



SIGU

Società Italiana di Genetica Umana

SIEOG

**SOCIETÀ ITALIANA DI ECOGRAFIA OSTETRICA E GINECOLOGICA
E METODOLOGIE BIOFISICHE**

SEGRETERIA PERMANENTE E TESORERIA: Via dei Soldati, 25 ROMA – TELEFAX 06/888142 - Tel. 06/6875119 - C/C postale N. 20857009

1

Utilizzo appropriato delle tecniche di CMA (Chromosomal Microarrays Analysis) in diagnosi prenatale

Raccomandazioni congiunte SIGU (Società Italiana Genetica Umana) e SIEOG (Società Italiana di Ecografia Ostetrico-Ginecologica)

Premessa

Negli ultimi anni l'analisi cromosomica molecolare (*Chromosomal Microarray Analysis, CMA*)¹ ha affiancato e, in specifici casi, sostituito l'analisi standard del cariotipo nella diagnosi postnatale delle anomalie cromosomiche [Miller et al., 2010].

Benché siano state pubblicate diverse casistiche relative all'uso della CMA nella diagnosi prenatale, permangono alcune peculiarità relative all'utilizzo di questa metodica, come la limitatezza dei dati clinici disponibili (per lo più ecografici), dei tempi necessari a completare l'iter diagnostico e di quelli utili alla coppia a prendere delle decisioni sul futuro della gravidanza. Per queste ragioni, l'impiego prenatale della CMA può risultare complesso, soprattutto quando i risultati ottenuti presentino un significato incerto.

Le criticità inerenti l'utilizzo prenatale della CMA, sia dal punto di vista tecnico, sia per l'impatto psicologico che i risultati possono avere sulla coppia, sono state ampiamente discusse a livello internazionale e hanno prodotto conclusioni controverse [Novelli et al., 2012; Vetro et al., 2012; Wapner et al., 2012; Crolla et al., 2013; Evangelidou et al., 2013; Ganesamoorthy et al., 2013; Klugman et al., 2013; Callaway et al., 2014].

Con il presente documento la Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) e la Società Italiana di Ecografia Ostetrico-Ginecologica (SIEOG) raccomandano una strategia condivisa per l'applicazione della CMA in epoca prenatale.

1. Finalità delle indagini prenatali e ambito di applicazione. Le indagini prenatali hanno due principali finalità:

- lo screening della sindrome di Down e di altre aneuploidie cromosomiche, dei difetti congeniti e dei difetti di crescita;
- la diagnosi di specifiche patologie, come le anomalie cromosomiche associate alla patologia fetale, le anomalie ecografiche suggestive di difetti congeniti, l'anamnesi familiare positiva per una patologia trasmissibile e suscettibile di diagnosi prenatale.

Il primo gruppo comprende accertamenti 'standard', proposti in tutte le gravidanze; il secondo riguarda indagini mirate, che trovano indicazione solo nelle gravidanze con un rischio specifico.

Sono stati pubblicati numerosi studi prenatali che fanno riferimento alla CMA nel contesto di protocolli sperimentali applicati in ambiti diversi, ad esempio dopo un test di screening biochimico positivo suggestivo di un aumento del rischio di sindrome di Down, nelle madri di età ≥ 35 anni, nelle gravidanze monitorate per ansia materna o per un approfondimento diagnostico, successivamente al riscontro di anomalie ecografiche e/o cromosomiche non completamente caratterizzate con l'analisi cromosomica standard.

Il confronto dei risultati di questi studi ha un limite intrinseco, derivante dalle differenze tra le piattaforme utilizzate, in termini di tipologia ('*targeted*': con risoluzione differenziata, maggiore nelle regioni cromosomiche già note per la loro associazione con specifiche condizioni patologiche; '*whole-genome*': analisi uniforme di tutte le regioni cromosomiche) e/o di potere di risoluzione [Callaway et al., 2014]. A questi limiti tecnici, si aggiunge la disomogeneità nella interpretazione della patogenicità delle variazioni del numero di copie di regioni discrete del genoma (*Copy Number Variants, CNV*).

Le CNV possono essere classificate correntemente in 5 gruppi: benigne; probabilmente benigne; varianti di significato incerto (*Variant Of Unknown Significance, VOUS*); probabilmente patogeniche; patogeniche. Possono originare *de novo* o segregare da un genitore.

