

Screening prenatale non invasivo basato sul DNA

D'Ambrosi F. 22 settembre 2015.

Le tecniche di diagnosi prenatale comprendono indagini strumentali e di laboratorio, che hanno lo scopo di monitorare il concepito e la gravidanza.

Sempre più attenzione è rivolta all'applicazione di queste metodologie in epoche gestazionali precoci o comunque nel primo trimestre al fine individuare eventuali patologie.

La diagnosi prenatale comprende tecniche di tipo invasivo (le più diffuse amniocentesi e villocentesi) e tecniche di screening non invasive (Bi test e ricerca del DNA fetale su sangue materno)¹.

Principali tecniche invasive:

- L'amniocentesi consiste in una puntura transaddominale sotto controllo ecografico con lo scopo di prelevare del liquido amniotico, attorno alla 16^a - 18^a settimana gestazionale. Nel liquido sono infatti contenuti gli amniociti, cellule di sfaldamento del feto provenienti da cute e mucose sulle quali si possono eseguire indagini al fine di conoscere il cariotipo (il corredo cromosomico) del prodotto del concepimento. Questa procedura non è priva di complicanze, il rischio di aborto, causato all'invasività della tecnica, è calcolato in circa 1:200.

La villocentesi anch'essa è eseguita mediante puntura transaddominale, sotto controllo ecografico, attorno alla 12^a settimana di gravidanza. In questo caso sono prelevati frammenti di placenta (villi coriali) dai quali si possono ottenere informazioni sul corredo cromosomico del feto. Anche per questa metodica il rischio abortivo si aggira intorno al 1:200¹.

Principali test di screening del primo trimestre:

Per comprendere a pieno l'utilizzo delle tecniche di screening attualmente messe in atto nel primo trimestre si deve comprendere cosa significhi screening.

Esso consiste in una serie d'indagini ritenute accettabili dai pazienti, utilizzate per identificare, all'interno di una popolazione, i soggetti a rischio per una patologia, che costituisce un problema importante di salute pubblica in termini di prevalenza (elevata) e di sintomi clinici (gravi) e per cui sia disponibile un trattamento accettabile per quei pazienti che risultino positivi al test¹⁻².

Nel caso in questione lo screening per le aneuploidie (cioè le anomalie nel numero dei cromosomi) fetali si è evoluto notevolmente negli ultimi decenni, portando complessivamente al miglioramento dei tassi di rilevamento delle stesse.

I test di screening rispetto alla diagnosi prenatale invasiva non permette di conoscere numero e forma dei cromosomi del feto, ma stabiliscono la probabilità che il feto sia affetto da una delle principali aneuploidie (trisomia 21 o sindrome di Down, trisomia 18 o sindrome di Edward e trisomia 13 o sindrome di Patau).

- Il bi-test (o test combinato) utilizza il sangue materno acquisito attorno alla 11^a settimana, sul quale vengono dosati due ormoni di origine placentare la Beta gonadotropina corionica (β -hcg) e la

Pregnancy Associated Plasma Protein A (PAPP-A). Tale analisi è in seguito integrata con un'ecografia transaddominale da eseguirsi fra la 11^a e la 13^a in cui viene misurata la traslucenza nucale (raccolta di liquido che è presente nella regione della nuca del feto). L'esame deve essere condotto da operatori esperti che abbiano ottenuto una certificazione (rilasciata dalla Fetal Medicine Foundation di Londra).

Questo test di screening è in grado di predire circa l'80% delle Sindromi di Down, con una percentuale di falsi positivi (cioè che alla fine non presenta la condizione che il test farebbe ipotizzare) di circa il 5%. L'aggiunta di ulteriori markers ecografici (la visualizzazione dell'osso del naso del feto, la valutazione della frequenza cardiaca e della funzionalità della tricuspide fetale e del dotto del dotto venoso) migliora la sensibilità, cioè la capacità di individuare feti affetti sino al 95%⁴⁻⁶.

