



Diagnosi Genetica Preimpianto - PGT

Raccomandazioni SIGU 2017

per la pratica clinica

*Documento redatto dal Tavolo Tecnico istituito nell'ambito
del GdL SIGU di Citogenetica-Citogenomica*

Approvato dal Consiglio Direttivo SIGU il 9 agosto 2017



Sommario

<i>Premessa</i>	3
<i>Abstract</i>	4
<i>Introduzione</i>	5
<i>Definizione</i>	6
<i>Indicazioni alla PGT-M e PGT-SR</i>	7
<i>Indicazioni alla PGT-A</i>	12
<i>Percorso PMA-PGT</i>	14
<i>Consulenza genetica e consenso informato</i>	18
<i>Strutture, personale e tracciabilità</i>	26
<i>Biopsia e crioconservazione embrionaria</i>	29
<i>Strategie diagnostiche e tecniche di analisi</i>	30
<i>Refertazione</i>	35
<i>Transport PGT</i>	38
<i>Outcome di PGT e PGT-A</i>	40
<i>Criticità emergenti in PGT/PGT-A</i>	42
<i>Bibliografia</i>	44
<i>Elenco acronimi</i>	51
<i>Allegato 1: Certificazioni e controlli di qualità</i>	53
<i>Allegato 2: Aspetti Giuridici</i>	58



PREMESSA (a cura del Consiglio Direttivo SIGU 2017)

Come recita il titolo, il presente documento è stato elaborato al fine di fornire raccomandazioni di buona pratica clinica per le procedure utilizzate nella diagnosi genetica preimpianto.

Si tratta di un ambito di attività in via di sviluppo nel nostro Paese in relazione alle recenti sentenze giudiziarie che hanno indotto alcune strutture sanitarie di genetica medica ad effettuare queste tipologie di esami genetici.

La pubblicazione di questo documento non rappresenta un avallo o un appoggio all'esecuzione della diagnosi preimpianto da parte della SIGU. Si tratta di una tematica sensibile dal punto di vista etico, e le opinioni dei soci riguardo alle implicazioni della sua applicazione non sono univoche.

Tuttavia, trattandosi di un'attività di interesse per la comunità dei genetisti e che potrebbe vedere coinvolti un numero crescente di centri diagnostici, è essenziale, come per tutte le procedure cliniche e diagnostiche, che vengano stabiliti i criteri che devono essere rispettati al fine di garantire efficacia, efficienza e di minimizzare il rischio clinico non solo per la madre, ma anche le possibili conseguenze a medio o lungo termine per i nati. Ciò anche considerando che le probabilità di successo delle procedure dipendono da una molteplicità di fattori legati non solo all'accuratezza delle metodologie genetiche ma anche da altri fattori biologici, clinici e organizzativi.

Tavolo di lavoro

Coordinatore GdL-SIGU Citogenetica e Citogenomica: *Daniela Giardino*¹

Coordinatori del tavolo di Lavoro: *Daniela Zuccarello*² e *Antonio Capalbo*³

Membri SIGU: *Antonio Novelli*⁴, *Alessandra Renieri*⁵, *Maria Cristina Rosatelli*⁶, *Manuela Seia*⁷

1. Laboratorio di Citogenetica Medica, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano
2. UOC Genetica e Epidemiologia Clinica, Azienda Ospedaliera di Padova
3. Laboratorio Genetyx, Marostica (VI)
4. UOC Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, Roma
5. UOC Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena
6. UO Laboratorio di Genetica Molecolare, Ospedale Pediatrico Microcitemico, Cagliari
7. Laboratorio Genetica Medica, IRCCS Policlinico, Milano



ABSTRACT

L'obiettivo di questo documento SIGU è fornire ai Centri Italiani che svolgono attività di diagnosi genetica preimpianto (PGT: preimplantation genetic testing) un vademecum di regole e suggerimenti da applicare per l'ottimizzazione delle procedure ed il miglioramento qualitativo delle stesse.

Il PGT è un processo che si avvale di tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) per indagini genetiche su embrioni prima del trasferimento in utero. E' possibile, in base alla finalità, distinguere 3 tipi di PGT, ovvero: PGT-M (PGT per malattie monogeniche); PGT-SR (PGT per anomalie cromosomiche numeriche e strutturali); PGT-A (PGT per aneuploidie). Le indicazioni a PGT-M e PGT-SR sono sovrapponibili a quelle della diagnosi prenatale (DPN) invasiva, ovvero finalizzate alla diagnosi di una specifica grave malattia geneticamente trasmissibile causata da variazioni di sequenza del DNA nucleare o mitocondriale, o da una anomalia cromosomica numerica o strutturale. Invece, il PGT-A viene effettuato in cicli di PMA nell'ottica di identificare gli embrioni che, in quanto euploidi e giunti autonomamente allo stadio di blastocisti, hanno maggiori probabilità di esitare in una gravidanza a termine. Il PGT-A può essere effettuato anche su coppie con indicazioni ad altro tipo di PGT (ad es. per malattia monogenica), al fine di ottimizzare la valutazione dell'embrione.

In questo documento è stato messo a punto il percorso PMA-PGT, definendone le specificità, sottolineando l'importanza della consulenza genetica pre- e post-test. Inoltre, sono stati definiti i requisiti di laboratorio relativamente alle strutture, al personale e alla tracciabilità del campione biologico. Sono state poi esplicitate le peculiarità della biopsia e crioconservazione embrionaria, nonché delle strategie diagnostiche molecolari, definendone parametri e gold-standard.

Infine, sono stati presi in considerazione l'outcome e le criticità emergenti in tale ambito, concludendo poi il documento con degli allegati riguardanti le necessarie certificazioni di qualità per garantire un percorso di eccellenza e gli aspetti giuridici del PGT.



INTRODUZIONE

Questo documento, redatto da genetisti esperti nel settore della diagnosi genetica preimpianto individuati dalla Società Italiana di Genetica Umana (SIGU), vuole essere una raccolta di informazioni, dati scientifici e raccomandazioni di buona pratica clinica relativi alla diagnosi genetica preimpianto, in attesa di una precisa regolamentazione del settore da parte delle Autorità italiane competenti. Il contenuto di questo documento, promosso dalla SIGU, è basato sui dati della letteratura scientifica internazionale, sulle vigenti leggi e sull'esperienza personale degli esperti che hanno collaborato alla stesura.

L'obiettivo del documento è fornire ai Centri Italiani che svolgono tale attività un vademecum di regole e suggerimenti da applicare per l'ottimizzazione delle procedure ed il miglioramento qualitativo delle stesse.



DEFINIZIONE

La diagnosi genetica preimpianto (PGT: Preimplantation Genetic Testing) è un processo che si avvale di tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) per indagini genetiche su embrioni prima del trasferimento in utero.

La diagnosi preimpianto sull'embrione, come indica lo stesso nome che ne qualifica la finalità ed il processo, è nata negli anni '90 (Handyside, 1990) per diagnosticare la presenza di anomalie genetiche negli embrioni di coppie a rischio in quanto portatrici di alterazioni geniche o alterazioni cromosomiche.

Come riportato nell'ultima raccolta dati ESHRE (De Rycke, 2015), la diagnosi preimpianto è anche utilizzata per la valutazione delle aneuploidie cromosomiche embrionali. Tale applicazione è finalizzata all'identificazione e trasferimento di embrioni euploidi nel corso di cicli di PMA in donne con particolari condizioni di infertilità. Per tale ragione è stata a lungo definita come screening genetico preimpianto (PGS).

In analogia con quanto adottato a livello internazionale (nuove linee guida WHO, in corso di pubblicazione), in questo testo verranno utilizzati i seguenti acronimi associandoli al rispettivo significato:

PGT: test genetico preimpianto in toto

PGT-M: test genetico preimpianto per malattie monogeniche;

PGT-SR: test genetico preimpianto per anomalie cromosomiche e strutturali

In considerazione dei recenti sviluppi tecnologici e scientifici in questo settore, un capitolo sarà inoltre dedicato all'analisi delle aneuploidie in corso di PMA finalizzata all'identificazione degli embrioni euploidi. Questa applicazione, in analogia con la nomenclatura internazionale, verrà indicata in questo testo con l'acronimo PGT-A (test genetico preimpianto per aneuploidie).



INDICAZIONI AL PGT-M e PGT-SR

Le indicazioni a PGT-M e PGT-SR sono sovrapponibili a quelle della diagnosi prenatale (DPN) invasiva, ovvero finalizzate alla diagnosi di una specifica grave malattia geneticamente trasmissibile causata da variazioni del DNA nucleare o mitocondriale, o da una anomalia cromosomica numerica o strutturale. In dettaglio, la sentenza 229/2015 (riferimento G.U. n. 46 del 18 novembre 2015) ha chiarito che le indicazioni per il PGT ricalcano quelle della diagnosi prenatale. Pertanto va ribadito come la certificazione sulla rilevanza della malattia genetica deve essere rilasciata dal Medico del Centro autorizzato (vedi anche allegato 2 sulla Legittimità giuridica della diagnosi preimpianto).

Criteria di inclusione dei pazienti in un percorso PGT-M e PGT-SR

Nel caso in cui una coppia chieda di essere ammessa ad un percorso per PGT-M o PGT-SR, essa dovrà essere sottoposta alla valutazione di un team multidisciplinare costituito da personale specializzato esperto in diagnosi preimpianto, che includa almeno un genetista ed un ginecologo con comprovata esperienza, al fine di avviare le procedure di verifica della fattibilità clinica e di laboratorio relativa alla specifica condizione in esame.

E' raccomandato includere la coppia in un percorso PGT-M e PGT-SR se la diagnosi è fattibile e l'affidabilità della tecnica è elevata (ogni specialista dovrebbe personalizzare le percentuali di successo per la specifica condizione clinica e genetica e comunicarle alla coppia). La percentuale di errore della tecnica diagnostica della maggior parte dei Centri di PGT internazionali si attesta intorno all'1% e a tale valore massimo dovrebbero tendere i Centri che intendono lavorare con standard qualitativi elevati.

E' raccomandato includere in un percorso PGT-M e PGT-SR coppie con infertilità solo se le tecniche di PMA possono superare l'ostacolo riproduttivo.

E' raccomandato escludere la coppia da un percorso PGT-M e PGT-SR se la diagnosi non è fattibile con le tecnologie disponibili oppure se la percentuale di sensibilità e specificità analitica della tecnica non sia superiore al 99%.

Inoltre, ogni Centro PMA dovrebbe tenere in considerazione, prima di accettare la coppia, le proprie percentuali di successo della PMA (in termini di numero di bambini nati per ciclo), la sicurezza della procedura per la specifica coppia, l'età materna, la riserva ovarica residua ed eventuali altre controindicazioni alla PMA. L'esclusione dal percorso dovrebbe essere considerata se la donna ha sintomi e segni gravi di malattia genetica (per la quale viene appunto richiesto il PGT) che potrebbe comportare complicazioni durante la stimolazione ovarica, il recupero ovocitario, la gravidanza o il parto, o mettere a rischio il neonato. Lo stesso vale in caso di terapia farmacologica cronica assunta per la malattia per cui si richiede il PGT (in tal caso è sempre opportuno fare eseguire alla paziente una consulenza teratologica per



valutarne i rischi). Infine, il PGT potrebbe essere inappropriato in caso di partner affetta/affetto da gravi problemi fisici, mentali, psicologici o psichiatrici a volte anche correlati alla patologia genetica per cui il PGT viene richiesto (in tal caso, a giudizio del Team clinico, la coppia dovrebbe essere valutata da uno psicologo/psichiatra per valutarne l'idoneità).

PGT-M per malattie monogeniche

Il PGT-M può essere offerto come opzione riproduttiva a tutte le coppie a rischio di avere un figlio affetto da grave malattia genica.

E' tecnicamente possibile effettuare questo tipo di PGT per malattie autosomiche recessive, autosomiche dominanti e X-linked, di cui è noto il gene malattia e la variante patogenetica causativa del fenotipo. Eccezionalmente, in caso di malattie senza eterogeneità genetica di locus e con diagnosi clinica certa è possibile eseguire il PGT-M mediante la sola analisi dell'aplotipo a rischio. Per le malattie da espansione di triplette è possibile, in genere, effettuare solo una diagnosi indiretta mediante analisi dell'aplotipo a rischio. Per le malattie da espansione di triplette a insorgenza tardiva (es. Malattia di Huntington) è possibile, a discrezione del Centro (Lashwood, 2001) ed in caso di nucleo familiare informativo, effettuare diagnosi di esclusione, evitando così il ricorso al test pre-sintomatico sul partner a rischio, o, in ultima analisi, effettuare il PGT in simultanea all'analisi delle aneuploidie embrionarie, testando il partner a rischio senza comunicazione del risultato specifico (*non disclosure test*). E' opportuno comunque discutere con la coppia che richiede il PGT-M per tale indicazione i pro e i contro della diagnosi, tenendo conto che spesso si tratta di patologie ad insorgenza in età adulta e variabile (es., corea di Huntington), con variabilità fenotipica (es. le diverse forme cliniche di distrofia miotonica) o a penetranza ridotta (es. alcuni alleli dei geni responsabili di corea di Huntington e alcune forme di atassia spinocerebellare).

In caso di malattie X-linked dominanti paterne o malattie X-linked di cui è nota la modalità di trasmissione ma non la specifica mutazione, è possibile la sola determinazione del sesso cromosomico embrionario.

In caso di malattia genetica da mutazione "de novo" è generalmente possibile, mediante analisi di linkage, determinare la "fase aplotipica" direttamente sugli embrioni, mentre in altri casi (es. patologia da espansione di triplette de novo) non è generalmente possibile procedere con l'analisi.

PGT-M per malattie mitocondriali (mtDNA)

Il PGT per malattia causata da varianti del DNA mitocondriale (mtDNA) pone difficoltà legate alla particolarità della modalità di trasmissione e alle peculiari caratteristiche della genetica mitocondriale. In particolare, la trasmissione esclusiva per via materna, la presenza di eteroplasmia mitocondriale, l'esistenza di varianti con penetranza sesso-specifica e la difficoltà di determinare un valore soglia "sicuro" al di sotto



del quale la malattia non si manifesterà comportano un rischio residuo di malattia piuttosto alto, con la possibilità di ridurre ma non di annullare il rischio di avere un figlio affetto.

E' dunque raccomandato considerare questo tipo di PGT solo in caso di malattie da mtDNA con una correlazione evidente tra il carico mutazionale e la gravità del fenotipo atteso (valore soglia ritenuto "sicuro"), in pazienti con buona prognosi di PMA (riserva ovarica conservata, età materna <35 anni, good-responders alla stimolazione ovarica).

PGT-M per predisposizione oncologica

Il PGT-M è una possibile opzione riproduttiva per i portatori di varianti patogenetiche a carico di geni che determinano predisposizione al cancro. In particolare esiste numerosa letteratura riguardante casi di eterozigoti per varianti patogenetiche di *BRCA1/2* che richiedono questa analisi per evitare di trasmettere ai figli la predisposizione ad ammalarsi di cancro della mammella/ovaio.

Nel 2003 la Task-force di Etica dell'ESHRE ha dichiarato "accettabile" l'esecuzione della PGT-M "per le malattie ad esordio tardivo e per alcuni tipi di predisposizione genetica al cancro, includendo anche il cancro della mammella/ovaio" (Shenfield, 2003).

E' opportuno comunque discutere con la coppia che richiede tale PGT i pro e i contro della diagnosi, tenendo conto che si tratta di una patologia a insorgenza tardiva, a penetranza ridotta e per la quale esistono delle misure profilattiche (ovariectomia, mastectomia) e terapeutiche valide (Kotsopoulos, 2008), oltre ai potenziali rischi neoplastici associati alla stimolazione ovarica in donne già ad alto rischio, anche se allo stato attuale non vi sono evidenze di effetti dannosi nelle donne portatrici di varianti patogenetiche di *BRCA1/2*.

PGT per tipizzazione HLA

Il PGT per tipizzazione HLA è una possibile opzione per quelle coppie a rischio per patologia genetica che hanno già un figlio affetto da malattia genetica o da patologia neoplastica del sistema emopoietico che potrebbe essere curato o la cui qualità/attesa di vita potrebbe essere sensibilmente migliorata da un trapianto di cellule staminali ottenute da cordone ombelicale di un fratello HLA-compatibile.

La diagnosi principale nell'embrione è sempre quella per la malattia genetica per la quale sussiste il rischio. La sola tipizzazione HLA non costituisce diagnosi dello stato di salute dell'embrione e non può essere effettuata se il rischio di ricorrenza della malattia è basso (es. patologie oncologiche non mendeliane).

