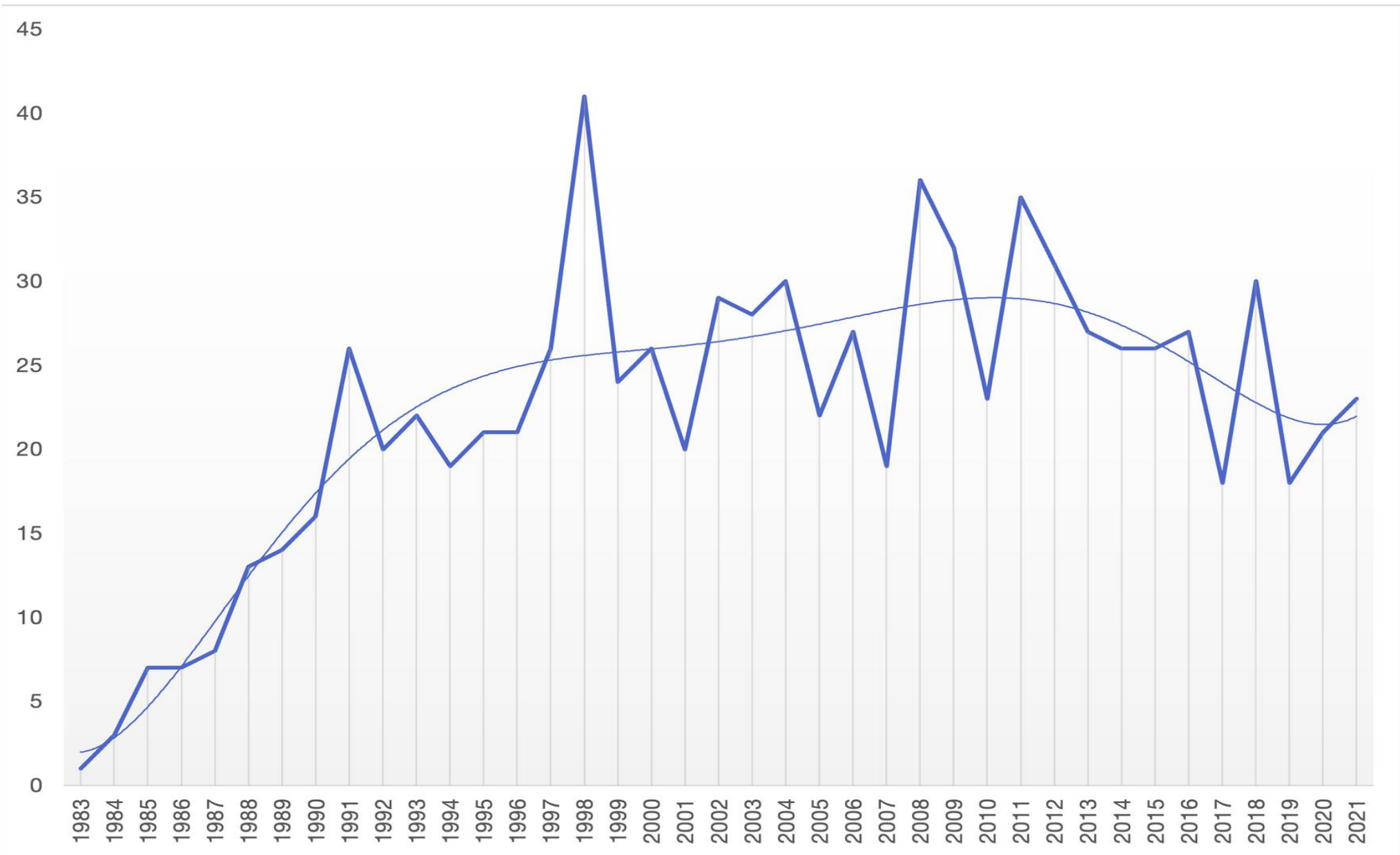


Diagnosi prenatale e percorso coppie a rischio



New at-risk couple in our Centre/year

Prima visita – riconoscimento
coppia a rischio



Colloquio informativo
DNA di conferma



Gravidanza?

Diagnosi prenatale

- La gravidanza è iniziata e siamo più o meno in tempo di fare qualcosa

Diagnosi prenatale

- La gravidanza è iniziata e siamo più o meno in tempo di fare qualcosa

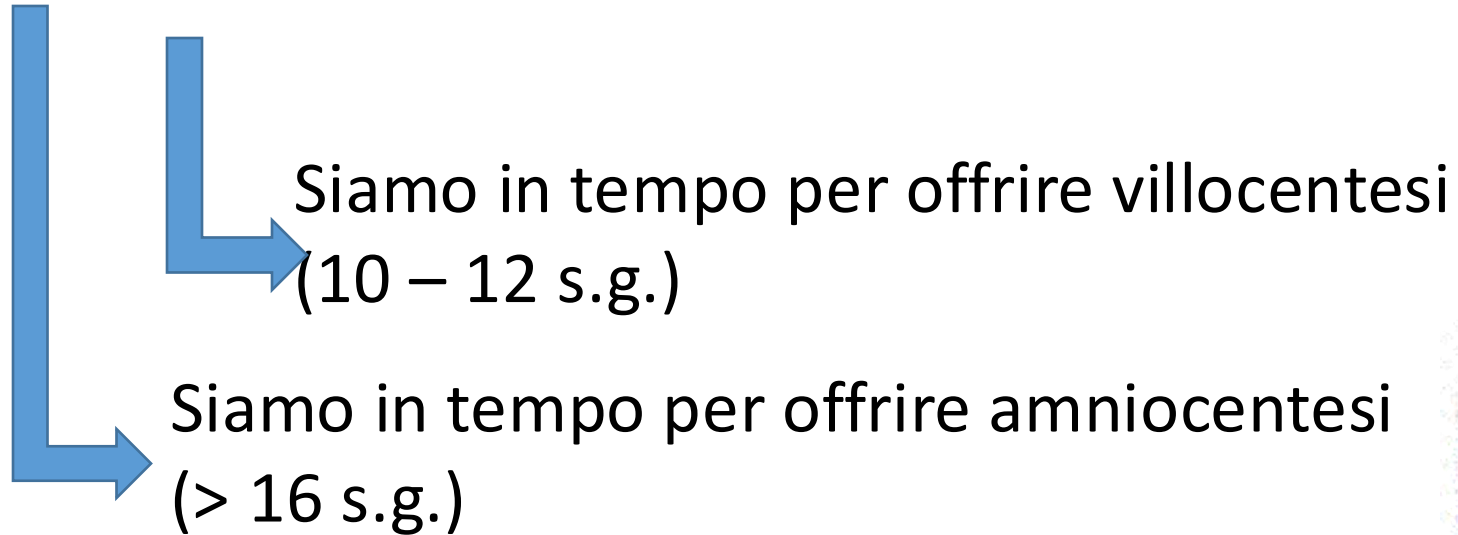


Siamo in tempo per offrire villocentesi
(10 – 12 s.g.)



