

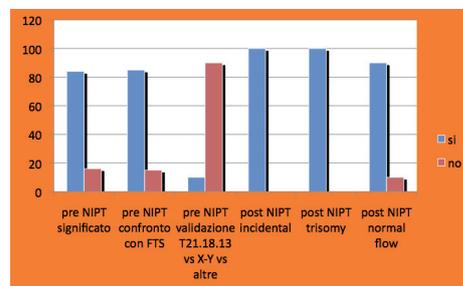


TEST PRENATALI NON INVASIVI DNA FETALE CIRCOLANTE IN SANGUE MATERNO PLURIGENTEST™

EMILIA NETWORK APRILE 2016

NIPT di nuova generazione. Col nuovo anno entrano in gioco progressi tecnici e grandi compagnie di distribuzione. Il ruolo della consulenza e l'organizzazione.

CONSULENZA PRE TEST (dalle Linee Guida NIPT del Ministero della Salute)
La disponibilità di varie tecniche che utilizzano il DNA fetale per la ricerca di anomalie genetiche nel corso della gravidanza rende tassativa la consulenza pre-test, che rappresenta lo strumento di elezione per informare la gestante/coppia sulle diverse opzioni disponibili.
Infatti, è stato dimostrato che la comprensione delle potenzialità e dei limiti del test cfDNA/NIPT è fortemente compromessa, in assenza della consulenza.
La consulenza pre-test deve essere effettuata da uno specialista esperto di medicina fetale. La comprensione dei risultati del test passa dal 25-40% senza consulenza al 85-100% con consulenza (studio condotto su 1000 consulenze consecutive nel nostro network).



PROCEDURE E PERFORMANCES DEI TEST

La mancanza di risposta ai test è descritta fra il 3% e 5% dei prelievi, prevalentemente per non rispondenza del campione di DNA fetale allo score/algoritmo. La nostra casistica è migliore, ha una mancanza di risposta <1% (obesità, FIV-ovodonazione). Riteniamo che la accuratezza del percorso dal prelievo al laboratorio nei tempi e modi dei nostri centri possa essere influente sui risultati di risposta.

I TEST

In Italia sono entrati due grandi gruppi di distribuzione, Roche e Synlab, ad affiancarsi a Genoma Roma e Bioscience. Diverse sono le strategie ma i test sono tutti ampiamente validati per le condizioni delle Linee Guida, ossia il rischio di Trisomie 21, 18, 13. Riteniamo che tutti devono e dovranno essere a disposizione di chi fa riferimento ai nostri centri, ostetrici, ginecologi, pazienti. Le nostre consulenze sono in grado di soddisfare le esigenze di tutti.

HARMONY (Ariosa) è il test con cui siamo nati nel 2013. Ora è di proprietà Roche, focalizza le trisomie principali 21, 18, 13 e, opzionali, le aneuploidie X e Y

NEOBONA (Labco) è il test su piattaforma Illumina di seconda generazione. E' di proprietà Synlab, è eseguito in Europa. Ha superato la verifica dei 5000 casi con performances eccellenti. Studia le trisomie principali 21, 18, 13 e, opzionali, le aneuploidie X e Y e alcune delezioni.

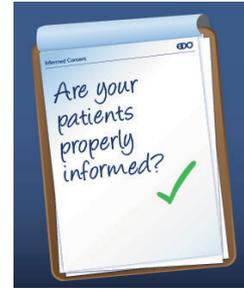
G-TEST (Bioscience Genomics) è il test su piattaforma BGI eseguito dalla Università di Roma Tor Vergata in spinoff con Bioscience di San Marino. Studia le trisomie principali 21, 18, 13 e, opzionali, le trisomie 16 e 22, le aneuploidie X e Y e alcune delezioni.

Cases	1200
Successful 1 st tier	1187
Successful 2nd tier	9 (0,7%)
Low DNA	7
High variance/1 obese	2
Double fail	4 (0,3%)
Low DNA-HV / FIV ovod.	2
High Variance / obese	2

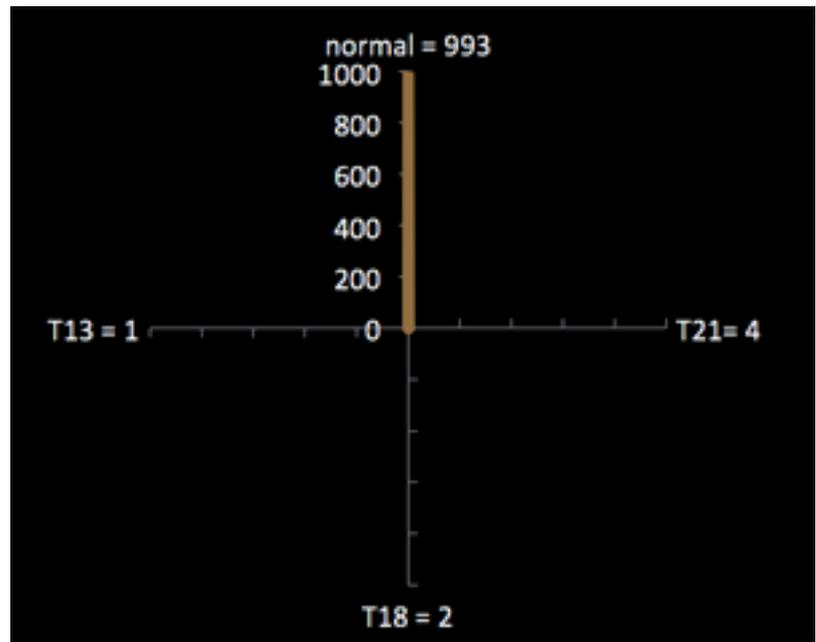


Tutte le opzioni eccedenti le principali trisomie (21, 18, 13 e le aneuploidie X e Y che hanno raggiunto la validazione) non sono validate, il che significa che le loro performances predittive in termini di sensibilità, specificità e valori predittivi non sono note, sebbene grande lavoro sia in corso.

Ciò non significa che, con accurata informazione, la paziente non debba accedere alle opzioni aggiuntive. Per questo è ancora più necessario che il percorso di accesso al test sia scandito e controllato: specialista con ecografia, colloquio genetico pre test, nursing al prelievo, gestione del risultato o degli incidental findings.



LA CASISTICA. Abbiamo superato le 1000 consulenze e test su DNA fetale circolante. Le trisomie 21, 18, 13 non hanno dato luogo a falsi positivi e negativi, sono state identificate 4 trisomie 21, 2 trisomie 18, 1 trisomia 13.



Nella prossima newsletter: Nuovi test in arrivo.



TEST PRENATALI NON INVASIVI DNA FETALE CIRCOLANTE IN SANGUE MATERNO PLURIGENTEST™ EMILIA NETWORK MAGGIO 2016

NIPT di nuova generazione. I nuovi test e l'organizzazione del servizio.

