

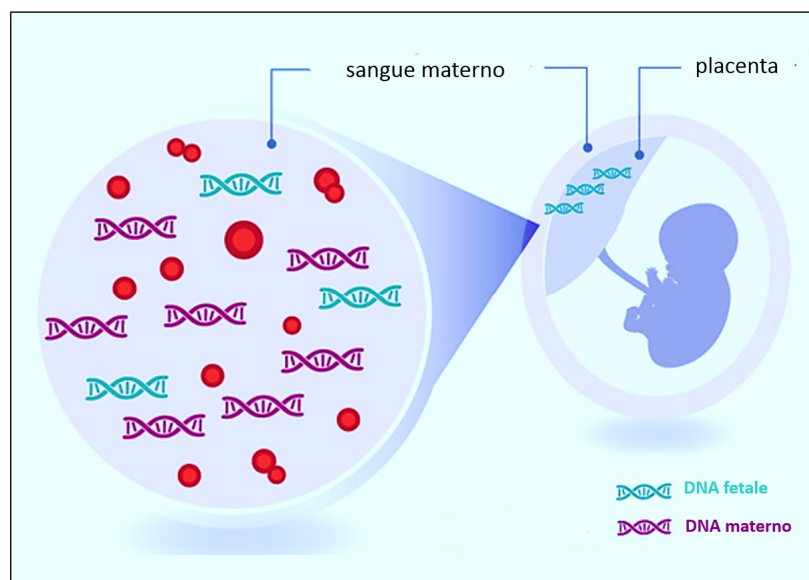


Ministero della Salute
Consiglio Superiore di Sanità

Sezione I

Linee-Guida

**Screening prenatale non invasivo basato sul DNA
(*Non Invasive Prenatal Testing – NIPT*)**



Nel plasma materno in gravidanza sono presenti cellule fetali nucleate e DNA libero (cffDNA) non-cellulare proveniente dalle cellule della placenta

Maggio 2015

1. Introduzione

Le tecniche di diagnosi prenatale comprendono indagini strumentali e di laboratorio, sviluppate negli ultimi 50 anni, con l'obiettivo di monitorare il concepito, a partire dalle prime fasi dello sviluppo embrionale fino ai momenti che precedono il parto.

L'**ecografia prenatale**, cioè il monitoraggio della gravidanza mediante ultrasuoni, è la tecnica non invasiva di diagnosi prenatale più importante e diffusa. Viene impiegata per monitorizzare lo sviluppo dell'embrione e del feto, verificarne il benessere, seguire l'evoluzione della gravidanza e come supporto alle indagini invasive che prevedono l'acquisizione di tessuti fetali. La non invasività e l'innocuità della tecnica, che ne consente la ripetizione nel corso della gravidanza, insieme all'elevato grado di risoluzione ottenuta con le apparecchiature di ultima generazione, giustificano la straordinaria diffusione dell'ecografia prenatale che, nei paesi industrializzati, viene utilizzata pressoché in tutte le gravidanze, proponendosi come un vero e proprio strumento di screening prenatale. Le potenzialità della tecnica correlano direttamente con l'epoca gestazionale in cui viene utilizzata, la risoluzione della apparecchiatura e l'esperienza dell'operatore.