Inoltre, la coppia dovrebbe essere informata riguardo la tempistica necessaria per la messa a punto del PGT-M, la sua esecuzione e la nascita di un bambino HLA compatibile, al fine di verificare che i tempi siano accettabili rispetto alla gravità dello stato di salute del precedente figlio affetto. Per tale motivo, se il



precedente figlio affetto dovesse presentare una condizione clinica acuta che controindica il trapianto di cellule staminali o dovesse avere un'attesa di vita estremamente bassa, questo tipo di PGT-M non dovrebbe essere eseguita.

Allo stesso modo, tale tipo di PGT deve essere escluso in caso di richiesta di tipizzazione HLA in assenza di una specifica malattia genetica familiare, solo nell'ottica di creare un futuro donatore per un fratello già nato. Da tale indicazione è escluso il PGT-HLA con finalità di donazione ai consanguinei non fratelli o motivato da neoplasie diverse da quelle del sistema emopoietico .

PGT-SR per anomalie cromosomiche e strutturali

Il PGT-SR è da considerare per tutte le coppie in cui uno o entrambi i partner siano portatori di aneuploidia dei cromosomi sessuali (es. 47,XXY), mosaicismo (presenza di due o più linee cellulari con diverso corredo cromosomico), o anomalia cromosomica strutturale (bilanciata e sbilanciata) per le quali esistono specifiche evidenze in letteratura scientifica che possano comportare poliabortività, ripetuti falliti impianti e/o nascita di un figlio affetto da patologie derivanti dalla presenza di uno sbilanciamento cromosomico.

L'analisi deve includere non solo il/i cromosoma/i coinvolto/i nell'anomalia, ma tutti i cromosomi al fine di identificare un embrione euploide. Vanno dunque evitate le tecniche di laboratorio (es. FISH) che non indagano tutti e 24 i cromosomi (22 autosomi, cromosoma X e Y). Le tecniche utilizzate non richiedono, in linea di massima, una fase di set-up ma solo un preliminare accertamento della fattibilità da parte del laboratorio di PGT e l'eventuale raccolta del DNA della coppia.

In base al tipo di anomalia cromosomica il rischio di sbilanciamento, e dunque di concepimento anomalo, può essere molto variabile. Il genetista, nella consulenza pre-PGT, quantizzerà questo rischio e, se dovesse essere molto basso, informerà la coppia, specie se di giovane età, su possibili alternative rispetto al PGT-SR. E' importante tenere conto che i principali calcolatori di rischio di sbilanciamento cromosomico (es. HC-FORUM) forniscono una stima del rischio a termine di gravidanza, ma non quantizzano il rischio di infertilità, mancato impianto o aborto. La storia clinica della coppia è di aiuto al genetista per valutare anche questi rischi difficilmente quantizzabili se non empiricamente.

Criteri di inclusione/esclusione dei pazienti per PGT-SR

E' raccomandato effettuare il PGT-SR solo se l'alterazione genomica riscontrata, confermata a livello germinale, è stata provata essere causa di fenotipo patologico. Vanno dunque escluse dal PGT-SR le coppie portatrici di varianti genomiche a significato benigno o incerto.

Per le anomalie genomiche a ridotta penetranza e/o espressività variabile- ad esempio: dup3q29; del/dup15q11.2 (NIPA1); del/dup15q13.3 (CHRNA7); del/dup16p13.1 (MYH11); dup22q11.2 (TBX1,HIRA) è



necessaria da parte del team multidisciplinare un'attenta valutazione del reale beneficio del ricorso ad una tecnica di PMA con PGT-SR per ottenere un concepito euploide.

Non è appropriato includere nella PGT-SR le coppie portatrici delle comuni inversioni pericentriche eterocromatiche dei cromosomi 1, 9, 16 ed Y e degli eteromorfismi $inv(2)(p11.2q13)$, $inv(3)(p11.2q12)$, $inv(10)(p11.2q21.1)$, poiché si tratta di varianti cromosomiche comuni nella popolazione generale (Linee Guida Citogenetica SIGU 2013 e ISCN 2016 - An International System for Human Cytogenetic Nomenclature).

Infine, in base alla tecnica utilizzata per il PGT-SR, è possibile che la diagnosi di sbilanciamento non sia fattibile: questo può avvenire in caso di frammenti traslocati di dimensioni inferiori alle 5-7 Mb, o posizionati terminalmente (molto vicini ai telomeri) o in zone poco coperte da sonde (in caso di utilizzo delle tecniche CGH-array o SNP-array). In questo caso, è possibile, se la coppia ha già avuto un concepimento sbilanciato ed è disponibile il relativo materiale biologico, effettuare una analisi di prova per verificare la fattibilità della diagnosi. In alternativa, è possibile indagare la regione in esame tramite genotipizzazione in SNP, previa verifica dell'informatività.



INDICAZIONI AL PGT-A

Il test genetico preimpianto per aneuploidie cromosomiche, in passato definito PGS (pre-implantation genetic screening e recentemente modificato in PGT-A), viene effettuato in cicli di PMA nell'ottica di identificare gli embrioni che, in quanto euploidi e giunti autonomamente allo stadio di blastocisti, hanno le maggiori probabilità di esitare in una gravidanza a termine e con minori rischi gestazionali una volta trasferiti.

Negli anni passati, questa tecnica era effettuata tramite FISH su blastomero (al 3° giorno di sviluppo embrionario) come semplice screening di 9 cromosomi e la sua utilità nella pratica clinica era ritenuta dubbia. Ad oggi questa prima versione di PGT-A è da considerarsi non idonea e potenzialmente dannosa, come evidenziato in alcuni studi randomizzati controllati (RCTs) (Staessen, 2004; Mastenbroek, 2007). Già da alcuni anni, invece, grazie alle innovazioni tecnologiche e di coltura embrionaria, è possibile analizzare l'intero assetto cromosomico (22 autosomi più i cromosomi del sesso X ed Y) su cellule del trofoblasto ottenute da blastocisti (al 5°-6°-7° giorno di sviluppo). Questo nuovo approccio è stato estensivamente validato in fase preclinica con numerosi studi che ne hanno evidenziato la sicurezza in termini di impatto della biopsia sulla capacità di sviluppo embrionale (Scott, 2013) e di accuratezza e valore predittivo clinico (Capalbo, 2013; Capalbo, 2014). In fase clinica, l'applicazione della biopsia del trofoectoderma (TE) combinata all'analisi numerica dei 24 cromosomi ha evidenziato correlazioni positive in termini di aumento delle percentuali di impianto e gravidanza a termine per trasferimento embrionale. Si è osservata una riduzione del 70% del rischio di abortività, riduzione dei fallimenti di impianto e, grazie alla possibilità di transfer di singola blastocisti euploide, diminuzione significativa della percentuale di gravidanze multiple (Chen, 2015; Ubaldi, 2015). La discussione relativa all'emergente problematica del mosaicismo cromosomico allo stadio di blastocisti è trattata nel paragrafo "Criticità emergenti".

Alcune tecnologie diagnostiche in PGT-A consentono oggi di diagnosticare su blastocisti un assetto embrionale triploide, la cui incidenza è di circa il 4% negli embrioni sottoposti a PGT (Xu, 2016). Tale diagnosi è utile per caratterizzare ulteriormente gli embrioni e identificare i più idonei al trasferimento in utero, e può risultare utile in quelle coppie con rari casi familiari di mola parziale ricorrente.

E' raccomandato che il medico responsabile del trattamento PMA si avvalga del supporto del team multidisciplinare, che deve includere un genetista, nelle fasi fondamentali in cui si sviluppa il ciclo di PMA con PGT-A ed in particolare nella consegna del referto di PGT-A, per accompagnare la coppia nel processo decisionale del transfer, soprattutto in caso di aneuploidie compatibili con la vita.



Criteria di inclusione/esclusione dei pazienti per PGT-A

La PGT-A può essere considerata per tutti i pazienti che si sottopongono ad un ciclo di PMA, ed in particolare nei casi in cui:

1) la donna che si sottopone a PMA ha una età materna avanzata (AMA), ovvero > 35 anni. Questa specifica indicazione è suggerita dai numerosi studi effettuati su blastocisti analizzate in gruppi di donne di differente età sottoposte a ciclo di PMA + PGT-A, in cui è evidente la chiara correlazione tra aumento dell'età materna e numero di embrioni aneuploidi (Franasiak, 2015; Ubaldi FM, 2017; Munné, 2017; Rubio, 2017).

2) la coppia ha avuto ripetuti falliti impianti (RFI) in diversi cicli di PMA standard (≥ 3 trasferimenti con embrioni di buona qualità o ≥ 10 embrioni trasferiti in trasferimenti multipli). Si definisce RFI l'assenza di sacco gestazionale ecografico a 5 o più settimane dopo il trasferimento embrionario.

3) la coppia, con cariotipo normale, ha avuto ripetuti aborti spontanei del I trimestre (≥ 3 aborti), non dovuti a cause "meccaniche" quali patologie dell'utero, o altri fattori causativi riconosciuti. E' importante sottolineare che coppie con storia di poliabortività hanno elevata probabilità di concepire spontaneamente e arrivare a termine di gravidanza nell'arco di 12 mesi, per cui è opportuno valutare ogni singolo caso soprattutto in relazione all'età della donna e alla riserva ovarica residua. Inoltre, l'utilità della PGT-A nei casi di poliabortività è attualmente oggetto di dibattito a livello internazionale (Murugappan, 2016), per cui è raccomandabile esercitare cautela per tale indicazione.

4) il partner maschile presenta grave oligoastenoteratospermia, criptospermia o azoospermia non ostruttiva, fattori che comportano il ricorso a tecniche microchirurgiche di MESA (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration) e TESE (TEsticular Sperm Extraction) per il prelievo di spermatozoi dalle vie seminali. Le evidenze a supporto dell'utilità del PGT-A per questa indicazione sono scarse, per cui si raccomanda cautela.

Il PGT-A può anche essere effettuato su coppie con indicazioni ad altro tipo di PGT (es. per malattia monogenica), al fine di ottimizzare le probabilità di impianto. Tale doppia indagine dovrebbe essere effettuata sulla medesima biopsia embrionaria.



PERCORSO PMA-PGT E RELATIVI RISCHI

Prima di affrontare le diverse fasi del PGT e dopo avere superato un adeguato iter diagnostico di coppia all'interno di una corretta impostazione clinica pre-PMA, dal punto di vista ginecologico e andrologico, la coppia dovrà ricevere da parte del Team multidisciplinare una consulenza pre-test relativa al ciclo di PMA previsto. Tale consulenza non differisce sostanzialmente da quella delle altre coppie che vanno incontro a PMA, ma deve tenere conto di alcuni aspetti peculiari relativi alla diagnosi preimpianto, quali un'attenta valutazione della riserva ovarica ed una approfondita discussione delle metodiche di produzione e prelievo dei gameti e della eventuale crioconservazione embrionaria.

In particolare, si raccomanda che vengano trattati i seguenti argomenti:

- descrizione dettagliata della procedura di PMA;
- rischio di complicazioni mediche per la donna durante la stimolazione ovarica o il recupero ovocitario;
- complicanze addizionali, a breve o lungo termine, causati dalle procedure di PMA (Rumbold, 2017) o dalla gravidanza in donne affette da specifiche malattie genetiche (es. rischio emorragico nelle portatrici di emofilia; rischio trombotico nelle donne affette da disordini della coagulazione).
- uso di spermatozoi freschi, o crioconservati, o ottenuti da tecniche di agoaspirato testicolare o TESE;
- numero minimo di ovociti che deve essere recuperato e la necessità di massimizzarlo, entro i limiti di sicurezza della pratica clinica
- numero di embrioni che saranno sottoposti a biopsia, numero di cellule che saranno prelevate e percentuale attesa di embrioni che sopravviveranno al ciclo di crioconservazione/scongelo
- possibilità di crioconservazione degli embrioni e loro destino (sia sani che affetti che non analizzati), in osservanza alle vigenti leggi
- modifica delle percentuali di successo del ciclo PMA causato dall'aggiunta della PGT e in relazione allo specifico rischio genetico della coppia;
- possibilità di gravidanza spontanea durante l'attesa o lo svolgimento del ciclo di PMA, e considerazione di attuare adeguata contraccezione.

Infine, la coppia dovrà essere informata dei limiti e rischi specifici relativi alle tecniche di PGT (coltura a blastocisti, biopsia embrionale, analisi genetica), quali:

- danni fisici all'embrione
- possibile aumento di mortalità embrionale prima dell'impianto in caso di biopsia di un blastomero allo stadio di day-3
- errori diagnostici legati a peculiarità biologiche dell'embrione
- mosaicismo embrionale



- errori diagnostici legati a limiti tecnologici (Drop-out allelico - ADO, errori di amplificazione o ibridazione del DNA, contaminazione da DNA estraneo).

- errore umano

- possibili effetti a lungo termine sulla salute del concepito alla nascita: basso peso e maggiore incidenza di patologie legate all'imprinting genomico (Desmyttere, 2012; Bay, 2016; Sunkara, 2017) sono alcuni dei possibili rischi associati al PGT e sono sovrapponibili a quelli dei bambini nati dopo un ciclo di PMA.

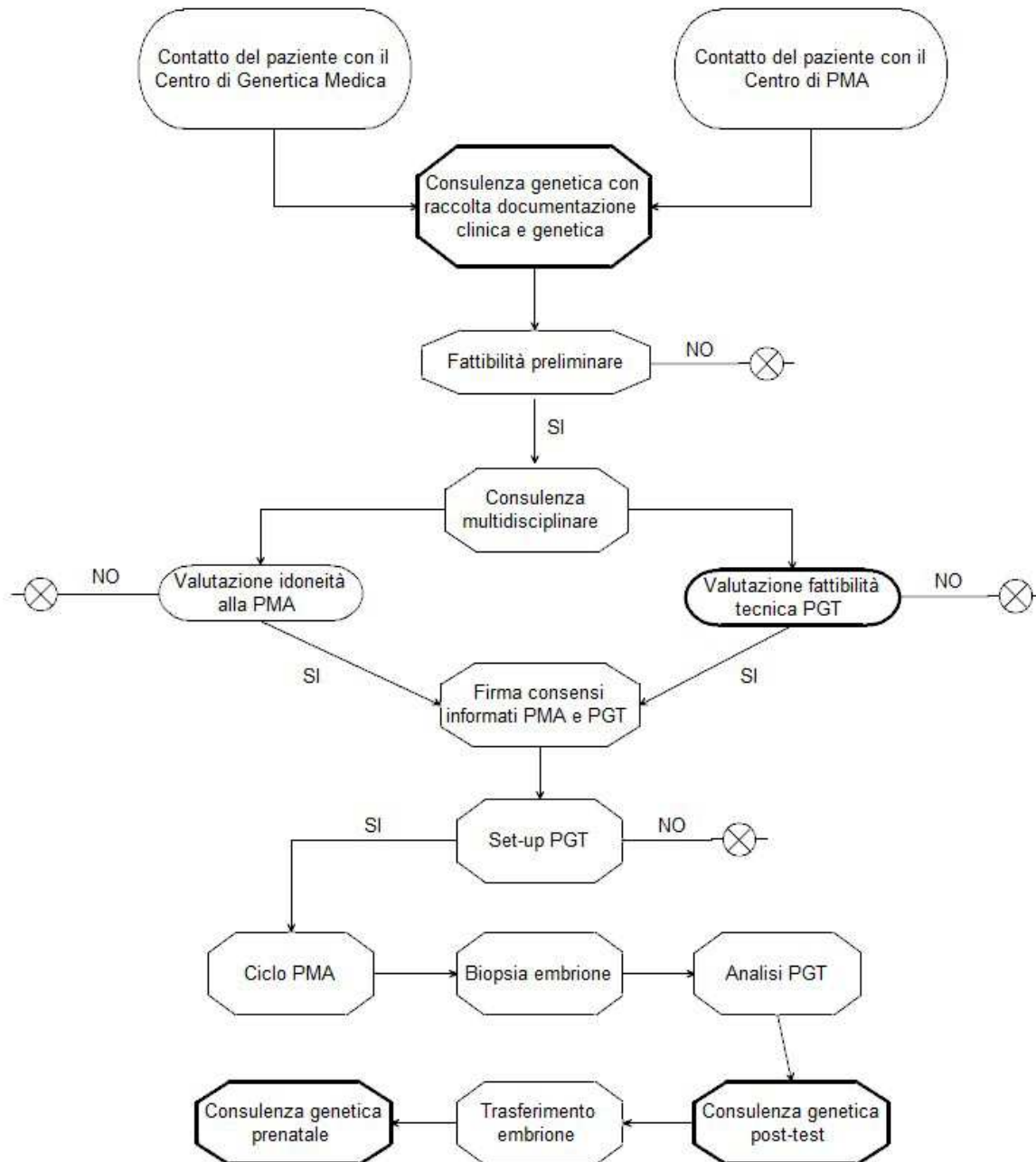
Tali rischi sono esplicitati in dettaglio nel capitolo dedicato alla consulenza genetica in PGT.

