

DIAGNOSTICA

Il test prenatale non invasivo rileva tumori silenti nelle madri in attesa

La gravidanza è una condizione fisiologica unica durante la quale avvengono numerosi cambiamenti. Uno di quelli più importanti riguarda il sistema immunitario materno, il quale si organizza in modo tale da tollerare la presenza del feto (un organismo semi-allogeneico) in via di sviluppo fornendo, al tempo stesso, protezione contro i patogeni.¹

È noto da tempo che in gravidanza è aumentato il rischio di sviluppare determinati tumori, tra cui il cancro al seno nel breve termine, la malattia trofoblastica gestazionale (GTD, Gestational Trophoblastic Disease), il tumore della cervice e il melanoma.^{2,3}

Le cause di questo incremento non sono ancora pienamente comprese ma sono state formulate numerose ipotesi per spiegare il fenomeno, relative soprattutto ai cambiamenti ormonali e al sistema immunitario



Giovanni Savarese
Direttore genetica medica

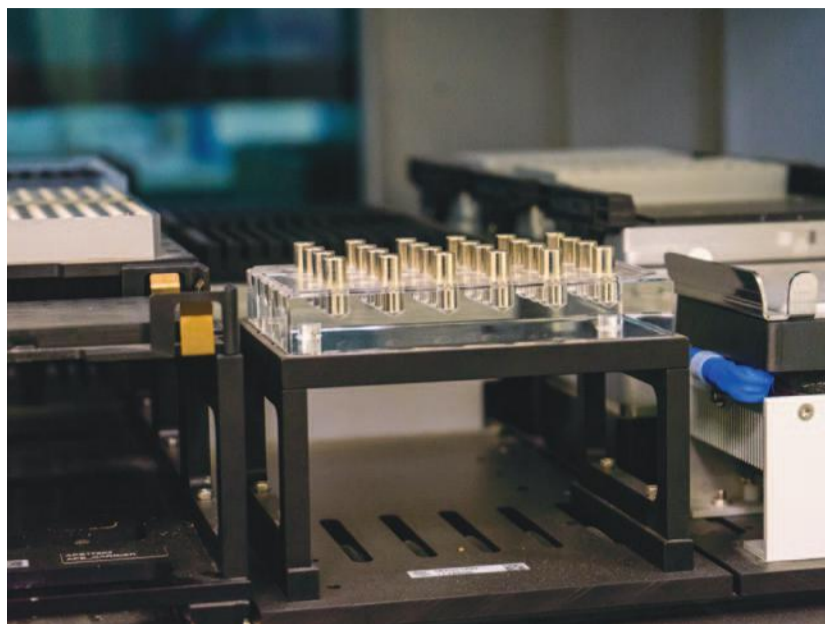
Il Test Prenatale Non Invasivo (NIPT) offre un'alternativa sicura e accurata all'amniocentesi e al prelievo dei villi coriali (CVS, *Chorionic Villus Sampling*) per lo screening di anomalie cromosomiche associate a malformazioni ed alterazioni neurologiche severe [American College of Obstetricians and Gynecologists, and the International Society for Prenatal Diagnosis].⁴ Il NIPT è altamente accurato e presenta un basso tasso di falsi negativi. Test invasivi di diagnosi prenatale (amniocentesi e CVS) sono tipicamente raccomandati per confermare una diagnosi dopo NIPT positivo. Il NIPT prevede l'isolamento e l'analisi del DNA fetale libero circolante (cffDNA, *cell-free fetal DNA*) a partire dal sangue periferico materno. Il cffDNA è presente nel torrente circolatorio materno a partire dalla quinta settimana di gravidanza e la sua concentrazione varia nel corso della gestazione. Al momento del test, in genere, la percentuale di DNA fetale presente nel sangue materno (frazione fetale) oscilla tra il 3% ed il 13%. Nonostante le misure adottate per minimizzare il rischio di contaminazione materna siano state

progressivamente implementate, essa può comunque verificarsi, influenzando l'accuratezza del test.⁵

Può una potenziale fonte d'errore rivelarsi una risorsa? Per la precisione, un risultato positivo al NIPT seguito da amniocentesi o villocentesi negative potrebbe precocemente suggerire l'insorgenza di un tumore nella madre?

Quando questo scenario si verifica, raccomandiamo un immediato *follow-up* post-partum. Questo approccio si basa sull'ipotesi che il risultato positivo al NIPT potrebbe essere indicativo di un tumore di origine primaria sconosciuta (CUP, *Cancer of Unknown Primary*) in silente evoluzione durante la gravidanza.