Le CNV patogeniche possono associarsi ad una significativa variabilità fenotipica e possono avere penetranza incompleta. Alcune CNV possono essere considerate patogeniche o verosimilmente patogeniche per quadri clinici non correlati alle specifiche indicazioni per le quali era stata richiesta la CMA (risultati incidentali). Ne consegue che, quando nelle casistiche vengono segnalate CNV ' clinicamente significative', non è sempre possibile stabilire se esse comprendano anche le CNV ' probabilmente' patogeniche, ma non correlate al quadro clinico in esame, che in altri contesti potrebbero ottenere una diversa interpretazione [Callaway et al., 2014]. In alcuni studi è stato esplicitato che le CNV ' clinicamente significative' comprendevano anche quelle ' potenzialmente' patogeniche [Wapner et al., 2012].

È importante sottolineare che in epoca prenatale il quadro clinico raramente è completamente espresso, che le anomalie riscontrate sono spesso aspecifiche e di non univoca interpretazione, che spesso le loro implicazioni nel lungo periodo non sono prevedibili. Ciò contribuisce ulteriormente a rendere difficile l'assimilazione delle CNV in rigide categorie.

Senza trascurare questi importanti limiti, una recente revisione dell'argomento [Callaway et al., 2014] ha concluso che la CMA aumenterebbe di circa l'1% la *detection rate* delle anomalie genomiche nei campioni analizzati per motivi di screening (ansia materna, età materna ≥ 35 anni, rischio aumentato agli screening per la sindrome di Down) e sino a circa il 7% quella dei casi analizzati in base al riscontro di anomalie ecografiche [Shaffer et al., 2012A, 2012C]. La percentuale delle VOUS è variabile, soprattutto in rapporto alla piattaforma utilizzata (1-3%) [Brady et al., 2013; Hillman et al., 2013; Klugman et al., 2013]. Questi dati dimostrano l'evidente sproporzione esistente tra il potenziale incremento diagnostico apportato dalla CMA nei programmi di screening, rispetto all'eventuale riscontro di VOUS, alla relativa complessità ed ai costi dell'analisi, ai problemi derivanti dall'interpretazione dei risultati ed alla esigenza di rendere disponibile la consulenza genetica post-test. Tuttavia, al momento non sono stati pubblicati studi di *Health Technology Assessment* della CMA applicata nella diagnosi prenatale ed è quindi

impossibile stabilire il rapporto costo-beneficio, né la sostenibilità economica da parte del Servizio Sanitario Nazionale di un'analisi di questo tipo su larga scala.

2. Translucenza nucale. Una considerazione a parte merita l'aumento della translucenza nucale fetale (*Nuchal Translucency, NT*). E' noto che questo marker ecografico può associarsi alle aneuploidie cromosomiche e, di fatto, la misurazione della NT fa parte integrante del test di screening combinato ed integrato.

Nella maggior parte dei casi, l'aumento della NT non associata alle aneuploidie si risolve spontaneamente ed esita in un successivo sviluppo normale [Bilardo et al., 2010]. Tuttavia l'aumento della NT può associarsi ad altre anomalie fetali, come le cardiopatie, le malformazioni extra-cardiache, alcune sindromi genetiche, ed alla morte endouterina. Per questo viene raccomandato un follow-up dedicato per queste gravidanze. In presenza di anomalie ecografiche, gli approfondimenti di laboratorio devono essere guidati dal sospetto clinico.

Alcuni studi hanno proposto l'analisi CMA in presenza di un aumento della NT, anche se isolato [Hillman et al., 2013]. I risultati disponibili, potenzialmente suggestivi di un aumento della detection rate delle anomalie cromosomiche, non appaiono comunque di univoca interpretazione, in particolare per la mancanza di una loro analisi scorporata dal gruppo delle 'anomalie fetali' e per la scarsa numerosità dei campioni. Altri studi non hanno chiarito se l'aumento isolato della NT sia equiparabile ad una 'anomalia strutturale fetale', né se costituisca un criterio di inclusione per l'analisi CMA e neppure hanno riportato l'esito di queste gravidanze, scorporandole dal gruppo generale delle anomalie fetali [Shaffer e al., 2012B; Brady et al., 2013, Ahn et al., 2014].

Una recente revisione di 18 studi [de Wit et al., 2014], ha documentato nei casi con NT >3,5 mm una incidenza di CNV pari a 3.1% (95% C.I. 0.4–5.7), la più bassa tra i feti con anomalie strutturali, dato che potrebbe riflettere la non-specificità di questo segno ecografico. Anche Huang et al. [2014] hanno confermato la limitata utilità degli approfondimenti diagnostici di laboratorio nei feti che mostrano un aumento isolato della NT: tra 215 feti che presentavano un aumento della NT e cariotipo normale, la CMA non ha rilevato CNV clinicamente significative, a fronte di un riscontro di VOUS nell'1.4% dei casi.

