

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ – ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΝΕΟΓΝΙΚΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ



Κλεοπάτρα Σπανού
Τμ.Ανοσολογίας & Ιστοσυμβατότητας
Νοσ.Παιδων «η Αγία Σοφία»



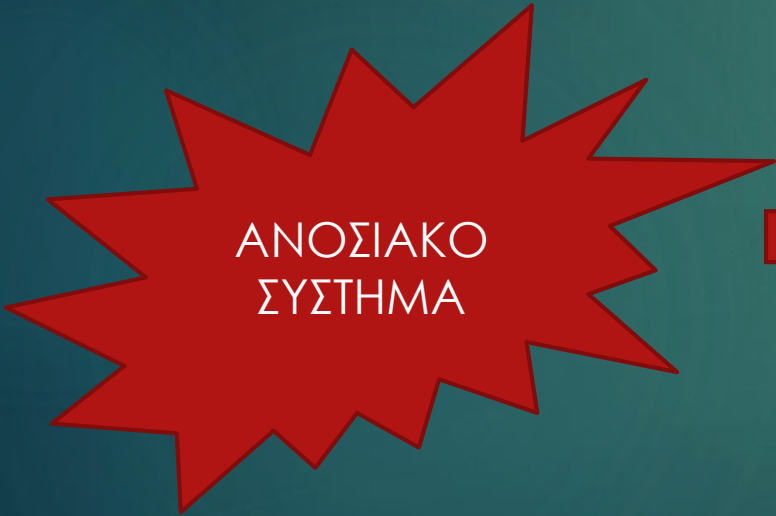
ΑΝΟΣΙΑΚΟ
ΣΥΣΤΗΜΑ



ΑΜΥΝΑ



ΕΠΙΒΙΩΣΗ



ΣΟΒΑΡΕΣ ΚΑΙ ΣΥΧΝΑ
ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΕΣ
ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ



ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

ΕΚ ΓΕΝΕΤΗΣ Ή ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ
ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ (ΠΑΑ)
PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES (PIDs)



Γενετικές βλάβες



- αυξημένη ευπάθεια σε λοιμώξεις
- αυτοάνοσες και
- καρκινικές εκδηλώσεις

Πρώιμη παιδική ηλικία

ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ Ή ΔΕΥΤΕΡΟΠΑΘΕΙΣ
ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ



- υποθρεψία
- μεταστατικός καρκίνος
- ανοσοκατασταλτικά φάρμακα
- λοιμώξεις (ειδικά HIV)

ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ (ΠΑΑ)

Κλινικά συμπτώματα

- Ευπάθεια σε λοιμώξεις
- Αλλεργία
- Αυτοανοσία
- Αυτοφλεγμονώδη νοσήματα
- Λεμφοϋπερπλασία
- Καρκίνος

Δυσδιάκριτα , επικαλύπτονται και ποικίλουν



ΕΠΙΤΑΚΤΙΚΗ ΑΝΑΓΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΣΤΙΣ ΠΑΑ

Ασθενείς με ανεπάρκεια της
Χυμικής ανοσίας:

Ανοσοσφαιρίνες
Παράγοντες συμπληρώματος
Φαγοκύτταρα

Επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις από

- ❖ Βακτήρια με κάψα
- ❖ αιμόφιλος τη γρίππης
- ❖ στρεπτόκοκκος
- ❖ σταφυλόκοκκος
- ❖ μηνιγγιτιδόκοκκος

Ασθενείς με ανεπάρκεια της
κυτταρικής ανοσίας

Ευκαιριακές λοιμώξεις από

- ❖ Μύκητες
- ❖ Ιός ανεμευλογιάς

Πρώιμη διάγνωση= πολύ σημαντική για την πρόγνωση και τη γενετική καθοδήγηση της οικογένειας

ΠΑΑ : σχετικά σπάνιες

Η συχνότητά τους ποικίλει μεταξύ 1: 300 (για την IgA ανεπάρκεια) και 1: 200000 (για την ΧΚΝ) και σε μερικές περιπτώσεις υπάρχουν μόνο μερικοί ασθενείς στον κόσμο.



Παιδική ηλικία



2^η και 3^η δεκαετία
(CVID)

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΑΑ

- ✓ Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCT)
- ✓ Θεραπεία υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη
- ✓ Αντιμικροβιακή θεραπεία για τις λοιμώξεις
- ✓ Γονιδιακή θεραπεία

ΠΑΑ ➔ πολυπλοκότητα γενετικών, ανοσολογικών και κλινικών χαρακτηριστικών ➔ μεγάλη φαινοτυπική ποικιλομορφία

I U I S (International Union Of Immunological Societies) Φαινοτυπική Ταξινόμηση των ΠΑΑ



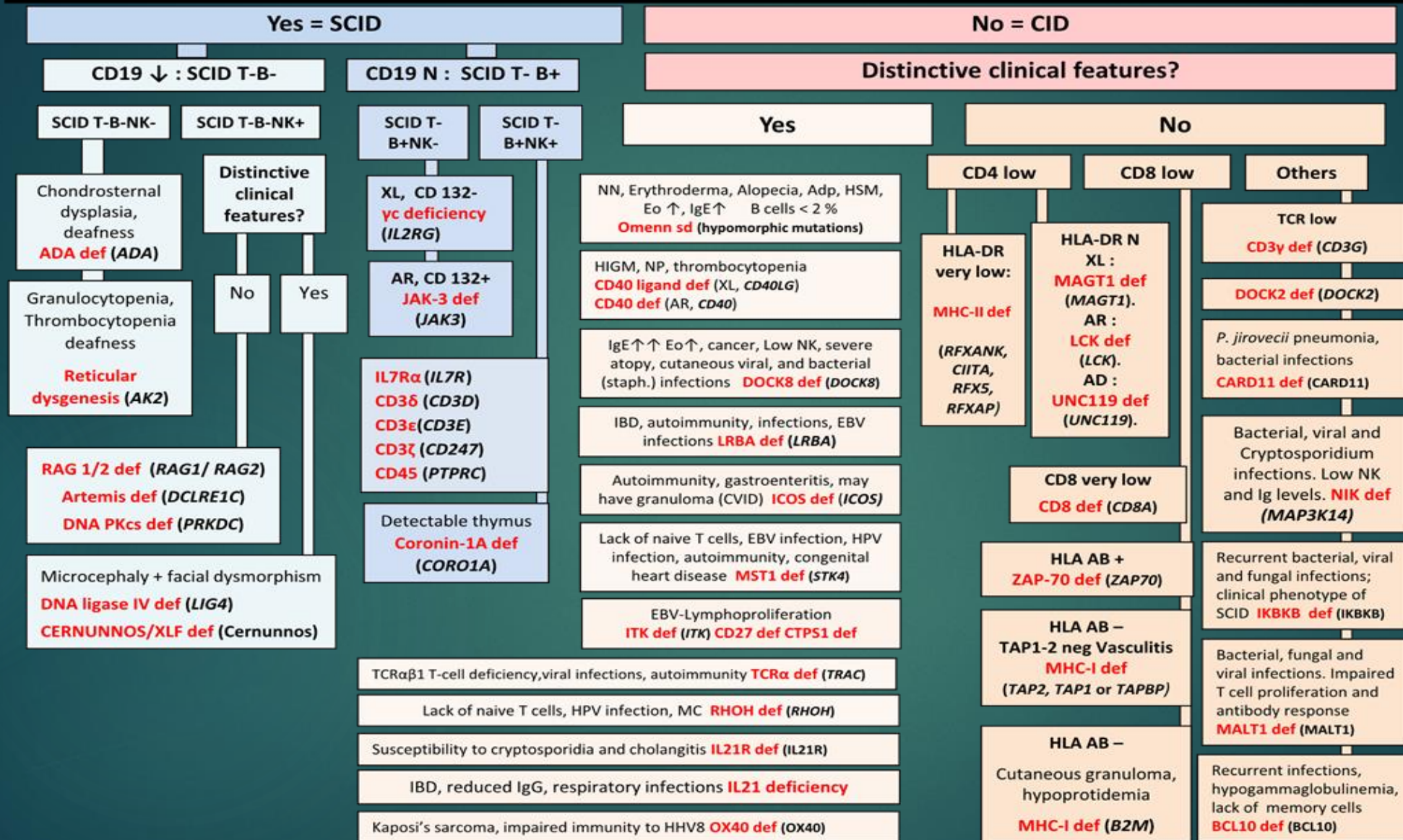
Κοινοί παθογενετικοί μηχανισμοί και/ή κλινικές εκδηλώσεις

9 ΟΜΑΔΕΣ

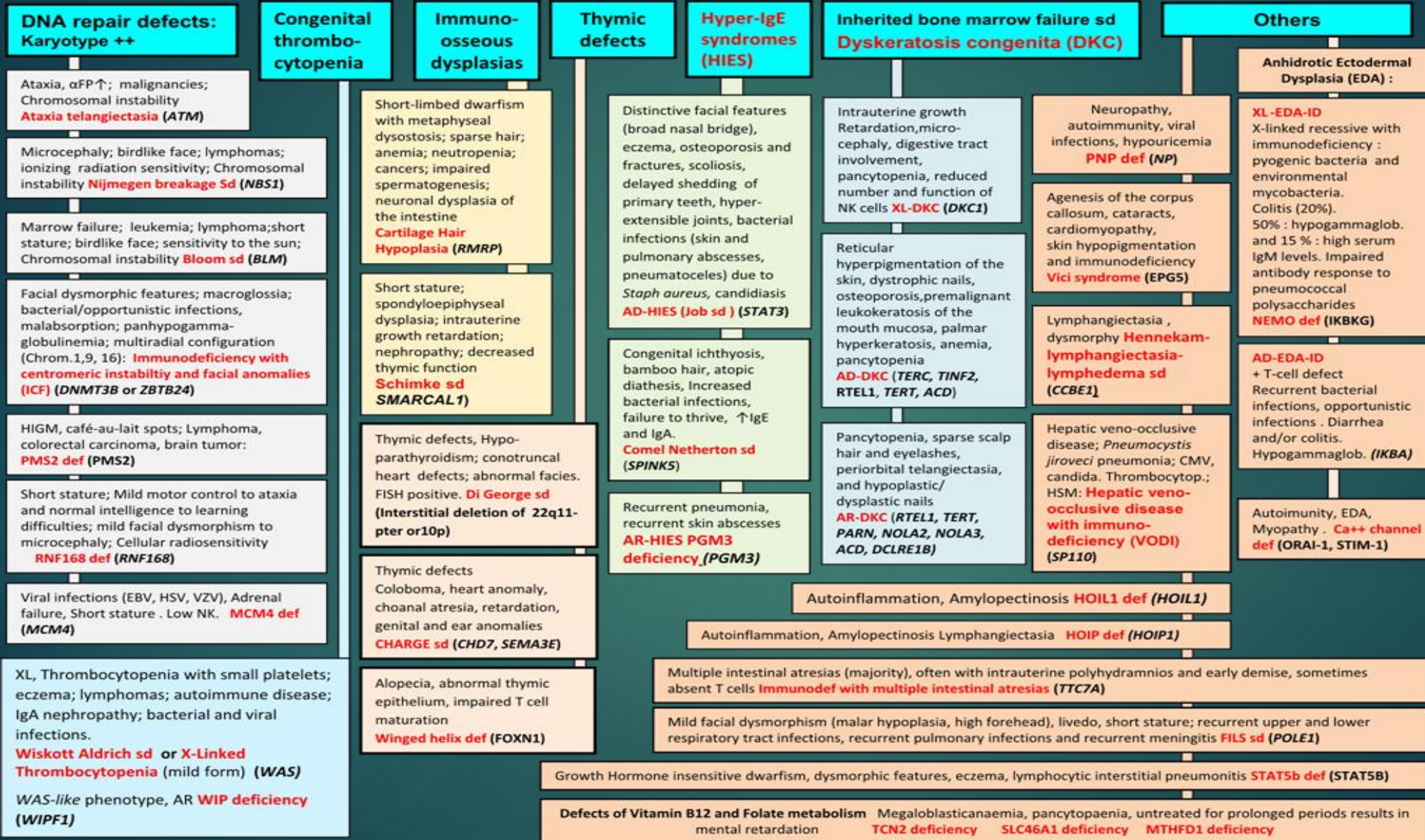
Αλγόριθμος
Νοσήματα (κόκκινο)
Γονίδια (έντονο)
Συχνό->σπάνιο

