Diagnosi prenatale delle malattie genetiche: presente e futuro

M. Ferrari[a,b,c], S. Galbiati[a], L. Cremonesi[a]

[a]*Unità di Genomica per la Diagnostica delle Patologie Umane, Centro di Genomica, Bioinformatica e Biostatistica, Istituto Scientifico "San Raffaele", Milano*
[b]*Università Vita-Salute "San Raffaele", Milano*
[c]*Diagnostica e Ricerca "San Raffaele", Milano*

Riassunto

La diagnosi prenatale di tipo invasivo basata sull'analisi del DNA fetale estratto da villi coriali o amniociti viene effettuata da circa 30 anni e nel tempo sono state sviluppate diverse metodologie diagnostiche per la caratterizzazione molecolare dei difetti causativi nei geni responsabili delle varie patologie. La recente identificazione di DNA fetale nel plasma materno ha consentito lo sviluppo di procedure alternative non invasive di diagnosi prenatale che non costituiscono un rischio per il feto. Il DNA fetale nel plasma materno si trova in presenza di un grande eccesso di DNA di origine materna e questo complica notevolmente l'identificazione di eventuali differenze di sequenza fetali e materne, dato che la maggior parte delle malattie genetiche è causata da mutazioni puntiformi. Sono pertanto necessarie metodiche avanzate di biologia molecolare dotate di elevata sensibilità e accuratezza che siano facilmente accessibili per consentirne una vasta applicazione in campo clinico.

Summary

Antenatal diagnosis of genetic diseases: present and future

Invasive prenatal diagnosis based on the analysis of fetal DNA extracted from chorioni villi or amniocytes has been performed during the last 30 years and since then a variety of diagnostic protocols for molecular characterization of causative mutations in genetic diseases have been developed. The recent identification of fetal DNA in maternal plasma made possible the application of alternative noninvasive procedures which do not constitute a risk for the fetus. Fetal DNA in maternal plasma is in the presence of an excess of maternal DNA which makes particularly difficult to distinguish between fetal and maternal sequences also because most genetic diseases are caused by point mutations. This demands the use of highly sensitive, accurate and accessible methodologies which have the potential to be applied in the routine clinical service.

Key-words: Antenatal diagnosis, genetic diseases, fetal DNA, pregnancy.

In questi ultimi anni, gli avanzamenti tecnologici nel campo della biologia hanno portato a una maggior comprensione delle basi molecolari delle malattie genetiche, fornendo nuove possibilità per la diagnosi prenatale di tali patologie. Scopo della diagnosi prenatale è di fornire un risultato diagnostico accurato nel minor tempo possibile e nelle fasi più precoci della gravidanza. Perché questo sia possibile è necessario: a) identificare tempestivamente le coppie a rischio per una malattia, b) caratterizzarne le mutazioni causative, c) ottenere il materiale genetico fetale nelle prime epoche gestazionali con metodiche sicure e d) determinare il genotipo fetale sulla base delle mutazioni parentali.

A partire dalle prime diagnosi prenatali di talassemia effettuate negli anni '70[1], sono state sviluppate varie metodologie diagnostiche per l'identificazione dei difetti molecolari e per la diagnosi prenatale di altre malattie genetiche. Nel corso degli anni abbiamo assistito ad una rapida evoluzione delle tecnologie impiegate basate essenzialmente sulla reazione di amplificazione (PCR)[2].

La maggior parte delle malattie genetiche è causata da mutazioni puntiformi ed il numero di mutazioni causative varia per ogni patologia. Pertanto, per determinare le mutazioni di cui sono portatrici le coppie a rischio vengono impiegate metodiche che consentono

Ricevuto: 27-04-2010 Pubblicato on-line: 07-05-2010

Corrispondenza a: Prof. Maurizio Ferrari, Istituto Scientifico "San Raffaele", via Olgettina n. 60, 20132 Milano.
Tel. 02-26432130, e-mail: ferrari.maurizio@hsr.it

di identificare o escludere in modo veloce e poco costoso la presenza di variazioni di sequenza all'interno di una regione e devono essere poi accoppiate a metodiche specifiche per caratterizzare con precisione le variazioni trovate. Inizialmente si effettuava la *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), successivamente questo metodo è stato sostituito dalla *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC). Il metodo DGGE permette di identificare variazioni di sequenza anche puntiformi all'interno di frammenti di DNA lunghi alcune centinaia di basi grazie alle loro differenti proprietà di dissociazione *"melting"* e quindi alla diversa migrazione elettroforetica in un gel di poliacrilamide contenente un gradiente chimico denaturante (formamide e urea)[3]. Il metodo DHPLC, veloce, molto processivo, poco costoso e completamente automatizzato, utilizza una colonna cromatografica per separare frammenti di DNA con sequenza diversa in base alla temperatura di *melting* (Tm) specifica[4].