Gli **screening prenatali non invasivi**, sviluppati negli ultimi 30 anni, si basano essenzialmente sull'analisi di marcatori biochimici sul sangue materno, combinati con le indagini ecografiche. Il prototipo di queste analisi è stato il dosaggio dell'alfa fetoproteina (AFP), inizialmente utilizzato come marcatore dei difetti del tubo neurale (valore aumentato) e, successivamente, della sindrome di Down (SD; valore ridotto). Con il tempo questi screening, basati sulla associazione di marcatori diversi, hanno ottenuto un crescente sviluppo nel calcolo della probabilità delle aneuploidie fetali, soprattutto nelle madri che rientravano nella fascia di età a bassa probabilità di patologie cromosomiche nel feto, e perciò non candidate al monitoraggio invasivo della gravidanza. Il triplo-test (o tri-test) basato sul dosaggio, nel secondo trimestre, dell'AFP, della gonadotropina corionica e dell'estriolo non coniugato, combinato con l'età materna e con l'età gestazionale misurata ecograficamente, consentiva di predire circa il 65% delle SD, con una percentuale di falsi positivi compresa tra il 5 ed il 10%. A questo protocollo ne sono stati affiancati nel tempo numerosi altri, basati su vari marcatori, in diverse combinazioni, e sull'anticipazione dello screening dal secondo al primo trimestre. Parallelamente, i marcatori biochimici sono stati integrati con quelli ecografici, in particolare l'analisi dello spessore della cute nucale (translucenza nucale - TN), che, sebbene non patognomonico della SD, tra l'XI e la XIV settimana di amenorrea, diagnostica circa il 75% dei casi, con una percentuale di falsi positivi del 5%. Negli ultimi anni si è affermato il bi-test, che utilizza il sangue materno acquisito attorno alla XI settimana, sul quale viene dosata la frazione libera della beta gonadotropina corionica ed una glicoproteina ad elevato peso molecolare, la *Pregnancy Associated Plasma Protein A* (PAPP-A). Questa analisi, integrata con la misurazione della TN e l'età materna, predice circa l'80% delle SD, con una percentuale di falsi positivi pari a circa il 6% (si veda anche l'allegato 1). In questo contesto va considerato anche il test contingente (TN + marker biochimici a 11-13 settimane; marker ecografici a 12-13 settimane o biochimici a 14-16 settimane nei gruppi a probabilità intermedia), che consente di migliorare la specificità del test (Nicolaidis et al 2014).

2. Il DNA libero nel sangue materno

Lo (1997) ha descritto per primo la presenza del cromosoma Y nel plasma di alcune donne con feto di sesso maschile, utilizzando l'analisi del DNA libero presente nel circolo materno (cfDNA).

E' stato dimostrato che, a partire dal primo trimestre di gravidanza, è presente nel circolo ematico materno DNA libero di origine fetale (*cell free fetal DNA*, cffDNA), che può essere recuperato in maniera non-invasiva ed utilizzato per lo studio di alcune patologie fetali.

Il cfDNA origina dalla lisi delle cellule materne e placentari. A partire dalla V settimana di amenorrea, il citotrofoblasto placentare si ancora alla decidua parietale uterina, le arterie spirali deciduali irrorano le lacune presenti tra la decidua e la placenta, il citotrofoblasto invade e tappezza le pareti delle arterie uterine spiraliformi e le rimodella. Il ricambio delle cellule del trofoblasto, che ricopre le pareti delle arterie spiraliformi, mediato dalle citochine, libera il DNA. I frammenti di DNA fetale degradato contengono circa 180 paia di basi (bp) e sono sospesi nel plasma arterioso.

Il cffDNA può essere isolato precocemente a partire dalla X settimana, quando raggiunge quantità sufficienti per il potenziale impiego clinico. La sua percentuale può variare tra <4%, una quantità non utile per la diagnosi, e circa il 40%, con una media del 10%, alla XII settimana, quando il 90% circa dei frammenti di DNA libero circolante nel plasma originano dall'apoptosi degli epitelii materni, creando una commistione di cfDNA materno e cffDNA. La percentuale del cffDNA viene definita "frazione fetale" (FF). Il cffDNA non è più reperibile nel circolo materno poche ore dopo il parto e probabilmente viene eliminato attraverso l'escrezione renale.

2.1 Generalità sul NIPT e sulla frazione fetale

Il principio dei protocolli di *Non Invasive Prenatal Test* (NIPT), indipendentemente dalla tecnica utilizzata, si basa su comparazioni. Prendendo ad esempio il cromosoma 21 (CR21), la tecnica confronta il numero dei frammenti appartenenti al CR21 nella gravidanza in esame, con il numero dei frammenti di un altro cromosoma dello stesso campione (confronto interno), atteso in una condizione di disomia (due copie di un determinato cromosoma, ad esempio il cromosoma 1 o il 10 o una loro combinazione), oppure con quelli di un *pool* di gravidanze disomiche (due CR21) di riferimento. Se il campione ottenuto dalla gravidanza in esame contiene due coppie di CR21 (due della madre e due del feto), il rapporto tra i conteggi (numero dei frammenti del CR21 nel test/numero dei frammenti nei campioni di riferimento disomici) è all'incirca uguale a 1.

