



News&Approfondimenti in Ginecologia a cura di Mario Campogrande

L'isolamento di DNA fetale libero nel plasma e nel siero materno, da parte di Lo ad Hong Kong nel 1997, ha aperto una nuova strada verso la DPN prenatale non invasiva. Da allora molti passi in avanti sono stati fatti. Ma a tutt'oggi la sensibilità e la specificità del test prenatale non invasivo non è del 100%, per cui non può essere ancora considerato un test diagnostico in grado di sostituire i test invasivi nelle gravidanze ad alto rischio

Dna embrio-fetale nel sangue materno Non oggi per la diagnosi prenatale

La diffusione di informazioni su media stampati e sul web, e la pubblicità di laboratori europei, diffusa anche in Italia, sulla possibilità di effettuare oggi diagnosi prenatali non invasive (Non Invasive Prenatal Testing - NIPT) di patologie da anomalie cromosomiche o da alterazioni geniche attraverso lo studio del DNA embrionale o fetale circolante nel sangue materno richiede una analitica, approfondita e aggiornata preparazione che ogni ginecologo ostetrico non può non possedere. Siamo infatti pressati da richieste di pazienti che portano con sé l'ultimo numero de *L'Espresso* o di *Panorama*, o lo stampato dell'ultimo Blog visitato, che affermano " ...i primi test promettevano di identificare il 96 per cento dei casi di malattia, ora siamo già intorno al 99%", dimenticando di dire che il 99% di specificità non è un risultato accettabile per un test che potrebbe avere come conseguenza o l'interruzione di una gravidanza con feto sano o la prosecuzione, non desiderata, di una gravidanza con feto malato. Certamente l'interesse ad una diagnosi prenatale (DPN) non invasiva è condiviso da tutti, per annullare i rischi di perdite fetali (0,5% -1%) che la DPN invasiva tuttora comporta, anche nei centri con maggiore esperienza. I primi tentativi di DPN non invasiva su sangue materno, sul finire degli anni '70 e negli anni '80 del secolo scorso, videro impegnati alcuni gruppi statunitensi nella ricerca di cellule di origine embriofetale, o trofoblastica nel sangue materno. Alcuni di noi italiani, da Torino, Milano, Bologna, Cagliari, partecipando agli annuali incontri del Fetoscopy Group, hanno avuto la felice opportunità di sentirne notizie di prima mano molto precocemente (Goldberg; Bianchi; Elias; Simpson), ma, anno dopo anno, abbiamo avuto modo di constatare il passaggio dalle ottimistiche speranze degli ambiziosi progetti alla delusione nel registrare la sostanziale impossibilità di passare da buoni risultati di ricerca di base a concrete applicazioni cliniche - fatti salvi alcuni casi specifici, quale, ad esempio, la diagnosi di alcune emoglobinopatie, proprio dal gruppo torinese (Camaschella). E ciò anche utilizzando decine di diversi approcci laboratoristici. Una delle limitazioni all'utilizzo di cellule fetali nel sangue materno per la DPN è il persistere per anni di tali cellule nel circolo della madre, e di essere quindi elemento di confusione nelle gravidanze successive. L'isolamento di DNA fetale (per lo più di origine trofoblastica) libero nel plasma e nel siero materno, da parte di Lo ad Hong



Kong nel 1997, ha aperto una nuova strada verso la DPN prenatale non invasiva: lo stesso Lo due anni dopo lo ha utilizzato per la determinazione del sesso fetale. È stato presto provato che il DNA fetale scompare dal sangue materno immediatamente dopo il parto, non consentendo quindi confusione con residui di gravidanze precedenti. Negli ultimi 5 anni lo studio del DNA fetale nel siero materno ha avuto una particolare attenzione per la possibilità di identificare la presenza, o la assenza, dell'antigene RhD nel feto, fino a consentirne l'utilizzo clinico nel corso della gravidanza in donne Rh negative, come avviene oggi nel Regno Unito. Analogamente prosegue la ricerca per una possibile applicazione diagnostica clinica per la identificazione di aneuploidie. Da alcuni anni si è provato, tra l'altro, che nei casi di embrioni-feti affetti da trisomia 21 il DNA fetale è presente nel siero materno in quantità significativamente più elevata rispetto a quella riscontrata nelle madri con feti euploidi; su questo dato è stato espresso qualche dubbio (Gerovasili). La ricerca e lo studio del DNA fetale, con metodiche di laboratorio genetico estremamente raffinate e complesse, la cui conoscenza e descrizione supera le possibilità di un ostetrico-ginecologo anche appassionato di gene-