Tra il 2018 e il 2022, si sono sottoposte al Vera Test (NIPT commercializzato dall'azienda Ames Srl) 100.685 donne incinte di 18 anni d'età o più, con un'età media di 34.6 anni (intervallo: 18-50 anni). Di queste, 1502 sono risultate positive al NIPT. Di queste ultime, 27 hanno presentato aneuploidie singole o multiple. Tuttavia, test invasivi successivamente condotti sul liquido am-



niotico o sulla placenta non hanno confermato la presenza di alterazioni genetiche. Delle donne prese in esame, 16 hanno sviluppato tumori benigni o maligni. Quattro non hanno sviluppato tumori fino alla stesura di questo lavoro e di 7 non è noto il *follow-up*. In 11 casi su 100.685, quindi, la positività al NIPT in assenza di altre indicazioni diagnostiche e l'esecuzione di un monitoraggio clinico-radiologico hanno permesso l'identificazione precoce e il trattamento del tumore con sola chirurgia o radioterapia e rituximab in alcuni casi di Linfoma Non Hodgkin (Tabella 1).

Il trattamento del cancro durante la gravidanza rappresenta una sfida in quanto l'oncologo deve approfondire il suo massimo impegno nel tentativo di ottimizzare e personalizzare le opzioni terapeutico assicurando il più possibile il benessere sia della madre che del bambino non ancora nato.

È importante enfatizzare che nella nostra serie di casi, ad eccezione di una sola paziente, le madri non hanno mostrato alcuna evidenza clinica di tumore durante la gravidanza. Sfortuna-

tamente, in quest'unico caso, la neoplasia (un sarcoma dei tessuti molli) è stata clinicamente rilevata durante il quarto mese di gravidanza e, nel momento in cui è stato riscontrato, aveva già raggiunto uno stadio avanzato e altamente aggressivo. La donna ha rifiutato l'interruzione di gravidanza e la possibilità di sottoporsi a una terapia. Dopo la nascita di un bambino perfettamente sano, il cancro aveva formato metastasi in numerosi siti distanti da quello primario. In un altro caso, una paziente è deceduta a causa di problemi oncologici avendo rifiutato di eseguire dei regolari *check-up* per cui il tumore è stato scoperto solo quando ormai clinicamente sintomatico. In 4 donne, sono state scoperte lesioni benigne come miomi uterini o fibroadenomi mammari. In questa serie di casi è possibile che queste lesioni, date le loro alterazioni genetiche, rappresentassero dei fenomeni precancerosi che sono stati prontamente risolti.

La prima considerazione da fare, immediata e intuitiva, riguarda il fatto che 11 casi su 100.685 rappresentano una coorte estremamente ridotta per attribuire rilevanza al NIPT in questo campo. Tuttavia, in Italia e in buona parte dei Paesi

Europei, milioni di donne incinte si sottopongono al NIPT ogni anno, sia per scelta personale che per appartenenza ad una delle categorie ad alto rischio. Ciò significa che ogni anno potrebbero venire identificate migliaia di situazioni simili.

Quattro donne hanno ottenuto un risultato positivo al NIPT senza nessun'altra evidenza diagnostica (all'amniocentesi o alla villocentesi) di anomalie cromosomiche, hanno dato alla luce bambini del tutto sani e non hanno sviluppato alcun tumore. Tuttavia, l'immediata ripetizione di questi test ha fornito ancora una volta un risultato positivo. Questo genere di situazioni può scatenare forti preoccupazioni nelle gestanti e costi considerevoli per il Sistema Sanitario Nazionale dato che le pazienti devono sottoporsi a controlli successivi superflui. I mosaicismi genetici non possono essere esclusi; tuttavia, i risultati positivi potrebbero essere dovuti a fenomeni dinamici e transitori. Potrebbero rappresentare il risultato di una contaminazione da parte del DNA tumorale durante una fase di eliminazione delle cellule tumorali ad opera del sistema immunitario ("sorveglianza immunitaria"). Questo report non fornisce dati sperimentali spe-

cifici riguardo la questione. Tuttavia, possiamo trarre vantaggio dal possesso di una biobanca che conserva i campioni di plasma delle donne incluse nello studio. Stiamo sfruttando questa risorsa per approfondire questi casi nel dettaglio con lo scopo di distinguere il DNA fetale libero circolante dal DNA tumorale circolante con maggiore precisione (un brevetto attualmente in via di sviluppo non può essere ancora divulgato) e per verificare la presenza di una risposta immunitaria antitumorale. Lo studio è in corso d'opera.

