



ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

Diagnosi molecolare di Emofilia B



a cura del
Gruppo di Lavoro Genetica dell'AICE

Edizione Settembre 2021

Sviluppo e cronologia del documento

La prima stesura del documento è stata redatta da Roberta Salviato e Donata Belvini (Servizio Trasfusionale e Centro Emofilia, Ospedale di Castelfranco Veneto, Castelfranco Veneto (TV)). Tale versione è stata rivista e integrata dal Gruppo di Lavoro (GdL) Genetica dell'AICE, presieduto da Angiola Rocino, Presidente AICE, e coordinato, per la componente dei biologi molecolari, da Francesco Bernardi e, per la componente medica, inizialmente, da Giancarlo Castaman, quindi da Lucia D. Notarangelo. Membri del GdL sono, oltre le due autrici, Isabella Garagiola, Maurizio Margaglione, Massimo Morfini, Mimosa Mortarino, Federica Riccardi, Rosa Santacroce, Annarita Tagliaferri, Federica Zarrilli.

La risultante versione, cui ha contribuito Antonio Coppola, Segretario AICE, approvata dal Consiglio Direttivo AICE (Presidente: A. Rocino; Vice-Presidente: R.C. Santoro; Consiglieri: A.C. Molinari, C. Santoro, E. Zanon; Rappresentante ISS: A. Giampaolo) e dal Comitato Scientifico AICE (Presidente: A. Tripodi; Componenti: R. De Cristofaro, G. Di Minno, F. Peyvandi, M. Pinotti, P. Simioni), è stata inviata ai Soci AICE per valutazione via e-mail il 12.10.2021.

Sono pervenuti commenti e proposte di revisione da parte di Maria Elisa Mancuso. La versione finale del documento, infine, ha ottenuto il parere favorevole dei Soci mediante consultazione online attraverso il sito ufficiale AICE (www.aiceonline.org), indetta il 03.11.2021 e conclusasi il 27.11.2021. Il documento è stato pubblicato sul sito AICE in data 13.12.2021.

Indice	<i>pag.</i>
Acronimi	1
Introduzione	4
Emofilia B: classificazione	4
Emofilia B: diagnosi, espressione clinica e complicanze della terapia	5
Altri difetti della coagulazione con ridotta attività del FIX	8
Fattore IX: gene e proteina	8
Variante <i>Leyden</i>	11
Diagnosi molecolare di emofilia B	12
<i>Casi familiari</i>	13
<i>Casi sporadici</i>	13
Approcci di analisi molecolare nel paziente emofilico B	13
<i>Analisi di varianti puntiformi, piccole delezioni, inserzioni, duplicazioni, delins</i>	15
<i>Sequenziamento diretto</i>	15
<i>Metodiche di screening</i>	16
<i>Analisi di ampie delezioni o duplicazioni</i>	16
Pazienti in cui non è possibile identificare la variante causa di malattia	17
<i>Posizione della variante nel gene</i>	18
<i>Appropriatezza della tecnica di analisi molecolare utilizzata</i>	18
<i>Mosaicismo</i>	19

Pazienti con varianti multiple	20
Percorso di analisi molecolare nel paziente emofilico B	20
Approcci di analisi molecolare nelle donne sospette portatrici	22
<i>Donne a rischio di trasmissione</i>	22
<i>Madre di un caso sporadico</i>	23
<i>Donne con ridotta attività coagulante del FIX</i>	24
<i>Fenomeni genetici</i>	25
<i>Fenomeni epigenetici</i>	25
Diagnosi prenatale	28
Conclusioni	29
Bibliografia	30
Allegato 1 - Origini delle varianti e mosaicismi: valutazione del rischio di trasmissione	37
Allegato 2 - Sequenziamento diretto del DNA	41
Allegato 3 - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	47
Allegato 4 - Lyonizzazione: studio della metilazione	52
Allegato 5 -Test diagnostici per la diagnosi prenatale	56

ACRONIMI

<i>AR</i>	Androgen Receptor
<i>ARE</i>	Androgen-Responsive Element
<i>BLAST</i>	Basic Local Alignment Search Tool
<i>CE-IVD</i>	Communauté Européenne-in vitro disposal
<i>C/EBPα</i>	CCAAT/enhancer-binding protein α
<i>cfDNA</i>	cell-free DNA (DNA libero circolante)
<i>cffDNA</i>	cell-free fetal DNA (DNA libero fetale circolante)
<i>CGH array</i>	Comparative Genomic Hybridization array
<i>CNVs</i>	Copy Number Variations
<i>CSGE</i>	Conformation Sensitive Gel Electrophoresis
<i>CVS</i>	Chronic Villous Sampling
<i>DAZ</i>	Deleted in AZospermia
<i>ddNTPs</i>	dideoxyNucleotide Triphosphate
<i>ddATP</i>	dideoxyAdenosine Triphosphate
<i>ddCTP</i>	dideoxyCytidineTriphosphate
<i>ddGTP</i>	dideoxyGuanosine Triphosphate
<i>ddTTP</i>	dideoxyThymidine Triphosphate
<i>ddPCR</i>	droplet digital PCR
<i>DGGE</i>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
<i>DHPLC</i>	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
<i>EGF</i>	Epidermal Growth Factor
<i>FISH</i>	Fluorescent in Situ Hybridization
<i>GGCX</i>	Gamma Glutamyl CarboXylase
<i>Gla</i>	Gamma-carboxy-glutamic acid

<i>Glu</i>	Glutamic acid
<i>HA</i>	Heteroduplex Analysis
<i>HNF4α</i>	Hepatocyte Nuclear Factor
<i>HRM</i>	High Resolution Melting
<i>HUMARA</i>	Human Androgen Receptor
<i>LRG</i>	Locus Reference Genomic
<i>LR-PCR</i>	Long Range - Polymerase Chain Reaction
<i>MAPH</i>	Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation
<i>MCC</i>	Maternal Cell Contamination
<i>MLPA</i>	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
<i>NGS</i>	Next Generation Sequencing
<i>NIPD</i>	Non-invasive Prenatal Diagnosis
<i>NIPS</i>	Non-invasive Prenatal Screening
<i>NIPT</i>	Non-invasive Prenatal Testing
<i>ONECUT1/2</i>	one cut homeobox
<i>ORF</i>	Open Reading Frame
<i>OSA</i>	One Stage Assay
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction
<i>PCSK1N</i>	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1 Inhibitor
<i>PGT</i>	Prenatal Genetic Testing
<i>QF-PCR</i>	Quantitative Fluorescent PCR
<i>qPCR</i>	quantitative PCR
<i>QMPSF</i>	Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments
<i>RFU</i>	Relative Fluorescent Unit
<i>RT-PCR</i>	Reverse Transcription-PCR
<i>SLITRK4</i>	SLIT And NTRK Like Family Member 4

<i>SNP array</i>	Single Nucleotide Polymorphism array
<i>SNVs</i>	Single Nucleotide Variants
<i>SRY</i>	Sex-determining Region Y
<i>SSCP</i>	Single Strand Conformation Polymorphism
<i>STR</i>	Short Tandem Repeat
<i>TF</i>	Tissue Factor
<i>TSIX</i>	XIST antisense RNA
<i>UTR</i>	Untranslated Region
<i>VKORC1</i>	Vitamin K epoxide Reductase Complex subunit 1
<i>WES</i>	Whole-Exome Sequencing
<i>WGS</i>	Whole-Genome Sequencing
<i>XIC</i>	X-Inactivation Center
<i>XIST</i>	X-inactive Specific Transcript
<i>ZDHHC15</i>	Zinc Finger DHHC-Type Palmitoyltransferase 15

Introduzione

L'emofilia B è una patologia rara caratterizzata da un difetto dell'attività coagulante del fattore (F) IX (FIX). Fu identificata come entità clinica a sé stante e differente dall'emofilia A all'inizio degli anni '50 e denominata *Christmas disease* da Biggs e collaboratori dal nome del primo paziente in cui essa fu precisamente caratterizzata [1]. La malattia si trasmette come carattere recessivo, legata al cromosoma X, e si manifesta quasi esclusivamente in soggetti di sesso maschile, emizigoti [2,3]. Una recente metanalisi basata sui dati riportati in diversi registri nazionali ha evidenziato una prevalenza di circa 3.8 casi per 100.000 maschi nati vivi, se si considerano i pazienti con qualsiasi grado di gravità della patologia e di 1.1 per 100.000, considerando i soli casi di emofilia B grave [4]. I soggetti di sesso femminile sono, generalmente, asintomatici ma possono presentare manifestazioni emorragiche in conseguenza di bassi livelli di FIX coagulante (FIX:C) a causa di *lyonizzazione* o fattori epigenetici¹.

L'espressione clinica della malattia è variabile in rapporto all'entità del difetto coagulativo, espressione a sua volta del tipo di variante genica causa della malattia e, in particolare, della capacità di dar luogo alla sintesi di proteina FIX funzionalmente attiva, sebbene altri determinanti possano influire sull'espressione fenotipica del difetto genetico [5]. Non sempre, dunque, il livello di FIX:C correla con la frequenza e la gravità delle manifestazioni emorragiche. Generalmente, tuttavia, i pazienti con emofilia B grave, non sottoposti a regime terapeutico di profilassi, possono presentare episodi emorragici, soprattutto a carico delle articolazioni (emartri) e dei muscoli (ematomi) sia post-traumatici che spontanei con una frequenza superiore a una volta alla settimana [6], mentre i pazienti moderati e lievi presentano più raramente episodi spontanei e più frequentemente le manifestazioni emorragiche insorgono a seguito di traumi anche minori e interventi chirurgici.

Emofilia B: classificazione

La *Scientific and Standardization Committee (SSC) of Factor VIII and IX Subcommittee* della *International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)* classifica la gravità della patologia sulla base dell'attività plasmatica del FIX:C, definendo gravi i pazienti che presentano un'attività <1% del normale, moderati i pazienti con livelli del 1-5% e lievi i soggetti con FIX:C >5 e <40% del normale [7]. Tuttavia, la variabilità dell'espressione clinica

¹ vedi sezione *Donne con ridotta attività del Fattore IX*

in pazienti con livelli simili di FIX:C suggerisce di tener conto anche della quantificazione antigenica del FIX (FIX:Ag) nel plasma. La misura dei livelli di FIX:Ag pur non essendo fondamentale per la diagnosi, può rappresentare un'utile integrazione del test funzionale, consentendo di formulare una suddivisione dei pazienti in sottogruppi, tenendo conto dei livelli di FIX:Ag e FIX:C:

1. livelli di FIX:Ag e FIX:C consensualmente ridotti, a dimostrare una carenza di sintesi
2. livelli di FIX:Ag nella norma e di FIX:C ridotti, a dimostrare la sintesi di una variante disfunzionale;
3. livelli di FIX:Ag e FIX:C ridotti ma non consensualmente (maggiore riduzione dei livelli di FIX:C, rispetto a quelli del FIX:Ag) a dimostrare la presenza di una carenza di sintesi di una variante disfunzionale.

Emofilia B: diagnosi, espressione clinica e complicanze della terapia

Emofilia A e B sono, alla diagnosi, clinicamente indistinguibili e la diagnosi differenziale risiede nel dosaggio dei livelli circolanti di FVIII e FIX che può essere effettuata mediante due tipi di metodiche: il metodo coagulante a uno stadio (*one stage assay*, OSA) che si basa sul tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT), misurato su un plasma carente di FVIII o di FIX al quale vengono aggiunte diluizioni scalari del plasma del paziente, e il metodo cromogenico a due stadi in cui il fattore FX attivato (FXa) che si genera è misurato fotometricamente mediante un substrato cromogenico sintetico. Il metodo OSA è più comunemente usato, ma entrambi possono essere utilizzati nella pratica clinica. In entrambi la misura del livello di fattore carente nel plasma del paziente viene eseguita in parallelo con un calibratore, tarato per il contenuto del fattore da misurare rispetto ad uno standard di riferimento, consentendo il calcolo dei risultati in termini di UI/dL. Tuttavia, discrepanze non trascurabili sono state osservate nei livelli di FVIII/FIX misurati alla diagnosi mediante i due metodi, le cui ragioni non sono state ancora del tutto chiarite, ma sembrano correlate alla presenza di specifiche varianti geniche. In particolare, per ciò che attiene alla misura dei livelli di FIX, una maggiore attività FIX:C è stata riscontrata in pazienti con emofilia B lieve, caratterizzata da bassi livelli di attività e normale concentrazione di antigeni FIX (FIX:Ag),

per metodi coagulanti eseguiti con alcuni reagenti del commercio, anche se non sono disponibili dati su tutti i reagenti APTT reperibili in commercio [8,9]².

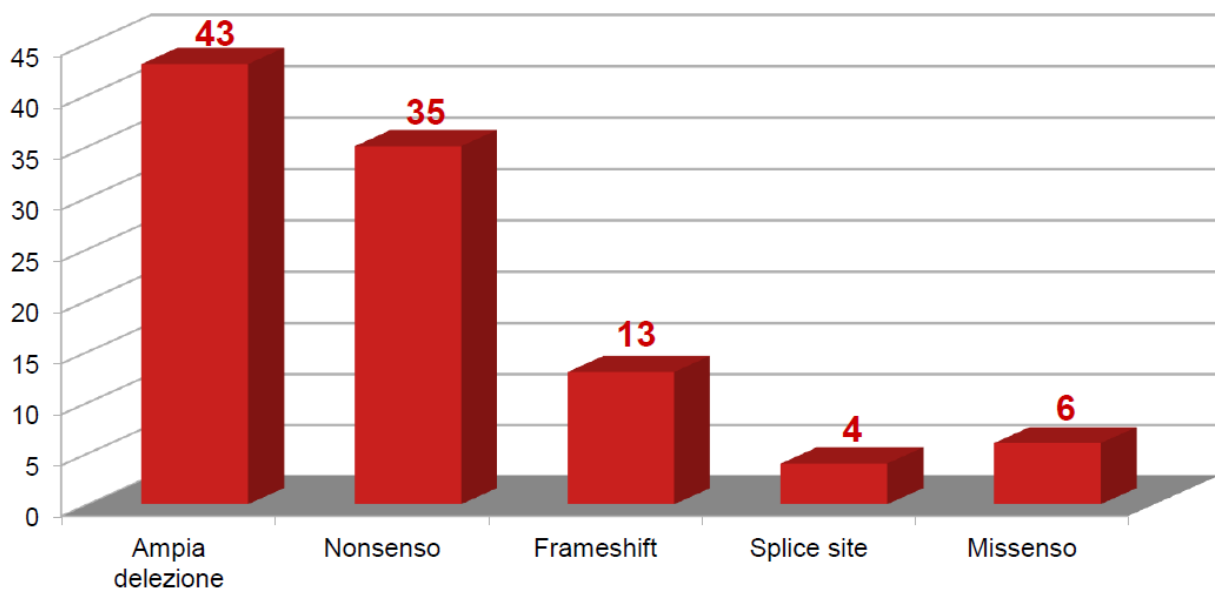
Un intenso dibattito si è svolto negli ultimi anni circa l'espressione fenotipica dell'emofilia B. La malattia sembrerebbe infatti, associata a una sintomatologia emorragica meno grave rispetto all'emofilia A [12,13]. Un ampio studio su bambini affetti da emofilia A e B grave e moderata ha dimostrato l'assenza di differenze significative del fenotipo emorragico nei due tipi di pazienti, almeno nei primi 75 giorni di esposizione a concentrati di FVIII o FIX utilizzati per la terapia sostitutiva e cioè all'inizio della loro storia emorragica [14]. D'altra parte, il minor impatto della tendenza emorragica nei pazienti con emofilia B rispetto a quelli con emofilia A si associava in uno studio italiano a *score* clinici ed ecografici di danno articolare inferiori, nonché ad un profilo più favorevole di indici sierici ed istologici sinoviali di progressione dell'artropatia. La necessità di essere sottoposti a interventi chirurgici di artroplastica è risultata, ancora, significativamente più elevata in pazienti adulti affetti da emofilia A grave rispetto a emofilici B [15]. Inoltre, nei pazienti con emofilia A è significativamente più elevato uno score di gravità della patologia (*Haemophilia Severity Score, HSS*) sviluppato da Schulman e collaboratori, combinando fattori quali: lo stato ortopedico, l'incidenza annuale di episodi emorragici e il conseguente consumo di concentrati per la terapia sostitutiva [16]. Tali differenze sono da attribuire alla maggiore prevalenza di varianti missenso negli emofilici B [17,18], le quali permettono la sintesi di FIX in quantità minima, ma sufficiente per lenire il fenotipo emorragico e, in particolare, l'insorgenza di emartri e lo sviluppo di artropatia cronica.

Lo stesso meccanismo fisiopatologico sarebbe anche alla base della minore incidenza di inibitori anti-FIX in emofilici B gravi, rispetto a pazienti con emofilia A grave [19]. Una recente revisione sistematica della letteratura ha, tuttavia, dimostrato che l'incidenza di inibitori è più elevata (10% circa dei pazienti non precedentemente trattati) di quanto precedentemente riportato [20]. Questo dato è stato confermato dalla recente analisi della coorte PedNet che ha riportato in 154 bambini con emofilia B grave non precedentemente esposti arruolati consecutivamente un'incidenza cumulativa di inibitori del 9,3% dopo 75 giorni di esposizione (*exposure days, ED*) e del 10,2% dopo 500 ED [21]. Tale complicanza, strettamente associata al trattamento sostitutivo, comporta notevoli difficoltà per la gestione clinica dei

² Per maggiori dettagli si rimanda agli specifici documenti che l'AICE, la World Federation of Haemophilia (WFH) hanno prodotto sull'argomento [10,11].

pazienti in cui si verifica. Gli alloanticorpi diretti verso il FIX infuso ne neutralizzano, infatti, la funzione procoagulante rendendo inefficace il trattamento sostitutivo [10,22]. Si sviluppano, in particolare, in emofilici B gravi con varianti del gene *F9* che impediscono completamente la sintesi della proteina, quali: le delezioni totali o di ampie porzioni del gene e le sostituzioni di basi che comportano l'inserimento di un segnale di stop prematuro della trascrizione (varianti *frameshift*) (**Figura 1**) [18,19,22].

Figura 1. Varianti geniche in 101 pazienti con inibitore anti-FIX (FIX International Variant Database - F9db, www.factorix.org, aggiornato a febbraio 2020) Accesso 31 agosto 2021.