Se nella gravidanza in esame è presente un feto con trisomia 21 (T21), aumenta la FF per la presenza di frammenti circolanti aggiuntivi rilasciati dal CR21 soprannumerario del feto. L'entità dell'aumento dipende dalla percentuale della FF totale e dal numero di bp del CR21, in rapporto alle bp del genoma complessivo del feto.

Il plasma materno contiene percentuali variabili della FF, che differiscono nei diversi campioni. Attorno alla XII settimana, mediamente, la FF corrisponde al 10% circa del cfDNA, con un *range* compreso tra <4% ed il 40%. A seconda della percentuale della FF totale presente nel campione, l'accuratezza dell'analisi del cromosoma può variare, analogamente all'aumento della percentuale

della FF totale, in presenza di una trisomia.

Prendendo come riferimento una percentuale del 10% della FF circolante, l'aumento della FF in presenza di una T21 è pari a circa il 5% del totale ed il rapporto (R) tra il numero di frammenti del CR21 nel campione in esame ed il numero dei frammenti di riferimento disomici aumenta da 1 a circa 1,05. Per una percentuale della FF pari al 20%, l'aumento della FF totale correlata alla presenza di una T21 nel feto è circa 10%, con il conseguente aumento del valore di R da 1 a circa 1,10. In presenza di una FF del 4%, l'aumento della FF correlato ad una T21 fetale è circa 2% ed il valore di R aumenta da 1 a circa 1,02. Infine, se la FF è inferiore al valore soglia del 4%, R è <1,02, un valore statisticamente non differenziabile da 1, che predice la disomia del CR21, cioè la normalità del feto. Questo spiega perché la soglia $\geq 4\%$ sia critica per evitare di avere risultati falsi negativi (FNR), in base all'assenza/insufficiente quantità della FF.

E' quindi opportuno verificare la percentuale della FF nel campione in esame, utilizzando protocolli che prevedono, prima o durante il NIPT, un altro test che di solito si basa sull'analisi di siti polimorfici a singolo nucleotide (cosiddetti SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms*).

Tuttavia non tutti i protocolli di NIPT al momento disponibili effettuano questa analisi. Alcuni test NIPT inseriscono la percentuale della FF nell'algoritmo per la formulazione della probabilità di presenza della trisomia indagata, mentre altri utilizzano fattori di normalizzazione predeterminati, che possono comunque raggiungere elevati livelli di affidabilità (Dan et al, 2012; Zhang et al, 2015)

2.2 Campioni non utilizzabili

E' stato stimato che, in circa il 2% dei campioni prelevati al termine del primo trimestre di amenorrea, la FF non superi la soglia del 4%. Uno studio preliminare suggerisce che la percentuale delle patologie cromosomiche in questi campioni sia significativamente più elevata, rispetto a quella dei campioni con $FF \geq 4\%$ (13,8% rispetto al 2,4%). Circa la metà di questi casi, sottoposti ad un secondo campionamento, confermano che la FF è <4%. Questi risultati, se confermati, suggerirebbero che i campioni in cui non è possibile ottenere un risultato predittivo, a causa della bassa FF, potrebbero fornire indirettamente la spia di un aumento della probabilità di una patologia cromosomica nel feto. Di conseguenza, la disponibilità dell'informazione sulla percentuale della FF presente nel campione potrebbe orientare la gestione clinica della gravidanza (Turocy et al, 2015).

3. Tecniche di analisi del cfDNA

Le tecniche in uso analizzano il cfDNA totale, senza differenziare quello fetale da quello materno. Trattandosi, di fatto, di indagini basate su una commistione di DNA materno e placentare, **il NIPT non è un test diagnostico, ma di screening**. Infatti, come nei test tradizionali, l'impiego di algoritmi dedicati permette di definire la probabilità post-test che il feto sia affetto da una delle principali trisomie autosomiche (trisomia 21 [T21], trisomia 18 [T18], trisomia 13 [T13]) o da un'aneuploidia dei cromosomi sessuali (X, XXX, XXY, XYY), analizzando selettivamente il numero dei frammenti di cfDNA contribuiti da ciascuno dei cromosomi oggetto del test.