Esistono numerose implicazioni etiche e l'argomento in questione, oltre che delicato, offre molti spunti di riflessione su quelle che potrebbero essere le ripercussioni psicologiche e personali di un simile strumento. Infatti, da un punto di vista psicologico, nella nostra esperienza e in alcuni casi, la comunicazione di un risultato positivo al NIPT e la concomitante negatività ad altri test diagnostici ha generato forti reazioni di negazione o di rabbia, soprattutto in donne provenienti da contesti di basso livello culturale e socioeconomico. Sfortunatamente, per queste

pazienti non abbiamo l'autorizzazione a fornire informazioni sugli eventi clinici successivi al parto. La consulenza genetica in quest'ottica dovrebbe essere integrata da una consulenza psicologica volta alla gestione delle reazioni emotive delle pazienti.

Raccomandiamo a tutte le donne positive al NIPT, in assenza di altre indicazioni diagnostiche rilevanti all'amniocentesi o alla villocentesi, di sottoporsi ad un rigoroso monitoraggio clinico-radiologico dopo il parto per escludere la possibilità di sviluppare un tumore. Una limitazione metodologica del nostro studio consiste nell'assenza di *follow-up* a cinque anni almeno per tutte le donne che hanno ricevuto diagnosi di tumore, che ci permetterebbe di dichiararne la guarigione con maggiore sicurezza. Ad ogni modo, siamo convinti che ulteriori studi siano urgenti e necessari per chiarire il ruolo del NIPT nel rilevamento di tumori latenti nelle madri in attesa dal momento che, a questo stadio, le probabilità di successo del trattamento sono considerevolmente alte.

REFERENCES

1. Petroff MG, Nguyen SL, Ahn SH. Fetal-placental antigens and the maternal immune system: Reproductive immunology comes of age. *Immunol Rev.* 2022;308(1):25-39.
2. Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, Ekblom A, Pavia M, Adami HO. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med.* 1994;331(1):5-9.
3. Still R, Brennecke S. Melanoma in pregnancy. *Obstet Med.* 2017;10(3):107-112.
4. Salomon LJ, Sotiriadis A, Wulff CB, Odibo A, Akolekar R. Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: Systematic review of literature and updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019;54(4):442-451.
5. Breveglieri G, D'Aversa E, Finotti A, Borgatti M. Non-invasive prenatal testing using fetal DNA. *Mol Diagn Ther.* 2019;23(2):291-299.



Il laboratorio della AMES Centro Polidiagnostico Specialistico S.r.l. il cui amministratore unico è il dott. Antonio Fico; è sito in Casalnuovo di Napoli ed è divenuto nel corso degli anni un centro diagnostico ad elevata specializzazione di rilevanza nazionale. AMES nasce nel 1996 come laboratorio di analisi di biochimica clinica per allargare la gamma dei servizi offerti alla medicina del lavoro ed alle analisi ambientali, ma è nell'ultimo quinquennio che l'azienda ha investito in maniera consistente nel settore della genetica medica diretto dal dott. Giovanni Savarese divenendo in breve tempo presidio di riferimento per esami ad alta tecnologia, espletando attività di analisi genetiche, citogenetiche e molecolari di elevata specializzazione, con l'obiettivo di fornire un servizio completo capace di soddisfare le più diverse esigenze in campo diagnostico.

Il **Centro Ames** è accreditato dal Sistema Sanitario Nazionale come **Laboratorio generale di base con settori specializzati di:**

- **chimica clinica e tossicologia (A1);**
- **microbiologia e sierologia (A2);**
- **Genetica (A6);**

Il Centro AMES è considerato uno fra i più avanzati laboratori europei di diagnostica molecolare. I professionisti che operano nel centro lavorano nel campo della biochimica clinica e della tossicologia da oltre 20 anni. L'equipe di genetisti e biologi molecolari del Centro Ames proviene dal mondo della ricerca universitaria.

L'attività del Centro Ames si estende in tutto il territorio nazionale e la società è attiva all'estero sia dal punto di vista diagnostico sia attraverso la partecipazione a progetti di ricerca internazionali. Il Centro AMES il cui direttore sanitario è il dott. Gianluca Valentino, collabora con strutture sanitarie sia pubbliche sia private, case di cura, laboratori di analisi, ospedali, cliniche private, centri di procreazione assistita e con medici specialisti di differenti discipline.