In conclusione, non esistono al momento dati sufficienti, né un parere internazionalmente condiviso sull'utilità dell'analisi CMA nelle gravidanze che presentano un aumento isolato della NT. Va peraltro sottolineato che negli studi citati non è mai stata fatta una distinzione tra le diverse classi di aumento della NT e neppure l'igroma cistico è stato considerato separatamente. Dato che i casi di NT >5,5 mm hanno un elevato rischio di esito patologico (70%) ed in circa un quarto delle gravidanze si associano malformazioni eco-evidenziabili al successivo follow-up [Souka et al., 2005; Bilardo et al., 2007], l'analisi CMA può essere giustificata in questo sottogruppo di feti.

Si sottolinea inoltre l'importanza di conservare un campione di DNA fetale in tutte le gravidanze che presentano un aumento della NT e si sottopongono ad indagini invasive, come indicato nelle Linee-Guida per la diagnosi citogenetica 2013 SIGU, per consentire l'analisi CMA o altri test genetici durante il successivo follow-up qualora si rilevassero ulteriori anomalie fetali.

La SIEOG e la SIGU auspicano che studi sperimentali o progetti pilota dedicati possano definire l'effettiva utilità clinica della CMA nei feti con aumento isolato della NT (ripartito nelle diverse classi di intervallo delle misurazioni) e nei casi di igroma cistico.

3. Anomalie ecografiche. La presenza di anomalie fetali all'indagine ecografica sposta la gravidanza dalla categoria 'a basso rischio' (o 'fisiologica'), a quella 'a rischio' (moderato o alto), oppure identifica una specifica patologia nelle gravidanze classificate a priori 'a rischio aumentato'. Per anomalie fetali si intendono: malformazioni isolate o multiple, anomalie/malformazioni associate configuranti un quadro sindromico, deficit significativi della crescita fetale (in particolare ad esordio precoce ed in assenza di alterazioni significative della velocimetria doppler del distretto utero-placentare). Non vengono considerate anomalie significative i cosiddetti *soft markers* [Linee

Guida SIEOG 2010; NHS Fetal Anomaly Screening Programme. Programme Statement: Normal variant screening in pregnancy, 2010].

In presenza di anomalie fetali, gli approfondimenti di laboratorio hanno finalità diagnostiche e non di screening. Se si formulano ipotesi diagnostiche specifiche, possono essere disponibili ed indicati uno o più accertamenti di laboratorio mirati. In molti casi non è possibile formulare una specifica diagnosi: in questi casi l'analisi CMA può consentire un incremento diagnostico medio del 7% nei confronti nella rilevazione degli sbilanciamenti cromosomici, rispetto al cariotipo [Shaffer et al., 2012C; Brady et al., 2013; Ahn et al., 2014; Callaway et al., 2014; de Wit et al., 2014], ed un incremento ancora più significativo nei casi con malformazioni multiple [9,1% in de Wit et al., 2014].

Pur in presenza di alcune casistiche rilevanti [Shaffer et al., 2012C], a differenza delle indicazioni per la analisi del cariotipo, non sono ancora disponibili dati definitivi circa la frequenza di sbilanciamenti rilevabili alla CMA per singole classi di malformazioni fetali, per cui non è ancora possibile stabilire una indicazione alla analisi CMA in relazione a specifiche anomalie fetali evidenziate all'indagine ecografica.

4. Criticità e aspetti organizzativo-gestionali. L'analisi CMA prenatale presenta alcune criticità che devono essere considerate nei loro aspetti tecnici, clinici e psicosociali. E' già stata anticipata la possibile difficoltà interpretativa dei risultati, con particolare riferimento alle VOUS e alla disomogeneità nella definizione delle CNV ' clinicamente significative '.

Quasi tutti i dati disponibili in letteratura e nei database riguardano casistiche analizzate con CMA in epoca postnatale, in base a specifiche indicazioni mediche, che quindi presentano possibili bias di selezione e non raramente fanno riferimento a dati clinici incompleti [Riggs et al., 2012; Riggs et al., 2013]. Analogamente, i database che raccolgono popolazioni ' apparentemente sane ' non contengono spesso i dati clinici dei soggetti analizzati e sono pertanto poco attendibili [Duclos et al., 2011]. Questi aspetti sono ulteriormente limitativi rispetto alla capacità di interpretare i risultati ottenuti in epoca prenatale.

