

Genetica Prenatale

La rivoluzione dei NIPT e l'eccellenza italiana

Il DNA libero nel sangue materno

Il DNA libero di origine fetale (cell free fetal DNA, cffDNA), già dal primo trimestre di gravidanza, è presente nel circolo ematico materno e proviene dal ricambio delle cellule del trofoblasto, con dei frammenti di DNA fetale di circa 150-200 paia di basi (bp). Esso può essere isolato ed utilizzato per lo studio di alcune patologie fetali già a partire dalla X settimana, quando raggiunge quantità sufficienti per il potenziale impiego clinico.

Wellesley et al. (2012) ha valutato la prevalenza e i tassi della diagnosi prenatale delle anomalie cromosomiche rare evidenziando, quindi, l'importanza degli studi di validazione dei test prenatali non invasivi al fine di valutarne le prestazioni prima di suggerirne un impiego nella genetica medica (vedi **figura 1**). Infatti ne è un esempio lo studio di Bianchi et al. (2012) e quello di Futch et al. (2014), dove vengono testate ed infine esaltate le performance di un tipo di Non Invasive Prenatal Test (NIPT), "verifi® prenatal test", nell'identificazione con elevatissima sensibilità e specificità delle aneuploidie dei cromosomi 13, 18 e 21, nel riuscire a separare i risultati borderline classificandoli come "sospetta aneuploidia" e nell'essere capace di identificare le anomalie cromosomiche che interessano i cromosomi sessuali, come ad esempio la Monosomia del X. Infatti, considerando la percentuale elevata nelle cromosopatie sessuali è estremamente



La scoperta del DNA cell-free fetale (cffDNA) nel sangue materno ha modificando la pratica della genetica prenatale e della medicina materno fetale, con un conseguente calo dei test invasivi e aprendo alla possibilità di un test prenatale non invasivo (NIPT) come test di screening di primo livello basato su un semplice prelievo di sangue ematico della gestante

te importante valutarne la presenza per poter essere rassicurati sullo stato di salute del feto. A seguito degli studi effettuati e dei requisiti che possedevano le gestanti inserite negli stessi, come in quello di Futch et al. (2013), sono state definiti i **requisiti delle gestanti destinate del NIPT**:

- positività ai test di screening del primo o secondo trimestre;
- quadro ecografico associato ad anomalie fetali suggestive di aneuploidia;
- età avanzata della madre (35 anni o più);
- pregressa gravidanza con trisomia;
- anamnesi personale/familiare

positiva per anomalie cromosomiche ed traslocazione Robertsoniana bilanciate;

- gravidanze in cui è controindicata la diagnosi prenatale invasiva (es. rischio di aborto spontaneo);
- gravide che non intendono eseguire test invasivi (villo centesi o amniocentesi).

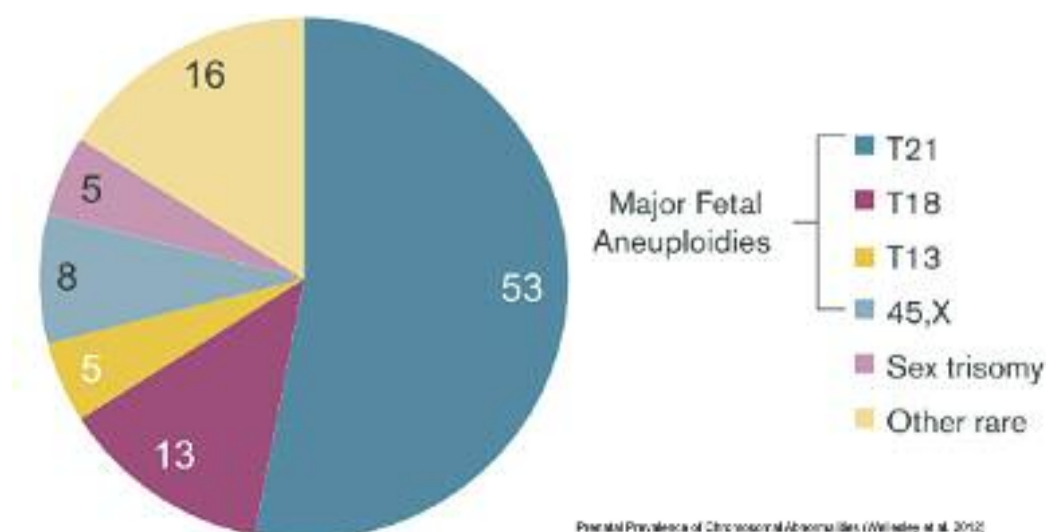
2. NGS di specifiche regioni (sequenziamento mirato)

