



SIGU - Società Italiana di Genetica Umana

**DOCUMENTO DI INDIRIZZO
SULL'IMPIEGO DI INDAGINI
PRENATALI NON INVASIVE**

AGGIORNAMENTO 2016

A cura della Commissione SIGU per la Diagnosi Prenatale Non Invasiva

A cura della Commissione SIGU composta da:

Maria Cristina Rosatelli (Cagliari) **Coordinatore**; Faustina Lalatta (Milano); Elisabetta Lenzini (Padova); Antonio Novelli (Roma); Chiara Pescucci (Firenze); Alessandra Renieri (Siena); Gioacchino Scarano (Benevento).

Ed. luglio 2016



Documento di indirizzo sull'impiego di indagini prenatali non invasive *Aggiornamento 2016*

Premessa

La diagnosi prenatale delle malattie monogeniche e delle aneuploidie si esegue tradizionalmente su campioni fetali prelevati nel I-II trimestre di gravidanza attraverso procedure di prelievo invasive (DPI), quali la villocentesi e l'amniocentesi, associate ad un rischio di perdita fetale stimato intorno allo 0,5-1%.

Per questo motivo, da alcuni decenni, sono state portate avanti diverse linee di ricerca finalizzate allo sviluppo di procedure non invasive, con l'intento di ridurre i rischi per il feto e di anticipare i tempi della diagnosi prenatale.

Tali linee di ricerca hanno ampiamente dimostrato che sin dalle prime settimane di gravidanza è possibile rilevare nel circolo ematico materno la presenza di cellule fetali intatte e di DNA libero di origine fetale (cffDNA, cell-free fetal DNA) e che questa fonte di materiale genetico fetale può essere utilizzata per la diagnosi prenatale non invasiva (NIPD, Non Invasive Prenatal Diagnosis o NIPT Non Invasive Prenatal Testing).

Nonostante l'impegno profuso per anni, non è stato sinora possibile sviluppare, sulle cellule fetali, un approccio diagnostico trasferibile alla pratica clinica, a causa delle difficoltà di isolamento e analisi delle cellule stesse.

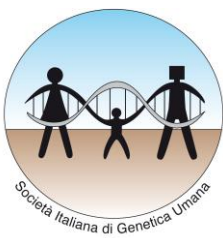
Viceversa, una svolta fondamentale si è avuta per la NIPD quando YMD Lo nel 1997 descrisse per la prima volta la determinazione del sesso fetale attraverso l'analisi del cfDNA (cell-free DNA) estratto da plasma materno, in un gruppo di donne in gravidanza con feto di sesso maschile (Lo YMD et al. 1997).

Studi successivi hanno definito in dettaglio le caratteristiche del cffDNA. Il DNA fetale costituisce una frazione variabile generalmente compresa tra il 3 e il 20% del DNA totale extracellulare rilevabile nel circolo materno (Lun FMF et al.2008), ha una concentrazione che tende ad aumentare progressivamente nel corso della gravidanza e che può variare in presenza di aneuploidie fetali (diminuisce in trisomie 13 e 18, aumenta nella trisomia 21); esso è presente sotto forma di frammenti di dimensioni ridotte rispetto a quelli che costituiscono la frazione materna.

La placenta e, in particolare, le cellule del sinciziotrofoblasto in apoptosi, sono la fonte principale di cffDNA (Flory E. et al. 2004; Alberry M. et al.2007), il quale è poi completamente rimosso dalla circolazione materna, probabilmente attraverso l'escrezione renale, entro poche ore dal parto (Lo YMD et al. 1999).