Per i motivi di cui sopra, la scelta della coppia di intraprendere un percorso di PMA-PGT deve essere operata in maniera consapevole e motivata, in seguito ad una consulenza non direttiva effettuata da un Team multidisciplinare, in cui sia la coppia stessa a stimare vantaggi e svantaggi del percorso e decidere con serenità quale sia il percorso più aderente alle loro aspettative e possibilità.

Si suggerisce di seguire una specifica flow-chart operativa in caso di coppia richiedente PGT (vedi qui di seguito), al fine di ottimizzare il percorso integrato di PMA e PGT.

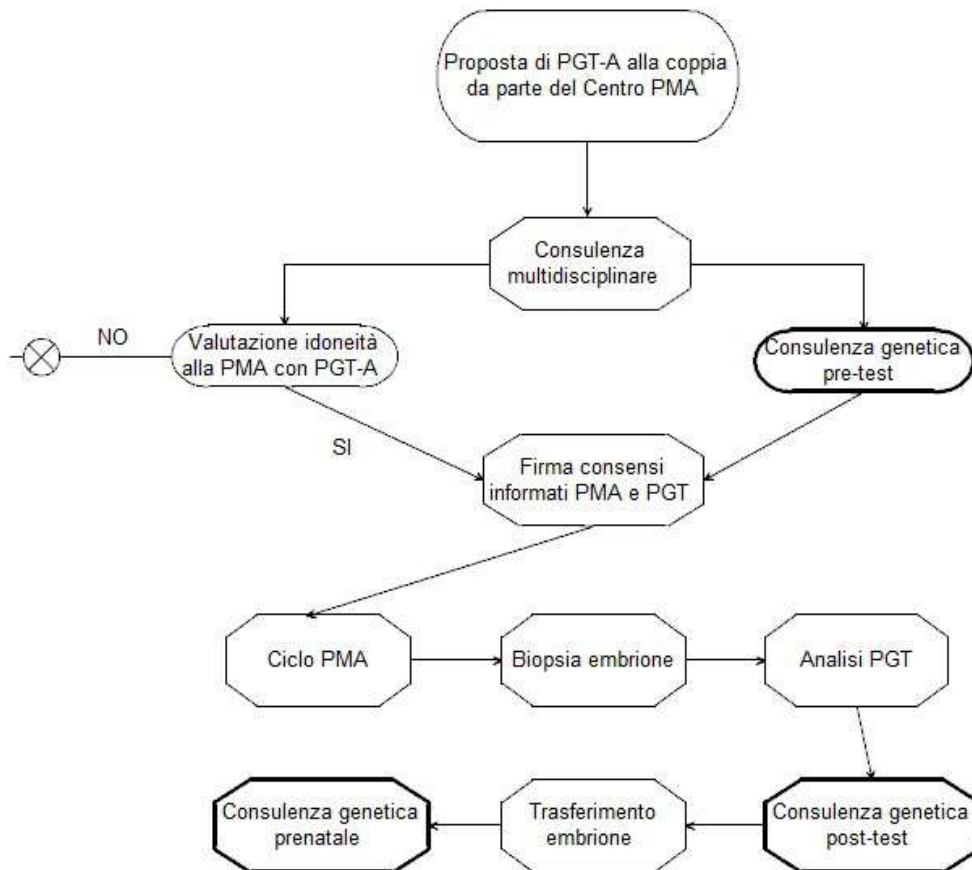


FLOW-CHART PERCORSO PGT-M e PGT-RS





FLOW-CHART PERCORSO PGT-A





CONSULENZA GENETICA e CONSENSO INFORMATO

Consulenza genetica

La consulenza genetica pre-test per PGT-M e PGT-SR ha le seguenti finalità: *a)* informare la coppia sulla condizione genetica in esame (storia naturale, possibilità terapeutiche) e sulle percentuali di rischio di ricorrenza; *b)* verificare la possibilità di diagnosticare il difetto genetico in questione mediante PGT; *c)* discutere le metodologie e gli approcci disponibili per la diagnosi genetica con relativi livelli di accuratezza; e *d)* illustrare i risultati della casistica del centro ottenuti in relazione all'indicazione ed alla metodologia diagnostica utilizzata. Si raccomanda che il PGT-M ed il PGT-SR siano richiesti da un medico specialista. Come per tutti gli esami di genetica anche per PGT-M e PGT-SR la consulenza genetica deve essere redatta in conformità alle normative vigenti: codice in materia di protezione dei dati personali" (D.L. n. 196 del 30-6-2003) e Autorizzazione n. 8/2016 - Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici - 15 dicembre 2016 (*Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n. 303 del 29 dicembre 2016*)

E' opportuno che lo specialista in genetica medica che effettua la consulenza, abbia una specifica e comprovata esperienza nelle tecniche di PGT e PMA.

A conclusione del test diagnostico, prima dell'eventuale transfer degli embrioni in utero, è opportuno che la coppia sia sottoposta a consulenza multidisciplinare (post-test), per illustrare i risultati delle analisi svolte ed al fine di permettere alla coppia di scegliere quale embrione trasferire per primo (consulenza post-test).

In relazione alla consulenza genetica pre-test, dovrebbero essere presi in considerazione i seguenti aspetti:

- entrambi i partner dovrebbero partecipare alla consulenza;
- la consulenza dovrebbe essere offerta alla coppia sia prima che dopo il ciclo di PMA/PGT-M e PGT-SR, e potrebbe essere necessario un'ulteriore consulenza in occasione della conclusione del set-up per malattia monogenica per discutere di eventuali limitazioni dell'efficienza diagnostica attesa, o durante il periodo prenatale o post-natale.
- la consulenza non deve essere in alcun modo di tipo direttivo, deve permettere alla coppia di decidere in piena autonomia se sottoporsi o meno al PGT;
- la consulenza deve essere informativa della patologia, dei rischi, delle diverse possibilità diagnostiche, della prognosi e della possibile terapia (almeno quando si tratta di ricorrenza nella coppia di malattie genetiche);
- è necessario accertarsi che la coppia abbia compreso il contenuto della consulenza, ed in caso di barriera linguistica, è necessario dotarsi di un interprete che dovrebbe preferibilmente non appartenere allo stesso nucleo familiare nella massima tutela della privacy della coppia;



- è opportuno fornire alla coppia un opuscolo informativo prima della consulenza genetica, scritto in linguaggio comprensibile dal paziente, evitando terminologia tecnico-scientifica, per facilitare la possibilità di porre domande specifiche da parte della coppia durante la consulenza;
- dopo la consulenza genetica deve essere rilasciato un referto scritto che comprenda tutte le informazioni fornite verbalmente.

Durante la consulenza genetica dovranno essere trattati i seguenti argomenti:

- Valutazione del rischio genetico

In consulenza genetica con la coppia devono essere discussi il rischio di ricorrenza della specifica malattia genetica (dopo conferma della diagnosi molecolare o citogenetica), la gravità, la variabilità fenotipica, la prognosi, le opzioni terapeutiche esistenti e le limitazioni della correlazione genotipo/fenotipo.

- Opzioni riproduttive

E' necessario discutere con la coppia delle alternative a PGT-M e PGT-SR ed in particolare della diagnosi prenatale invasiva e non invasiva, della donazione dei gameti (fecondazione eterologa). Tali prospettive vanno inserite nel contesto della precisazione dei limiti e probabilità di successo del PGT. Da ultimo, è necessario avvisare le coppie della possibilità di una gravidanza spontanea nel contesto di un ciclo di PMA+PGT, nel caso in cui la coppia non effettuasse contraccezione, e del relativo rischio di ricorrenza della patologia nel concepito.

- Argomenti specifici di PGT da discutere nel corso della consulenza:

- attendibilità e accuratezza diagnostica in relazione al campione biotico ottenuto e allo specifico stadio di sviluppo embrionale analizzato
- possibilità che la diagnosi non sia conclusiva per alcuni embrioni o non fattibile per insufficiente materiale ottenuto da biopsia(è raccomandato indicare le percentuali di diagnosi non conclusiva del proprio laboratorio)
- probabilità di ottenere un embrione non affetto e possibilità che tutti gli embrioni risultino affetti
- possibilità di non avere alcun embrione trasferibile per la presenza di difetti genetici o embriologici
- quali patologie il PGT-M e il PGT-SR richiesto può analizzare e quali non è possibile diagnosticare con questa analisi



- la tecnica utilizzata in base al tipo di PGT-M e PGT-SR richiesto, con indicazione del numero di cicli eseguiti per la specifica indicazione, numero di cicli globale effettuati dal Centro, parametri qualitativi della diagnostica, quali amplification rate (percentuale di amplificazione), diagnosis rate (percentuale di diagnosi conclusa), ADO rate (percentuale di mancata amplificazione di un allele), contamination rate (percentuale di contaminazione), misdiagnosis rate (percentuale di errata diagnosi). Di quanto sopra dovrebbe essere consegnata al paziente una documentazione riassuntiva, contenente i relativi riferimenti bibliografici.
- la fattibilità di PGT-M e PGT-SR richiesti, il rischio di errata diagnosi o di esito negativo. La percentuale di errore, espressa come falso negativo/falso positivo, deve essere riportata nel consenso informato e deve essere basata sui dati prodotti dal laboratorio che effettua la diagnosi (indicatori percorso qualità) e sul follow-up per lo specifico test diagnostico. La fattibilità del test dovrebbe raggiungere la più elevata accuratezza possibile, e non essere comunque inferiore al 99%. Qualsiasi limitazione alla diagnosi deve essere ben spiegata alla coppia. La coppia deve comprendere che esiste un rischio di errata diagnosi, e quali sono le opzioni a disposizione, in caso di successo dell'impianto e prosecuzione della gravidanza, per la conferma diagnostica (diagnosi prenatale). Ogni centro PGT dovrebbe riportare in consenso informato la percentuale attesa e osservata di errata diagnosi, in base alla propria casistica.
- il metodo di analisi e il tipo di campioni richiesti per eventuale fase di set-up
- per il PGT-SR, analisi di fattibilità in base al metodo utilizzato
- per il PGT-M per malattie X-linked, i pro e i contro di effettuare solo la determinazione del sesso invece della diagnosi della specifica variante genica.
- per il PGT-M, conferma della variante patogenetica e verifica dell'informatività della famiglia, in base al metodo utilizzato, soprattutto in caso di malattia da espansione di triplette
- per PGT-M o PGT-SR con tipizzazione HLA, la probabilità in caso di diagnosi combinata di malattia genetica e HLA.
- la tempistica di esecuzione della fase di set-up (in media di 30-60 giorni), con verifica della compatibilità dell'attesa per la specifica coppia. In caso di partner femminile con età materna molto avanzata, in accordo con il ginecologo del team multidisciplinare, è possibile ipotizzare comunque l'inizio della stimolazione ovarica, anche in più cicli con successivo congelamento, al fine di ottimizzare le possibilità di esito favorevole del ciclo di PMA-PGT. In linea di principio, comunque, è sempre suggerito concludere la fase di set-up prima di iniziare il ciclo di PMA.



- Scelta dell'embrione

Il processo decisionale riguardante quali embrioni sono trasferibili dovrebbe essere discusso con la coppia prima dell'inizio del ciclo di PMA-PGT ed aggiornato al bisogno durante o dopo la conclusione del ciclo.

In particolare, in caso di PGT-M, dovranno essere fornite alla coppia tutte le informazioni inerenti il genotipo degli embrioni.

Per le malattie X-linked recessive in cui è disponibile solo la determinazione del sesso dell'embrione, le coppie devono essere informate che tutti gli embrioni di sesso maschile, affetti o non affetti, non saranno trasferiti e che gli embrioni di sesso femminile portatori sani non potranno essere distinti dagli embrioni femmina non portatori. E' necessario informare la coppia, prima della decisione finale di intraprendere il percorso PMA-PGT, se esiste la possibilità o meno che in altro Centro si proceda alla ricerca della specifica variante causativa invece della sola selezione per sesso dell'embrione. In tal caso è opportuno discutere con la coppia della possibilità di omettere, a fini etici, l'informazione riguardante il sesso dell'embrione.

Per le malattie da mutazione dinamica (es. espansione di triplette) in cui la grandezza dell'espansione non può essere correttamente quantizzata in PGT ma può essere identificato solo l'aplotipo a rischio, è opportuno discutere con la coppia dell'evenienza che vengano esclusi dal trasferimento anche embrioni con aplotipo a rischio ma con espansione di triplette non patologica, e dunque non affetti.

In caso di riscontro di soli embrioni in mosaico, è necessario discutere con la coppia delle possibilità di trasferimento di questi embrioni, delle loro possibilità di impianto, di gravidanza a termine e dei possibili rischi per il feto e per l'integrità della funzione placentare (mosaicismo confinato alla placenta e rischio di ritardo di crescita intrauterina-IUGR), nonché dei possibili effetti a lungo termine in epoca post-natale (Besser, 2017). Non è comunque raccomandato il trasferimento di embrioni in mosaico per uno dei cromosomi che in trisomia sono potenzialmente vitali (13, 18, 21) o per uno dei cromosomi soggetti a imprinting (7, 14, 15, 20), dato il rischio di disomia uniparentale (UPD).

- Follow-up dopo PGT

In fase di consulenza è opportuno discutere con la coppia dei seguenti argomenti:

- probabilità di gravidanza / nascita e rischio di aborto per ciclo iniziato e per transfert effettuato, correlati all'età materna e alla specifica malattia genetica
- destino degli embrioni affetti, dei non affetti ma non HLA-compatibili, dei non affetti in sovrannumero rispetto alle esigenze di pianificazione familiare della coppia
- destino degli embrioni non diagnosticati o di quelli non trasferibili
- conferma della diagnosi di PGT sugli embrioni affetti non trasferiti mediante seconda biopsia e disponibilità di questi risultati per la coppia



- in caso di dubbio diagnostico e/o necessità di conferma dei risultati ottenuti, è importante discutere la possibilità di effettuare una seconda biopsia del trofoectoderma previo consenso informato
- opzioni disponibili per gli embrioni non trasferiti o non congelati per usi futuri, in base alla vigente legislazione
- diagnosi prenatale e follow-up della gravidanza e dei bambini nati da PGT.

- Diagnosi prenatale e test prenatale non invasivo

E' opportuno informare la coppia della possibilità di ottenere una conferma diagnostica del risultato del PGT-M o del PGT-SR mediante diagnosi prenatale invasiva. Inoltre, il test prenatale non invasivo (NIPT), eseguito sul DNA fetale circolante (cfDNA), può essere proposto alla coppia in sede di consulenza per una rivalutazione del rischio di anomalie cromosomiche per i cromosomi oggetto della PGT-SR prima di una decisione definitiva inerente la possibilità di sottoporsi o meno alla diagnosi prenatale invasiva di conferma (Skrzypek, 2017).

E necessario fornire alla coppia le informazioni necessarie a comprendere le caratteristiche del test (fonti biologiche, frazione fetale) ed i suoi limiti (specificità e sensibilità, mosaicismi feto-placentari), anche in rapporto alle altre tecniche di diagnosi prenatale disponibili, e, prima del test, ottenere la sottoscrizione di un consenso informato.

In aggiunta, e' indicato informare la coppia che non vuole sottoporsi a test invasivi che è importante monitorare la gravidanza mediante ecografie mirate e che è possibile, con i limiti posti dalle indicazioni relative ai test genetici sui minori, in particolare per quanto riguarda le patologie ad insorgenza tardiva, verificare la diagnosi molecolare effettuata con PGT tramite analisi del DNA del neonato alla nascita.

- Impatto della PGT: gravidanza multipla e altri figli affetti

E' opportuno affrontare con la coppia argomenti correlati alla dinamica familiare, alla presenza di un bambino affetto in famiglia, alla salute dei genitori (in caso di malattie dominanti) e agli aspetti economici e psicologici correlati alla gestione di una gravidanza e alla eventualità di nascita gemellare.

Per le coppie che hanno già un precedente figlio affetto dalla malattia, prima dell'inizio del trattamento è opportuno discutere con la coppia dell'impatto del ciclo PGT sulla vita familiare, degli eventuali viaggi o spostamenti, assenze da casa, potenziali sequele dell'iperstimolazione nella madre e dell'impatto sulla cura del precedente figlio, in particolare di una eventuale nascita gemellare.



- Follow-up pediatrico dei bambini nati dopo PGT

Come è previsto dalla legge il monitoraggio obbligatorio degli effetti avversi dei farmaci e la relativa segnalazione alle autorità competenti, si auspica che venga regolamentato un follow-up adeguatamente lungo per il monitoraggio della salute dei bambini nati da fecondazione assistita e con diagnosi preimpianto, in modo da avere dati oggettivi e dettagliati sull'assenza a lungo termine di effetti nocivi sulla loro salute.