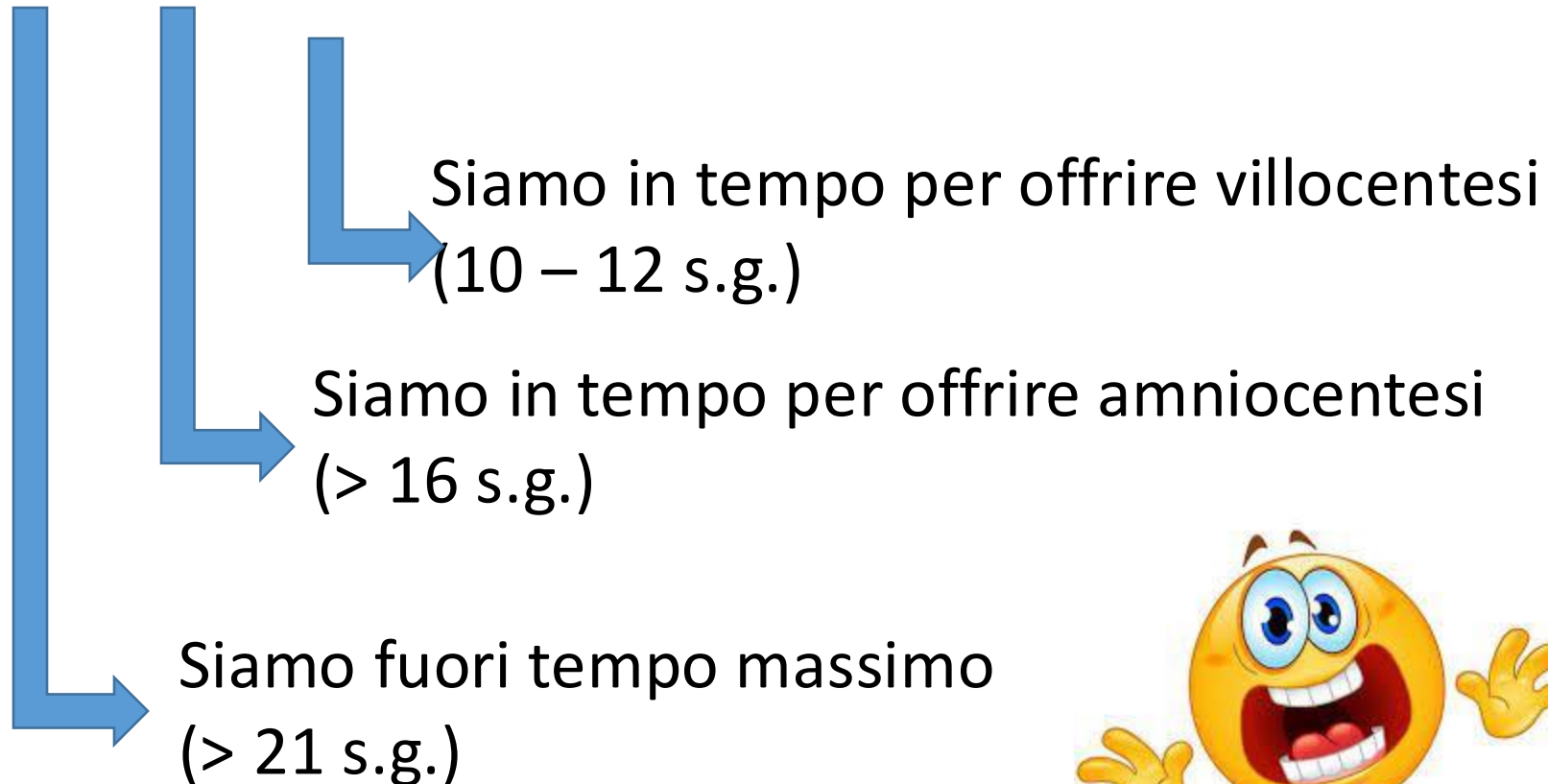
Diagnosi prenatale

- La gravidanza è iniziata e siamo più o meno in tempo di fare qualcosa



Diagnosi prenatale

- La gravidanza è iniziata e siamo più o meno in tempo di fare qualcosa



Abbiamo visto in data 15/12/2022, in consulenza presso il nostro ambulatorio per la prevenzione delle emoglobinopatie ereditarie, la coppia [REDACTED]

[REDACTED] è eterozigote (**portatrice sana**) per **drepanocitosi** (anemia falciforme, emoglobina S, Sickle Cell Disease). La ricerca in biologia molecolare dei principali difetti alfa globinici, inclusa la triplicazione dei geni alfa globinici, è normale.

[REDACTED] è eterozigote (**portatore sano**) per **β talassemia** secondo la mutazione **IVS1.1 (G>A)** sul gene della β globina. Il sequenziamento di nuova generazione dei geni alfa globinici ha dato esito normale.

La coppia presenta un rischio di malattia (**microdrepanocitosi**) per la prole del 25% ad ogni gravidanza.

Si tratta di una malattia grave, che può comportare anemia di grado variabile anche trasfusione-dipendente e crisi acute di dolore su base trombotica, che possono causare complicanze serie a livello di tutti i distretti arteriosi.

Abbiamo informato la coppia sugli aspetti ematologici e genetici di tale condizione. Data l'epoca protratta della gravidanza non è possibile offrire una diagnosi prenatale.

Non sono necessari controlli perinatali.

Il controllo del nascituro potrà avvenire all'età di 3 mesi presso il nostro Centro.

Cell-free DNA

- short fragments of DNA released into the bloodstream through a natural process of cell death
- cfDNA (fetal fraction) derived from the placenta can be detected after 4-7 g.w. and is undetectable within hours postpartum
- Various cfDNA NIPT technologies; it's important to understand how fetal fraction is used and how it can affect test results.

Usually NGS / SNParray

cff-DNA: when?

- Chromosomes
 - Y chromosome for X-linked diseases → avoid PND
 - AD diseases for paternal mutations
 - AR disease for paternal mutations
- } PND required for diagnosis

Recessive diseases

- aneuploidy diagnosis based on quantitation (in NGS by counting sequence reads from multiple sites on a chromosome compared to sequence reads from other chromosomes)
- for autosomal recessive disorders quantitative analysis is focused on only 1 or 2 mutations → determining the maternally transmitted allele requires precise quantitative analysis → very difficult with short reads

Recessive diseases

Relative mutation dosage (RMD)

- quantitative comparisons between variant and wild-type alleles
- Powerful for single nucleotide variants (SNVs) and small insertions/deletions (InDels) but usually cannot detect large InDels and copy number variants (CNVs).
- Sequencing errors and amplification bias of low-abundance fetal variants in cfDNA.

Relative haplotype dosage (RHDO)

- determines the relative proportions of variant and normal haplotypes in maternal plasma.
- Can theoretically detect most types of variants, including large InDels and CNVs.
- Requires parental haplotype information

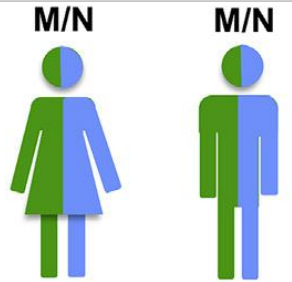
Relative mutation dosage (RMD)

- analyze balance or imbalance of wild-type and mutant alleles in maternal plasma using digital PCR
- Droplet digital PCR (ddPCR): PCR-based technique - absolute quantification of the targeted DNA molecules
- high sensitivity – lower cost compared to NGS

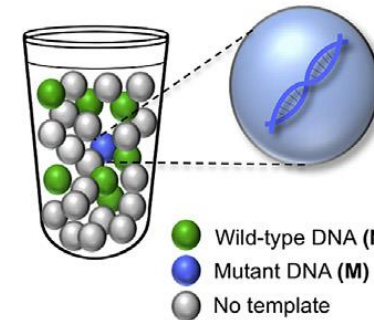
A. RELATIVE MUTATION DOSAGE by droplet digital PCR

1. Genomic DNA analysis

- Maternal genotyping
- Paternal genotyping
- Design of the mutation assay



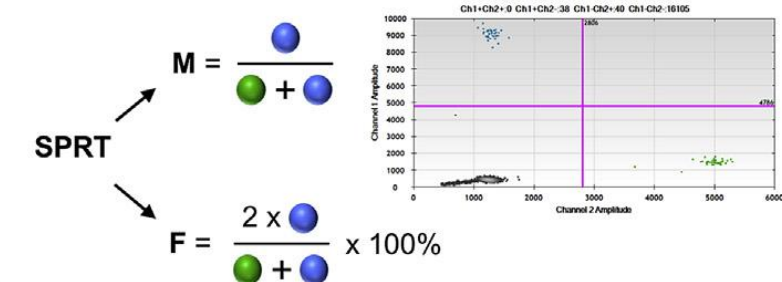
2. Maternal plasma DNA analysis





- Distribution of DNA molecules into reaction droplets and PCR amplification
- **Mutation assay**
- Fetal DNA fraction - **ZFX/Y assay**

3. Droplet digital PCR data analysis

- Counting the number of reaction droplets with positive PCR amplifications
- Mutant allele proportion (**M**) and fetal DNA fraction (**F**) calculation



Optimized Droplet Digital PCR Assay on Cell-Free DNA Samples for Non-Invasive Prenatal Diagnosis: Application to Beta-Thalassemia

Constantina G Constantinou,^{a,b} Eleni Karitzi,^a Stefania Byrou,^a Coralea Stephanou,^a Kyriaki Michailidou ^{b,c},
Christiana Makariou,^d Georgia Hadjilambi,^d Agathoklis Christofides,^e Marina Kleanthous,^{a,b,†} and
Thessalia Papasavva ^{a,b,x,†}

- IVSI-110G>A
- 8-13 gw
- 33 samples correctly classified, 6 inconclusive, 1 misclassified (contamination – low fetal fraction)
- 97.06% accuracy (95%CI, 82.46–99.68), 100% sensitivity (95% CI, 76.84-100), and 95% specificity (95% CI, 75.13–99.87)