3. SNP, cioè polimorfismi di singoli nucleotidi.

La distinzione di questi test fatta su base tecnologica, prende in considerazione 2 parametri:

- il metodo utilizzato per sequenziamento/allineamento delle sequenze che consente di distinguere i test tra quelli che si avvalgono di un sequenziamento massivo parallelo - MPS (*whole genome shotgun sequencing*) e quelli che utilizzano un sequenziamento mirato (*targeted sequencing*);
- il metodo di conteggio del quantitativo di DNA che consente di distinguere i test che eseguono il conteggio (counting) di tutte le sequenze prodotte e quelli che invece eseguono un conteggio di determinati polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), dato che è possibile rilevare aneuploidie cromosomiche in funzione del quantitativo di DNA rilevato. Di notevole rilevanza scientifica è la tecnologia del "Genome-wide MPS" che, a differenza della

Figura 1. Prenatal Prevalence of Chromosomal Abnormalities (Wellesley et al. 2012)



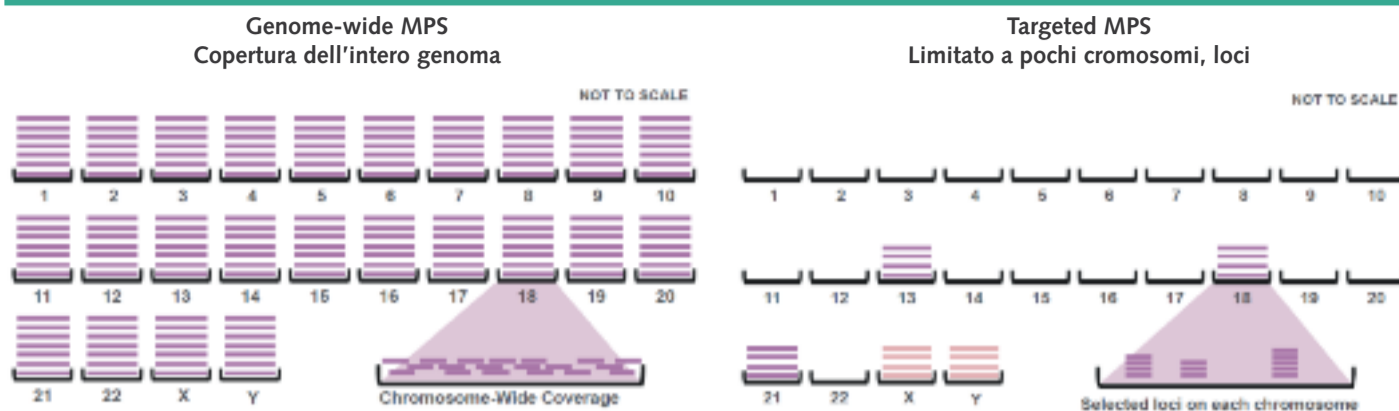
Tecniche di analisi del cf DNA

Il principio dei protocolli di NIPT, indipendentemente dalla tecnica utilizzata, si basa sul conteggio di frammenti dei cromosomi di interesse (il 21 nel caso della sindrome di Down) presenti nel sangue 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.

Per l'analisi delle aneuploidie mediante NIPT si utilizzano tre principali tecniche basate sulle tecniche di sequenziamento di seconda generazione (Next Generation Sequencing - NGS):

1. NGS dell'intero genoma

Figura 2. "Genome-wide MPS" vs "Targeted MPS"



tecnica "Targeted MPS", presenta tassi di fallimento estremamente bassi, tempi d'analisi più veloci e la possibilità di aggiungere nuovi contenuti al menu del test (vedi figura 2).