Molte CNV si associano a patologie ad espressività variabile e penetranza incompleta, altre a patologie ad insorgenza tardiva, creando incertezza in termini prognostici sulla salute del feto. Inoltre, l'identificazione di una variante segregata da un genitore "apparentemente sano", sul quale possono essere conseguentemente indicati accertamenti clinici, può introdurre una destabilizzazione sulle aspettative di salute e sugli equilibri familiari [Klugman et al., 2013].

L'impatto di queste informazioni sulla coppia è molto forte e spesso assume connotazioni fortemente negative, come dimostra uno studio qualitativo nel quale i futuri genitori hanno addirittura definita ' tossica ' questa esperienza [Bernhardt et al., 2013].

5. Fase analitica. Il beneficio dell'analisi CMA, ovvero del potenziamento della capacità diagnostica, deve bilanciarsi con le criticità sopra discusse secondo i principi di opportunità e proporzionalità.

In base alle considerazioni fatte, si evince che al momento l'analisi CMA prenatale si colloca in una zona grigia compresa tra la ricerca e la diagnostica [de Jong et al., 2013]. I dati disponibili e la rapida evoluzione delle tecniche non consentono di proporre una specifica piattaforma da utilizzare nella diagnosi prenatale. Le criticità principali sono rappresentate dalle VOUS, dalle varianti di suscettibilità e dalle varianti associate alle patologie ad esordio tardivo, che devono essere interpretate e gestite. E' perciò indispensabile definire un filtro nella lettura e nell'interpretazione dei risultati della CMA. Le strategie utilizzate sono diverse, ma comprendono due approcci principali:

- limitare il potere di risoluzione della piattaforma (filtro ' tecnico ');
- utilizzare un gruppo di esperti (' expert review panel ') a livello ' centrale ' (del singolo laboratorio [Wapner et al., 2012]; a livello nazionale, come in Belgio, [Vanakker et al.,

2014] o nel progetto EACH in UK) non direttamente coinvolti nella gestione clinica del caso, per valutare i risultati e definire le varianti da refertare (filtro ‘interpretativo’).

Nel primo caso viene predisposto un sistema di analisi che consente di avere una risoluzione elevata nelle regioni note per la loro associazione con quadri patologici, mentre la risoluzione è molto più bassa per quanto attiene il resto del genoma (*‘backbone’*) [Hillman et al., 2013; Ahn JW et al., 2014; Callaway et al., 2014]. Questo approccio viene definito *‘targeted’* e, a sua volta, può essere significativamente variabile a seconda della risoluzione scelta dal laboratorio. L’approccio *‘targeted’* ha l’indiscutibile vantaggio di escludere sistematicamente numerose VOUS potenzialmente identificabili.

L’approccio *‘expert review panel’* presenta l’apparente vantaggio di una maggiore flessibilità, a scapito di una possibile interpretazione soggettiva, variabile in base alla composizione del gruppo degli esperti. Ad esso si aggiunge la difficoltà organizzativa e gestionale del sistema. I due approcci possono comunque essere utilizzati in una strategia combinata [Wapner et al., 2012].

E’ evidente perciò che la scelta della piattaforma e della risoluzione da applicare sono particolarmente cruciali. La strategia deve privilegiare il quesito clinico e la proporzionalità tra l’utilità, le incertezze e le complessità dei risultati.

Nei casi in cui l’analisi CMA sia eseguita per caratterizzare un riarrangiamento cromosomico *de novo* diagnosticato con il cariotipo (ad es. un marcatore cromosomico soprannumerario, una traslocazione reciproca), la risoluzione viene scelta opportunamente di volta in volta dal genetista del laboratorio.

Negli altri casi, tenuto conto dei dati scientifici disponibili, si ritiene al momento ragionevole l’impiego di piattaforme *‘targeted’* con un *backbone* risolutivo non superiore a 500 kb. Questo valore rappresenta un opportuno compromesso tra la possibilità di rilevare la maggior parte delle CNV clinicamente significative, limitando il più possibile il riscontro di VOUS [Cooper et al., 2011; Shaffer et al., 2012B; Rooryck et al., 2013].

6. Altri aspetti tecnici ed operativi. Per quanto concerne gli aspetti prettamente analitici, il laboratorio che offra l’analisi CMA prenatale deve garantire il completamento del percorso diagnostico nella fase analitica.