Per l'analisi delle aneuploidie mediante NIPT si utilizzano tre principali tecniche basate sulle tecniche di sequenziamento di seconda generazione (*Next Generation Sequencing - NGS*): NGS dell'intero genoma; NGS di specifiche regioni; SNP, cioè polimorfismi di singoli nucleotidi. Si stanno attualmente proponendo NIPT basati sulla tecnologia degli *array* che, in base ai primi dati di validazione, sembrerebbero garantire le stesse *performance*, o addirittura superiori, rispetto alle tecniche di NGS (Juneau et al, 2014).

La tecnica della NGS dell'intero genoma si basa sul sequenziamento del cfDNA presente nel plasma materno, per generare milioni di sequenze brevi dell'intero genoma, che vengono poi mappate su una sequenza di riferimento del genoma umano, per stabilire la loro origine e contare il numero dei frammenti che originano dal cromosoma di interesse, messo a confronto con il numero dei frammenti ottenuti dagli altri cromosomi (Fan et al, 2008). Sono stati sviluppati diversi algoritmi per stabilire se, nel campione in esame, sia aumentato o diminuito il numero dei frammenti, in rapporto ad una soglia suggestiva di una aneuploidia (Fan et al, 2008; Lo et al, 2014; Sehenert et al, 2011). Così ad esempio, se un feto ha una T21, nel plasma materno saranno presenti più frammenti del CR21, rispetto a quanto atteso nei controlli senza T21.

Una tecnica alternativa di NGS amplifica selettivamente specifici loci genomici sul cromosoma d'interesse, che vengono in seguito sequenziati. Questa tecnica è più economica, in quanto riduce le regioni da sequenziare, ma ha il limite di studiare solo alcune regioni di interesse preselezionate. Successivamente ai primi studi di validazione della tecnica per le T21 e T18 su alcune popolazioni ad alto rischio, le successive indagini sulla popolazione generale hanno dimostrato che essa fornisce risultati affidabili anche sulle gravidanze che con un basso rischio a priori (Lau et al, 2014; McCullough et al, 2014; Norton et al, 2014; Norton et al, 2015; Pergament et al, 2014).

La terza tecnica è una variazione di quella precedente e si basa sull'amplificazione di numerosi loci polimorfi (SNP) sul cromosoma d'interesse (Nicolaidis et al, 2013; Zimmermann et al, 2012).

La sensibilità e la specificità nei confronti delle principali aneuploidie sono elevate per tutte e tre le tecniche, indipendentemente dagli strumenti utilizzati per il sequenziamento e dall'algoritmo bioinformatico utilizzato (Boon et al, 2013; Gil et al, 2014).

4. Esperienze sull'uso del cffDNA nello screening prenatale

Gli studi relativi all'uso del NIPT come test di screening sono stati promossi e realizzati dalle aziende che, a partire dal 2012, hanno avviato la sua commercializzazione, con finalità cliniche: *Sequenom (MaterniT21)*, *Verinata (Verifi)*, *Ariosa (Harmony)*, *Natera (Panorama)*, *BGI (Nifty)*.

Alcune Società Scientifiche (ACOG, ACMG, ASHG, ESHG, ISPD, ISUOG, NSGC, SIEOG, SIGU) hanno nel frattempo assunto posizioni concordanti sulla validità clinica, i limiti, gli aspetti etici ed economici, il significato ed il ruolo del NIPT (Dondorp et al, 2015).

4.1 Aneuploidie autosomiche

4.1.a Sensibilità e specificità dello screening delle T13, T18, T21 nelle gravidanze singole

Una recente metanalisi (Gil et al, 2015), relativa a 37 studi, ha riportato, per le tre principali aneuploidie autosomiche, nelle gravidanze singole, le seguenti percentuali di sensibilità (*detection rate - DR*) e di specificità (risultati falsi positivi - FPR) del NIPT:

- T21 - DR 99,2% (95% CI, 98,5-99,6%); FPR 0,09% (95% CI, 0,05-0,14%);
- T18 - DR 96,3% (95% CI, 94,3-97,9%); FPR 0,13% (95% CI, 0,07-0,20%);
- T13 - DR 91,0% (95% CI, 85,0-95,6%); FPR 0,13% (95% CI, 0,05-0,26%).