Un punto critico dell'analisi del cffDNA è che esso rappresenta, in media, il 10% del DNA totale estratto dal plasma, mentre la frazione predominante è rappresentata dal DNA materno. Nonostante questi limiti, diversi studi hanno dimostrato come, attraverso l'utilizzo di tecnologie a elevata sensibilità (digital PCR, Massively Parallel Sequencing – MPS – sull'intero genoma o su sequenze target, SNP-based NGS, Digital ANalysis of Selected Regions - DANSR) e l'applicazione di algoritmi dedicati, sia possibile eseguire il test di screening prenatale delle più comuni aneuploidie fetali (trisomia dei cromosomi 21, 13 e 18, aneuploidie dei cromosomi sessuali) e la NIPD di alcune malattie monogeniche su DNA libero circolante, oltre che test per l'identificazione della paternità.

Le applicazioni principali del test prenatale su cfDNA sono:



- Screening delle principali aneuploidie cromosomiche;
- Determinazione del sesso fetale applicata alle gravidanze a rischio per malattie genetiche X-linked, al fine di evitare DPI nei feti di sesso femminile, e per Iperplasia surrenale congenita (CAH) a fini terapeutici;
- Determinazione del genotipo fetale RHD (Rh bloodgroup, D antigen) in donne RhD-negative con partner RhD positivo, a rischio di malattia emolitica neonatale;
- Malattie autosomiche dominanti sporadiche o ad eredità paterna (Acondroplasia, Morbo di Huntigton, ecc);
- Alcune malattie autosomiche recessive (β -talassemia, Fibrosi Cistica, ecc), in particolare attraverso l'esclusione della mutazione paterna e la determinazione del genotipo fetale (RMD, Relative Mutation Dosage) e/o l'approccio RHDO (Relative Haplotype DOSage) mediante determinazione dell'aplotipo fetale.

Mentre per le malattie monogeniche l'evoluzione delle tecniche ed il loro trasferimento nella pratica clinica è oggettivamente lento, lo screening prenatale non invasivo delle più frequenti anomalie cromosomiche di numero su cfDNA ha avuto una evoluzione incontenibile, anche in virtù della presenza di interessi commerciali.

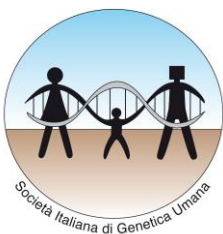
Il trasferimento del test di screening prenatale non invasivo nella pratica clinica ed il suo ruolo nella diagnosi delle anomalie cromosomiche ha suscitato un profondo dibattito alimentato dallo sviluppo di decine di trials clinici per definirne l'attendibilità.

I risultati di tali studi possono essere così riassunti:

- Il test di screening prenatale non invasivo basato sull'analisi del DNA libero circolante nel plasma materno rappresenta un metodo accurato per la determinazione del rischio di aneuploidie fetali a carico dei cromosomi 21, 18 e 13.
- Per lo screening della trisomia 21 (T21) in donne a rischio aumentato* il test presenta l'attendibilità maggiore, con sensibilità e specificità superiori al 99% (in particolare 99,3% riferita ai falsi negativi e 99,8% ai falsi positivi). Tali dati sono molto consistenti e suffragati da ampia letteratura (vedi per review Statement ACOG e ISPD 2015).
- Nelle donne a rischio aumentato un'attendibilità di poco inferiore è stata riportata per l'identificazione della trisomia del cromosoma 18 (T18, sensibilità 97,4%, specificità 99,8%), sensibilmente inferiore per la trisomia del cromosoma 13 (T13, sensibilità 91,6%, specificità 99,8%), e per le aneuploidie dei cromosomi sessuali (sensibilità 91%, specificità 99,6%) (ACOG 2015).
- E' stato proposto di ampliare il test alle più frequenti microdelezioni (es. microdelezioni 22q11) ma questi test non sono stati ancora validati in trials clinici, il PPV risulta estremamente basso e la loro utilità clinica non è comprovata. Pertanto lo screening delle microdelezioni su cfDNA non è raccomandato (SMFM Consult Series 2015).