2013 έως σήμερα: 70 νέες ΠΑΑ

I. ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΧΥΜΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ



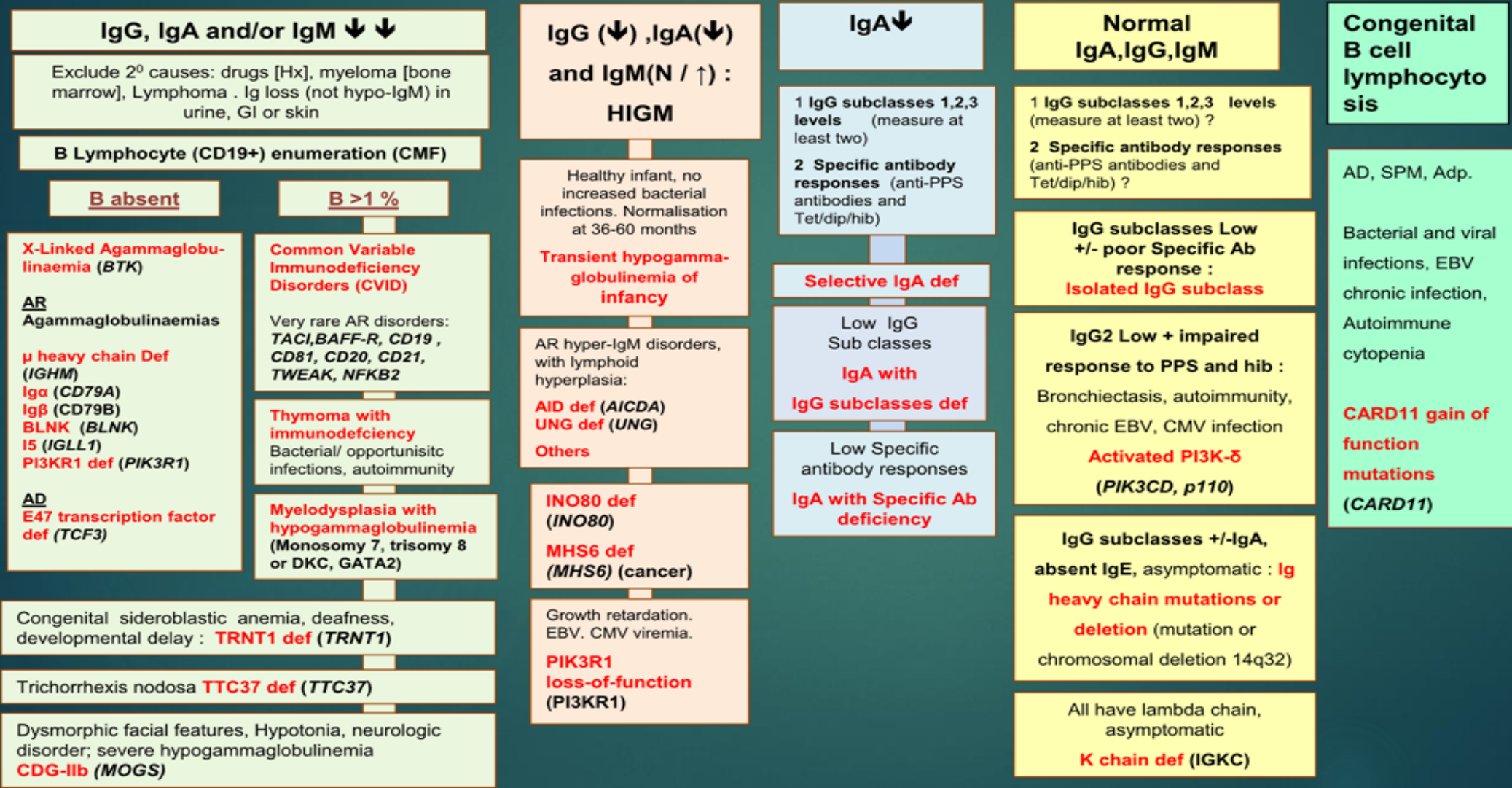
II. ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΑ



III. ΚΥΡΙΩΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

(Επαναλαμβανόμενες βακτηριακές λοιμώξεις, πχ.ωτίτιδα,δερματίτιδα, διάρροια,σήψη)

Serum Immunoglobulin Assays : IgG, IgA, IgM



IV. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ

Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (HLH)

Syndromes with Autoimmunity

Immune dysregulation with colitis

Type 1 Interferonopathies

Hypopigmentation

Specific hair shaft anomaly
Neutropenia
Increased bleeding
Low degranulation (T, NK).
Hermansky Pudlak sd type 2 (AP3B)

Giant lysosomes in Leukocytes on blood smears
Specific hair shaft anomaly
Low degranulation (T,NK)
Primary neurological disease
Chediak Higashi sd (LYST)

Specific hair shaft anomaly
Low degranulation (T, NK).
Grisecelli sd type 2 (RAB27a)

Specific hair shaft anomaly
Hermansky Pudlak sd type 9 (PLDN)

Severe inflammation, persistent fever

Normal CD107 Degranulation

Perforin deficiency (CMF)
FHL2 (PRF1)

Munc 13-4 deficiency
FHL3 (UNC13-D)

Munc 18-2/STXBP2 deficiency
Primary Bowel disease
Increased bleedings.
FHL5 (STXBP2)

Syntaxin 11 deficiency.

FHL4 (STX11)

Low CD107 Degranulation (T, NK)

EBV-associated lymphoproliferation

XL, Hypogammaglobulinemia, Lymphoma, Hepatitis, Frequent EBV induction of HLH. NKT cell deficiency. Reduced CTL activity to EBV. SAP deficiency (CMF).
XLP1 (SH2DIA)

XL, Splenomegaly, Colitis, XIAP deficiency (CMF)
XLP2 (XIAP)

ALPS Splenomegaly, adenopathy, defective lymphocyte apoptosis, CD3 double negative > 2,5 %?

No

Yes

Autoimmune polyendocrinopathy with candidiasis and ectodermal dystrophy: Autoimmunity affecting parathyroid, adrenal, other endocrine organs; candidiasis; dental enamel hypoplasia
APECED (AIRE)

Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy XL : Autoimmune enteritis, early onset diabetes, thyroiditis, hemolytic anemia, thrombocytopenia, eczema. Lack of CD4+ CD25+ FOXP3+ Regulatory T cells. IgA, IgE↑.
IPEX(FOXP3)

Lymphoproliferation, autoimmunity, impaired T-cell function.
CD25 deficiency (IL2RA)

Multi-organ autoimmunity, chronic lung disease, failure to thrive, developmental delay, macrocephaly
ITCH def (ITCH)

Lymphoproliferation, Solid organ autoimmunity, recurrent infections.
STAT3 GOF (STAT3)

Variable lymphoproliferation, severe autoimmune cytopenias, hypergammaglobulinemia, recurrent infections.
Tripeptidyl-Peptidase II def (TPP2)

Hypogammaglobulinemia, recurrent infections and multiple autoimmune clinical features, decreased circulating B cells
CTLA4 def (ALPS-V) (CTLA4)

AD, AR, autoimmune blood cytopenias
ALPS-FAS(FAS)

AD or AR, lupus, autoimmune blood cytopenias
ALPS-FASLG (FASLG)

AD autoimmune disease
ALPS-CASP10 (CASP10)

AR, Recurrent bacterial and viral infections, Functional hyposplenism, liver dysfunction, defective IFN γ biology
FADD deficiency (FADD)

AD, Recurrent bacterial and viral infections, defective lymphocyte activation
CASPASE 8 defect (CASP8)

AR, Recurrent infections; EBV chronic infection. Lymphoproliferation . SLE-like autoimmunity (Nephrotic and anti-phospholipid syndromes)
HypogIgG
PRKCDelta def (PRKCD)

Inflammatory bowel disease (IBD) Folliculitis, Recurrent respiratory diseases, Arthritis
IL-10 def (IL10)

+ Lymphoma
IL-10R α def (IL10RA)
IL-10R β def (IL10RB)

IBD, recurrent sinopulmonary infections
NFAT5 haploinsufficiency (NFAT5)

Progressive encephalopathy Intracranial calcifications, Cerebral atrophy, leukodystrophy HSMG, Thrombocytopenia, Elevated hepatic transaminases
Chronic cerebrospinal fluid (CSF) lymphocytosis
Aicardi-Goutieres (TREX1, RNASEH2B, RNASEH2C, RNASEH2A),

Progressive encephalopathy intracranial calcification, Severe developmental delay, leukodystrophy
ADAR1 def, AGS6 (ADAR1) . AGS7 (IFIH1).

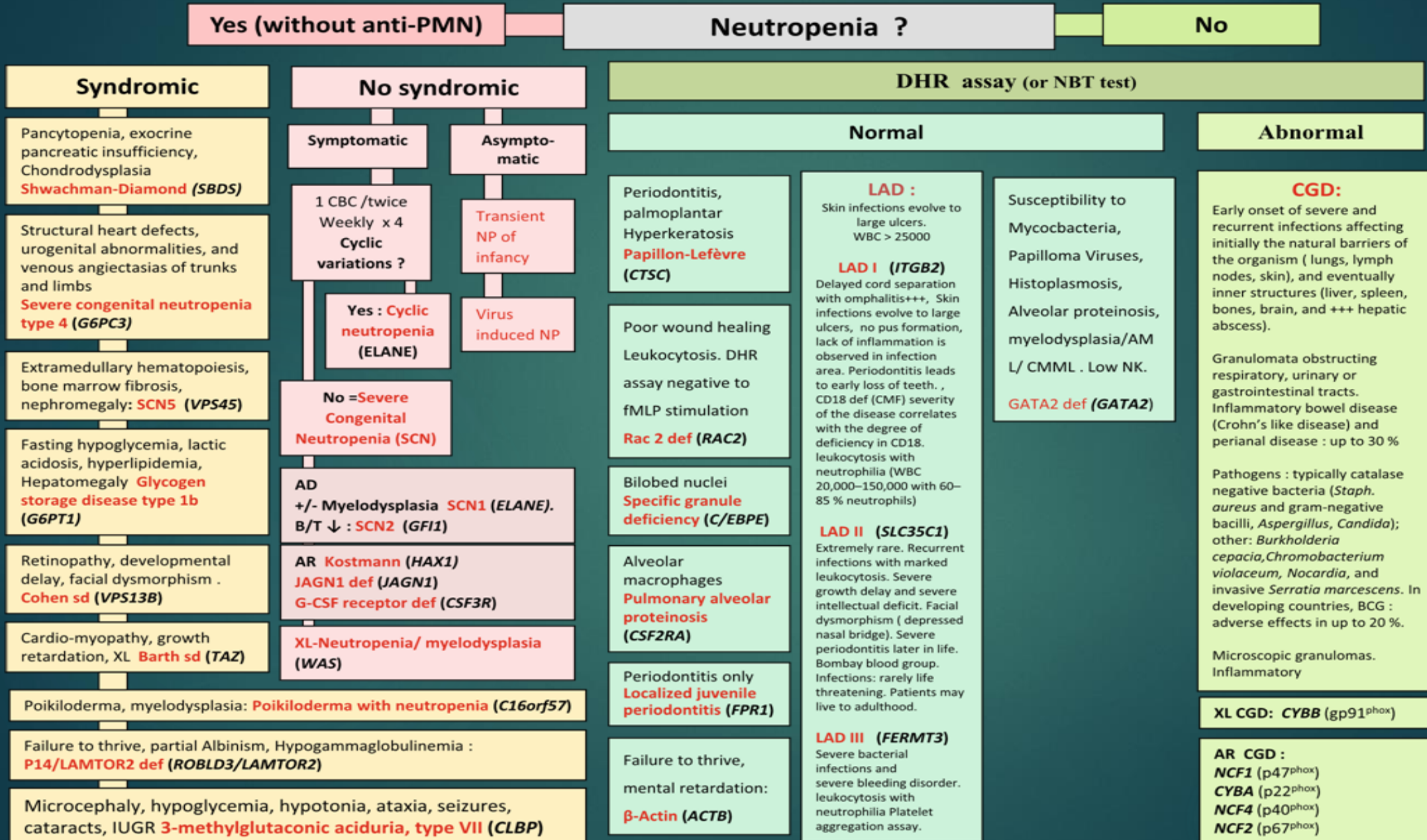
Recurrent bacterial and viral infections, Intracranial calcification, SLE-like autoimmunity (Sjögren's syndrome, hypothyroidism, inflammatory myositis, Raynaud's disease and vitiligo), hemolytic anemia, thrombocytopenia, skeletal dysplasia, short stature
SPENCD (ACP5)

Early-onset inflammatory disease, rash, tachypnea, systemic inflammation, vascular inflam, pulmonary inflammation
VACI (STING)

Recurrent fever, Early-onset stroke, Livedo racemosa, low IgM, Hypogamma, Lymphopenia, Polyarteritis nodosa, childhood-onset
ADA2

+ Skin vascularitis, mouth ulcers, arthropathy
SAMHD1 def, AGS5 (SAMHD1)

V. ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ Η/ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΝ



VI. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ

Predominant susceptibility to invasive infections with pyogenic bacteria

Predisposition to invasive bacterial infections (meningitis, sepsis, arthritis, osteomyelitis and abscesses), often in the absence of fever.

Predominant pathogens (*S. pneumoniae*, *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*). Non-invasive bacterial infections (skin infections and upper respiratory tract infections). Improve with age.

Routine screening tests are normal. Specific screening tests (lack of proinflammatory cytokine production and CD62L shedding) : available only in specialized clinical immunology laboratories.

IRAK4 def (IRAK4)

MyD88 def (MYD88)

Bacteremia (encapsulated bacteria)
No spleen

Isolated congenital asplenia (RPSA)

Predominant susceptibility to viral infection

Herpes simplex Encephalitis

Dominant clinical phenotype is herpes simplex encephalitis (HSE) during primary infection with herpes simplex virus type 1 (HSV1), usually between 3 months and 6 years of age.

Routine screening tests are normal.

