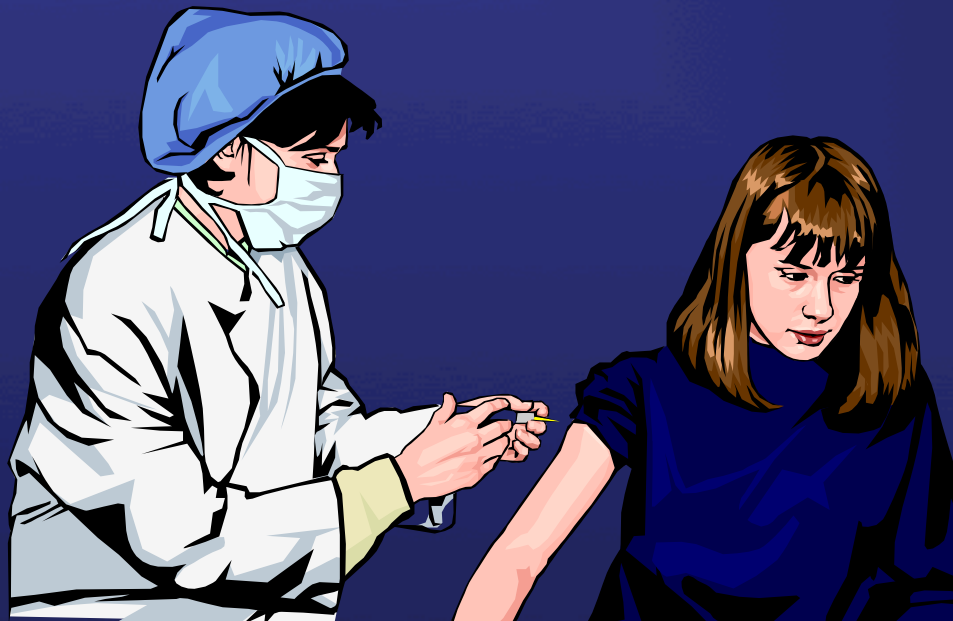
I: LA DIAGNOSI

LA DIAGNOSI

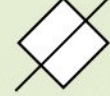
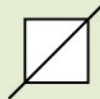
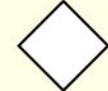
I: raccolta della storia familiare (anamnesi) e ricostruzione albero genealogico

II: esame clinico obiettivo del probando e dei suoi familiari

III: le indagini di laboratorio pertinenti

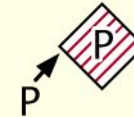
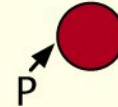
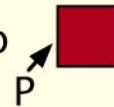


	Male	Female	Sex unknown or unspecified
Unaffected individual			
Individual affected with trait			
Obligate carrier (carries the gene but does not have the trait)			
Asymptomatic carrier (unaffected at this time but may later exhibit trait)			
Multiple individuals (5)			
Deceased individual			



	Male	Female	Sex unknown or unspecified
Proband (first affected family member coming to attention of geneticist)			
Family history of individual unknown			
Family— parents and three children: one boy and two girls in birth order			
Adoption (brackets enclose adopted individuals. Dashed line denotes adoptive parents; solid line denotes biological parent)			

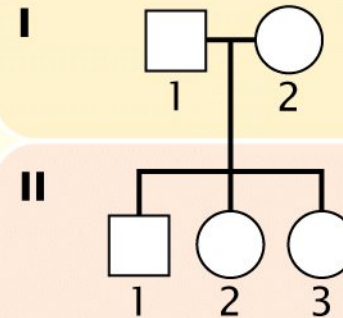
Proband (first affected family member coming to attention of geneticist)



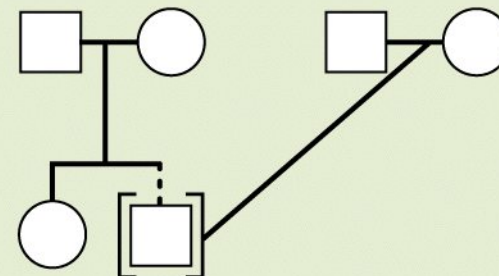
Family history of individual unknown



Family—
parents and three children: one boy and two girls in birth order



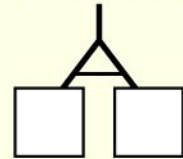
Adoption (brackets enclose adopted individuals. Dashed line denotes adoptive parents; solid line denotes biological parent)



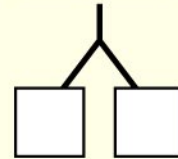
**Male Female Sex unknown
or unspecified**

Twins

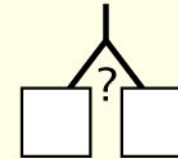
Identical



Nonidentical

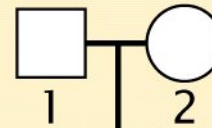


Unknown

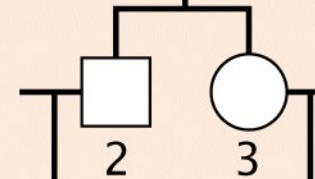


Consanguinity
(mating between
related individuals)

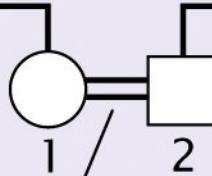
I



II



III



Indicates
consanguinity

I TEST GENETICI

DIAGNOSTICI: si rivolgono alle persone che hanno o sospettano una malattia in quanto ne presentano i sintomi. Possono essere eseguiti in epoca prenatale o durante il corso della vita.

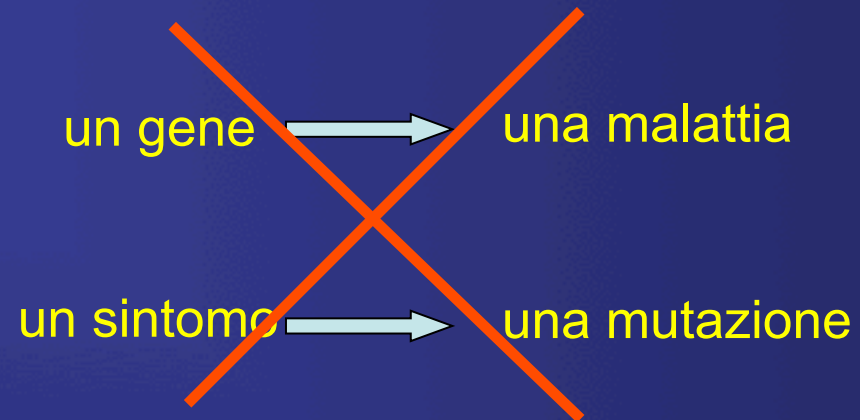
TEST DI IDENTIFICAZIONE PORTATORI SANI: individuano mutazioni comuni in determinati gruppi etnici (es. FC)

TEST PRESINTOMATICI: si applicano a persone che non presentano sintomi clinici ma che sono a rischio di sviluppare una patologia a esordio tardivo (es. Corea di Huntington)

TEST PREDITTIVI O DI SUSCETTIBILITA' : identificano genotipi che non causano la malattia ma resistenza o suscettibilità di svilupparla

TEST PER LA VARIABILITA' INDIVIDUALE (NON MEDICI)

TEST FARMACOGENETICI: forniscono indicazioni sulla risposta individuale ai farmaci

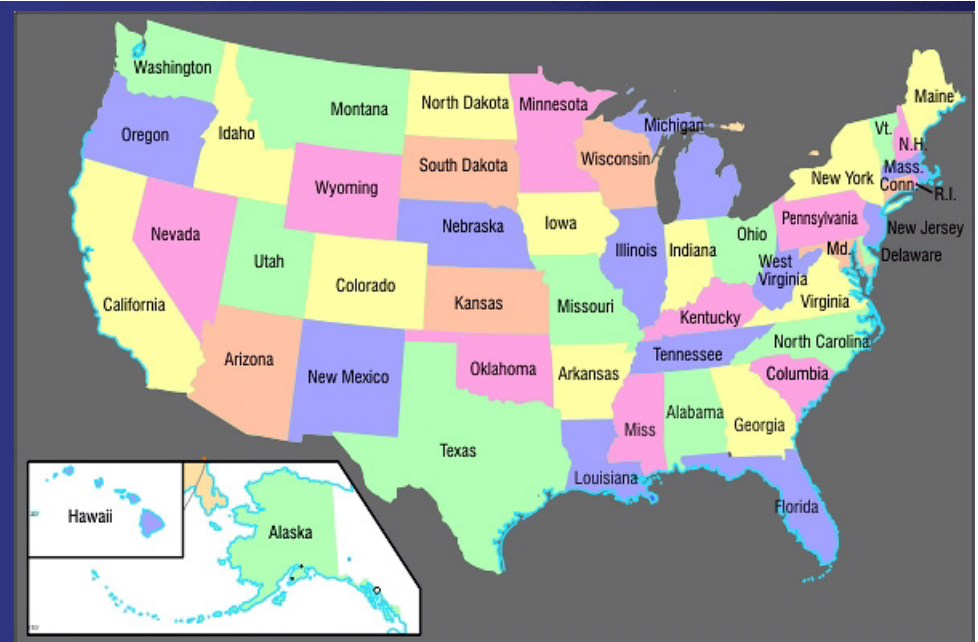


La diagnosi genetica è complicata da: diagnosi errata, eterogeneità genetica, eterogeneità allelica

**Negli Stati Uniti, nel 2000,
la principale causa di morte infantile
è stata a carico
delle anomalie genetiche (20.5%).**