E' fortemente suggerito che il centro PMA raccolga i dati relativi al bambino nato dopo PMA-PGT e che sensibilizzi i genitori sull'importanza di raccogliere tali dati. In particolare, sarebbe opportuno raccogliere informazioni circa:

- dettagli sul decorso della gravidanza
- settimana gestazionale alla nascita
- peso alla nascita ed eventuali problemi neonatali
- eventuali anomalie congenite

E' auspicabile che i Centri che effettuano PGT raccolgano dati dei bambini nati dopo PGT anche a medio e lungo termine, al fine di partecipare a studi collaborativi prospettici e retrospettivi.

Infine, è opportuno considerare una **valutazione psicologica** per le seguenti coppie:

- con storia di insuccesso riproduttivo
- con storie di esperienze traumatiche
- per le quali gli specialisti del team hanno dubbi riguardanti il benessere dei figli esistenti o futuri, o le capacità mentali dei futuri genitori
- che richiedono specificatamente un supporto psicologico
- in cui uno dei futuri genitori è affetto da una malattia autosomica dominante e presenta segni correlati alla malattia (es. malattie neurodegenerative, malattie psichiatriche)
- che richiedono PGT con tipizzazione HLA per figlio affetto da altra patologia che prevede trapianto di cellule ematopoietiche, allo scopo di valutare il loro reale desiderio di un altro figlio.

In ogni caso, è opportuno che il Centro PMA/PGT offra alle coppie la possibilità di usufruire del servizio di consulenza psicologica sia prima che dopo un ciclo di PGT.

Informativa e consenso

L'informativa e il relativo consenso per la diagnosi genetica preimpianto deve essere accurati trattandosi di materia nuova e di scarsa conoscenza per la popolazione generale. Si raccomanda che sia dunque presente in cartella:

- informativa e consenso per diagnosi genetica preimpianto



-informativa e consenso per biopsia embrioni

La biopsia dell'embrione è parte integrante della diagnosi genetica preimpianto ma può essere eseguita da un centro diverso (il centro di PMA) da quello in cui è eseguito il test genetico vero e proprio (il centro di Genetica). Inoltre, biopsia e diagnosi genetica necessitano di dettagli informativi specifici e l'erogatore del consenso ha in genere una specializzazione diversa. Per tale motivo, ed in analogia con quanto avviene per la diagnosi genetica prenatale in cui si raccolgono il consenso per la procedura invasiva (villocentesi o amniocentesi) ed il consenso per l'esecuzione del test genetico, si suggerisce di allestire documenti separati.

Informative e consensi possono, per comodità, essere accorpati in un solo documento, purché siano rispettate le specifiche competenze professionali.

Un consenso separato sarà dedicato alla procedura di PMA, che non è materia specifica di queste raccomandazioni, ma la cui copia è auspicabile che sia conservata nel centro di genetica che esegue la diagnosi genetica preimpianto.

Nel caso di raccolta, durante il set-up, di materiale biologico di ulteriori individui della famiglia diversi dalla coppia, è necessario fornire l'informativa e fare sottoscrivere il consenso specifico per la raccolta di tale materiale (informativa e consenso per set-up sui familiari).

Strutturazione dell'informativa e consenso

L'informativa e il consenso sono 2 sezioni separate e inscindibili dello stesso documento. La prima parte del documento è l'informativa. Nell'informativa sono fornite informazioni ai pazienti. Per tale motivo, tale documento generalmente inizia con "Gentile signora/Egregio signore" e termina con lo spazio dedicato ai riferimenti (nome, cognome e recapiti telefonico/email) del medico che ha somministrato e spiegato il documento. Tali informazioni servono per la rintracciabilità di chi ha sottoposto il consenso nel caso di dubbi.

L'informativa contiene una parte di premessa che incornicia l'informazione erogata nel contesto legislativo di riferimento. Nello specifico in particolare vanno citate: la legge 40/2004; il decreto n. 336 del 16-12-2004; e le sentenze della Corte Costituzionale n. 151 del 2009, n. 162 del 2014, n. 96 del 2015 e n. 229 del 2015. Alla premessa seguono una serie di informazioni sulle modalità, tempi, finalità, rischi e problematiche connesse alla tecnica (specifici per la biopsia o specifici per il test genetico nei rispettivi documenti), rischi specifici per il nascituro, questioni bioetiche e percentuali di successo.

E' raccomandato specificare nell'informativa e nel consenso informato che il PGT è soggetto a errore di campionamento, analogamente alla biopsia dei villi coriali.

La seconda parte del documento è la dichiarazione di consenso da parte della coppia. Per tale motivo



questa parte del documento inizia con i riferimenti anagrafici completi dei partner. La dichiarazione termina con la data, la firma di entrambi i partner e la firma del medico che ha somministrato il consenso i cui dati (nome e numero telefono) si trovano alla fine dell'informativa. In questo documento i partner operano scelte attive che devono essere chiaramente evidenziate attraverso specifica indicazione (esempio crocetta su frasi alternative).

Le scelte attive da operare sono relative alla dichiarazione di richiesta solamente di diagnosi riguardante la malattia ereditaria presente in famiglia oppure diagnosi per la malattia ereditaria accoppiata ad analisi del numero dei cromosomi (vedi anche paragrafo sul referto), oppure richiesta di sola analisi dei cromosomi. E' necessario effettuare una scelta attiva anche relativamente all'eventuale disponibilità di materiale residuo per scopi scientifici, ove consentito dalle vigenti leggi, nonché sulla volontà di essere o non essere informati in caso emergessero dall'utilizzo del materiale residuo reso disponibile eventuali informazioni inerenti la scelta procreativa.



STRUTTURE, PERSONALE, TRACCIABILITÀ DEL CAMPIONE

Strutture

E' raccomandato che il PGT venga eseguito in Centri PMA e Laboratori di Genetica con comprovata esperienza nel settore, che siano conformi alle normative vigenti, in grado di eseguire, per quanto riguarda la PMA, tecniche di coltura a blastocisti, vitrificazione embrionaria e biopsia embrionaria, e, per quanto riguarda il laboratorio di genetica, che abbia validati protocolli di analisi preimpianto.

Un possibile riferimento circa i requisiti relativi alle strutture del Centro di PMA ed al personale che effettua diagnosi preimpianto, e' il "Manuale per la gestione di un laboratorio di PMA - Strumenti per l'applicazione dei DL 191/2007 e 16/2010 nei laboratori di procreazione medicalmente assistita", recentemente pubblicato dalla Società Italiana di Embriologia, Riproduzione e Ricerca (SIERR 2016).

L'attrezzatura di un centro di PMA che esegue procedure di PGT deve prevedere, oltre a quanto dettagliato nel documento SIERR per la strumentazione della PMA, un numero sufficiente di incubatori con bassa tensione di ossigeno e personale qualificato per garantire una buona cultura embrionale allo stadio di blastocisti, almeno un obiettivo laser per l'esecuzione della biopsia embrionale, e validati protocolli di crioconservazione. Inoltre, il laboratorio di PMA deve avere un'area dedicata per il *tubing* (trasferimento delle cellule nella provetta da PCR) ed eventuale primo processamento (es. lisi cellulare) delle cellule sottoposte a biopsia. Specifici sistemi di tracciabilità devono essere in opera per garantire la corrispondenza tra embrione bioptizzato/crioconservato e cellule prelevate. Questo passaggio deve essere verificato e validato da un secondo operatore che agisce da testimone alla fase di *tubing*. E' auspicabile che il centro lavori attivamente anche per sviluppare e validare processi automatizzati al fine di garantire la massima tracciabilità del campione di biopsia.

Per quanto riguarda i requisiti relativi al personale, alle infrastrutture e all'ambiente di lavoro del Laboratorio di Genetica che effettua diagnosi preimpianto si rimanda allo Standard "Sistema di Gestione per la Qualità nei Laboratori di Genetica Medica" pubblicato dalla SIGU (ultimo aggiornamento Rev. del 30.04.2014, reperibile al link: <http://www.sigu.net/>). Si veda l'allegato 1 per i dettagli su certificazioni e controlli di qualità.

Relativamente alle specifiche concernenti il PGT, è auspicabile che questo venga effettuato in laboratori che, oltre a rispettare lo standard della SIGU, abbiano comprovata esperienza nel settore, che abbiano condotto un percorso adeguato di formazione e validazione dei test e delle procedure, che prevedano



controlli di qualità interni (CQI) e partecipino a Valutazioni Esterne della Qualità (VEQ) specifiche per PGT, e che rispettino le Linee Guida esistenti ed i relativi aggiornamenti (si veda anche Harton, 2011).

I locali in cui si esegue PGT devono essere isolati rispetto agli altri locali del laboratorio di Genetica e avere caratteristiche strutturali adatte alla manipolazione di materiale biologico scarso e irripetibile e a rischio di contaminazione.

Personale

Le seguenti raccomandazioni sono formulate in modo da garantire che il PGT venga eseguito da personale competente:

1. Il personale in organico deve essere competente, adeguatamente formato ed esclusivamente dedicato alle attività specifiche di **Genetica Molecolare** e preferibilmente possedere la specializzazione in Genetica Medica. Inoltre, deve avere un'adeguata formazione documentata in centri specializzati in PGT e agire sotto la supervisione e il controllo (soprattutto nelle fasi critiche di trasferimento del campione) di **Genetisti Molecolari competenti ad eseguire diagnosi genetiche**.
2. Si raccomanda che il direttore del laboratorio PGT abbia la specializzazione in Genetica Medica e comprovata esperienza nel settore della PGT.
3. Il personale del laboratorio di PGT deve essere adeguato ai carichi di lavoro. Escluso il direttore, in linea generale, si considera adeguato **un numero minimo di due biologi molecolari**.
4. Per un laboratorio di PGT di qualità si considera adeguato, per il mantenimento della specifica competenza di PGT, un carico di lavoro che effettui in fase di avvio (primi due anni) almeno 50 biopsie per PGT o 150 biopsie per PGT-A all'anno e , successivamente non meno di almeno 100-150biopsie di PGT o 500-1000biopsie di PGT-A all'anno.

Il personale di Laboratorio che esegue diagnosi genetiche deve essere adeguatamente formato e la competenza deve essere periodicamente rivalutata. Il programma di formazione e la valutazione delle competenze devono essere formalizzati in procedure documentate. Per gli embriologi esistono dei programmi di formazione riconosciuti (organizzati annualmente dall'ESHRE), mentre non ci sono per PGT. Il Centro che esegue PGT deve progettare e seguire un programma definito di formazione continua e un percorso a garanzia della qualità delle prestazioni fornite, che comprenda tutte le attività, incluso l'uso delle attrezzature, le procedure operative utilizzate, la protezione dei dati. **Il laboratorio deve inoltre partecipare a valutazioni esterne di qualità per PGT, ove disponibili (si veda relativo capitolo) .**

Tutto il personale deve dimostrare di essere competente prima di essere autorizzato a gestire campioni diagnostici. Una volta formato, il personale dovrebbe sottoporsi, almeno una volta all'anno, ad una



rivalutazione delle competenze riguardante tutti gli aspetti delle procedure che è autorizzato a svolgere. Si raccomanda di stabilire programmi di formazione interna continui e di rivalutazione delle competenze del personale.

Tracciabilità del campione

Devono essere prese adeguate precauzioni per prevenire la contaminazione dei campioni sia mediante isolamento fisico (locali separati di pre e post-PCR, cappe ad aria filtrata), sia mediante protocolli di rilevazione di contaminazione (uso di marcatori materni e paterni).

Una volta che la biopsia è stata eseguita, il campione cellulare può essere immediatamente analizzato in laboratorio di genetica attiguo al laboratorio di embriologia, oppure può essere congelato e inviato ad un laboratorio esterno per l'analisi. In questo ultimo caso devono essere messe in atto le procedure per la catena di custodia. In entrambi i casi, il laboratorio deve essere dotato di sistemi adeguati di etichettatura per la precisa identificazione dei campioni, che devono avere un codice univoco di associazione biopsia/embrione. Il sistema di etichettatura è essenziale per abbinare correttamente il risultato diagnostico della biopsia con l'embrione da cui essa è stata prelevata.

L'etichettatura e l'identificazione dei campioni sono tra le fasi critiche ed a più alto rischio di errore. Si raccomanda che il numero di identificazione univoco del paziente ed il numero di identificazione univoco degli embrioni / biopsie siano controllati e approvati da due operatori indipendenti (di cui uno testimone e controllore delle procedure eseguite dall'altro) o mediante l'utilizzo di strumenti e tecnologie elettroniche per la tracciabilità. In particolare, le fasi che richiedono obbligatoriamente un doppio controllo sono:

1. quelle immediatamente dopo la biopsia, per associare correttamente il numero dell'embrione con il campione di cellule prelevate.
2. il *tubing*, per confermare che l'identificativo delle cellule corrisponda con l'etichettatura sulla provetta in questione.
3. quelle in cui il processamento del campione prevede un cambio di provetta o un passaggio da un contenitore ad un altro.
4. la refertazione, per garantire la precisa corrispondenza tra la biopsia e l'embrione corrispondente.



BIOPSIA E CRIOCONSERVAZIONE EMBRIONARIA

L'identificazione dello stadio di sviluppo embrionale sul quale è più opportuno eseguire la biopsia e analisi genetica rappresenta uno degli aspetti di maggiore criticità. Recentemente, numerosi studi hanno permesso di valutare l'efficacia preclinica e clinica dei due approcci percorribili per il test genetico in epoca preimpianto e di ottenere evidenze significative sulla loro appropriatezza: il prelievo bioptico di un singolo blastomero in terza giornata di sviluppo embrionale (day3) allo stadio di clivaggio ed il prelievo di un campione di trofoectoderma allo stadio di blastocisti, che è raggiunto generalmente tra la quinta e settima (day 5-7) giornata di sviluppo embrionale.

In base alle attuali evidenze scientifiche, l'uso della biopsia allo stadio di blastocisti per qualsiasi procedura ed indicazione di test genetico preimpianto è raccomandato e considerato "gold standard" a livello internazionale. Anche per il PGT di malattie monogeniche, l'approccio della biopsia allo stadio di blastocisti è fortemente raccomandato, in considerazione della non invasività della biopsia e della possibilità di ottenere minor ADO e fallimenti di amplificazione (AF) con risultati conclusivi. Si raccomanda ai Centri che offrono un servizio di PGT-M e RS e/o PGT-A di adoperarsi al fine di adottare le adeguate misure di implementazione della biopsia del trofoectoderma allo stadio di blastocisti.

È infine raccomandabile che i Centri di PMA che intendano introdurre la biopsia di trofoectoderma nella loro pratica clinica adottino un sistema di coltura a blastocisti e un programma di crioconservazione embrionale efficienti, entrambi prerequisiti fondamentali e propedeutici per mantenere standard laboratoristici adeguati ad un utilizzo sicuro della tecnica.

In caso di dubbio diagnostico e/o conferma dei risultati ottenuti, è possibile eseguire una seconda biopsia del trofoectoderma previo consenso informato della coppia. Anche se non ci sono evidenze estese pubblicate in letteratura, la seconda biopsia non sembra avere un impatto significativo sul successivo sviluppo embrionale.

La biopsia dei globuli polari (GP) è oggi in disuso nel panorama europeo e mondiale, in quanto si associa a significative limitazioni che ne riducono l'efficacia clinica ed il potenziale applicativo, come l'impossibilità di analizzare il contributo paterno, l'elevato numero di diagnosi non conclusive causate dalla ricombinazione meiotica e l'eccessivo traumatismo della doppia tecnica di prelievo. L'uso della biopsia e analisi dei GP trova applicazione per motivazioni etiche della coppia richiedente e dopo opportuna informazione dei limiti diagnostici e biologici della tecnica.

Per i protocolli di crioconservazione embrionaria (congelamento lento vs vitrificazione) si faccia riferimento alle linee guida della SIERR 2016.



STRATEGIE DIAGNOSTICHE E TECNICHE DI ANALISI

Tecniche di analisi per PGT-M

E' possibile effettuare PGT-M, a seguito di consulenza genetica e firma attiva di consenso informato, solo se la variante genica, confermata a livello germinale, è giudicata causativa del fenotipo patologico. In caso di omogeneità genetica di locus (un unico gene o locus malattia per il fenotipo presente in famiglia), è raccomandato eseguire l'analisi indiretta solo in caso di adeguato numero di familiari sani e affetti per cui sia possibile stabilire con certezza l'aplotipo a rischio (diagnosi indiretta mediante analisi di linkage, utilizzando marcatori polimorfi del DNA (STR/SNP) intragenici e a monte/valle del gene/locus, il più vicino possibile e comunque entro 1 Mb, al fine di minimizzare fenomeni di ricombinazione.