Diversi fattori giustificano queste discrepanze, compresa la presenza di un *vanishing twin*, una malattia metastatica materna, un mosaicismo cromosomico materno, l'assenza/insufficienza della FF, anche se la ragione principale sarebbe ascrivibile ad un mosaicismo feto-placentare. Infatti, il cffDNA presente nel plasma materno origina dal citotrofoblasto placentare che, come è noto, mostra, in una percentuale dei casi, un cariotipo discordante rispetto a quello fetale. Le analisi cromosomiche del trofoblasto hanno, di fatto, individuato percentuali variabili di discordanza per le diverse aneuploidie.

Sembrerebbe dunque che la specificità dei test sul cffDNA, negli studi che hanno arruolato oltre 10.000 campioni, riveli una FPR <1/1.000, in accordo con la percentuale delle discordanze feto-placentari emersa dalle analisi cromosomiche effettuate sul citotrofoblasto.

4.1.b Sensibilità e specificità dello screening delle T13, T18, T21 nelle gravidanze gemellari

L'analisi del cffDNA può essere effettuata sulle gravidanze bigemine, anche dopo donazione di gameti. L'analisi è limitata allo screening delle principali trisomie autosomiche ed risultato esprime una probabilità distribuita tra i due feti.

Sebbene la casistica sia limitata, gli studi che hanno quantizzato la percentuale della FF mediante SNP, che consente nelle gravidanze dizigoti (DZ) di distinguere e misurare il contributo di ciascuno dei due gemelli, hanno permesso di acquisire dati interessanti. Nelle gravidanze DZ, il gemello più piccolo, che fornisce una quantità minore di DNA, produce una FF statisticamente inferiore alla media della FF presente nelle gravidanze singole (8,7%, range 4,1-30%, rispetto a 11,7%, range 4-38,9%; $p < 0.001$) (Bevilacqua et al, 2015).

Questi dati suggeriscono che, nelle gravidanze DZ, il contributo della FF da parte delle due placenti sia disomogeneo e, addirittura, sia possibile che una di esse non sia sufficientemente rappresentata (FF <4%). Pertanto, in queste gravidanze aumenta la probabilità di un FNR per l'assente/insufficiente contributo della FF da parte di una delle due placenti.

La metanalisi di cinque pubblicazioni ha riportato, per la T21, una sensibilità del 95%; per la T18, dell'86%; per la T13, del 100% (i dati numerici delle T13 e T18 sono comunque troppo limitati per raggiungere un valore verosimile di sensibilità). Non sono stati ottenuti FPR per nessuna delle tre trisomie (Gil et al, 2014; Huang et al, 2014; Bevilacqua et al, 2015). Il test come tale non indica comunque, in presenza di un risultato positivo, quale dei due feti sia affetto.

4.2 Aneuploidie dei Cromosomi Sessuali

Sensibilità e specificità per le aneuploidie dei cromosomi X e Y nelle gravidanze singole

La specificità del NIPT nello screening delle aneuploidie dei cromosomi sessuali è inferiore rispetto a quella riportata per gli autosomi.

Una metanalisi relativa a 37 studi ha descritto per la monosomia X una sensibilità (DR) del 90,3% (95% CI, 85,7-94,2%) ed una specificità (FPR) dello 0,23% (95% CI, 0,14-0,34%). Per tutte le altre aneuploidie dei cromosomi sessuali (SCA), la sensibilità è risultata del 93,0% (95% CI, 85,8-97,8%) e la specificità dello 0,14% (95% CI, 0,06-0,24%) (Gil et al, 2015).

Le analisi cromosomiche del trofoblasto hanno indicato, per la monosomia X, una FPR, per la presenza di un mosaicismo confinato al citotrofoblasto, ed una FNR, per la presenza di un mosaicismo confinato al feto, rispettivamente di 1/1.421 (95%CI: 1.031-1.958) e di 1/14 (95%CI: 8-26). Si tratta complessivamente di probabilità più elevate rispetto a quelle riportate per gli autosomi, in quanto la monosomia X è l'aneuploidia maggiormente presente nei mosaicismi fetoplacentari (Grati, 2014). Di conseguenza, relativamente alla monosomia X (e in generale a tutte le SCA), il NIPT mostra una ridotta specificità, con una FPR cumulativa >1%, ascrivibile non solo ai mosaicismi confinati alla placenta, ma anche ai mosaicismi costituzionali della madre, presenti in circa l'8,6% dei NIPT positivi per una SCA (Nielsen et al. 1991; Thompson e Thompson, 2001; Wang et al, 2014).