Mediante questo esame è possibile individuare quindi quali siano quelle gravidanze ritenute a basso rischio per le tre principali aneuploidie (trisomia 21, 18 e 13). Inoltre permette un primo studio morfologico del feto già a 12 settimane di gravidanza⁶.

L'operatore alla fine del test può riconoscere quali siano le pazienti con feto a elevato rischio per difetti cromosomici o morfologici cui proporre successivi accertamenti se esse lo desiderassero rispetto a quelle a basso rischio che proseguiranno con i controlli di routine.

E' importante ribadire come i test di screening prenatali (come tutti i test di screening) non siano volti a diagnosticare una data patologia, ma abbiano lo scopo di identificare quali siano i feti ad elevato probabilità di esserne portatori senza sottoporre tutte le pazienti a test invasivi con un potenziale rischio abortivo.

- DNA libero di origine fetale consiste in un semplice prelievo di sangue venoso materno. Infatti già dal primo trimestre di gravidanza e in particolare dalla 10^a settimana di gestazione, sono presenti nel circolo ematico materno DNA libero di origine fetale (cffDNA dall'acronimo inglese "cell free fetal DNA"). Sottoponendo dunque la donna a un prelievo di sangue è possibile isolare tali cellule³.

La percentuale di concentrazione di DNA libero fetale può variare tra meno del 4%, una quantità non utile per la diagnosi, e circa il 40%, con una media del 10%, alla 12^a settimana⁷.

Una buona concentrazione per l'impiego clinico e l'esecuzione del test si raggiungono a partire dalla 10^a settimana di gestazione.

La metodica utilizzata da questo esame si basa sul rapporto di porzioni di un dato di cromosoma individuati nel prelievo e quelli che ci aspetteremmo di trovare in una paziente con un feto portatore di un assetto cromosomico normale. Se tale rapporto è maggiore di 1 vi è la probabilità che il feto sia affetto da una trisomia (presenza di cromosoma soprannumerario)¹.

Secondo la percentuale della quota di cffDNA presente nel campione varia l'accuratezza dell'esame. Se essa è inferiore al valore considerato soglia di almeno il 4%, il test di screening non risulta statisticamente significativo e dunque l'esame non è attendibile. E' quindi sempre opportuno verificare la percentuale di frammenti liberi che vengono individuati nel campione in esame^{1,7}.

In tutti gli studi condotti su questa tipologia di screening nelle gravidanze singole⁸ per le tre principali anomalie del numero dei cromosomi son state riscontrate percentuali di sensibilità (capacità del test di individuare i soggetti affetti – DR) e di specificità (capacità del test di individuare i soggetti sani - FPR) del test come riportato nella tabella sottostante.

	Sensibilità (DR)	Specificità (FPR)
Trisomia 21 (Sindrome di Down)	99,2% (95% CI, 98,5-99,6%)	FPR 0,09% (95% CI, 0,05-0,14%)
Trisomia 18 (Sindrome di Edwards)	96,3% (95% CI, 94,3-97,9%)	FPR 0,13% (95% CI, 0,07-0,20%)
Trisomia 13 (Sindrome di Patau)	91,0% (95% CI, 85,0-95,6%)	FPR 0,13% (95% CI, 0,05-0,26%)

Questo test di screening ha dimostrato di possedere anche una buona sensibilità e specificità aneuploidie dei cromosomi sessuali X e Y nelle gravidanze singole anche se inferiore rispetto a quello dei cromosomi precedentemente elencati.

Per la monosomia X è stata dimostrata sensibilità del 90,3% (95% CI, 85,7-94,2%) ed una specificità dello 0,23% (95% CI, 0,14-0,34%)⁸.

Per tutte le altre aneuploidie dei cromosomi sessuali 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%)⁸.

Sono inoltre in via di sviluppo pannelli che analizzano alcune sindromi clinicamente riconoscibili. I risultati preliminari indicano tuttavia una ancor bassa sensibilità (62-95%) ed una elevata specificità^{3,9}
-¹⁴.