- cffDNA → NGS sequencing of alpha genes
- Machine learning → fragment count profiles across the HBA gene cluster
→ correct classification of alpha carrier status
- sensitivity and specificity >99% for common genotype classes
(i.e., $\alpha\alpha/--SEA$, $\alpha\alpha/-\alpha3.7$ and $\alpha\alpha/-\alpha4.2$)
- PPV and NPV of the model for $\alpha\alpha/--SEA$ (Vietnam): 99.29% and 99.99%

OPEN **Detection of maternal carriers
of common α -thalassemia
deletions from cell-free DNA**

Relative haplotype dosage (RHDO)

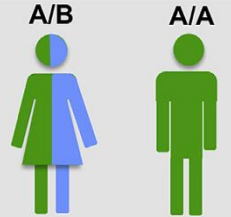
RHDO analyzes a range of SNP allele counts within a haplotype → more robust

Expensive (reconstruction of each parental haplotype)

B. RELATIVE HAPLOTYPE DOSAGE
by massively parallel sequencing

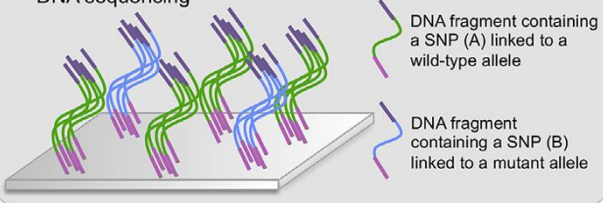
1. Genomic DNA analysis

- Maternal haplotyping
- Paternal genotyping
- Selection of SNPs heterozygous in the mother and homozygous in the father



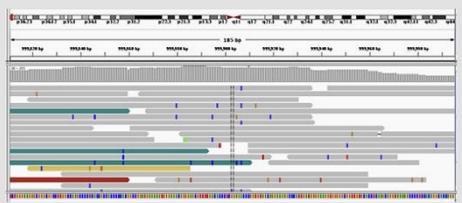
2. Maternal plasma DNA analysis

- Distribution of DNA molecules on a sequencing flow cell and DNA sequencing



3. Sequencing data analysis

- DNA sequence alignment



- Counting the number of sequence reads originating from DNA fragments containing SNPs linked to a mutant allele (**Haplotype I**) or a wild-type allele (**Haplotype II**)

	Hap I	Hap II	SPRT
SNP 1	30	31	30 : 31
SNP 2	26	22	56 : 53
SNP 3	33	31	89 : 84
SNP 4	28	24	117 : 108
SNP 5	35	27	152 : 135

Hap I > Hap II

interrogates the relative proportions of maternal haplotypes through the use of heterozygous single-nucleotide polymorphisms (SNPs).

The number of sequenced reads for each allele of the respective informative loci is counted and the fetal DNA fraction is determined.

Statistical analysis evaluates whether a haplotype dosage balance or imbalance for Hap I (haplotype associated with the mutant allele) or Hap II (haplotype associated with the wild-type allele)

Relative haplotype dosage (RHDO)

RHDO analyzes a range of SNP allele counts within a haplotype → more robust

Expensive (reconstruction of each parental haplotype)

Attempt to use population haplotype: haplotypes reconstruction using a sample of the carrier population → reference panel

- Deduction of parental haplotypes from genotypes
- Determination of parental inheritance in the cffDNA → infer fetal genotype
- Invasive PND if affected fetus

RESEARCH

Open Access



Noninvasive prenatal testing of α -thalassemia and β -thalassemia through population-based parental haplotyping

Chao Chen^{1,2†}, Ru Li^{3†}, Jun Sun^{1,2†}, Yaping Zhu^{1,2}, Lu Jiang^{1,2}, Jian Li³, Fang Fu³, Junhui Wan³, Fengyu Guo^{1,2}, Xiaoying An^{1,2}, Yaoshen Wang^{1,2}, Linlin Fan^{1,2}, Yan Sun^{1,4}, Xiaosen Guo¹, Sumin Zhao^{1,2}, Wanyang Wang^{1,2}, Fanwei Zeng¹, Yun Yang^{1,4,5}, Peixiang Ni^{1,2}, Yi Ding^{1,2}, Bixia Xiang¹, Zhiyu Peng^{1*}  and Can Liao^{3*}

Inferred 94% (111/118) of the fetal alleles

7 cases: not feasible because of lack of informative SNP

Accuracy: 99%

80\$/test

ethnic backgrounds!

consider including SNPs to distinguish ethnic information

- Long reads sequencing (e.g. Nanopore sequencing): can phase haplotype of complex
- Each long read spans multiple heterozygous SNPs → more accurate
- DNA quality and quantity crucial

400\$/family

Correct classification in 12/13 families
(small quantity of informative SNPs)

Scientific Reports | (2021) 11:5714

Noninvasive prenatal testing for β -thalassemia by targeted nanopore sequencing combined with relative haplotype dosage (RHDO): a feasibility study

Fuman Jiang^{1,3,5}, Weiqiang Liu^{2,5}, Longmei Zhang^{4,5}, Yulai Guo⁴, Min Chen², Xiaojing Zeng⁴, Yang Wang⁴, Yufan Li², JiaJia Xian², BoLe Du⁴, Yuhuan Xie², Shuming Ouyang², Sheng Li⁴, Yinghong Yang², Chunsheng Zhang⁴, Fei Luo¹ & Xiaofang Sun^{2✉}

Prima visita – riconoscimento
coppia a rischio



Colloquio informativo
DNA di conferma



NO



Avvio esami in routine
Informazione sulle possibilità
(DPN – PGT – altro)

Carrier Screening

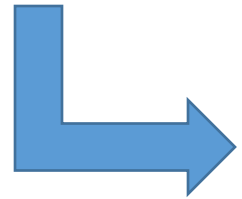
- Identify carriers without family history
- Recessive or XL disease with high frequency in the population (eg. CF-SMA-thal):
 - Well known phenotype
 - Impact on quality of life/duration of life
 - Intellectual deficit
 - Requires therapy
 - Paediatric onset
 - PND/PGT available

Carrier Screening – who?

- IVF
- Gamete donors
- Consanguineous marriage
- General population

Carrier Screening – who?

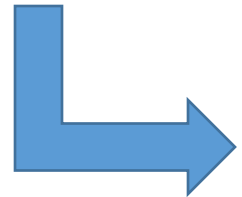
- IVF
- Gamete donors
- Consanguineous marriage
- General population



Cost-benefit?

Carrier Screening – who?

- IVF
- Gamete donors
- Consanguineous marriage
- General population



Cost-benefit?