4.3 Microdelezioni

Il cfDNA può essere, in teoria, utilizzato per cercare specifiche delezioni nella sequenza del DNA. Nella prospettiva di sviluppare tecniche in grado di analizzare l'intero genoma, sono stati messi a punto pannelli che analizzano singole microdelezioni associate ad alcune sindromi clinicamente riconoscibili (ad es. delezione 1p36, delezione 5p, delezione 15q, delezione 22q). I risultati preliminari indicano tuttavia una bassa sensibilità (62-95%) (Sequenom Presentations, NSGC, 2014), ed un elevato FPR. L'unico studio finora pubblicato ha utilizzato lo *SNP genotyping* ed ha indagato quattro microdelezioni (22q11.2, 1p36, 5pter, 15q11.2 associata alle sindromi di Prader Willi e di Angelman; Wapner et al, 2014). Il processo di validazione ha mostrato alcune criticità. In

particolare, la maggior parte dei casi utilizzati per la validazione non riguardava gli screening prenatali (plasma delle gestanti), ma campioni creati in laboratorio, che simulavano una patologia (PlasmArt™). Per questo, la sensibilità e la specificità dichiarate non sono rappresentative delle *performances* reali del test in ambito clinico. Ad esempio, considerando i valori di sensibilità e specificità del test maggiormente ottimistico (assumendo una prevalenza dell'1/1000 della delezione 22q11), il valore predittivo positivo del test (cioè la probabilità che la microdelezione identificata dal protocollo considerato fosse vera) non superava il 7%.

4.4 Patologie Mendeliane e altre indicazioni

La prima applicazione clinica del cffDNA ha riguardato la determinazione del sesso del feto (Lo et al, 1997), in base alla presenza/assenza nel plasma materno di sequenze di SRY e DYS14 del cromosoma Y. Nel 2000, la stessa tecnica è stata utilizzata in Italia per escludere la segregazione paterna della distrofia miotonica (Amicucci et al, 2000). Questa tecnica viene attualmente utilizzata in alcuni Paesi per monitorizzare le gravidanze a rischio per alcune malattie legate al cromosoma X, come la distrofia muscolare di Duchenne, indirizzando poi alle indagini molecolari mirate solo le gravidanze con feto di sesso maschile (Hill et al, 2011; Pan et al, 2014).

Un'ulteriore potenziale applicazione riguarda la diagnosi precoce non invasiva del sesso fetale nelle gravidanze a rischio per iperplasia congenita dei surreni (sindrome adreno-genitale), nelle quali l'identificazione di un feto maschio giustifica l'interruzione del trattamento con steroidi (Tardy-Guidollet et al, 2014). L'analisi può anche essere utile nella gestione dei feto nei quali le indagini ecografiche identifichino un'ambiguità dei genitali (Everett e Chitty, 2014).

Un'altra applicazione clinica del cffDNA riguarda la definizione del fenotipo Rh del feto concepito dalle madri RhD-negative. Un risultato positivo nel plasma materno sarebbe riconducibile alla segregazione nel feto del genotipo RhD-positivo del padre. Il test consente, nei casi positivi, di avviare tempestivamente la profilassi con immunoglobuline anti-RhD (Finning et al, 2008).

La trombocitopenia alloimmune fetale o neonatale è causata da alloanticorpi materni diretti contro gli antigeni ereditati dal padre, presenti sulle piastrine fetali. Questa patologia causa nel 20% dei casi emorragie intracraniche, che possono produrre sequele a lungo termine nei bambini. Lo studio del cffDNA è in grado di analizzare precocemente il gene HPA-1a correlato alla malattia e perciò di identificare i feto affetti (Le Toriell et al, 2013).

La sfida più importante che attende lo sviluppo e la ricerca relativa all'impiego clinico del cffDNA riguarda le malattie mendeliane. Esistono al momento alcune esperienze, come quelle relative alla diagnosi fetale di acondroplasia originata *de novo* al concepimento o segregata da un padre affetto (Chitty et al, 2011; Lench et al, 2013), al nanismo tanatoforo (Chitty et al, 2013) e alla sindrome di Apert (Everett e Chitty, 2014).