Il test presenta ancora alcuni limiti:

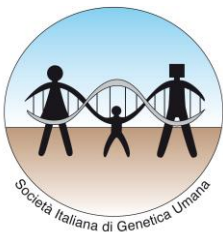
1. La sensibilità e la specificità non sono così elevate per tutti i cromosomi e questo sarebbe principalmente dovuto alla variabilità intercromosomica nel contenuto di basi CG e alla presenza di varianti strutturali estese (CNV). Pertanto la stima del rischio è al momento limitata alle aneuploidie dei cromosomi 21,18,13. Queste ultime rappresentano circa il 50-70% delle anomalie diagnosticate di routine con la diagnosi prenatale invasiva (DPI), di conseguenza la quota restante di anomalie cromosomiche non sono identificate dai NIPT;



2. Le performances descritte si riferiscono a popolazioni di gestanti a rischio aumentato*. Nella popolazione a basso rischio recenti evidenze permettono di asserire con ragionevole certezza che i valori di sensibilità e specificità del test sono pressoché sovrapponibili a quelli della popolazione a rischio aumentato. In tale popolazione però, a causa della più bassa incidenza delle trisomie 21, 18, 13, che rappresentano una percentuale minore di tutte le anomalie riscontrate, il valore predittivo positivo (VPP) risulta invece inferiore. Gli screening convenzionali, eseguiti con test combinati biochimici ed ecografici, hanno in questo ambito maggiore potere diagnostico;
3. Il test non distingue tra diversi tipi di aneuploidie (T21 libera, da traslocazione cromosomica o mosaicismo);
4. La presenza di falsi positivi e negativi, dovuta principalmente a mosaicismi feto-placentari o a gravidanze gemellari in cui uno dei gemelli sia stato riassorbito nelle prime settimane di gestazione (vanishing twins), malattie tumorali materne e condizioni di mosaicismo cromosomico nella madre, rende il test non diagnostico. Nei casi positivi è quindi fondamentale una conferma con il test invasivo, preferenzialmente attraverso prelievo di liquido amniotico;
5. Nei casi di gravidanza gemellare non è possibile distinguere la condizione del singolo feto;
6. Il test non è raccomandato in caso di anomalie fetali strutturali evidenziate ecograficamente;
7. Il test non è attualmente raccomandato per lo screening di microdelezioni;
8. Il risultato del test è condizionato dalla quantità percentuale di DNA fetale presente nel plasma che deve essere superiore al 3-4% (Canick et al 2013); quantità inferiori possono esitare in risultati falsi negativi. La quantità relativa di DNA fetale risulta ridotta in particolari condizioni quali età gestazionale inferiore alla 10^a settimana ed un indice di massa corporea materna elevato.
9. L'esame ha un rischio globale di fallimento di circa 1-4%, a seconda delle casistiche, dovuto a basse percentuali di DNA fetale o ad altre cause. Poiché la percentuale di aneuploidie riscontrate nelle gravidanze con risultato inconclusivo o non interpretabile si aggira intorno al 23% (ACOG 2015), nelle donne normopeso sarebbe opportuno che risultati di bassa frazione fetale o risultati non conclusivi, ottenuti su due prelievi distinti, eseguiti ad almeno una settimana di distanza l'uno dall'altro, e pertanto riconducibili a cause biologiche, venissero gestiti nell'ambito di una consulenza genetica volta a valutare un eventuale rischio aumentato di aneuploidie e una conseguente strategia di approfondimento diagnostico.

Per tutti questi motivi il test non invasivo può essere collocato al momento all'interno del percorso degli screening prenatali nelle coppie a rischio aumentato, preceduto e seguito da consulenza genetica, con l'intento di aumentare in maniera considerevole l'efficienza diagnostica del percorso "combinato". In questo contesto rappresenta un importante ausilio agli altri test ecografici e biochimici, che svolgono comunque una funzione al momento non sostituibile. In particolare, potrebbe rivelarsi di rilevante utilità nell'evitare la diagnosi invasiva nei casi in cui lo screening prenatale convenzionale definisse un rischio aumentato dovuto a un risultato "falso positivo", evento che si verifica nel 5% dei casi e/o quando la coppia a rischio aumentato fosse contraria all'esecuzione di test invasivi.