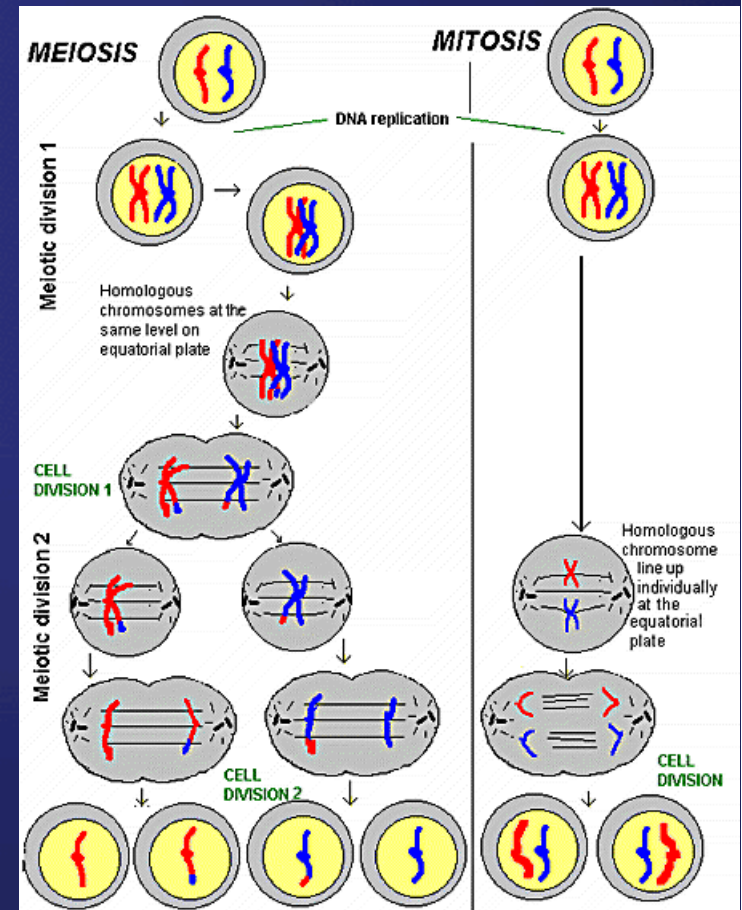
**Il 17.3% di tutte le morti infantili è
dovuta ad anomalie cromosomiche e
malformazioni**

**Le madri di porto Rico e, in genere di
origine africana hanno problemi
percentualmente diversi, ad esempio
il basso peso alla nascita.**

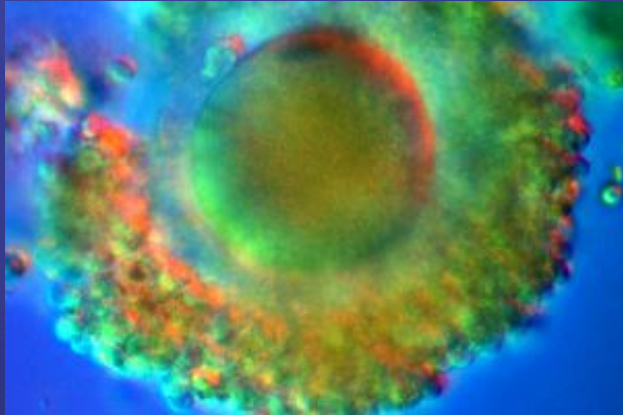


La frequenza delle anomalie cromosomiche è:

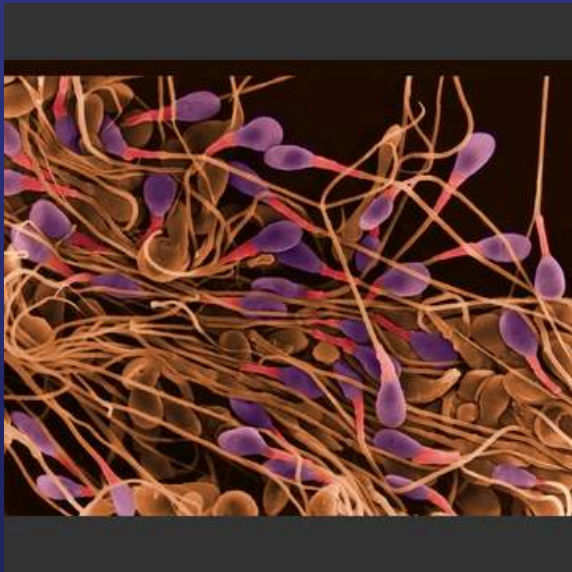
- Direttamente correlata con l'età materna
- Inversamente correlata con l'epoca gestazionale



INCIDENZA E PREVALENZA



18-19% DI ANEUOPLOIDIE



3- 4 % DI ANEUOPLOIDIE

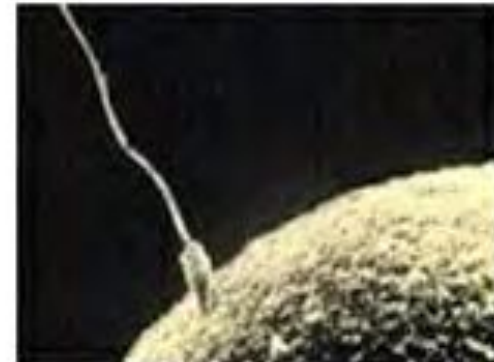
Circa il 10% degli spermatozoi di maschi fertili presenta anomalie cromosomiche:

- 45% anomalie numeriche
- 55% anomalie strutturali
(prevalentemente rotture)

INCIDENZA E PREVALENZA

1 CONCEPIMENTO SU 13 HA DIFETTI CROMOSOMICI

IL 50% DEGLI ABORTI SPONTANEI E' DOVUTO AD ANOMALIE CROMOSOMICHE



FREQUENZA DELLE ANOMALIE CROMOSOMICHE NEGLI ABORTI SPONTANEI

su 8841 aborti spontanei del primo trimestre 3613
(40.87%) presentano anomalie cromosomiche

- trisomie autosomi 52%
- 45,X 19%
- poliploidie (triploidie 16%) 22%
- riarrangiamenti strutturali 7%

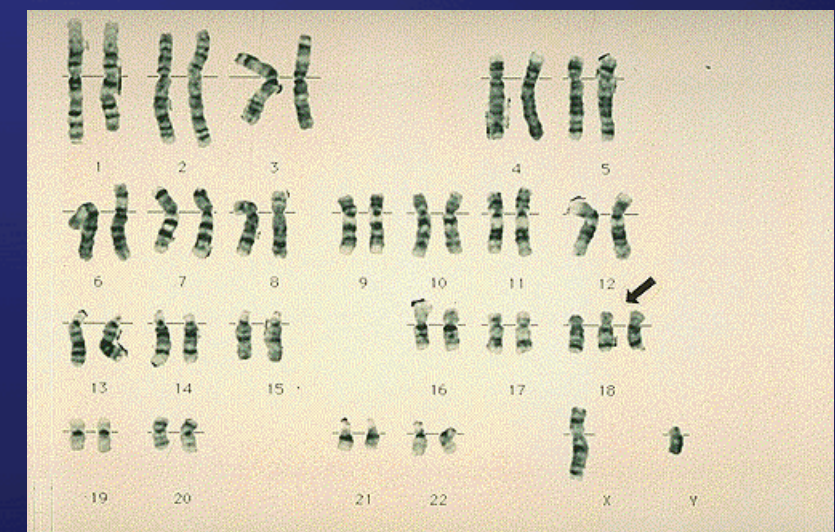
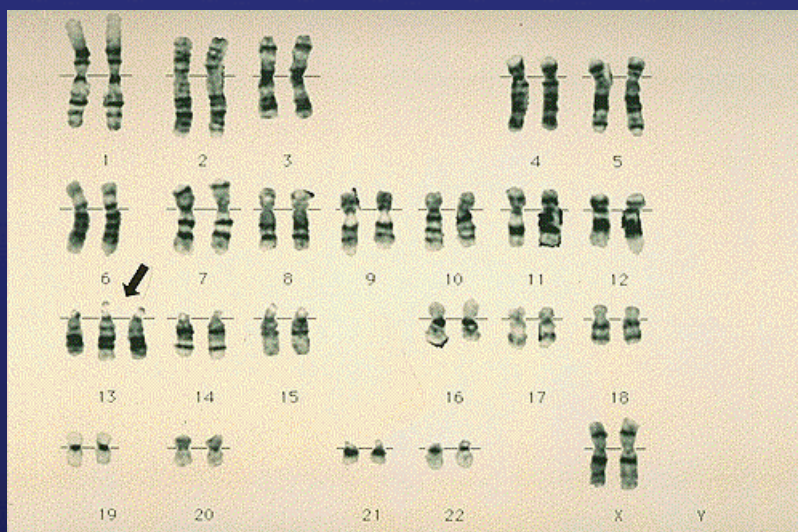
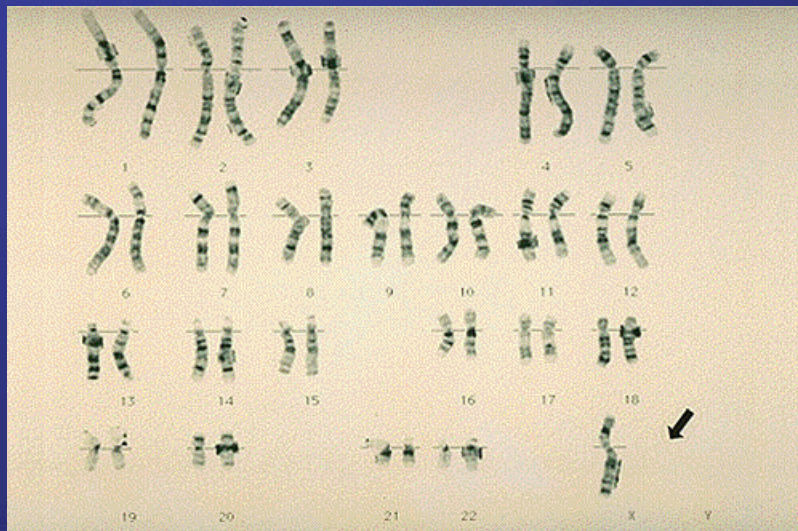
A. Milunsky “ Genetic disorders and the fetus” 2004

La frequenza delle anomalie cromosomiche alla nascita è 0.65%

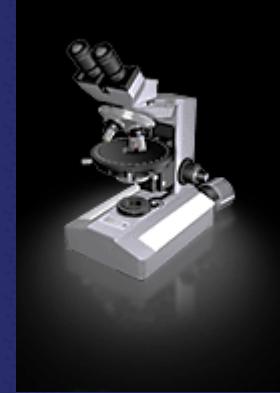
- Trisomie
 - +21 0.12% 1 su 833
 - +18 0.013%
 - +13 0.004%
- Monosomie
 - 45,X 0.024%
- Tr. bilanciate
 - 0.2% 1 su 500
- Tr. sbilanciate
 - 0.05%

Lo 0.2% dei nati ha riarrangiamenti bilanciati con rischi riproduttivi

Aneuploidie più frequenti alla nascita



Malattie dovute ad aberrazioni cromosomiche.