E' raccomandato non effettuare PGT per malattia monogenica se la patogenesi o la patogenicità della variante sono incerte (si veda anche paragrafo relativo alle malattie mitocondriali) o se è incerta la modalità di trasmissione. A tal proposito il Centro che esegue la PGT si deve accertare della patogenicità della variante attraverso la visione del referto del test diagnostico, l'analisi della letteratura corrente e dei database specifici aggiornati e l'eventuale contatto con il Centro che ha eseguito il test genetico diagnostico.

Le metodiche da applicare nel PGT per l'analisi di varianti geniche variano in base alla specifica malattia genetica ed alla specifica mutazione:

- Per le malattie (autosomiche dominanti, recessive o X-linked) causate da varianti puntiformi, delezioni o duplicazioni intrageniche o intraesoniche, le metodiche per le quali esiste maggiore letteratura scientifica sono il sequenziamento automatico, la tecnica di mini-sequencing, l'analisi di microsatelliti (STR) per linkage e la genotipizzazione mediante TaqMan-assays. Possono essere utilizzate altre tecniche, a seconda della specifica esperienza del laboratorio. Ciascuna tecnica impiegata va comunque opportunamente validata per il PGT.
- Per le malattie (autosomiche dominanti, recessive o X-linked) causate da delezioni o duplicazioni di dimensioni oltre un esone/gene o coinvolgenti più geni (es. *CMT1A*), non amplificabili con la PCR tradizionale, la strategia da preferire è quella dell'analisi indiretta, mediante analisi di linkage. In questo caso è richiesto uno studio familiare ed è possibile identificare la trasmissione della delezione/duplicazione mediante marker interni informativi, possibilmente distanti non più di 1 Mb per minimizzare/ridurre il rischio di ricombinazione. E' preferibile utilizzare metodiche di SNP genotyping, poiché gli SNP sono più frequenti nel genoma rispetto agli STRs e pertanto maggiormente informativi. Per questo motivo, quando possibile, l'analisi degli SNPs deve essere preferita allo studio degli STRs.



- Per le malattie (autosomiche dominanti o X-linked) causate da una mutazione dinamica (es. Distrofia Miotonica, X-Fragile, etc.), la metodica che rappresenta il "gold standard" è la genotipizzazione mediante PCR fluorescente, al fine di distinguere l'allele normale da quello espanso. Considerate le persistenti difficoltà di tale approccio quando applicato all'analisi di singole o poche cellule, alternativamente si consiglia di tracciare l'allele a rischio tramite analisi indiretta di linkage (vedi considerazioni sopra esposte).

In linea generale è preferibile ottimizzare dei protocolli diagnostici che prevedono l'analisi "diretta" della variante genetica, unitamente all'analisi indiretta mediante l'amplificazione di una serie di "linked-markers" (almeno 2 marcatori informativi, uno localizzato al 5' e l'altro al 3' del gene; l'impiego di un numero maggiore di markers aumenta l'affidabilità del protocollo diagnostico) al fine di avere un controllo del risultato ottenuto con l'analisi diretta ed evidenziare eventuali fenomeni di allele drop-out (ADO) (nel caso di PGT su embrione-blastocisti) o ricombinazione. I linked markers possono anche fornire informazioni sulla ploidia dell'embrione e su eventuali contaminazioni cellulari esterne.

L'analisi "indiretta", o di linkage, può anche essere utilizzata:

- in casi di difficoltà tecniche che non consentono l'analisi diretta (esempio, regioni difficili da amplificare, come le GC-rich, o in caso di delezioni o duplicazioni di grosse dimensioni, o presenza di uno pseudogene, o in caso di mutazioni dinamiche);
- in casi di variante causativa non identificata solo se non esiste eterogeneità di locus;
- nei casi di PGT per HLA-matching;

I limiti dell'analisi "indiretta" sono rappresentati dal fatto che non è possibile impiegare tali protocolli diagnostici in caso di mutazioni *de novo* e dalla necessità di effettuare uno studio familiare esteso (analisi di linkage) per la corretta definizione dell'aplotipo a rischio.

Set-up pre-clinico

Il set-up pre-clinico rappresenta probabilmente la fase più importante nel processo del PGT-M. Dalla qualità del set-up dipendono le percentuali di successo ed il rischio di errore della procedura. Esso consiste nello studio personalizzato e nell'ottimizzazione di una strategia diagnostica appropriata per effettuare il PGT della specifica malattia genetica per la quale la coppia è a rischio aumentato. Il protocollo diagnostico viene preliminarmente ottimizzato sulla coppia e sui familiari per confermare la presenza della variante causativa, ove possibile, e per definire i linked-markers informativi da usare nella PGT.



Il disegno della strategia diagnostica, l'efficienza e l'affidabilità dei test preimpianto dovrebbero essere in linea con i parametri stabiliti dalle linee guida internazionali ESHRE PGT Consortium (Harton, 2011), che prevedono per ciascun protocollo di PGT:

- efficienza di amplificazione > 90%;
- ADO rate < 10%;
- contamination rate < 5%;

Il set up pre-clinico è considerato un passaggio propedeutico fondamentale per l'esecuzione del PGT in coppie a rischio. E' consigliabile non eseguire PGT quando non si dispone di tecnologie in grado di garantire gli standard diagnostici sopra indicati e rimandare la valutazione ad altro laboratorio di PGT.

Tecniche per PGT-A e PGT-SR

Vengono qui descritte le tecniche più comunemente utilizzate nella pratica clinica, nell'ambito di un'ampia varietà tecnica di piattaforme tecnologiche e correlati algoritmi bioinformatici.

Per l'analisi delle traslocazioni, delle inversioni o di altre anomalie del cariotipo parentale e/o delle aneuploidie embrionali de novo, la FISH (che limita l'analisi a soli pochi cromosomi, nonostante siano tutti passibili di aneuploidie ai vari stadi di sviluppo embrionale preimpianto) è stata rapidamente sostituita dalle metodiche di analisi contemporanea dei 24 cromosomi (Mastenbroek, 2007; Stassen, 2004; Treff, 2010).

Le tecniche di microarray, ovvero CGH-array e SNP-array, sono applicate da oltre 10 anni in modo sistematico per PGT e PGT-A grazie all'utilizzo di protocolli di Whole Genome Amplification (WGA), utilizzati come step preliminare di arricchimento del DNA genomico ottenuto dalle biopsie cellulari. Si raccomanda l'utilizzo di tali metodiche per la ricerca di sbilanciamenti derivanti da una anomalia strutturale del cariotipo parentale già nota, previa verifica del coverage eseguita dal laboratorio di PGT.

Si raccomanda particolare cautela nell'interpretare il significato di sbilanciamenti sub-microscopici (delezioni e duplicazioni) di origine de novo e diagnosticate incidentalmente. Queste infatti potrebbero non rappresentare il reale assetto cromosomico embrionale ma essere conseguenza di errori di amplificazione dovuti a WGA.

Il limite di risoluzione delle tecnologie di microarray applicate alla PGT viene generalmente considerato di 5 Mb (Vanneste, 2011), ma dipende sensibilmente dalla copertura del disegno dello specifico microarray utilizzato nelle diverse regioni genomiche.

Considerata infine l'eterogeneità dei protocolli ed algoritmi di lettura dei dati, è raccomandato l'utilizzo di quelli validati in letteratura scientifica o su di un campione di validazione interno sufficiente a valutarne i livelli di accuratezza diagnostica ed efficacia clinica.



Una metodologia di analisi delle anomalie numeriche cromosomiche per PGT-A che evita l'uso della WGA e possibili artefatti connessi è la qPCR (Treff, 2012). Tale metodo è infatti basato su una pre-amplificazione targeted di quattro regioni non variabili per ciascun cromosoma. Tali ampliconi sono poi quantificati in real-time ed il numero di copie cromosomiche è determinato da una normalizzazione basata sul Delta-Delta-Ct usando come riferimento interno la media dei valori di tutti gli autosomi e, come riferimento esterno, un gruppo di controlli di embrioni maschi con assetto cromosomico normale. Inoltre, la metodologia PGT-A basata su qPCR è l'unica che introduce una soglia cromosoma-specifica per definire la nullisomia, la monosomia, la disomia e la trisomia. La metodica basata su qPCR è stata estensivamente validata e sono state effettuate e pubblicate tutte le fasi di validazione preclinica e clinica, e resi noti i livelli di accuratezza su campioni cellulari di fibroblasti a cariotipo noto, su biopsie di trofoectoderma da embrioni già tipizzati con una metodica differente e nel corso di trials clinici (Treff, 2012; Scott, 2013; Capalbo, 2015).

Inoltre, la metodica basata su qPCR è stata validata per analisi in parallelo di condizioni monogeniche e cromosomiche su singolo campione bioptico di trofoectoderma. In questo caso è sufficiente aggiungere i primers per l'analisi della variante responsabile della malattia mendeliana e SNPs fiancheggianti ai primers per l'analisi cromosomica in fase di pre-amplificazione. Questo approccio risulta costo-efficace ed in grado di diagnosticare la quasi totalità delle condizioni genetiche comunemente richieste in PGT (Zimerhman, 2016; Capalbo, 2016), con il minor tasso di ADO e fallimento di amplificazione riportato in letteratura.

Next Generation Sequencing (NGS)

L'implementazione di protocolli di NGS in PGT-M, PGT-A e PGT-SR è già una realtà in molti centri di diagnosi molecolare. In particolare, è possibile dopo applicazione di WGA effettuare sulla stessa piattaforma NGS contemporaneamente analisi della variante puntiforme, di esteso pannello di SNP a monte e a valle del gene e analisi di CNV (Copy Number Variation). Ciò si traduce a volte in una difficoltosa interpretazione dei dati, per cui in sede di analisi è complicato discriminare la variabilità tecnica dalla pura variabilità biologica (Goodrich, 20016; Capalbo, 2017; Treff, 2017). Pur essendo una tecnologia resa disponibile solo recentemente in PGT, esistono già studi di validazione ad oggi disponibili che ne dimostrano l'efficienza (Yan, 2015); tuttavia per prudenza, in caso di utilizzo di metodologie diagnostiche in PGT/PGT-A basate su WGA-NGS si raccomanda di eseguire estese validazioni precliniche e cliniche dei nuovi protocolli prima del loro utilizzo nella pratica diagnostica, al fine di determinarne preliminarmente i livelli di accuratezza diagnostica ed efficacia clinica. In particolare, i protocolli diagnostici dovrebbero essere testati in cieco su linee cellulari con cariotipo noto e su DNA residui di precedenti campioni analizzati, eseguendo possibilmente un controllo crociato tra laboratori diversi. Si sconsiglia l'utilizzo di nuovi protocolli NGS per PGT-A e PGT senza opportuna validazione preliminare effettuata nel laboratorio che li implementa, al fine



di identificare il tasso atteso di falsi positivi e falsi negativi, nonché il valore predittivo positivo e negativo, e di definire la profondità e il coverage dell'analisi.

Non essendo presenti in letteratura livelli di validazione sufficienti che permettano di definire se i profili consistenti con pattern a mosaico siano il risultato di genuini fenomeni biologici o di artefatti tecnici dovuti alla WGA, si raccomanda, in caso di utilizzo di WGA-NGS in PGT-A, prudenza nella refertazione (per es. riportare tali pattern come “consistenti con...”) e di esplicitare tale possibilità nell'informativa.



REFERTAZIONE

Numero di referti

Poiché in diagnosi prenatale è possibile per le coppie che effettuano amniocentesi e villocentesi per malattia monogenica, dietro consenso informato e scelta attiva, l'opzione di ricercare anche eventuali aneuploidie, si ritiene che analogamente il laboratorio di genetica che esegua PGT-M debba informare la coppia sulla possibilità di ricercare, in contemporanea, eventuali aneuploide embrionali.

Per le coppie che richiedono anche l'analisi di aneuploidie (vedi paragrafo informativa e consenso) si raccomanda di compilare 2 referti separati, trattandosi di test genetici con finalità e tecniche differenti. Al fine di facilitare la lettura e il processo decisionale relativo a quale/i embrione/i trasferire, si suggerisce di citare nel referto relativo alla malattia ereditaria anche l'esito sintetico dell'analisi per aneuploidie, rinviando al referto PGT-A i dettagli tecnici.

Mentre le linee guida ESHRE (Harper, 2010) suggeriscono di produrre due referti per la stessa indagine, entrambi firmati (uno ad uso interno, contenente più dettagli metodologici ed uno ad uso esterno, più sintetico, da inviare al centro di PMA), tale indicazione non è applicabile nel contesto legislativo e culturale italiano. Di conseguenza, si raccomanda la produzione di un unico referto, che contenga i dettagli tecnici adeguati.

Strutturazione del referto

Ciascun referto deve avere un titolo sintetico ma esplicativo (es. test genetico preimpianto per beta talassemia; test genetico preimpianto per aneuploidie) e deve essere strutturato nelle seguenti sessioni consecutive: anagrafica paziente e tracciabilità, motivo dell'indagine, analisi richiesta, finalità del test, dati relativi alla fecondazione in vitro, descrizione del test genetico e della metodologia, risultati e conclusioni. Si raccomanda di usare il numero minimo di pagine, essendo ottimale una sola pagina. In calce alla pagina devono essere elencate le certificazioni e accreditamenti del laboratorio e la partecipazione a circuiti di Valutazione Esterna di Qualità.

Indicazione di trasferibilità nel referto

Le linee guida ESHRE (Harper, 2010) indicano di esplicitare nel referto per ciascun embrione non solo l'esito del test genetico ma anche il commento "trasferibile" o "non trasferibile". Anche in questo caso, il suggerimento non sembra adattabile al contesto legislativo italiano che si incentra sul diritto della coppia di chiedere informazioni sullo stato di salute degli embrioni prodotti (art. 14, comma 5, l. n. 40 del 2004) ed implicando una scelta personalissima dell'individuo non vicariabile a terzi. Inoltre, è necessario sottolineare



che sono trascorsi 6 anni dalla pubblicazione di tali linee guida e in questo frattempo sono state acquisite nuove conoscenze relative alle biologia dell'embrione. In particolare, è oggi noto che l'embrione allo stato precoce di blastocisti può essere dal punto di vista genetico un crogiuolo di cellule con genoma differente (mosaico) e che dunque l'anomalia cromosomica rivelata in una biopsia a questo stato di sviluppo non sempre è rappresentativa della situazione del nascituro. Da ciò consegue che se nel referto fosse dichiarato "non trasferibile" un embrione sano per la malattia ereditaria ma aneuploide, e la coppia (non avendo embrioni euploidi) chiedesse di impiantarli, il centro si troverebbe a dover impiantare un embrione dopo averlo dichiarato "non trasferibile". Si suggerisce pertanto di includere nel referto soltanto il risultato del test genetico senza l'aggiunta del commento sulla trasferibilità.

Numero di firme sul referto

Le linee guida ESHRE (Harper, 2010) suggeriscono che sul referto siano presenti 3 firme, rispettivamente di chi ha eseguito l'analisi, di chi l'ha supervisionata e del Direttore di Laboratorio. Mentre consideriamo opzionale la firma dei 2 operatori, la cui presenza deve essere sempre testimoniata nei protocolli di laboratorio attraverso siglatura, riteniamo viceversa raccomandabile che la qualifica dell'operatore che firma il referto sia quella di biologo/biotecnologo specialista. Si ribadisce inoltre che è raccomandato che il direttore del laboratorio di genetica cofirmatario del referto abbia la specializzazione in Genetica Medica.

Refertazione delle aneusomie, mosaicismo e analisi di UPD

La recente introduzione di tecniche sempre di più sofisticate per l'analisi delle aneuploidie embrionali ha reso possibile la visualizzazione delle aneusomie cromosomiche (delezioni/duplicazioni coinvolgenti porzioni di cromosoma) e messo in evidenza l'esistenza del fenomeno (già noto a livello dello stadio embrionale di clivaggio) del mosaicismo cromosomico. Per una trattazione completa di tali argomenti, si rimanda al capitolo "Criticità emergenti". Relativamente alla eventuale refertazione di tali riscontri, si raccomanda di includere la spiegazione della loro esistenza nell'informativa legata al consenso informato che la coppia firma al momento dell'accettazione del percorso PGT, garantendo in caso di riscontro e successiva refertazione di tali anomalie una consulenza genetica post-test esauriente che esplori tutte le possibili implicazioni prenatali e post-natali del trasferimento di tali embrioni. Il laboratorio che esegue PGT-A può anche decidere di non includere nel referto finale tali riscontri, dal momento che esistono ancora posizioni contrastanti sulla reale incidenza del mosaicismo e sulla sensibilità e accuratezza delle tecniche molecolari utilizzate in PGT per la diagnosi delle aneusomie.