Specific tests examining the TLR3 pathway : marked decrease in the ability of patient's fibroblasts to produce IFN- β / λ in response to TLR3 agonists and HSV1 infection.

AR :
UNC93B1
TLR3
TRIF

AD :
TLR3
TRIF
TRAF3
TBK1

Warts, Hypogammaglobulinemia, infections, Myelokathexis

AD. Neutropenia, reduced B cell numbers. Warts/ human papilloma virus infection.

WHIM sd (CXCR4)

Human papilloma virus (group B1) infections and skin cancer

Epidermo-dysplasia verruciformis (EVER1/TMC6, EVER2/TMC8)

Viral infections
STAT1 def
STAT2 deficiency

Severe viral infections
CD16 def

Severe influenza disease
IRF7 def

Parasitic infections and fungal diseases

Trypanosomiasis
AD **APOL1**

CMC

Chronic Mucocutaneous Candidiasis

Occasionally autoimmunity, no ectodermal dysplasia

AD: **STAT1** (gain of function) **IL17F**

AR: **IL17RA**
IL17RC

Invasive candidiasis or dermatophytic disease
CARD9 def (CARD9)

Blepharitis, Folliculitis and macroglossia
ACT1 def (ACT1)

Susceptibility to Mycobacteria

Susceptibility to *Mycobacteria*, *Candida*, Myeloproliferation

IRF8 def (AR form) (IRF8)

Susceptibility to *Mycobacteria*, *Candida*
RORc def (RORC)

MSMD

IL12 –IFN γ axis def.

AD **IFNGR1** (mycobacterial osteomyelitis).

Complete AR **IFNGR1** and AR **IFNGR2** (Serious disseminated BCG and environmental mycobacteria infections (soft tissue, bone marrow, lungs, skin, bones and lymph nodes), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and viruses)

Partial **STAT1** LOF (AD), Partial IFN γ R1, partial IFN γ R2 , complete IL-12R β 1, complete IL-12B, complete ISG15, XL **CYBB**, **IRF8**, **Tyk2**, XL **NEMO** usually less severe

VII. ΑΥΤΟΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Recurrent inflammation

AR
DA: 1–4 days.
FA : Variable.

Polyserositis, Abdominal pain, Arthritis, Amyloidosis
 Colchicine-responsive +++
 Erysipelas-like erythema

Familial Mediterranean Fever (FMF) (MEFV)

AR
DA: > 3–7 days
FA: 1–2 monthly

Cervical adenopathy
 Oral aphthosis. Diarrhea
 Elevated IgD and IgA, acute phase response and mevalonate aciduria during attacks

MKD def (HIDS) (MVK)

AD
DA: 1–4 weeks
FA : Variable, continuous
 Serositis, rash, Periorbital edema and conjunctivitis;
 Amyloidosis.
 Low levels of soluble TNF-R1 when well

TRAPS (TNFRSF1A)

Systemic inflammation with urticaria rash

AD - DA: 24-48 H
 Cold exposure. Non pruritic urticaria, arthritis, chills
 Conjunctivitis.

Familial Cold Autoinflammatory Syndrome (CAPS) (NLRP3, NLRP12)

AD - DA : Continuous.
 Often worse in the evenings
FA: Often daily

Ethnic group : North European;
 Deafness, Conjunctivitis;
 Amyloidosis.

Muckle Wells syndrome (CAPS) (NLRP3)

AD, Sporadic
DA: Continuous
FA : Continuous

Aseptic and chronic meningitis,
 Deforming arthropathy,
 Sensorineural deafness.
 Mental retardation; Visual loss. **CINCA (NOMID), (CAPS) (NLRP3)**

Cold urticaria, humoral immune def, autoimmunity
PLAID (PLC2G)
 +Blistering skin lesion,
 pulmonary and bowel disease
APLAID (PLC2G, c. 2120C>A)

Sterile inflammation (skin / bone / joints)

AR - DA : Few days
FA : 1-3 / month

Chronic recurrent
 Multifocal osteomyelitis,
 severe pain, tender soft tissue swelling,
 Transfusion-dependent anemia,

MAJEED (LPIN2)

AR - DA : Continuous
FA : Continuous

Sterile multifocal
 Osteomyelitis, Folliculitis.
 IL1: Unopposed effect

Deficiency of IL-1 Receptor Antagonist (DIRA) (IL1RN)

AD - DA: 5 days
FA: Fixed interval :4-6 weeks

Sterile pyogenic oligo-arthritis,
 Pyoderma gangrenosum,
 Myositis. Acute-phase response during attacks

PAPA (PSTPIP1)

AD. DA : Continuous.
FA : Continuous. Uveitis,
 Granulomatous synovitis,
 Camptodactyly, Rash,
 Cranial neuropathies, Crohn disease. Sustained modest acute-phase response
BLAU syndrome (NOD2)

AR , life-threatening,
 multisystemic inflammatory disease characterized by episodic widespread, pustular psoriasis, malaise, and leukocytosis.
DITRA (IL-36RN)

Hyperpigmentation, hypertrichosis
SLC29A3 mutation (SLC29A3)

Bone degeneration in jaws
Cherubism (SH3BP2)

Psoriasis. **CAMPS (CARD14)**

AR, early-onset pustular dermatitis, short and broken hair, paronychia, frequent cutaneous bacterial infections, and diarrhea , high IL-1 and IL-6 production. Lack of TNF- α was considered partly responsible for their increased susceptibility to infection and development of cardiomyopathy.
Inflammatory skin and bowel disease-1 (ADAM17)

Others

AR Dystrophy,
 panniculitis

CANDLE (PSMB8)

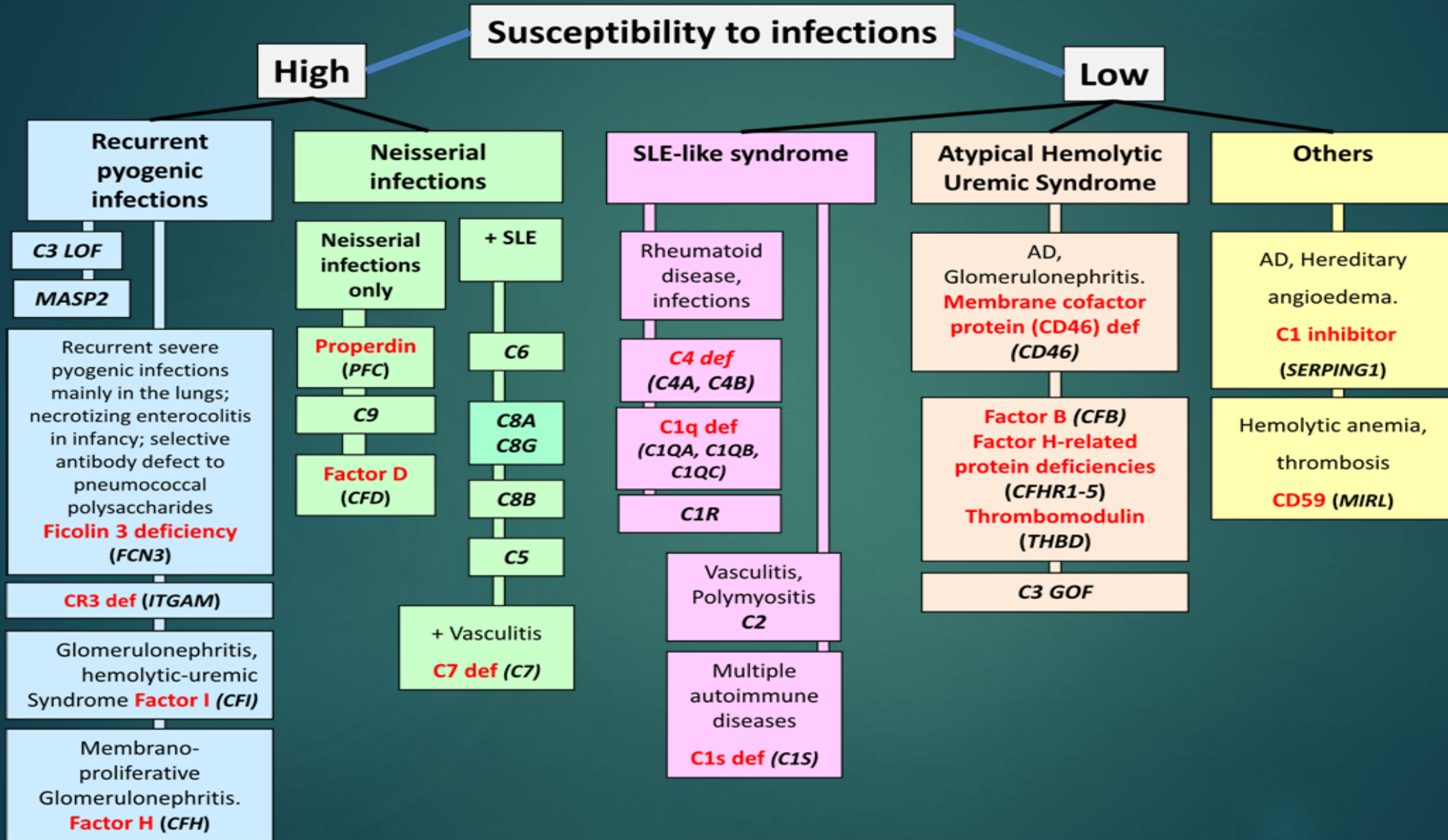
Neonatal enterocolitis, periodic fever, fatal autoinflammation, macrophage activation syndrome

NLRP4

Autoimmune inflammatory arthritis and interstitial lung disease

COPA def (COPA)

VIII. ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ



ΙΧ. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ «ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ» ΠΑΑ

Associated with Somatic Mutations

Splenomegaly, lymphadenopathy, autoimmune cytopenias,

Defective lymphocyte apoptosis.
/ ALPS-FAS

ALPS-SFAS
(somatic mutations in *TNFRSF6*)

Sporadic;
Defective lymphocyte apoptosis after IL-2 withdrawal

Activating N-RAS defect,
Activating K-RAS defect

(somatic mutations of *NRAS* or *KRAS*)

Urticaria-like rash,
arthropathy, neurological symptoms

Cryopyrinopathy
(somatic mutations of *NLRP3*)

Associated with Auto-Antibodies

CMC

AutoAb to IL-17 and/or IL-22

Mycobacterial, fungal, salmonella
VZV infections / MSMD or CID

Adult-onset immunodeficiency
(AutoAb to IFN gamma)

Staphylococcal infections / *STAT3* deficiency

Recurrent skin infection (AutoAb to IL-6)

Pulmonary alveolar proteinosis, cryptococcal meningitis
/ *CSF2RA* deficiency

Pulmonary alveolar proteinosis
(AutoAb to GM-CSF)

Angioedema
/C1 INH deficiency

Acquired angioedema (AutoAb to C1inhibitor)

Atypical HUS

aHUS (AutoAb to Factor H)

Φαινοτυπική ταξινόμηση των ΠΑΑ (EC – IUIS)

- ✓ Διευκόλυνση της κλινικής έρευνας
 - ✓ Προώθηση της καλύτερης δυνατής θεραπείας
 - ✓ Διευκόλυνση συγκριτικών μελετών ανά τον κόσμο
 - ✓ Ενημέρωση ετησίως σε νέα γονίδια
 - ✓ Διευκόλυνση των κλινικών στη διαφορική διάγνωση
 - ✓ Προώθηση της συνεργασίας με εθνικά και διεθνή κέντρα
- ❖ Ο αριθμός των ΠΑΑ αυξήθηκε ακόμα περισσότερο και η μελέτη τους βελτιώθηκε ειδικά μετά την εισαγωγή του NGS (next generation sequencing).