Dalle precedenti news.....la scelta di qualità

CONSULENZA PRE TEST (dalle Linee Guida NIPT del Ministero della Salute)

La disponibilità di varie tecniche che utilizzano il DNA fetale per la ricerca di anomalie genetiche nel corso della gravidanza rende tassativa la consulenza pre-test, che rappresenta lo strumento di elezione per informare la gestante/coppia sulle diverse opzioni disponibili.

PLURIGENTEST Studio delle mutazioni delle più frequenti malattie mendeliane: Fibrosi Cistica (CF), Atrofia Muscolare Spinale (SMA), Sindrome X fragile (FRAXA), Sordità Neurosensoriale (SNS).



NIPT cfDNA nel plasma materno. PUNTI SENSIBILI DEI TEST

I nostri test operativi soddisfano alle garanzie:

VALIDAZIONE LLGG (Ariosa, Illumina)

ASSENZA DI CONFLITTI PER PATENT INFRINGEMENT

DEFINIZIONE FRAZIONE FETALE

SUCCESSO DI RISPOSTE: mancanza di risposta <1% (obesità, FIV-ovodonazione).

HARMONY (Ariosa) è operativo dal 2013. Seconda generazione dal 2015 con piattaforma microarrays (sostituisce NGS). Ora è di proprietà Roche, focalizza le trisomie principali 21, 18, 13 e, opzionali, le aneuploidie X e Y.



NEOBONA (Labco) è su piattaforma Illumina operativa dal 2013. E' di seconda generazione. E' di proprietà Synlab, è eseguito da Labco Europa su licenza Illumina. Studia le trisomie principali 21, 18, 13 e, opzionali, le aneuploidie X e Y e alcune delezioni.



Il percorso clinico

			PLURIGEN						
					CVS				AF
				NIPT					
Private					CFT/NT				
	CONSULENZA								
	8	9	10	11	12	13	14	15	16
				CONSUL					
HCS facility					CFT/NT				
						NIPT			
					CVS				AF

Lo schema del percorso organizzativo in ambito soggettivo privato e come è previsto dai principali modelli di sanità assistita, dove il DNA fetale NIPT è attuato come seconda scelta dopo un CFT (test combinato) a rischio codificato.

I percorsi clinici mostrano una evidente differenza di tempistica di accesso al test DNA-NIPT che nella pianificazione individuale può con grande efficacia essere di prima scelta, mentre nella organizzazione sanitaria assistita sarà prevalentemente di seconda scelta dopo un risultato del test fetale combinato a rischio aumentato a partire dalla finestra prescelta ($1/100 > 1/250$).

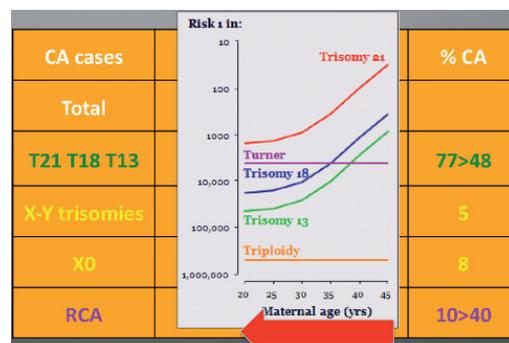
guardando oltre

I nuovi test genomici e le CNV (copy numbers variations)

Il DNA-NIPT è validato per le trisomie autosomiche e le aneuploidie XY. La tabella ci indica che **rimangono escluse dalla indagine le RCA (anomalie cromosomiche rare) che sono il 17% delle anomalie (dal 40% al 10% al crescere dell'età).**

Le tecniche molecolari di analisi delle CNV servono a identificare le delezioni o duplicazioni causa delle principali RCA. Sono già ampiamente applicate sui tessuti fetali da trofoblasto o amniociti, ma trovano difficoltà sul DNA in plasma materno. Le cause sono varie: CNV materne, variabilità delle basi GC, dimensione delle CNV, profondità di sequenziamento, frazione fetale.

Le tecniche NGS si stanno affinando e se inizialmente gli studi erano solo di simulazione su campioni di DNA di soggetti affetti, frantumati con ultrasuoni e diluiti in plasma femminile, ora si avviano analisi retrospettive in vivo.



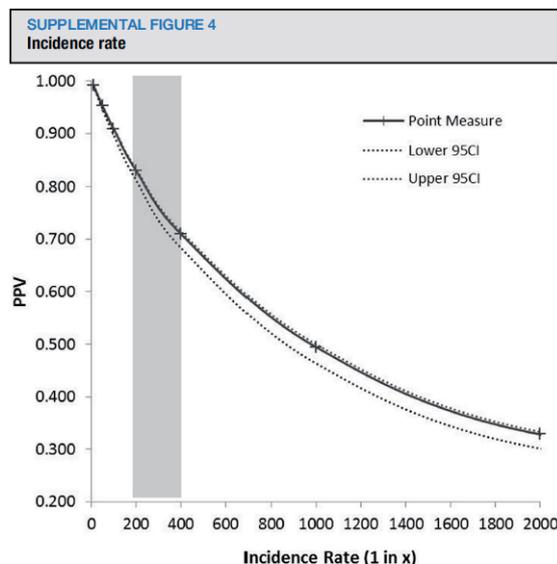
Un primo studio condotto su piattaforma SEQUENOM è stato eseguito su 1166 casi retrospettivi con 43 anomalie CNV e ha portato al test MaterniT[®]GENOME, un secondo (in stampa) su una diversa piattaforma NGS su circa 900 casi e una trentina di anomalie CNV.

Nel peggiore dei casi la sensibilità ha superato il 70% e la specificità ha superato il 98%. Uno studio italiano condotto da Genoma di Roma su un protocollo NGS elaborato in proprio è in fase di pubblicazione; i dati assai positivi su un campione di oltre 1000 casi sono già inseriti nel modulo operativo del test PrenatalSAFE[®]Karyo.

Le CNV identificabili con i test sono volutamente di dimensioni rilevanti, > 10 megabasi, che corrispondono alle più piccole anomalie visibili anche col cariotipo tradizionale: quando siano confermate sul feto non creano di solito incertezze di interpretazione clinica.

E' però importante rilevare che gli studi sono di validazione tecnica, quindi ripuliti da tutti gli eventi indiretti causa di errore, i quali però nella pratica clinica incidono e non sono eliminabili: frazione fetale borderline, conferme vaghe dei dati di cariotipo o microarrays, CNV materne, mosaicismi confermati.

Prudenza impone che ancora i valori predittivi non vengano definiti anche per la bassa incidenza delle rare anomalie strutturali (v figura) ma il progresso delle tecniche è evidente e promettente, in attesa della validazione clinica internazionale.