Nel caso delle malattie autosomiche recessive, nelle quali i genitori sono eterozigoti per mutazioni diverse, l'esclusione o la presenza dell'allele paterno possono essere utilizzate per precisare la probabilità che il feto sia affetto; tale probabilità viene esclusa in assenza della mutazione paterna, mentre aumenta quando è presente. In quest'ultimo caso, il genotipo del feto deve essere poi diagnosticato con una tecnica invasiva. Questo approccio è già stato sperimentato nelle gravidanze a rischio per talassemia (Papasavva et al, 2013; Saijun Liu et al, 2014) e per fibrosi cistica (Twiss et al, 2014).

La maggior parte dei protocolli che utilizzano il cffDNA per l'analisi delle gravidanze a rischio per malattie monogeniche sono ancora sperimentali; tuttavia alcuni protocolli sono stati recentemente approvati per uso clinico nel Regno Unito (Everett e Chitty, 2014).

5. Sensibilità, specificità e implicazioni etiche

I dati emersi dalle analisi citogenetiche sugli amniociti indicano che le T21, T18, T13 incidono tra il 50 e il 75% di tutte le patologie cromosomiche, in rapporto all'età materna.

La sensibilità e la specificità dei test sul cfDNA per le T21, T18, T13 sono elevate ed in linea con i risultati ottenuti con l'analisi cromosomica del trofoblasto.

Limiti biologici

Oltre alle discordanze feto-placentari, a cui sono soggette tutte le indagini che utilizzano il DNA fetale nel primo trimestre e che possono generare FPR e FNR, le analisi del cfDNA possono essere inficiate da altri fattori, compresa la presenza di:

1. mosaicismi cromosomici costituzionali nella madre: dato che il test è eseguito sul DNA plasmatico materno e fetale, nel caso in cui l'assetto cromosomico della madre non sia normale, ad esempio per la presenza di una linea cellulare anomala non necessariamente associata ad evidenze cliniche, il risultato del test può essere compromesso;
2. anomalie cromosomiche materne di origine iatrogena, e perciò non costituzionali: il test può essere compromesso dalla presenza nel plasma di frammenti di DNA materno mutati a causa di agenti clastogeni (ad es. farmacologici, fisici, virali, in grado di danneggiare il DNA);
3. una placenta evanescente appartenente ad una gravidanza interrotta: una importante causa di discrepanza nei test genetici nel primo trimestre di gravidanza basati sul DNA di origine placentare è la presenza di frammenti di DNA originati dalla placenta di un feto abortito nelle prime settimane.

9. Conclusioni

1. Lo screening prenatale non invasivo basato sul DNA (NIPT) non è un test diagnostico. Il test verifica la possibilità che il feto sia affetto dalle più comuni aneuploidie, con una specificità e sensibilità significativamente superiori rispetto allo screening non invasivo combinato (TN+PAPP-A/ β HCG). Il NIPT definisce, su base probabilistica, la presenza nel feto di una specifica patologia indagata. **Pertanto, ogni risultato positivo deve essere confermato con una tecnica invasiva tradizionale (villocentesi /amniocentesi).**

2. Il test deve essere preceduto da un'ecografia e dalla consulenza pre-test, che ha il compito di illustrare il significato del test e tutte le opzioni alternative disponibili per il monitoraggio della gravidanza. Prima del test deve essere acquisito il consenso della donna e specificato l'uso dei campioni biologici residui (Allegati 10.3 e 10.4).

3. In almeno il 2% dei casi, il campione acquisito non è idoneo ad essere refertato. Per essere affidabile il risultato deve essere ottenuto a partire da una percentuale di DNA fetale libero non inferiore al 4% del totale del DNA libero presente nel plasma materno.