Tali varianti, inoltre, sono associate alla comparsa di manifestazioni anafilattiche e gravi reazioni allergiche il cui meccanismo patogenetico non è completamente noto [19,22,23]. Esse non sembrano associate a un particolare tipo di concentrato (plasmaderivato o ricombinante) utilizzato per la terapia sostitutiva [24]. Sono, invece, sicuramente associate a varianti geniche come le ampie delezioni [25]. Un'ipotesi molto accreditata vede, inoltre, nelle stesse caratteristiche molecolari della proteina FIX un possibile meccanismo. Il suo peso molecolare, notevolmente inferiore rispetto a quello del FVIII, fa sì che si distribuisca anche nel compartimento extra-vascolare ove è più facilmente innescabile un'attivazione delle mastcellule con conseguente reazione di ipersensibilità IgE-mediata [22,26,27]. In ogni caso, tali reazioni possono porre in serio pericolo la vita del paziente e richiedono un'attenta sorveglianza nel corso dei primi giorni di esposizione a concentrati di FIX, praticando le

infusioni in ambiente protetto e con facile accesso a servizi di terapia intensiva [28]. Per tale motivo l'identificazione della variante genica causa di emofilia B è fortemente raccomandata già alla diagnosi [10,28]. Gli stessi pazienti spesso manifestano, inoltre, una sindrome nefrosica in corso di trattamento di Induzione dell'Immunotolleranza (ITI) [29]. Ciò impedisce la prosecuzione del trattamento, a meno che non si stabilisca una contemporanea terapia immunosoppressiva. Questa possibile grave complicanza scoraggia i clinici dall'intraprendere un trattamento di ITI, considerando anche le scarse informazioni circa la patogenesi della sindrome nefrosica, la stessa scarsa responsività all'ITI [30-32], i dubbi circa l'opportunità di sottoporre i pazienti, spesso bambini, a terapia immunosoppressiva e le possibilità di trattamenti alternativi non basati sulla terapia sostitutiva per la profilassi degli episodi emorragici che oggi si affacciano all'orizzonte [3].

Altri difetti della coagulazione con ridotta attività del FIX

Un difetto del FIX si manifesta anche in casi di difetti combinati di fattori vitamina K dipendenti (OMIM 277450) caratterizzati da allungamento sia del tempo di protrombina (PT) che del tempo dell'APTT con ridotti livelli di protrombina (FII) e di FVII, FIX, FX, proteina C e S. Questo raro difetto della coagulazione ha eredità autosomica recessiva ed è dovuto a difetti nei geni che codificano per gli enzimi Gamma-glutamil carbossilasi (*Gamma-Glutamyl Carboxylase*, *GGCX*, difetto di tipo 1) e Vitamina K epossido reduttasi (*Vitamin K epoxide Reductase Complex subunit 1* *VKORC1*, difetto di tipo 2) [33]. L'enzima *GGCX* è responsabile della carbossilazione dei residui di acido glutammico (*Glu*) localizzati nei domini *Gla* (*gamma-carboxy-glutamic acid*), permettendo alla proteina di assumere una conformazione terziaria tale da consentire il legame ai fosfolipidi.

L'enzima *VKORC1* è implicato nel ciclo della vitamina K ed è necessario per rigenerare la vitamina K nella forma idrochinone, cofattore dell'enzima *GGCX*. Difetti a carico del gene *VKORC1* influiscono, dunque, sulla disponibilità di vitamina K per la carbossilazione.

Fattore IX: gene e proteina

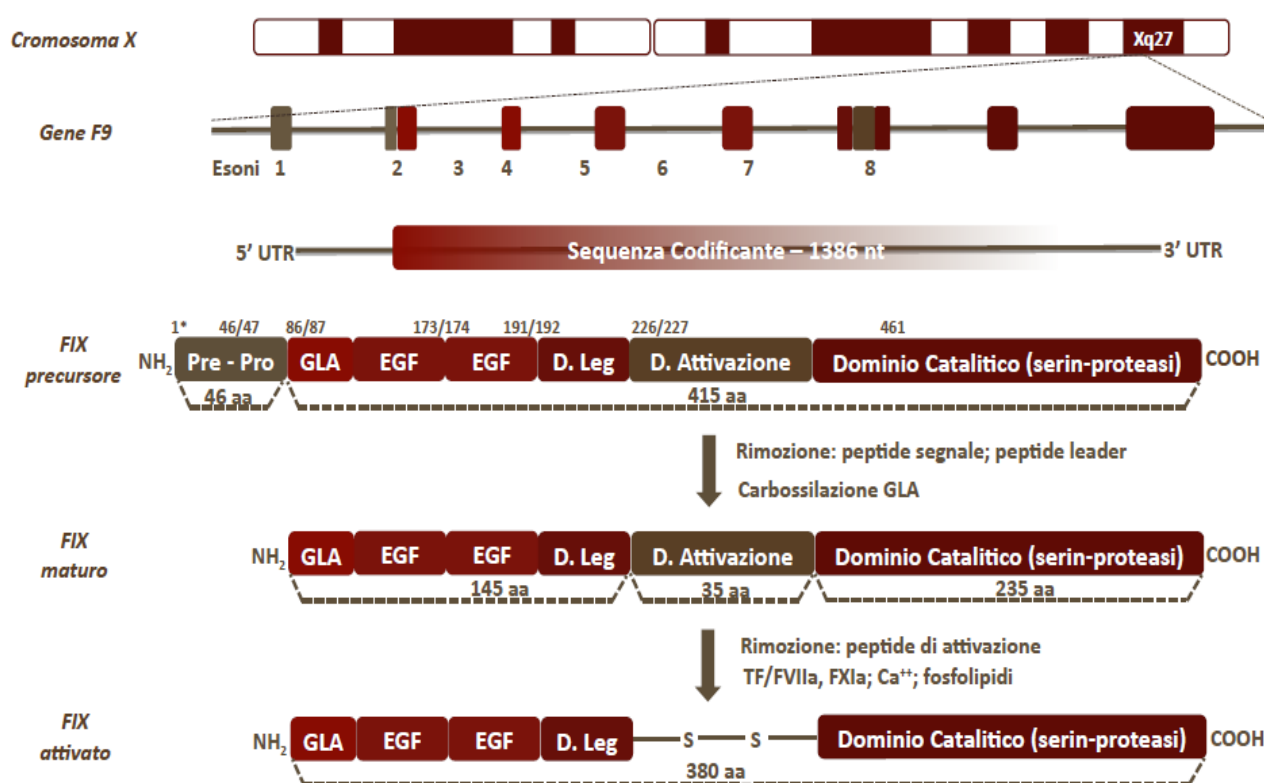
Il gene *F9* (**Tabella 1**) è localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq27.1), comprende circa 34 Kilobasi (Kb) [34] e include 8 esoni costituiti da un minimo di 25 nucleotidi fino a un massimo di 1.935 nucleotidi [35].

Tabella 1. Gene F9

Denominazione del Gene HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)	F9
Phenotype MIM Number Gene/Locus MIM Number Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	306900 (HEMOPHILIA B) 300746 (COAGULATION FACTOR IX) F9
Homo sapiens coagulation factor IX gene NCBI Reference Sequence RefSeqGene (LRG_556)	NG_007994.1
Homo sapiens coagulation factor IX (F9) transcript variant 1, mRNA	NM_000133 2800 bp mRNA
Locus Reference Genomic (LRG) LRG Project	LRG_556
Gene Cards Id The Human Gene Database	GC0XP139530
Ensembl gene Ensembl transcript Ensembl - genome browser	ENSG00000101981 ENST00000218099
Posizione cromosomica	Xq27.1-q27.2
Coordinate cromosomiche (Genome Reference Consortium): Assembly GRCh38.p13 (hg38) NC_000023.11 Release date 2019.02.28 (current assembly) Assembly GRCh37.p13 (hg19) NC_000023.10 Release date 2013.06.28 (previous assembly)	Intervallo nucleotidico: 139.530.720-139.563.459 Intervallo nucleotidico: 138.612.895-138.647.617

L'intera sequenza del gene è completamente nota. Il suo trascritto è costituito da 2.802 nucleotidi e comprende una breve regione 5' non tradotta di 29 basi, una *open reading frame* (ORF) di 1.386 basi e una regione 3' non tradotta di 1.390 basi (**Figura 2**).

Figura 2. Localizzazione cromosomica e organizzazione in esoni del gene F9. Maturazione e attivazione della proteina codificata[^].



D. dominio della proteina matura; EGF, epidermal growth factor like domain; GLA, γ -carboxy glutamic acid; leg.: legante; nt: nucleotidi. [^]I colori indicano la corrispondenza tra regioni esoniche e domini proteici. *Numerazione dei residui aminoacidici secondo la Human Genome Variation Society (HGVS)

La proteina FIX è una serin-proteasi sintetizzata nelle cellule epatiche in forma di precursore; è costituita da 461 aminoacidi e comprende un peptide segnale di 28 aminoacidi e un pro-peptide di 18 residui. Il FIX viene carbossilato nelle cellule epatiche, ad opera di una carbossilasi vitamina K dipendente, ed è secreto in circolo come precursore inattivo. La sua attivazione avviene nel plasma dopo i tagli proteolitici di due legami peptidici, ad opera del FXI attivato (FXIa) o ad opera del complesso *Tissue Factor* (TF) /FVII attivato (FVIIa). La proteina matura è costituita da 415 aminoacidi con un peso molecolare di 56 kDa. L'attivazione del FIX genera una proteina costituita da una catena leggera N-terminale e

Figura 3. Rappresentazione schematica del processo di coagulazione.



11

factor 4α da c.-49), *CCAAT/Enhancer-binding Protein α* (*C/EBPα* da c.-19), *One Cut Homeobox* (*ONECUT1/2*; c.-35_34) causano una riduzione dei livelli di FIX:C durante l'infanzia, ma l'aumento della produzione di ormoni androgeni che si verifica con la pubertà riporta i livelli di trascrizione della proteina e di FIX:C circolante a valori normali (fenotipo *Leyden*). Al contrario, la variante *Brandenburg* (c.-55 G>C) causa una riduzione dei livelli di FIX:C che rimangono stabili per tutta la vita [37].

Diagnosi molecolare di emofilia B

La diagnosi molecolare con identificazione della variante nel gene *F9* è raccomandata in tutti i maschi affetti da emofilia B [10,28]. Il tipo di variante genica identificata fornisce, infatti, informazioni circa il rischio di sviluppo di anticorpi neutralizzanti il FIX (inibitori) e di reazioni anafilattiche in caso di trattamento sostitutivo con concentrati di FIX. Inoltre, il paziente rappresenta il caso indice nell'indagine familiare rivolta alle donne della famiglia, per le quali lo studio molecolare consente di determinare, o confermare in caso di portatrici obbligate, tale condizione.

Le donne portatrici sono spesso asintomatiche, ma il 10-15% circa presenta sintomi emorragici rilevanti [2] e il 28% livelli di FIX:C <40% [38], configurando una vera e propria diagnosi di emofilia lieve, in base ai criteri definiti dalla *World Federation of Haemophilia* (*WFH*) [10]. Tuttavia, il valore rilevato dalla misura del FIX:C non è utilizzabile come criterio diagnostico. Come molte variabili biologiche, l'attività funzionale dei fattori della coagulazione si distribuisce, infatti, secondo un andamento normale o gaussiano, sia nella popolazione delle donne portatrici che delle non portatrici. Ne deriva una notevole sovrapposizione di valori tra le due curve e le portatrici possono presentare livelli plasmatici di FIX:C normali o solo lievemente ridotti. Non sono da sottovalutare, tuttavia, possibili variazioni del livello di FIX:C, in rapporto al metodo di misura utilizzato e cioè a seconda che si utilizzi il metodo coagulante OSA o il cromogenico. Tali discrepanze si osservano, in particolare, in pazienti con emofilia B lieve [9] e possono verificarsi anche per la misura dei livelli di FIX in donne portatrici. L'analisi molecolare rappresenta, pertanto, l'unico metodo in grado di definire con certezza lo stato di portatrice. Anche in donne che hanno una riduzione dell'attività del FIX, suggestiva della presenza di una variante, la condizione di portatrice deve, quindi, essere sempre confermata mediante lo studio molecolare. Inoltre, la possibilità di trasmissione della malattia deve essere attentamente valutata in base al tipo di emofilia,

sporadica o familiare, poiché ciò condiziona l'iter diagnostico molecolare e l'identificazione dei soggetti a rischio su cui condurre l'analisi molecolare.

Casi familiari

In circa due terzi dei casi di emofilia B, il probando appartiene a una famiglia in cui sono già noti uno o più soggetti affetti. In questo caso, l'emofilia viene definita “familiare” e il paziente eredita dalla madre portatrice la variante del gene *F9* responsabile della malattia. Dallo studio dell'albero genealogico si possono individuare quali siano le donne portatrici obbligate e quali a rischio di trasmissione della malattia. In queste ultime lo stato di portatrice deve essere confermato mediante ricerca della variante genica familiare presente negli individui affetti.

Casi sporadici

In circa un terzo dei casi non viene riferito alcun soggetto affetto da emofilia nella famiglia, ad eccezione del probando, indicato come “caso sporadico”. Nella maggior parte dei casi (70%) la madre è portatrice e ha ereditato la variante da uno dei genitori. Per determinare l'origine della variante nelle generazioni precedenti è, pertanto, necessario ricercarla nella madre e, se possibile nei nonni materni. Nel restante 30% dei casi sporadici, la madre risulta, invece, non portatrice per diverse cause biologiche³. Anche in questo caso, la donna deve essere considerata come potenzialmente portatrice e, pertanto, a rischio di trasmettere la malattia. È indicato, inoltre, confermare, con l'analisi molecolare, anche la condizione di portatrice obbligata delle figlie del caso sporadico, non vera in caso di mosaicismo nel padre affetto⁴ [39] e in caso di non paternità.

Approcci di analisi molecolare nel paziente emofilico B

L'analisi molecolare viene di norma condotta su DNA genomico estratto dai leucociti del sangue periferico. L'identificazione della variante genica causa della malattia può essere effettuata tramite un approccio indiretto che, tuttavia, è ormai quasi del tutto abbandonato, e mediante analisi diretta (sequenziamento *Sanger*) che si basa sulla ricerca della variante

³ Vedi, in seguito, sezione *Madre di un caso sporadico; per approfondimento, vedi Allegato 1 - Origine delle varianti e mosaicismo*.

⁴ Vedi *Allegato 1 - Origine delle varianti e mosaicismo*.

nel gene *F9* [40]. Oggi, il grande progresso delle metodiche di sequenziamento “ad alta processività” consente, infatti, di condurre l’analisi molecolare dell’intera sequenza genica in tempi estremamente rapidi e su un elevato numero di campioni contemporaneamente.

Le varianti del gene *F9* sono estremamente numerose ed eterogenee; il numero di possibili varianti è così elevato che quasi ogni famiglia ne possiede una propria non precedentemente descritta. Nel *database* internazionale delle mutazioni del gene *F9* [*EAHAD Factor IX Gene (F9) Variant Database*], aggiornato al febbraio 2020, vengono riportate 1244 varianti uniche identificate in 4713 individui affetti. Le varianti sono distribuite lungo tutto il gene *F9* in oltre il 70% dei 461 codoni della sequenza codificante [<https://f9-db.eahad.org>]. Esistono, tuttavia, deviazioni dall’eterogeneità allelica:

- sono presenti 21 dinucleotidi “CpG”, regioni del DNA dove una citosina si trova vicino ad una guanina nella sequenza lineare di basi, che rappresentano un *hotspot* mutazionale;
- presenza di varianti ricorrenti in individui apparentemente non correlati, secondaria a un “effetto fondatore”, per isolamento geografico o motivi religiosi o sociali. Le varianti dovute a questo processo si osservano per lo più in associazione a un fenotipo lieve e in soggetti provenienti da ambiti geografici specifici e ristretti [2,41]

Le varianti identificate nel gene *F9* appartengono a diverse classi:

- sostituzioni di un singolo nucleotide (*Single Nucleotide Variants, SNVs*) che rappresentano il 72% circa delle mutazioni riportate nel *EAHAD Factor IX Gene (F9) Variant Database (update online 02-2020)* e che si distinguono in: missenso, nonsenso, varianti che coinvolgono siti di *splicing*, varianti sinonime, polimorfismi sinonimi e non sinonimi;
- delezioni, duplicazioni/inserzioni di piccole dimensioni (<50 paia di basi); se la variante coinvolge 3 o un multiplo di 3 nucleotidi si verifica la conservazione del frame di lettura senza formazione di un codone di stop prematuro (variante *in frame*); se il numero di nucleotidi coinvolti non è 3 o multiplo di 3, la variante causa uno slittamento del frame di lettura che può portare alla comparsa di un codone di stop prematuro (variante *frameshift*);
- piccole inserzioni in combinazione con piccole delezioni (*delins*);
- delezioni, duplicazioni, inserzioni intermedie o *Copy Number Variations (CNVs)*, comprese tra 1Kb e 5Mb;

- ampi riarrangiamenti strutturali, attribuibili a delezioni di ampie porzioni del gene o dell'intero gene *F9* o delezioni o inserzioni di ampie regioni genomiche;
- rari riarrangiamenti grossolani, come traslocazioni bilanciate.

Differenti approcci metodologici vengono utilizzati per identificare le diverse varianti geniche:

- A) Analisi di varianti puntiformi, piccole delezioni/inserzioni/duplicazioni, delins
- B) Analisi di ampie delezioni o duplicazioni.

A) Analisi di varianti puntiformi, piccole delezioni, inserzioni, duplicazioni, delins

L'analisi molecolare per queste varianti viene di norma condotta sulle regioni codificanti (esoni) del gene *F9*, sul promotore, sulle regioni non tradotte, 5' e 3' *UTR* (*untranslated region*) e sulle regioni regolatorie note e prevede due approcci metodologici:

- sequenziamento diretto con metodo *Sanger* o Sequenziamento di nuova generazione - *Next Generation Sequencing* (NGS);
- metodiche di screening che identificano la regione interessata dalla variante, che viene successivamente caratterizzata mediante sequenziamento con metodo *Sanger*.

Sequenziamento diretto

La ridotta dimensione del gene *F9* (circa 2,8 Kb di sequenza codificante) consente di eseguire il sequenziamento diretto di tutti i frammenti potenzialmente interessati da varianti patologiche e di identificare gran parte dei difetti genetici. La variante responsabile potrebbe, tuttavia, essere localizzata in sequenze introniche o extrageniche a funzione regolatoria, non normalmente analizzate a fini diagnostici.

Il sequenziamento del gene *F9* può essere condotto con la metodica *Sanger* di prima generazione [42,43] o con le più recenti metodiche di seconda generazione, NGS⁵ [44].

Il sequenziamento diretto di *Sanger* rappresenta il metodo di eccellenza per l'identificazione di varianti che coinvolgono minime porzioni del gene (mutazioni puntiformi, *frameshift* etc.). Tuttavia, il sequenziamento NGS consente, potenzialmente, di rilevare anche ampie delezioni o duplicazioni, note come *CNVs*. Consente, inoltre, di analizzare molti geni contemporaneamente, con un elevatissimo rendimento e, generando in parallelo milioni di frammenti sottoposti a sequenziamento simultaneo, la sua elevata flessibilità diagnostica consente di estendere l'analisi alle regioni introniche del gene [45]. Questo potrebbe permettere l'identificazione della variante causa di malattia nei pazienti in cui le metodiche convenzionali non consentano di identificare alcuna variante. Tuttavia, anche la metodica

5 Vedi Allegato 2 - Sequenziamento diretto del DNA.

NGS presenta alcuni limiti. In particolare, in caso di analisi di regioni genomiche particolarmente ricche di sequenze CG o nel caso di ripetizioni da espansione. In questi casi il sequenziamento classico rimane, pertanto, il metodo di elezione.