In caso di trasferimento di embrioni con mosaicismo cromosomico o aneusomie è indicato un attento monitoraggio della gravidanza mediante diagnosi prenatale invasiva e un adeguato follow-up post-natale.



Relativamente alla possibilità di indagare la presenza di disomia uniparentale (UPD) dei cromosomi soggetti ad imprinting, se il laboratorio che effettua PGT possiede la tecnologia utile per effettuare tali analisi, è possibile offrire alla coppia questa opzione, dietro consenso informato e scelta attiva. Nonostante il fenomeno dell'UPD a livello della blastocisti sia abbastanza poco frequente (Gueye, 2014), diversi Centri a livello internazionale stanno proponendo questa analisi diagnostica, almeno per i cromosomi ad oggi noti essere sottoposti a tale fenomeno (cromosomi 2, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 20). La maggior parte dei Centri che effettua PGT a livello italiano non esegue per il momento questo tipo di diagnosi, ma è auspicabile la sua implementazione in un prossimo futuro.



TRANSPORT PGT

E' raccomandato che il Centro di PMA e il laboratorio di PGT stipulino un contratto ufficiale che regolamenti gli aspetti legali, assicurativi e relativi alle responsabilità individuali. E' raccomandato che vengano messi in atto protocolli per la catena di custodia.

Il Centro di PMA e il laboratorio di PGT dovrebbero preventivamente concordare su un protocollo clinico-laboratoristico condiviso prima della spedizione dei campioni da analizzare. Particolare attenzione deve essere rivolta all'identificazione della persona responsabile durante le varie fasi del transport PGT. E' auspicabile che i centri di PMA e il laboratorio di PGT usino un consenso condiviso.

Si raccomanda che il Centro di PMA e il laboratorio PGT organizzino preliminarmente delle visite reciproche per familiarizzare con i protocolli in uso, prima di iniziare una collaborazione di transport PGT.

Il laboratorio di PGT deve validare il protocollo di spedizione utilizzato dal Centro di PMA inviando valutando con attenzione l'imballo, la tempistica di consegna e la garanzie assicurative al fine di preservare al massimo l'integrità dei campioni inviati.

Il Centro di PMA deve garantire la presenza di personale esperto in biopsia embrionale e formato sulla tecnica di *tubing* con doppio testimone, secondo le procedure decise dal laboratorio di PGT.

Le procedure di transport PGT devono essere validate prima di iniziare a spedire/ricevere i campioni, programmando alcuni invii di prova di materiale biologico dal centro PMA al laboratorio. Queste prove dovrebbero valutare la qualità della biopsia, la capacità di manipolazione delle biopsie, la corretta ed univoca etichettatura dei campioni e la sicurezza della spedizione (compreso il numero massimo di campioni trasportati), nonché dimostrare la capacità del laboratorio di PGT di concludere la diagnosi su tali biopsie trasportate con le modalità concordate. Inoltre, in queste prove dovrebbe anche essere valutata l'eventuale presenza di contaminazione esterna mediante l'analisi di campioni di controllo negativi.

Si raccomanda che il laboratorio di PGT e il Centro di PMA concordino preventivamente le tempistiche e la frequenza di spedizione dei campioni, per ottimizzare il lavoro in entrambi i Centri. Inoltre, è raccomandato che essi delineino preventivamente delle chiare ed efficienti vie di comunicazione durante tutte le fasi del transport PGT.

E' fortemente raccomandato che le procedure sopra descritte, preventivamente concordate, siano riassunte in un documento condiviso.

Si raccomanda che tutti i risultati diagnostici siano consegnati a mano, in sede di consulenza multidisciplinare, in presenza di un genetista e del ginecologo. In caso di necessità di spedizione, si raccomanda che essi siano inviati in forma scritta, tramite posta elettronica certificata (PEC) e che questi



non siano mai comunicati telefonicamente. Il referto deve essere chiaramente comprensibile sia per il personale del Centro di PMA che per la coppia. E' opportuno che il referto sia ricevuto dal medico responsabile del trattamento e da questi consegnato alla coppia, al fine di assicurare una adeguata spiegazione e comprensione del risultato ottenuto.



OUTCOME DI PGT E PGT-A

I dati relativi ai risultati ottenuti nei cicli di PGT vengono annualmente raccolti dall'ESHRE Consortium, che dal 1999 pubblica poi i risultati sulla rivista *Human Reproduction* in forma aggregata. Il principale difetto di tale raccolta, seppur molto utile nelle sue finalità originarie, è il lungo tempo di latenza tra la raccolta dati e la pubblicazione degli stessi e la base volontaria della presentazione dei dati. Al momento sono disponibili i dati relativi agli anni 2010-2011 pubblicati ad agosto 2015 (De Rycke, 2015).

E' auspicabile che organismi nazionali italiani raccolgano la casistica relativi ai cicli di PMA + PGT eseguiti in Italia ed in tal senso si è attivato l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che già da anni raccoglie i dati relativi ai Centri e ai cicli PMA.

Per quanto riguarda i dati presenti nella letteratura scientifica, in linea generale si ritiene che un ciclo di PGT-M o PGT-SR sia qualitativamente adeguato se il tasso di gravidanza cumulativa per ciclo di stimolazione iniziato è pari o superiore al 20% (Forman, 2014; Ubaldi, 2015). Per tasso di gravidanza cumulativa per ciclo iniziato si intende la percentuale di gravidanza ottenuta al completamento di tutti i trasferimenti embrionali per un dato ciclo di stimolazione. Ovviamente, questo tasso è estremamente variabile in base all'età riproduttiva della donna, condizionato soprattutto dalla riserva ovarica e dalla qualità ovocitaria. Mediamente, comunque, le coppie che si rivolgono ad un centro PMA per PGT-M o PGT-SR sono coppie fertili e di età relativamente giovane, ovvero coppie con fattori prognostici favorevoli. I fattori che invece diminuiscono il numero di embrioni disponibili per il transfer e di conseguenza il tasso di gravidanza sono la scarsa riserva ovarica e la presenza di una doppia anomalia genetica/cromosomica da analizzare.

E' auspicabile che il programma di PGT-M o PGT-SR implementato in un dato Centro di PMA-PGT abbia un tasso globale superiore al 20%, valore questo congruo sia con le attese che con i dati presenti in letteratura (Forman, 2014; Ubaldi, 2015). Tale dato è il risultato complessivo del livello qualitativo del centro di PMA dove avviene la stimolazione ormonale, il prelievo ovocitario, la fecondazione, la coltura e biopsia embrionale, la crioconservazione ed il transfer embrionale. Il laboratorio di PGT contribuisce al tasso di gravidanza tramite l'accuratezza della diagnosi e il tasso di "no result" diagnostico, a cui può conseguire una seconda biopsia e rianalisi. E' opportuna una verifica periodica di tutte le componenti sopra menzionate per garantire e monitorare la qualità globale del trattamento di PMA-PGT. L'aggiunta dell'analisi cromosomica nei cicli PGT-M si traduce in un vantaggio significativo in termini di outcome clinico. In particolare, il trasferimento di embrioni euploidi nei cicli PGT-M risulta in aumentati tassi di impianto embrionale evolutivo e minor rischio di abortività. Si raccomanda pertanto di eseguire sempre la ricerca delle aneuploidie embrionarie nei cicli di PGT-M, e quando possibile di eseguirla sulla stessa biopsia in cui si esegue l'analisi monogenica.



Per quanto riguarda il PGT-A, sono ad oggi stati pubblicati 4 studi randomizzati controllati (RCTs) e relative meta-analisi che ne hanno valutato l'efficacia clinica. Tutti gli studi, in modo concordante, riportano un aumento significativo del tasso evolutivo di impianto embrionale dopo trasferimento di blastocisti euploidi rispetto ad embrioni non sottoposti a diagnosi. Dalla meta-analisi degli stessi lavori si riporta anche una riduzione relativa del 70% del rischio di abortività dopo trasferimento di blastocisti euploidi rispetto ad embrioni non sottoposti a diagnosi. Questo effetto è consistente in tutti gli studi randomizzati e retrospettivi pubblicati fino ad oggi (Yang, 2012; Forman, 2013; Scott, 2013; Rubio, 2017).

Il valore atteso in un ciclo di PGT-A è un tasso di impianto del singolo embrione trasferito superiore al 40% ed un rischio di abortività inferiore al 15%. E' interessante sottolineare che in tutte le maggiori casistiche mondiali riportate, il tasso di impianto e aborto dopo analisi cromosomica non sono più dipendenti dall'età riproduttiva della donna, come qualsiasi altro parametro basale e del ciclo di PMA. Quello che rimane ancora da determinare in studi randomizzati è se il tasso di gravidanza cumulativa è aumentato nel ciclo di PGT-A rispetto alla PMA senza analisi. Come tutte le metodiche diagnostiche, non ci si attende che la PGT-A aumenti le probabilità di gravidanza per ciclo di stimolazione, ma che migliori il "time to pregnancy", ovvero il tempo necessario per ottenere una gravidanza a termine di feto euploide, e che sia equivalente, in termini di numero di gravidanze ottenute, alla PMA standard. Al momento della stesura di questo documento, non sono presenti RCTs che ne accertino l'equivalenza in termini cumulativi per ciclo. Un solo studio (Ubaldi, 2015), retrospettivo, basato su migliaia di cicli PMA e PGT-A, ha recentemente riportato che il tasso cumulativo di gravidanza a termine è equivalente nel gruppo PGT-A rispetto alla PMA standard, ma è necessario attendere RCTs prima di confermare questo dato in maniera prospettica.

E' comunque assodato che l'aumentata capacità di valutazione della competenza riproduttiva embrionale, a seguito dell'analisi cromosomica, consente oggi di offrire alle coppie un trattamento più efficiente (meno embrioni trasferiti per ottenere la gravidanza) e sicuro (minor rischio di abortività, trasferimento di un singolo embrione con minimizzazione del numero di gravidanze gemellari e relative complicanze gestazionali), sia dal punto di vista ostetrico che fetale.



CRITICITÀ EMERGENTI IN PGT/PGT-A

Una delle controversie principali recentemente emerse nella pratica clinica della PGT-A, riguarda i dati di incidenza e impatto diagnostico del mosaicismo cromosomico, ovvero la presenza nell'embrione di cellule con cariotipi eterogenei a seguito di un errore nelle segregazioni mitotiche post-fecondazione. Errori mitotici possono avvenire nelle prime fasi di divisione embrionale e quanto prima avviene tale errore, tanto maggiore sarà la presenza del mosaicismo nella blastocisti che ne deriva (Lupski, 2013). La maggior parte dei casi di mosaicismo origina da uno zigote inizialmente euploide che subisce una non-disgiunzione post-zigotica, risultando in un embrione con linee cellulari trisomiche e monosomiche. Altri casi possono originare da un ritardo anafasico, il cui risultato è una linea cellulare monosomica a mosaico con una linea cellulare euploide. Infine, un embrione inizialmente aneuploide può essere sottoposto ad un fenomeno di correzione (il cosiddetto "embryo rescue") con perdita post-zigotica di un cromosoma o duplicazione di un intero cromosoma, con conseguente ripristino di un corredo cromosomico euploide (Sachdev, 2017).

L'effettiva incidenza del mosaicismo non è stata ancora definita chiaramente in letteratura, soprattutto per le difficoltà tecniche nell'ottenere stime accurate in fase sperimentale. Esiste al momento una notevole eterogeneità nei reports che hanno analizzato l'incidenza del fenomeno nello stadio preimpianto, con una variabilità che va dal 2 al 70% nella stima delle incidenze in questa epoca di sviluppo (Esfandiari, 2016; Tortoriello, 2016; Greco, 2015; Capalbo, 2017; Treff, 2017). Questi dati discordanti si spiegano principalmente con le differenze procedurali e metodologiche utilizzate nei diversi studi. La stima della reale incidenza e prevalenza di tale fenomeno negli embrioni preimpianto è comunque ancora oggetto di dibattito. (Sermon, 2016; Marin, 2017; Vera-Rodriguez, 2017; Sachdev, 2017; Fragouli, 2017; Simon, 2017).

Ad ogni modo, gli studi che hanno analizzato fino ad ora la concordanza diagnostica tra inner cell mass (ICM) e trofoblasto (TE) riportano valori di concordanza diagnostica superiori al 98% (Jhonson, 2010; Northrop, 2010; Fragouli, 2011; Capalbo, 2013; Capalbo, 2017), suggerendo che l'analisi del TE può considerarsi diagnostica dell'ICM.

D'altronde il fenomeno del mosaicismo è fisiologico e ben noto nel periodo prenatale, in cui un mosaicismo placentare viene riscontrato nell'1-2% dei campioni di villi coriali analizzati e nel 0.2% dei campioni ottenuti da amniocentesi (Spinner, 2014).

Embrioni con cariotipo a mosaico allo stadio di blastocisti hanno comunque una potenzialità di impianto e la possibilità di esitare in un feto cromosomicamente normale o aneuploide o a mosaico (con percentuali di mosaicismo non sempre corrispondenti a quelle diagnosticate in PGT), anche se i dati disponibili in tal senso sono estremamente pochi e preliminari (Greco, 2015).



Come atteso, il trasferimento di questi embrioni con cariotipo a mosaico è soggetto ad un tasso di fallimento di impianto e di aborto spontaneo molto elevato, e non si conoscono le conseguenze a lungo termine post-natali di nati da tali embrioni (PGDIS Position Statement, 2016). Ciononostante, si ritiene doveroso, se la coppia non ha altre opzioni di trasferimento, discutere in sede di consulenza genetica della possibilità di trasferimento, avendo la coppia compreso le limitazioni e i rischi ad esso connesso (Munné, 2016; Besser, 2017).

Un discorso simile può essere effettuato per il riscontro di aneusomie in PGT, dal momento che il miglioramento tecnologico ha comportato un aumento della definizione diagnostica a livello subcromosomico, con possibilità di rilevare microdelezioni/microduplicazioni di grandezza inferiore alle 5-10 Mb. Non è nota l'incidenza di tali anomalie genomiche a livello embrionale, poiché la tecnologia che permette di rilevarle è agli esordi e non esistono studi pubblicati su ampie casistiche, per cui non sono noti neppure gli effetti a breve (tasso di impianto, di aborto e andamento della gravidanza) e lungo termine (follow-up post-natale). Per le ragioni sovraesposte, si raccomanda estrema cautela nell'includere la ricerca di tali anomalie nella routine diagnostica di PGT, così come nella loro refertazione (Capalbo, 2017).



BIBLIOGRAFIA

Bay B, Ingerslev HJ, Lemmen JG, Degn B, Rasmussen IA, Kesmodel US. Preimplantation genetic diagnosis: a national multicenter obstetric and neonatal follow-up study. *Fertil Steril*. 2016 Nov;106(6):1363-1369.e1.

Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, Baldi M, Colamaria S, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod*. 2013 Feb;28(2):509-18.

Capalbo A, Wright G, Elliott T, Ubaldi FM, Rienzi L, Nagy ZP. FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum Reprod*. 2013 Aug;28(8):2298-307.

Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, Nagy ZP, Ubaldi FM. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod*. 2014 Jun;29(6):1173-81.

Capalbo A, Treff NR, Cimadomo D, Tao X, Upham K, Ubaldi FM, Rienzi L, Scott RTJr. Comparison of array comparative genomic hybridization and quantitative real-time PCR-based aneuploidy screening of blastocyst biopsies. *Eur J Hum Genet*. 2015 Jul;23(7):901-6.

Capalbo A, Rienzi L, Ubaldi FM. New approaches for multifactor preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases and aneuploidies from a single biopsy. *Fertil Steril*. 2016 Feb;105(2):297-8.

Capalbo A, Ubaldi FM, Rienzi L, Scott R, Treff N. Detecting mosaicism in trophectoderm biopsies: current challenges and future possibilities. *Hum Reprod*. 2017 Mar 1;32(3):492-498.

Capalbo A, Rienzi L. Mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Fertil Steril*. 2017 Apr 19.

Chen M, Wei S, Hu J, Quan S. Can Comprehensive Chromosome Screening Technology Improve IVF/ICSI Outcomes? A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 Oct 15;10(10): e0140779.



De Rycke M, Belva F, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, Traeger-Synodinos J, Coonen E. ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011. *Hum Reprod.* 2015 Aug;30(8):1763-89.

Deans Z, Fiorentino F, Biricik A, Traeger-Synodinos J, Moutou C, De Rycke M, Renwick P, SenGupta S, Goossens V and Harton G: The experience of 3 years of external quality assessment of preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis. *EJHG* (2013) 21, 800–806.

Dekeuwer C, Bateman S. Much more than a gene: hereditary breast and ovarian cancer, reproductive choices and family life. *Med Health Care Philos.* 2013 May;16(2):231-44.