I continui investimenti nel settore della genetica medica pongono il Centro Ames all'avanguardia a livello nazionale ed internazionale e lo rendono il principale centro di riferimento per tutto il Mezzogiorno. L'AMES opera in scienza e coscienza ed evita di propagandare indagini diagnostiche che non trovano un ampio consenso nella comunità scientifica internazionale al solo fine di perseguire mere finalità commerciali.

L'accreditamento col Servizio Sanitario Nazionale permette al Centro Ames di operare in regime di convenzione consentendo ai pazienti di svolgere sia analisi in regime privatistico, sia presentando prescrizione specialistica corredata dalla prescrizione del medico di medicina generale. L'articolata diversificazione delle prestazioni e la possibilità di svolgere indagini di qualsiasi tipo rende il Centro AMES uno dei laboratori di analisi più completi dell'intero panorama nazionale ed internazionale, supportando i pazienti e gli specialisti nell'individuare appropriate soluzioni diagnostiche. Negli ultimi anni il Centro Ames ha aperto una sezione specializzata nell'odontoiatria in grado di offrire tutte le prestazioni in campo odontoiatrico, con alti livelli di competenza, grazie ad un lavoro di equipe che vede la collaborazione di diversi professionisti, ognuno con specifiche competenze. Presso il Centro AMES si svolgono tutte le specialità odontoiatriche: si eseguono pertanto l'igiene e prevenzione, la conservativa, l'endodonzia, la parodontologia, l'ortodonzia, la protesi dentaria, chirurgia orale,

l'implantologia e la patologia orale. L'implantologia non è più ormai una pratica nuova nel panorama odontoiatrico e rappresenta sempre più la soluzione naturale al ripristino di una dentatura che manifesti tutte quelle caratteristiche anatomo-funzionali che più imitano la natura umana. Per quanto sia una pratica di dominio comune e applicabile in un'ampia percentuale di casi, è solo una pianificazione corretta e la padronanza di tecniche e principi rigenerativi tissutali che favoriscono un'osteointegrazione di lunga durata, a garantire un risultato ottimale. Il centro AMES mette a disposizione dei suoi pazienti professionisti con esperienza e professionalità maturate in anni di attività odontoiatrica e chirurgica, in modo da garantire agli assistiti un elevato livello di trattamento per qualunque tipologia di intervento.

Per quanto riguarda il settore della genetica, il Centro AMES svolge attività diagnostica e di consulenza clinica per patologie ereditarie e variabilità genetica. Eroga prestazioni per conto del Sistema Sanitario Nazionale come laboratorio d'alta specializzazione, pertanto, dispone di personale altamente qualificato e costantemente aggiornato sulle novità analitiche e tecnologiche. Presso l'ambulatorio del Centro AMES si effettua il servizio di consulenza genetica pre test, post teste clinica nella quale i soggetti e le famiglie vengono informati sulla natura, l'ereditarietà e le implicazioni delle malattie genetiche. La consulenza è anche finalizzata a fornire un aiuto all'utente al fine di prendere decisioni informate d'ordine medico e personale. L'attività di consulenza spazia in diversi campi:

- consulenza genetica diagnostica (prenatale, postnatale, ed oncologica);
- consulenza genetica per la caratterizzazione dei portatori sani;
- consulenza genetica di suscettibilità;
- consulenza genetica pre test pre sintomatici;
- consulenza genetica farmacogenetica;
- consulenza genetica per indagine forense.

Il laboratorio di Genetica Medica del centro AMES ha sviluppato librerie di geni e "pannelli" diagnostici, avendo considerato le esigenze di pazienti che si rivolgono a noi, in diagnosi prenatale e postnatale, quali:

•Cariotipo Molecolare

- SNP-array

•Analisi post-natale mediante SNP-Array

- Sospetta sindrome cromosomica
- Malformazioni congenite
- Disordini neurologici
- Autismo
- Epilessia
- Disordini cognitivi e dello sviluppo psicomotorio
- Approfondimento diagnostico per la caratterizzazione di anomalie cromosomiche precedentemente identificate attraverso il cariotipo convenzionale
- Fenotipi complessi
- Familiari di soggetti con anomalie cromosomiche

Tabella 1

Table 1 Follow-up information for women who tested positive on NIPT but negative on direct diagnostic tests.