**Criteri di inclusione nel rischio aumentato: età materna maggiore di 35 anni, segni ecografici che depongono per un rischio aumentato di aneuploidie, risultato positivo del test di screening convenzionale (BI-test), precedenti gravidanze con feto trisomico, traslocazioni bilanciate nei genitori che predispongono a trisomie T13 e T21.*



E' necessario sottolineare che recenti trials pubblicati nella letteratura internazionale stabiliscono una buona validità clinica del test anche nelle donne a basso rischio, e quindi il suo utilizzo può essere considerato appropriato anche in questa categoria.

Le maggiori società scientifiche nazionali ed internazionali (ESHG, ACOG, ACMG, ISPD, NSGC, SIGU, SIEOG) nonché il Californian Technology Assessment Forum ed il Consiglio Superiore di Sanità del Ministero della Salute Italiano, hanno recentemente assunto posizioni per lo più concordanti sulla validità clinica, i limiti, gli aspetti etici ed economici e sul significato o ruolo stesso del test ovvero di aumentare il potere predittivo degli screening prenatali non invasivi

Parere

La **Società Italiana di Genetica Umana**, sulla base di quanto sopra esposto e tenendo in considerazione anche quanto già espresso dalle Società scientifiche internazionali, esprime il seguente parere:

I test prenatali non invasivi devono essere eseguiti in laboratori selezionati che siano certificati, accreditati per le attività di Genetica Medica e qualificati a svolgere tali indagini.

Per quanto attiene alle **malattie monogeniche** ed alla determinazione del sesso fetale, si ritiene appropriato il loro impiego nelle seguenti applicazioni in cui la sensibilità e la specificità del test sono ben definite ed il test è ritenuto attendibile e diagnostico:

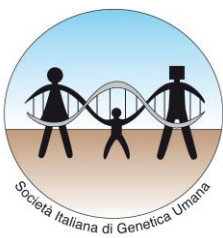
- Nella determinazione del sesso fetale applicata alle gravidanze a rischio per malattie genetiche X-linked, al fine di evitare DPI nei feti di sesso femminile, e per Iperplasia surrenale congenita (CAH) a fini terapeutici;
- Nella determinazione del genotipo fetale RHD (Rh blood group, D antigen) in donne Rh D-negative a rischio per malattia emolitica del neonato;
- Nelle malattie autosomiche dominanti di origine paterna e in quelle *de novo* il cui sospetto clinico sia posto in sede ecografica, ad esempio alcune displasie scheletriche, specificamente l'acondroplasia e la displasia tanatofora.

Si ritiene che il test NON sia invece validato a livello diagnostico, e quindi non utilizzabile nella pratica clinica, nelle seguenti malattie monogeniche:

- Autosomiche recessive;
- X-linked;
- Dominanti di origine materna;

Per quanto attiene l'utilizzo del test di screening per la determinazione del rischio di **aneuploidie**, è necessario tenere conto delle seguenti considerazioni:

- Il ruolo del test è aumentare il potere predittivo degli screening prenatali convenzionali (ecografici e biochimici) nella popolazione a rischio aumentato di aneuploidie (età materna avanzata, anomalie ecografiche e biochimiche fetali, deponenti per un rischio aumentato); pertanto si colloca come test di screening avanzato per la valutazione del rischio di trisomia 21, 18 e 13 (per le quali i dati di letteratura sono più consistenti). In questo contesto concorre nel ridurre il ricorso alla diagnosi prenatale invasiva (DPI).