Desmyttere S, De Rycke M, Staessen C, Liebaers I, De Schrijver F, Verpoest W, Haentjens P, Bonduelle M. Neonatal follow-up of 995 consecutively born children after embryo biopsy for PGD. *Hum Reprod.* 2012 Jan;27(1):288-93.

Esfandiari N, Bunnell ME, Casper RF. Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? *J Assist Reprod Genet.* 2016 Nov;33(11):1439-1444.

Forman EJ, Hong KH, Franasiak JM, Scott RT Jr. Obstetrical and neonatal outcomes from the BEST Trial: single embryo transfer with aneuploidy screening improves outcomes after in vitro fertilization without compromising delivery rates. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Feb;210(2):157.e1-6.

Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, et al. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;100:100–7.e1.

Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, Goodall NN, Mania A, Griffiths T, Gordon A, Wells D. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod.* 2011 Feb;26(2):480-90.

Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Babariya D, Tarozzi N, Borini A, Wells D. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid-aneuploid blastocysts. *Hum Genet.* 2017 Apr 9.



Franasiak JM, Dondik Y, Molinaro TA, Hong KH, Forman EJ, Werner MD, Upham KM, Scott RT Jr. Blastocyst transfer is not associated with increased rates of monozygotic twins when controlling for embryo cohort quality. *Fertil Steril*. 2015 Jan;103(1):95-100.

Goodrich D, Tao X, Bohrer C, Lonczak A, Xing T, Zimmerman R, Zhan Y, Scott RT Jr, Treff NR. A randomized and blinded comparison of qPCR and NGS-based detection of aneuploidy in a cell line mixture model of blastocyst biopsy mosaicism. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Nov;33(11):1473-1480.

Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *N Engl J Med*. 2015 Nov 19;373(21):2089-90.

Gueye NA, Devkota B, Taylor D, Pfundt R, Scott RT Jr, Treff NR. Uniparentaldisomy in the human blastocyst is exceedingly rare. *Fertil Steril*. 2014Jan;101(1):232-6.

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990 Apr 19;344(6268):768-70.

Harper JC, Sengupta S, Vesela K, Thornhill A, Dequeker E, Coonen E, Morris MA. Accreditation of the PGD laboratory. *Hum Reprod*. 2010 Apr;25(4):1051-65.

Harton G, Braude P, Lashwood A, Schmutzler A, Traeger-Synodinos J, Wilton L, Harper JC; European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium.. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod*. 2011 Jan;26(1):14-24.

Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, Moutou C, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, Harper JC; European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium.. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod*. 2011 Jan;26(1):33-40.

Johnson DS, Cinnioglu C, Ross R, Filby A, Gemelos G, Hill M, Ryan A, Smotrich D, Rabinowitz M, Murray MJ. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophoctoderm and inner cell mass. *Mol Hum Reprod*. 2010 Dec;16(12):944-9.



Kotsopoulos J, Librach CL, Lubinski J, Gronwald J, Kim-Sing C, Ghadirian P et al. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group.. Infertility, treatment of infertility, and the risk of breast cancer among women with BRCA1 and BRCA2 mutations: a case-control study. *Cancer Causes Control*. 2008 Dec;19(10):1111-9.

Lashwood A, Flinter F. Clinical and counselling implications of preimplantation genetic diagnosis for Huntington's disease in the UK. *Hum Fertil (Camb)*. 2001;4(4):235-8.

Lupski JR. Genetics. Genome mosaicism--one human, multiple genomes. *Science* 2013 Jul 26;341(6144):358-9.

Marin D, Scott RT Jr, Treff NR. Preimplantation embryonic mosaicism: origin, consequences and the reliability of comprehensive chromosome screening. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2017 Jun;29(3):168-174.

Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM, Buys CH, Heineman MJ, Repping S, van der Veen F. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*. 2007 Jul 5;357(1):9-17.

Murugappan G, Shahine LK, Perfetto CO, Hickok LR, Lathi RB. Intent to treat analysis of in vitro fertilization and preimplantation genetic screening versus expectant management in patients with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 2016 Aug;31(8):1668-74.

Northrop LE, Treff NR, Levy B, Scott RT Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod*. 2010 Aug;16(8):590-600.

Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Castillón G, Guillén A, Vidal C, Giles J, Ferrando M, Cabanillas S, Remohí J, Pellicer A, Simón C. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertil Steril*. 2017 Apr 19.

Rumbold AR, Moore VM, Whitrow MJ, Oswald TK, Moran LJ, Fernandez RC, Barnhart KT, Davies MJ. The impact of specific fertility treatments on cognitive development in childhood and adolescence: a systematic review. *Hum Reprod*. 2017 May 4:1-19.



Sachdev NM, Maxwell SM, Besser AG, Grifo JA. Diagnosis and clinical management of embryonic mosaicism. *Fertil Steril*. 2017 Jan;107(1):6-11.

Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2013 Sep;100(3):697-703.

SenGupta SB, Dhanjal S, Harper JC: Quality control standards in PGT and PGS. *ReproductiveBioMedicine Online* (2016) 32, 263–270.

Sermon K, Capalbo A, Cohen J, Coonen E, De Rycke M, De Vos A, et al. The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists. *Mol Hum Reprod*. 2016 Aug;22(8):845-57.

Shenfield F, Pennings G, Devroey P, Sureau C, Tarlatzis B, Cohen J; ESHRE Ethics Task Force.. Taskforce 5: preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 2003 Mar;18(3):649-51.

SIERR: Manuale per la gestione di un laboratorio di PMA - Strumenti per l'applicazione dei DL 191/2007 e 16/2010 nei laboratori di procreazione medicalmente assistita" - Società Italiana di Embriologia, Riproduzione e Ricerca, 2016.

Simon C. Introduction: To transfer or not transfer...a mosaic embryo, that is the question. *Fertil Steril*. 2017 Apr 19.

Skrzypek H, Hui L. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy and single gene disorders. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017 Feb 28. pii: S1521-6934(17)30032-9.

Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2004 Dec;19(12):2849-58.



Sunkara SK, Antonisamy B, Selliah HY, Kamath MS. Pre-term birth and low birth weight following preimplantation genetic diagnosis: analysis of 88 010 singleton live births following PGD and IVF cycles. *Hum Reprod.* 2017 Feb;32(2):432-438.

Tortoriello DV, Dayal M, Beyhan Z, Yakut T, Keskinetepe L. Reanalysis of human blastocysts with different molecular genetic screening platforms reveals significant discordance in ploidy status. *J Assist Reprod Genet.* 2016Nov;33(11):1467-1471.

Treff NR, Levy B, Su J, Northrop LE, Tao X, Scott RT Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH. *Mol Hum Reprod.* 2010 Aug;16(8):583-9.

Treff NR, Tao X, Ferry KM, Su J, Taylor D, Scott RT Jr. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil Steril.* 2012 Apr;97(4):819-24.

Treff NR, Scott RT Jr. Four-hour quantitative real-time polymerase chain reaction-based comprehensive chromosome screening and accumulating evidence of accuracy, safety, predictive value, and clinical efficacy. *Fertil Steril.* 2013 Mar 15;99(4):1049-53.

Treff NR, Franasiak JM. Detection of segmental aneuploidy and mosaicism in the human preimplantation embryo: technical considerations and limitations. *Fertil Steril.* 2017 Jan;107(1):27-31.

Ubaldi FM, Capalbo A, Colamaria S, Ferrero S, Maggiulli R, Vajta G, et al. Reduction of multiple pregnancies in the advanced maternal age population after implementation of an elective single embryo transfer policy coupled with enhanced embryo selection: pre- and post-intervention study. *Hum Reprod.* 2015 Sep;30(9):2097-106.

Vanneste E, Melotte C, Voet T, Robberecht C, Debrock S, Pexsters A, Staessen C, Tomassetti C, Legius E, D'Hooghe T, Vermeesch JR. PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod.* 2011 Apr;26(4):941-9.

Vera-Rodriguez M, Rubio C. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos. *Fertil Steril.* 2017 Apr 19.



Yan L, Huang L, Xu L, Huang J, Ma F, Zhu X, et al. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Dec 29;112(52):15964-9.

Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5:24.

Zimmerman RS, J alas C, Tao X, Fedick AM, Kim JG, Pepe RJ, Northrop LE, Scott RT Jr, Treff NR. Development and validation of concurrent preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders and comprehensive chromosomal aneuploidy screening without whole genome amplification. *Fertil Steril*. 2016 Feb;105(2):286-94.



ELENCO ACRONIMI

ADO: Allele drop out

AF: Fallimenti di amplificazione

CEDU: Corte Europea Diritti dell'Uomo

CGH-array: Comparative genomic hybridization - array

CNV: Copy number variation

CQI: Controlli di qualità interni

DPN: Diagnosi prenatale

ESHRE: European society of human reproduction and embryology

FISH: Fluorescent in situ hybridization

GP: Globulo polare

HLA: Antigene leucocitario umano

ICM: Inner cell mass

ISS: Istituto superiore di Sanità

MA: Età materna avanzata

MESA: Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration

mtDNA: DNA mitocondriale

NGS: Next generation sequencing

PCR: Polimerase chain reaction

PEC: Posta elettronica certificata

PGT: Preimplantation genetic test - Test genetico preimpianto

PGT-A: Test genetico preimpianto per aneuploidie

PGT-M: Test genetico preimpianto per malattia monogenica

PGT-SR: Test genetico preimpianto per anomalie cromosomiche strutturali

PMA: Procreazione medicalmente assistita



qPCR: PCR quantitativa

RCTs: Studi randomizzati controllati

RFI: Ripetuti falliti impianti

SGQ: Sistema di Gestione per la Qualità

SIERR: Società italiana embriologia, riproduzione e ricerca

SIGU: Società italiana di genetica umana

SNP: Polimorfismo a singolo nucleotide

SSN: Sistema sanitario nazionale

STRs: Short tandem repeats

TE: Trofoectoderma

TESE: Testicular Sperm Extraction

UK-NEQAS: United Kingdom National External Quality Assessment

UPD: Disomia uniparentale

VEQ: Valutazioni esterne della qualità

WGA: Whole Genome Amplification



ALLEGATO 1

CERTIFICAZIONI e CONTROLLI DI QUALITÀ

Accreditamento e Certificazione

L'obiettivo principale per la realizzazione di un Sistema di Gestione per la Qualità (SGQ) in un laboratorio è quello di valutare l'efficacia delle procedure adottate, di individuare e correggere gli errori, di assicurare l'accuratezza e la sensibilità dei diversi processi analitici e di valutare la competenza dei professionisti che operano nei diversi settori. Tutto ciò concorre a mantenere sotto controllo il complesso processo diagnostico ed il suo continuo miglioramento e a soddisfare le aspettative del paziente/cliente che richiede servizi diagnostici affidabili. In aggiunta ai criteri di cui sopra è necessario offrire al paziente la migliore offerta diagnostica e le migliori informazioni sul processo, in questo caso rappresentato dal PGT.

La maggior parte dei laboratori di analisi mediche applica i principi di base della buona prassi di laboratorio, che includono la presenza di protocolli e procedure scritte. Tuttavia, l'introduzione di un SGQ incorpora un elemento aggiuntivo: la verifica, da parte di un soggetto indipendente, della conformità ad una serie di requisiti definiti in standard o in specifiche tecniche e la conseguente certificazione. Fondamentalmente, ottenere una certificazione implica che il SGQ implementato dal laboratorio è stato sottoposto a verifica da parte di un Ente di Certificazione e che il SGQ risponde ai requisiti definiti in norme internazionali quali la UNI-EN ISO 9001, applicabile in ambito sanitario e la cui nuova edizione è stata pubblicata nel settembre 2015.

Il PGT Consortium dell'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) raccomanda che il PGT venga eseguito solo in laboratori accreditati (Harton, 2011) e la Human Fertilisation and Embryology Authority del Regno Unito ne ha fatto un obbligo. Analogamente, l'Organisation for Economic Co-operation and Development nelle "Guidelines for quality assurance in molecular genetic testing" (OECD, 2007) afferma che "tutti i laboratori che refertano i risultati di test di genetica molecolare per scopi di assistenza clinica dovrebbero essere accreditati od ottenere un riconoscimento equivalente". In questo contesto si parla quindi di Accreditamento dei laboratori.

In cosa consiste la differenza tra Accreditamento e Certificazione?

L'Accreditamento è un processo tramite il quale un ente (organismo), indipendente e autorevole, concede il riconoscimento formale che un'organizzazione (o un singolo) è competente nell'eseguire uno specifico



servizio come descritto nello scopo dell'accreditamento [UNI CEI EN 45020:1998]. Una particolare forma di Accredimento è quello conseguente a regolamentazione pubblica, quale l'Accreditamento Istituzionale delle strutture sanitarie e socio-sanitarie, processo con il quale le Regioni riconoscono ai presidi sanitari e socio-sanitari, pubblici e privati, la possibilità di erogare prestazioni sanitarie e socio-sanitarie per conto del Servizio sanitario regionale. Questo riconoscimento garantisce ai cittadini che le strutture accreditate sono in possesso dei requisiti organizzativi, tecnologici e impiantistico-strutturali aderenti agli standard di qualità richiesti dalla programmazione regionale in materia di sanità.

La Certificazione è una procedura con cui una terza parte indipendente dà assicurazione scritta che un prodotto, un servizio, un processo o una persona è conforme ai requisiti specificati (definizione tratta da UNI-Ente Italiano di Normazione: <http://www.uni.com>).

La differenza tra le due apparentemente simili definizioni risiede quindi nel fatto che: a) con l'accreditamento si riconosce la competenza, basata su una comprovata conoscenza tecnica e pertanto richiede la consultazione di un esperto tecnico per lo scopo dell'accreditamento; b) con la certificazione si assicura la conformità ad una data norma (standard).

Generalmente in ambito sanitario la certificazione riguarda la conformità alla norma UNI EN ISO 9001 e quindi la gestione generale dei processi senza entrare nello specifico della competenza tecnica. Entra nel merito della competenza la norma UNI EN ISO 15189, che definisce i requisiti che un laboratorio deve soddisfare per dimostrare la competenza tecnica del proprio personale e la disponibilità di tutte le risorse necessarie a garantire dati e risultati accurati e affidabili per le specifiche analisi mediche oggetto di accreditamento. La competenza si attesta attraverso l'accreditamento, ed infatti la UNI EN ISO 15189 è una norma accreditabile (non certificabile). Ovviamente è applicabile ai laboratori che eseguono test genetici a scopo medico e pertanto anche ai laboratori di PGT.

Per assicurare la conformità nel tempo, i laboratori accreditati vengono sottoposti a controlli regolari in modo da poter garantire il mantenimento dei livelli di competenza tecnica. Per quanto concerne i requisiti relativi alla competenza del personale coinvolto, la ISO 15189 stabilisce che il laboratorio (nel nostro caso di PGT) sia diretto "da una o più persone con responsabilità esecutiva e la competenza necessaria per assumersi la responsabilità dei servizi forniti". I requisiti di gestione fanno riferimento al sistema qualità ed includono: manuale e la politica della qualità; controllo dei documenti; gestione delle non-conformità e azioni correttive; miglioramento continuo; attività di audit; revisione del Sistema; contratti; gestione e risoluzione dei reclami. I requisiti tecnici riguardano la competenza del personale (sia tecnico che medico), le attrezzature, le infrastrutture e l'ambiente, i processi di laboratorio (fasi pre-analitica, analitica e post-analitica). Una particolare enfasi è posta su identificazione e tracciabilità del campione, validazione dei test, interpretazione e comunicazione dei risultati. Inoltre, devono essere sviluppati indicatori di qualità per



monitorare i contributi alla cura del paziente ed il miglioramento continuo. Ai laboratori viene poi esplicitamente richiesto di partecipare a programmi regolari di valutazione esterna della qualità (VEQ) come dimostrazione continua della loro competenza.

Da quanto sopra esposto risulta evidente che l'accreditamento secondo la norma ISO 15189 è un processo laborioso, difficile da implementare e da mantenere. In parecchie Nazioni europee è peraltro già o sta diventando cogente, a riprova della capacità di garantire la qualità delle analisi mediche eseguite nei laboratori accreditati.