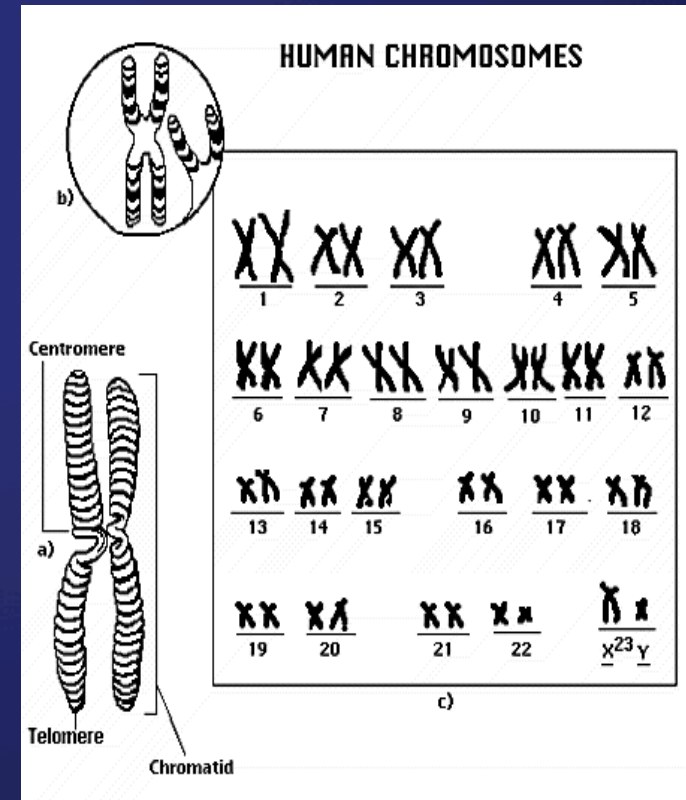


1. ANEUPLOIDIE (anomalie numeriche)

- sindrome di Down
- sindrome di Patau (cr.13)
- sindrome di Edwards (cr.18)
- sindrome di Klinefelter
- sindrome di Turner

Frequenza delle anomalie cromosomiche in diagnosi prenatale

<u>Età</u> <u>materna</u>	<u>L. A.</u>	<u>CVS</u>
35a	0.76 %	0.78 %
40a	2.50 %	3.40 %
45a	8.33 %	7.14 %



LA DIAGNOSI PRENATALE

TECNICHE STRUMENTALI E DI LABORATORIO FINALIZZATE AL
MONITORAGGIO DELLA GRAVIDANZA, DAL CONCEPIMENTO AL
MOMENTO IMMEDIATAMENTE PRECEDENTE IL PARTO

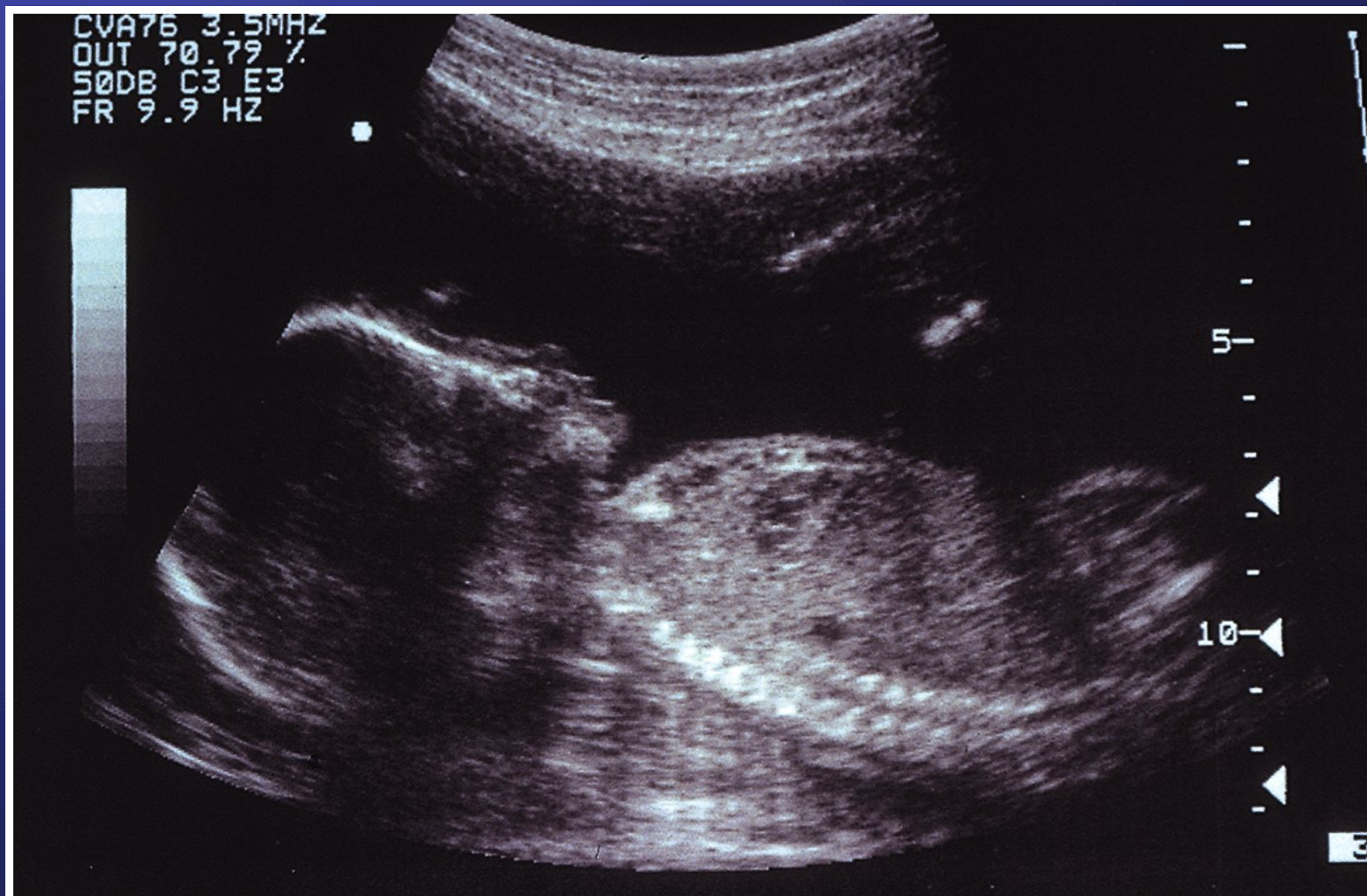


```
graph TD; A[TECNICHE STRUMENTALI E DI LABORATORIO FINALIZZATE AL MONITORAGGIO DELLA GRAVIDANZA, DAL CONCEPIMENTO AL MOMENTO IMMEDIATAMENTE PRECEDENTE IL PARTO] --> B[NON INVASIVE]; A --> C[INVASIVE]
```

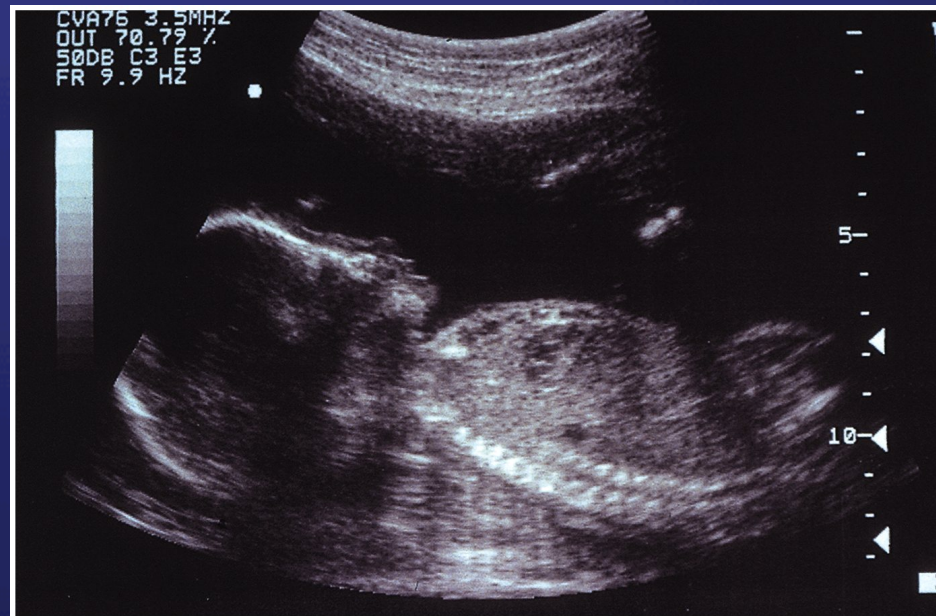
NON INVASIVE

INVASIVE

ECOGRAFIA



- **DIFETTI STRUTTURALI DEL FETO**
- **INDICAZIONI OSTETRICHE** (gravidanze gemellari e localizzazione placenta)
- **PERIODO OTTIMALE 16-18° settimana** (il sesso può essere predetto a partire dalla 16° settimana)
- **PUO' ESSERE RIPETUTA**



La Translucenza Nucale è una ecografia che viene eseguita fra la 11^a e la 14^a settimana e consente di determinare il rischio statistico per la sindrome di Down e altre patologie cromosomiche più rare.