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΠΑΑ

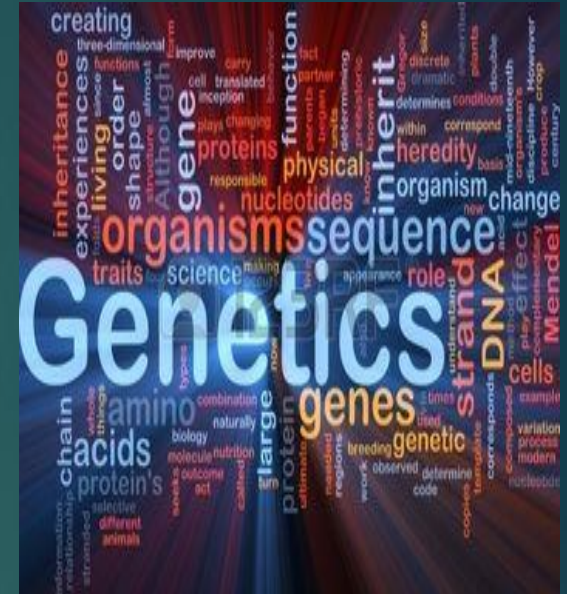
>240 διαφορετικά γονίδια ↔ >200 ΠΑΑ

έκφραση και λειτουργία

(κυτταροκίνες + υποδοχείς, μεταγραφικοί παράγοντες, ρυθμιστές του κυτ.κύκλου, DNA τροποποιητικά ένζυμα, μεταφορικές πρωτεΐνες)

που εμπλέκονται σε

- ❖ ανοσιακή ανάπτυξη
- ❖ λειτουργίες των δραστικών κυττάρων
 - ❖ καταρράκτες σημάτων
 - ❖ συντήρηση ομοιόστασης



DNA

THE ONLY WAY TO TELL WHO YOU ARE

Τρόπος κληρονόμησης ΠΑΑ

με χαρακτήρα

- ❖ **Φυλοσύνδετο** – συχνές στα αγόρια
- ❖ **Αυτόσωμο υπολειπόμενο** – απαιτεί βλάβη και στα 2 αλλήλια
 - πχ μέσω συγγενικού γάμου, όπως οι μεταλλάξεις του υποδ.της IFN- γ που προκαλούν ευπάθεια σε μυκοβακτηριακές λοιμώξεις
 - ή
 - γενετικά απομονωμένος πληθυσμός, μεταβίβαση μετάλλαξης μέσω πατρικών και μητρικών σειρών
- ❖ **Αυτόσωμο επικρατούντα** - ατελής διεισδυτικότητα, παρακάμπτουσες γενιές και/ή ποικίλη βαρύτητα μεταξύ συγγενών με την ίδια μετάλλαξη

Πρώτο διαγνωστικό βήμα
πλήρες γενεαλογικό και οικογενειακό ιστορικό
+
εθνική και γεωγραφική καταγωγή

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΑΑ

PID phenotype	Associated gene defects
T-B+NK-SCID	<i>ILDRG, JAK3</i>
T-B+NK+SCID	<i>RAG1, RAG2, DCLERC1</i>
Omenn syndrome	<i>RAG1, RAG2, DCLERC1, RMRP, IL7R, IL2RG, ADA</i>
Agammaglobulinemia	<i>BTK, IGHM, IGLL1; CD79A, CD79B, BLNK</i>
CVID	<i>TNFRSF13B (TACI), ICOS, TNFRSF13C (BAFF-R), CD40L, CD19, SH2D1A</i>
Hyper-IgM syndrome	<i>CD40L, CD40, AICDA, UNG</i>
XL lymphoproliferative syndrome	<i>SH2D1A, XIAP</i>
Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis	<i>PRF1, MUNC13B, STX11</i>
Chronic granulomatous disease	<i>CYBB, CYBA, NCF1, NCF2</i>
Severe congenital neutropenias	<i>ELA2, HAX1, GF11, MAPBP, WASP</i>
Mendelian susceptibility to mycobacterial disease	<i>IL12B, IL12RB1, IFNGR1, IFNGR2, STAT1</i>
Herpes simplex encephalitis	<i>UNC93B1, TLR3</i>
The hyper-IgE syndromes (HIES)	<i>TYK2, DOCK8, STAT3</i>

(modified with permission from Notarangelo and Sorensen 2008)

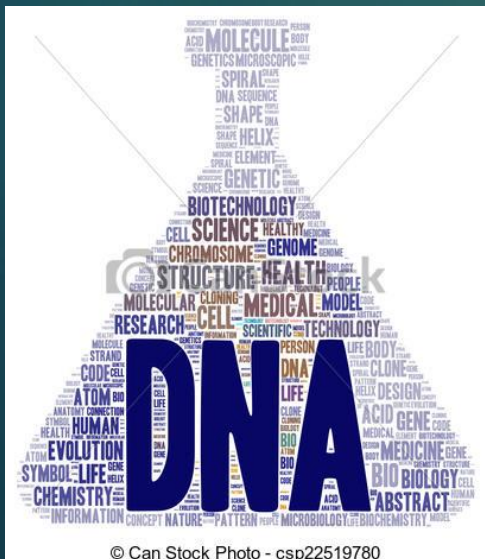
ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΛΑ

Mutated genes	Associated phenotypes
<i>RAG1, RAG2, DCLERC1</i>	SCID, OS, leaky SCID
<i>LIG4</i>	SCID, LIG4 syndrome
<i>WASP</i>	WAS, XLT, XLN
<i>SH2D1A</i>	XLP, CVID
<i>RMRP</i>	CHH, SCID, OS
<i>ELA2</i>	SCN, cyclic neutropenia



ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- ✓ Οριστική και ακριβής διάγνωση
- ✓ Γενετική συμβουλευτική, για την έγκαιρη προγεννητική διάγνωση και την ανίχνευση φορέων
- ✓ Διάγνωση άτυπων προβολών
- ✓ Προσυμπτωματική διάγνωση ατόμων με εν δυνάμει θανατηφόρες μορφές ΠΑΑ
- ✓ Ανάπτυξη στρατηγικών μακροχρόνιας προφύλαξης για την αποφυγή επιπλοκών και μη αναστρέψιμων οργανικών βλαβών
- ✓ Αντιστοίχιση γονότυπου-φαινότυπου για την πρόγνωση νοσημάτων



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΠΑΑ

Διαφορετικές μοριακές τεχνικές - αξιολόγηση κάθε τεχνικής και σύγκριση με άλλες

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ



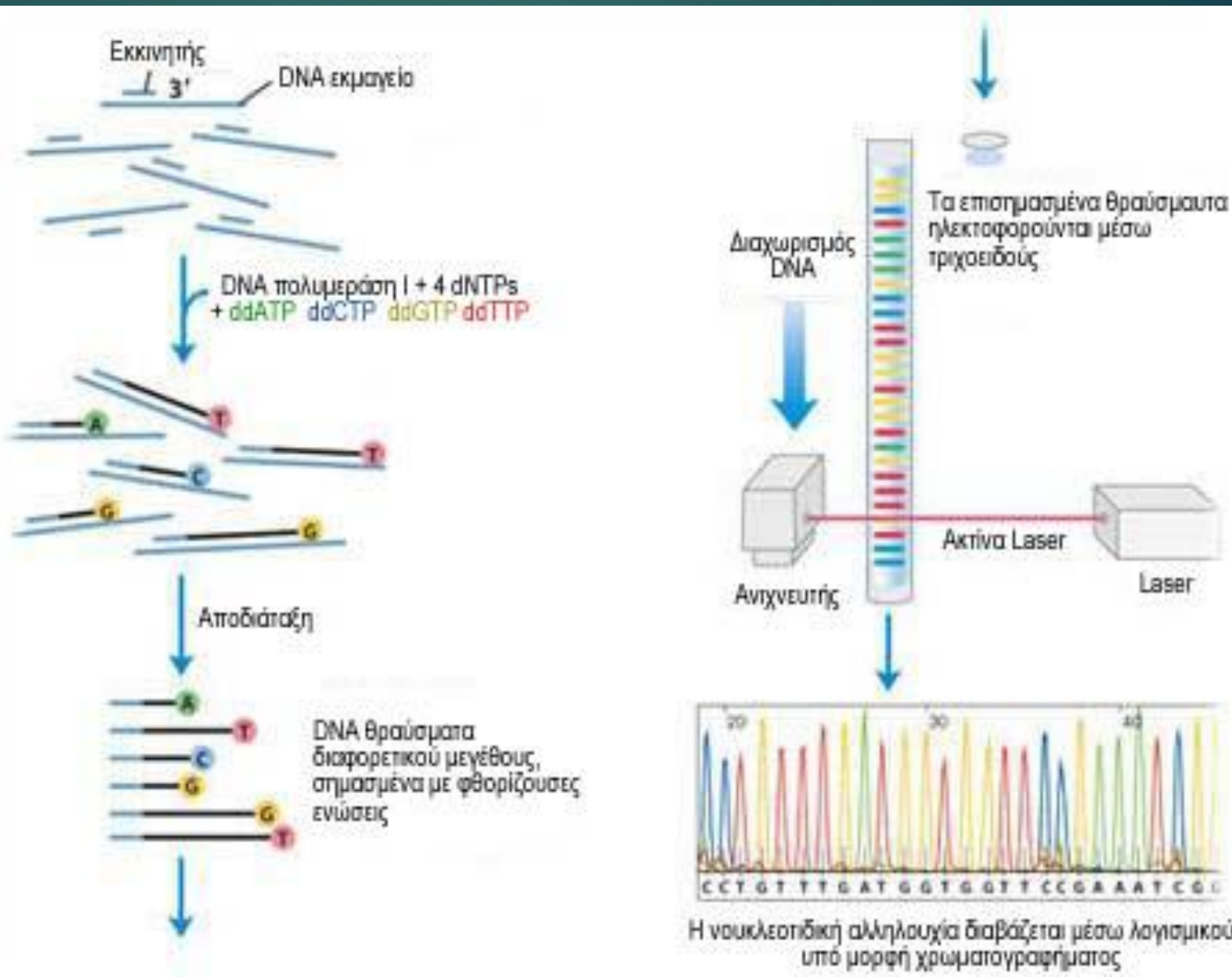
Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα
(DNA extraction).



Προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing)

- ✓ με τη μέθοδο κατά Sanger
- ✓ Με τη μέθοδο αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing)

Μέθοδος κατά Sanger



Next Generation Sequencing(NGS)

ILLUMINA

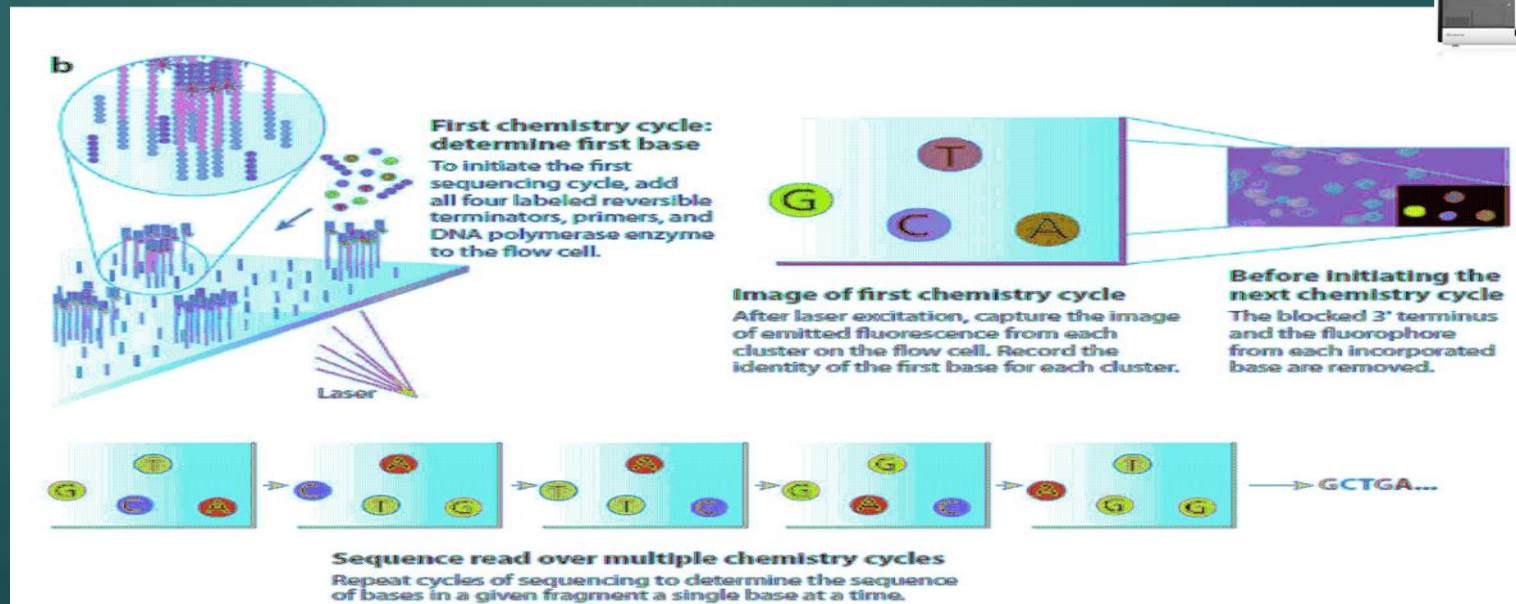
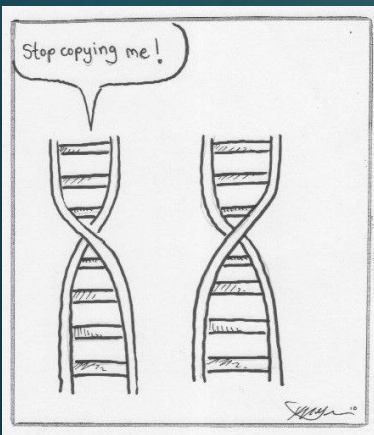
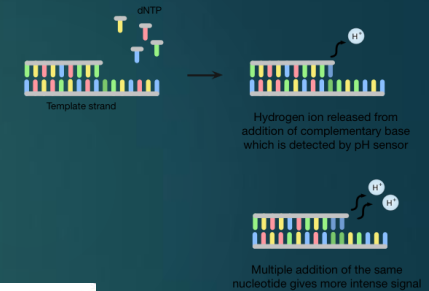
Ανίχνευση με φθοριόχρωμα

454

Ανίχνευση του παραγόμενου πυροφωσφορικού

ION TORENT

Ανίχνευση των H⁺ που απελευθερώνονται κατά τον πολυμερισμό





Διαφορετικά βήματα
για αλληλούχιση,
διαχωρισμό και
ανίχνευση

Δύσκολη
αυτοματοποίηση της
προετοιμασίας του
δείγματος

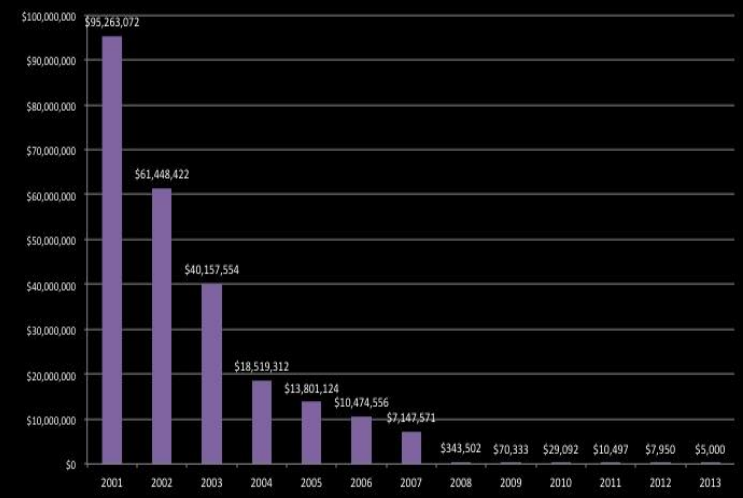


Χρησιμοποιεί και τα 3
βήματα σε ένα,
παράγοντας
εκατομμύρια
αντιδράσεων
παράλληλα.