Per saperne di più

- Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JHM, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3279-3283
- Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997; 61:822-829
- Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood: advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA* 1993;270:2357-2361
- Camaschella C, Alfarano A, Gottardi E, Travi M, Primignani P, Caligaris-Cappio F, Saglio G. Prenatal diagnosis of fetal hemoglobin Lepore-Boston disease on maternal peripheral blood. *Blood* 1990;75:2102-2106
- Goldberg JD. Fetal Cells in Maternal Circulation: Progress in Analysis of a Rare Event. *Am J Hum Genet* 1997; 61:806-809
- Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J Pediatr* 1995; 127: 847-856
- Farina A, LeShane ES, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Lee T, Neveux LM, Palomaki GE, Bianchi DW. Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy. *Clin Chem* 2003; 49:239-242
- Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Campogrande M, Bastonero S, Pagliano M, Calza S, Ferrarini M, Cremonesi L. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005; 117(2-3):243-248
- Lo YMD et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-487
- Nicolaides KH et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207:374.e1-e6

tica, stanno portando a sempre più significativi risultati, in particolare per la individuazione di alcune aneuploidie, quali la trisomia 21 e la trisomia 18 ed oggi anche la 13 (Nicolaidis; Ashor). Tra le nuove metodiche, le più promettenti utilizzano tecniche di sequenziamento massivamente parallelo (MPS o MPGS) sia selettive per ciascun cromosoma sia per l'intero genoma, con l'introduzione nei calcoli di nuovi algoritmi.

Mentre le prime ricerche sono state condotte su popolazione individuata a rischio di anomalie cromosomiche attraverso le metodiche di screening oggi utilizzate, età materna, test combinato, test integrato, e lasciando dubbi sulla applicabilità dello studio del DNA fetale alla popolazione generale, oggi disponiamo di lavori che sono stati realizzati su oltre 2000 donne che hanno richiesto lo screening di routine per le aneuploidie a 11-13 settimane di gravidanza (Nicolaidis).

In questo lavoro il rischio di trisomia 21 e trisomia 18 è stato correttamente valutato in oltre il 99% dei casi positivi, mentre il rischio è risultato inferiore a 1% nel 99,9% dei casi di euploidia. Il test richiede un semplice prelievo di 2 cc di plasma materno.

La sensibilità e la specificità del test prenatale non invasivo non è 100% e perciò non può essere considerato oggi un test diagnostico per sostituire i test invasivi (biopsia coriale, amniocentesi) nelle gravidanze ad alto rischio. Sono concordi su questa affermazione il California Technology Assessment Forum (CTAF), la International Society of Prenatal Diagnosis (ISPD), la United States National Society of Genetic Counselors (NSGC), l'American Congress of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).

Lo studio del DNA fetale è da considerare un nuovo test di screening che identifica un gruppo ad alto rischio che necessita di diagnosi invasiva. La performance di questo nuovo test di screening per la trisomia 21 e 18 è di molto superiore alle metodiche di screening che stiamo utilizzando, ecografiche e biochimiche (traslucenza nucale, test combinato ed integrato), raggiungendo una altissima detection rate (DR) con un valore di falsi positivi (FPR) molto basso.

Basandosi su questi dati si potrebbe già oggi proporre il DNA fetale quale mezzo utilizzabile per uno screening generalizzato per tutte le gravide che lo desiderano, tuttavia vi è una importante limitazione che deriva dal costo elevato per un singolo test (1.000-2.000 euro!). I risultati delle metodiche di screening "ormai tradizionali" finora utilizzate, offrono peraltro anche la opportunità di ricercare, attraverso gli esami invasivi che per lo più seguono la positività dello screening, anche una altra larga serie di anomalie genetiche.

Anche nello studio del DNA circolante si possono utilizzare microarrays che evidenziano migliaia di mutazioni: e questo è un elemento assai delicato anche sotto il profilo scientifico ed etico poiché non di tutte le anomalie si conoscono i corrispondenti fenotipi, e per alcuni le successive scelte cliniche sono davvero problematiche. Non si possono infine non ricordare i suggerimenti di Nicolaides, uno dei padri delle nostre metodiche di screening, che ci ricorda che attraverso la misurazione della traslucenza nucale (NT) e la identificazione precoce di difetti strutturali si hanno indicazioni precoci alla DPN invasiva anche in caso di NIPT negativa per trisomia 21 e 18. L'introduzione dello studio del DNA fetale non dovrebbe essere considerato un metodo per sostituire l'ecografia a 11-13 settimane, che, in combinazione con markers biochimici e biofisici, offre uno screening precoce per complicazioni della gravidanza, comprese la preeclampsia e il rischio di parto prematuro.

Un caldo invito quindi a tutti i ginecologi-ostetrici italiani: non cadiamo nelle braccia delle sirene delle multinazionali della diagnostica che allettano le donne in gravidanza e noi con affermazioni che non sono vere.

Lo studio del DNA fetale nel sangue materno non è attualmente diagnostico. Dobbiamo distinguere tra utilità clinica e validità clinica. La validità clinica è la capacità di predire il rischio di un certo esito e di separare le pazienti con esiti differenti in classi di rischio separate. Mentre la validità clinica di NIPT è stata testata in numerosi trials, questo è soltanto l'inizio di ciò che dovrebbe essere un processo di integrazione di questo test nel sistema sanitario esistente. L'utilità clinica di un test si riferisce alla sua capacità di migliorare gli esiti di salute delle pazienti. Nello specifico, i risultati del test devono poter cambiare i processi decisionali clinici. Non vi sono finora studi sull'impatto del DNA fetale-NIPT che incidono sulle possibili scelte cliniche migliori per le donne in gravidanza. **Y**