Lefkowitz et al. Clinical validation of genomewide cell-free DNA testing. Am J Obstet Gynecol 2016.



Lamberto Camurri gene consult



TEST PRENATALI NON INVASIVI DNA FETALE CIRCOLANTE IN SANGUE MATERNO PLURIGENTEST™

EMILIA NETWORK

GIUGNO 2016

HOTSPOT DI CONSULENZA GENETICA PRENATALE

E' CONSULENZA PRENATALE INTEGRATA, OSTETRICA, GENETICA, CON PROFESSIONISTI DEDICATI E SEDUTE PANEL CON I PAZIENTI

Il percorso prenatale delle prime settimane di gravidanza sta diventando complesso da quando, al tradizionale test combinato di bitest e misura della translucenza nucale, si è aggiunta la possibilità di indagare in DNA fetale. Da un approccio di screening, dove dalla semplice valutazione del rischio genetico per età materna si sono aggiunte voci per migliorare la sensibilità a discapito della specificità (meno falsi negativi ma più falsi positivi), ora i test raggiungono migliore sensibilità e specificità assieme, definendo quindi nelle risposte non più delle valutazioni di rischio, ma di COMPATIBILITA' con la anomalia genetica

Ecco dunque che, a tre anni dall'esordio delle tecniche NIPT, la ricerca delle trisomie principali definitivamente validate è un punto centrale di riferimento per diverse strategie.

1. Un test migliore del test combinato ma con i medesimi obiettivi. Tutti i test in commercio raggiungono questo risultato, le differenze possono stare nelle sensibilità operative a basse percentuali di DNA fetale.

2. Un test che punti progressivamente a colmare la lacuna verso il cariotipo amniotico con tecniche genomiche. I test di seconda generazione si pongono questo obiettivo con un percorso di validazione in progresso, per ora espresso dalle aziende, non ancora preso in carico dai criteri internazionali. La consulenza alla paziente non può poi prescindere da segnalare che alcune malattie mendeliane hanno una incidenza di nascite importante e che il Plurigentest arricchisce le informazioni disponibili per affrontare il percorso della gravidanza e del controllo fetale.

La complessità dello scenario disponibile indica in un HOTSPOT DI CONSULENZA PRENATALE il luogo ideale per aiutare la paziente a comprendere e scegliere coscientemente i test adatti a sé. Sono garantiti anche tutti gli strumenti necessari al follow up dei test, gli interventi ostetrici invasivi eventualmente necessari, le tecniche diagnostiche più sofisticate e tempistiche ridotte.

Gli Hotspot operativi sono a Parma MEDI saluser DI VIA VERDI, quello vero (attenzione ai sinonimi).



A Reggio Emilia Il CENTRO PALMER DI VIA F.LLI CERVI



A Modena in Via ARQUA'



UN AIUTO A SCEGLIERE IL TEST ADATTO AI PROPRI OBIETTIVI:

PLURIGENTEST Studio delle mutazioni delle più frequenti malattie mendeliane: Fibrosi Cistica (CF), Atrofia Muscolare Spinale (SMA), Sindrome X fragile (FRAXA), Sordità Neurosensoriale (SNS).

TEST COMBINATO (BI TEST+TRANSLUCENZA)?

HARMONY (Ariosa) è il test con cui siamo nati nel 2013, concepito per superare il BITEST e il TEST COMBINATO. Ora è di proprietà Roche, focalizza le trisomie principali 21, 18, 13 e, opzionali, le aneuploidie X e Y. **Non si propone evoluzioni verso il cariotipo.**

O UN TEST CHE SI AVVICINI AI RISULTATI DELL'AMNIOCENTESI O VILLOCENTESI?

NEOBONA (Labco) è su piattaforma Illumina operativa dal 2013. E' di seconda generazione. E' di proprietà Synlab, è eseguito da Labco Europa su licenza Illumina. Studia le trisomie principali 21, 18, 13 e, opzionali, le aneuploidie X e Y e alcune delezioni. La tecnica può evolversi verso una analisi completa del genoma mirando al cariotipo

PRENATALSAFE (Genoma, Roma) è su piattaforma Illumina operativa dal 2013. E' di proprietà Genoma Group, Prenatalsafe Karyo analizza tutto il genoma cercando di identificare anomalie di duplicazione/delezione superiori a 10Mb e così **ha una sensibilità teorica vicina al cariotipo.**



Lamberto Camurri gene consult



TEST PRENATALI NON INVASIVI DNA FETALE CIRCOLANTE IN SANGUE MATERNO PLURIGENTEST™ EMILIA NETWORK NOVEMBRE 2016

TRISOMIE E ANOMALIE RARE IL VALORE PREDITTIVO

WHOLE GENOME SEQUENCING PER LE ANOMALIE DI NUMERO E STRUTTURA DEI CROMOSOMI. I PRIMI STUDI PROSPETTICI NELLA PRATICA CLINICA

I valori PREDITTIVI, positivo (PPV) o negativo (NPV) si stanno definendo nella pratica clinica dei test cffDNA nel sangue materno. Il valore predittivo ricordiamo è un rapporto fra casi veri e totale dei positivi/negativi. Le linee guida hanno definito la **specificità (FPR) e sensibilità (DR)** dei test per le aneuploidie:

T21. DR 99,2%	FPR 0.09%
T18. DR 96.3%	FPR 0,13%
T13 DR 91.0%	FPR 0.13%
45X DR 90.3%	FPR 0.23%
SCA DR 93.0%	FPR 0.14%

I **valori predittivi** danno una immagine più percettiva della capacità del test di identificare una anomalia/non anomalia. Alcuni dati da esperienze di pratica clinica:

HARMONY (studio NEXT 2015 - 15000 casi):

T21 PPV 80% NPV 100%

NEOBONA (6000 casi, 2016)

T21 PPV 97.7% NPV 100%

T18 PPV 100%	NPV 100%
T13 PPV 92.8%	NPV 100%
45X PPV 75.0%	NPV 100%
SCA PPV 100%	NPV 100%

PRENATALSAFE (31000 casi. Genoma report 2016):

T21 PPV 97.7% NPV 99.9%

T18 PPV 88.7%	NPV 99.9%
T13 PPV 82.0%	NPV 100%
45X PPV 61.6%	NPV 100%
SCA PPV 73.4%	NPV 100%

Genoma Group ha calcolato i valori predittivi del test **PRENATALSAFE KARYO** (7048 casi, Genoma report 2016) che, col sequenziamento dell'intero genoma, si propone di studiare tutte le anomalie cromosomiche di numero e struttura (superiori a 10Mb)

PluriGenTest™

UN AIUTO A SCEGLIERE IL TEST ADATTO AI PROPRI OBIETTIVI:

PLURIGENTEST Studio delle mutazioni delle più frequenti malattie mendeliane: Fibrosi Cistica (CF), Atrofia Muscolare Spinale (SMA), Sindrome X fragile (FRAXA), Sordità Neurosensoriale (SNS).