Πολύ μεγάλες ταχύτητες
και υψηλή απόδοση με
μειωμένο κόστος.

Κεντρικό ρόλο στην
ανακάλυψη νέων
γονιδίων.

The Cost of Sequencing the Human Genome



A [HGVS](#) affiliated database
 References : [2003](#) [2004](#) [2008](#)



This web site was supported
 by the [EU 5th framework](#)

Editor in chief: [Isabelle Touitou](#)

The registry of Hereditary [Auto-inflammatory](#) Disorders Mutations

Hereditary Recurrent Fevers

[CAPS](#) [FMF](#) [NAPS12](#) [MKD](#) [TRAPS](#)

Pyogenic Disorders

[DIRA](#) [Majeed Syndrome](#) [PAPA](#)

Granulomatous Disorders

[CD/BS/EOS](#) [Cherubism](#)

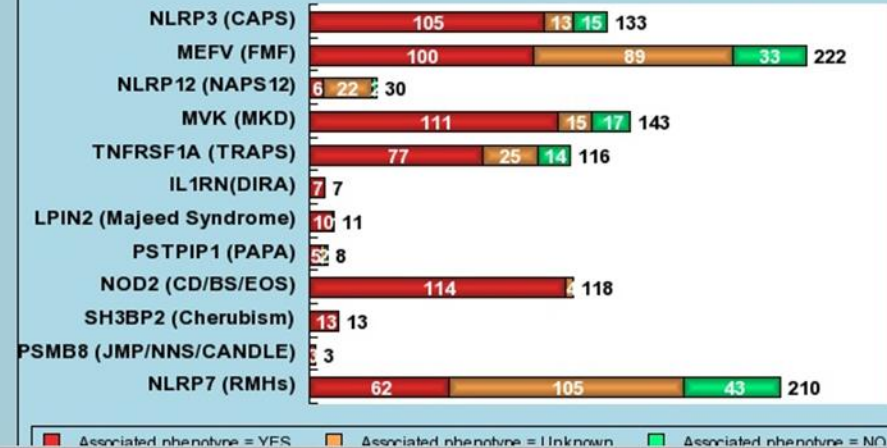
Proteasome disability

[JMP/NNS/CANDLE](#)

Reproductive Wastage

[DIRA](#)

Current number (1014) of sequence variants in the database



A [HGVS](#) affiliated database
References : [2003](#) [2004](#) [2008](#)



This web site was supported
by the [EU 5th framework](#)



The Human Gene Mutation Database

at the Institute of Medical Genetics in Cardiff
Copyright © Cardiff University 2012. All rights reserved

HGMD® Professional
Access the most up-to-date mutation data

HGMD® Professional contains over 120,000 inherited disease-relevant mutations



BIOBASE
BIOLOGICAL DATABASES

Search help

Statistics

New genes

What's new

Background

Publications

Contact us

Register

Log in

Locus-specific databases

Other useful links

Gene symbol

Symbol: Missense/nonsense



HGMD introductory text is available in 40 different languages. Please click on a flag to proceed.

[HGMD Professional](#) includes 1. Up-to-date mutation data; 2. Fulltext indexing

This database is maintained by D.N. Cooper, E.V. Ball, P.D. Stenson, A.D. Phillips, K. Shaw and M.E. Mort.




*Please note that this less up-to-date public version of our database is freely available only to [registered](#) users from academic institutions/non-profit organisations. All commercial users are required to purchase a license from BIOBASE, our commercial partner. A license to [HGMD Professional](#) is available to both commercial and academic/non-profit users wishing to access the most up-to-date version of the database (see [example](#) HGMD Professional entry). Read more about how HGMD is [funded](#).



<u>Table:</u>	<u>Description:</u>	<u>Public entries:</u> <small>This site. Academic/non-profit users only</small>	<u>Total entries:</u> <small>HGMD Professional 2011.4</small>
Mutation totals (as of 2012-03-26)		85840	120004
Gene symbol	The gene description, gene symbol (as recommended by the HUGO Nomenclature Committee) and chromosomal location is recorded for each gene. In cases where a gene symbol has not yet been made official, a provisional symbol has been adopted which is denoted by lower-case letters.	3253	4411
cDNA sequence	cDNA reference sequences are provided, numbered by codon.	3195	4320
Genomic coordinates	Genomic (chromosomal) coordinates have been calculated for missense/nonsense, splicing (release 2011.3), regulatory, small deletions, small insertions and small indels.	0	106621
HGVS nomenclature	Standard HGVS nomenclature has been obtained for missense/nonsense, splicing (release 2011.3), regulatory, small deletions, small insertions and small indels.	0	107178

Editor in chief: [Isabelle Touitou](#)


The registry of Hereditary [Auto-inflammatory Disorders Mutations](#)



The Human Gene Mutation Database
at the Institute of Medical Genetics in Cardiff
Copyright © Cardiff University 2012. All rights reserved

HGMD® Professional
Access the most up-to-date mutation data

HGMD® Professional contains over 120,000 inherited disease-relevant mutations



BIOBASE
BIOLOGICAL DATABASES

Search help

Statistics

New genes

What's new

Background

Publications

Contact us

Register

Log in

Logus-specific databases

Other useful links

Gene symbol

Symbol: Missense/nonsense

IDbases - databases for immunodeficiency-causing mutations

[Home page](#) [Available databases](#) [Our publications](#) [Staff](#) [About database](#)

Immunodeficiency Mutation Databases:

ADAbase	FF10	Adenosine deaminase deficiency (ADA)
AICDAbase	FF17	Non-X-linked hyper-IgM syndrome
AIREbase	FF72	Autoimmune polyendocrinopathy with candidiasis and ectodermal dystrophy (APECED)
AP3B1base	FF108	Hermansky-Pudlak syndrome 2
BIRC4base	FF165	X-linked lymphoproliferative syndrome
BLMbase	FF89	Bloom syndrome
BLNKbase	FF24	BLNK deficiency
BTKbase	FF22	X-linked agammaglobulinemia (XLA)
C1QAbase	FF48	C1q α polypeptide deficiency
C1QBbase	FF49	C1q β polypeptide deficiency
C1QCbase	FF50	C1q γ-polypeptide deficiency
<small>(previously known as C1QGbase)</small>		
C1Sbase	FF52	C1s deficiency
C2base	FF90	C2 deficiency
C3base	FF61	C3 deficiency
C5base	FF91	C5 deficiency
C6base	FF10	C6 deficiency
C7base	FF93	C7 deficiency
C8Bbase	FF56	C8B deficiency
C9base	FF94	C9 deficiency
CASP4base	FF400	Autoimmune lymphoproliferative syndrome, type 1

Table:

Gene symbol

cDNA sequence

Genomic coordinates

HGVS nomenclature

[Get HGMD Professional](#) *Please users to access

1.4

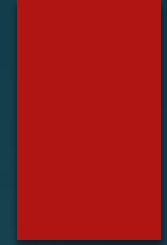
0004

4411

4320

06621

07178



Χρήσιμες Διευθύνσεις

- http://bioinf.uta.fi/base_root/
- <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
- <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/>
- <http://www.hgvs.org/mutnomen/>
- <http://www.esid.org/>
- <http://www.paed-anosia.gr/>

Βαριά Μικτή Ανοσοανεπάρκεια Severe Combined Immunodeficiency (SCID)

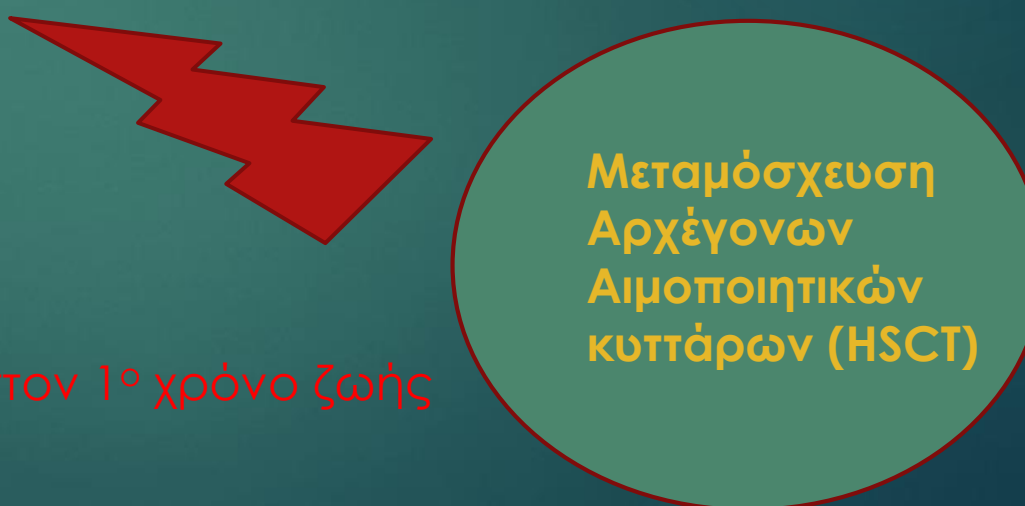
Γενετικά ετερογενής ομάδα διαταραχών

Γεννιούνται γενικά υγιή (μητρικά IgG αντισώματα)

- ✓ σοβαρές και επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις,
- ✓ χρόνια διάρροια και
- ✓ υπολειπόμενο βάρος

Καθόλου ή λίγα T κύτταρα

Καθόλου ή μη λειτουργικά B κύτταρα



Μεταμόσχευση
Αρχέγονων
Αιμοποιητικών
κυττάρων (HSCT)

Βρέφη με SCID: μη αντιμετωπίσιμη λοίμωξη στον 1^ο χρόνο ζωής
20% —————> οικογενειακό ιστορικό

Προσυμπτωματικός έλεγχος νεογνών NBS (New Born Screening)

Στόχος: να ανιχνεύσει θεραπεύσιμες διαταραχές που απειλούν είτε την ίδια τη ζωή είτε τη μακρόχρονη υγεία, **πριν γίνουν συμπτωματικές.**

ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ



μεγάλη θνητότητα και μερικές φορές πρόωμος θάνατος από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις

ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ



μείωση θνητότητας + θνησιμότητας

(μέσω του NBS)