Patient initials	Age	Indication for NIPT	Date of blood draw	Type of tumor	Type of aneuploidy	Adherence to post-partum follow-up	Full-term pregnancy	Cancer stage	Type of treatment for cancer	Vital status
AR	34	PC	May 4, 2021	None	Multiple	Yes	Yes	NA	None	A, NED
AV	29	PC	November 6, 2019	FTC	Multiple	Yes	Yes	Stage I	Surgery	A, NED
BMV	39	MAP	June 15, 2021	Unknown ^a	Multiple	No	Yes	Unknown	Unknown	LFU
CMP	31	PC	October 14, 2021	Uterin myoma	Multiple	Yes	Yes	NA	Surgery	A, NED
CS	39	Age	March 3, 2021	Uterin myoma	Multiple	Yes	Yes	NA	Surgery	A, NED
Ca Ma	42	MAP	January 8, 2022	Unknown ^a	Multiple	No	Yes	Unknown	Unknown	LFU
Cr Ma	38	Age	December 19, 2018	None	Multiple	Yes	Yes	NA	None	A, NED
CD	30	PC	February 4, 2022	Unknown ^a	Multiple	No	Yes	Unknown	Unknown	LFU
EE	36	Age	December 28, 2020	STS	Single (13)	No	Yes	Stage IV	CT	D (May 6, 2022) progression of STS
Fa Va	26	PC	June 14, 2021	NHL	Multiple	Yes	Yes	Stage II	Rituximab + RT	A, NED
Fe Va	28	PC	December 6, 2018	NHL	Multiple	Yes	Yes	Stage I	RT	A, NED
FF	37	Age	April 12, 2022	SFT of SNC	Multiple	Yes	Yes	Diameter 2 cm, no metastases	Surgery	A, NED
FL	39	Age	April 26, 2022	Unknown ^a	Multiple	No	Yes	Unknown	Unknown	LFU
FR	35	Age	June 16, 2021	None	Multiple	Yes	Yes	None	None	A, NED
LB	37	Age	September 25, 2021	BC	Multiple	Yes	No	Stage I	Surgery + HT	A, NED
LR	35	Age	November 29, 2021	Breast fibroadenoma	Multiple	Yes	Yes	NA	Surgery	A, NED
Mar Car	39	Age	September 8, 2022	NHL	Multiple	Yes	Yes	Stage II	Rituximab + RT	A, NED
Mas Car	35	MAP	August 10, 2021	Unknown ^a	Multiple	No	Unknown	Unknown	Unknown	LFU
PA	40	Previous T21	January 25, 2020	Colon	Multiple	No	Yes	Stage II	Surgery	A, NED
PF	34	PC	December 22, 2021	NHL	Multiple	Yes	Yes	Stage II	RT	A, NED
PMR	33	MAP	May 18, 2021	None	Multiple	Yes	Yes	NA	None	A, NED
PJ	28	PC	June 29, 2021	BC	Multiple	No	Yes	Stage I	Surgery + HT	D (Sept 22, 2022) progression of BC
PE	40	Age	August 25, 2021	Unknown ^a	Multiple	No	No	Unknown	Unknown	LFU
TG	45	MAP	January 7, 2022	Breast fibroadenoma	Multiple	Yes	Yes	NA	Surgery	A, NED
TP	35	Age	January 26, 2021	Unknown ^a	Multiple	No	Unknown	Unknown	Unknown	LFU
VMC	23	PC	February 19, 2021	NHL	Multiple	Yes	Yes	Stage I	RT	A, NED
WN	26	PC	September 6, 2019	Colon	Multiple	Yes	Yes	Stage II	Surgery	A, NED

A, alive; BC, breast cancer; CT, chemotherapy; D, dead; FTC, follicular thyroid carcinoma; HT, hormone therapy; LFU, lost to follow-up; MAP, medically-assisted procreation; NED, no evidence of disease; NHL, non-Hodgkin lymphoma; PC, personal choice; RT, radiotherapy; SFT, solitary fibrous tumor; STS, soft tissue sarcoma.

^a These patients did not want to undergo any further diagnostic investigations or release any additional information. Indirect information obtained through the treating physician suggests a high probability that they may have developed cancer.