Metodiche di screening

Le metodiche di screening sono: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)* [46], *Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)* [47], *Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE)* [41] e *Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)* [48]. Queste tecniche permettono di identificare il 90-95% circa delle varianti. Più recentemente, è stata introdotta una metodica nota come *High Resolution Melting (HRM)* [49,50]. Queste tecniche consentono di identificare il frammento genico in cui si presuppone sia presente la variante genica, sulla base di un profilo di migrazione elettroforetica, di eluizione cromatografica o di un profilo di *melting* diverso da quello di un controllo di riferimento. Per definire il tipo di variante genica è necessario caratterizzarla mediante sequenziamento diretto del frammento interessato. Queste metodiche di screening consentono, quindi, di ridurre il numero di regioni da sottoporre al sequenziamento diretto con minori costi e un *detection rate* del 95-98%.

B) Analisi di ampie delezioni o duplicazioni

Una ridotta proporzione di pazienti con emofilia B (2% circa) presenta delezioni parziali o complete del gene *F9* [2]. Per essi, quasi esclusivamente affetti da emofilia grave, viene riportato un rischio elevato di sviluppo di inibitore e sono state segnalate gravi reazioni anafilattiche e altri fenomeni allergici a seguito dell'esposizione a concentrati di FIX [22,51,52]. L'individuazione di tali pazienti si rende, perciò, quanto mai necessaria al fine di adottare le opportune misure di prevenzione di queste rare ma gravi complicanze [10,28]. Meno frequenti sono le ampie duplicazioni di uno o più esoni, probabilmente sottostimate in relazione alla necessità di utilizzo di tecnologie specifiche per l'analisi di CNVs e all'associazione a fenotipi moderati o lievi, con possibile mancata diagnosi della malattia [53].

La diagnostica molecolare di routine per l'emofilia si basa prevalentemente sulla *polymerase chain reaction (PCR)*; quindi, le ampie delezioni in un DNA emizigote possono essere sospettate in seguito all'assenza di prodotti di amplificazione delle regioni interessate dalla delezione, ma non vengono rilevate in un DNA eterozigote femminile per la presenza del

secondo allele non deleto. Ampie duplicazioni sfuggono, invece, all'analisi mediante *PCR* sia nel DNA emizigote che eterozigote.

La ricerca di ampie delezioni o duplicazioni nel genoma può essere eseguita mediante approcci diversi in base alla risoluzione della tecnica di analisi impiegata [54]:

- *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*, tecnica di facile applicazione e, quindi, largamente impiegata per l'emofilia B; consente di identificare sia ampie delezioni che estese duplicazioni tramite quantificazione relativa di specifiche sequenze geniche [55];
- analisi dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing, *WGS*), basato sull'uso di *array* (*Comparative Genomic Hybridization array - CGH array* o *Single Nucleotide Polymorphism - SNP array*) o sull'interpretazione informatica di dati raccolti con sequenziamento *NGS*;
- analisi di loci specifici (*targeted analysis*), basato su metodi quantitativi come *Quantitative PCR (qPCR)*, *Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments (QMPSF)*, *Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH)*.

Il risultato ottenuto dall'analisi con *MLPA* deve essere confermato con un'altra metodica. In particolare, in caso di delezione di un singolo esone al fine di escludere che si tratti di un falso positivo causato da varianti di sequenza che impediscono il corretto appaiamento delle sonde esoniche o dal fallimento della reazione catalizzata dell'enzima ligasi.

La conferma della presenza di *CNV* si ottiene con l'utilizzo di un approccio citogenetico molecolare o *CGH-array*. Tale metodica permette peraltro l'estensione dell'analisi anche alle regioni contigue al gene ed è raccomandabile in caso di delezione totale del gene. Sono infatti noti in letteratura casi in cui la delezione totale del gene *F9* si associa all'assenza di numerosi geni contigui a causa di grossolane delezioni interstiziali, che può correlare con disabilità intellettuale di vario grado, riconoscendo una vera '*contiguous gene syndrome*' [56].

Pazienti in cui non è possibile identificare la variante causa di malattia

Nei rari casi (<3%) in cui le indagini descritte non consentano di identificare la variante causa di malattia nel probando, è consigliabile confermare la diagnosi di emofilia B.

La mancata identificazione della variante causa di emofilia B è attribuibile a diverse ragioni [57]:

- posizione della variante nel gene;
- appropriatezza della tecnica di analisi molecolare utilizzata;
- mosaicismo.

Posizione della variante nel gene

Di norma vengono analizzate le regioni 5' *UTR*, 3' *UTR* e codificanti del gene, comprensive delle regioni introniche fiancheggianti gli esoni per l'analisi del sito di *splicing* convenzionalmente utilizzato. È noto, tuttavia, che la presenza di varianti introniche possa attivare siti criptici donatore o accettore di *splicing* che portano all'inclusione o esclusione di uno o più esoni e alla generazione di trascritti aberranti. Per identificare tali varianti, si possono utilizzare due approcci:

- l'analisi del DNA genomico con il sequenziamento dell'intero locus *F9*; a questo scopo, i frammenti di DNA, ottenuti mediante *Long Range PCR (LR-PCR)* saranno sequenziati con tecnologia *NGS*;
- l'analisi del trascritto con la metodica *Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)* che rappresenta il metodo più diretto per identificare tali varianti.

L'analisi effettuata tramite *NGS* permette di analizzare simultaneamente tutto il gene, identificando anche varianti introniche che potrebbero non essere rilevabili con *RT-PCR*, come quelle poste sulle sequenze di appaiamento dei *primers* di *RT*; in tal senso l'approccio con *NGS* supera i limiti metodologici della *RT-PCR*.

Appropriatezza della tecnica di analisi molecolare utilizzata

La natura eterogenea delle varianti del gene *F9* rende necessaria l'applicazione di un ampio spettro di approcci metodologici per identificare le varianti causa della malattia. Tuttavia, non tutti i laboratori diagnostici hanno a disposizione approcci metodologici complessi. Nel caso non si riuscisse a identificare la variante mediante l'uso delle tecniche a disposizione, nel referto rilasciato al paziente deve, perciò, essere precisata la possibilità di utilizzare altre metodiche, indicando in quali laboratori è possibile eseguire un'ulteriore analisi.

Le mutazioni puntiformi rappresentano la causa più frequente di varianti del gene *F9* e sono identificabili mediante sequenziamento. Tuttavia, non può essere esclusa la possibilità che la malattia sia causata da mutazioni meno frequenti che devono, quindi, essere

opportunamente ricercate. In presenza di ampie delezioni o duplicazioni il sequenziamento diretto di *Sanger* potrebbe non essere efficace, mentre il sequenziamento *NGS* potrebbe suggerire la loro presenza in quanto determina un cambiamento della “*read depth*”. È comunque raccomandabile l'utilizzo di tecniche specifiche per l'analisi di *CNV* come *MLPA* o *CGH array*. In caso di positività per tali varianti è anche possibile definirne, con precisione, l'estensione e identificare i punti di rottura [53].

Non va, inoltre, trascurata la possibilità che si verifichino grossolani riarrangiamenti cromosomici. In letteratura sono riportati, infatti, casi di donne portatrici di emofilia B che presentano traslocazioni bilanciate [58-60] e casi di pazienti o di portatrici che presentano grossolane delezioni interstiziali [56,61]. Questi ampi riarrangiamenti inter- o intra-cromosomici possono essere individuati mediante tecniche di citogenetica tradizionale o avanzata, come la *Fluorescent in Situ Hybridization (FISH)* o *CGH array*. Quest'ultima risulta di più rapida esecuzione e presenta una risoluzione più elevata, anche se non permette di rilevare traslocazioni cromosomiche bilanciate.

Non sono noti per il gene *F9* riarrangiamenti intracromosomici ma, in linea di principio, non si può escludere che possano avvenire. Tali riarrangiamenti non sono evidenziabili con gli approcci metodologici standard, basati sulla *PCR* tradizionale, ma richiedono l'applicazione di metodiche adeguate all'individuazione dei punti di rottura [57]. Un metodo convenzionale per individuare i punti di rottura intronici è l'amplificazione dell'intera regione genomica del gene *F9* usando una *Long Range PCR (LR-PCR)* in cui il locus in esame può essere amplificato in frammenti che si sovrappongono. L'assenza di amplificazione di un frammento atteso indica che esso contiene un punto di rottura che può essere caratterizzato con un approccio di *Inverse PCR* e successivo sequenziamento dell'amplificato ottenuto.

Mosaicismo

Sebbene le varianti che causano l'emofilia insorgano di solito nelle cellule germinali, una variante *de novo* potrebbe comparire durante l'embrionogenesi, generando nel paziente un mosaicismo germinale e/o somatico⁶. Qualora la variante fosse presente nelle cellule del fegato ma non nei leucociti, il soggetto sarebbe affetto da emofilia ma negativo ai test genetici condotti su DNA estratto da cellule del sangue periferico [57]. La variante potrebbe, quindi, essere identificata nelle eventuali figlie del paziente che potrebbero avere ereditato

⁶ vedi *Allegato 1 - Origine delle varianti e mosaicismo*.

il difetto, se presente nelle cellule germinali del padre. Il mosaicismo può, inoltre, spiegare l'assenza della variante genica nel sangue periferico di un caso sporadico.

Pazienti con varianti multiple

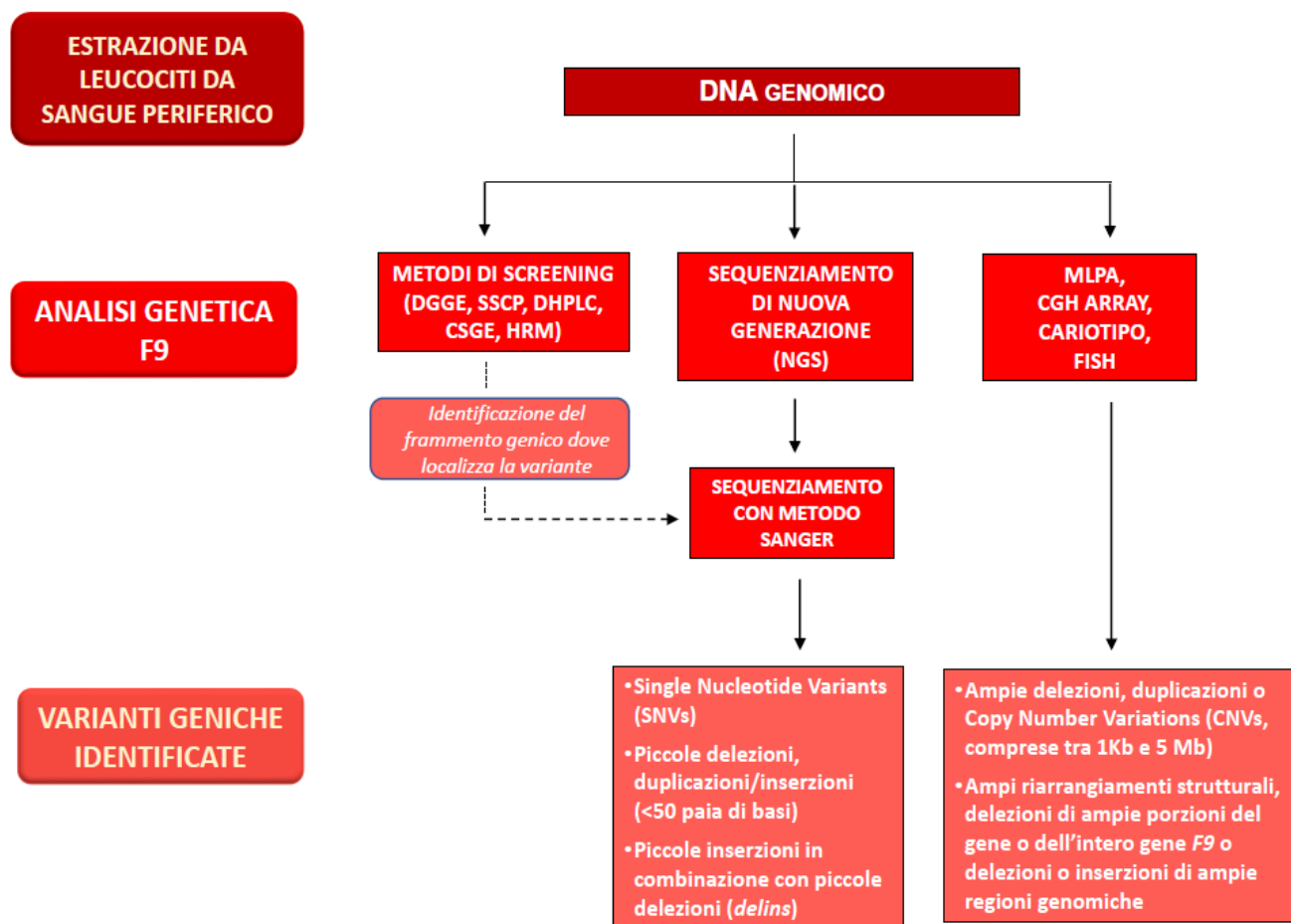
In pazienti con emofilia B non è raro il riscontro di più di una variante del gene *F9*, soprattutto se l'analisi viene condotta mediante metodica *NGS* [62] e, infatti, un gran numero di varianti multiple è riportato nel *EAHAD F9 Variant Database* e in letteratura [63, 64]. Inoltre, è possibile che vi sia una sottostima dei casi di varianti multiple [65] la cui causa è da attribuire al fatto che non tutti i laboratori conducono uno screening completo del gene *F9*, ma interrompono il sequenziamento una volta identificata una prima variante. In presenza di varianti multiple è, tuttavia, necessario valutarne il significato patogenetico, tanto più se esse non fossero chiaramente correlabili a casi di emofilia B clinicamente significativi e se non fossero mai state descritte precedentemente in letteratura. È infatti da tenere presente che in caso di varianti multiple, l'effetto potrebbe essere antagonistico, neutrale, parzialmente additivo, additivo o sinergico. La variabilità talvolta riscontrata tra i livelli di FIX:C in pazienti portatori di una stessa variante potrebbe essere giustificata dalla presenza di una seconda variante non riscontrata con le indagini molecolari eseguite, anche se una tale evenienza è stata ipotizzata ma non dimostrata [65]. La mancata individuazione nel paziente emofilico di varianti multiple può, in ogni caso, avere serie implicazioni pratiche portando a potenziali errori diagnostici sia nella determinazione dello stato di portatrice che nelle diagnosi prenatali.

Percorso di analisi molecolare nel paziente emofilico B

È consigliabile che il percorso diagnostico per il paziente con emofilia B sia strutturato seguendo un algoritmo ben definito (**Figura 4**) e condiviso tra i laboratori di Biologia molecolare che collaborano con i Centri Emofilia italiani aderenti all'AICE, in cui l'ordine di applicazione delle diverse tecnologie tenga conto della frequenza delle varianti [66, 67]:

- in prima linea *SNV*, piccole inserzioni, duplicazioni o delezioni nelle regioni esoniche, giunzioni introniche e regolatorie in 5' e 3';
- in seconda linea, in assenza di identificazione di variante, *CNV*.

Figura 4. Percorso di analisi molecolare per l'identificazione della variante causa di Emofilia B



È consigliabile inoltre:

- eseguire l'analisi dell'intera sequenza codificante del gene *F9*, evitando di interrompere la ricerca dopo aver identificato una prima variante in corso di sequenziamento *Sanger* o di screening;
- confermare la variante identificata su DNA estratto da un diverso prelievo di sangue del paziente;
- confermare la variante identificata ripetendo il test con la metodica originale oppure utilizzando una differente metodica, ad esempio sequenziamento *Sanger*, sia in direzione 5' (*forward*) che in direzione 3' (*reverse*), per confermare varianti puntiformi in *NGS* o tecniche in grado di analizzare il "*gene dosage*" per confermare CNV;
- considerare anche la possibilità di mosaicismo in caso di mancata individuazione di una variante nel DNA da sangue periferico;

- orientare verso altri laboratori che dispongano di test di indagine più avanzati, in caso il laboratorio coinvolto, in prima istanza, non sia in grado di fornire una diagnosi molecolare definitiva, considerando anche la possibilità che varianti introniche e riarrangiamenti grossolani siano identificabili mediante l'uso di approcci metodologici più evoluti e complessi o mediante indagini complementari di citogenetica che non rientrano nelle comuni prerogative dei laboratori di biologia molecolare;
- valutare la patogenicità di tutte le varianti identificate, soprattutto se vengono identificate varianti multiple.

Approcci di analisi molecolare nelle donne sospette portatrici

Donne a rischio di trasmissione

L'identificazione di una variante causa di emofilia B in un paziente affetto consente di effettuare la diagnosi di portatrice nelle donne dello stesso nucleo familiare precedentemente identificate, come soggetti a rischio, attraverso la costruzione dell'albero genealogico e la raccolta dei dati anamnestici individuali relativi a eventuali manifestazioni emorragiche. Entrambe queste valutazioni preliminari sono d'importanza cruciale.

La compilazione dell'albero genealogico, in particolare, deve essere la più precisa possibile coinvolgendo, se necessario, altri soggetti della famiglia, oltre al probando, che potrebbe non essere precisamente informato dell'esistenza di altri soggetti affetti nello stesso nucleo familiare. La raccolta di informazioni circa il fenotipo emorragico della donna, inoltre, dovrebbe essere condotta in maniera strutturata utilizzando un questionario specifico come il *Bleeding Assessment Tool (BAT)* [68]. Tale questionario è facilmente compilabile dalla stessa paziente e, per quanto non validato per l'uso in portatrici di emofilia, consente di acquisire informazioni sulla tipologia e la gravità delle manifestazioni emorragiche, compresi i sanguinamenti post-chirurgici. Le informazioni anamnestiche sono particolarmente rilevanti in caso non sia disponibile un caso indice della famiglia e in caso la misura dei livelli circolanti di FIX:C dia esito a valori più bassi del normale. Benché nelle donne portatrici i livelli di FIX:C siano estremamente variabili [38], la loro correlazione con la possibilità di manifestare eventi emorragici è notevole, soprattutto per valori <40% del normale, tanto da indurre la SCC della ISTH a definire una nuova nomenclatura per le donne portatrici di emofilia [69]. In essa le donne che presentano livelli di fattore carente <40% vengono

definite come affette da emofilia grave, moderata, lieve con gli stessi criteri utilizzati dalla WFH per i maschi [10]. Non di meno, considerando anche la variabilità dei risultati dei test di misura dei livelli di FIX:C a seconda del metodo utilizzato, è auspicabile che vengano condotti maggiori studi di correlazione tra livelli plasmatici di fattore carente, variante genica causa della malattia e sintomatologia emorragica.

L'analisi molecolare nelle donne sospette portatrici prevede il sequenziamento diretto del solo frammento in cui è stata identificata la variante genica della famiglia o analisi mediante metodica *MLPA* per la determinazione di ampie delezioni e duplicazioni geniche.