4. L'indagine è al momento mirata e validata per le principali aneuploidie autosomiche (T21, T18, T13). Le anomalie cromosomiche indagate riguardano solo una parte, sia pure significativa (50-70%), delle aberrazioni cromosomiche eventualmente presenti nel feto. In rapporto alla tecnica utilizzata, si potranno in prospettiva ottenere informazioni più ampie anche su altre aneuploidie (ad es. dei cromosomi sessuali), su alcuni microriarrangiamenti e su alcune patologie mendeliane. In questo caso dovrà essere riconsiderato il razionale del test. **Il NIPT può essere effettuato sulle gravidanze gemellari bigemine, anche dopo eventuale donazione dei gameti.**

5. Un risultato indicativo di una "bassa probabilità di trisomia" deve essere considerato, di massima, rassicurante per la donna, in considerazione dell'elevata specificità del test e del

suo elevato valore predittivo negativo. Il risultato dello screening fa comunque riferimento alle caratteristiche genetiche del citotrofoblasto (placenta) che, in rari casi, possono essere discordanti rispetto a quelle del feto (discrepanza feto-placentare).

6. Il NIPT non è sostitutivo e perciò non evita di effettuare le altre indagini cliniche, laboratoristiche e strumentali che fanno parte integrante del monitoraggio della gravidanza.

7. I Centri che erogano il test devono:

- a) avere competenze nella diagnosi ecografica;**
- b) avere competenza nella diagnosi prenatale;**
- c) essere in grado di offrire la consulenza pre-test e post-test;**
- d) essere collegati con il laboratorio di cui al punto 8.**

8. I laboratori che eseguono il test devono:

- a) essere certificati;**
- b) partecipare a programmi di controllo della qualità, nazionali ed internazionali;**
- c) essere dotati di personale con competenza specifica nelle tecniche di NGS.**

Nel caso in cui i laboratori sviluppino protocolli originali, è necessario che le tecniche e le procedure bioinformatiche siano rese pubbliche e disponibili alla validazione scientifica.

9. Considerato che il NIPT è il test prenatale non invasivo maggiormente sensibile, è necessario che, a livello centrale (Ministero della Salute, SSN) e regionale (SSR), venga presa in considerazione la sua introduzione come test di prima o di seconda scelta, per il monitoraggio delle principali aneuploidie autosomiche.

10. Le caratteristiche del test raccomandano che esso venga eseguito presso un numero ristretto di laboratori a livello nazionale; per questo è auspicabile una pianificazione ed un accordo interregionale.

11. E' necessario predisporre campagne di informazione alla popolazione e di formazione dei professionisti, per garantire equità nell'accesso al test.

12. Il progressivo impatto clinico delle tecniche genetiche di ultima generazione, associato ad un abbattimento dei loro costi, raccomanda un dibattito proattivo a livello professionale e della Società sugli scopi futuri degli screening prenatali dei difetti fetali. Al momento, lo screening basato sul NIPT non ha ragioni di essere esteso oltre le T21, T18, T13 (Allegato 10.1).

D&R

IL GINECOLOGO

DA QUALCHE ANNO CI SONO
ALTERNATIVE ALL'AMNIOCENTESI

Gentile dottore, sono incinta e vorrei sapere quali sono gli esami necessari in gravidanza. E poi, ci sono test sicuri per accertare che il bambino sia sano?

Cinzia (via e-mail)

Cara Cinzia, gli esami indispensabili sono quelli previsti dal Sistema Sanitario Nazionale e iniziano verso la settima settimana di gravidanza, durante la prima visita ginecologica. Si comincia con test delle urine, per verificare la funzionalità renale, e del sangue, per determinare il gruppo sanguigno ed escludere alcune malattie. Questi esami vanno poi ripetuti ogni 4-6 settimane. Durante la visita si fa anche la prima ecografia per confermare la presenza del feto e il battito cardiaco. Seguiranno altre due ecografie, nel secondo e nel terzo trimestre, per valutare la crescita e il sesso del nascituro. Per sapere se sono presenti anomalie cromosomiche, gli esami più attendibili sono la villocentesi e l'amniocentesi che comportano entrambe il rischio di aborto. In alternativa, da qualche anno è possibile eseguire test costituiti da analisi del sangue combinate a ecografie. Si tratta del tritest e del test combinato: entrambi sono privi di rischi, ma affidabili, rispettivamente, al 65% e all'80%. Il test del Dna delle cellule fetali, invece, è un esame del sangue attendibile al 99%. Però, è molto costoso (da 500 a 800 euro) e non viene rimborsato dal SSN.



CLAUDIO PAGANOTTI
ginecologo dell'Istituto Clinico
Città di Brescia