Consiste nel misurare la distanza fra i muscoli paravertebrali e la cute nella regione posteriore del collo. Questa distanza o meglio questo spessore aumenta proporzionalmente con il rischio di sindrome di down e secondo alcuni anche con il rischio futuro di patologie cardiache.

5000

THE FAIRBANKS CLINIC

C8-4v OB/Gen > 10wks

10:19:01

Fr #98

5.0 cm

C 2

150dB/C4

Persist Med

Fr Rate Med

2D Opt:Res

ATL

NUCHAL
TRANSLUCENCY

+ 0.21cm



Alla fine dell' esame viene detto se il rischio relativo specifico individuale è migliorato o peggiorato rispetto a prima dell' esame.

Per esempio, se prima dell' esame il rischio era di una donna di 34 anni ($1 / 446$), questo rischio, dopo l' esame potrà essere uguale a quello di una donna di 30 anni ($1/895$) o anche meno, oppure peggiore e diventare quello di una donna di 40 ($1/97$) o anche più.

In parole povere in base a questo rischio lei deciderà se fare o meno un esame invasivo.

Il BITEST è un esame di screening che consente di valutare il rischio che un feto possa essere affetto da Sindrome di Down o da Trisomia 18 (S. di Edwards).

L' esame consiste di una ecografia e un prelievo di sangue.

Si esegue nel **1° trimestre di gravidanza** (11-12 settimane) e si basa sull' utilizzo di una tecnica combinata: la misurazione della translucenza nucale associata al dosaggio di due ormoni (da cui il nome bi-test) presenti nel circolo sanguigno materno: la free-beta hCG (frazione libera della gonadotropina corionica) e la PAPP-A (proteina A plasmatica associata alla gravidanza).

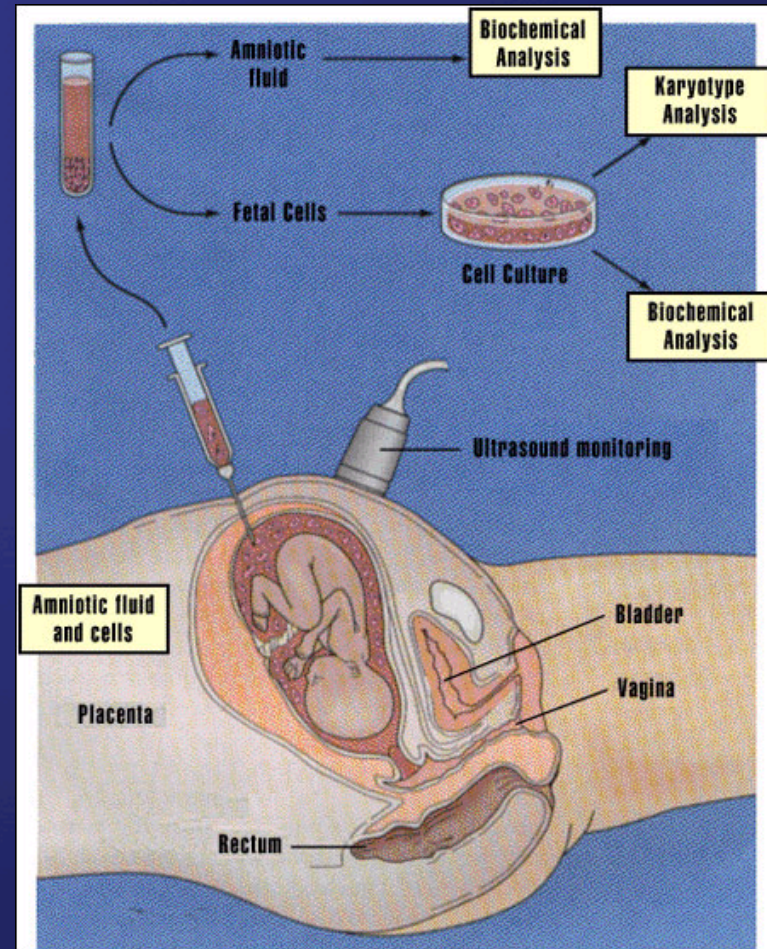
QUANDO ESEGUIRE UNA DIAGNOSI PRENATALE?

- ETA' MATERNA AVANZATA (35 anni rischio down 1:380)
- malattie mendeliane (studio precedente della malattia)
- Anamnesi familiare positiva per patologia cromosomica(non necessaria se genitori sono normali)
- genitori eterozigoti per anomalie bilanciate (rischio 5-10%)

-

LA DIAGNOSI PRENATALE

La diagnosi prenatale comprende una serie di tecniche strumentali e di laboratorio finalizzate al monitoraggio della gravidanza, dal concepimento al momento immediatamente precedente il parto.

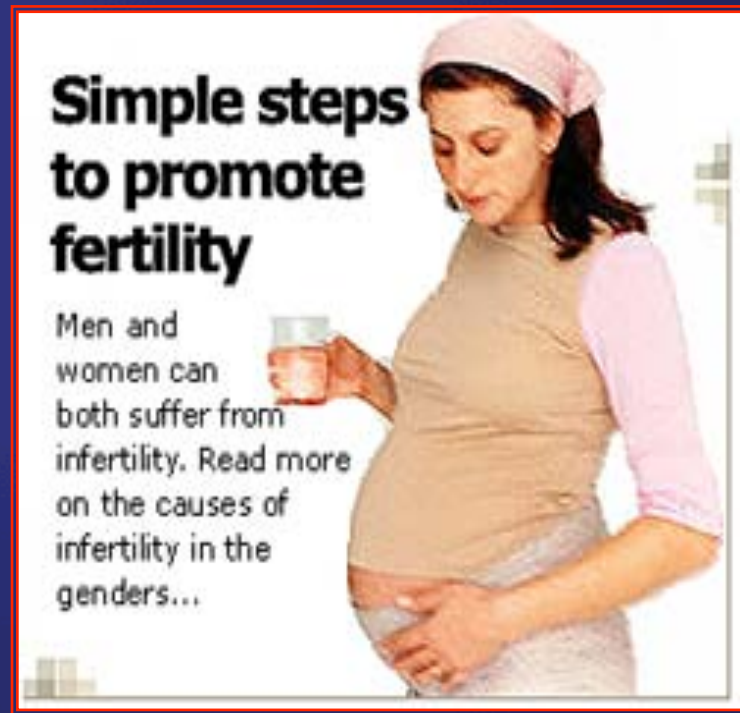


Diagnosi Prenatale e Coppia

Lo sviluppo della diagnosi prenatale ha significativamente modificato il comportamento riproduttivo delle coppie a rischio per malattie genetiche, che possono ottenere da questo servizio informazioni tranquillizzanti per il proseguimento della gravidanza