Se la variante non è ancora stata identificata, è necessario verificare l'esistenza di un probando su cui eseguire l'analisi molecolare. Nel caso non ci fosse alcun probando o il paziente non fosse disponibile, lo studio può essere condotto sulle donne portatrici obbligate, individuate durante la consulenza genetica. In assenza anche di portatrici obbligate, l'analisi molecolare va eseguita sulla donna richiedente l'analisi utilizzando il medesimo approccio. Se nella donna richiedente si individua una variante, è necessario stabilire se la stessa possa essere considerata causa della malattia. Al contrario, qualora non fosse possibile individuare alcuna variante, l'analisi non può essere conclusiva, non potendosi escludere che la variante sia non identificabile per i limiti già evidenziati.

Madre di un caso sporadico

Particolare attenzione deve essere prestata in caso si studi la famiglia di un caso sporadico⁷. In tal caso, è necessario cercare la variante causa della malattia nella madre dell'emofilico, di norma su DNA estratto da leucociti del sangue periferico, con implicazioni diverse riguardo al rischio di trasmissione qualora la madre non risultasse portatrice.

In caso il *test* molecolare evidenzia lo stato di portatrice della madre, possono essere formulate le seguenti ipotesi:

1) la madre ha ereditato il difetto:

- dalla propria madre (nonna del probando) che, a sua volta, potrebbe aver ereditato il difetto dalle generazioni precedenti oppure essere lei stessa la portatrice della variante *de novo*;
- dal padre, asintomatico che è quindi un mosaico della variante patogenetica anche se, in caso di emofilia lieve, dovrà essere verificato che egli non sia in realtà un emofilico sfuggito alla diagnosi a causa della scarsa sintomaticità della malattia.

⁷ vedi *Allegato 1 - Origine delle varianti e mosaicismo*.

2) la madre è portatrice di un difetto *de novo* originatosi:

- come variante germinale, comparsa in uno dei precursori dei gameti al suo concepimento e, pertanto, la variante è presente in tutti i suoi tessuti ed è quindi costituzionale;
- come variante somatica, originata nelle prime fasi dell'embriogenesi, dando luogo ad una forma di mosaicismo estremamente precoce, tanto da coinvolgere sia cellule somatiche che germinali.

Qualora il *test* molecolare evidenzia che la madre non è portatrice, si possono formulare le seguenti ipotesi:

- 1) il paziente ha una variante, comparsa nella cellula germinale materna (ovocita) al suo concepimento e rappresenta, quindi, un caso emblematico di soggetto con mutazione *de novo*.
- 2) la madre presenta un mosaicismo delle cellule germinali in alcune delle quali è presente la variante causa della malattia e da una di esse deriva il figlio affetto, mentre in altri ovociti la variante non è presente.

La discriminazione tra i due casi ha importanti implicazioni per eventuali successive gravidanze, a causa della possibile trasmissione ad altri figli maschi o dello stato di portatrice a figlie femmine. In ogni caso, è da segnalare che la probabilità di un mosaicismo germinale nella madre di un caso *de novo* è stata stimata del 20% circa [39]. In sede di consulenza genetica è, pertanto, necessario informare la donna di tale eventualità e invitarla a valutare di sottoporsi a diagnosi prenatale, onde meglio chiarire il dubbio, considerando anche altri aspetti, come la gravità dell'emofilia e i rischi, sia pur ridotti, di abortività legati a procedure invasive come la villocentesi.

Donne con ridotta attività coagulante del FIX:

Generalmente, le portatrici di emofilia B non presentano sintomi emorragici. Nel 10-15% dei casi, tuttavia, può essere presente una sintomatologia emorragica variabile per entità e frequenza, correlabile a ridotti livelli di FIX:C [38] o altri eventi [70], quali:

- la presenza di un secondo allele *F9* mutato o alterazioni cromosomiche (fenomeni genetici);
- fenomeni epigenetici come l'inattivazione preferenziale del cromosoma X su cui è presente l'allele *wild type* (l'ionizzazione sbilanciata).

Fenomeni genetici:

- doppia variante molecolare del gene *F9*, in omozigosi quando la stessa variante viene ereditata da entrambi i genitori, come può avvenire in caso di consanguineità, o in eterozigosi composta per la presenza di due varianti diverse, ciascuna ereditata da un genitore, oppure una ereditata da un genitore e l'altra comparsa come variante *de novo* o, ancora, per la comparsa di due varianti *de novo*;
- un'anomalia cromosomica numerica, come la sindrome di Turner 45,X0 [71], o la presenza di cariotipo maschile 46,XY con anomalie dello sviluppo sessuale (Sindrome di Morris o di Swyer) in cui, analogamente a quanto descritto per l'emofilia A, il soggetto con fenotipo femminile potrebbe presentare un solo cromosoma X su cui è presente l'allele *F9* mutato.

Fenomeni epigenetici:

L'inattivazione del cromosoma X o *lyonizzazione* [72,73] è un normale fenomeno epigenetico che si verifica precocemente nell'embriogenesi delle femmine di mammifero. Consiste nell'inattivazione di uno dei due cromosoma X per compensare l'effetto dovuto alla trascrizione dei geni presenti sul cromosoma X che nelle femmine (corredo cromosomico 46,XX) è doppia rispetto a quella dei maschi (46,XY). Il meccanismo, regolato dal Centro di Inattivazione (*X Inactivation Center, XIC*) localizzato in Xq13.2, modifica lo stato di metilazione del DNA e induce uno stato eteropicnotico o condensato della cromatina corrispondente al reperto citologico, noto come corpo di Barr. Tale modifica dell'espressione genica è stabilmente ereditata da tutte le cellule somatiche durante i successivi processi di mitosi, risultando in un'inattivazione clonale. Di norma, l'inattivazione si verifica in modo casuale dando luogo a un mosaico con conseguente presenza di due popolazioni cellulari che differiscono per cromosoma X inattivato [74]. Se l'inattivazione è "bilanciata", nel caso di una portatrice di emofilia B, ci sarà approssimativamente lo stesso numero di cellule con cromosoma X inattivato, indipendentemente dal fatto che su di esso sia presente il gene *F9 wild type* o mutato. L'attività FIX:C risulterà pari a circa la metà del normale, sufficiente a garantire il normale svolgimento del processo coagulativo. Qualora si verifichi, invece, un'inattivazione "sbilanciata" con prevalente inattivazione del cromosoma su cui è presente il gene *wild type*, la donna portatrice potrà presentare una ridotta attività FIX:C e esibire un fenotipo emorragico variabile per entità e frequenza, fino ad essere paragonabile a quello di maschi affetti da emofilia B.

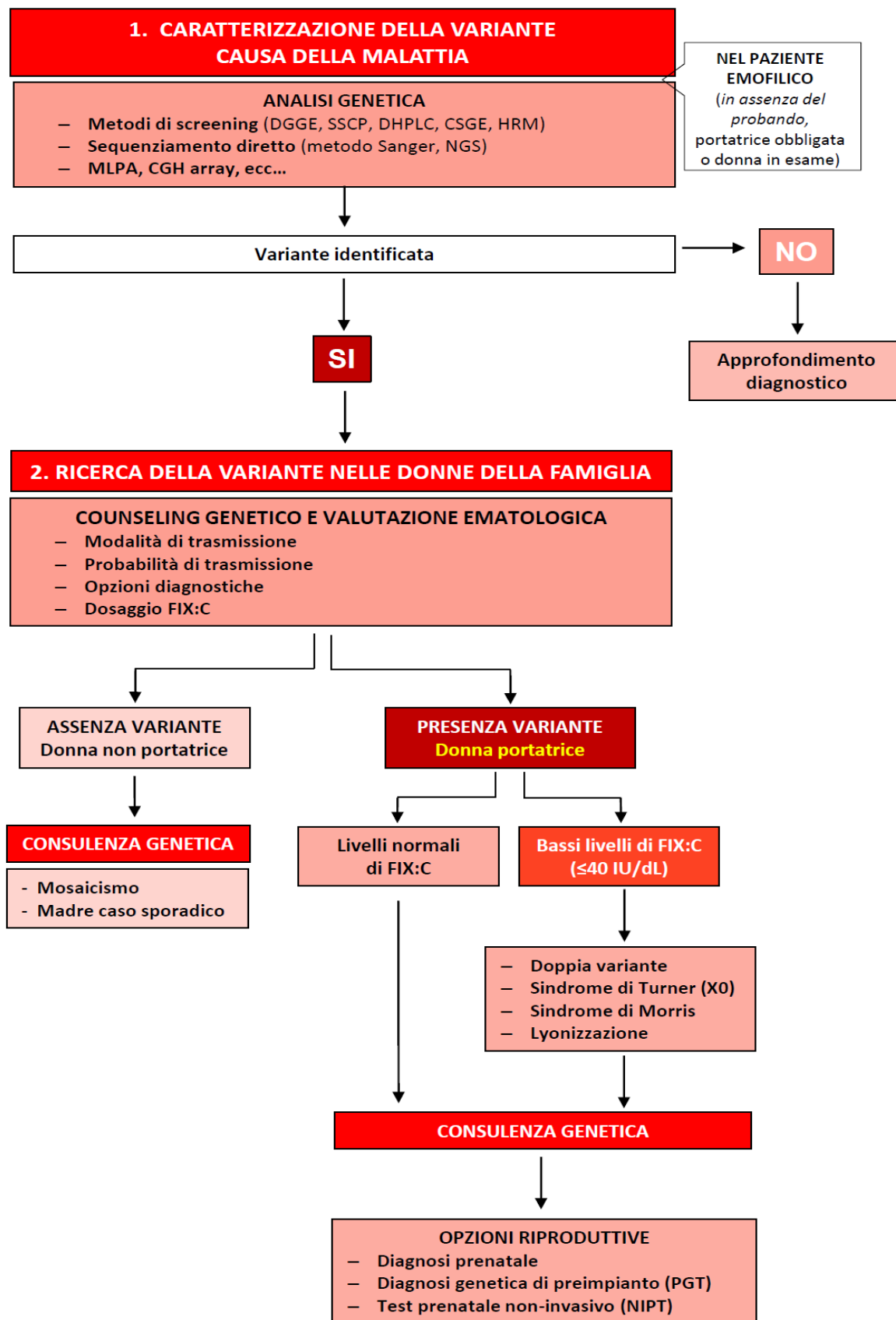
Per analizzare l'inattivazione del cromosoma X nella donna con ridotta attività FIX:C, i metodi di studio comunemente utilizzati si basano sullo stato di metilazione del DNA, attraverso l'indagine di loci genici multipli e test sensibili alla metilazione⁸. Altri approcci, più recenti, si basano su analisi di espressione dei geni localizzati sul cromosoma X e ottenuti mediante sequenziamento su larga scala del RNA [75-79].

Il percorso diagnostico per la donna correlata in linea materna con un paziente affetto da emofilia B o con ridotta attività FIX:C dovrebbe, dunque, essere strutturato come indicato nella **Figura 5**, seguendo un iter ben definito e condiviso tra i laboratori di Biologia molecolare che collaborano con i Centri Emofilia aderenti all'AICE.

Parte integrante di un tale percorso è anche la stretta collaborazione con gli specialisti del Centro Emofilia di riferimento della paziente e il Laboratorio di Coagulazione di riferimento del Centro cui spetta il compito di definire, con precisione, utilizzando i metodi diagnostici più appropriati, i livelli di FIX:C basali della donna. La collaborazione con i Centri è anche necessaria in quanto le donne portatrici di emofilia non sono sempre adeguatamente assistite, nonostante spesso presentino una sintomatologia emorragica non trascurabile. Queste considerazioni sono alla base della recente raccomandazione della SCC dell'ISTH [69] che prevede la definizione di emofilia B per le donne con livelli di FIX:C compresi tra <1 e ≤ 40 UI/dL con gli stessi criteri di classificazione per gravità applicati ai pazienti emofilici di sesso maschile. Ciò consente di includere le donne in modelli assistenziali sinora riservati ai soli pazienti maschi.

⁸ vedi *Allegato 4 - Lyonizzazione: studio della metilazione*.

Figura 5. Percorso di analisi molecolare per la diagnosi di portatrice di Emofilia B



Diagnosi prenatale

La diagnosi prenatale è consigliata alle donne portatrici di emofilia B grave e moderata. Tuttavia, a prescindere dalla gravità della malattia, precedenti esperienze negative di familiari affetti possono aver condizionato il vissuto della famiglia e determinare nella donna particolari condizioni di ansietà o stress. In questi casi è di cruciale importanza che tali aspetti emergano nel corso della consulenza genetica e siano affrontati con la dovuta attenzione richiedendo, se necessario, il contributo di uno psicologo. È di particolare importanza, in questi casi, l'intervento dello specialista del Centro Emofilia che, entrando nel merito della patologia, delle sue manifestazioni e delle opzioni terapeutiche, suggerisca se la diagnosi prenatale sia consigliabile o meno anche a portatrici di emofilia B lieve.

La diagnosi prenatale nelle donne portatrici di emofilia prevede, innanzitutto, l'identificazione del sesso del feto e la ricerca della variante genica causa di emofilia B nella famiglia. Preliminarmente, è inoltre opportuno confermare la presenza della variante già identificata su un nuovo campione di sangue periferico della donna. Il materiale fetale può essere ottenuto con metodiche invasive, come la villocentesi e l'amniocentesi, o con una metodica non invasiva *NIPT* (*Non Invasive Prenatal Test*), metodica di recente introduzione che offre il vantaggio di non comportare alcun rischio per il feto e che consente di determinare il sesso e altre anomalie cromosomiche, come le più comuni aneuploidie (trisomia 13, 18, 21 e aneuploidie dei cromosomi sessuali) per le quali l'accertamento potrebbe, comunque, essere pertinente in relazione all'età materna o altri fattori che emergano nel corso della consulenza genetica.

Dalla villocentesi, eseguibile tra la 10^a e la 12^a settimana di gestazione, o dall'amniocentesi, eseguibile tra la 15^a e la 18^a settimana, si ottengono cellule fetali di cui è possibile studiare l'assetto cromosomico, stabilire il sesso, estrarre il DNA fetale e eseguire la ricerca della variante genica causa di emofilia B già identificata nella famiglia e nella madre portatrice. Entrambe le procedure vengono generalmente praticate per via transaddominale, sotto stretto controllo ecografico, e presentano un rischio di abortività molto variabile (0.2-2% e 0.1-0.5% circa), rispettivamente per villocentesi e amniocentesi. Tali rischi sono inversamente correlati al numero di procedure effettuate dall'operatore e si riducono nei centri con elevata esperienza nell'esecuzione della procedura [80]. Sul campione fetale è, inoltre, necessario escludere la contaminazione da cellule materne (*Maternal Cell Contamination – MCC*) che potrebbe essere causa di errata diagnosi⁹.

⁹ vedi Allegato 5 - Test diagnostici in DPN.

Conclusioni

Le numerose tecniche di biologia molecolare oggi disponibili, sempre più raffinate, consentono di identificare la variante genica causa di emofilia B nella maggioranza dei casi. A questa segue la possibilità di identificare le donne portatrici della famiglia, aprendo la strada alla diagnosi prenatale e alla diagnosi genetica preimpianto (*Prenatal Genetic Testing, PGT*), qualora la donna voglia intraprendere questo percorso.

Allo stesso tempo, la precisa identificazione delle portatrici rappresenta il presupposto per riconoscere anche alle donne, qualora sintomatiche, possibilità di assistenza presso i Centri emofilia in maniera più strutturata che in passato. Le recenti raccomandazioni della ISTH vanno in questo senso e rappresentano un enorme passo in avanti sulla strada del riconoscimento di come anche le donne possano soffrire di manifestazioni emorragiche in maniera non dissimile dai maschi. Si tratta di superare differenze di genere che vedono i maschi principali obiettivo delle cure e delle forme assistenziali riservate all'emofilia. Non di meno, ulteriori studi sono necessari per chiarire meglio frequenza, tipologia e espressività del fenotipo emorragico nelle donne portatrici. Ciò è valido anche per le portatrici di emofilia A ma, per ciò che attiene alle donne carrier di emofilia B, tali studi rivestono ancora maggiore importanza, se si guarda a quanto è riportato in letteratura riguardo alle possibili differenze del fenotipo emorragico e del suo impatto in termini di complicanze artropatiche a lungo termine in emofilici A e B.

Un elenco completo dei Laboratori di Biologia Molecolare che eseguono diagnosi molecolare di Emofilia e diagnosi prenatale e che collaborano strettamente con i Centri AICE, nonché dei Centri pubblici e privati convenzionati che eseguono diagnosi pre-impianto, è disponibile alla pagina del sito AICE:

<https://aiceonline.org/wp-content/uploads/2020/10/Diagnosi-portatrice-prenatale-preimpianto-2020.pdf>

Bibliografia

1. Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merskey C. Christmas disease – a condition previously mistaken for haemophilia. *Br Med J* 1952; 2:1378–82.
2. Goodeve AC. Hemophilia B: molecular pathogenesis and mutation analysis. *J Thromb Haemost* 2015;13:1184-95.
3. Mannucci PM. Hemophilia therapy: the future has begun. *Haematologica* 2020;105:545-553.
4. Iorio A, Stonebraker JS, Chambost H, et al. Establishing the prevalence and prevalence at birth of hemophilia in males: a meta-analytic approach using national registries. *Ann Intern Med* 2019;171:540-6.
5. Franchini M, Mannucci PM. Modifiers of clinical phenotype in severe congenital hemophilia. *Thromb Res* 2017;156:60-4.
6. Nagel K, Walker I, Decker K, Chan AK, Pai MK. Comparing bleed frequency and factor concentrate use between haemophilia A and B patients. *Haemophilia* 2011; 17:872–4.
7. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, Manco-Johnson MJ, van Den Berg HM, Srivastava A, for the Subcommittee on Factor VIII, Factor IX and Rare Coagulation Disorders. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2014;12:1935–9.
8. Pouplard C, Trossaert M, LE Querrec A, Delahousse B, Giraudeau B, Gruel Y. Influence of Source of Phospholipids for APTT-based Factor IX Assays and Potential Consequences for the Diagnosis of Mild Haemophilia B. *Haemophilia* 2009;15:365-8.
9. Park CH, Seo JY, Kim HJ, Jang JH, Kim SH. A diagnostic challenge: mild hemophilia B with normal activated partial thromboplastin time. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010;21:368-71.
10. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia panelists and co-authors. *WFH Guidelines for the Management of Hemophilia*, 3rd edition. *Haemophilia* 2020;26 (Suppl 6):1-158.
11. Il Laboratorio di Emostasi nella gestione del paziente emofilico. A cura del Gruppo di Lavoro AICE Qualità dei Laboratori. Edizione luglio 2021. Disponibile alla pagina web: <https://aiceonline.org/?p=17617>. Accesso 25.09.2021.