Dunque in questo caso la maggior parte di questi protocolli sono sperimentali e non proponibili nella pratica clinica quotidiana¹⁵.

In conclusione oggi l'impiego di algoritmi dedicati permette di definire quale sia la probabilità che il feto sia affetto da una delle principali trisomie autosomiche (trisomia 21, trisomia 18, trisomia 13) o da un'aneuploidia dei cromosomi sessuali (X, XXX, XXY, XYY). Vengono infatti analizzati il numero di cffDNA di ciascuno dei cromosomi oggetto del test¹.

Limiti di esecuzione del DNA libero fetale

Questo esame presenta alcuni casi in cui gli esiti non sono considerati attendibili:

- E' stato stimato che, in circa il 2% dei campioni prelevati al termine del primo trimestre di amenorrea, la percentuale di DNA libero non superi la soglia del 4% e non sono dunque utilizzabili al fine di questo esame⁷.
- Se la madre è portatrice di un assetto cromosomico che differisca dal normale. In alcuni casi queste alterazioni (mosaicismi cromosomici) non sono noti alla paziente in quanto non

associati a segni clinici. In queste pazienti il risultato dell'esame può non essere attendibile.

- Farmaci, agenti fisici o virali possono danneggiare il DNA e influire sulla quantità e la tipologia di DNA libero circolante isolabile.
- Presenza di placenti evanescenti da pregressi aborti.

Tutte queste possibilità sono comunque molto rare nella pratica clinica e necessitano sempre di consulenze e approfondimenti maggiori ¹.

Quando e come eseguire il test

I principali studi internazionali consigliano di anteporre a questo test un accurato controllo ecografico (ancor meglio il bi – test) dopo l' 11^a settimana. Va infatti ricordato che il bi test dà ulteriori informazioni e non studia il solo rischio di alterazione del numero dei cromosomi. Tramite l'ecografia condotta da un operatore certificato infatti è possibile individuare già a 12 settimane di gravidanza anomalie fetali maggiori (malformazioni cardiache, anomalie della parete addominale, degli arti o dell'estremo cefalico) ⁶. Per tale motivo non sarebbe corretto considerare il cffDNA come un esame sostitutivo al bi – test, ma per lo più un esame integrante ¹.

Nel caso in cui vengano rilevate anomalie morfologiche del feto o l'esito del bi test suggerisca un aumento del rischio di patologia cromosomica, deve essere valutata l'opportunità di eseguire direttamente una diagnosi prenatale invasiva (amniocentesi o villocentesi) e non il DNA libero fetale ^{16,17}.

Il test del DNA libero dovrebbe essere offerto a quelle donne che richiedano ulteriori approfondimenti a fronte di un bi test che mostri un basso rischio per le tre aneuploidie e una morfologia fetale ecograficamente indagabile nella norma per epoca gestazionale.

E' necessario che le donne che intendano sottoporsi a tale prelievo siano informate mediante un colloquio che trasmetta loro le informazioni necessarie per comprendere a pieno le caratteristiche del test di screening, i suoi benefici e limiti. Le stesse pazienti dovranno inoltre firmare un consenso informato scritto prima di sottoporsi a tale prelievo ¹.

Il Centro che offre il test deve essere in grado di garantire la consulenza genetica post-test ed il completo supporto alla paziente durante l'intero iter diagnostico prenatale.

Va sempre ricordato alla donna che si tratta di uno screening prenatale che ha una sensibilità più elevata in particolare per la trisomia 21 rispetto agli attuali test di screening che combinano le analisi biochimiche e la translucenza nucale (bi test). IL DNA libero fetale che non si sostituisce però al bi-test né esclude la possibilità di poter eseguire ulteriori test diagnostici invasivi ¹.

Il fine del DNA libero fetale è quello di fornire informazioni aggiuntive alle coppie che lo desiderano nelle gravidanze considerate a basso rischio per la presenza delle tre principali aneuploidie, senza dover mettere a rischio la gravidanza con tecniche invasive.

In conclusione:

Lo screening prenatale non invasivo basato sul DNA non è un test diagnostico ¹.