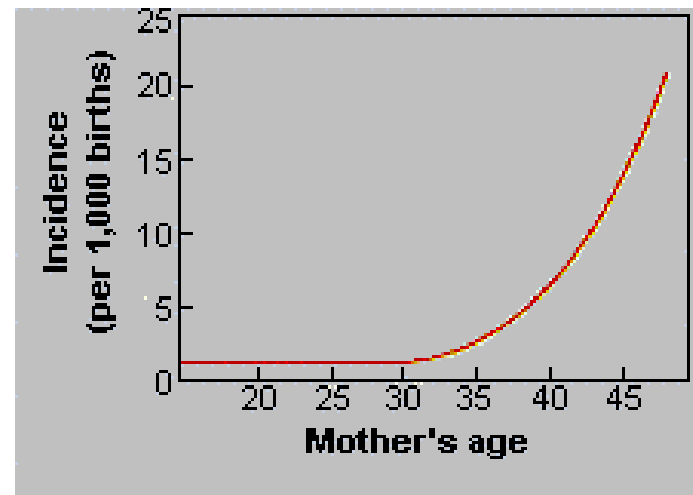
La diagnosi prenatale

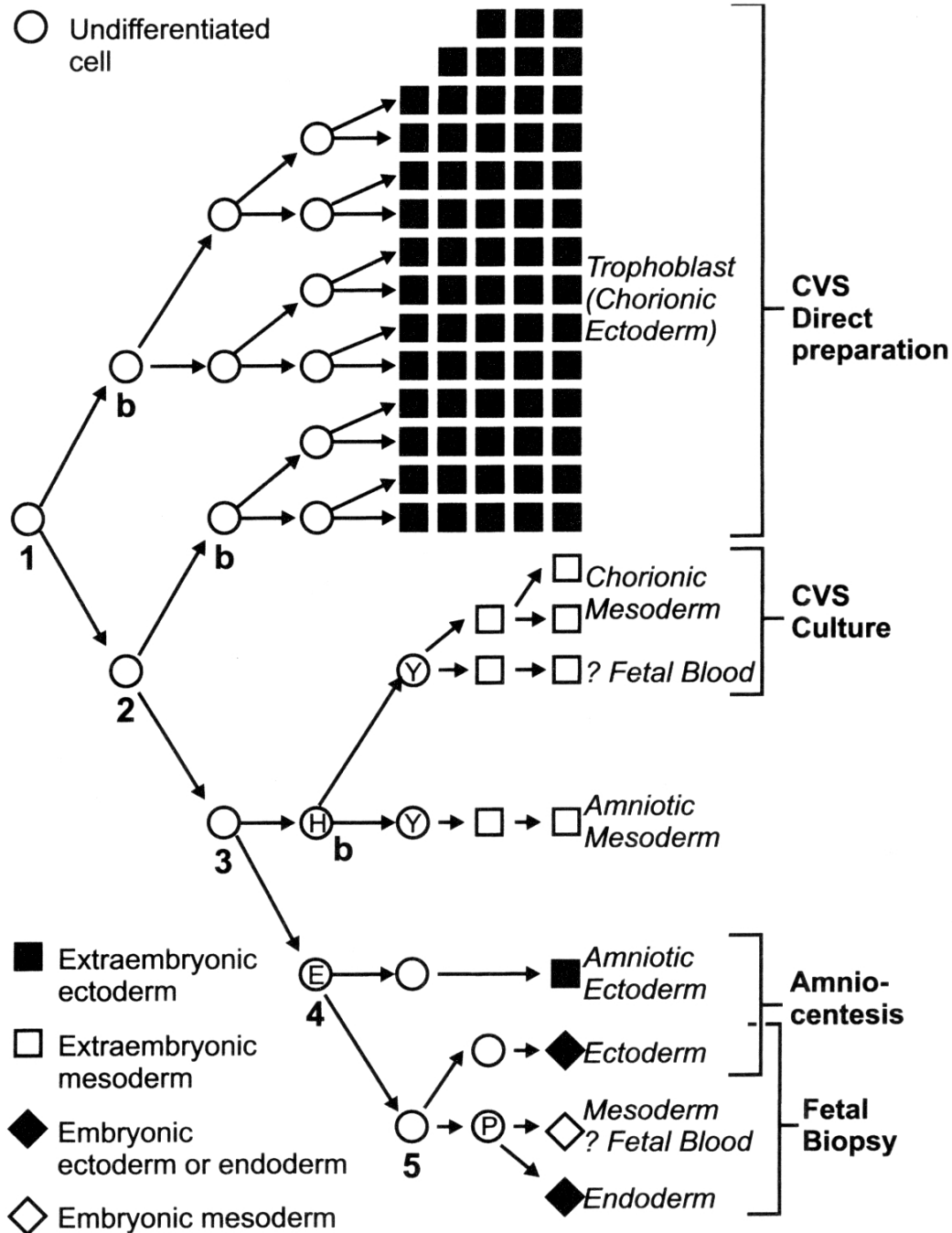
- *La principale indicazione alla diagnosi prenatale è il monitoraggio del **cariotipo fetale**. In Italia questa analisi riguarda oltre il 98% delle diagnosi prenatali che utilizzano tecniche di laboratorio. Lo studio del cariotipo ha alcune precise indicazioni e ha negli amniociti il tessuto di elezione .*



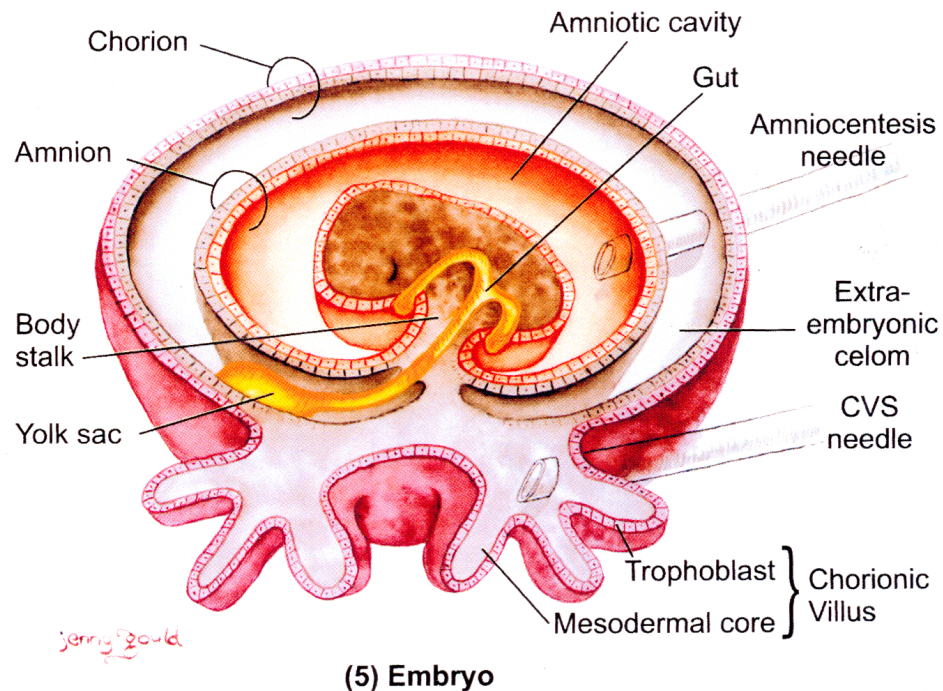
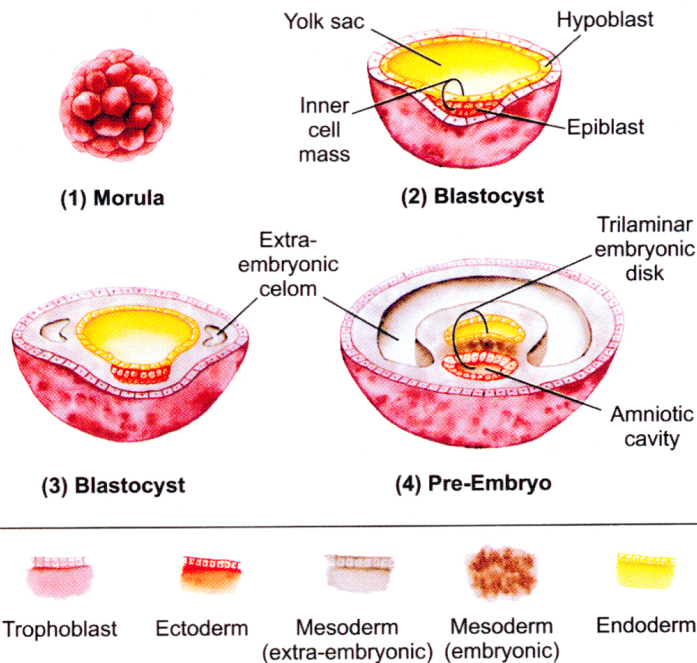
Indicazioni per la diagnosi prenatale

- **Età materna avanzata**
- Non esiste un criterio per definire l'età materna più appropriata al monitoraggio citogenetico della gravidanza.
- La maggior parte degli operatori ritiene appropriata un'età uguale o superiore ai 35 anni (RR DS = 1/380).





Lo zigote produce una cellula precursore (1b) (trofoblasto) e una cellula staminale totipotente (2). La cellula staminale 3 dà origine alla inner cell mass che si divide in ipoblasto (H) ed epiblasto (E).



- Il trofoblasto, il tessuto di rivestimento della blastocisti darà origine al rivestimento esterno dei villi coriali.

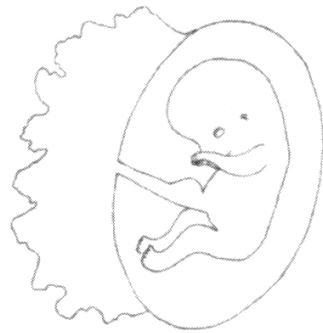
- La ICM si compone di H e E.

- La blastocisti di 64 cellule è composta per la maggior parte da trofoblasto, 16 cellule sono ICM di cui soltanto 4 daranno origine all'embrione (epiblasto).

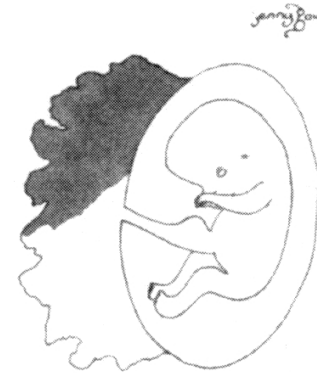
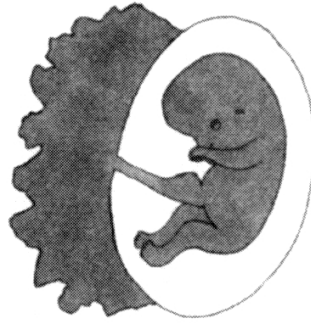
- Epiblasto dà origine alla cavità amniotica (e la superficie dorsale dell'embrione).

- Le linee cellulari analizzate dall'amniocentesi sono strettamente correlate con l'embrione.