Please cite this article as: Ottaiano A et al., Non-invasive prenatal testing can detect silent cancers in expecting mothers, *Genes & Diseases*, <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.04.008>

• **Screening genico di mutazioni mediante NGS**

- Esoma
- Pannello Cardiomiopatie
- Pannello Sordità
- Pannello geni coinvolti nella predisposizione al cancro
- Pannello Screen Test (Portatore sano)
- Pannello Cancro della mammella e dell'ovaio
- Pannello Baby Exome
- Pannello Mieloide
- Pannello neoplasie endocrine MEN
- Pannelli oncologia (TrusightTumor I5 e TrusightTumor I70)
- Analisi geni BRCA1 e BRCA2
- Analisi gene CFTR

• **Test di genetica prenatale Invasiva**

- Cariotipo su liquido amniotico e/o villi coriali
- Ultramicrocentesi
- QF-PCR

• **Test di genetica prenatale non invasiva**

- Vera Prenatal test
- Vera Plus (cariotipo fetale)
- Vera Omnia
- Pannello Microdelezioni
- Determinazione fattore RH fetale

• **Analisi Citogenetica post-natale**

- cariotipo su sangue periferico
- cariotipo di materiale e/o tessuto abortivo

• **Test di Screening pre-concezionali di coppia**

- Donna
- Uomo

• **Test per la diagnosi e lo screening delle seguenti patologie genetiche**

- Amiloidosi familiare
- Analisi molecolare mielodisplastica dei geni TP53 EASX1
- Analisi di zigosita'
- Cardiomiopatia ipertrofica
- Cardiomiopatia dilatativa (DCM)
- Cecità congenita notturna
- Celiachia
- Displasia aritmogena del ventricolo destro (D/ARVD)
- Degenerazione maculare senile (DMS)
- Disomieuniparentali (UDP)

- Emocromatosi ereditaria
- Febbre mediterranea familiare
- Fibrosi cistica (CF)
- Intolleranza al lattosio
- Iperplasia surrenale congenita (CAH)
- Ipoacusia
- Ipogonadismo ipogonadotropo congenito (CHH)
- Malattia di Best o distrofia maculare vitelliforme
- Malattia di Fabry
- Malattia di Stargardt
- Melanoma (CDKN2A)
- Microrodelezioni del cromosoma Y
- Neoplasia endocrina multipla
- Neuropatia ereditaria con paralisi da pressione (HNPP)
- Porfirie
- Sindrome del QT-LUNGO (LQTS)
- Rene Policistico dell'adulto (ADPKD)
- Retinite pigmentosa autosomica recessiva, dominante e X-Linked
- Sindrome di Charcot-Marie-Tooth
- Sindrome di Marfan
- Sindrome Angelman
- Sindrome Brugada
- Sindrome di Gilbert
- Sindrome di Prader Willi
- Sindrome di Silver Russell (SRS)
- Sindrome Von Hippel-Lindau (VHL)
- Sindrome di Usher (SRS)
- Sindrome dell' x-fragile
- Tachicardia ventricolare (TV)
- Talassemia Beta ed Alfa
- Trombofilia
- Vitreoretinopatie

• **Farmacogenetica Molecolare**

- Test di Tolleranza ai chemioterapici (Fluoropirimidine, Metotressano, Irinotecano, Derivati del Plati-no, Taxani)

• **Diagnosi molecolare in Oncologia**

- Test per l'identificazione di mutazioni nei geni quali:
- EGFR
- KRAS
- BRAF
- NRAS
- EML4-ALK

• **Infettivologia Molecolare**

- Ricerca di candida species
- Ricerca di ChlamydiaTrachomatis
- Ricerca di Citomegalovirus (CMV)
- Ricerca di Gardenerella
- Ricerca di HBV
- Ricerca e genotipizzazione di HCV
- Ricerca di Herpes Simplex Virus (HSV 1-2)
- Ricerca di MycoplasmaGenitalium - MycoplasmaHominis
- Ricerca di Neisseria Gonorrhoeae
- Ricerca di Toxoplasma Gondii
- Ricerca di Trichomonas Vaginalis
- Ricerca di Rubella virus
- Ricerca di pseudomonasaeruginosa
- Ricerca di Ureaplasmaparvum-ureaplasmaurealyticum
- Ricerca di Virus Varicella - Zoster

• **Test di Genetica Forense e Parentela**

- Test di paternità
- Test di paternità sul cromosoma Y

• **Test di Oncoematologia**

- Sindromi mieloproliferative
- Eritrocitosi
- Leucemia linfatica cronica
- Leucemia Mieloide cronica
- Mielofibrosi
- Policitemia Vera

• **Ricerca e Genotipizzazione di Papilloma Virus (HPV)**

- HPV test 14 genotipi
- HPV test 28 genotipi
- Save Cancer Test