TEST COMBINATO (BI TEST+TRANSLUCENZA)?

HARMONY (Ariosa) è il test con cui siamo nati nel 2013, concepito per superare il BITEST e il TEST COMBINATO. Ora è di proprietà Roche, focalizza le trisomie principali 21, 18, 13 e, opzionali, le aneuploidie X e Y. **Non si propone evoluzioni verso il cariotipo.**

O UN TEST CHE SI AVVICINI AI RISULTATI DELL'AMNIOCENTESI O VILLOCENTESI?

NEOBONA (Labco) è su piattaforma Illumina operativa dal 2013. E' di seconda generazione. E' di proprietà Synlab, è eseguito da Labco Europa su licenza Illumina. Studia le trisomie principali 21, 18, 13 e, opzionali, le aneuploidie X e Y e alcune delezioni. La tecnica può evolversi verso una analisi completa del genoma mirando al cariotipo

PRENATALSAFE (Genoma, Roma) è su piattaforma Illumina operativa dal 2013. E' di proprietà Genoma Group, Prenatalsafe Karyo analizza tutto il genoma cercando di identificare anomalie di duplicazione/delezione superiori a 10Mb e così **ha una sensibilità teorica vicina al cariotipo.**

Harmoney™
PRENATAL TEST

neoBona®

PrenatalSafe®
KARYO

T21 PPV 98.3% NPV 100%
T18 PPV 100% NPV 100%
T13 PPV 85.7% NPV 100%
SCA + 45X PPV 66.6% NPV 100%
TRISOMIE RARE PPV 66.7% NPV 100%
CNV (DELEZIONI/DUPLICAZIONI) PPV 54.5% NPV 100%

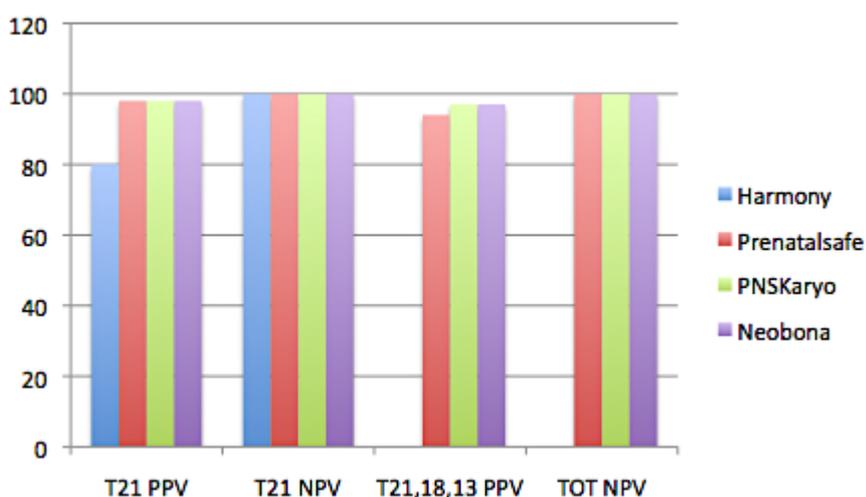
Questi dati mostrano una buona performance del test basato sul sequenziamento dell'intero genoma sia per le trisomie già validate con i metodi consolidati che per le anomalie rare, specialmente del delezioni che non hanno mostrato falsi negativi e hanno trovato rispondenza fetale in 6 casi su 11.



	Trisomy 21 (n=7048)	Trisomy 18 (n=7048)	Trisomy 13 (n=7048)	SCA (n=7048)	Rare Trisomies (n=7048)	CNV (n=7048)
True Positive	58	9	6	20	8	6
False Positive	1	0	1	10	4	5
True Negative	6989	7039	7041	7018	7036	7037
False Negative	0	0	0	0	0	0
Sensitivity (95% CI)	100.00% (93.84% - 100.00%)	100.00% (66.37% - 100.00%)	100.00% (54.07% - 100.00%)	100.00% (83.16% - 100.00%)	100.00% (63.06% - 100.00%)	100.00% (54.07% - 100.00%)
Specificity (95% CI)	99.99% (99.92% - 100.00%)	100.00% (99.95% - 100.00%)	99.99% (99.92% - 100.00%)	99.86% (99.74% - 99.93%)	99.94% (99.85% - 99.98%)	99.93% (99.83% - 99.98%)
PPV (95% CI)	98.31% (90.91% - 99.96%)	100.00% (66.37% - 100.00%)	85.71% (42.13% - 99.64%)	66.67% (47.19% - 82.71%)	66.67% (34.89% - 90.08%)	54.55% (23.38% - 83.25%)
NPV (95% CI)	100.00% (99.95% - 100.00%)	100.00% (99.95% - 100.00%)	100.00% (99.95% to 100.00%)	100.00% (99.95% - 100.00%)	100.00% (99.95% - 100.00%)	100.00% (99.95% - 100.00%)

I valori predittivi totali dei test sono valutabili solo per Neobona, Prenatalsafe e Prenatalsafe Karyo, poichè lo studio Harmony si limita alla trisomia 21. Escludendo le anomalie cromosomiche X/Y emergono dati molto robusti e omogenei

Neobona PPV totale: 97%. NPV totale: 100%
Prenatalsafe PPV totale: 94%. NPV totale: 100%
Prenatalsafe Karyo PPV totale: 97%. NPV totale: 100%





network
EMILIA-ROMAGNA

MEDI SALUSER
CENTRO MEDICO DIAGNOSTICO

Poliambulatorio Privato
CENTRO PALMER s.r.l.

POLIAMBULATORIO GIBRUGGIO MODENESE PCM
CENTRO MEDICO DI GIBRUGGIO MODENA



TEST GENETICI PRENATALI

DNA FETALE CIRCOLANTE IN SANGUE MATERNO - CARIOTIPO MOLECOLARE EASYCHIP®
PLURIGENTEST™

FEBBRAIO 2017

NON INVASIVO E INVASIVO ... I TEST SI AVVICINANO?

Whole genome amplification e Easychip® array di screening ... a confronto

TEST NON INVASIVI. Abbiamo nelle precedenti newsletters ampiamente mostrato la sovrapposizione dei dati di predittività dei vari test su DNA fetale. Ora abbiamo eseguito il pool di tutti i dati messi a disposizione da Harmony, Neobona, Prenatalsafe anche con la sua componente Karyo per i test cfDNA sulle aneuploidie cromosomiche. Abbiamo aggiunto i dati BGI (Gtest) raggiungendo la soglia dei 200000 casi per fare il confronto di performance fra trofoblasto/villi coriali e trofoblasto/NIPTcfDNA. I valori di sensibilità e specificità si equivalgono.