Οι ΠΑΑ και ειδικά η SCID πληρούν τα κριτήρια για να συμπεριληφθούν στον NBS

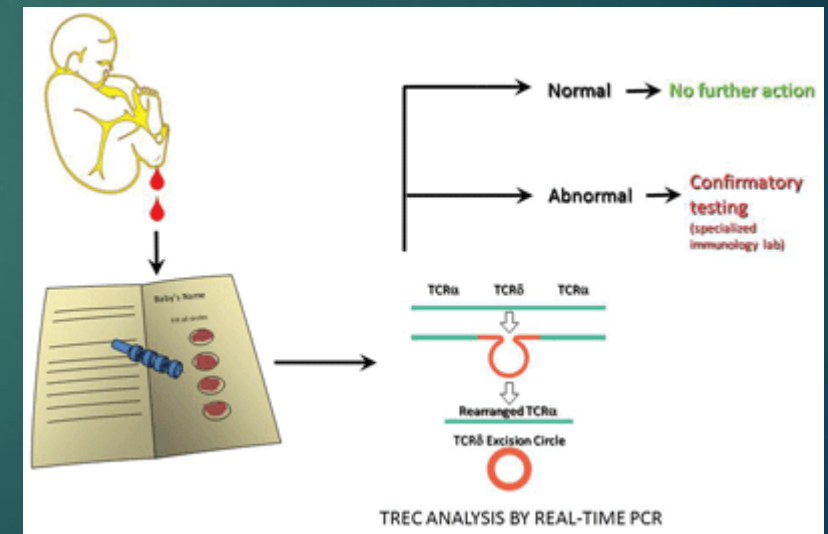


NGS

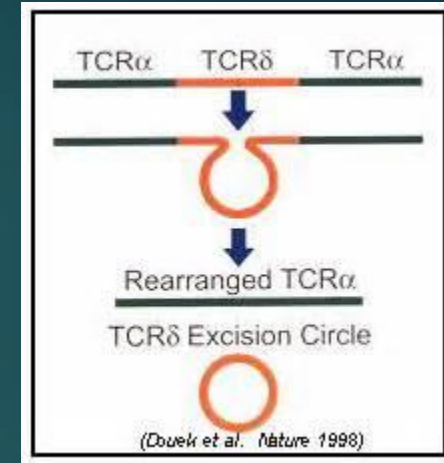
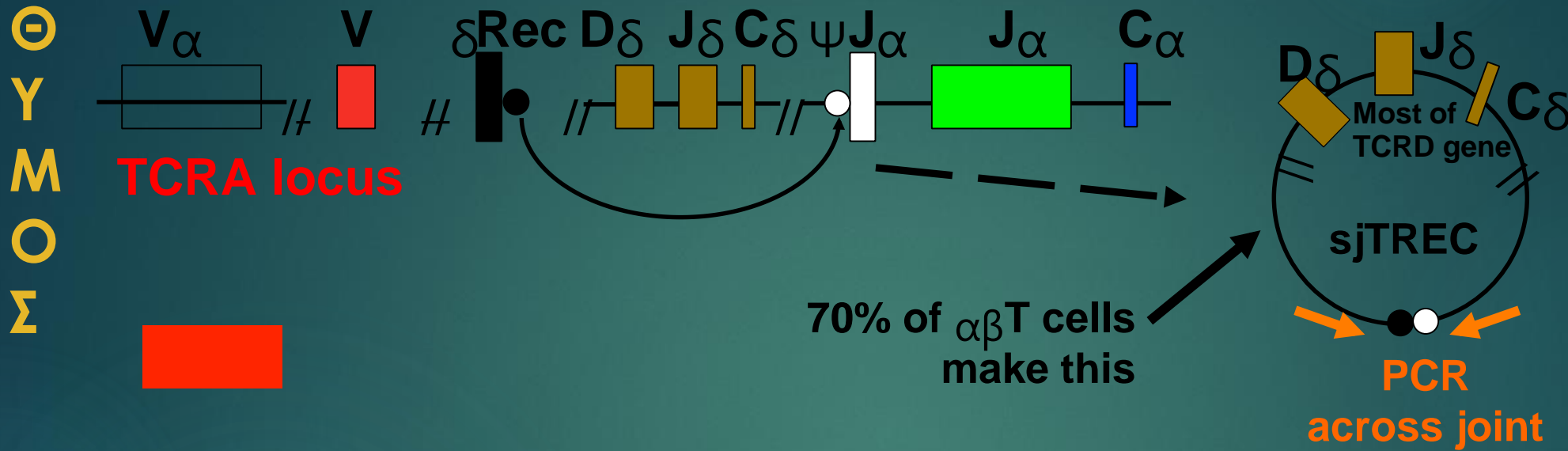
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ NBS ΓΙΑ ΤΟ SCID

Αρχικά: screening για ADA ανεπάρκεια με χρωματομετρική μέθοδο **X**

Σήμερα: ποσοτική PCR (Real Time PCR) $\xrightarrow{\text{DNA από DBS}}$ μέτρηση **TRECs**
(βιολογικός δείκτης των
παρθένων T κυττάρων)



TRECs (T cell Receptor Excision Circles)



Αρ. TRECs/κυτταρικό πληθυσμό \Rightarrow παραγωγή παρθένων T από το θύμο

Φυσιολογικά TRECs \Rightarrow βιολογικός δείκτης ικανοποιητικής παραγωγής T κυττάρων

Χαμηλά ή καθόλου TRECs \Rightarrow χαμηλή παραγωγή T ή αυξημένη απώλεια T

ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΗ: επαρκής για την PCR ποσότητα DNA

TRECs Screening Test

ΠΡΩΤΑΡΧΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ: Ανιχνεύει βρέφη με χαμηλά παρθένα T κύτταρα (SCID)

ΔΕΥΤΕΡΕΥΩΝ ΣΤΟΧΟΣ: Ανιχνεύει και άλλες ασθένειες με χαρακτηριστικό τους την T λεμφοπενία που επίσης οδηγούν σε μείωση των κυκλοφορούντων παρθένων T κυττάρων

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ TRECs

Καθορίζονται από το εργαστήριο που πραγματοποιεί τον νεογνικό έλεγχο

Φυσιολογικά νεογνά : 1 TREC/10 T κύτταρα
Παιδιά: 1 TREC/100 T κύτταρα
Ενήλικες: 1 TREC/1000 T κύτταρα



**Βρέφη με SCID : πολύ χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα TRECs
(τα μητρικά T δεν αυξάνουν τον αρ.TRECs)**

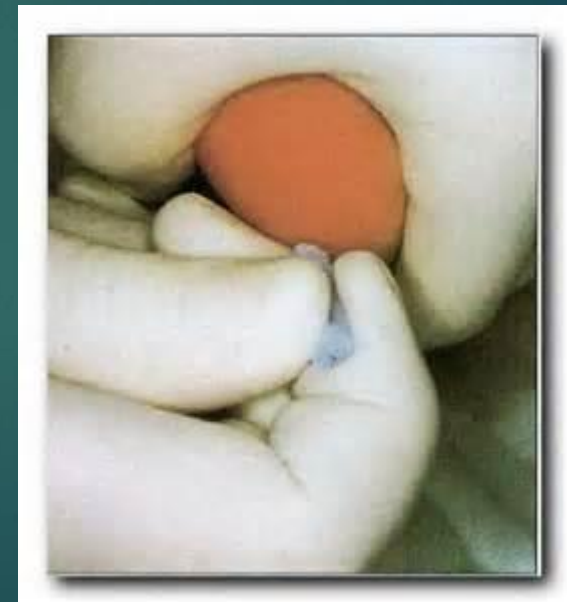
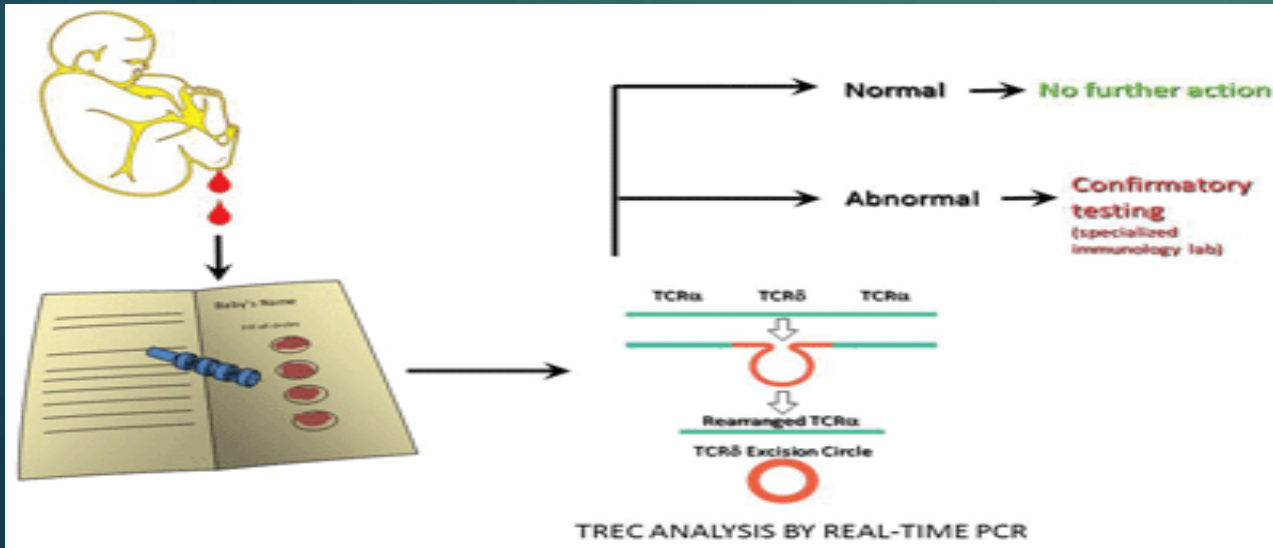
NBS-TRECs test



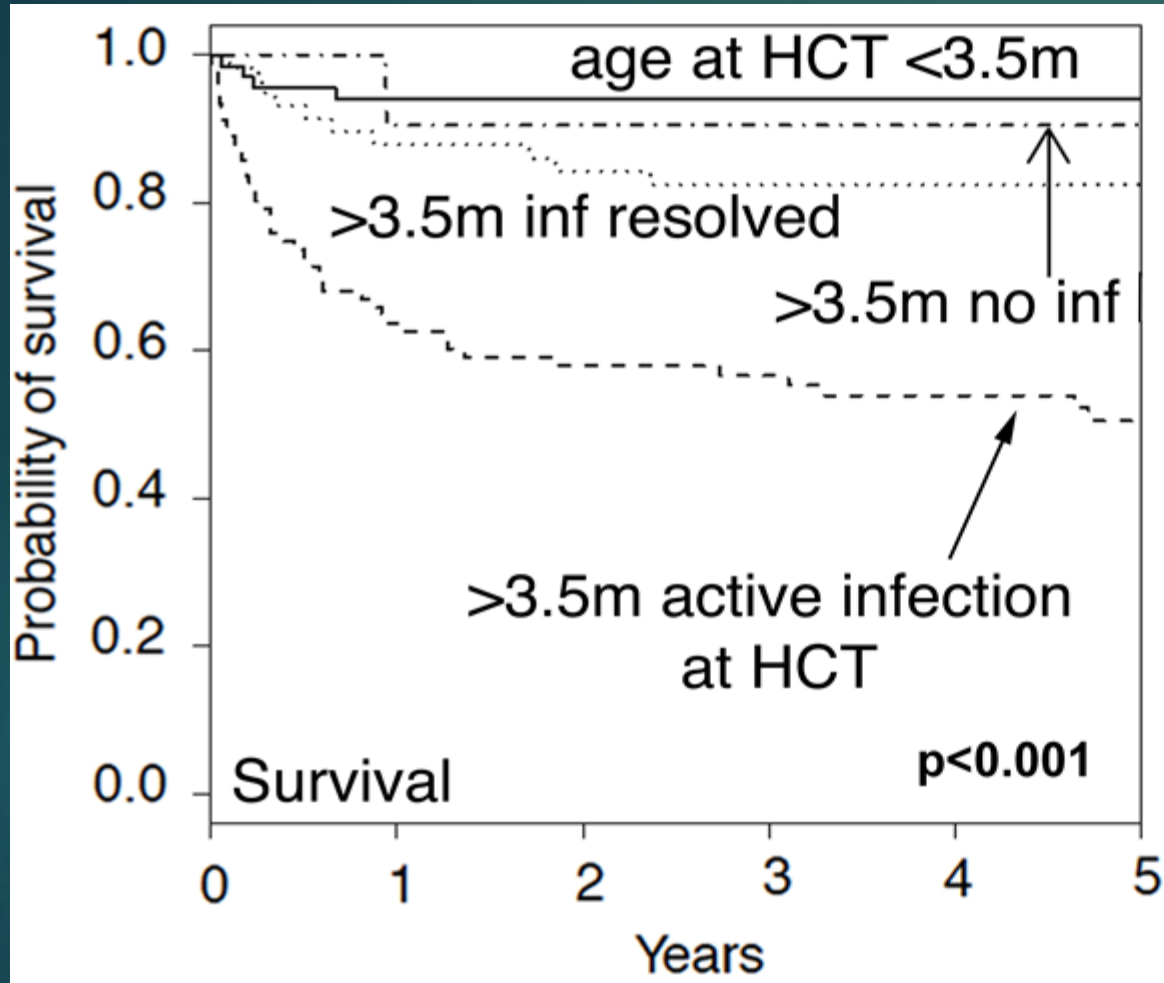
TRECs: κυκλικά DNAs σταθερά στις κηλίδες αίματος

TRECs screening:
ευαίσθητη, ειδική, οικονομική μέθοδος

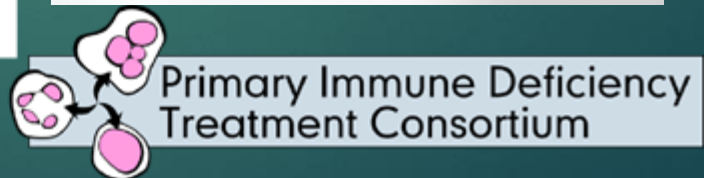
DBS (Dried Blood Spots) - εκχύλιση γενωμικού DNA - ποσοτική PCR ειδική για τα TRECs – αριθμός πρόσφατα σχηματισμένων T κυττάρων στο περιφερικό αίμα.



ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ 5 ΧΡΟΝΙΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΗCT



240 νεογνά



SCID – NBS -> 23 πολιτείες των ΗΠΑ (από τον Αύγουστο του 2014)

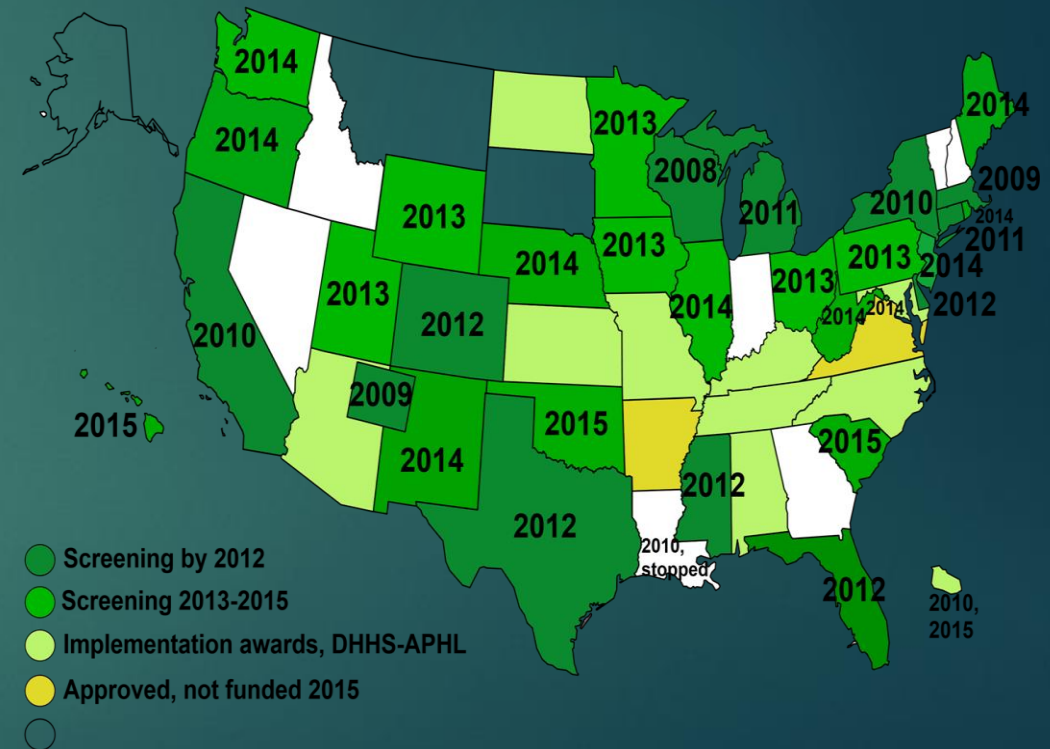
+

πυλοτικά προγράμματα σε Ευρώπη, Μ.Ανατολή και Ασία

Μελέτη από 11 προγράμματα NBS για SCID
(περισσότερα από 3 εκατ. βρέφη)

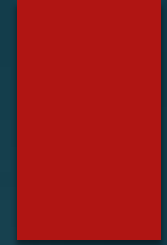
52 SCID και leaky SCID/Omenn

- ✓ συχνότητα 1:58000 γεννήσεις
- ✓ διπλάσια από τις προηγούμενες 1:100000 γεννήσεις



SCID: υποδιαγνωσμένο απουσία ενός αμερόληπτου προσυμπτωματικού ελέγχου

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΤΑΥΤΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΜΕ TRECS-TESTING



ανεπάρκεια	γεν.βλαβη	CD3/μl	απάντηση σε μιτογόνα %	μητρικά T	ολιγοκλωνικότητα
τυπικό SCID	σοβαρές μεταλλάξεις σε γνωστά SCID γονίδια	<300	<10	ναι	-
leaky SCID ή Σύνδρομο Omenn	ατελείς ή υπομορφικές μεταλλάξεις σε γνωστά SCID γονίδια	300-500		οχι	ναι
άτυπο SCID ή ιδιοπαθής T λεμφοπενία	Καμία μετάλλαξη σε γνωστά SCID γονίδια	300-1500			
σύνδρομα με T λεμφοπενία (DiGeorge, CHARGE, Rag2 και Dock8, αταξία-τηλεαγγειεκτασία		<1500 ή ανεπαρκής λειτουργία T	Τυπικό Di George (DGS) ✓ πολύ χαμηλά T ✓ χαμηλά T ✓ σχεδόν φυσιολογικά T	→	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ
δευτεροπαθής T λεμφοπενία		<1500	✓ συγγ.καρδική ανεπάρκεια ✓ νεογνική λευχαιμία ✓ προγεννητική χορήγηση γλυκοκορτικοειδών ✓ φλεγμονώδεις καταστάσεις (σήψη) ✓ Πρόωρα με χαμηλό σωματικό βάρος (χωρίς συγγενή ανωμαλία ή αναγνωρίσιμη διαταραχή)		

Χωρίς το NBS
 Θα ήταν αδιάγνωστα
 και ευάλωτα σε λοιμώξεις

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΜΕ TREC_s-TESTING

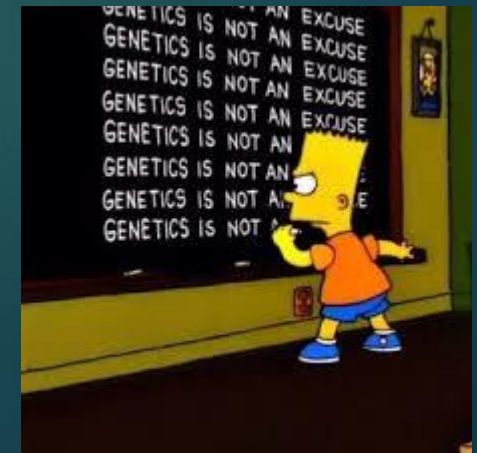
ΒΑΣΙΚΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ = ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΑ

ΑΙΤΙΑ	ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ
Γενετική βλάβη που επηρεάζει την εξέλιξη του T μετά τον ανασυνδυασμό του TCR στο θύμο	<ul style="list-style-type: none">✓ Ανεπάρκεια ZAP-70✓ MHC class-II ανεπάρκεια✓ Ανεπάρκεια CD40 ligand
Ατελείς ή υπομορφικές μεταλλάξεις σε γονίδια SCID	<ul style="list-style-type: none">✓ Late onset ADA -SCID
Διάφορες γενετικές βλάβες	<ul style="list-style-type: none">✓ Ποικίλες T ανεπάρκειες (αρκετά T κύτταρα ώστε να είναι πάνω από το cutoff)
Γενετικές βλάβες που αφορούν χυμική ανοσία	<ul style="list-style-type: none">✓ Φυλοσύνδετη αγαμμασφαιριναιμία (XLA),✓ χρόνια κοκκιωματώδης νόδος (CGD) κα
Γενετικές βλάβες που εκδηλώνονται αργότερα	<ul style="list-style-type: none">✓ Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID)

ΑΡΑ: ένα αρνητικό TREC-test δεν αποκλείει την πιθανότητα μιας ΠΑΑ

Ευαισθητοποίηση των κλινικών γιατρών

- ✓ Κλινικές εκδηλώσεις
- ✓ Οικογενειακό ιστορικό πρώιμων θανάτων παιδιών
- ✓ Κακή ανάπτυξη
- ✓ Επαναλαμβανόμενες και σοβαρές λοιμώξεις
- ✓ Φυσικά χαρακτηριστικά



ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ TREC ΤΕΣΤ

SCID-NBS → παθολογικό όταν TRECs < cutoff

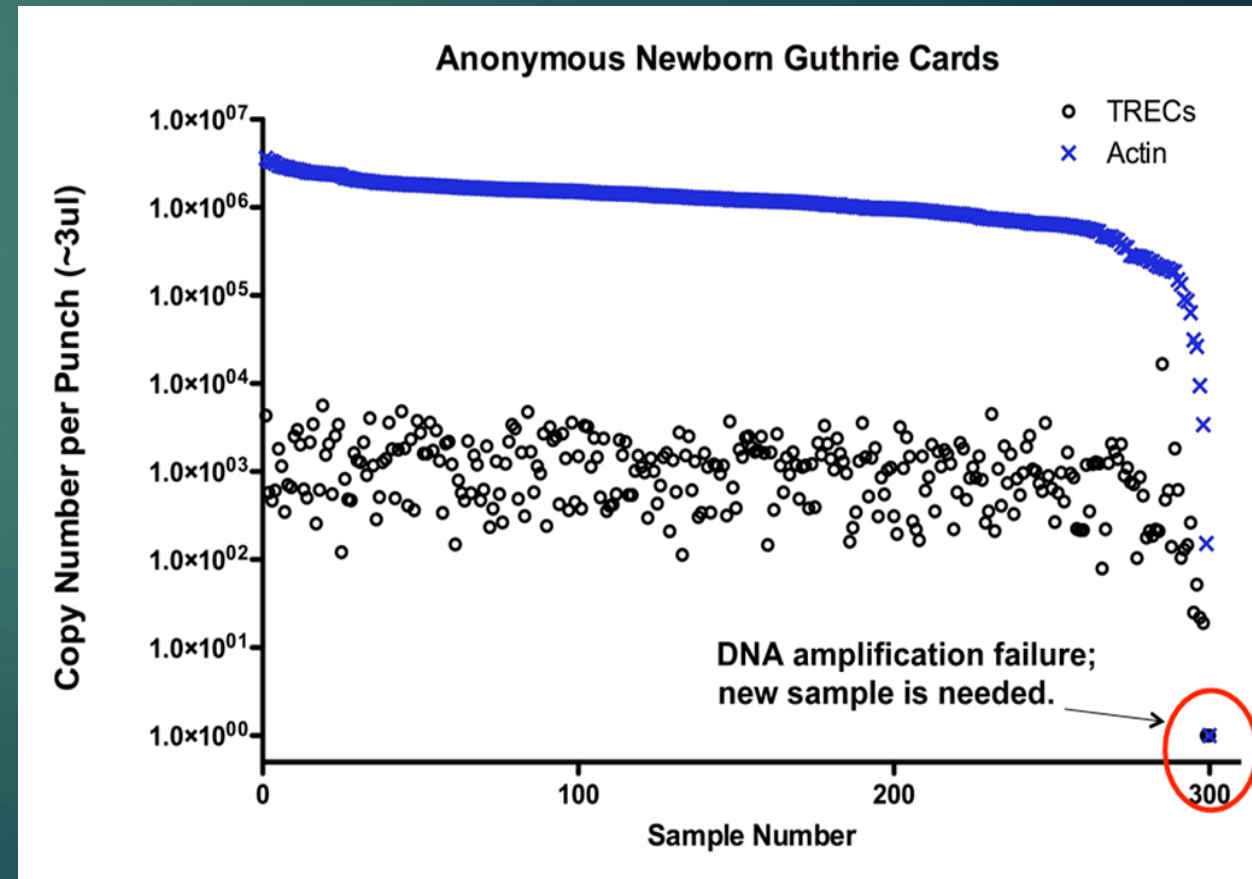
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ TRECs → εσφαλμένα αρνητικό (χαμηλά TRECs)

- ✓ Ανεπαρκής ποσότητα αίματος
- ✓ Αποτυχία εκχύλισης DNA
- ✓ Παρουσία αναστολέων της PCR (ηπαρίνη)



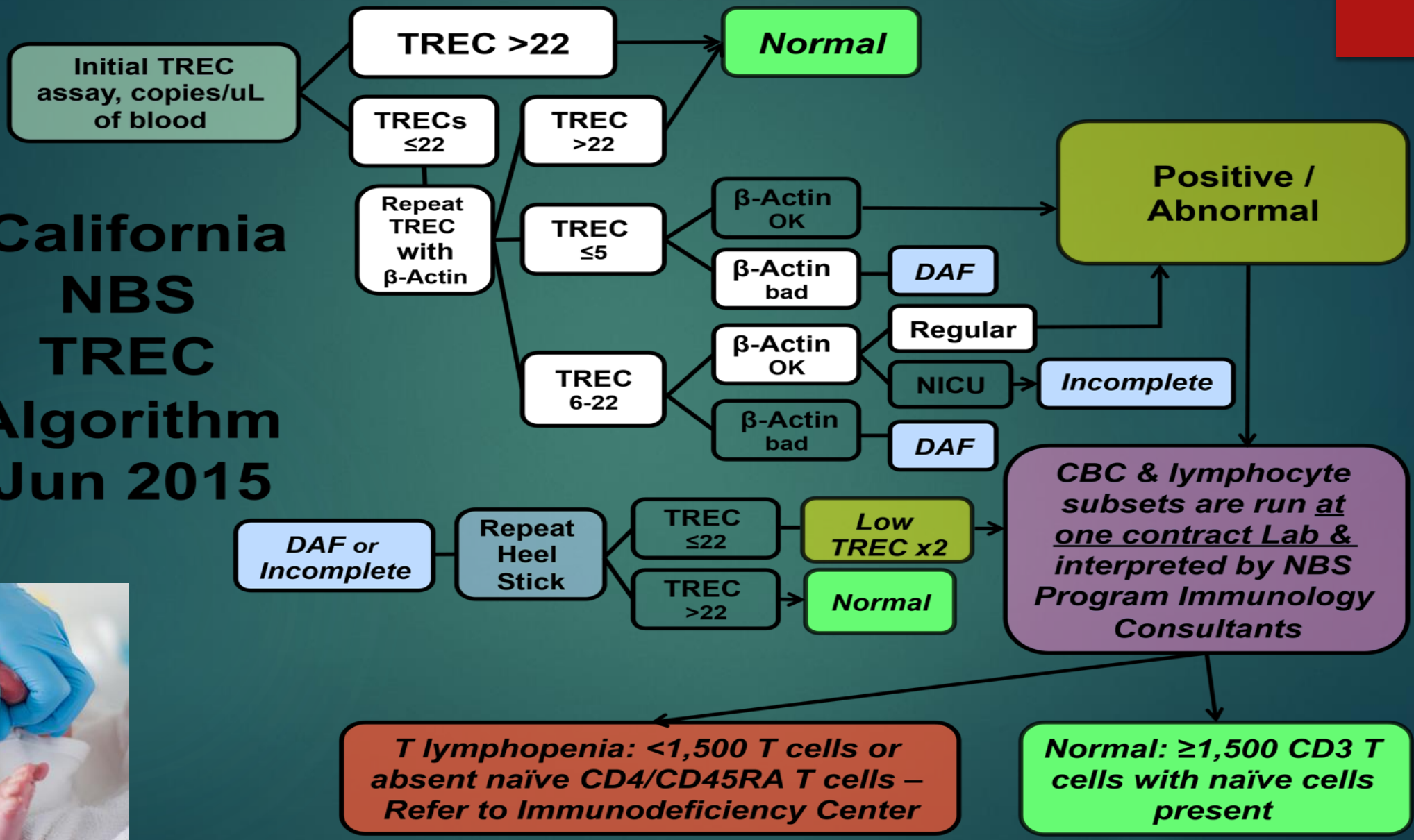
επανάληψη του τεστ με β-ακτίνη
(θετικός μάρτυρας)