Per l'analisi del DNA fetale vengono invece impiegati vari metodi per determinare la presenza o l'assenza delle mutazioni presenti nei genitori. Un metodo molto utilizzato in passato era la *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS), che sfrutta la capacità della DNA polimerasi di estendere solo *primer* perfettamente appaiati al DNA stampo all'estremità 3' e non estende *primer* che contengono un misappaiamento[5]. Allestendo due reazioni di amplificazioni separate, una delle quali utilizza *primer* complementari in 3' alla sequenza normale e l'altra *primer* complementari alla sequenza mutata, si determina il genotipo del campione in esame in base alla presenza o all'assenza del prodotto amplificato specifico per ogni *primer* impiegato. E' un metodo veloce, richiede solo un'analisi elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti amplificati, ma la messa a punto delle condizioni specifiche di reazione è laboriosa; inoltre non rappresenta l'approccio ideale in popolazioni con numerose mutazioni causative o multietniche.

Attualmente, i metodi più comunemente impiegati si basano sull'ibridazione del prodotto amplificato con probe oligonucleotidiche allele-specifiche (ASO), sia nel formato *dot-blot* che nel formato *reverse dot-blot* [6,7]. Per ogni mutazione vengono utilizzati due oligonucleotidi uno dei quali complementare all'allele *wild-type* e l'altro all'allele mutato. E' il principio base utilizzato dalle tecnologie emergenti dei *microarray*, ma può essere impiegato solo qualora le mutazioni in esame siano in un numero limitato. Ad oggi, tuttavia, la metodica d'elezione è il sequenziamento diretto del prodotto amplificato che è in grado di rilevare e caratterizzare qualsiasi tipo di mutazione all'interno di una regione genica. Questa metodica rappresenta ancora il *gold standard* ma non è accessibile a tutte le realtà diagnostiche per i costi elevati ed in molti laboratori viene applicata unicamente allo studio dei campioni in cui non sia stato possibile identificare la mutazione con altri metodi.

Altre metodiche più recenti per l'identificazione di mutazioni puntiformi includono *real-time* PCR con sonde fluorescenti allele-specifiche, *Oligonucleotide Ligation Assays*[8] basati su appaiamento e ligazione di sonde allele specifiche e saggi di *Melting Curve Analysis* (MCA) che discriminano gli alleli in base al differente profilo di melting[9].

Infine si stanno attualmente sviluppando tecniche innovative quali *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) per la rilevazione di delezioni. Questa tecnica consiste nella ligazione di due sonde oligonucleotidiche complementari alla regione in esame, nella successiva amplificazione con PCR universale delle coppie di sonde ligate, separazione dei frammenti amplificati mediante elettroforesi capillare in fluorescenza e analisi semiquantitativa dei prodotti di amplificazione[10].

Le conoscenze sempre maggiori del genoma umano e l'evoluzione della biologia molecolare hanno permesso la diagnosi in utero di un numero crescente di patologie genetiche. Ciò comporta inevitabilmente un aumento delle procedure invasive (amniocentesi e prelievo dei villi coriali) effettuate. Tali tecniche presentano un rischio di provocare un aborto compreso fra 0.5% e 1%; inoltre, per motivi ostetrici devono essere effettuate in epoche gestazionali precise, l'amniocentesi tra la 15ª e la 17ª settimana e la villocentesi tra la 10ª e la 12ª settimana di gravidanza.

Nel corso degli ultimi vent'anni la ricerca ha investito molto nello sviluppo di procedure diagnostiche che non costituiscano un rischio per il feto, rivolte alla ricerca di una fonte alternativa di materiale genetico fetale che potrebbero notevolmente diminuire l'impatto della diagnosi prenatale invasiva attualmente in uso.