12. Mannucci PM, Franchini M. Is haemophilia B less severe than haemophilia A? *Haemophilia* 2013;19: 499–502.
13. Melchiorre D, Linari S, Manetti M, et al. Clinical, instrumental, serological and histological findings suggest that hemophilia B may be less severe than hemophilia A. *Haematologica*. 2016;101:219-25.
14. Clausen N, Petrini P, Claeysens-Donadel S, Gouw SC, Liesner R, PedNet, Research of Determinants of Inhibitor Development Study Group. Similar bleeding phenotype in young children with haemophilia A or B: a cohort study. *Haemophilia* 2014;20:747–55.
15. Tagariello G, Iorio A, Santagostino E, et al. Italian Association Hemophilia Centre. Comparison of the rates of joint arthroplasty in patients with severe factor VIII and IX deficiency: an index of different clinical severity of the 2 coagulation disorders. *Blood* 2009;114:779–84.
16. Schulman S, Eelde A, Holmstrom M, Stahlberg G, Odeberg J, Blomback M. Validation of a composite score for clinical severity of hemophilia. *J Thromb Haemost* 2008;6:1113–21.
17. Belvini D, Salviato R, Radossi P, et al. AICE HB Study Group. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B. *Haematologica* 2005;90:635-42.
18. Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. *J Thromb Haemost* 2013;11:1329–40.
19. DiMichele D. Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention. *Br J Haematol* 2007;138:305–15.
20. Franchini M, Santoro C, Coppola A. Inhibitor incidence in previously untreated patients with severe haemophilia B: a systematic literature review. *Thromb Haemost* 2016;116:201-3.
21. Santoro C, Quintavalle G, Castaman G, et al. Inhibitors in hemophilia B. *Semin Thromb Hemost* 2018;44:578-89.
22. Male C, Andersson NG, Rafowicz A, et al. Inhibitor incidence in an unselected cohort of previously untreated patients with severe haemophilia B: a PedNet study. *Haematologica*. 2021;106:123-9.
23. Warrior I, Ewenstein BM, Koerper MA, et al. Factor IX inhibitors and anaphylaxis in hemophilia B. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;19:23–7.

24. Recht M, Pollmann H, Tagliaferri A, Musso R, Janco R, NeumaWR. A retrospective study to describe the incidence of moderate to severe allergic reactions to factor IX in subjects with haemophilia B. *Haemophilia* 2011;17:494–9.
25. Thorland EC, Drost JB, Lusher JM, et al. Anaphylactic response to factor IX replacement therapy in haemophilia B patients: complete gene deletions confer the highest risk. *Haemophilia* 1999;5:101–5.
26. High KA. Factor IX: molecular structure, epitopes, and mutations associated with inhibitor formation. *Adv Exp Med Biol* 1995;386:79–86.
27. Khodoun MV, Strait R, Armstrong L, Yanase N, Finkelman FD. Identification of markers that distinguish IgE- from IgG-mediated anaphylaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:12413–18.
28. Rocino A, Coppola A, Franchini M, Castaman G, Santoro C, Zanon E, Santagostino E, Morfini M; Italian Association of Haemophilia Centres (AICE) Working Party. Principles of treatment and update of recommendations for the management of haemophilia and congenital bleeding disorders in Italy. *Blood Transfus* 2014;12:575-98.
29. Ewenstein BM, Takemoto C, Warrier I, et al. Nephrotic syndrome as a complication of immune tolerance in hemophilia B. *Blood* 1997;89:1115–6.
30. Chitlur M, Warrier I, Rajpurkar M, Lusher JM. Inhibitors in factor IX deficiency a report of the ISTH-SSC international FIX inhibitor registry (1997-2006). *Haemophilia* 2009;15:1027–31.
31. Castaman G, Bonetti E, Messina M, et al; Italian Association of Hemophilia Centers. Haemophilia. Inhibitors in haemophilia B: the Italian experience. 2013;19:686-90.
32. Astermark J, Holstein K, Abajas YL et al. The B-Natural study-The outcome of immune tolerance induction therapy in patients with severe haemophilia B. *Haemophilia*. 2021;27:802-13.
33. Napolitano M, Mariani G, Lapecorella M. Hereditary combined deficiency of the vitamin K-dependent clotting factors. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:21.
34. Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 1985;24:3736-50.
35. Green PM, Montandon AJ, Bentley DR, Giannelli F. Genetics and molecular biology of haemophilias A and B. *Blood Coagul Fibrinol* 1991;2:539-65.

36. Veltkamp JJ, Meilof J, Remmelts HG, van der Vlerk D, Loeliger EA. Another genetic variant of haemophilia B: haemophilia B Leyden. *Scand J Haematol* 1970;7:82–90.
37. Lannoy N, Lambert C, Farrugia A, Van Damme A, Hermans C. Usual and unusual mutations in a cohort of Belgian patients with hemophilia B. *Thromb Res* 2017;149:25-28.
38. Plug I, Mauser-Bunschoten EP, Bröcker-Vriends AH, et al. Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood* 2006;108:52-6.
39. Lannoy N.H, Hermans C. Genetic mosaicism in haemophilia: a practical review to help evaluate the risk of transmitting the disease. *Haemophilia* 2020;26:375-83.
40. Goodeve AC. Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders. *Clin Lab Haematol* 1998;20:3-19.
41. Tagariello G, Belvini D, Salviato R, et al. The Italian haemophilia B mutation database: a tool for genetic counseling, carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Transfus* 2007;5:158-63.
42. Guo ZP, Yang LH, Qin XY, Liu XE, Chen JF, Zhang YF. Comprehensive analysis of phenotypes and genetics in 21 Chinese families with haemophilia B: characterization of five novel mutations. *Haemophilia* 2014;20:859-65.
43. Li T, Miller CH, Driggers J, Payne AB, Ellingsen D, Hooper WC. Mutation analysis of a cohort of US patients with hemophilia B. *Am J Hematol* 2014;89:375-9.
44. Huang L, Li L, Lin S et al. Molecular analysis of 76 Chinese hemophilia B pedigrees and the identification of 10 novel mutations. *Mol Genet Genomic Med* 2020;8:e1482.
45. Inaba H, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification of deep intronic individual variants in patients with hemophilia A by next-generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Res Pract Thromb Haemost* 2017;1:264–74.
46. Tartary M, Vidaud D, Piao Y, et al. Detection of a molecular defect in 40 of 44 patients with haemophilia B by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Br J Haematol* 1993;84:662-9.
47. Aguilar-Martinez P, Romey MC, Schved JF, Gris JC, Demaille J, Claustres M. Factor IX gene mutations causing haemophilia B: comparison of SSC screening versus systematic DNA sequencing and diagnostic applications. *Hum Genet* 1994;94:287-90.
48. Castaldo G, Nardiello P, Bellitti F, et al. Denaturing HPLC procedure for factor IX gene scanning. *Clin Chem* 2003;49:815-8.

49. Yu T, Dai J, Liu H, et al. Spectrum of F9 mutations in Chinese haemophilia B patients: identification of 20 novel mutations. *Pathology* 2012;44:342-7.
50. Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. High resolution melting for F9 gene mutation analysis in patients with haemophilia B. *Blood Transfus* 2019;17:72-82.
51. Miller CH, Benson J, Ellingsen D, et al. F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: correlation with history of inhibitor and race/ethnicity. *Hemophilia* 2012;18:375–82.
52. Radic CP, Rossetti LC, Abelleyro MM, et al. Assessment of the F9 genotype specific FIX inhibitor risks and characterisation of 10 novel severe F9 defects in the first molecular series of Argentinian patients with haemophilia B. *Thromb Haemost* 2013;109:24–33.
53. Xie X, Chen C, Liang Q, et al. Characterization of two large duplications of F9 associated with mild and severe haemophilia B, respectively. *Haemophilia* 2019;25:475-83.
54. Carson AR, Feuk L, Mohammed M, Scherer SW. Strategies for the detection of copy number and other structural variants in the human genome. *Hum Genomics* 2006;2:403-14.
55. Belvini D, Salviato R, Radossi P, Tagariello G. Multiplex ligation-dependent probe amplification as first mutation screening for large deletions and duplications in haemophilia. *Haemophilia* 2017;23: e124-32.
56. Jourdy Y, Chatron N, Carage ML, et al. Study of six patients with complete F9 deletion characterized by cytogenetic microarray: role of the SOX3 gene in intellectual disability. *Thromb Haemost* 2016;14:1988–93.
57. Pezeshkpoor B, Pavlova A, Oldenburg J, El-Maarri O. F8 genetic analysis strategies when standard approaches fail. *Hamostaseologie* 2014;34:167-73.
58. Schröder W, Poetsch M, Gazda H, et al. A de novo translocation 46,X,t(X;15) causing haemophilia B in a girl: a case report *Br J Haematol* 1998;100:750-7.
59. Krepisch-Santos AC, Carneiro JD, Svartman M, Bendit I, Odone-Filho V, Vianna-Morgante AM. Deletion of the factor IX gene as a result of translocation t(X;1) in a girl affected by haemophilia B. *Br J Haematol* 2001;113:616-20.
60. Di Paola J, Goldman T, Qian Q, Patil SR, Schutte BC. Breakpoint of a balanced translocation (X:14) (q27.1;q32.3) in a girl with severe hemophilia B maps proximal to the factor IX gene. *J Thromb Haemost* 2004;2:437-40.

61. Stoof SCM, Kersseboom R, de Vries FAT, Kruip MJHA, Kievit AJA, Leebeek FWG. Hemophilia B in a female with intellectual disability caused by a deletion of Xq26.3q28 encompassing the F9. *Mol Genet Genomic Med* 2018;6:1220-24.
62. Johnsen JM, Fletcher SN, Huston H, et al. Novel approach to genetic analysis and results in 3000 hemophilia patients enrolled in the My Life, Our Future initiative. *Blood Adv* 2017;1:824-34.
63. Ghosh K, Shetty S, Quadros L, Kulkarni B. Double mutations causing haemophilia B: a double whammy! *Br J Haematol* 2009;145:433-5.
64. Sexton A, Furmedge J, Barnes C, Cheetham G, Wallace J, Savarirayan R. Clinical significance of two mutations in the factor IX gene in a family with haemophilia B. *Haemophilia* 2010;16:223–5.
65. Shetty S, Bhavne M, Ghosh K. Challenges of multiple mutations in individual patients with haemophilia. *Eur J Haematol* 2011;86:185-90.
66. Payne AB, Bean CJ, Hooper WC, Miller CH. Utility of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for hemophilia mutation screening. *J Thromb Haemost* 2012;10:1951–4.
67. Bastida JM, González-Porras JR, Jiménez C, et al. Application of a molecular diagnostic algorithm for haemophilia A and B using next-generation sequencing of entire F8, F9 and VWF genes. *Thromb Haemost* 2017;117:66-74.
68. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC joint VWF and Perinatal/Pediatric Hemostasis Subcommittees Working Group. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010;8:2063-5.
69. van Galen KPM, d'Oiron R, James P, et al. A new hemophilia carrier nomenclature to define hemophilia in women and girls: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2021;19:1883-7.
70. Karimipoor M, Kokabee L, Kamali E, Karizi SZ, Zeinali S. Molecular analysis of factor IX gene in an Iranian female with severe hemophilia B. *Acta Haematol* 2008;119:151-3.
71. Kelsey G, Monagle P, Barnes C. Delayed diagnosis of congenital factor IX deficiency (Christmas disease) in a girl with Turner's Syndrome *Clin Lab Haematol* 2006;28:355-6.
72. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus*). *Nature* 1961;190:372–3.

73. Lyon MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet* 1962;14:135–48.
74. Kling S, Coffey AJ, Ljung R, et al. Moderate haemophilia B in a female carrier caused by preferential inactivation of the paternal X chromosome. *Eur J Haematol* 1991;47:257-61.
75. Espinós C, I Lorenzo J, Casaña P, Martínez F, Aznar JA. Haemophilia B in a female caused by skewed inactivation of the normal X-chromosome. *Haematologica* 2000;85:1092–5.
76. Okumura K, Fujimori Y, Takagi A, et al. Skewed X chromosome inactivation in fraternal female twins results in moderately severe and mild haemophilia B. *Haemophilia* 2008;14:1088-93.
77. Esquilin JM, Takemoto CM, Green NS. Female factor IX deficiency due to maternally inherited X-inactivation. *Clin Genet* 2012;82:583-6.
78. Sellner LN, Price PJ. Segmental isodisomy and skewed X-inactivation resulting in haemophilia B in a female. *Br J Haematol* 2005;131:410-1.
79. Shvetsova E, Sofronova A, Monajemi R, et al. BIOS consortium; GoNL consortium. Skewed X-inactivation is common in the general female population. *Eur J Hum Genet* 2019;27:455-65.
80. Ghi T, Sotiriadis A, Calda P, et al. International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG). ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;48:256-68.

Origine delle varianti e mosaicismo: valutazione del rischio di trasmissione

Una variante *de novo* può insorgere come errore genetico con conseguenze diverse a seconda della cellula coinvolta [1]:

- in caso la variante si generi durante la meiosi di una cellula germinale (gamete), tutte le cellule che ne derivano esprimeranno la variante; un maschio nato da quella cellula germinale sarà il primo individuo affetto da emofilia nella famiglia (caso sporadico) mentre una femmina sarà la prima portatrice di emofilia nella famiglia;
- in caso la variante si generi durante la mitosi di una cellula dello zigote, il soggetto sarà un mosaico.

A seconda dello stadio dell'embriogenesi in cui la variante compare possono verificarsi tre tipi di mosaicismo, con proporzioni variabili di cellule e tessuti coinvolti: qualora la variante si generi nelle prime fasi dell'embriogenesi, possono essere coinvolti molti tessuti e organi e sia cellule somatiche che germinali, dando luogo a un mosaicismo gonosomico; qualora la variante si generi in fasi più tardive dell'embriogenesi, potrebbero essere coinvolti pochi o un solo tessuto somatico, dando luogo a un mosaicismo somatico; in caso sia coinvolto il solo tessuto germinale, una proporzione variabile di gameti può presentare la variante, dando luogo a un mosaicismo germinale.

A seconda del sesso del soggetto interessato, i diversi tipi di mosaicismo comportano conseguenze diverse sulla potenziale trasmissione di un difetto genetico X-linked, come l'emofilia.

I maschi con mosaicismo gonosomico possono manifestare un ampio spettro di sintomi, espressione fenotipica dell'emofilia A o B, in relazione all'entità di cellule in cui la variante è presente e del tessuto o organo cui esse appartengono. Inoltre, se essa non fosse presente in tutti i gameti e una quota di essi non presentasse la variante genica, può venir meno la condizione di portatrice obbligata nella progenie femminile. Anche i maschi con mosaicismo somatico possono manifestare un ampio spettro di sintomi, espressione dell'emofilia, in relazione all'entità di cellule in cui la variante è presente e del tessuto o organo cui esse appartengono, ma non trasmettono la variante alla propria progenie, in quanto non presente nei gameti. Al contrario, i maschi con mosaicismo germinale sono asintomatici per

manifestazioni cliniche dell'emofilia, ma possono trasmetterla alla propria progenie, generando donne portatrici.

Le femmine con mosaicismo gonosomico possono essere sintomatiche se la variante è presente in una elevata proporzione di cellule epatiche (principale sede di sintesi del FVIII e FIX) e/o in associazione a lyonizzazione sbilanciata e possono trasmettere la variante alla propria progenie, a causa del coinvolgimento delle cellule germinali. Le femmine con mosaicismo somatico possono manifestare un ampio spettro di sintomi emorragici, legati all'emofilia, in relazione all'entità di cellule epatiche coinvolte e/o in associazione a lyonizzazione sbilanciata, ma non trasmettono la variante alla propria progenie, in quanto non presente nei loro gameti. Le femmine con mosaicismo germinale non presentano sintomi di malattia, in quanto le loro cellule epatiche non sono interessate dalla variante, ma possono trasmetterla alla loro progenie, sia maschi che femmine.

L'origine della variante nel caso sporadico può, quindi, essere associata a diversi meccanismi genetici:

- la variante patogenetica viene trasmessa alla progenie dalla madre portatrice che, a sua volta, può averla ereditata da uno dei genitori;
- la variante patogenetica *de novo* è insorta nel solo gamete da cui deriva il figlio maschio affetto oppure nel feto maschio in epoca post-zigotica e il soggetto emofilico è, di fatto, un mosaico;
- la variante patogenetica è comparsa nella madre il cui genotipo, in termini di proporzione di cellule/tessuti in cui è presente, può variare a seconda del momento di insorgenza e può essere interamente mutato, se la variante è insorta in un gamete (donna portatrice), o a mosaico, se la variante si è generata nello zigote; in questo caso, la donna può trasmettere la variante solo se il mosaicismo coinvolge il tessuto germinale.

Lannoy et al. hanno approfondito questo argomento traendo spunto da pubblicazioni sull'origine delle varianti in ampie casistiche di emofilia A e B o in singole famiglie con mosaicismo [2]. Gli autori sottolineano che nel 70% delle madri di casi sporadici l'analisi del DNA estratto dai leucociti evidenzia la presenza della variante causa della malattia. Esse sono, quindi, portatrici di una variante ereditata da uno dei genitori che possono trasmettere alla loro progenie. Nel restante 30% esse sono apparentemente non portatrici, in base all'analisi condotta sul DNA estratto dai leucociti. Il loro stato di portatrici può, tuttavia, essere

svelato mediante analisi del DNA estratto da tessuti diversi dal sangue periferico (epitelio buccale, bulbo pilifero, cellule uroteliali). Si delineano, pertanto, due diverse situazioni:

- la variante causa della malattia non è rilevabile (80% dei casi) in alcun tessuto analizzabile della madre (leucociti periferici o cellule derivate da altri tessuti); in tal caso è presumibile che la variante *de novo* sia comparsa nel gamete della madre al momento del concepimento o durante le prime fasi di sviluppo dell'embrione. In questo caso, la madre sarebbe teoricamente e probabilmente non portatrice di emofilia;
- la variante è presente in tessuti diversi dal sangue periferico (20% dei casi) e la madre risulta essere un mosaico; la variante potrebbe essere presente in tutti o in una porzione non quantificabile di gameti e, in tal caso, la donna potrebbe essere portatrice e a rischio di trasmettere il difetto alla propria progenie.

In corso di consulenza genetica rivolta a madri di casi sporadici, allo scopo di fornire risposte utili per future gravidanze sarebbe, pertanto, necessario discriminare tra le diverse situazioni descritte, conducendo opportune analisi genetiche su tessuti diversi dal sangue periferico e utilizzando metodiche e tecnologie quantitative ad elevata sensibilità. Il DNA può essere estratto da tessuti provenienti dal foglietto embrionale mesodermico e, in particolare da cellule dell'epitelio buccale, derivanti dal foglietto embrionale ectodermico, o da cellule uroteliali, proveniente dal foglietto embrionale endodermico, origine peraltro condivisa dalle cellule epatiche. Inoltre, tecniche di screening o di ricerca di varianti tradizionali come *Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*, *Heteroduplex Analysis (HA)*, *Denaturing High Performance Liquid Chromatography (dHPLC)* o sequenziamento *Sanger* non sono in grado di rilevare bassi livelli di *mosaicismo somatico*, in quanto non rilevano la presenza di DNA mutato in quantità inferiore al 10-20% del totale. A questo scopo sono da preferire tecniche quantitative più sensibili, come *quantitative PCR (qPCR)*, *Next Generation Sequencing (NGS)*, *droplet digital PCR (ddPCR)* [2], il cui utilizzo non è in genere, previsto nel percorso diagnostico standard condotto dalla maggior parte dei laboratori.