Probably with panels < 500\$



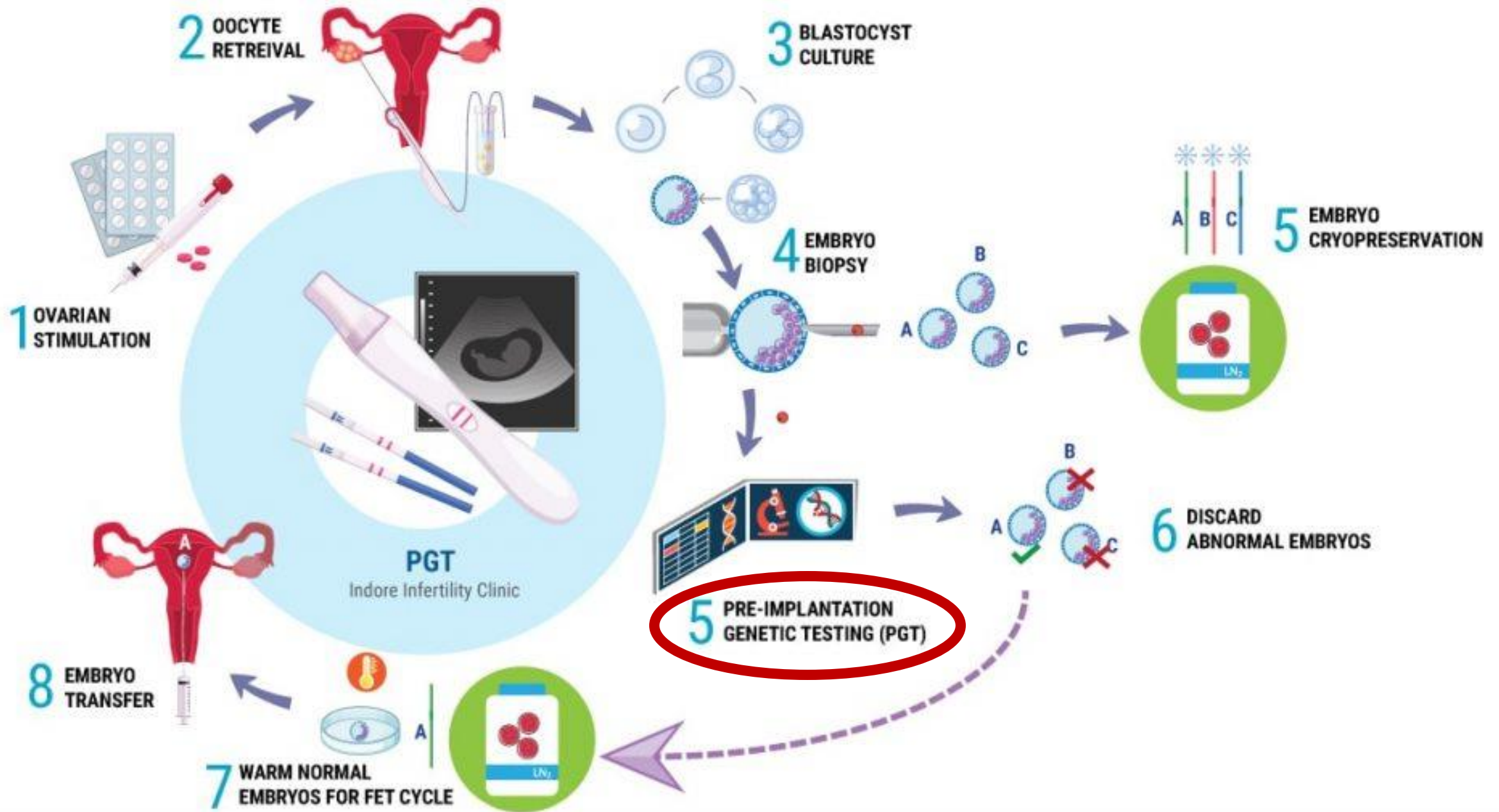
- Knowledge
 - Reduce the psychological impact of the pathology
 - optimal strategy for diagnosis and treatment
 - Possible PGT/PND
- Social stigma
 - Reduced penetrance/variable expressivity
 - Not possible to detail every disease
 - Residual risk
 - Stress related to the choices
 - Obligated to perform PND
-
- Can really recognize all the carriers?



- Knowledge
- Reduce the psychological impact of the pathology
- optimal strategy for diagnosis and treatment
- Possible PGT/PND
- Social stigma
- Reduced penetrance/variable expressivity
- Not possible to detail every disease
- Residual risk
- Stress related to the choices
- Obligated to perform PND
- Can really recognize all the carriers?

Counselling!





Preimplantation genetic testing (PGT)

- Aneuploidy (PGT-A) → higher implantation rates / less risk of pregnancy interruption
- Specific genetic disorders (PGT-M)

Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J, et al. Birth of a healthy infant following trophoctoderm biopsy from blastocysts for PGD of β -thalassaemia major: case report. Hum Reprod. 2005;20:1855-1859

Preimplantation genetic testing (PGT)

- Aneuploidy (PGT-A) → higher implantation rates / less risk of pregnancy interruption

- Specific genetic disorders (PGT-M)

Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J, et al. Birth of a healthy infant following trophoctoderm biopsy from blastocysts for PGD of β -thalassaemia major: case report. Hum Reprod. 2005

- It is NOT

A way to make "designer babies"

manipulating or altering an embryo's genome

- No differences in children status comparing IVF alone vs IVF+PGT
- Preimplantation genetic testing is not a guarantee: Sensibility 95-99%
 - Insufficient DNA
 - amplification failure (allele drop-out)
 - different genetic condition that was not tested

- No differences in children status comparing IVF alone vs IVF+PGT
- Preimplantation genetic testing is not a guarantee: Sensibility 95-99%

Insufficient DNA

amplification failure (allele drop-out)

different genetic condition that was not tested



monitoring ADO and contamination by STR / SNPs
linked to the pathogenic variant locus

Linkage analysis especially for alpha thalassemia

- SNP arrays (Karyomapping)
- Haplotypes in the couple in order to determine the informative SNPs
- Embryo haplotypes compared to the parental haplotypes

- detection of any monogenic disorder

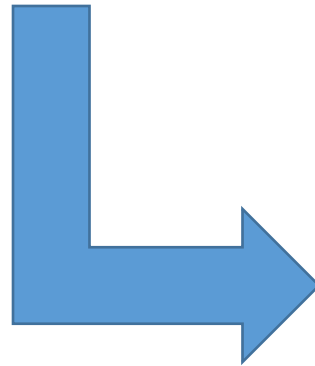
- Concurrent HLA typing (likelihood of finding an embryo unaffected for the disease and matched to the affected child in the family is 18.8%)

PND after PGT-M?

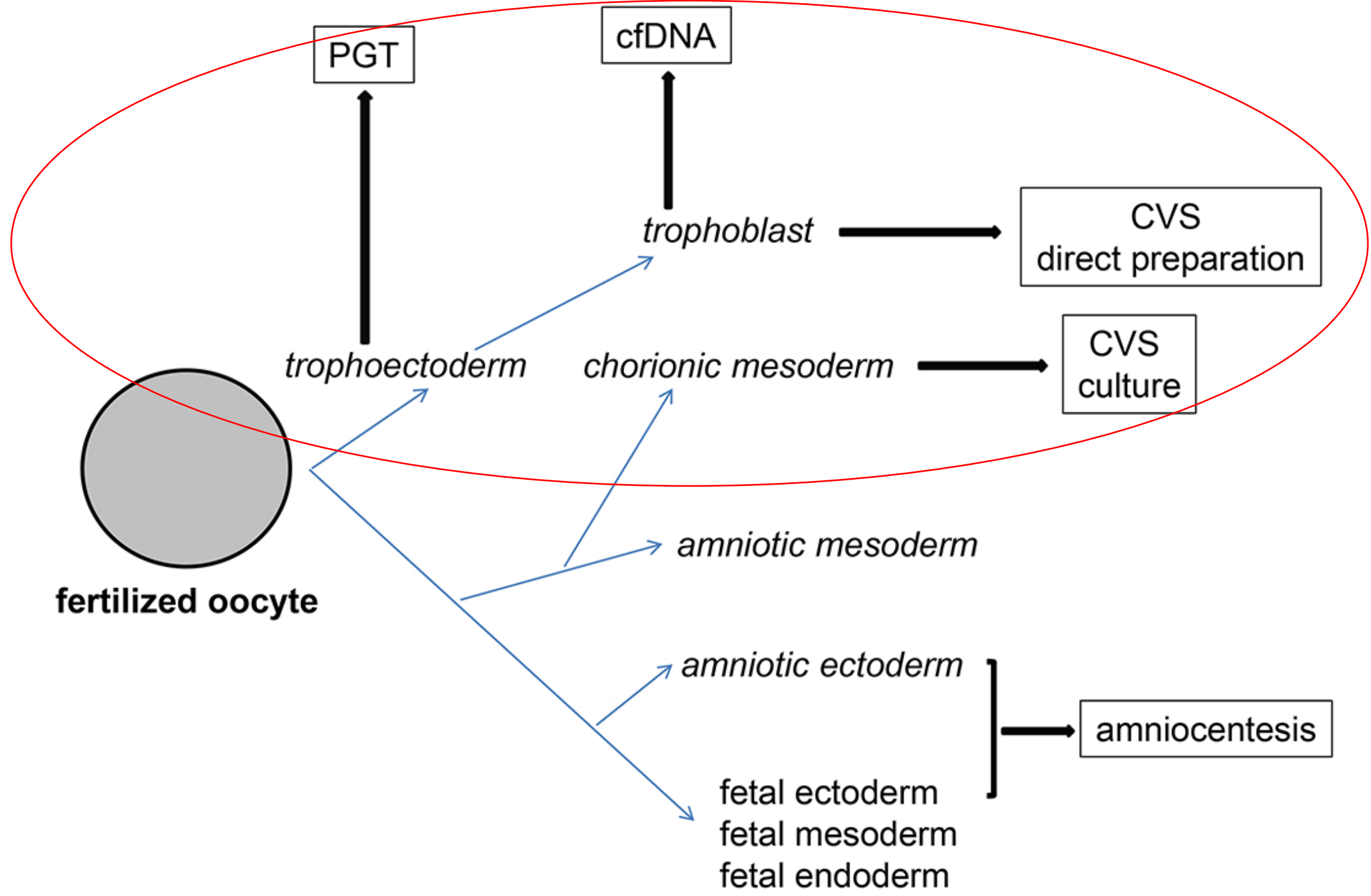
- If the test is done correctly: residual risk 1% for the monogenic disease
- If PGT-A is not performed → chromosomal risk as per maternal age

PND after PGT-M?