Prevalenza anomalie cromosomiche

T21	VERI POSITIVI/ TUTTI POSITIVI	VERI NEGATIVI/ TUTTI NEGATIVI	NUMERO CASI	Prevalenza coorte Prev. Italia 15/10000
HARMONY	418/428	22724/22727	23155	182/10000
NEOBONA	94/96	5760/5760	5856	161/10000
PRENSAFE	257/263	31536/31537	31800	80/10000
PS KARYO	87/88	11843/11843	11932	80/10000

T18	VERI POSITIVI/ TUTTI POSITIVI	VERI NEGATIVI/ TUTTI NEGATIVI	NUMERO CASI
NEOBONA	17/17	5839/5839	5856
PRENSAFE	47/53	31745/31746	31800
PS KARYO	15/16	11916/11916	11932
HARMONY	147/152	2243/22247	22399

T13	VERI POSITIVI/ TUTTI POSITIVI	VERI NEGATIVI/ TUTTI NEGATIVI	NUMERO CASI
NEOBONA	12/13	5843/5843	5856
PRENSAFE	32/39	31761/31761	31800
PS KARYO	12/13	11919/11919	11932
HARMONY	30/33	14208/14210	14243

Specificità e Sensibilità, pooled

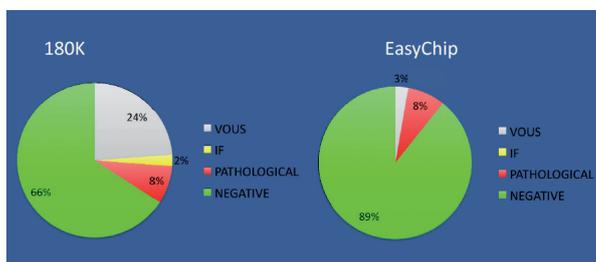
Casi di Anomalie Cromosomiche	% prevalence EU	% Anomalie Cromosomiche	CVS Cytotrophoblast (direct method)	CVS Cytotrophoblast (direct method)	cfDNA	cfDNA
Totale	4,4		Specificità%	Sensibilità%	Specificità%	Sensibilità%
T21			99,9	99,5	99,9	99,5
T18	3,1	70 (48<77)	99,9	98,4	99,9	98,4
T13			99,8	98,4	99,7	98,4
X/Y Trisomies	0,2	5	99,9	99,0	99,9	100
45,X	0,33	8	99,7	99,1	99,8	100
Anomalie rare	0,7	17 (40<10)				
Anomalie rare >10Mb		10			99,9	100

I test su DNA nel plasma materno, stante la equivalenza biologica col trofoblasto placentare, risultano condizionati dalla frammentazione del DNA con conseguente necessità di fattori di correzione nelle tecniche NGS e dalla presenza del DNA materno coi possibili fattori di confondimento (CNV). La ricerca delle anomalie cromosomiche strutturali (delezioni/duplicazioni) di dimensioni > 10Mb (simili a quelle identificabili col cariotipo tradizionale) sono condizionate da questi fattori di confondimento. Per ridurre l'impatto Illumina sta lavorando sull'algoritmo della tecnica di sequenziamento di tutto il genoma. Al momento il test genomico Prenatalsafe Karyo (>10Mb) decrementa i falsi positivi e mantiene sensibilità massima. Le pazienti che afferiscono ai nostri ambulatori di consulenza, in seguito alla informazione complessiva sui test genetici non invasivi, hanno nell'ultimo trimestre scelto i test genomici completi nel 40% dei casi..

PrenatalSafe KARYO	Trisomy 21 (n=11.932)	Trisomy 18 (n=11.932)	Trisomy 13 (n=11.932)	SCA (n=11.932)	Rare Trisomies (n=11.932)	CNV (n=11.932)
True Positive	88	15	12	36	10	8
False Positive	1	1	1	12	7	5
True Negative	11.843	11.916	11.919	11.894	11.915	11.919
False Negative	0	0	0	0	0	0
Sensitivity (95% CI)	100.00% (95.89% - 100.00%)	100.00% (78.20% - 100.00%)	100.00% (73.54% - 100.00%)	100.00% (90.26% - 100.00%)	100.00% (69.15% - 100.00%)	100.00% (83.06% - 100.00%)
Specificity (95% CI)	99.99% (99.95% - 100.00%)	99.99% (99.95% - 100.00%)	99.99% (99.95% - 100.00%)	99.90% (99.82% - 99.95%)	99.94% (99.88% - 99.98%)	99.96% (99.90% - 99.99%)
PPV (95% CI)	98.88% (92.54% - 99.84%)	93.75% (87.88% - 99.07%)	92.31% (82.83% - 98.84%)	75.00% (63.02% - 84.08%)	58.82% (40.52% - 74.97%)	61.54% (39.98% - 79.35%)
NPV (95% CI)	100.00% (99.95% - 100.00%)	100.00% (99.95% - 100.00%)	100.00% (99.95% - 100.00%)	100.00% (99.95% - 100.00%)	100.00% (99.95% - 100.00%)	100.00% (99.95% - 100.00%)

PluriGenTest™
Harmony™
PRENATAL TEST™
neoBona®
PrenatalSafe®
KARYO

TEST INVASIVI. I test su DNA fetale nel plasma, con la tecnica di amplificazione totale del genoma, coprono il genoma stesso con un backbone di 10 Megabasi di DNA (con le performances suesposte). Il cariotipo ottico tradizionale ha un potere di risoluzione di 10-15 Megabasi, è afflitto da grande variabilità ed è operatore-dipendente. Una copertura genomica più fine è necessaria e si attua con tecniche CGHarray. Per evitare fattori di confondimento si sceglie un backbone di base di 3 Megabasi, raffinato a 500 Kilobasi di DNA nelle zone telomeriche. In tal modo si annullano dati incidentali di dubbio significato (VOUS)



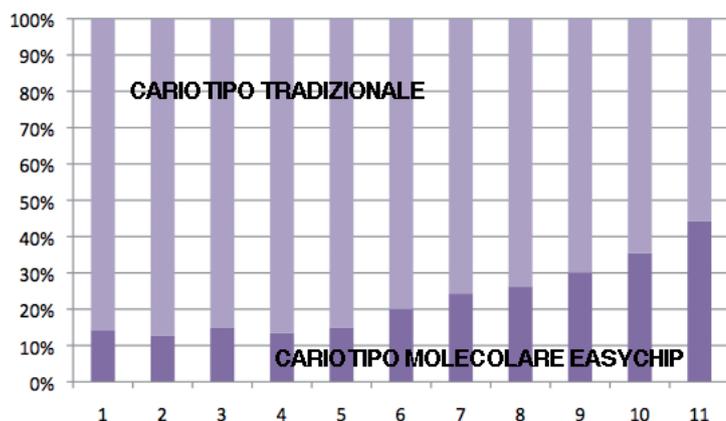
In corrispondenza di circa 50 regioni associate a sindromi da delezione/duplicazione la risoluzione è aumentata a 250 Kilobasi.