- Le linee cellulari analizzate dalla villocentesi sono più distanti: trofoblasto (diretto) e mesenchima (coltivato)



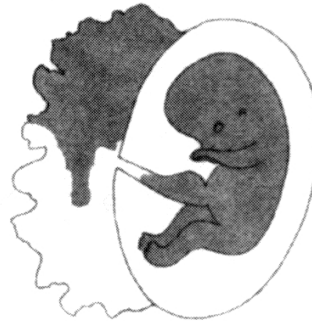
Complete
fetal-placental concordance



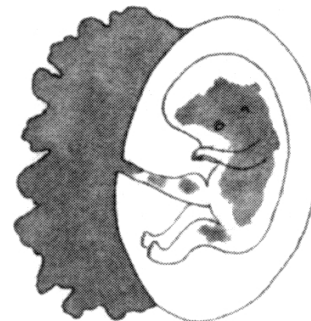
Confined placental
mosaicism



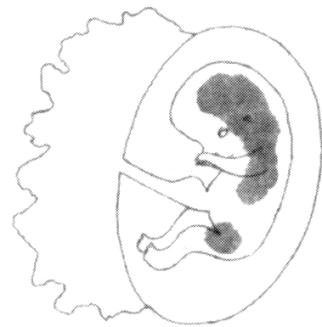
Fetal-placental
mosaicism



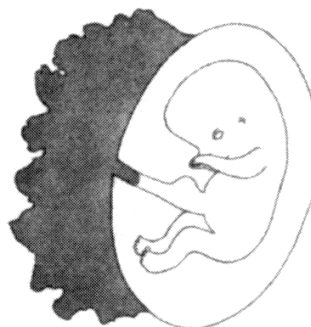
Non-mosaic fetus,
mosaic placenta



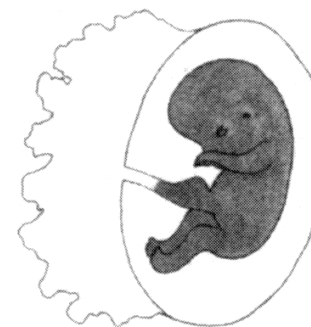
Fetal mosaicism,
non-mosaic placenta



Fetal mosaicism,
normal placenta

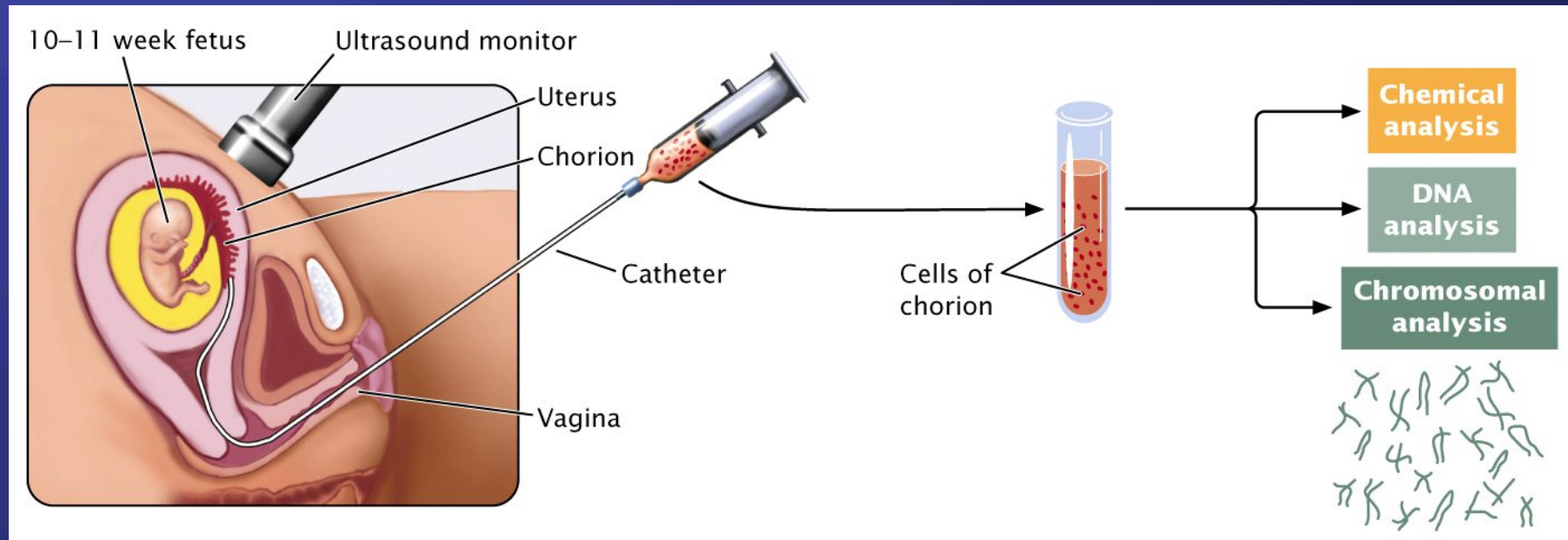


Complete
fetal-placental discordance



DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

VILLOCENTESI



PRELIEVO DEL TROFOBLASTO (VILLI CORIALI) TRA LA 8° E LA 12° SETTIMANA

RISCHIO 2-3%

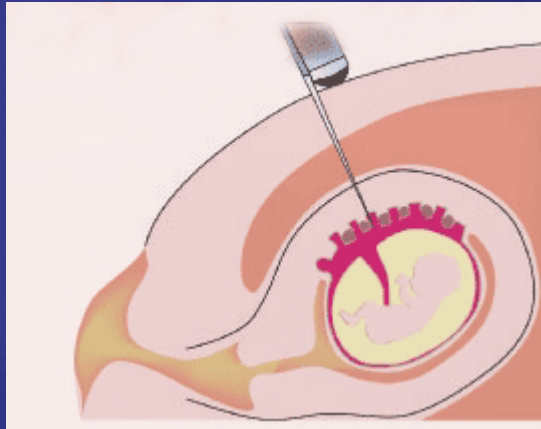
ANALISI CROMOSOMICA DIRETTA (le cellule del citotrofoblasto si dividono spontaneamente)

DIAGNOSI PRECOCE MA RISCHIO ELEVATO DI ABORTO

1% DI RISCHIO DI FALSI POSITIVI

DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

VILLOCENTESI



**analisi
diretta**

(citotrofoblasto)



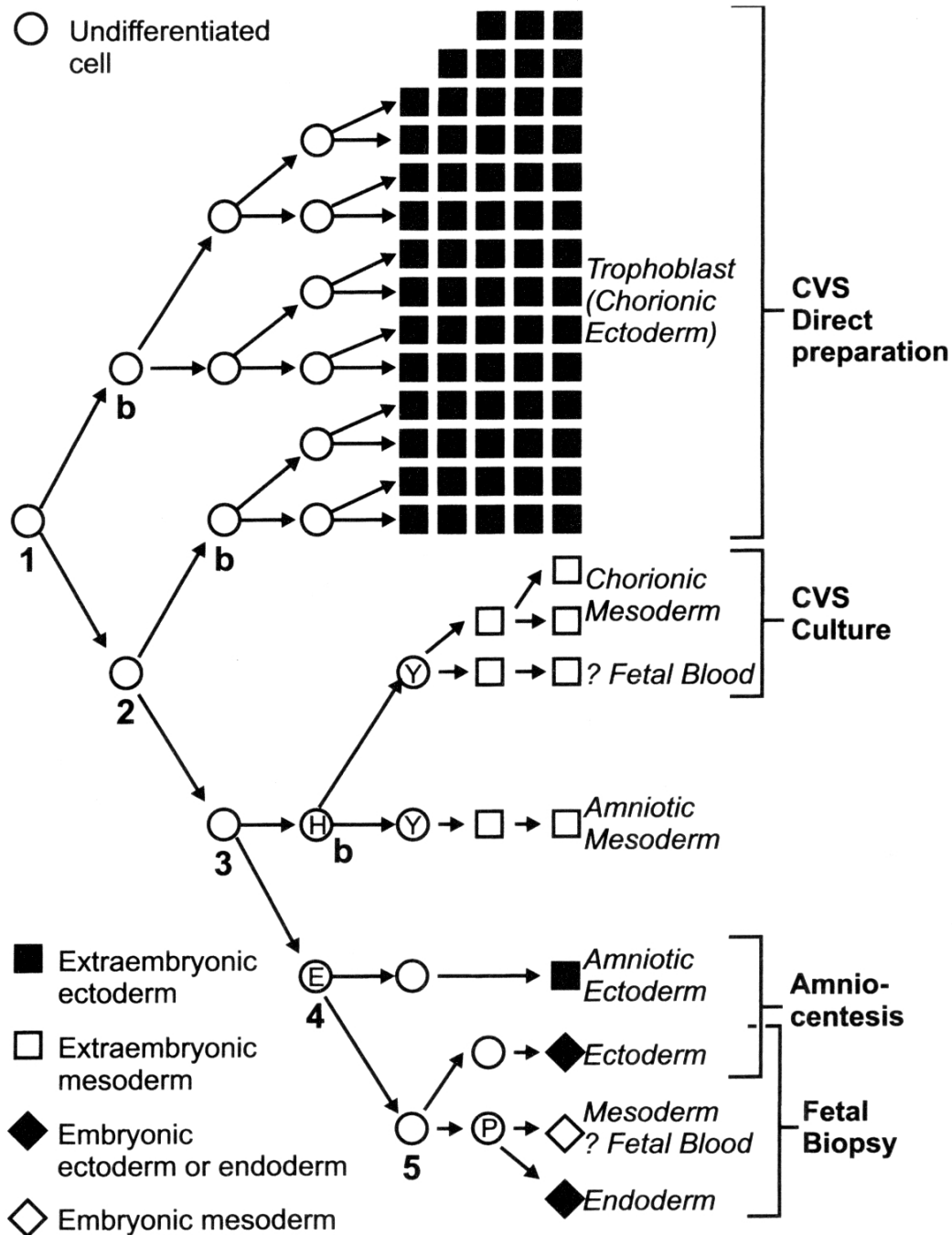
Difficoltà di bandeggio

**Analisi
indiretta**

(cellule mesenchimali)



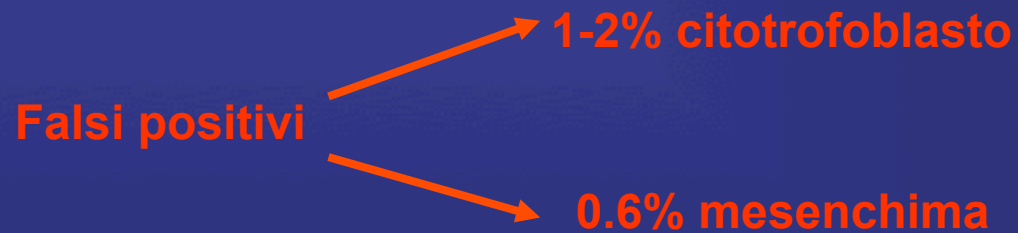
Bandeaggio migliore



Lo zigote produce una cellula precursore (1b) (trofoblasto) e una cellula staminale totipotente (2). La cellula staminale 3 dà origine alla inner cell mass che si divide in ipoblasto (H) ed epiblasto (E).

DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

VILLOCENTESI - DIFFICOLTA'



DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

VILLOCENTESI - DIFFICOLTA'

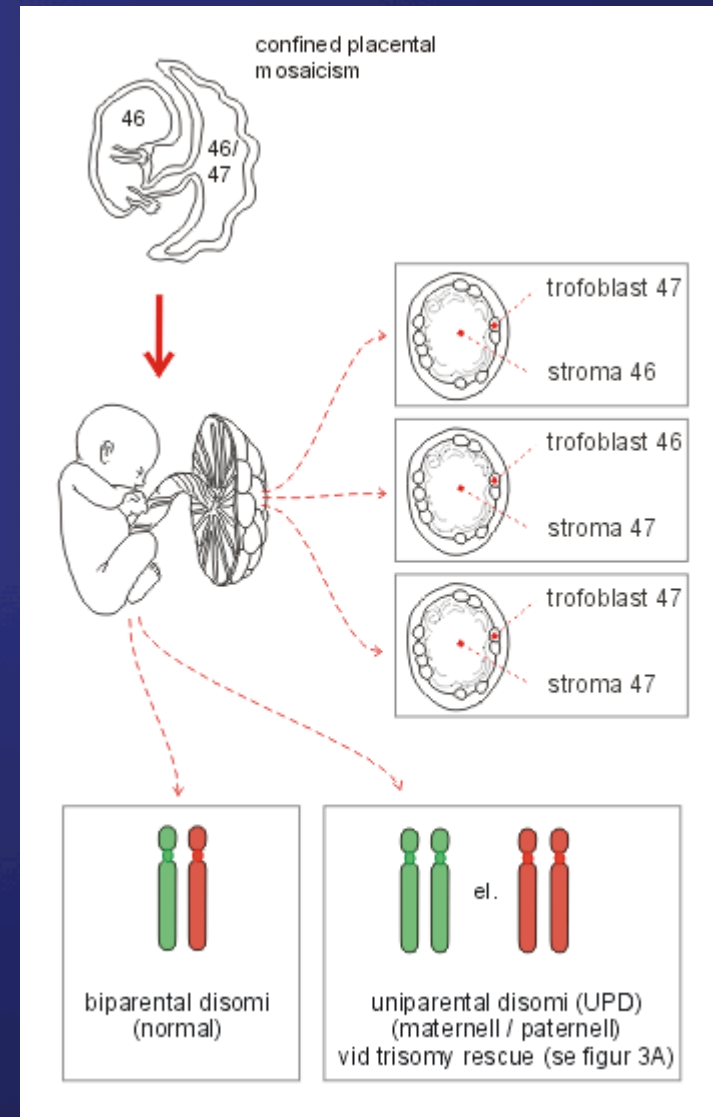
Mosaicismo confinato alla placenta

1-2 % dei casi

Tipo I: cellule anormali solo nel diretto

Tipo II: cellule anormali solo nel coltivato

Tipo III: cellule anormali nelle due linee



VILLOCENTESI - DIFFICOLTA'

- La maggior parte delle aberrazioni cromosomiche riscontrate nelle villocentesi sono da riferirsi a pseudomosaicismi. Con tale termine si intende la presenza di un cromosoma extranumerario presente solo nei villi ma del tutto assente nel feto. Questi, ovviamente, non hanno significato clinico.

VILLOCENTESI - DIFFICOLTA'

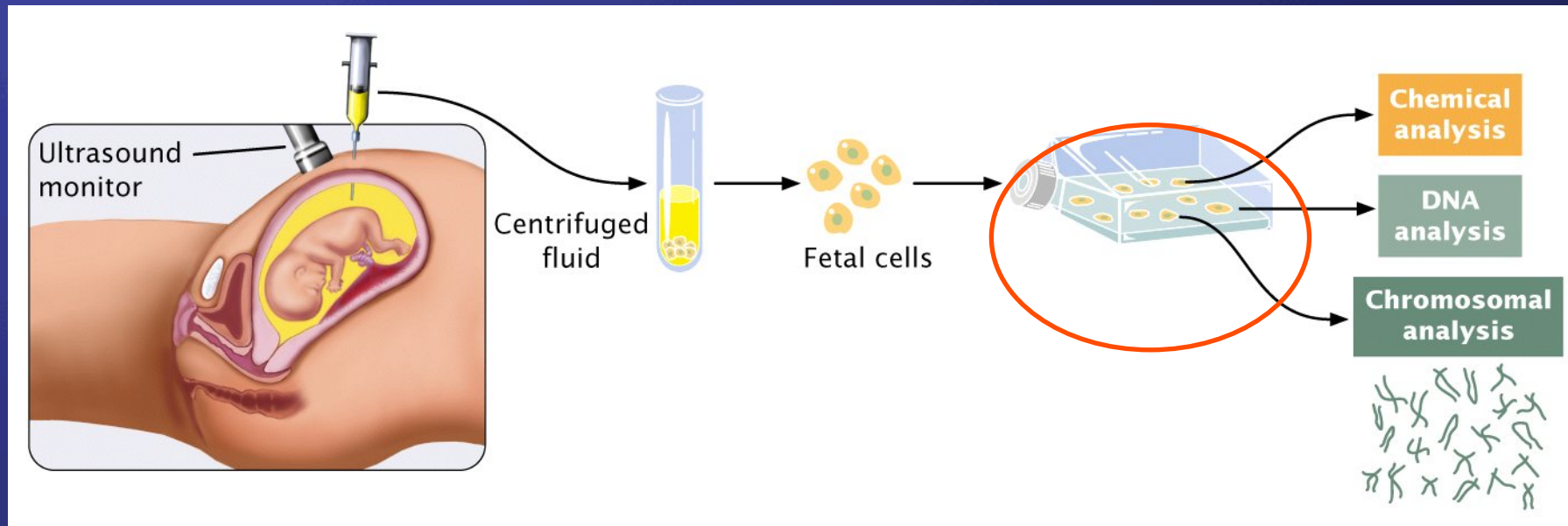
- Per stabilire che si tratta di tale artefatto, il genetista esperto si basa essenzialmente su due considerazioni. La prima è che la cellula aberrante è solitamente unica quando ci si trova a leggere un allestimento diretto e, in coltura, l'alterazione interessa pertanto un unico clone di crescita. In tal modo nelle cellule coltivate l'aberrazione appartiene sempre a zone isolate di una stessa flasca. La seconda considerazione è che, solitamente, ci si trova di fronte a mosaicismi che non sono compatibili con la vita e che, pertanto, sono da considerare assolutamente come errori di coltura. Ad esempio sono molto frequenti i riscontri occasionali di patrimoni aberranti aneuploidi come il tetraploide. Il problema però può sorgere di fronte ad una anomalia possibile come la trisomia.

VILLOCENTESI - DIFFICOLTA'

- A conferma del caratteristico confinarsi dell'anomalia ai soli villi sta il fatto che tutti i mosaicismi presenti nella letture dirette, non ritrovavano quasi mai riscontro sui neonati; mentre circa il 40% viene confermato quando il mosaicismo è osservato nelle colture.

DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

AMNIOCENTESI



**ASPIRAZIONE DEL LIQUIDO AMNIOTICO INTORNO ALLA 15°-16° SETTIMANA
(circa 20-30mL sui 200-250 totali)**

Il rischio di non riuscire a prelevare il liquido è minore del 1%

Il rischio di aborto è non superiore a 0.2-0.3 % (Milunsky, 2004)