In assenza della possibilità di effettuare analisi più approfondite, la madre di un caso sporadico negativa per la variante identificata nel figlio emofilico affetto, in base all'analisi effettuata su DNA estratto da leucociti di sangue periferico, deve essere considerata a rischio di trasmissione e la diagnosi prenatale deve essere sempre proposta in caso di ulteriori gravidanze.

Inoltre, il mancato riscontro della variante causa di emofilia nel DNA estratto dai leucociti dei genitori di una donna portatrice può essere dovuto a mosaicismo. In tal caso, altre eventuali

sorelle della donna potrebbero aver ereditato il difetto in caso di mosaicismo gonosomico o germinale in uno dei genitori.

Alla luce di quanto esposto, in corso di consulenza è, dunque, necessario considerare la possibilità di presenza di un mosaicismo in caso l'analisi standard su leucociti da sangue periferico non abbia mostrato la presenza della variante causa di emofilia in soggetti in cui era attesa.

Bibliografia

1. Kasper CK, Buzin CH. Mosaics and haemophilia. *Haemophilia* 2009;15:1181-6.
2. Lannoy N., Hermans C. Genetic mosaicism in haemophilia: a practical review to help evaluate the risk of transmitting the disease. *Haemophilia* 2020;26:375-83:1-9.

Sequenziamento diretto del DNA

Metodo Sanger

Il sequenziamento diretto del DNA si basa sul metodo proposto da Frederick Sanger et al. nel 1977 [1], conosciuto anche come metodo della *terminazione della catena*. Il metodo prevede l'impiego di nucleotidi modificati, dideossinucleotidi (*ddNTPs*) che, mancando dell'ossidrilico (OH) in posizione 3' dello zucchero che li compone, impediscono l'attacco del nucleotide successivo, quando incorporati nella catena del DNA in corso di sintesi. Ciò comporta una terminazione della catena ogni volta che un *ddNTP* viene incorporato nel filamento polinucleotidico in crescita. La reazione di sequenziamento utilizza, come stampo, un singolo filamento precedentemente amplificato tramite reazione polimerasica a catena (*PCR*). Una breve sequenza nucleotidica (*primer*), complementare all'estremità del frammento di *PCR*, agisce come punto di partenza per la sintesi del filamento complementare ad opera di una DNA polimerasi termostabile. Tale enzima utilizza *dNTPs* convenzionali, presenti in miscela. Si assiste a una amplificazione lineare dei filamenti, raramente e casualmente interrotti. Statisticamente, si otterranno frammenti tronchi in numero pari alle basi corrispondenti rappresentate nel DNA analizzato. La dimensione dei frammenti interrotti corrisponde alla distanza tra l'inizio dell'oligonucleotide e la base terminante.

I metodi attuali di sequenziamento prevedono l'utilizzo di sequenziatori automatici in cui la marcatura di ciascun *ddNTP* (*ddATP*, *ddTTP*, *ddCTP* e *ddGTP*) avviene tramite l'utilizzo di fluorocromi in grado di essere eccitati a una specifica lunghezza d'onda e di emettere, successivamente, parte dell'energia assorbita sotto forma di luce visibile a lunghezza d'onda maggiore. Oggi, è quindi possibile allestire una singola reazione di sequenziamento con i quattro diversi *ddNTPs*, identificando le molecole tronche, in base a distinti segnali di fluorescenza. I segnali vengono registrati attraverso l'utilizzo di un sistema rilevatore che comporta l'uso di un computer per leggere la sequenza del DNA. I prodotti della reazione vengono caricati in un sistema di elettroforesi capillare (monocapillare o multicapillare) in cui i frammenti di DNA marcati con i diversi fluorocromi vengono sottoposti all'azione di un campo elettrico e, quindi, separati e ordinati in base al peso molecolare. Durante la migrazione elettroforetica, tali frammenti passano attraverso una finestra di lettura scannerizzata da un rilevatore laser che, in tempo reale, identifica il segnale fluorescente emesso da ciascun frammento; invia, poi, i relativi dati a un computer che elabora i segnali di posizione e intensità traducendoli in un tracciato elettroforetico in cui sono visibili picchi

diversamente colorati, espressione sull'asse delle ascisse delle posizioni nella sequenza e sulle ordinate della loro fluorescenza. L'area sottesa al picco è indice dell'intensità del segnale (proporzionale alla numerosità del singolo frammento terminato) e il colore del picco è indicativo della base del DNA che si trova in quella specifica posizione e che funge da terminatore (convenzionalmente, T rosso, G nero, C blu, A verde). Il software, in base al diverso segnale di fluorescenza, attribuisce la base C, G, T e A a ciascuna posizione o assegna una N, in caso di ambiguità. Al termine della corsa elettroforetica, vengono valutati sia i dati grezzi che il tracciato elettroforetico in toto, per stabilire la qualità del risultato.

Interpretazione del Sequenziamento secondo Sanger

L'identificazione della variante nella sequenza del campione di DNA da analizzare richiede il confronto con le sequenze di riferimento (wild type) del gene *F9*. Ciò avviene mediante l'utilizzo di un software di comparazione. La sequenza del campione ignoto (*Query*) ottenuta mediante metodo *Sanger* viene allineata con le sequenze di riferimento (*Subject - Sbjct*), utilizzando un software disponibile online, BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Un esempio di appaiamento mediante BLAST è visibile nella **Figura 1**.

Figura 1. Esempio di allineamento mediante l'utilizzo del software BLAST

Query	66	TGACTTAAATGAAATTTATTTTAATAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATAC	125
Sbjct	35760	TGACTTAAATGAAATTTATTTTAATAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATAC	35819
Query	126	AGAGCAAAAGC AAA ATGTGATTGCAATTATTCTCACCACAACCTACAATGCAGCTATTAA	185
Sbjct	35820	AGAGCAAAAGC AAA ATGTGATTGCAATTATTCTCACCACAACCTACAATGCAGCTATTAA	35879
Query	186	TAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACCTGGACGAACCCCTTAGTGCTAAACAGCTA	245
Sbjct	35880	TAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACCTGGACGAACCCCTTAGTGCTAAACAGCTA	35939
Query	246	CGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATC	305
Sbjct	35940	CGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATC	35999
Query	306	TGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCA	365
Sbjct	36000	TGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCA	36059

Sequenza Query del campione ignoto a confronto con sequenza Subject, rappresentata dalla sequenza NCBI Homo sapiens coagulation factor IX (*F9*), RefSeqGene (LRG_556) on chromosome X (ID: NG_007994.1): in evidenza il mancato appaiamento in posizione 35831, corrispondente alla variante NG_007994.1 g.35831G>A presente nel campione ignoto.

Next Generation Sequencing (NGS)

Dopo anni in cui il sequenziamento di Sanger ha rappresentato il gold standard per la diagnosi genetica mondiale, le tecniche di nuova generazione (*Next Generation Sequencing* – NGS, detta anche *second generation sequencing*) hanno preso il sopravvento. NGS è anche chiamata *high-throughput sequencing* (sequenziamento ad alta resa) perché, a differenza del sequenziamento tradizionale, mediante metodo *Sanger*, consente di sequenziare moltissimi frammenti in parallelo. Esistono diversi sistemi NGS, sviluppati e commercializzati da diversi produttori. Tutti condividono almeno tre tappe fondamentali: la preparazione e immobilizzazione del DNA (cioè la preparazione della cosiddetta libreria, *sequencing library*), la reazione di amplificazione e la reazione di sequenziamento.

Nel sequenziamento con NGS, il DNA da sequenziare viene impiegato per costruire una libreria di frammenti ciascuno dei quali, nella sua parte terminale, viene covalentemente legato, ad opera di una DNA ligasi, a sequenze di “DNA sintetico” denominate adattatori (*adapter*), sequenze universali e specifiche per ogni piattaforma analitica. La libreria di DNA, così realizzata, può essere amplificata ad opera di una polimerasi direttamente nello strumento di sequenza su superfici, opportunamente preparate, in grado di legare gli *adapter*. Questi piccoli frammenti fungono da stampo per la sintesi in parallelo di numerosi frammenti complementari (definite *reads*). Ogni piccolo frammento del DNA originario viene copiato numerose volte in un numero variabile di *reads*. A seconda del livello di precisione desiderato, è possibile calibrare il sistema per ottenere un certo livello di copertura (*coverage*), ossia un certo numero di *reads*, piuttosto che un altro. Con l’ausilio di un software, le sequenze di *reads* sono allineate con le sequenze di riferimento (*reference sequence*) annotate nei database ricomponendo, come in un *puzzle*, la sequenza del gene o del genoma del soggetto da analizzare. Ad oggi, sono disponibili sul mercato diversi software utilizzabili per diversi tipi di applicazioni, in base alla natura e all’ampiezza della porzione di genoma da analizzare per i seguenti scopi:

- Sequenziamento dell’intero genoma (*Whole-Genome Sequencing* –WGS);
- Sequenziamento dell’intero esoma (*Whole-Exome Sequencing* –WES);
- Sequenziamento mirato di pannelli di geni (*Targeted NGS testing* o *Panel NGS testing*).

Pur impiegando differenti sistemi di analisi è comune il seguente flusso di lavoro:

1. Frammentazione del DNA: il DNA estratto dal campione biologico (tessuto/cellule) da esaminare subisce un processo di frammentazione con l’obiettivo di generare frammenti casuali con estremità che si possano sovrapporre e di lunghezza variabile, compresa tra 150 e 600 paia di basi (bp), in relazione al *software* utilizzato e al tipo di applicazione

analitica che si intende impiegare, e che prevedono tre metodi per la frammentazione della catena degli acidi nucleici: fisico, enzimatico e chimico;

2. Legame degli adattatori: i frammenti di DNA sono convertiti in una libreria attraverso il legame chimico con specifiche sequenze sintetiche (*adapter* complementari a sequenze oligonucleotidiche presenti sulla piattaforma NGS);

3. Immobilizzazione: avviene mediante le sequenze *adapter* complementari a sequenze immobilizzate su una superficie solida (*microchips*, *microbiglie*, *pozzetti*) che rappresenta il supporto fisico della reazione di sequenza;

4. Amplificazione clonale: la maggior parte delle piattaforme richiede un'amplificazione del materiale di partenza per aumentare il segnale di rilevamento; ciò può essere ottenuto mediante l'impiego di varie metodiche di *PCR* (in emulsione o in soluzione), con la produzione di *cluster* di migliaia di molecole identiche;

5. Sequenziamento: costituisce la fase finale dell'intero processo e permette la composizione ordinata della sequenza; durante le fasi cicliche del processo viene immediatamente catturato il segnale (luminoso o elettrico) emesso a seguito dell'incorporazione dei nucleotidi; i segnali registrati corrispondono agli specifici nucleotidi incorporati da cui si ricava la sequenza *read*;

6. Analisi dei dati: rappresenta un complesso “processo di montaggio” attuato con l'ausilio di algoritmi bioinformatici ben strutturati e con l'impiego di software; nelle applicazioni configurate secondo la normativa CE-IVD l'interpretazione e l'elaborazione dei risultati avviene in modo automatico, con restituzione solo del risultato ottenuto e, in genere, senza ulteriore analisi da parte dell'operatore.

Descrizione e nomenclatura delle varianti

Ogni variante genica deve essere definita in modo accurato, standardizzato e condivisibile sulla base delle raccomandazioni a cura della *Human Genome Variation Society (HGVS)*, che ha precisamente indicato come descriverla e numerarla [2]. Accanto alla numerazione *HGVS* rimane in uso, per motivi storici, la precedente numerazione *Legacy*, dal momento che essa era largamente utilizzata nelle pubblicazioni prima dell'anno 2000.

Nella numerazione *HGVS* i codoni sono numerati a partire dal primo codone (+1), corrispondente al primo aminoacido tradotto, ovvero la metionina del peptide segnale, includendo, pertanto, i 46 aminoacidi del peptide segnale. Nella numerazione *Legacy* i codoni sono numerati a partire dal primo codone della proteina matura, che codifica per una tirosina (Tyr1), e differisce, pertanto, dalla *HGVS* per i 46 aminoacidi del peptide segnale.

Questi vengono, quindi, identificati con il segno negativo (-). La tabella 1 riporta alcuni esempi di conversione numerica dei codoni da una numerazione all'altra.

Devono sempre essere indicate le sequenze cui fa riferimento la numerazione [3]. Queste possono essere derivate dal *NCBI Reference Sequence Database (RefSeq)*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) con il numero della versione o dal database *Locus Reference Genomic (LRG)* (<http://www.lrg-sequence.org>) (Tabella 2).

Tabella 1. F9: esempi di numerazione della sequenza proteica HGVS versus Legacy

Aminoacido*	Nomenclatura HGVS	Nomenclatura Legacy	Conversione da HGVS a Legacy	Conversione da Legacy a HGVS
Metionina ¹	p.(Met1)	<i>p.(Met -46)</i>	p.(Met1) = <i>p.(Met - 46)</i>	<i>p.(Met -46)</i> = p.(Met1)
Tirosina ⁴⁷	p.(Tyr47)	<i>p.(Tyr 1)</i>	p.(Tyr47) -46 = <i>p.(Tyr 1)</i>	<i>p.(Tyr 1)</i> + 46 = p.(Tyr47)
Fenilalanina ⁵	p.(Phe55)	<i>p.(Phe 9)</i>	p.(Phe55) -46 = <i>p.(Phe 9)</i>	<i>(Phe 9)</i> + 46 = p.(Phe55)

* posizione nella sequenza aminoacidica comprendente il peptide segnale.

Tabella 2. Sequenze di riferimento derivate dal Database NCBI RefSeq e LRG

RefSeq	Livello	ID	Prefisso
	cromosomico	NC_000023.11 [genome build GRCh38/hg19]	g.
	genomico	NG_007994.x	g.
	cDNA	NM_000133.x	c.
	proteina	NP_000124.x	p.
LRG	CDNA	LRG_556t1	c.
	proteina	LRG_556p1	p.

Il prefisso “g.” si utilizza nella descrizione su sequenza genomica e la numerazione parte dal nucleotide 1 della sequenza di riferimento; il prefisso “c.” si utilizza nella descrizione su sequenza codificante e la numerazione deve considerare, come posizione 1, la A del codone ATG da cui ha inizio la traduzione; il prefisso “p.” si utilizza nella descrizione su sequenza proteica.

Sono disponibili diversi software che forniscono la corretta nomenclatura della variante individuata dall'allineamento, seguendo le linee guida *HGVS*, i più utilizzati sono:

Mutalyzer: (<https://mutalyzer.nl>)

VariantValidator (<https://VariantValidator.org>).

Bibliografia

1. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-7.
2. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 2016;37:564-9.
3. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24.

MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

La metodica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*, introdotta nel 2002 [1], è in grado di fornire una quantificazione relativa di specifiche sequenze cromosomiche con un test relativamente facile e di rapida esecuzione, applicabile alle malattie genetiche a patogenesi imputabile alle *Copy Number Variation (CNV)*. Queste sono generalmente definite come una variazione del numero di copie di un segmento di DNA di dimensioni comprese tra 1 Kb e 5 Mb, rispetto a un genoma di riferimento. Nel caso specifico dell'emofilia B, la metodica *MLPA* rende possibile, con un singolo test, l'identificazione di ampie delezioni o inserzioni/duplicazioni nel DNA di soggetti maschi e femmine.

Principi del metodo

Il DNA genomico viene denaturato e ibridato con una miscela di sonde specifiche per il gene *F9 (F9 probes)* e sonde di controllo complementari a diverse regioni, ritenute normali, sul cromosoma X o su diversi autosomi (*F7, F8 e reference probes*).

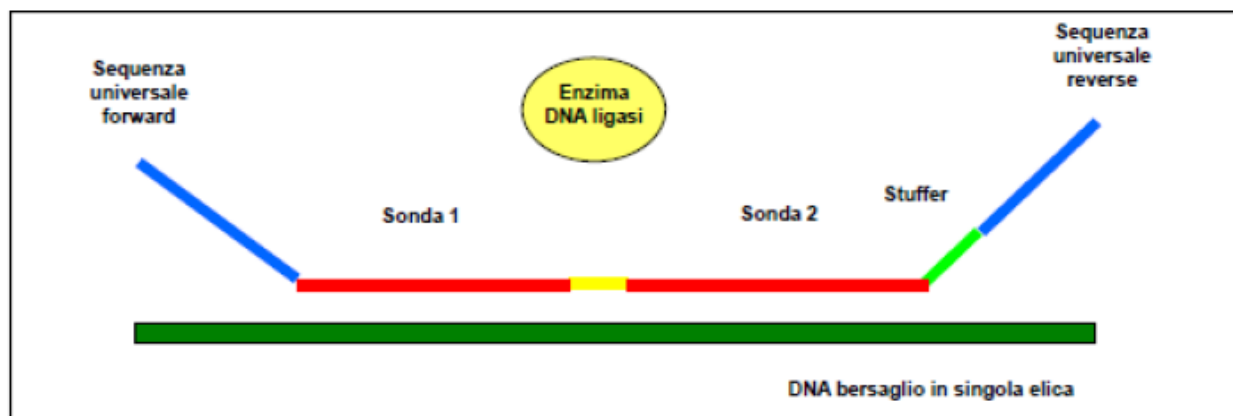
Ogni sonda è composta da due porzioni (**Figura 1**):

sonda 1: costituita da un oligonucleotide sintetico (20-30 nucleotidi) complementare al target, fiancheggiata da una sequenza universale *forward*;

sonda 2: oligonucleotide derivato dal vettore fagico M13, costituita da una sequenza specifica (25-45 nucleotidi) complementare al target, adiacente a quella riconosciuta dalla sonda 1 e fiancheggiata da una sequenza universale *reverse*; questa contiene un frammento a composizione casuale, di lunghezza variabile da 19 a 370 basi, noto come *stuffer*, aggiunto per generare frammenti di differenti lunghezze, tipiche per ogni miscela di sonde, che permette una risoluzione ottimale mediante elettroforesi capillare dei prodotti amplificati.