- Il test non presenta la stessa capacità diagnostica della diagnosi prenatale invasiva. Dal momento che si tratta di un test di screening che è in grado esclusivamente di fornire una predizione di rischio, si raccomanda che eventuali risultati positivi siano confermati mediante diagnosi prenatale invasiva e che nessuna decisione in merito alla gravidanza venga presa sulla base esclusiva del risultato dell'indagine NIPT.
- In caso di risultato negativo, per il limitato tipo di anomalie cromosomiche che sono oggetto del test (T21, T18 e T13), deve essere sottolineato che il test non identifica tutte le anomalie cromosomiche.
- Dal momento che il test non è in grado di fornire informazioni sull'eventuale presenza di difetti del tubo neurale o altri difetti congeniti o anomalie cromosomiche strutturali, sarebbe opportuno che questo test venisse offerto nell'ambito di un percorso assistito di gravidanza volto alla valutazione dello stato complessivo di salute del feto e della madre.
- Il test deve essere sempre accompagnato da consulenza genetica, durante la quale i limiti ed i benefici dell'esame devono essere chiaramente esposti. In particolare la consulenza genetica può essere di grande ausilio nei casi in cui l'attitudine della coppia sia orientata verso un rifiuto dell'indagine invasiva. La semplicità di accesso, attraverso un prelievo venoso, rende il test molto popolare ed un uso improprio o un abuso molto probabile. Pertanto è compito del consulente specialista in genetica medica individuare i casi in cui esso è appropriato e rendere questo concetto chiaro ai richiedenti.

Le informazioni della consulenza pre-test devono pertanto chiarire che:

1. Lo screening prenatale non invasivo delle più frequenti anomalie cromosomiche di numero su cfDNA non è un test di routine ma può essere una scelta della coppia dopo la consulenza genetica che includa anche un'accurata storia familiare per valutare l'appropriatezza dell'approccio diagnostico;
2. Non è un test diagnostico, ma come test di screening presenta sensibilità e specificità elevate;
3. Il test è validato per le trisomie più frequenti, che rappresentano il 50-70% della patologia cromosomica fetale clinicamente rilevante, e non dà altre informazioni genetiche sul feto;
4. Un test negativo non assicura assenza di patologia;
5. Un test positivo necessita di conferma diagnostica con approccio invasivo (amniocentesi);
6. Nel corso dell'esame si possono riscontrare incidentalmente dei risultati non correlati con il quesito diagnostico (dovuti a patologie materne quali anomalie del cariotipo e tumori), spesso anche di difficile interpretazione. Questo rischio deve essere menzionato durante la consulenza pre-test e nel consenso informato deve essere chiaramente espressa la volontà della donna di volere/non volere esserne informata;
7. La quantità di DNA fetale può essere insufficiente all'esecuzione del test. Il rischio di fallimento dell'esame è di circa 1-4%; poiché un risultato non conclusivo o fallimento dell'esame è stato recentemente correlato con patologie fetali, nell'ambito della consulenza genetica post test dovrebbe essere consigliata in questi casi un'attenta valutazione ecografica ed eventualmente l'analisi del cariotipo fetale da valutare in team multidisciplinare e secondo le attitudini materne;
8. Lo screening prenatale non invasivo non sostituisce la diagnosi prenatale invasiva (con amniocentesi o villocentesi) che deve rimanere un'opzione percorribile;
9. In caso di anomalie ecografiche fetali resta indicata la DPI per eseguire indagini genetiche mirate a seconda del quadro clinico fetale;
10. In considerazione della complessità degli scenari illustrati, la consulenza genetica post-test



dovrebbe sempre essere eseguita indipendentemente dall'esito del test;

11. I vantaggi rispetto agli screening combinati del primo trimestre sono:

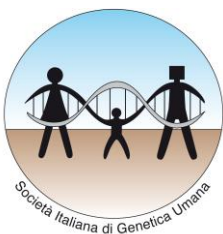
- Detection rate più alta;
- Più alto valore predittivo positivo;
- Alto valore predittivo negativo in particolare per T21 e T18 (importante per chi vuole evitare diagnosi prenatale invasiva);
- Bassa percentuale di falsi positivi;
- Minore dipendenza dall'età gestazionale (si può accedere dalla 11 settimana e per tutta la gravidanza).