ANALISI DEL CARIOTIPO DOPO CULTURA DI 14 GIORNI

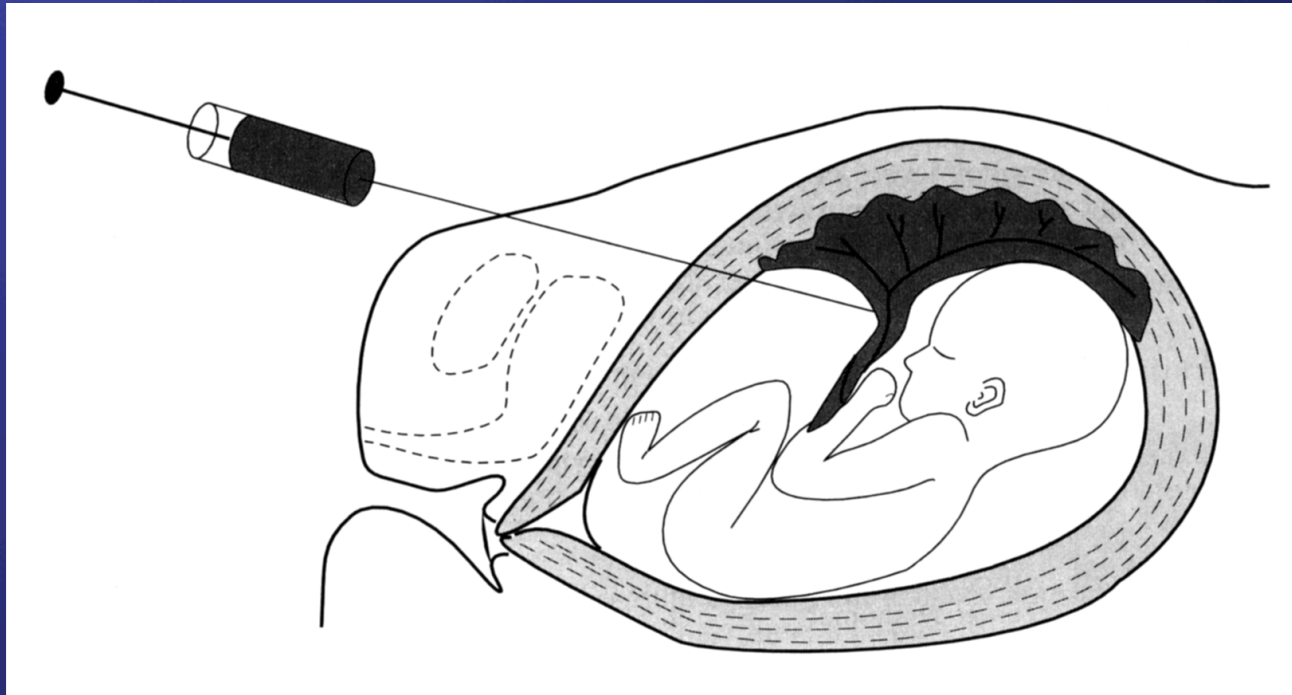
Risultati ambigui all'amniocentesi



- Usualmente vengono allestite 2-3 colture
- 1 cellula anormale in 1 cultura = artefatto
 - Mosaicismo di livello 1 o pseudomosaicismo
- 2 o più cellule anormali in 1 cultura = potrebbe essere un artefatto o reale;
 - Mosaicismo di livello 2, 20% di possibilità che sia reale mosaicismo
- 2 o più cellule anormali in due o più colture = mosaicismo vero
 - Mosaicismo di livello 3
 - Riptere amniocentesi o cordocentesi

DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

CORDOCENTESI



ASPIRAZIONE DI SANGUE FETALE INTORNO ALLA 18° SETTIMANA

RISCHIO 2.0%

DIAGNOSI RAPIDA PER VERIFICARE RISULTATO AMBIGUO DELL' AMNIOCENTESI

SCREENING DEL SIERO MATERNO

- Dosaggio dell' alfa-fetoproteina su liquido amniotico per analizzare i difetti del tubo neurale
- Insieme all' ecografia è in grado di rilevare l' 88% dei casi di spina bifida
- TRIPLATEST: alfa-fetoproteina (ridotta) gonadotropina corionica (aumentata) e estriolo non coniugato (aumentato)

70% di identificazione

6% di falsi positivi

QUANDO ESEGUIRE UNA DIAGNOSI PRENATALE?

- ETA' MATERNA AVANZATA (35 anni rischio down 1:380)
- malattie mendeliane (studio precedente della malattia)
- Anamnesi familiare positiva per patologia cromosomica (non necessaria se genitori sono normali)
- genitori eterozigoti per anomalie bilanciate (rischio 5-10%)

-

Indicazioni per la diagnosi prenatale

- Precedente figlio con patologia cromosomica

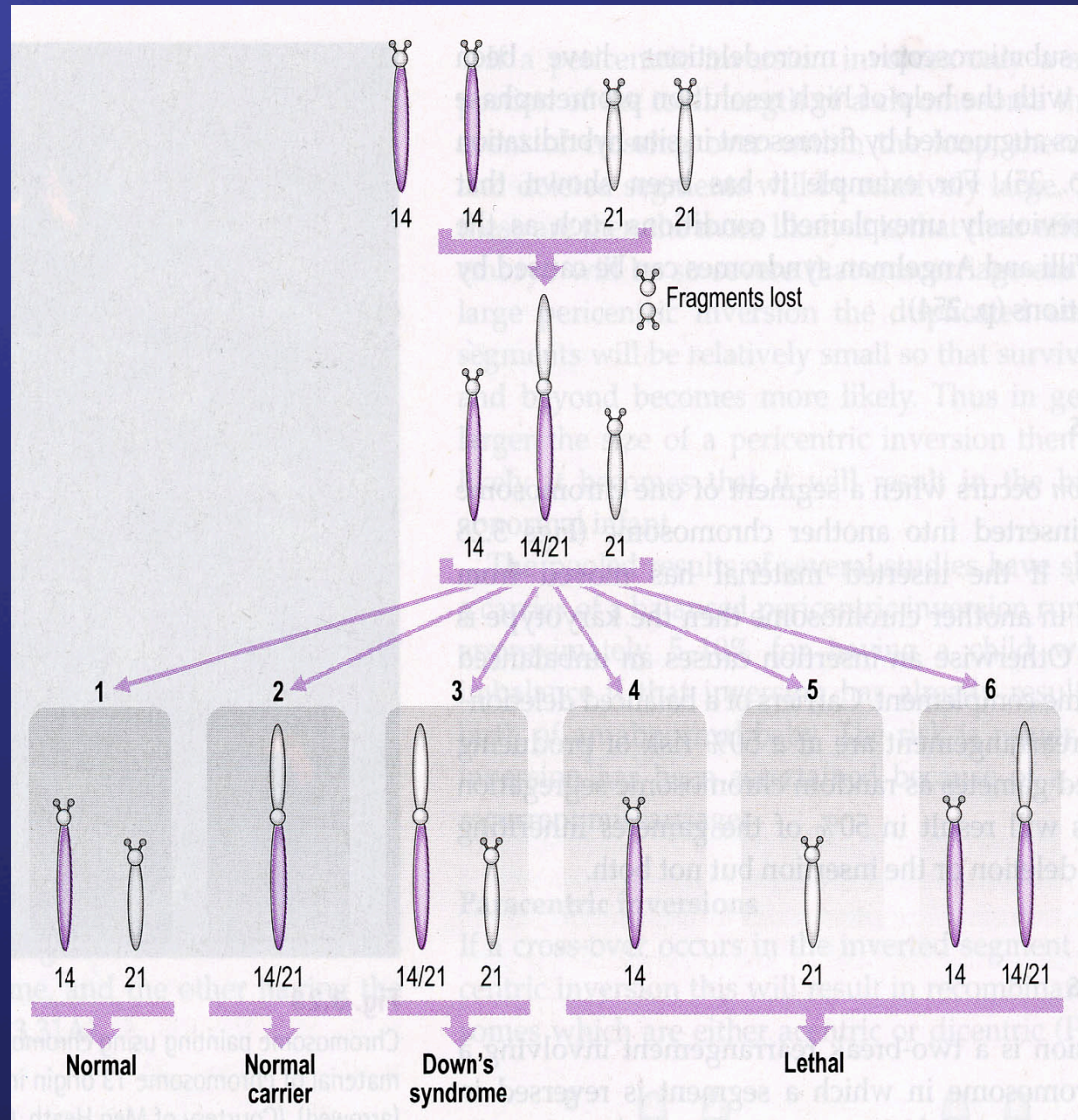
Le coppie che hanno un figlio con sindrome di Down da trisomia 21 libera o con traslocazione robertsoniana de novo hanno un rischio dell'1% circa di ricorrenza della sindrome. Nelle coppie attempate il rischio è quello calcolato sull'età materna.

Indicazioni per la diagnosi prenatale

- Genitori eterozigoti per anomalie 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

Robertsonian translocation



Indicazioni per la diagnosi prenatale

- Identificazione ecografica di patologia fetale o della gravidanza

in presenza di difetti strutturali e/o dello sviluppo fetale o alterazioni del volume del liquido amniotico.

In circa il 20% di queste gravidanze, soprattutto quando sono presenti difetti associati, il feto è affetto da una patologia cromosomica. Il riscontro di anomalie ecografiche costituisce perciò un'indicazione al monitoraggio del cariotipo fetale.

Indicazioni per la diagnosi prenatale

- Anamnesi familiare positiva per difetti del tubo neurale
- Anamnesi familiare positiva per malformazioni congenite
- Malformazioni e/o rimozioni chirurgiche dell'ovaio o parti di esso (RR DS + 9.6)
- Malattie mendeliane

Problemi nella diagnosi prenatale

- *1. Possibilità che le cellule in coltura non crescano in maniera adeguata e non sia possibile effettuare la diagnosi sul campione prelevato.*

Presso i centri più qualificati questo problema si verifica eccezionalmente, in media in meno dell' 1% dei campioni.

Problemi nella diagnosi prenatale

- 2. *Possibilità che l'analisi fornisca un risultato ambiguo.*

Questo può dipendere da una contaminazione materna, che dà quindi origine alla presenza di due linee cellulari, potenzialmente non differenziabili se il feto è di sesso femminile, mentre di solito sono facilmente evidenziabili se il feto è di sesso maschile.

In altri casi può essere presente una seconda linea cellulare originata da una mutazione *in vitro*. È indispensabile riuscire a differenziare i campioni che contengono artefatti della coltura (pseudomosaicismo) dai mosaicismi veri, in quanto le implicazioni per il feto sono completamente diverse (rispettivamente sano e ammalato).

Problemi nella diagnosi prenatale

- 3. *Diagnosi certa ma implicazioni fenotipiche incerte*

Questo costituisce attualmente un importante limite della diagnosi citogenetica fetale. In pratica, a fronte di un risultato diagnostico accurato a livello di laboratorio, non è possibile in certi casi predire con altrettanta accuratezza il fenotipo fetale. In queste situazioni viene attribuito un rischio empirico di patologia, che non è ulteriormente precisabile.