Tali ricerche si basano su evidenze ormai ben conosciute che la placenta non costituisce, come si credeva in passato, una barriera che mantiene separati la madre e il feto geneticamente differenti ma si trova piuttosto al centro di un traffico bidirezionale tra madre e feto. Si sa da tempo che una piccola quantità di cellule fetali nucleate (elementi del trofoblasto, leucociti ed eritroblasti) attraversano fisiologicamente la placenta ed entrano nel circolo materno fin dalle prime settimane di gravidanza. E' stato stimato che il sangue della gestante contenga una proporzione di 1 cellula fetale ogni 100.000 -1.000.000 cellule nucleate materne[11]. Tuttavia è stato dimostrato che linfociti di origine fetale possono persistere dopo il parto anche per decenni nel sangue materno; pertanto il loro utilizzo nella diagnostica prenatale potrebbe portare ad errori interpretativi dovuti alla persistenza di cellule fetali da precedenti gravidanze.

Un avanzamento significativo in questo campo è stato compiuto grazie all'identificazione di DNA fetale circolante nel plasma delle donne gravide. Nel 1997 Lo e collaboratori[12], hanno scoperto la presenza nel plasma materno di DNA fetale libero proveniente da processi di lisi cellulare che costituisce circa il 3-6% del DNA totale nel plasma[13] e rappresenta quindi una fonte di

materiale genetico fetale più abbondante rispetto a quello ottenibile dalle cellule fetali circolanti. L'identificazione del DNA fetale nel plasma materno ha dato nuovo impulso allo sviluppo di strategie alternative per la diagnosi prenatale non invasiva di malattie genetiche ed il monitoraggio delle complicanze della gravidanza.

Analizzando il DNA del gene SRY come modello più semplice per distinguere il DNA fetale da quello materno in gravidanze con feto di sesso maschile, è stato dimostrato che il DNA fetale rappresenta una fonte ottimale di materiale genetico: uno studio effettuato su oltre 1800 donne con gravidanza fisiologica ha mostrato che il DNA fetale può essere identificato nel plasma materno a partire dalla sesta settimana di gestazione con un'accuratezza superiore al 99% estraendo DNA da 0,5 mL di plasma materno[14]. I dati ottenuti sull'accuratezza diagnostica nell'identificazione del sesso fetale sono fondamentali per un'applicazione alla diagnosi di malattie legate al cromosoma Y. Non sono stati ottenuti risultati falsi positivi neanche in donne con precedenti gravidanze con feti di sesso maschile o con aborti, sottolineando ulteriormente l'elevato potenziale diagnostico dell'analisi su plasma materno. La valutazione di una serie di parametri clinici, demografici ed anamnestici ha mostrato che la concentrazione di DNA fetale non sembra essere influenzata dal numero di gravidanze precedenti, dal numero dei precedenti aborti e da tabagismo. Questo implica che il DNA fetale può essere considerato come un marcatore indipendente e che i valori di riferimento possono essere applicati a varie tipologie di donne gravide, quali nullipare e multipare, fumatrici e non fumatrici, etc.

Inoltre, vari studi hanno confermato la *clearance* completa del DNA fetale dal plasma materno dopo il parto, requisito essenziale per evitare errori diagnostici dovuti al persistere del DNA fetale nella circolazione materna derivante da gravidanze precedenti[15,16].

Un approccio simile basato sull'identificazione qualitativa di sequenze presenti unicamente nel feto ed assenti nella madre ha permesso la diagnosi prenatale non invasiva del genotipo Rhesud D[17], della distrofia miotonica[18], dell'acondroplasia[19] e della sindrome adrenogenitale[20].

La stessa strategia non può tuttavia essere applicata alla diagnosi prenatale non invasiva di malattie a trasmissione autosomica recessiva nelle quali il feto condivide gli stessi alleli della madre, incluso quello eventualmente mutato. In questi casi è possibile solo identificare l'allele fetale ereditato per via paterna.

Una delle difficoltà maggiori nell'analisi del plasma materno è che la maggior parte del DNA presente è costituita da sequenze di origine materna (>95%) che complicano notevolmente l'identificazione di eventuali differenze tra sequenze fetali e materne. Questo vale in modo particolare per le malattie mendeliane causate da mutazioni puntiformi o per tutte le situazioni in cui entrambi i genitori siano portatori dello stesso allele mutato e sia necessario distinguere gli alleli fetali ereditati dal padre o dalla madre mediante l'analisi di polimorfismi.