- If the test is done correctly: residual risk 1% for the monogenic disease
- If PGT-A is not performed → chromosomal risk as per maternal age



Chromosome abnormalities
ultrasound



PND



Standard prenatal tests

Spontaneous pregnancy
-> general population
risk

National Health system

Karyotype



Pregnancy termination

Wait up to 10 gw

PGT



ICSI -> higher risk

No pregnancy
termination

\$\$

Karyotype



Lots of test before

Inconclusive tests
(ADO)

No embryos

No pregnancy



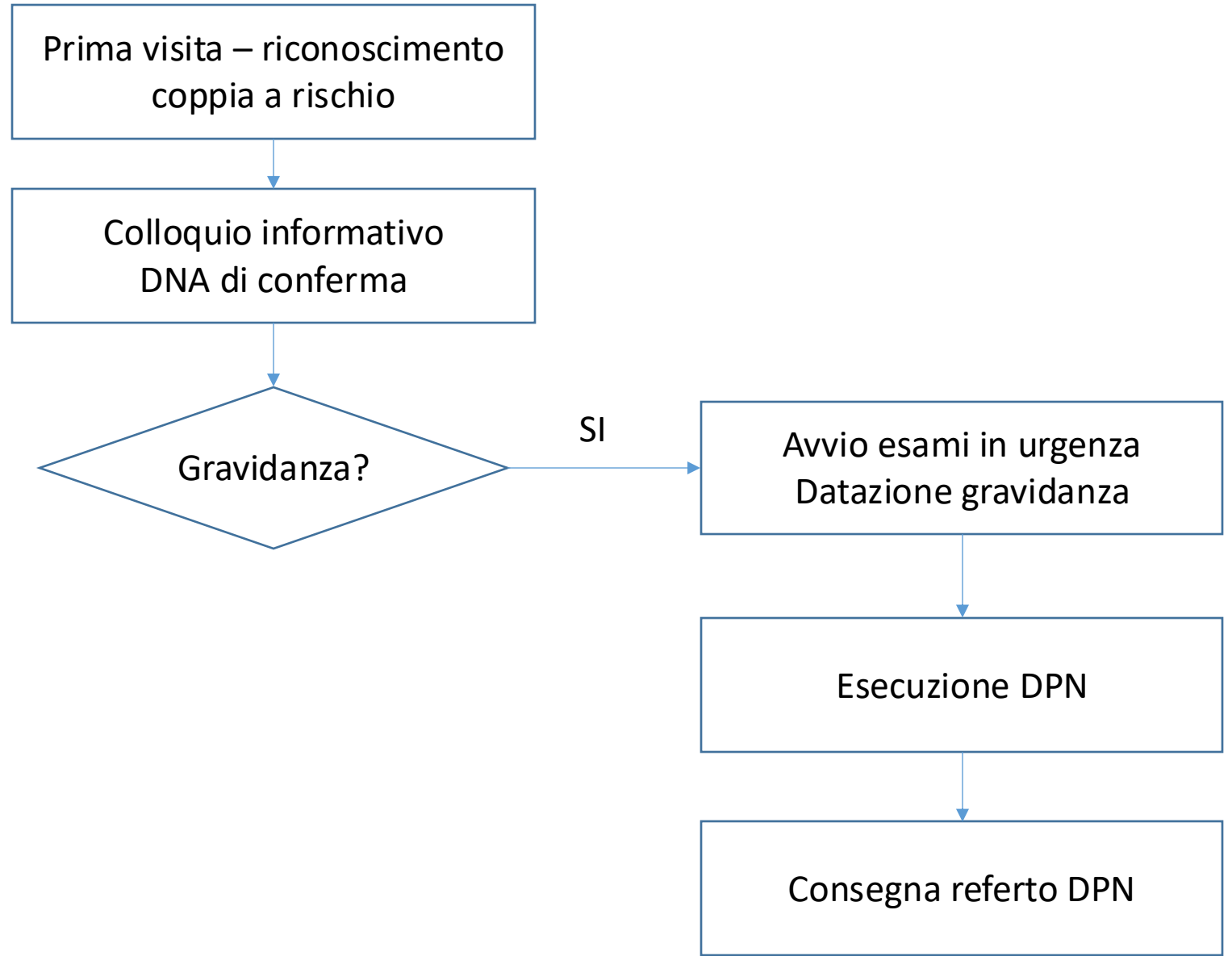
Prima visita – riconoscimento
coppia a rischio



Colloquio informativo
DNA di conferma



Gravidanza?



Abbiamo visto, in consulenza presso il nostro ambulatorio per la prevenzione delle emoglobinopatie ereditarie, la coppia [REDACTED]

[REDACTED] è omozigote (**portatrice sana**) per α talassemia secondo la delezione -3.7 sul cluster α globinico. [REDACTED] è inoltre eterozigote (**portatrice sana**) per la mutazione CD6 (A>T) del gene β globinico ed è quindi portatrice sana di **drepanocitosi** (anemia falciforme, emoglobina S, Sickle Cell Disease).

[REDACTED] è eterozigote (**portatore sano**) per α talassemia secondo la delezione -3.7 sul cluster α globinico. [REDACTED] è inoltre eterozigote (**portatore sano**) per la mutazione CD6 (A>T) del gene β globinico ed è quindi portatore sano di **drepanocitosi** (anemia falciforme, emoglobina S, Sickle Cell Disease).

La coppia presenta quindi un rischio di malattia (**drepanocitosi**) per la prole del 25% ad ogni gravidanza.

Si tratta di una malattia grave, che può comportare anemia anche trasfusione-dipendente e crisi acute di dolore su base trombotica, che possono causare complicanze serie a livello di tutti i distretti arteriosi.

Per la gravidanza in corso è stata eseguita in data 31/05/2023 una villocentesi. Si consegna oggi il risultato della diagnosi prenatale: il feto ha ereditato da entrambi i genitori gli alleli normali e sarà pertanto **sano**.

Non sono necessari ulteriori controlli in gravidanza.

Il controllo del nascituro potrà avvenire all'età di 6 mesi presso il nostro Centro.

Abbiamo anche informato la coppia degli aspetti relativi alla necessità di riservatezza nei confronti del nascituro per quanto riguarda l'esame effettuato.



Abbiamo visto in data odierna, in consulenza presso il nostro ambulatorio per la prevenzione delle emoglobinopatie ereditarie, la coppia [REDACTED]

[REDACTED] è eterozigote (**portatrice sana**) per β talassemia secondo la mutazione puntiforme -87 (C→G) sul gene della β globina. La ricerca in biologia molecolare dei difetti α (alfa) talassemici più comuni e rilevanti, inclusa la triplicazione dei geni α globinici, è risultata normale.

[REDACTED] è eterozigote (**portatore sano**) per β talassemia secondo la mutazione puntiforme IVS 1.6 (T→C) sul gene della β globina. La ricerca in biologia molecolare dei difetti α (alfa) talassemici più comuni e rilevanti, inclusa la triplicazione dei geni α globinici, è risultata normale.

La coppia presenta quindi un rischio di malattia (**β talassemia omozigote**) per la prole del 25% ad ogni gravidanza.

Tale condizione è quasi sempre associata ad anemia grave (β talassemia major) che richiede cure costanti (trasfusione regolare, terapia chelante del ferro quotidiana, terapie di supporto ed follow-up specialistico). Per i malati che dispongono di assistenza di qualità le prospettive e la qualità di vita si avvicinano alla normalità. Cure risolutive sono oggetto di intensa ricerca e alcune di queste sono oggi disponibili in casi selezionati.

La gravità clinica può essere attenuata da altri fattori genetici come ad esempio la presenza del difetto α talassemico, che attenuerebbe lo sbilanciamento della sintesi di catene globiniche.