Χαμηλά TRECs + χαμηλή ακτίνη=ανεπαρκές DNA



ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ TREC_s-TEST

California NBS TREC Algorithm Jun 2015



ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Μετά από ένα θετικό ή δύο ατελή τεστ

Προσδιορισμός T/B/NK φαινοτύπου

- ✓ Ολικά λευκά
- ✓ CD3,CD4,CD8 T λεμφοκυττάρων
- ✓ CD45RA/CD45RO για την ολιγοκλωνικότητα των T και για την ύπαρξη μητρικών T
- ✓ CD19 B κυττάρων
- ✓ CD16/CD56 NK κυττάρων

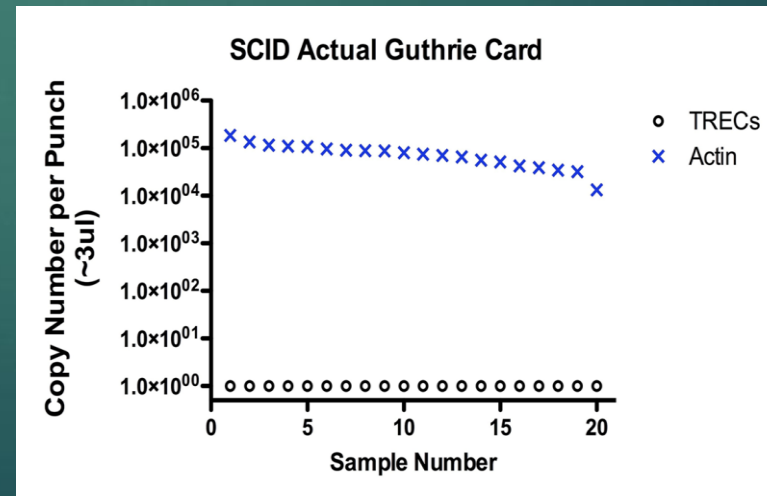
ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ

- $CD3 \leq 1500/\mu l$
- Απουσία παρθένων T
- Σύνδρομα με λίγα T ή δευτεροπαθής απώλεια T

- ❖ αντιβιοτικά
- ❖ γ-σφαιρίνη
- ❖ αποφυγή ζωντανών εμβολίων

ΟΡΙΣΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

- ✓ Έλεγχος της λειτουργίας του T μετά από διέγερση με μιτογόνα (PHA)
- ✓ Συγκέντρωση Abs στον ορό
- ✓ Τίτλοι Abs σε ειδικά Ags (εμβόλια)
- ✓ Γενετική ανάλυση (DNA sequencing)



NBS για B ανεπάρκειες

Μέτρηση KRECs

(Kappa Deleting Recombination Excision Circles)

Ωρίμανση των B κυττάρων
στο μυελό των οστών



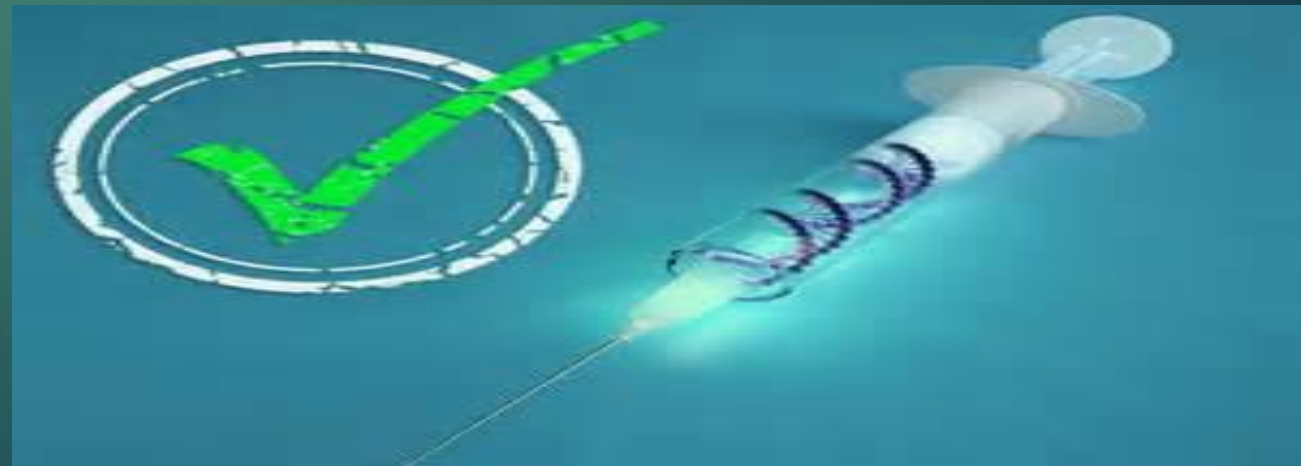
Απελευθέρωση KRECs

- ✓ σταθερά,
- ✓ δεν αντιγράφονται,
- ✓ κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα

Φυσιολογικά βρέφη = ανιχνεύσιμα KRECs

Μη ανιχνεύσιμα KRECs στο DNA από DBS

- ✓ B κύτταρα ανύπαρκτα ή δυσλειτουργικά (φυλοσύνδετη αγαμμασφαιριναιμία-XLA, ή B-SCID)
- ✓ Ανεπάρκεια της πρώιμης ωρίμανσης των B κυττάρων



TRECs + KRECs ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΜΕΤΡΗΣΗ



Ταυτοποίηση και άλλων ΠΑΑ

- ✓ ανεπάρκεια DOCK8,
- ✓ σύνδρομο υπερ-IgE,
- ✓ αταξία τηλεαγγειεκτασία και το
- ✓ σύνδρομο Comel-Netherton

Όμως πρέπει να καθοριστούν τα **cutoffs** ώστε να μην έχουμε πολλά ψευδώς θετικά

Disease	Genetic defect	Analysis		References
		TREC	KREC	
SCID	IL2RG	+	-	Chan and Puck (2005), Gerstel-Thompson et al. (2010), Morinishi et al. (2009)
	IL7RA	+*	-	Gerstel-Thompson et al. (2010)
	JAK3	+	-	Chan and Puck (2005), Hale et al. (2010), Morinishi et al. (2009)
	RAG1	+	+*	Morinishi et al. (2009)
	RAG2	+*	+*	
	Artemis (DCLRE1C)	+*	+*	
	LIG4	+	+*	Morinishi et al. (2009)
	DNA-PKcs	+*	+*	
	ADA	+	+*	Gerstel-Thompson et al. (2010), Morinishi et al. (2009)
	PNP	+	-	Gerstel-Thompson et al. (2010)
	AK2	+*	+*	
	CD3E	+*	-	
	CD3D	+*	-	
	CD3G	+*	-	
	CD3Z	+*	-	
	CD45	+*	-	
	CORO1A	+*	-	
DiGeorge syndrome	22q11.2 deletion	+	-	Routes et al. (2009)
Agammaglobulinemia	BTK	-	+	Nakagawa et al. (2011)
	IGHM	-	+*	
	BLNK	-	+*	
	CD79A	-	+*	
	CD79B	-	+*	
	L14.1	-	+*	

+, Analysis will yield aberrant result; -, analysis will not reveal aberrancies. *Expected based on immunological phenotype of the patient, but not yet demonstrated in dried blood spots.



ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ

- ✓ Γονιδιακός έλεγχος για ΧΚΝ
CYBB, CYBA, NCF1, NCF2
- ✓ Γονιδιακός έλεγχος για Χ-φυλοσύνδετο Hyper IgM
CD40L
- ✓ Γονιδιακός έλεγχος για Αυτοφλεγμονώδη Νοσήματα
TRAPS
TNFRSF1A
CAPS (CINCA, MWS, FCAS)
CIAS1
Hyper IgD
MVK

Στόχοι για το άμεσο μέλλον:

- ✓ SCID-NBS
- ✓ NGS

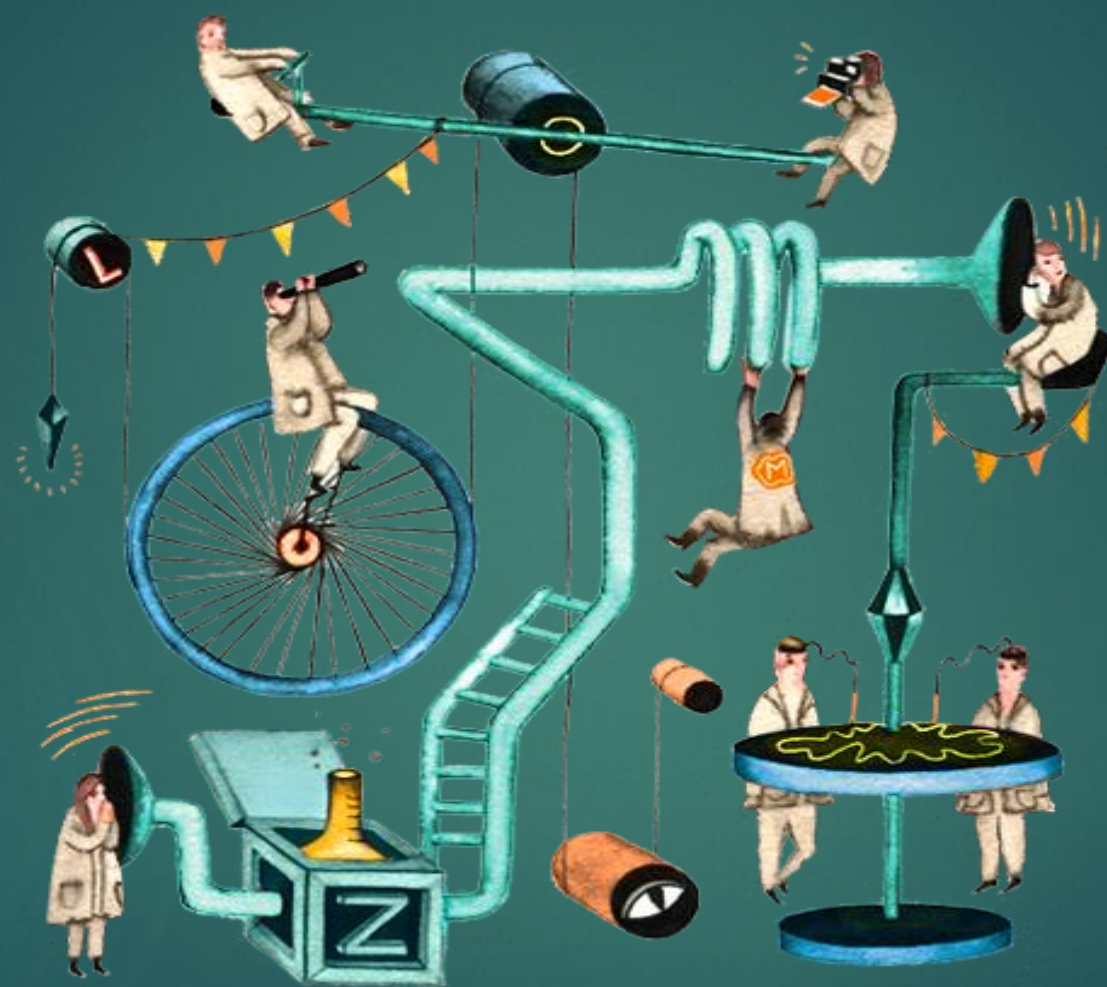
“IF WE DIDN'T HAVE GENETIC MUTATIONS, WE WOULDN'T HAVE US. YOU NEED ERROR TO OPEN THE DOOR TO THE ADJACENT POSSIBLE.”

STEVEN JOHNSON

© Lifehack Quotes

Mutations





Σας ευχαριστώ πολύ για την προσοχή σας!