In ottemperanza alla normativa vigente, l'informativa ed il consenso informato devono esplicitare questi limiti insieme ai valori di incidenza del falso positivo e negativo e di VPP e VPN.

Il referto di laboratorio dovrà essere redatto in accordo con i requisiti richiesti dalle raccomandazioni internazionali; in particolare dovrà dare una chiara indicazione del rischio residuo, relativo alla sua caratteristica di test di screening (non diagnostico).

Conclusioni

- Lo studio del cfDNA, se utilizzato come test di screening avanzato per la valutazione del rischio di trisomia 21, 18 e 13 in donne a rischio aumentato, rappresenta un approccio sicuro ed efficace ed un'evoluzione importante nel percorso della gravidanza fisiologica e di conseguenza il suo uso nelle condizioni indicate, si ritiene appropriato.
- Nelle donne che non sono considerate a rischio aumentato, il test ha mostrato egualmente una sensibilità e specificità elevata, mentre a causa della bassa prevalenza di aneuploidie in questa fascia di popolazione, il VPP è considerevolmente più basso. In tale popolazione inoltre le trisomie dei cromosomi 21, 18 e 13, rappresentano una percentuale minore delle anomalie cromosomiche riscontrate. Per tali ragioni ed in considerazione anche del costo non trascurabile, si ritiene che lo screening convenzionale del primo trimestre sia ancora oggi la scelta più appropriata, come primo livello in questa fascia di popolazione.
- Lo screening prenatale da DNA libero, in quanto erogato prevalentemente dal settore privato, e perciò a totale carico dell'utente, introduce un aspetto di discriminazione nel trattamento sanitario. Alcune Regioni hanno introdotto il test sulla base della autonomia decisionale regionale ma limitatamente ai propri residenti e con la loro partecipazione alla spesa.
- Si auspica pertanto che la discriminazione del trattamento sanitario possa a breve essere corretto attraverso l'inserimento della NIPD, se pur con le dovute limitazioni, tra i test offerti dal Sistema Sanitario Nazionale. A questo proposito una valutazione HTA dell'introduzione dello screening prenatale da DNA fetale nel sistema sanitario potrà fornire gli elementi di decisione sulle modalità più sostenibili ed appropriate di offerta.



Bibliografia

Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *PrenatDiagn* 2007;27(5):415-18;

Canick JA1, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *PrenatDiagn*. 2013 Jul;33(7):667-74;

Flory E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report. *Hum. Reprod*. 2004;19:723-24;

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; 350:485-7;

Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J HumGenet*. 1999; 64:218-24;

Lun FMF, Chiu RWK, Chan KCA, Leung TY, Lau TK, Lo YMD. Microfluidics Digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *ClinChem*. 2008; 54:1664-72;

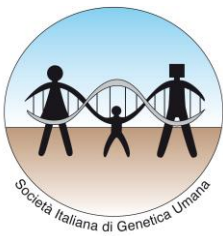
Linee Guida

Ministero della Salute- Consiglio Superiore di Sanità-Sezione I
Linee-Guida Screening prenatale non invasivo basato sul DNA (Non Invasive Prenatal Testing- NIPT). 2015

Society for Materna-Fetal Medicine (SMFM) Publications Committee
#36: Prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA
Am J ObstetGynecol 2015; 212(6):711-6

American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)
Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. Committee Opinion No. 640.
Obstet Gynecol 2015;126:31-7

The International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD)
Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis
Benn P et al, *Prenat Diagn* 2015; 35: 725-34



The European Society of Human Genetics (ESHG) and American Society of Human Genetics (ASHG) joint policy statement.

Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening.

Dondorp et al, Eur J Hum Genet (2015) **23**, 1438–1450; (2015)

Documento elaborato dalla Commissione SIGU composta da:

Maria Cristina Rosatelli (Coordinatore)

Faustina Lalatta

Elisabetta Lenzini

Antonio Novelli

Chiara Pescucci

Alessandra Renieri

Gioacchino Scarano