Easychip si applica come miglioramento della tecnica del cariotipo, aumenta la risoluzione, elimina la variabilità, è indipendente dall'operatore.

L'utilizzo del **2in1**, cioè Cariotipo + Easychip, sta prendendo piede ed entrando nella pratica ordinaria. Nel corso dell'ultimo anno, nella nostra casistica, da un 10% iniziale, il **2in1** è arrivato a superare il 45%

Su 1700 esami sono state riscontrate 7 anomalie cromosomiche classiche e 6 anomalie strutturali con Easychip (dimensioni <5 Megabasi) clinicamente significative. **La sensibilità dell'analisi è raddoppiata.**

REGIONI SINDROMICHE	
1p36 deletion syndrome	14q12 microdeletion syndrome
1q41q42 microdeletion syndrome	Prader-Willi
2p15-16.1 microdeletion syndrome	Angelman
2q23.1 microdeletion syndrome	15q24 microdeletion syndrome
2q32-q33 deletion syndrome	ATR-16
2q37 deletion syndrome	microdel 16q24.1
3pter-p25 deletion syndrome	Miller dieker
3q29 del/dup	Smith-Magenis
Wolf-Hirschhorn	Potocki Lupski
microdelezione 4q21	NF1-microdeletion syndrome
Cri du chat	17q21.31 microdeletion syndrome
5q14.3 deletion syndrome	17q23.1q23.2 deletion syndrome
Sotos	microdel 19q13.11
microdel 6q13q14	Down Syndrome critical region
Williams-Beuren	Cat eye
8p23.1 deletion syndrome	DiGeorge
8q21.11 Microdeletion Syndrome	22q11.2 distal deletion syndrome
Langer-Giedion	Xp11.3 deletion syndrome
Kleefstra syndrome	HSD (microdup Xp11.22p11.23)
DiGeorge 2	Xp11.22-linked intellectual disability
Wagr	microdup Xq12q13.1
Potocki-Shaffer	microdel Xq22.3q23
Jacobsen syndrome	Xq28 Microduplication
	X-IST
	SRY



Tag-Keywords: cffDNA, Whole Genome Amplification, Easychip, CGHarray screening, Deletions, Duplications, Consulenza prenatale

easychip

PluriGen Test™

21



TEST GENETICI PRENATALI

DNA FETALE CIRCOLANTE IN SANGUE MATERNO - CARIOTIPO MOLECOLARE EASYCHIP® PLURIGENTEST™

MAGGIO 2017

TEST NIPT DEL GENOMA (whole genome sequencing) ... DUE FORTI CONTRIBUTI per la valutazione motivata del cariotipo molecolare

SEQUENZIAMENTO WHOLE GENOME DEL DNA FETALE NEL PLASMA MATERNO.

Come sua abitudine Diana Bianchi interviene sui NIPT all'ACMG e sposta l'asticella verso l'alto; nel suo modo tipico, analizzando problemi e difficoltà, ma alla fine ne esce un imprimatur. Era successo per le prime ipotesi di validazione delle trisomie principali individuate sul cfDNA, ora affronta il "genome wide" NIPT. Tutti sappiamo che Illumina sta perfezionando da tempo l'algoritmo allo scopo di ridurre turbolenze e falsi positivi'. Da questa parte dell'Atlantico è oggi in pubblicazione il primo studio prospettico parallelo, italiano, condotto su 12000 casi da GENOMA GROUP di Roma, che confronta il test tradizionale sulle principali trisomie con il sequenziamento di tutto il genoma, Le performances sono paragonabili laddove spicca, nel sequenziamento di tutto il genoma, una fortissima sensibilità (nessun falso negativo) e l'individuazione di 8 anomalie strutturali cromosomiche (CNV) a fronte di 5 falsi positivi (PPV 61%).

Specificità e Sensibilità, pooled

Casi di Anomalia Cromosomica	% trisomie EU	% Anomalia Cromosomica	CVS (Trisomie 13, 18, 21)	CVS (Trisomie 13, 18, 21)	cfDNA	cfDNA
Totale	4,4		Specificità ^a	Sensibilità ^a	Specificità ^a	Sensibilità ^a
T21	3,1	70 (48+77)	99,9	99,5	99,9	99,5
T18			99,9	98,4	99,9	98,4
T13			99,8	98,4	99,7	98,4
X/Y Trisomia	0,2	5	99,9	99,9	99,9	100
45,X	0,19	8	99,7	99,1	99,8	100
Anomalie rare	0,9	17 (40+10)				
Anomalie rare >10Mb	0,1	10			99,9	100

The clinical utility of genome-wide non invasive prenatal screening

Francesco Fiorentino*, Sara Bono, Francesca Pizzuti, Sara Duca, Arianna Polverari, Monica Faieta, Marina Baldi, Laura Diano and Francesca Spinella

GENOMA—Molecular Genetics Laboratories, Rome, Italy
*Correspondence to: Francesco Fiorentino. E-mail: fiorentino@laboratorigenoma.it

ABSTRACT

Objective In this study, we expanded conventional cell-free fetal DNA (cfDNA)-based non-invasive prenatal testing (NIPT) to cover the entire genome. We aimed to compare the performance of the two tests in a large general population of pregnant women, in order to assess the clinical utility of the genome-wide screening.

Method Genome-wide cfDNA analysis was offered to 12 114 pregnant women undergoing NIPT for common fetal aneuploidy. Sequencing data were analyzed using an algorithm optimized to identify aneuploidies and subchromosomal aberrations.

Results Genome-wide screening allowed detection of 12 (7.4%) potentially viable clinically relevant chromosomal abnormalities, which would have remained overlooked if only conventional NIPT had been performed. This resulted in a statistically significant higher sensitivity (100% vs 92.64%, $p < 0.001$) than did standard screening. This was achieved without sacrificing the specificity of the test, which resulted similar to that obtained with standard cfDNA testing (99.87% vs 99.77%, $p = 0.064$).