Infatti, lo studio di Bianchi et al. (2012) sottolinea che la tecnica MPS può essere incorporata negli esistenti algoritmi di screening per le aneuploidie riducendo le procedure invasive non necessarie. Il sequenziamento massivo parallelo, come dimostrato mediante l'impiego del verifi® prenatal test, è efficace per rilevare le aneuploidie per più cromosomi (autosomici e sessuali) in tutto il genoma, presentando una sensibilità e specificità superiori nel rilevare le aneuploidie T21, T18, T13 rispetto alle analisi sieriche del primo e secondo trimestre ed agli esami ecografici e nel determinare in maniera non invasiva cariotipo molecolare.

La Frazione fetale

Il DNA libero di origine fetale viene definito "frazione fetale" (FF) ed è presente in percentuale variabile nei diversi campioni. È 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%, mentre alla XII settimana, mediamente, la FF corrisponde al 10% circa del cfDNA, con un range compreso tra <4% ed il 40%.

In alcune tipologie di NIPT, l'accuratezza dell'analisi del cromosoma può variare a seconda della percentuale della FF totale presente nel campione. Infatti, i campioni con FF ≤4% potrebbero fornire indirettamente la spia di un aumento della probabilità di una patologia cromoso-

mica nel feto e, pertanto, in questi casi è necessario verificare la percentuale della FF nel campione in esame. Difatti lo studio di Bianchi et al. (2012) evidenzia che la percentuale della FF totale aumenta in presenza di una trisomia, mentre Rava et al. (2014) dimostra che la FF è più alta quando il feto ha trisomia 21 ed è inferiore quando il feto ha la trisomia 18, 13, o una monosomia X0. Invece, il verifi® prenatal test avvalendosi della tecnologia MPS (Illumina) riesce ad utilizzare una ff <4 mantenendo alti livelli di sensibilità e specificità, grazie alla produzione di 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).

Gravidanze gemellari

Il NIPT può essere eseguito sulle gravidanze dizigoti (2 gemelli), sia naturali che originate con una tecnica di procreazione medicalmente assistita. Il test comunque non distingue quale feto abbia eventualmente una probabilità elevata di patologia cromosomica e non fornisce informazioni sul sesso dei feti, ma è eventualmente riportata nel referto la presenza del cromosoma Y. Nel caso in cui il test evidenzi una probabilità elevata di una anomalia cromosomica, l'interpretazione del risultato viene demandata alla consulenza genetica e ad eventuali successivi approfondimenti che utilizzano una tecnica diagnostica invasiva (villocentesi, amniocentesi).

Secondo Fosler et al. (2013) mediante il verifi® prenatal test sono stati ottenuti risultati simili nell'identificazione di anomalie cromosomiche sia nelle gravi-



danze singole che gemellari, ciò fornisce un sostegno all'utilità dei NIPT in gravidanze gemellari.

Sensibilità e Specificità

Bianchi et al (2012), mediante l'impiego del verifi® prenatal test, dimostrò utilità dell'impiego dei NIPT nello screening di primo livello, mostrando nell'identificazione delle tre principali aneuploidie autosomiche T21, T13 e T18, nelle gravidanze singole, una sensibilità e la specificità elevatissime (uguali o prossime al 100%) ed in linea con i risultati ottenuti con l'analisi cromosomica del trofoblasto. Inoltre, anche se con percentuale leggermente più bassa di sensibilità e specificità Bianchi et al (2012) dimostra l'affidabilità del verifi® prenatal test nella individuazione di aneuploidie dei cromosomi sessuali (X, XXX, XXY, XYY) (vedi tabella).

Limiti biologici

Dalle discordanze feto-placentari, a cui sono soggette tutte le in-

dagini 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;
2. anomalie cromosomiche materne di origine iatrogena, e perciò non costituzionali;
3. una placenta evanescente appartenente ad una gravidanza interrotta.