Inizialmente è stata riportata la diagnosi prenatale non invasiva di una delezione di 4 basi nel gene beta globinico che causa beta-talassemia nella popolazione cinese con amplificazione *real-time* e ibridazione con sonde fluorescenti di tipo TaqMan[21]. Più recentemente sono stati sviluppati dei saggi per identificare 4 mutazioni che causano beta-talassemia nel Sud-Est asiatico mediante *single-base extension* seguita da analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF[22]. L'allele fetale ereditato per via paterna è stato correttamente identificato in tutte le 11 gravidanze analizzate. Tuttavia questo approccio si basa sull'impiego di una apparecchiatura altamente sofisticata, con costi elevati e non facilmente accessibile. E' quindi necessario sviluppare strategie alternative che consentano un'applicazione più generalizzata.

Uno studio recente ha mostrato che le molecole di DNA di origine fetale sono generalmente più corte di quelle di origine materna[23]. Per cui è stata sviluppata una strategia di separazione dei frammenti secondo la taglia, basata su elettroforesi in gel di agarosio e successiva excisione della frazione del gel contenente frammenti di DNA con una taglia di circa 300 bp che ha portato all'arricchimento selettivo delle sequenze di DNA circolanti di origine fetale[24]. Questo protocollo che necessita di un prelievo di sangue di circa 15-20 mL, è stato applicato in combinazione con PCR in presenza di *peptide nucleic acids* (PNA) per la soppressione dell'allele normale prevalentemente materno e l'ulteriore arricchimento delle sequenze fetali, una strategia che il nostro gruppo aveva precedentemente proposto[25,26]. I PNA sono analoghi del DNA in cui lo scheletro zucchero-fosfato è sostituito da unità di N-(2aminoetil)glicine[27,28]. I PNA mimano il comportamento del DNA legandosi a filamenti di DNA complementare, ma con una forza e specificità molto maggiori. A causa della loro natura chimica differente, possono formare ibridi PNA-DNA dotati di stabilità termica molto più elevata dei corrispondenti ibridi DNA-DNA e questa caratteristica ne permette l'impiego nelle reazioni di PCR a temperature di *annealing* più elevate. Inoltre ibridi PNA-DNA sono più destabilizzati dalla presenza del misappaiamento di una singola base rispetto agli ibridi DNA-DNA, caratteristica che rende i PNA molto utili nella discriminazione di mutazioni puntiformi. E' stato dimostrato che PNA appositamente disegnati possono inibire l'allele normale permettendo l'amplificazione selettiva dell'allele mutato[26]. Per cui qualsiasi tecnica di identificazione di mutazioni basata sulla reazione di PCR può essere combinata con l'impiego di PNA che blocchino (*clamping*) sequenze complementari specifiche. La tecnica di soppressione allelica mediante *PNA-clamping* può aumentare notevolmente la sensibilità delle metodiche esistenti. Il protocollo combinato di arricchimento basato sulla taglia e impiego di PNA è stato applicato alla diagnosi pre-

natale non invasiva di beta-talassemia in 32 gravidanze, con una specificità del 93.8% nell'identificazione delle mutazioni fetali ereditate per via paterna[24]. L'arricchimento di sequenze fetali mediante separazione elettroforetica e gel eluizione è comunque complicato, richiede molti passaggi manuali e può dar luogo facilmente a problemi di contaminazione.

Date queste premesse fondamentali il nostro gruppo si è proposto di mettere a punto metodologie avanzate dotate di elevata sensibilità e accuratezza, che siano tuttavia facilmente accessibili per consentirne una vasta applicazione in campo clinico.

Abbiamo accoppiato la strategia di arricchimento mediante PNA con il sistema a microchip microelettronici come riferimento al quale comparare altre metodiche avanzate di diagnostica molecolare, quali *pyrosequencing* e *direct sequencing*. Abbiamo sviluppato con il sistema a microchip microelettronici i saggi per identificare le 7 mutazioni prevalenti nel gene beta-globinico responsabili della beta talassemia nella popolazione mediterranea. Abbiamo quindi applicato tale approccio all'analisi di campioni di plasma di donne gravide portatrici di una mutazione differente da quella del partner prima che si sottoponessero a diagnosi prenatale invasiva. In totale abbiamo effettuato in cieco 41 diagnosi prenatali su plasma materno col sistema microchip, con completa concordanza con i risultati ottenuti su DNA fetale estratto da villi coriali. Quattro diagnosi (4/4) sono state confermate anche con *pyrosequencing* e 27/28 sono state confermate con *direct sequencing*[29]. L'uso dei PNA è tuttavia laborioso e non è trasferibile a tutti gli ambiti diagnostici.