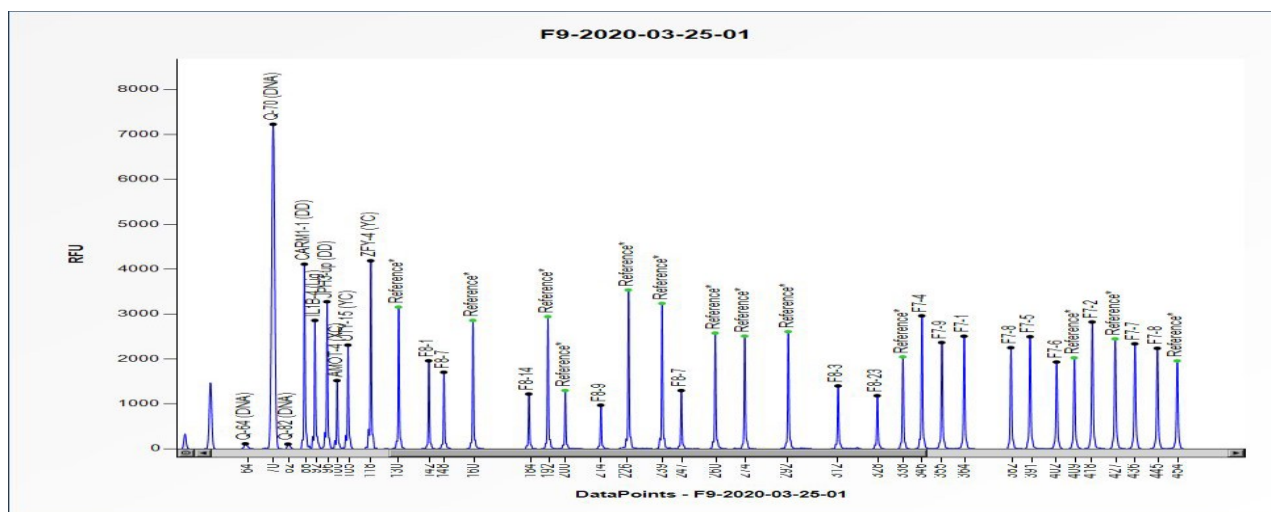
Dopo l'ibridazione in posizioni adiacenti delle due porzioni della sonda, queste ultime vengono unite dall'enzima ligasi (complessivamente la porzione ibridata è lunga 55-75 nucleotidi); solo se ciò avviene, per reale ibridazione in contiguità (assenza di delezione/duplicazione), potrà aver luogo l'amplificazione multiplex in fluorescenza, nella quale le intere sonde fungono da stampo (**Figura 1**). In ogni reazione, tutti i 38 frammenti (9, 7, 9 e 13 rispettivamente per i geni *F7, F8, F9* e di riferimento) vengono amplificati contemporaneamente con una singola coppia di *primer* (complementari alle sequenze universali delle sonde), rendendo la *Multiplex PCR* estremamente robusta.

Figura 1. Funzionamento del test e struttura delle sonde.



Si crea, così, una miscela di sonde amplificate in misura esponenziale, diverse per sequenza (porzioni adiacenti della sonda sequenza-specifica) e dimensione. La quantità di sonda appaiata è proporzionale al numero di copie del DNA bersaglio. Le dimensioni delle sonde amplificate sono diverse in virtù della presenza dello *stuffer* di lunghezza variabile; i frammenti sono evidenziabili mediante elettroforesi capillare, che fornisce un profilo di picchi di fluorescenza frammento-specifici (**Figura 2**). Gli amplificati delle sonde (*F9* e *reference probes*) sono costituiti da 130-480 nucleotidi circa.

Figura 2. Profilo elettroforetico capillare delle sonde amplificate (elettroferogramma).



Intensità del segnale, corrispondente all'altezza del picco di fluorescenza (Unità RFU in ordinata) in funzione della dimensione della sonda (in ascissa).

Analisi dei risultati

La separazione mediante elettroforesi capillare evidenzia un profilo di fluorescenza o elettroferogramma¹⁰ in cui:

- il numero delle sonde (picchi blu del tracciato elettroforetico) corrisponde al numero di sequenze bersaglio presenti nel DNA genomico analizzato;
- la posizione dei picchi è indicativa della dimensione delle sonde;
- la misura dei segnali di fluorescenza delle sonde (altezza o area dei picchi) è proporzionale alla quantità di sequenze bersaglio.

Per l'emofilia B, patologia *X-linked*, il risultato atteso dipende dal numero di cromosomi X e, quindi, dal sesso del soggetto in esame. È necessario utilizzare campioni di controllo (*reference samples*) noti per assenza di delezioni/duplicazioni, provenienti da individui dello stesso sesso.

Maschio affetto, emizigote per cromosoma X (*reference samples* di sesso maschile):

la delezione di uno o più frammenti risulta in una completa assenza del prodotto di amplificazione e, quindi, del picco di fluorescenza corrispondente alle sequenze delete;

la duplicazione di uno o più frammenti risulta visibile come un aumento relativo dell'area e/o dell'altezza del picco di fluorescenza delle sonde corrispondenti alle sequenze duplicate;

Donna in esame, due cromosomi X (*reference samples* di sesso femminile):

la delezione di uno o più frammenti risulta in una riduzione del 35-50% dell'area e dell'altezza del picco di fluorescenza delle sonde corrispondenti alle sequenze delete;

la duplicazione di uno o più frammenti risulta visibile come un aumento relativo dell'area e dell'altezza del picco di fluorescenza delle sonde corrispondenti alle sequenze duplicate.

I dati ottenuti dall'elettroferogramma sono raccolti in file con estensione *.fsa*, la cui analisi viene effettuata utilizzando il *software* Coffalyser.Net (MRC Holland) [2].

L'analisi prevede fasi di normalizzazione il cui esito viene espresso dal calcolo della *ratio* finale per ciascuna sonda (**Figura 3 e 4**), che consente di riconoscere duplicazioni e delezioni (**Tabella 1**). I valori dei limiti arbitrari 0.7 (linea rossa in Figura 3 e 4) e 1.3 (linea blu in Figura 3 e 4) si discostano dai teorici (rispettivamente, 0.5 e 1.5) in relazione alla variabilità dell'esperimento.

¹⁰ Vedi figura 2

Figura 3. Copy number ratio di un campione dopo normalizzazione eseguita da Coffalyser.Net. Campione di paziente con emofilia B con delezione dell'intero gene F9 (ratio 0).

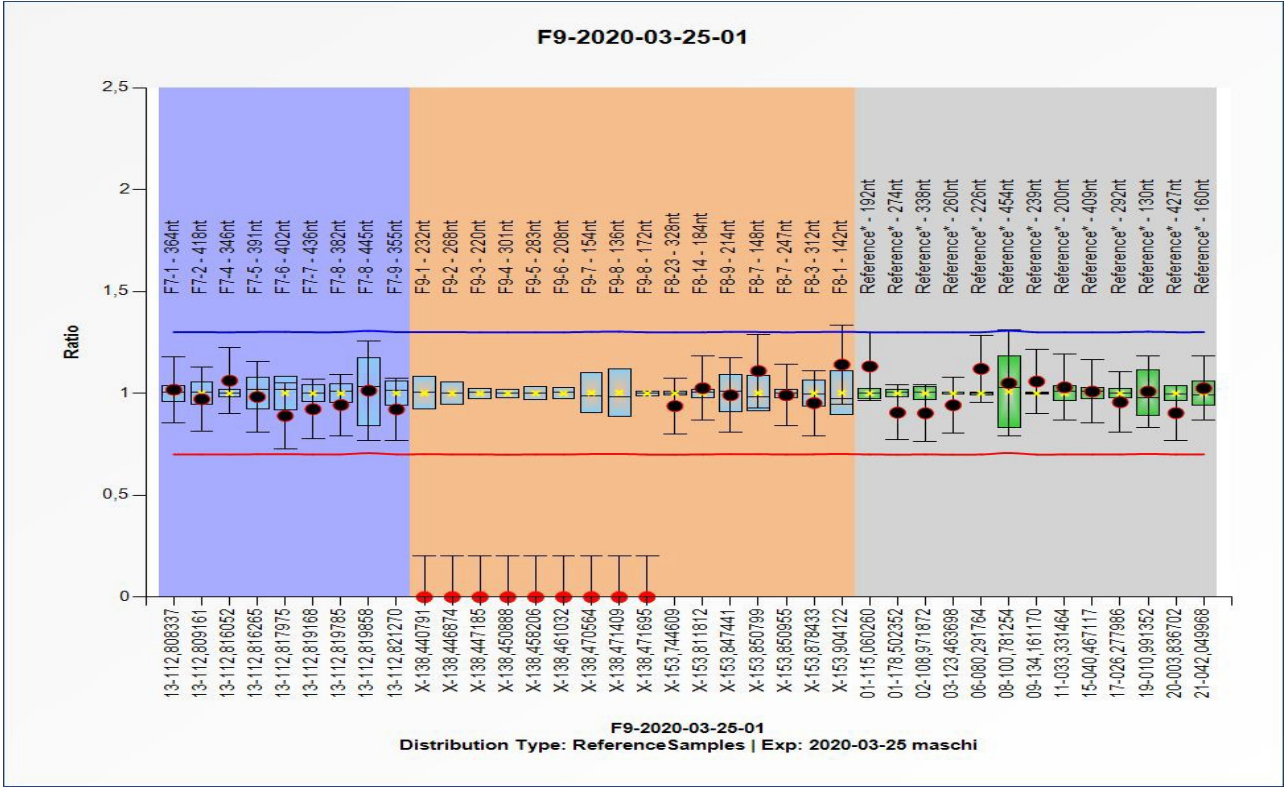


Figura 4. Copy number ratio di un campione dopo normalizzazione eseguita da Coffalyser.Net. Campione di donna portatrice eterozigote per delezione dell'intero gene F9 (ratio 0,5).

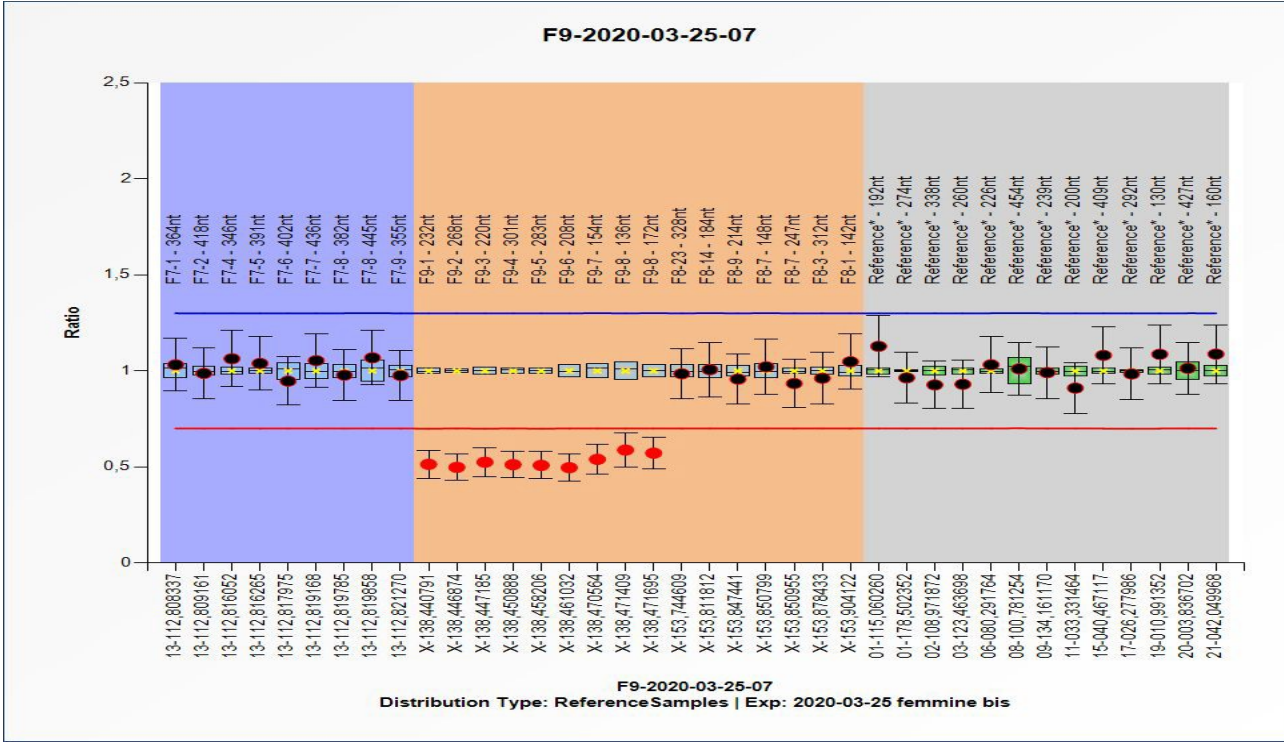


Tabella 1. Ratio finali confrontate ai valori teorici attesi per maschio e femmina per differenti condizioni genetiche (delezione, normalità, duplicazione)

	Probe ratio	Maschio in esame	Femmina in esame
Delezione	<0,7	0	0,5
Normalità	0,7 – 1,3	1	1
Duplicazione	>1,3	2	1,5

Bibliografia

1. Shouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 2002; 30:e57.
2. Coffa J, van den Berg J. Analysis of MLPA Data Using Novel Software Coffalyser.NET by MRC-Holland, 2011, Modern Approaches To Quality Control, Dr. Ahmed Badr Eldin (Ed.), ISBN: 978-953-307-971-4, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/modern-approaches-to-quality-control/analysis-ofmlpa-data-using-novel-software-coffalyser-net-by-mrc-holland>.

Lyonizzazione: Studio della metilazione

Introduzione

Nelle donne portatrici di una variante dei geni *F8* o *F9*, i bassi livelli dell'attività coagulante del FVIII o FIX, possono essere dovuti al fenomeno epigenetico della *lyonizzazione*. Nei primi stadi dello sviluppo embrionale, uno dei due cromosomi X viene inattivato in modo casuale, indipendentemente dalla sua origine materna o paterna. Il processo comporta il silenziamento trascrizionale di uno dei due cromosomi X e avviene sotto il controllo di una regione XIC (Centro di Inattivazione del Cromosoma X), situata anch'essa sul cromosoma X in posizione Xq12-q13. In questa regione sono presenti più loci: *XIST* (*X Inactive Specific Transcript*) e *TSIX* (*TSIX Transcript, XIST Antisense RNA*). Il prodotto di *XIST* regola il centro di inattivazione dell'X, silenziando il cromosoma X su cui è localizzato. Sul cromosoma X attivo, il gene *TSIX* esprime un trascritto antisenso non codificante che, con meccanismi non ancora chiariti, non permette l'espressione del gene *XIST*, lasciando così attivo il cromosoma X.

Di norma, il silenziamento del cromosoma di origine materna o di origine paterna risulta bilanciato (*lyonizzazione bilanciata*) comportando l'inattivazione del cromosoma materno nel 50% delle cellule e del cromosoma di origine paterna nel restante 50%. È stato tuttavia, osservato che nel 10% circa delle femmine dei mammiferi il silenziamento può coinvolgere, preferenzialmente, uno dei due cromosomi X in tutte le linee cellulari somatiche, determinando una *lyonizzazione parzialmente o totalmente sbilanciata*, nel caso estremo in cui venga preferenzialmente inattivato lo stesso cromosoma X, sia esso di origine paterna o materna.

La *lyonizzazione sbilanciata* può essere alla base delle manifestazioni cliniche di donne portatrici di patologie *X-linked* recessive, come l'emofilia, qualora il processo di inattivazione coinvolga preferenzialmente il cromosoma su cui non è presente la variante genica causa di malattia. In queste donne è particolarmente importante eseguire studi molecolari di metilazione che permettano di evidenziare lo stato di inattivazione dei cromosomi X nel tentativo di capire il meccanismo sottinteso alle manifestazioni cliniche dell'emofilia,

sebbene deve sempre considerarsi che il fenotipo emorragico dell'emofilia può essere influenzato da altri fattori che prescindono dalla variante genica causa della malattia.

Principi del metodo di studio della metilazione

Lo stato di inattivazione risulta generalmente associato ad uno stato di ipermetilazione della citosina dei siti *CpG*. I metodi di studio più frequentemente utilizzati si basano, sullo stato di metilazione delle regioni *CpG* nel promotore di geni *X-linked* [1] che essendo anche altamente polimorfici permettono di discriminare il cromosoma paterno da quello materno. I locus usati per l'analisi di metilazione comprendono il gene del recettore degli androgeni (*AR* o *HUMARA*) e i loci *ZDHHC15*, *SLITRK4* e *PCSK1N* [2]. Questi loci presentano, infatti:

- specifici siti di taglio per gli enzimi di restrizione *HpaII* e *HhaI* che sono sensibili alle citosine metilate nei siti *CpG*; l'enzima è attivo su residui di citosina non metilata e non su residui di citosina metilata;
- regioni altamente polimorfiche dovute alla presenza di triplette CAG ripetute in numero variabile [3] e, pertanto, utili per l'attribuzione dell'origine paterna o materna dei cromosomi X.

Lo studio molecolare prevede:

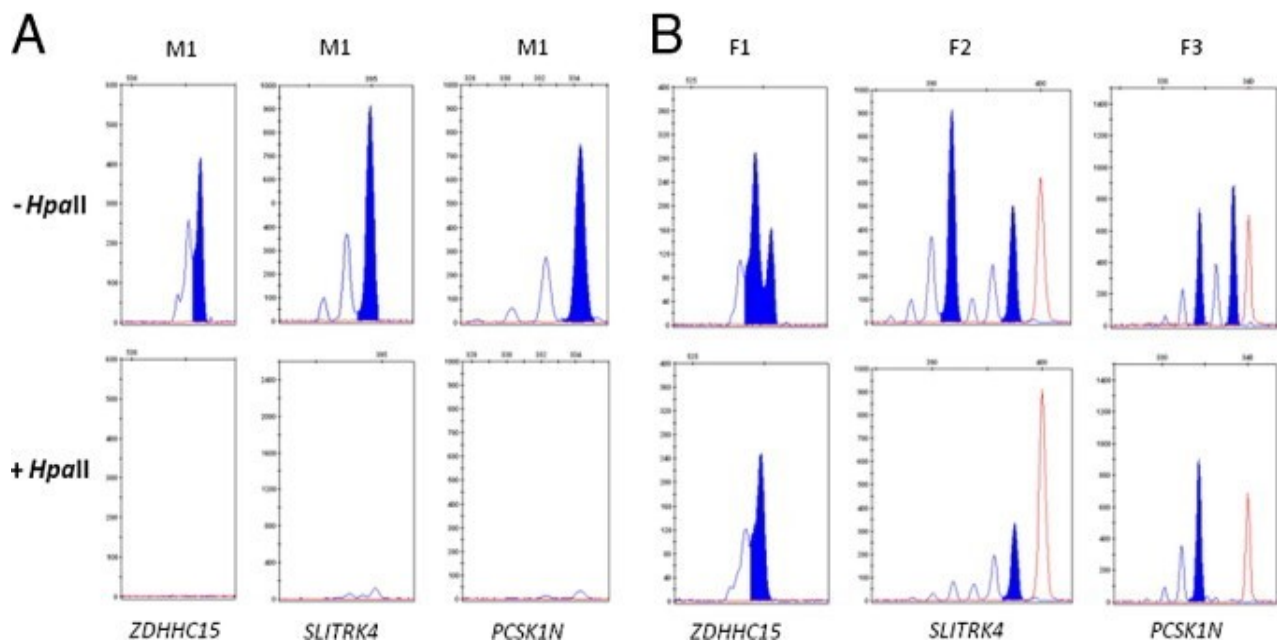
- estrazione del DNA genomico da sangue periferico utilizzando una metodica che permetta di ricavare frammenti di DNA ad alto peso molecolare;
- digestione con gli enzimi di restrizione *HpaII* e *HhaI*;
- amplificazione in doppio delle 4 regioni d'interesse (*AR/HUMARA*, *ZDHHC15*, *SLITRK4* e *PCSK1N*), utilizzando DNA genomico non digerito e DNA genomico digerito; per ciascuna regione il *primer forward* è marcato con un fluorocromo; le condizioni di *PCR* ed i *primer* sono state precisamente standardizzate [2]. La corretta amplificazione viene verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio;
- i frammenti amplificati sono analizzati su sequenziatore automatico, utilizzando il software "GeneMapper" o software simili;
- in presenza di metilazione dei residui di citosina (cromosoma inattivo), l'enzima non è in grado di tagliare il DNA fornendo, così, una regione integra da amplificare con *primer* specifici;

- in assenza di metilazione dei residui di citosina (cromosoma attivo), l'enzima sarà in grado di riconoscere il sito di taglio impedendo una corretta amplificazione del locus di interesse.