Ciononostante, Bianchi et al. (2012) ha mostrato che MPS è stato in grado di classificare i campioni come aneuploidie che avevano cariotipo a mosaico per i cromosomi 21 e 18 in quattro dei quattro campioni colpiti.

Aspetto legale Responsabilità civile

Il danno da nascita indesiderata (cioè il danno sofferto dai genitori che vedono leso il proprio diritto a decidere se avere o meno un figlio portatore di handicap o di gravi affezioni congenite) e il conseguente risarcimento è ormai riconosciuto dalla giurisprudenza. Già nel 2012 la Cassazione ha riconosciuto ad una famiglia il risarcimento per "danno da nascita indesiderata", scaturito dall'errore del medico che, non rilevando malformazioni congenite del concepito e non segnalando alla gestante l'esistenza di più efficaci test diagnostici prenatali rispetto a quello in concreto prescelto, ha impedito alla madre l'esercizio del diritto di interruzione della gravidanza e pertanto ha dovuto risarcire i genitori del bimbo nato malformato, ma anche i suoi fratelli e lo stesso bimbo.

L'eccellenza in Campania

Il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames è l'unico centro del sud Italia ad essere autorizzato ad effettuare direttamente presso i propri laboratori di genetica l'analisi dei NIPT, in quanto partner di Verinata-Illumina (USA) che esegue il verifi® prenatal test, non commercializzato in Italia. L'analogo al verifi® prenatal test commercializzato in Italia e fornito dal Centro Ames è il Vera Prenatal Test. Inoltre, come indicato dalle Linee Guida del Ministero della Salute, il Centro Ames ha competenze nella diagnosi eco-

grafica e nella diagnosi prenatale, è in grado di fornire la consulenza pre-test e post-test, è collegato con un servizio di genetica medica e con il laboratorio certificato che effettua il test, che partecipa ai controlli di qualità nazionali ed internazionali ed è dotato di personale con competenze specifiche nelle tecniche di NGS. Il Vera Prenatal Test utilizza il metodo MPS abbinato al conteggio di tutte le sequenze.



Fino a qualche tempo fa molti campioni venivano inviati all'estero. Il vantaggio di avere un centro di eccellenza sul territorio consente di evitare di sottoporre i campioni di sangue a lunghi viaggi e/o eccessive manipolazioni, al fine di scongiurare la frammentazione del DNA al punto da rendere inadeguato il campione.

La possibilità di usufruire di una struttura sul territorio che effettui presso i propri laboratori il test di screening presenta numerosi vantaggi:

- Test Rapido (risposta in 36-48 ore);
- Ridotta manipolazione del campione;
- Riduzione dei tempi di attesa;
- Riduzione dei costi dell'analisi.

Inoltre, dato che ogni risultato positivo deve essere confermato con la tecnica invasiva tradizionale (villocentesi /amniocentesi), il Centro Ames fornisce un servizio esclusivo offrendo gratuitamente l'analisi genetica di conferma su liquido amniotico o villo coriale. **Y**

Tabella. Sensibilità e specificità del verifi® prenatal test nella individuazione delle tre principali aneuploidie autosomiche e aneuploidie dei cromosomi sessuali

CROMOSOMA	SENSIBILITÀ	FALSI NEGATIVI	SPECIFICITÀ	FALSI POSITIVI
Trisomia 21 (Sindrome di Down)	>99,9%	<0,1%	>99,9%	<0,1%
Trisomia 18 (Sindrome di Edwards)	>99,9%	<0,1%	>99,9%	<0,1%
Trisomia 13 (Sindrome di Patau)	>99,9%	<0,1%	>99,9%	<0,1%
Monosomia X (Sindrome di Turner)	>95%	5%	>99,9%	<0,1%
XX (sesso femminile)	99%	1%	99%	1%
XY (sesso maschile)	99%	1%	99%	1%
XXX/ XXY/ XYY	Non è possibile fare un calcolo per dati limitati			