Per la gravidanza in corso è stata eseguita in data 31/05/2023 un'anniocentesi. Si consegna oggi il risultato della diagnosi prenatale: il feto ha ereditato una sola mutazione da un genitore -87 (C→G) e un gene normale dall'altro e sarà pertanto eterozigote (**portatore sano**) per **β talassemia**. Non sono necessari ulteriori controlli in gravidanza.

Il controllo del nascituro potrà avvenire all'età di 6 mesi presso il nostro Centro.

Abbiamo anche informato la coppia degli aspetti relativi alla necessità di riservatezza nei confronti del nascituro per quanto riguarda l'esame effettuato.

Abbiamo visto in data odierna, in consulenza presso il nostro ambulatorio per la prevenzione delle emoglobinopatie ereditarie, la coppia [REDACTED]

[REDACTED] è eterozigote (portatore sano) per la variante emoglobina S. La ricerca in biologia molecolare dei principali difetti α talassemici, inclusa la triplicazione dei geni α globinici, mostra che [REDACTED] è eterozigote (portatore sano) per α talassemia secondo la delezione -3.7 sul cluster α globinico.

[REDACTED] è eterozigote (**portatore sano**) per la variante **emoglobina S**. La ricerca in biologia molecolare dei principali difetti α talassemici, inclusa la triplicazione dei geni α globinici, mostra che [REDACTED] è eterozigote (**portatore sano**) per α **talassemia** secondo la delezione -3.7 sul cluster α globinico.

La coppia presenta quindi un rischio di **drepanocitosi** per la prole del 25% ad ogni gravidanza.

Si tratta di una malattia grave, che può comportare anemia anche trasfusione-dipendente e crisi acute di dolore su base trombotica, che possono causare complicanze serie a livello di tutti i distretti arteriosi.

Abbiamo informato la coppia sugli aspetti clinici e genetici di tale condizione e sulle possibilità di prevenzione e diagnosi prenatale.

Per la gravidanza in corso è stata eseguita in data 12/4/23 una villocentesi. Si consegna oggi il risultato della diagnosi prenatale: il feto ha ereditato entrambe le mutazioni dei genitori e sarà pertanto **affetto da drepanocitosi**.

La coppia, adeguatamente informata, decide di non interrompere la gravidanza.

Non sono necessari ulteriori controlli.

Il controllo del nascituro avverrà al 3° mese di vita.

Abbiamo visto in consulenza presso il nostro ambulatorio per la prevenzione delle emoglobinopatie ereditarie, la coppia [REDACTED]

[REDACTED] è eterozigote (portatrice sana) per β talassemia, secondo la mutazione puntiforme **IVSI-6** (c.92+6T>C) sul gene della β globina. La ricerca in biologia molecolare dei difetti α talassemici più comuni e rilevanti, inclusa la triplicazione dei geni α globinici, è risultata negativa.

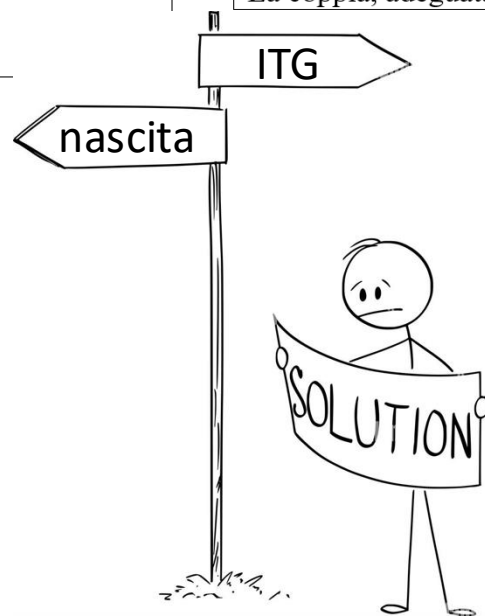
[REDACTED] è eterozigote (portatore sano) per β talassemia, secondo la mutazione puntiforme **CD39** (c.118C>T) sul gene della β globina. La ricerca in biologia molecolare dei difetti α talassemici più comuni e rilevanti, inclusa la triplicazione dei geni α globinici, è risultato normale.

La coppia presenta quindi un rischio di malattia (**Beta Talassemia Major**) per la prole del 25% ad ogni gravidanza.

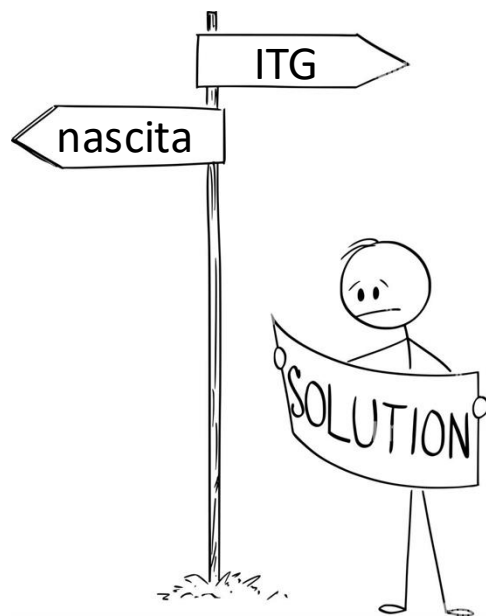
Per la gravidanza in corso è stata eseguita in data 11/1/23 una villocentesi.

Si consegna oggi il risultato della diagnosi prenatale: il feto ha ereditato entrambi i difetti dei genitori e sarà pertanto **affetto da β talassemia**.

La coppia, adeguatamente informata, decide di interrompere la gravidanza.



La domanda a cui dovete rispondere è: come vivreste l'accompagnare vostro figlio in ospedale almeno una/due volte al mese e a fare terapia a casa ogni giorno?

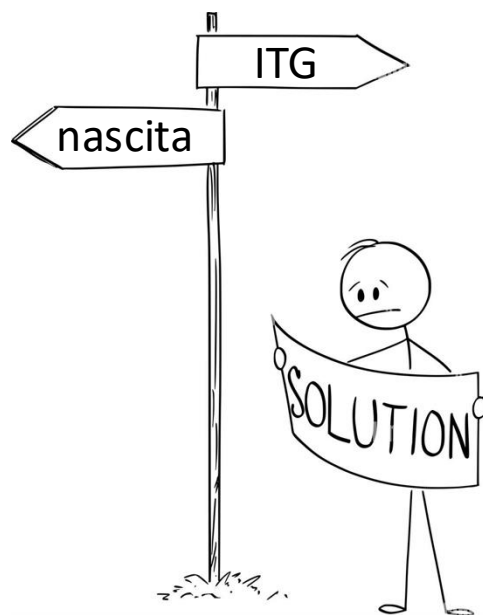


La domanda a cui dovete rispondere è:
come vivreste l'accompagnare vostro figlio in ospedale almeno
una/due volte al mese e a fare terapia a casa ogni giorno?

Ma può andare a
giocare a pallone in
cortile?

Per cui può avere
una vita normale
come la mia

Lo sappiamo e
possiamo curarlo
subito al meglio

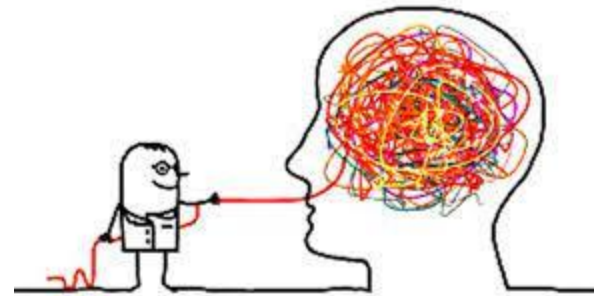


Quindi deve fare
un prelievo ogni
volta? Fa male

Un'altra major
no

Sempre in
ospedale non è
vita

SCHEDA SEGNALAZIONE COPPIE – MICROCITEMIE



COGNOME – NOME – DATA NASCITA LEI TELEFONO	
COGNOME - NOME – DATA NASCITA LUI TELEFONO	
PATOLOGIA	
PARITA'	
PRECEDENTI DPN	
DPN ATTUALE - DATA	
ESITO DPN	
DATA CONSEGNA ESITO DPN IN MICROC.	
CRITICITA'	
APPUNTAMENTO S.ANNA	<input type="checkbox"/> In presenza <input type="checkbox"/> In videochiamata