Conclusion Genome-wide cfDNA analysis represents an enhanced screening tool for prenatal detection of chromosomal abnormalities, allowing identification of clinically relevant imbalances that are not detectable by conventional cfDNA testing. The results of this study demonstrate the clinical utility of genome-wide cfDNA analysis. This level of screening provides a significant higher sensitivity compared to standard screening while maintaining a high specificity, with the potential to improve overall pregnancy management. © 2017 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 4 Performance of conventional cfDNA screening versus genome-wide analysis

	Conventional cfDNA screening	Genome-wide cfDNA screening	p-Value ^b
No. of pregnancies assessed	12 114	12 114	
Clinical relevant chromosomal abnormalities detected—no.	166	196	
Pregnancies confirmed as chromosomally abnormal—no.	151	169	
False positive	15	27	
False negative	12 ^a	0	
True positive	151	169	
True negative	11 936	11 918	
Sensitivity	92.64%	100.00%	<0.001
Specificity	99.87%	99.77%	0.064
Positive predictive value (PPV)	90.96%	86.22%	0.161
Negative predictive value (NPV)	99.90%	100.00%	<0.001

^aClinically relevant chromosomal abnormalities, not detected by conventional cfDNA screening, potentially resulting in the birth of babies with chromosomal anomalies, have been considered as false negative.
^bA p-value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

La risposta delle pazienti alla possibilità di ampliare l'indagine alle anomalie rare strutturali (CNV) è interessante. Nell'ultimo semestre, basando l'informazione alle pazienti su questi dati già in nostro possesso, la scelta del test col sequenziamento genomico (PrenatalSafeKaryo) è passata dal 36% (30-65) del primo trimestre al 53% (45-65) del secondo trimestre.



TEST GENETICI PRENATALI

DNA FETALE CIRCOLANTE IN SANGUE MATERNO - CARIOTIPO MOLECOLARE EASYCHIP® PLURIGENTEST™

MAGGIO 2017

TEST NIPT DEL GENOMA (whole genome sequencing) ... DUE FORTI CONTRIBUTI per la valutazione motivata del cariotipo molecolare

SEQUENZIAMENTO WHOLE GENOME DEL DNA FETALE NEL PLASMA MATERNO.

Come sua abitudine Diana Bianchi interviene sui NIPT all'ACMG e sposta l'asticella verso l'alto; nel suo modo tipico, analizzando problemi e difficoltà, ma alla fine ne esce un imprimatur. Era successo per le prime ipotesi di validazione delle trisomie principali individuate sul cfDNA, ora affronta il "genome wide" NIPT. Tutti sappiamo che Illumina sta perfezionando da tempo l'algoritmo allo scopo di ridurre turbolenze e falsi positivi'. Da questa parte dell'Atlantico è oggi in pubblicazione il primo studio prospettico parallelo, italiano, condotto su 12000 casi da GENOMA GROUP di Roma, che confronta il test tradizionale sulle principali trisomie con il sequenziamento di tutto il genoma, Le performances sono paragonabili laddove spicca, nel sequenziamento di tutto il genoma, una fortissima sensibilità (nessun falso negativo) e l'individuazione di 8 anomalie strutturali cromosomiche (CNV) a fronte di 5 falsi positivi (PPV 61%).

Specificità e Sensibilità, pooled

Casi di Anomalia Cromosomica	% trisomie EU	% Anomalia Cromosomica	CVS (Trisomie 13, 18, 21)	CVS (Trisomie 13, 18, 21)	cfDNA	cfDNA
Totale	4,4		Specificità ^a	Sensibilità ^a	Specificità ^a	Sensibilità ^a
T21			99,9	99,5	99,9	99,5
T18	3,1	70 (48+77)	99,9	98,4	99,9	98,4
T13			99,8	98,4	99,7	98,4
X/Y Trisomia	0,2	5	99,9	99,9	99,9	100
45,X	0,19	8	99,7	99,1	99,8	100
Anomalie rare	0,9	17 (40+10)				
Anomalie rare >10Mb	0,1	10			99,9	100

The clinical utility of genome-wide non invasive prenatal screening

Francesco Fiorentino*, Sara Bono, Francesca Pizzuti, Sara Duca, Arianna Polverari, Monica Faieta, Marina Baldi, Laura Diano and Francesca Spinella

GENOMA—Molecular Genetics Laboratories, Rome, Italy

*Correspondence to: Francesco Fiorentino. E-mail: fiorentino@laboratorigenoma.it

ABSTRACT

Objective In this study, we expanded conventional cell-free fetal DNA (cfDNA)-based non-invasive prenatal testing (NIPT) to cover the entire genome. We aimed to compare the performance of the two tests in a large general population of pregnant women, in order to assess the clinical utility of the genome-wide screening.

Method Genome-wide cfDNA analysis was offered to 12 114 pregnant women undergoing NIPT for common fetal aneuploidy. Sequencing data were analyzed using an algorithm optimized to identify aneuploidies and subchromosomal aberrations.

Results Genome-wide screening allowed detection of 12 (7.4%) potentially viable clinically relevant chromosomal abnormalities, which would have remained overlooked if only conventional NIPT had been performed. This resulted in a statistically significant higher sensitivity (100% vs 92.64%, $p < 0.001$) than did standard screening. This was achieved without sacrificing the specificity of the test, which resulted similar to that obtained with standard cfDNA testing (99.87% vs 99.77%, $p = 0.064$).

Conclusion Genome-wide cfDNA analysis represents an enhanced screening tool for prenatal detection of chromosomal abnormalities, allowing identification of clinically relevant imbalances that are not detectable by conventional cfDNA testing. The results of this study demonstrate the clinical utility of genome-wide cfDNA analysis. This level of screening provides a significant higher sensitivity compared to standard screening while maintaining a high specificity, with the potential to improve overall pregnancy management. © 2017 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 4 Performance of conventional cfDNA screening versus genome-wide analysis

	Conventional cfDNA screening	Genome-wide cfDNA screening	p-Value ^b
No. of pregnancies assessed	12 114	12 114	
Clinical relevant chromosomal abnormalities detected—no.	166	196	
Pregnancies confirmed as chromosomally abnormal—no.	151	169	
False positive	15	27	
False negative	12 ^a	0	
True positive	151	169	
True negative	11 936	11 918	
Sensitivity	92.64%	100.00%	<0.001
Specificity	99.87%	99.77%	0.064
Positive predictive value (PPV)	90.96%	86.22%	0.161
Negative predictive value (NPV)	99.90%	100.00%	<0.001

^aClinically relevant chromosomal abnormalities, not detected by conventional cfDNA screening, potentially resulting in the birth of babies with chromosomal anomalies, have been considered as false negative.

^bA p-value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

La risposta delle pazienti alla possibilità di ampliare l'indagine alle anomalie rare strutturali (CNV) è interessante. Nell'ultimo semestre, basando l'informazione alle pazienti su questi dati già in nostro possesso, la scelta del test col sequenziamento genomico (PrenatalsafeKaryo) è passata dal 36% (30-65) del primo trimestre al 53% (45-65) del secondo trimestre.