Analisi dei risultati

L'analisi è effettuata su campioni di DNA digeriti e non digeriti con gli enzimi metilazione sensibili. Per discriminare il cromosoma X di derivazione paterna da quello di origine materna è essenziale che la donna sia eterozigote per almeno uno dei loci analizzati. Lo stato di eterozigosi si evince dal tracciato elettroforetico del DNA non digerito (-*HpaII*), in base alla presenza di 2 picchi delle dimensioni dei frammenti attesi (**Figura 1, pannello B**).

Figura 1. Analisi dei frammenti dei loci ZDHHC15, SLITRK4 e PCSK1N



A: Maschio, il cromosoma X attivo non è metilato e quindi è tagliato dall'enzima *HpaII*. Nella reazione con DNA digerito (+*HpaII*, parte inferiore) il picco blu dell'amplificato non è visibile mentre è presente nel campione non digerito (-*HpaII*); **B:** Femmine eterozigoti, sono presenti due picchi blu nel DNA non digerito (-*HpaII*, parte superiore), un solo picco blu nel DNA digerito (+*HpaII*, parte inferiore) indicando una inattivazione completamente sbilanciata.

In caso di *lyonizzazione bilanciata*, entrambi i cromosomi X hanno un grado di metilazione simile e l'enzima *HpaII* taglierà in modo equivalente il DNA di entrambi i cromosomi X; nel tracciato elettroforetico sono evidenti entrambi i picchi e il *pattern* è simile nelle reazioni con DNA digerito e non digerito.

In caso di *lyonizzazione sbilanciata*, nel campione di DNA digerito con HpaII (+HpaII) sarà presente un solo picco, dovuto al diverso grado di metilazione dei due cromosomi X; nel tracciato elettroforetico sono evidenti due picchi nel campione di DNA non digerito e un solo picco in quello digerito corrispondente al cromosoma non metilato ed attivo (Figura 1B).

Bibliografia

1. Salstrom JL. X inactivation and the dynamic maintenance of gene silencing. Mol Genet Metab 2007;92:56-62.
2. Bertelsen B, Tümer Z, Ravn K. Three new loci for determining X chromosome inactivation patterns. J of Molecular Diagnostics 2011;13:537-40.
3. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen receptor gene correlates with X chromosome inactivation. Am J Hum Genet 1992, 51:1229-39.

Test diagnostici per la Diagnosi Prenatale

Cariotipo: metodica classica

L'approccio diagnostico di routine per la ricerca di anomalie cromosomiche e la determinazione del sesso del nascituro prevede un prelievo di cellule di origine fetale mediante villocentesi o amniocentesi. Il cariotipo viene determinato mediante analisi al microscopio dei cromosomi metafasici nelle cellule provenienti da liquido amniotico o dai villi coriali messe in coltura. Le colture cellulari richiedono lunghi tempi di attesa che si aggirano intorno ai 15-20 giorni.

Comparative Genomic Hybridization Array (Array-CGH): cariotipo molecolare

Grazie ai recenti progressi della citogenetica molecolare è possibile esaminare i cromosomi in maniera più approfondita e accurata, utilizzando il cosiddetto *cariotipo molecolare*, procedura diagnostica che impiega una tecnica innovativa conosciuta come *Array-CGH* o ibridazione genomica comparativa su *microarray* (*Array - Comparative Genomic Hybridization*). Tale tecnica è stata sviluppata per identificare anomalie cromosomiche di tipo numerico (aneuploidie) a carico degli autosomi e dei cromosomi sessuali (X e Y) o anche variazioni di piccole porzioni cromosomiche, come delezioni o duplicazioni/amplificazioni (*Copy Number Variation, CNV*). La metodica si basa sulla comparazione quantitativa del DNA in esame e di un DNA di riferimento proveniente da un soggetto sano (*reference DNA*). Consente di determinare il sesso del nascituro e di valutare, contemporaneamente, la presenza di eventuali anomalie cromosomiche. Rispetto ad altre metodiche, il suo impiego richiede tempi più brevi con una risoluzione di circa 100 volte più elevata, permettendo di individuare anomalie che, normalmente, potrebbero non essere rilevate con la metodica di citogenetica classica. Permette, inoltre, di definire esattamente la regione genomica alterata e i geni in essa contenuti, migliorando la comprensione delle relazioni tra anomalie cromosomiche e sviluppo di specifiche patologie. Non è in grado, tuttavia, di porre in evidenza traslocazioni cromosomiche bilanciate, per le quali l'analisi citogenetica classica continua ad essere la metodica di riferimento.

Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR)

La *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR)*, eseguita su DNA estratto da cellule del liquido amniotico, villi coriali e sangue fetale, è in grado di determinare, in tempi molto rapidi, il sesso fetale e definire, contemporaneamente, l'esatto assetto numerico dei cromosomi sessuali e degli autosomi 13, 18 e 21 (aneuploidie più frequenti che causano, rispettivamente, la sindrome di Patau, sindrome di Edwards e sindrome di Down). La metodica si basa sull'analisi di brevi sequenze ripetute di DNA altamente polimorfiche (*Short Tandem Repeat - STR*), localizzate sui cromosomi oggetto di studio, mediante *multiplex PCR* dei tratti di interesse, utilizzando *primer* opportunamente marcati con diversi fluorocromi e successiva elettroforesi capillare per la separazione degli ampliconi e la rilevazione dei segnali di fluorescenza.

L'analisi della segregazione degli alleli parentali, sia in termini qualitativi (lunghezza del prodotto di amplificazione per ciascun *STR*) che quantitativi (rapporto delle aree o delle altezze dei picchi di fluorescenza per ciascun *STR*), permette di evidenziare la presenza di eventuali trisomie a carico degli autosomi 13, 18 e 21. Perché l'analisi sia informativa, è necessario che almeno 2 marcatori per ciascun autosoma siano in eterozigosi e, pertanto, è indicato l'impiego di più marcatori con un elevato indice di eterozigosità. Per ogni *STR* i profili che si ottengono sono:

- in caso di un assetto cromosomico normale, 2 picchi di area e altezza approssimativamente uguali con pattern biallelico normale (rapporto 1:1);
- in caso di trisomia si possono verificare due differenti situazioni: presenza di 3 picchi per la trisomia triallelica (rapporto 1:1:1) o 2 picchi con rapporto delle aree 1:2 per la trisomia biallelica.

Per i cromosomi sessuali viene, in genere, impiegata una sequenza presente nei geni omologhi dell'amelogenina sui cromosomi X e Y, che differisce per una piccola delezione, e il gene *SRY (Sex-Determining Region Y)* per il cromosoma Y. L'impiego di almeno un "*chromosome X counting marker*", locus che mappa sia sul cromosoma X che su un autosoma, consente di determinare il numero di cromosomi X, in assenza del cromosoma Y, e di definire le aneuploidie del cromosoma X, in particolare nel caso della sindrome di Turner (monosomia X o 45,X0).

Non invasive prenatal testing (NIPT) / Non invasive prenatal diagnosis (NIPD)

Questo test è eseguibile dopo la 10^a settimana di gravidanza su prelievo di sangue periferico materno e costituisce, quindi, una metodica d'indagine non invasiva e scevra da ogni rischio per il feto. Consente di rilevare nella frazione plasmatica del sangue materno la presenza di frammenti di DNA di origine fetale rilasciati dal tessuto placentare [1]. Il DNA libero totale (*cell-free DNA*, *cfDNA*) si compone di una frazione maggiore di origine materna e di una frazione fetale (*cell-free fetal DNA*, *cffDNA*) che può rappresentare il 3-13% del DNA totale. La proporzione di *cffDNA* aumenta progressivamente (0,1% per settimana tra la 10^a e la 21^a settimana di gestazione) e più rapidamente dopo la 21^a settimana (fino a 1% per settimana). L'aumento di *cffDNA* può, tuttavia, essere influenzato da fattori individuali, come: l'indice di massa corporea (*Body Mass Index*, BMI) che, se elevato, può essere associato a una frazione di DNA fetale di minore entità, aneuploidie, gravidanze gemellari. Per tale motivo, è sempre consigliabile eseguire una ecografia, prima di praticare il test, allo scopo di determinare, con precisione, l'epoca gestazionale ed escludere gravidanze gemellari o iniziate come tali poiché, in tal caso, il test risulterebbe non informativo. Inoltre, l'esiguità della frazione di cellule fetali può rendere necessario l'utilizzo di metodiche alternative altamente sensibili, come tecniche di sequenziamento di seconda generazione (*whole genome o targeted NGS*), mirate e validate per indagini sulle principali aneuploidie degli autosomi 13, 18, 21, nonché per la determinazione del sesso fetale, attraverso la ricerca di sequenze caratteristiche del cromosoma Y. In alcuni casi vengono analizzate anche le aneuploidie dei cromosomi sessuali e alcune microdelezioni associate ad alcune sindromi clinicamente riconoscibili. In ogni caso, il *NIPT* non può essere considerato diagnostico, ma costituisce un test di screening (*NIPS*, *Non invasive prenatal screening*), poiché applicato a una miscela di DNA materno e fetale. Ciò rende necessario il ricorso ad algoritmi bioinformatici per definire la probabilità di presenza di aneuploidie nella frazione di DNA fetale. Ciò nonostante, rappresenta una scelta attrattiva per donne gravide riluttanti a sottoporsi a indagini invasive, a prescindere da familiarità per malattie genetiche. Nell'ultimo decennio la tecnica è stata, quindi, utilizzata con un ampio scopo clinico preventivo, grazie anche alla diffusione di numerosi kit commerciali.

L'*European Society of Human Genetics (ESHG)* e l'*American Society of Human Genetics (ASHG)* hanno, congiuntamente, avviato un'analisi della validità clinica della metodica, analizzandone i limiti, gli aspetti etici ed economici, il significato e il ruolo [2]. Il tasso di fallimento riportato è estremamente variabile tra i laboratori (0-5%) [3] ed è dovuto ai limiti della metodica, oltre che alla variabilità della frazione di DNA fetale presente nel campione.

In particolare, se questa è inferiore al 3% del totale, il risultato non è attendibile e sarà necessario ripetere il test su un nuovo campione. È, inoltre, da segnalare che nel campo dell'applicazione a malattie X-linked a ereditarietà mendeliana, come l'emofilia, la determinazione del sesso fetale consente di limitare le successive indagini invasive ai soli feti maschi [4, 5]. Infatti, dopo l'identificazione della presenza di *cffDNA* nel sangue materno, negli anni novanta, il primo marcatore genetico utilizzato fu uno specifico locus sul cromosoma Y, la cui presenza o assenza sta a indicare, rispettivamente, il sesso maschile o femminile del nascituro. In particolare, per l'analisi mediante *real time PCR* quantitativa (*qPCR*), sono stati utilizzati il gene *SRY*, la sequenza *DYS14* e i geni in copie multiple della famiglia *DAZ*. Quest'ultimo approccio mostra ancora la sua validità grazie alla disponibilità di tecnologie con maggiore sensibilità come la *droplet digital PCR* (*ddPCR*), che consente di superare i limiti dovuti a quantità ridotte di *cffDNA*, consentendo di eseguire il test in epoca gestazionale più precoce, anche precedente alla 7^a settimana [6]. È sempre necessaria, comunque, la conferma del sesso fetale mediante ecografia da eseguirsi alla 20^a settimana di gestazione.

Relativamente all'analisi diretta dei geni associati all'emofilia, le applicazioni sono, attualmente, ancora sperimentali. Numerosi studi si sono, infatti, prevalentemente concentrati su malattie a trasmissione autosomica dominante dovute a varianti *de novo*, o a ereditarietà paterna, come l'acondroplasia o la displasia tanatofora [7, 8]. È importante, tuttavia, che il DNA fetale sia presente in quantità superiore al 3-4%, onde evitare che il test dia esito a risultati falsamente negativi [9]. Per le malattie a ereditarietà recessiva, la maggiore difficoltà deriva dalla presenza di DNA libero materno in elevata concentrazione, che può interferire con l'identificazione di DNA fetale, rendendo più arduo l'approccio *NIPD* a tali malattie. Ciò nonostante, studi applicati all'emofilia A e basati sull'impiego di *Digital PCR* [10], *Digital PCR* in combinazione con *NGS* [11] o *NGS* con analisi dell'aplotipo [12] e uno studio applicato all'emofilia B con l'impiego del sequenziamento [13] dimostrano la possibilità di facile, sicura ed efficace applicazione di tali tecniche per la determinazione del sesso fetale.

Contaminazione materna

L'interpretazione dei test genetici è una delle aree più complesse nel contesto delle analisi prenatali. I campioni ottenuti da amniocentesi o villocentesi (*CVS*) presentano un rischio di contaminazione da cellule materne di grado inferiore per l'amniocentesi (0.3% circa) rispetto alla villocentesi in cui esso può essere influenzato dalla tecnica di esecuzione del prelievo:

0.8% circa, nel caso di un prelievo per via transaddominale, 2.2% circa, se il campione viene ottenuto per via transcervicale [13]. Per tale motivo, la tecnica di prelievo per via transaddominale è oggi quella più largamente utilizzata.

Per fornire una corretta interpretazione dei risultati, il laboratorio di genetica e biologia molecolare deve essere certo che il campione ottenuto non presenti contaminazione da cellule di origine materna (*Maternal Cell Contamination, MCC*), poiché ciò comporterebbe un serio rischio di diagnosi errata. Nel documento a cura della *UK Clinical Molecular Genetics Society (UK-CMGS)* [14] per tutte le diagnosi prenatali per malattie a trasmissione monogenica si raccomanda, infatti, di procedere con opportune indagini sul campione fetale per escludere, per quanto possibile, la presenza di contaminazione materna, eseguendo contestualmente l'analisi su DNA estratto da cellule nucleate di sangue periferico materno. Tali indagini si basano sull'analisi di un pannello di marcatori polimorfici, di tipologia *STR*, ampiamente distribuiti sui cromosomi autosomici, accompagnata dall'analisi di specifiche sequenze non ripetitive sui cromosomi X e Y, da effettuarsi su DNA estratto da villi coriali o da amniociti. Questi marcatori vengono analizzati mediante *multiplex* PCR in fluorescenza, seguita da elettroforesi capillare e analisi dei marcatori *STR* risultati eterozigote nel profilo materno e pertanto informativi; l'analisi viene condotta confrontando i profili della madre e del campione fetale: per ciascun locus *STR* informativo deve essere presente, nel campione fetale, il segnale fluorescente corrispondente ad un solo allele materno. In presenza di segnali di fluorescenza relativi ai 2 diversi alleli materni e quindi di contaminazione, è raccomandabile stimare il valore percentuale di *MCC*, tenendo conto dell'area dei picchi di fluorescenza del profilo fetale, utilizzando la seguente formula:

$$\%MCC_{\text{ciascun STR}} = (\text{Area picco fetale } MCC_{\text{ciascun STR}} / \text{Area picco fetale di origine paterna}_{\text{ciascun STR}}) \times 100$$

Il livello di *MCC* del campione fetale viene stimato calcolando la media dei valori percentuali di *MCC* di tutti i marcatori *STR* utilizzabili. È raccomandabile che l'analisi sia in grado di identificare un livello di contaminazione di almeno 10%. In caso di contaminazione significativa, è infatti consigliabile procedere a un nuovo prelievo, per evitare errori diagnostici. Sono disponibili diversi kit commerciali, alcuni genericamente rivolti ad applicazioni medico-legali, con marcatori localizzati su vari cromosomi autosomici e sui cromosomi X e Y, altri già descritti nella sezione su *QF-PCR* in questo allegato, contestualmente utilizzati sia nell'analisi delle principali aneuploidie dei cromosomi 13, 18 e 21 e dei cromosomi X e Y che nell'analisi di *MCC*.

Bibliografia

1. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
2. Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet* 2015;23:1438–50.
3. Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;42:15–33.
4. Chi C, Hyett JA, Finning KM, Lee CA, Kadir RA. Non-invasive first trimester determination of fetal gender: a new approach for prenatal diagnosis of haemophilia. *BJOG* 2006;113:239-42.
5. Santacroce R, Vecchione G, Tomaiuolo M, et al. Identification of fetal gender in maternal blood is a helpful tool in the prenatal diagnosis of haemophilia. *Haemophilia* 2006;12:417-22.
6. D'Aversa E, Breveglieri G, Pellegatti P, Guerra G, Gambari R, Borgatti M. Non-invasive fetal sex diagnosis in plasma of early weeks pregnant using droplet digital PCR. *Mol Med* 2018;24:14.
7. Zhang J, Li J, Saucier JB, et al. Non-invasive prenatal sequencing for multiple Mendelian monogenic disorders using circulating cell-free fetal DNA. *Nat Med* 2019;25:439–47.
8. Chitty LS, Mason S, Barrett AN, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia and thanatophoric dysplasia: next-generation sequencing allows for a safer, more accurate, and comprehensive approach. *Prenat Diagn* 2015;35:656–62.
9. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 2013;33:667-74.
10. Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood* 2011;117:3684–91.
11. Hudecova I, Jiang P, Davies J, Lo YMD, Kadir RA, Chiu RWK. Noninvasive detection of *F8* int22h-related inversions and sequence variants in maternal plasma of hemophilia carriers. *Blood* 2017;130:340–7.

12. Chen C, Sun J, Yang Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia A by a haplotype-based approach using cell-free fetal DNA. *Biotechniques* 2020;68:117-21.
13. Hu P, Qiao F, Yuan Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis for X-linked disease by maternal plasma sequencing in a family of Hemophilia B. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2017;56:686-90.
14. Allen S, Mountford R, Butler A, Mann K and Treacy B. Practice guidelines for the Testing for maternal cell contamination (MCC) in prenatal samples for molecular studies. Guidelines ratified by the UK Clinical Molecular Genetics Society (16th April, 2008).