Prima visita – riconoscimento
coppia a rischio



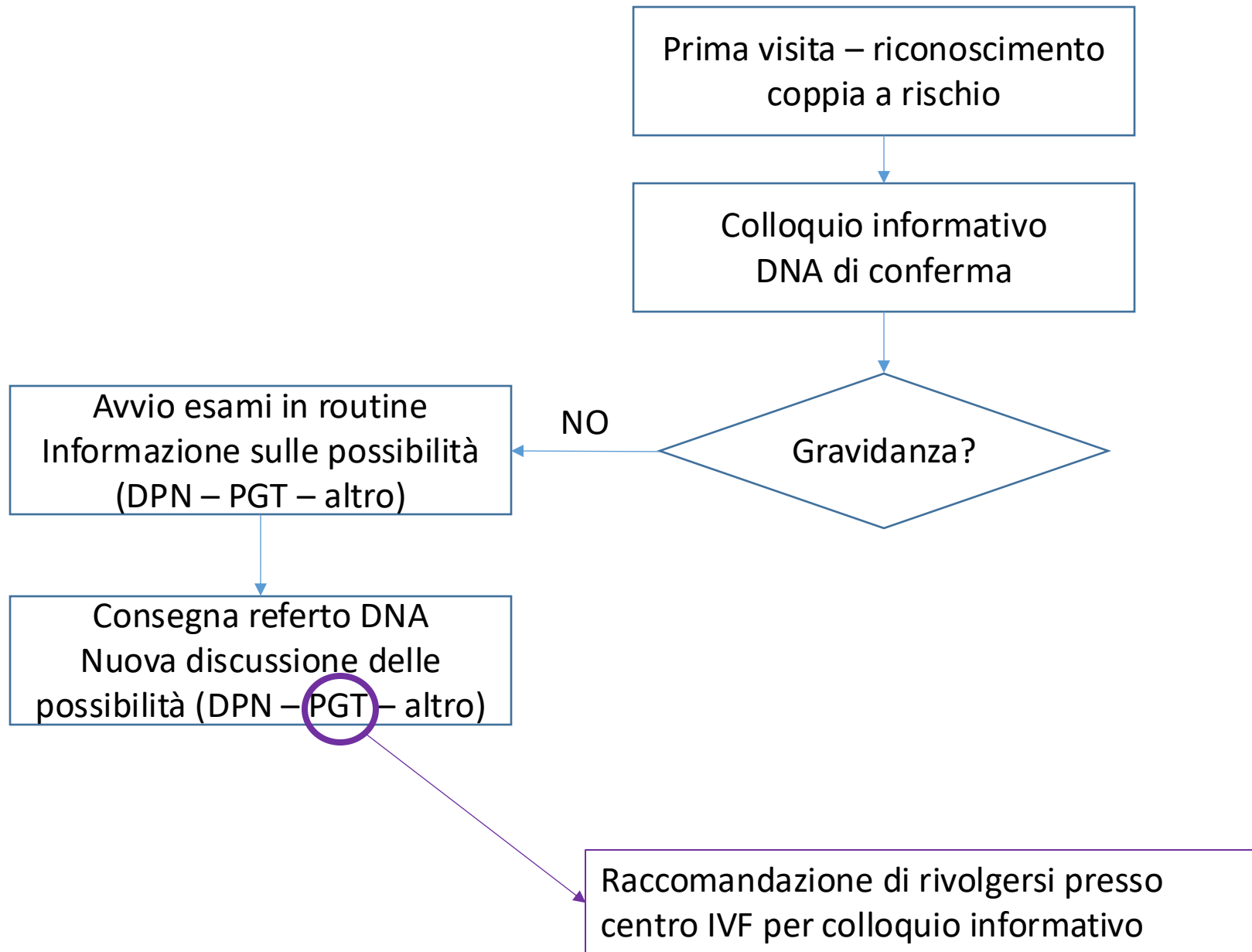
Colloquio informativo
DNA di conferma

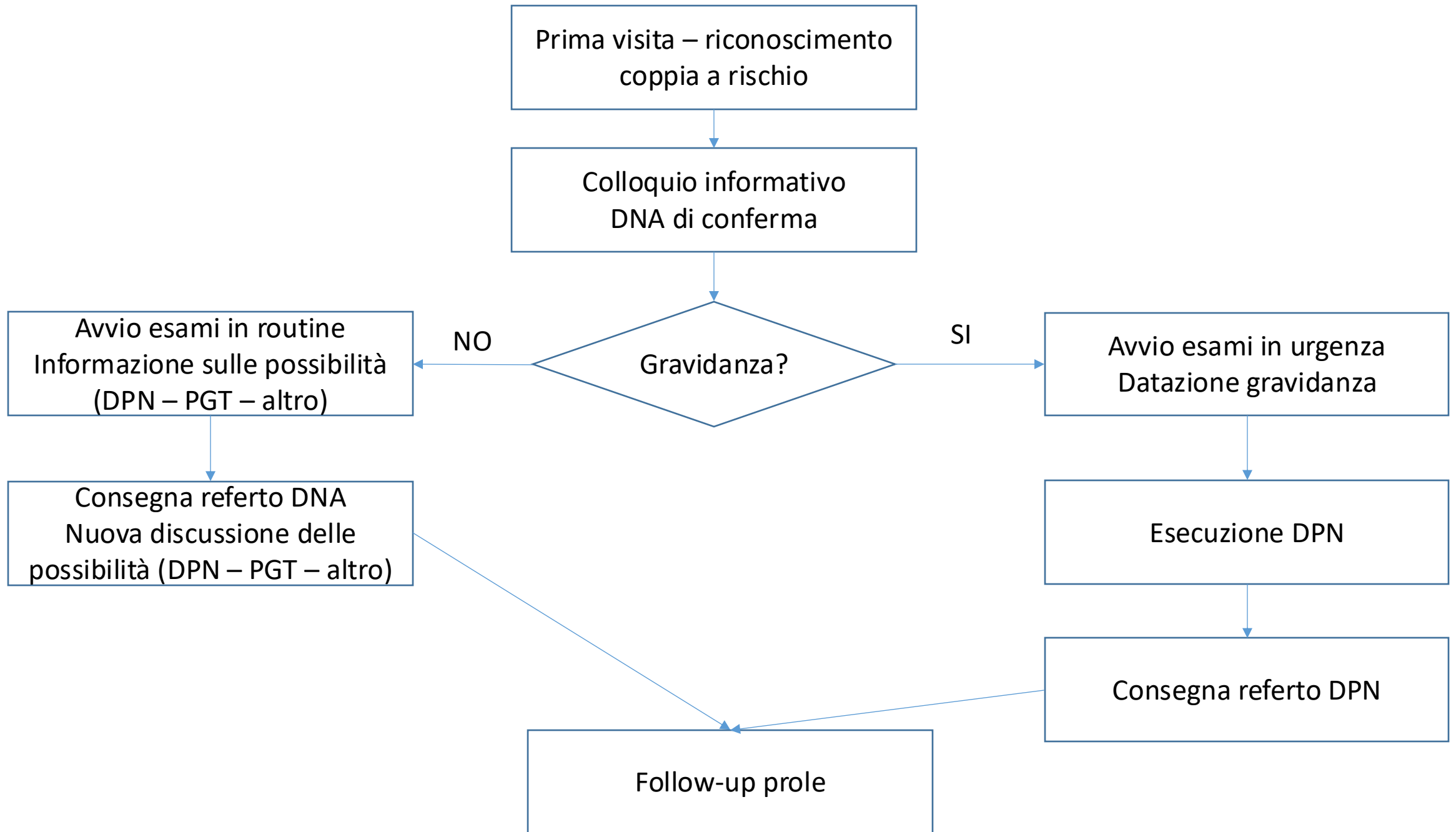


NO



Avvio esami in routine
Informazione sulle possibilità
(DPN – PGT – altro)





A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
MADRE	PADRE	NASCITA PREVISTA	QUANDO CHIAMARE	COPPIA DEL	NOTE							
		set-22	apr-23	NO R 2022								
		ott-22	INIZIO GENNAIO 2023	R2022	RISCHIO SC							
		24-gen-23	mar-23	R2020	la coppia era stata segnalata dal consultorio, non si sono presentati all'appuntamento c							
			mar-23	R2022								
		26/02/22	APRILE 2023PER APP A MGGIO									
		04/01/23	MARZO 2023 APP APRILE	R 2022	appuntamento il 4/04							
		FINE LUGLIO 2023	01/10/23	R 2020								
		FINE LUGLIO 2023	FINE OTTOBRE 2023	R 2023								
			01/2024	R 2023								
			nov-23	R 2023								
			FEBB 24	R 2023								
			GEN2024	R 2023								
		10/09/2023	10/12/2023	R2022	coppia in attesa di IVF, lei è rimasta in gravidanza naturalmente e non se ne è accorta							
		29/07/2023	01/11/2023	NO R2023	quando si chiama per il neonato dire che portino anche gli altri 3 figli della signora							