Il test verifica la possibilità che il feto sia affetto dalle più comuni aneuploidie, con una specificità e sensibilità elevata. Esso esprime 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) ^{16,17}.

Il test deve comunque 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.

L'indagine è al momento mirata e validata per le principali aneuploidie(trisomia 21,13 e 18)¹.

Bisogna inoltre ricordare che le anomalie cromosomiche indagate riguardano solo una parte, sia pure significativa (50-70%), delle aberrazioni cromosomiche eventualmente presenti nel feto. Uno studio morfologico del feto già a partire dalla 12^a settimana è a maggior ragione necessario ^{1,6}.

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

I Centri e gli operatori che erogano il test devono¹ :

- Avere competenze nella diagnosi ecografica e nella diagnosi prenatale.
- Essere in grado di offrire la consulenza pre-test e post-test.
- Essere collegati con il laboratorio certificato che partecipi a programmi della qualità nazionali ed internazionali.
- -La tipologia di analisi e la metodica di screening proposta deve essere resa pubblica e devono essere presenti validazioni scientifiche¹.

BIBLIOGRAFIA

1. Ministero della Salute. Screening prenatale non invasivo basato sul DNA(Non Invasive Prenatal Testing – NIPT). Maggio 2015.
2. Wilson JM, Jungner YG. Principles and practice of screening for disease. World Health Organization, Geneva, 1968.
3. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350:485-487.
4. Nicolaides KH, Syngelaki A, Poon LC, Gil MM, Wright D..First-trimester contingent screening for trisomies 21, 18 and 13 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35:185–192.
5. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207:374.e1-6.
6. Nicolaides KH. A model for a new pyramid of prenatal care based on the 11 to 13 weeks' assessment. *Prenat Diagn* 2011; 31: 3–6. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/pd.2685
7. Turocy John, Norem Carol, Blumberg Bruce, Norton Mary. Chromosomal abnormalities detected in patients with failure to obtain test results using non-invasive prenatal testing. *AJOG*. 2015; 212(Suppl 1): S45.
8. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar E, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015; 45:249-266.
9. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med*. 2012;367(23):2175-84.
10. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem*. 2000;46:301-302.
11. Hill M, Wright D, Daley R, Lewis C, McKay F, Mason S, Lench N, Howarth A, Boustred C, Lo K, Plagnol V, Spencer K, Fisher J, Kroese M, Morris S, Chitty LS. Evaluation of non-invasive prenatal testing (NIPT) for aneuploidy in an NHS setting: a reliable accurate prenatal non-invasive diagnosis (RAPID) protocol. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014;14:229.
12. Pan X, Zhang C, Li X, Chen S, Ge H, Zhang Y, Chen F, Jiang H, Jiang F, Zhang H, Wang W, Zhang X. Non-invasive fetal sex determination by maternal plasma sequencing and application in X-linked disorder counseling. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014;27(18):1829-1833.
13. Papasavva T, van Ijcken WF, Kockx CE, van den Hout MC, Kountouris P, Kythreotis L, Kalogirou E, Grosveld FG, Kleanthous M. Next generation sequencing of SNPs for non-

invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to beta-thalassemia. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:1403-1410.

14. Twiss P, Hill M, McKay F, Fielding S, Jenkins L, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: detection of paternal mutations and exploration of patient preferences. *Prenat Diagn.* 2014;34 (Suppl 1):83.
15. Everett TR, Chitty LS: Cell-free fetal DNA: The new tool in fetal medicine. *Ultrasound in Obst Gynecol* 2015;45:499-507.
16. Novelli A, Grati FR, Ballarati L, Bernardini L, Bizzoco D, Camurri L, Casalone R, Cardarelli L, Cavalli P, Ciccone R, Clementi M, Dalprà L, Gentile M, Gelli G, Grammatico P, Malacarne M, Nardone AM, Pecile V, Simoni G, Zuffardi O, Giardino D. Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;39(4):384-388.
17. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2175-84.