Accreditamento SIGUCERT

I laboratori che eseguono per conto del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) analisi genetiche non possono prescindere dall'operare nell'ambito di un SGQ. Gli elementi da considerare prioritari nell'attuazione del SGQ nelle Strutture del SSN sono riconducibili alla corretta gestione dei processi (in conformità con la Norma ISO 9001), alla definizione del corretto contenuto "tecnico" degli specifici servizi forniti (in conformità a specifiche linee guida), alla qualificazione del personale attraverso una formazione appropriata e di elevato contenuto scientifico, alla competenza per l'esecuzione delle attività diagnostiche (in conformità alla Norma ISO 15189). La SIGU, con le finalità principali di garantire la qualità delle prestazioni di genetica erogate ai cittadini e di tutelare i professionisti e le Strutture di Genetica operanti in convenzione con il SSN, ha realizzato un modello di "Accreditamento professionale di parte terza", che ingloba gli aspetti positivi della Certificazione (completa indipendenza tra verificatori e verificati, a tutela di una operatività imparziale e super partes) e dell'Accreditamento (competenza specifica dei verificatori su processi e attività oggetto di accreditamento). Al modello è stato assegnato il nome di "Certificazione SIGUCERT". Apposite Commissioni SIGU hanno elaborato Standard contenenti i requisiti di accreditamento specifici per le attività di Genetica Clinica, per i Laboratori di Genetica Medica (citogenetica e genetica molecolare) e per le Biobanche Genetiche. Lo Standard SIGU "Sistema di Gestione per la Qualità nei Laboratori di Genetica Medica" è applicabile anche nei laboratori che eseguono PGT.

La SIGU, da sempre attenta alle problematiche inerenti la qualità dei servizi e delle analisi erogati in strutture di genetica medica e a tutela di chi ne usufruisce, ritiene auspicabile che un laboratorio di PGT inizi e consolidi un processo di accreditamento secondo la norma ISO 15189 e di Certificazione SIGUCERT.

La Valutazione Esterna della Qualità

Requisito imprescindibile per l'accreditamento ISO 15189 e la Certificazione SIGUCERT, la partecipazione a schemi di valutazione esterna della qualità (VEQ) consente ai laboratori di confrontare la qualità della loro attività diagnostica con quella degli altri laboratori. Gli schemi di VEQ disponibili per PGT sono numerosi: ai



partecipanti può essere richiesto di interpretare i risultati diagnostici ottenuti oppure di individuare le strategie diagnostiche necessarie per affrontare diversi scenari di PGT. Ad essere valutato è l'intero processo diagnostico, comprese le informazioni che il laboratorio fornisce nel referto. Buone pratiche o eventuali errori identificati dai valutatori sono riassunti in un report individuale che viene inviato al laboratorio, il quale deve poi farsi carico della risoluzione degli eventuali problemi rilevati. La VEQ ha il potenziale per identificare problemi maggiori e minori relativi a formazione del personale, manutenzione delle attrezzature, conduzione delle analisi nel rispetto delle linee guida di più recente pubblicazione. Si tratta quindi per i laboratori di un ottimo strumento per valutare e migliorare in modo oggettivo la qualità del servizio diagnostico offerto.

I laboratori partecipanti sono valutati in base a specifici criteri ed il risultato ottenuto viene espresso con un punteggio e con il giudizio di prestazione adeguata o inadeguata. I laboratori possono appellarsi al giudizio ottenuto. Il ricorso viene valutato da un gruppo di esperti in PGT (Specialist Advisory Group) e può essere accolto o respinto. Quando il risultato ottenuto è di "prestazione inadeguata" il laboratorio deve analizzarne le cause: spesso infatti gli errori sono il risultato di protocolli deboli che influenzano il risultato delle analisi.

Una revisione dei risultati ottenuti nei primi tre schemi di diagnosi di genetica molecolare preimpianto organizzati da UK-NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment) ha mostrato un netto miglioramento della refertazione di tutti i laboratori partecipanti, come conseguenza dei suggerimenti contenuti nella relazione di sintesi che ogni laboratorio riceve alla conclusione dello schema e che contiene indicazioni puntuali sugli elementi che un referto deve contenere (Deans, 2013). Incontri tra laboratori partecipanti allo schema sono poi un utile strumento per discutere le difficoltà incontrate nel partecipare alla VEQ. Questo processo permette agli schemi di VEQ di evolvere e di adeguarsi ai cambiamenti introdotti nella pratica clinica, quali l'introduzione di nuove tecnologie.

Gli schemi di VEQ per PGT attualmente disponibili in Europa sono relativi alle diverse tipologie di analisi eseguibili in un laboratorio di PGT: FISH per l'analisi di riarrangiamenti cromosomici, tecniche molecolari per studio di mutazioni, micro-array per la determinazione di aneuploidie cromosomiche.

Controllo di Qualità Interno (CQI)

Altrettanto importante ai fini dell'accreditamento dei laboratori e della garanzia di qualità delle prestazioni eseguite in un laboratorio di PGT è la progettazione e messa in atto di specifici CQI per ciascuna fase del processo analitico e per le attività che possono influenzare la buona riuscita e la qualità delle analisi, a partire dalla biopsia fino alle tecniche di analisi applicata (SenGupta, 2016).



Gli Audit sono una parte importante del controllo della qualità in quanto rappresentano il mezzo con cui monitorare il servizio offerto dal laboratorio di PGT ad intervalli regolari. Hanno lo scopo di controllare l'intero SGQ ed il processo analitico, o nel suo insieme o nelle sue componenti, e di verificare la competenza del personale.

Indicatori di qualità

L'individuazione ed il monitoraggio continuo di indicatori di qualità rientrano tra i requisiti di accreditamento secondo la norma ISO 15189. Un buon indicatore deve essere: accurato, preciso, rilevabile (i dati devono essere disponibili senza eccessivi costi di raccolta), sensibile (deve registrare i miglioramenti e i peggioramenti). Dovrebbero essere identificati indicatori in grado di monitorare la gestione del percorso di accesso al PGT, le prestazioni analitiche e le fasi cruciali delle stesse, il numero e la tipologia delle prestazioni eseguite anche in rapporto al numero ed alla competenza del personale, la percentuale di insuccessi, le modalità di acquisizione del consenso informato, la validazione e la tipologia del referto dei diversi test, i tempi di refertazione e la modalità di consegna del referto, le eventuali modalità di invio e di trasporto dei campioni presso altre strutture e/o laboratori, il numero e la tipologia degli errori evidenziati dai controlli di qualità e dalle VEQ, la modalità di gestione dei sistemi informatici, con particolare attenzione ai livelli di accesso e conservazione dei dati raccolti, il numero e la tipologia dei reclami.

In conclusione, il rispetto dei requisiti previsti dall'accREDITAMENTO secondo la norma ISO 15189 e degli ulteriori requisiti di qualità specifici per le analisi di genetica medica previsti dallo Standard SIGU "Sistema di Gestione per la Qualità nei Laboratori di Genetica Medica", congiuntamente al rispetto di quanto previsto dalle linee guida pubblicate dall'ESHRE (Harton, 2011), riducendo al minimo il rischio di una diagnosi errata dovrebbe essere considerato imprescindibile per i laboratori che si occupano di PGT.

In aggiunta, è opportuno che il Centro di PGT invii i propri dati e risultati al Registro PMA-PGT esistente presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Riferimenti normativi

- UNI CEI EN 45020:1998 "Normazione ed attività connesse – Vocabolario generale"
- UNI EN ISO 9001:2015 "Quality Management Systems"
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura"
- UNI EN ISO 15189:2013 "Medical laboratories - Requirements for quality and competence"



- STANDARD SIGUCERT Sistema di Gestione per la Qualità nei Laboratori di Genetica Medica, ed 2014.
- OECD, 2007 "Guidelines for quality assurance in molecular genetic testing"

ALLEGATO 2

ASPETTI GIURIDICI

(a cura dell'Avv. Gianni Baldini)

In termini generali definitivi, sotto l'aspetto giuridico, la diagnosi genetica preimpianto (PGT) è uno strumento diagnostico che consente di riconoscere già nell'embrione la sussistenza dell'alterazione genetica della malattia della quale sono affetti i genitori. Sul punto si rileva che tale tecnica, che altro non rappresenta se non una forma di "diagnosi genetica pre-natale" successiva al concepimento e precedente al trasferimento in utero dell'embrione, resa attuale dalle modalità tecnico-esecutive della PMA, viene richiesta da soggetti affetti da gravi patologie genetiche trasmissibili alla prole in funzione preventiva alle comuni diagnosi prenatali (amniocentesi e villocentesi), configurandosi come una sorta di buona pratica medica che consente una diagnosi precoce di problematiche che integrerebbero i presupposti legittimanti la successiva decisione della madre di interrompere la gravidanza ex art. 4 o 6 L. 194/78.

Il precedente supposto divieto di effettuare qualsiasi analisi sull'embrione risultava fondato sull'art 13 L. 40/04 che come è noto prevede che *"Le indagini relative allo stato di salute degli embrioni creati in vitro, ai sensi dell'art. 14 comma 5, dovranno sempre essere volte alla tutela della salute e dello sviluppo di ciascun embrione"*. Le linee Guida, approvate qualche mese dopo la legge, precisavano tale concetto prevedendo che *"Qualsiasi indagine sull'embrione potrà essere solo di tipo osservazionale"*.

Tali enunciati sono stati progressivamente dichiarati illegittimi dalle pronunce non solo delle Corti di merito ma anche dalla Corte Costituzionale e dalla Corte Europea dei diritti dell'Uomo, secondo la quale, con riguardo al divieto di PGT, esso deve ritenersi limitato a fini di ricerca e sperimentazione sull'embrione – ipotesi disciplinata dall'art 13 L. 40/04 - e non alle ipotesi in cui ai sensi dell'art. 14 c. 5, per cui la coppia che acceda al trattamento di PMA ha diritto a chiedere *"informazioni sul numero e sullo stato di salute degli embrioni prodotti e da trasferire in utero"*. In tal senso la precisazione effettuata con un atto secondario, come le Linee Guida ministeriali del 2004, che limitavano alla solo indagine osservazionale la



tecnica diagnostica utilizzabile, risultava del tutto illegittimo perché lesivo dei principi fondamentali di autodeterminazione e consenso informato, nonché del diritto alla salute della donna.

Ne è scaturita l'approvazione delle nuove Linee Guida del 30 aprile 2008, che recependo quanto indicato e precisato dalla giurisprudenza di merito (Tribunali di Cagliari e Firenze 2007, TAR Lazio 2008), non contengono più l'arbitraria limitazione della indagine pre-impianto alla sola tecnica osservazionale, implicitamente consentendo il pieno esercizio del diritto della coppia di conoscere le condizioni di salute dell'embrione, tramite diagnosi preimpianto, così come previsto dall'art. 14 c. 5 L. 40/04.

Nel 2009, la Sentenza della Corte Costituzionale n. 151/09 ha dichiarato l'illegittimità costituzionale dell'art. 14 della legge 40, laddove prevedeva che il medico, nell'esecuzione del trattamento di PMA, dovesse produrre in tutti i casi massimo 3 embrioni e avesse l'obbligo di trasferire tutti gli embrioni prodotti senza tener conto della tutela prevalente, nel caso specifico, della salute della donna. Questo principio, confermato da tutte le pronunce successive dei tribunali, è stato poi autorevolmente e definitivamente confermato sia dalla Consulta che dalla Corte Europea Diritti dell'Uomo (CEDU).

Infatti, con specifico riferimento alla PGT e ai requisiti di accesso soggettivi alle tecniche di PMA, la CEDU nel 2012 censura la legge 40/04 su due fronti: il primo riguardo ai requisiti per l'accesso alla PMA; il secondo inerente la (talvolta) collegata vicenda della ammissibilità della diagnosi genetica pre-impianto (PGT).

Il giudice delle Leggi (sentenza Corte Cost. 96/2015) risolve infine la questione delle coppie fertili ma portatrici di patologia genetica trasmissibile cui era precluso l'accesso alla PMA e alla diagnosi genetica di pre-impianto, uniformando i diritti di queste coppie (e di quelle delle coppie sterili in analoga condizione) con quelli delle coppie che ricorrono all'interruzione volontaria della gravidanza dopo il 3° mese.

Viene individuato un comune criterio di gravità in forza del quale così come si ha diritto all'aborto terapeutico oltre il 3° mese di gravidanza, dopo aver fatto la diagnosi prenatale invasiva, così per la PMA si può fare subito la diagnosi preimpianto e, sussistendo i requisiti di gravità della patologia che legittimerebbe successivamente l'eventuale opzione per la PGT, si può decidere di non procedere all'impianto dell'embrione.

Ne consegue che è il medico che ha il potere/dovere di accertare la gravità delle patologie e, accertata la loro eventuale idoneità a consentire il ricorso all'IVG a valutare l'adeguatezza della situazione a consentire l'accesso alla PMA preceduta da PGT.



In attuazione delle richiamate disposizioni costituzionali e dell'art 6 della legge 194/78, in attuazione del diritto alla procreazione cosciente e responsabile e della tutela della salute della donna, deve dunque ritenersi che in forza della sentenza Consulta 96/15 alla PGT/PMA per coppie con grave rischio di trasmettere patologia genetica legittimante il successivo aborto (come attestato dalla richiamata certificazione medica rilasciata da struttura pubblica autorizzata), debba estendersi la medesima disciplina prevista per l'aborto terapeutico.

Quanto alla certificazione sulla rilevante malattia genetica della coppia, par di capire, è il medico del Centro all'uopo autorizzato, analogamente a ciò che avviene per l'aborto terapeutico, a doverla rilasciare. Altra cosa è la esecuzione della stessa che, congiuntamente o meno al trattamento di PMA, potrà essere fatta, ovviamente, anche nel privato.

Affermato il diritto della coppia di selezionare l'embrione sano da quello malato, non aveva senso lasciare la previsione penale di cui all'art. 13 c. 3 lett. b), che prevedeva una sanzione penale a carico del sanitario che eseguisse in tali casi la selezione a tutela della salute della donna, evitando di trasferire l'embrione malato. In tal senso la Corte così è intervenuta con sentenza 229/15.

Quanto alla questione della eventuale possibilità di soppressione dell'embrione risultato malato, la Consulta ha precisato che il divieto previsto dalla legge risulta conforme al principio di ragionevolezza, rientrando nella discrezionalità del legislatore prevedere che a tutela della dignità dell'embrione (ancorché malato), non sussistendo alcun diritto antagonista da bilanciare (non la tutela della salute della donna, né esigenze autodeterminative della coppia), lo stesso deve essere crioconservato a tempo indeterminato.

In sintesi: 1) selezionare gli embrioni da trasferire al fine di tutelare il prioritario interesse alla salute della donna non è più reato e dunque il sanitario dovrà procedere, sussistendo i requisiti di gravità della patologia ex art 6 l. 194/78, all'impianto dei soli embrioni sani preventivamente individuati tali con la PGT; 2) in assenza di un diritto antagonista da bilanciare a tutela della dignità dell'embrione, permane il divieto di soppressione dello stesso e il correlativo obbligo per i centri di PMA di crioconservazione a tempo indefinito.

Infine, rimangono aperte alcune questioni in attesa di un intervento chiarificatore del legislatore (nazionale e/o regionale). Una di queste attiene alla problematica se la PGT debba o meno rientrare nei LEA (livelli essenziali di assistenza) con la possibilità di un rimborso per il paziente da parte del servizio sanitario pubblico. La questione è in questi mesi oggetto di discussione dei vari tavoli ministeriali e siamo in attesa della sua definizione. Altra questione è per quale patologie è consentito ricorrere alla PGT. La risposta è stata data dalla Corte costituzionale che ha indicato nel "criterio normativo di gravità", rimesso



alla valutazione del medico, il parametro che uniforma il trattamento tra l'embrione malato che non deve essere trasferito e il feto malato che può essere abortito. Ultima questione riguarda il ricorso a PGT-A inteso come screening nelle coppie a rischio. In questo senso, è bene precisare che le richiamate sentenze della Consulta o dei Tribunali non indicano quale tecnica di PGT debba ritenersi ammessa o vietata dovendosi, a prescindere dalle metodiche utilizzate, ritenere ammissibile qualsiasi tipo di analisi su materiali biologici embrionari diretto a fornire informazioni sullo stato di salute dell'embrione che siano rilevanti per i genitori e il nato.

Riferimenti di legge

- Legge 40/2004: norme in materia di procreazione medicalmente assistita” pubblicata su G.U.R.I. n. 45 del 24 febbraio 2004; Linee Guida L.40/04 del 01/07/2015.
- Decreto 16 dicembre 2004 n. 336: Regolamento recante norme in materia di procreazione medicalmente assistita” pubblicato su G.U.R.I. n. 42 del 21 febbraio 2005.
- Sentenza della Corte Costituzionale n. 151 1 aprile - 8 maggio 2009” pubblicata su G.U.R.I. Prima Serie Speciale n. 19 del 13 maggio 2009.
- Sentenza della Corte Costituzionale n. 162 9 aprile - 10 giugno 2014” pubblicata su G.U. n. 26 del 18 giugno 2014; “Sentenza della Corte Costituzionale n. 96 14 aprile - 14 maggio 2015 pubblicata su G.U. n. 23 del 10 giugno 2015.
- Sentenza della Corte Costituzionale n. 229 6 ottobre - 21 ottobre 2015” pubblicata su G.U. n. 46 del 18 novembre 2015.