FETO SANO/PORTATORE SANO – 6/12 mesi



FETO AFFETTO/NON NOTO – 3 mesi

coppia a rischio nota
in gravidanza



Ecografia di datazione



Colloquio



Esecuzione DPN

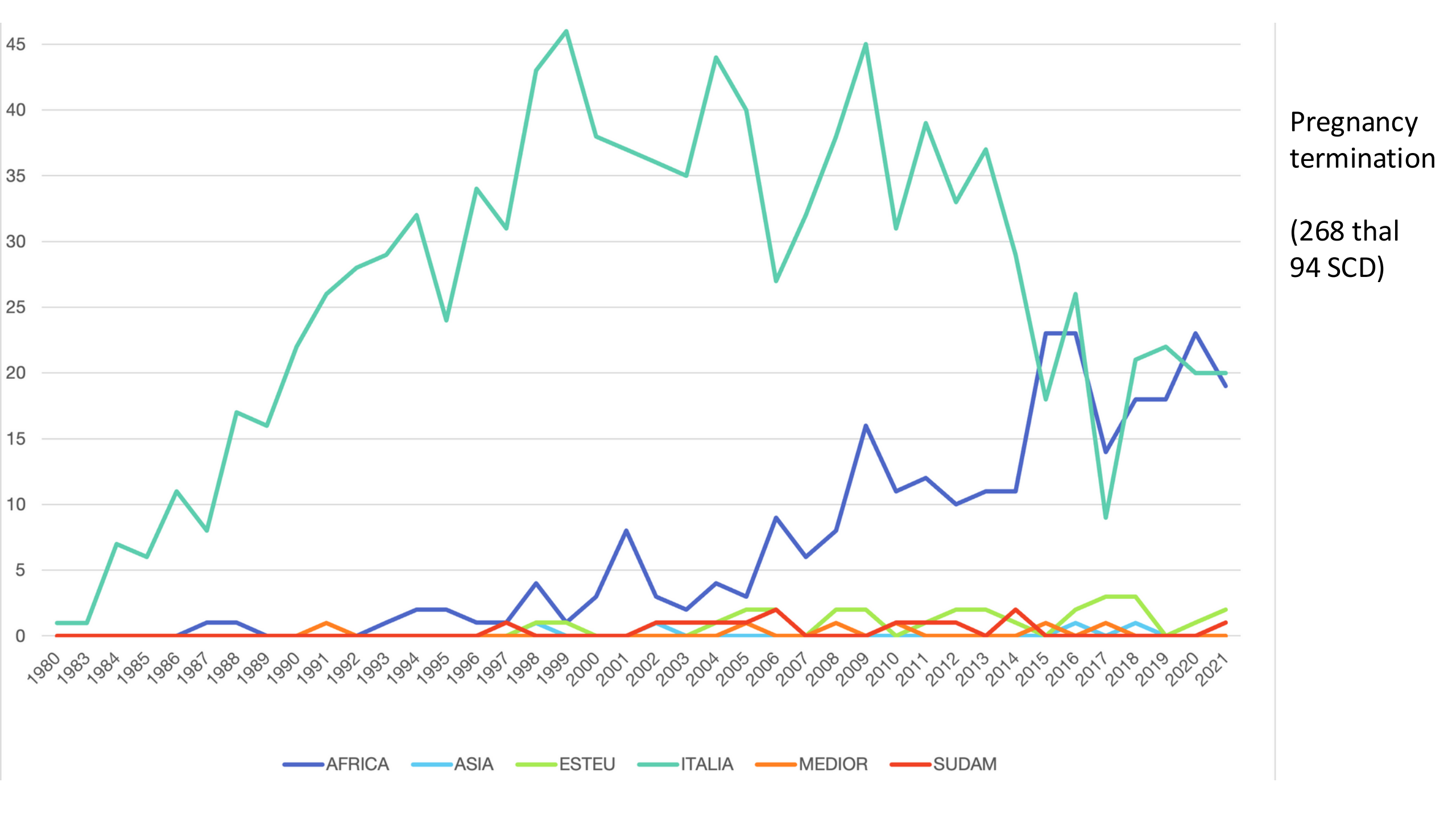


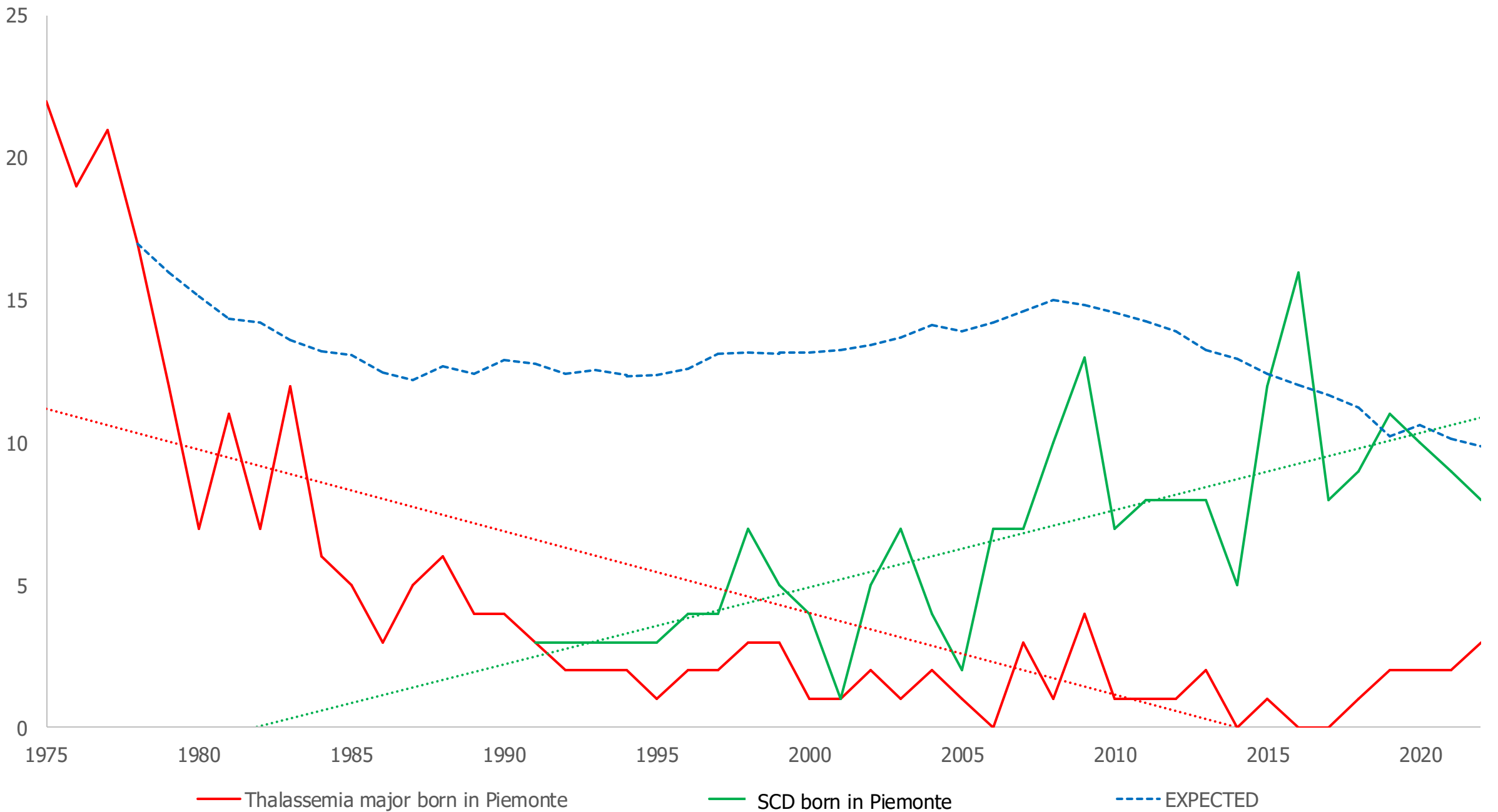
Consegna referto DPN



Follow-up prole

Signora prima di dire
a suo marito che è
incinta lo dice a noi





*“Prima di giudicare
una persona
cammina
nei suoi mocassini
per tre lune”*