Non esistono attualmente strategie consolidate dotate di accuratezza elevata per l'analisi diretta del genotipo fetale su plasma materno, che siano di facile applicazione, automatizzate, ad alta processività e facilmente accessibili.

Recentemente abbiamo sviluppato un sistema basato sull'impiego di una tecnologia *microarray* che utilizza slide di silicio funzionalizzate con un polimero innovativo che consente la deposizione di *probe* ad alta densità con basso *background* di fluorescenza, sviluppate specificamente per una rivelazione ottimale ultrasensibile del segnale. La validità del sistema è stata inizialmente dimostrata in saggi sviluppati per identificare una mutazione beta-talassemica e 3 polimorfismi del gene CFTR, in cui l'impiego delle slide funzionalizzate ultrasensibili ha permesso di identificare l'allele fetale ereditato per via paterna anche in assenza di PNA-clamping[30,31]. Stiamo attualmente applicando il sistema ad un'ampia casistica di coppie a rischio per beta-talassemia e validando i risultati con quelli ottenuti su DNA fetale estratto da villi coriali.

Bibliografia

1. Kan YW, Dozy AM. Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by D.N.A. analysis of amniotic-fluid cells. Lancet 1978; 2:910-2.
2. Harteveld CL, Kleanthous M, Traeger-Synodinos J. Prenatal diagnosis of hemoglobin disorders: present and future strategies. Clin Biochem 2009; 42:1767-79.
3. Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. Methods Enzymol 1987; 155:501-27.
4. O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, et al. Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. Genomics 1998; 52:44-9.
5. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res 1989; 17:2503-16.
6. Ristaldi MS, Pirastu M, Rosatelli C, Monni G, Erlich H, Saiki R, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia in Mediterranean populations by dot blot analysis with DNA amplification and allele specific oligonucleotide probes. Prenat Diagn 1989; 9:629-38.
7. Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86:6230-4.
8. Mueller PR and Wold B. In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. Science 1989; 246:780-6.
9. Shih HC, Er TK, Chang TJ, Chang YS, Liu TC, Chang JG. Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis. Clin Biochem 2009; 42: 1667-76.
10. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res 2002; 30:e57.
11. Bianchi DW. Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. J Perinat Med 1998; 26:175-85.
12. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997; 350:485-7.
13. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998; 62:768-75.
14. Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, et al. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. Hum Genet 2005; 117:243-8.
15. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet 1999; 64:218-24.
16. Smid M, Galbiati S, Vassallo A, Gambini D, Ferrari A, Viora E. No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. Hum Genet 2003; 112:617-8.
17. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998; 339:1734-8.
18. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. Clin Chem 2000; 46:301-2.
19. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from

maternal plasma. Lancet 2000; 356:1170.
20. Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. Clin Chem 2002; 48:778-80.
21. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. Lancet 2002; 360:998-1000.
22. Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY, et al. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:10762-7.
23. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2004; 50:88-92.
24. Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. JAMA 2005; 293: 843-9.
25. Cremonesi L, Galbiati S, Foglieni B, Gambini D, Ferrari M, Smid M, et al. Feasibility study for a microchip-based approach for non invasive prenatal diagnosis of genetic diseases. Ann N Y Acad Sci 2004; 1022:105-12.
26. Cremonesi L, Galbiati S, Foglieni B, Smid M, Gambini D, Ferrari A, et al. Feasibility study for a microchip-based approach for noninvasive pre-natal diagnosis of genetic diseases. Ann N Y Acad Sci 2004; 1022:105-12.
27. Orum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. Nucleic Acids Res 1993; 21:5332-6.
28. Nielsen PE, Egholm M, Buchardt O. Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. Bioconjug Chem 1994; 5:3-7.
29. Galbiati S, Foglieni B, Travi M, Curcio C, Restagno G, Sbaiz L, et al. Peptide-nucleic acid-mediated enriched polymerase chain reaction as a key point for non-invasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia. Haematologica. 2008; 93:610-4.
30. Galbiati S, Damin F, Di Carlo G, Ferrari M, Cremonesi L, Chiari M. Development of new substrates for high-sensitive genotyping of minority mutated alleles. Electrophoresis. 2008; 29:4714-22.
31. Bruno F, Damin F, Causarano V, Galbiati S, Di Carlo G, Seia M, et al. High-sensitive microarray substrates specifically designed to improve sensitivity for the identification of fetal paternally inherited sequences in maternal plasma. Clin Chem Lab Med 2009; 47:818-23.