PluriGenTEST™

Poliambulatorio Privato
CENTRO PALMER S.r.l.

MEDI SALUSER
CENTRO MEDICO DIAGNOSTICO

TEST GENETICI PRENATALI

NUOVI NIPT COME FUNGHIQUALE TEST SCEGLIERE ?

OTTOBRE 2017

ROCHE E ILLUMINA HANNO PRODOTTO KIT DEI LORO TEST NIPT, VALIDATI CE, DISPONIBILI PER IL TRANSFER DELLA TECNOLOGIA

... ai laboratori che abbiano denaro per acquisire la consistente componente strumentale: CE-IVD Harmony Prenatal Test e VeriSeq NIPT Solution. Questi prodotti hanno dimostrato una sufficiente accuratezza per rientrare nei parametri previsti dalle Linee Guida Internazionali e sono confezionati, specialmente quelli che usano il sequenziamento di tutto il genoma (VeriSeq), con caratteristiche semplici, a bassa copertura di sequenziamento, con software fisso, non maneggiabile.

I test sono congegnati per analizzare le trisomie 13, 18, 21, XeY, oltre monosomia X. Non prevedono le indagini di delezioni o duplicazioni parziali. La disponibilità dei test per i laboratori di analisi ha creato ovviamente due livelli di competenze fra le strutture che si occupano di NIPT.

Una, superiore, con competenze di genetica molecolare avanzate, che consente loro duttilità nella gestione dei test, degli algoritmi, nello sviluppo di ulteriori procedure supportate dalla verifica scientifica.

Una seconda, inferiore, dei laboratori di analisi polidiagnostici che si avvalgono di questi kit standardizzati. In questo caso non basta la validazione CE dei prodotti per garantire l'utilizzatore finale, occorre che i laboratori, che di solito danno un nome proprio al test da loro eseguito, dimostrino le loro referenze mettendo a disposizione i dati tecnologici e la casistica progressiva della loro attività clinica. Ovviamente la analisi critica di tutti questi dati va affidata a soggetti esperti senza evidenti conflitti di interesse.

Questo è un ruolo che fin dal 2013, anno d'esordio dei NIPT, è specifico delle strutture multidisciplinari dedite alla diagnosi genetica prenatale, con genetista, ginecologo, staff paramedico, capaci di rispondere alle esigenze dei colleghi e seguire la paziente in tutte le fasi delle indagini, dalle procedure non invasive alle eventuali invasive. Le nostre strutture, che già operano con centri di livello superiore, stanno analizzando con attenzione alcune nuove realtà e per questo sono a disposizione dei colleghi per ogni esigenza nasca dalla loro pratica clinica.



TEST GENETICI PRENATALI DNA NIPT QUALI NOVITA' ?



NOVEMBRE 2019 bis

Questa nuova Newsletter nasce per un doveroso chiarimento al disappunto suscitato dalla precedente. Il contrappunto di CHI SALE e CHI SCENDE non era evidentemente riferito alla analisi dei prodotti descritti e tantomeno alle aziende, ma agli obiettivi genetici che i prodotti si pongono, salire verso il genoma fetale o rimanere ad anomalie selezionate. E' innegabile per un genetista che il genoma sia l'obiettivo di indagine, dopo 45 anni e 100.000 diagnosi prenatali genomiche su amniociti o villi coriali. Ed è altrettanto innegabile la attenzione ai progressi che verso tale traguardo compiono le tecniche NIPT.

Ciò detto la nostra attenzione è vivace per tutte le novità che si rifanno alle Linee Guida Ministeriali 2015, con particolare attenzione al mantenimento degli standard di accuratezza su tutte le trisomie e alle garanzie informative per le pazienti che consistono nel colloquio pre test affidato a un genetista o medico esperto in diagnosi prenatale. Mai vorremmo che la compressione dei costi portasse a trasgredire questi cardini, e in tal senso i nostri commenti saranno sempre espressi.

Per risolvere ogni fortuito fraintendimento alleghiamo qui i dati originali PERKIN ELMER circa le caratteristiche e l'accuratezza del test NIPT

PerkinElmer Receives CE-IVD Mark for Its Vanadis Fully Automated NIPT Platform

Innovative Cost-Effective Solution Provides Pregnant Women Widespread Access to Non-Invasive Prenatal Testing

November 26, 2018 03:00 AM Eastern Standard Time

WALTHAM, Mass.--(BUSINESS WIRE)--PerkinElmer, Inc. (NYSE: PKI), a global leader committed to innovating for a healthier world, today announced that its Vanadis® NIPT system has obtained CE-IVD mark for commercialization and distribution throughout Europe and other countries that accept CE marking. This non-invasive test provides screening results for trisomy 21 (Down syndrome), trisomy 18 (Edwards syndrome) and trisomy 13 (Patau syndrome). The Vanadis NIPT system has been validated in an external clinical study conducted in France. The blinded study analyzed 80 samples from pregnancies affected by trisomy 21 and 670 samples from unaffected pregnancies, classifying all cases correctly, with only one sample failing to generate a result. In addition to trisomy 21, PerkinElmer conducted clinical studies to demonstrate high sensitivity and specificity for trisomies 18 and 13.



LABORATORIO ANALISI
CENTRO DIAGNOSTICO

Prestazioni del test VANADIS

L'attendibilità che l'esame ha mostrato in studi di validazione clinica, è riportata nella seguente tabella:

Dati cumulativi di validazione clinica Perkin Elmer

	Trisomia 21 (n= 750)	Trisomia 18 (n= 1086)	Trisomia 13 (n= 1086)
Sensibilità (95% CI)	100% (80/80) (95.5-100%)	88.9% (32/36) (73.9-96.9%)	100% (10/10) (89.2-100%)
Specificità (95% CI)	100% (670/670) (99.5-100%)	99.5% (1035/1040) (98.9-99.6%)	99.9% (1039/1040) (99.5-100%)

Technical assay performance

The capture specificity of the probe set was evaluated by sequencing. For three probe sets, capturing 3500 loci at chromosomes 13, 18 and 21, ≥99.9% of the sequence reads aligned to the correct target loci in the genome. Extraction of cDNA from plasma samples generated approximately 12 ng DNA and 600 000 counts per sample and chromosome. To evaluate the precision achieved by the Vanadis NIPT assay digitally enabled counting readout, cell line samples reacted to labelled RCPs were pooled and split across one nanofilter plate and quantified. In average 508 842 objects per well and chromosome were counted and the normalized ratio across samples had a standard deviation of 0.2%, which corresponds well with the theoretically lowest variability possible at this count depth (Fig. 3), assuming Poisson distributed counts between samples by:

$$theorCV_{Count_{affected}/Count_{reference}} = \sqrt{\frac{1}{Count_{affected}} + \frac{1}{Count_{reference}}}$$