Al momento non sono disponibili dati sufficienti per stabilire quale sia il campione maggiormente idoneo per l’analisi CMA prenatale e, più specificamente, se sia meglio utilizzare cellule del trofoblasto oppure gli amniociti, il DNA estratto direttamente dal tessuto o dopo coltura. I potenziali limiti riguardano la qualità del campione e l’eventuale presenza di mosaicismi placentari. E’ perciò auspicabile che i laboratori che eseguono questa indagine collaborino nella acquisizione di questi dati.

I risultati ottenuti con l’analisi CMA devono sempre essere confermati con altre tecniche molecolari. Deve essere sempre disponibile un campione ematico dei genitori, spesso indispensabile nell’interpretare i risultati ottenuti dall’analisi del feto [Linee Guida per la diagnosi citogenetica SIGU 2013, Note operative citogenetica costituzionale 2013].

Dato che l’analisi parentale potrebbe rilevare la presenza di CNV non presenti nel campione fetale, è necessario ottenere il consenso informato da ciascun genitore, per stabilire a priori i risultati che intendono conoscere e non conoscere (ad es. solo le informazioni relative alla/e CNV fetali, tutte le varianti rilevate, ecc.), e produrre referti separati per ciascun soggetto testato.

Al momento è disponibile un sistema europeo di controllo esterno di qualità relativo all’analisi a-CGH in diagnosi postnatale (*CEQAS: Cytogenetic External Quality Assessment Service*), ma non esiste un analogo sistema per la diagnosi prenatale. Si raccomanda ai laboratori che offrono l’analisi CMA prenatale di partecipare ad almeno questo modulo di VEQ.

Si raccomanda l’avvio di studi a livello nazionale sull’impiego diagnostico dell’analisi CMA con particolare riferimento alla sua utilità clinica, al costo-beneficio, al suo impatto a livello di popolazione, soprattutto per quanto attiene gli aspetti psicologici ed il peso delle ricadute decisionali sulla coppia.

Raccomandazioni

1. Sulla base delle evidenze disponibili non si ritiene al momento che l'analisi CMA debba o possa essere offerta come test di primo livello in epoca prenatale, in sostituzione o in affiancamento del cariotipo. Non sono giustificate, né appropriate le analisi CMA eseguite per ansia materna, età materna ≥ 35 anni, rischio aumentato di aneuploidie cromosomiche in base al test di screening combinato o biochimico, riscontro di soft markers ecografici.
2. Non sono disponibili al momento evidenze sufficienti a supporto della utilità clinica dell'analisi CMA nei feti che mostrano un aumento isolato della NT, in presenza di un cariotipo normale. L'analisi CMA può essere proposta, nei feti con aumento isolato della NT, solo nel contesto di studi sperimentali, approvati dai Comitati Etici, finalizzati a definire l'effettiva utilità clinica del test per questa specifica indicazione. Considerata la peculiarità dei casi estremi, l'analisi CMA è giustificata nei casi di NT $> 5,5$ mm con cariotipo normale.
3. In presenza di una anomalia fetale, come sopra definita, l'analisi CMA può essere presa in considerazione dopo valutazione multidisciplinare da parte del ginecologo e del genetista clinico esperti in medicina prenatale, in un centro di secondo livello. L'indicazione deve derivare dalla valutazione complessiva dal quadro clinico, dalle informazioni scientifiche disponibili, dal rischio connesso all'invasività della tecnica impiegata per l'acquisizione dei tessuti fetali, dall'epoca della gravidanza, dall'utilità dell'indagine nel modificare l'evoluzione della gravidanza, dalle decisioni dei genitori debitamente informati sulle caratteristiche dell'indagine.
4. La complessità della gestione dell'analisi CMA prenatale, dell'interpretazione e della comunicazione dei risultati ne giustifica un uso cauto e ponderato. L'analisi deve essere sempre considerata 'possibile' e non 'necessaria'. La sua integrazione nel percorso della diagnosi prenatale deve essere affidata solo a Centri di documentata esperienza, nei quali operi un'équipe multidisciplinare (ginecologo, genetista clinico, genetista di laboratorio) con competenze nella diagnosi prenatale, in grado di garantire la presa in carico della gravidanza e della coppia. E' altresì opportuna la disponibilità di uno psicologo esperto in diagnosi prenatale.
5. Al momento non è possibile stabilire e sostenere una strategia nazionale di un 'expert review panel'. Pertanto si raccomanda di utilizzare un filtro 'tecnico', mediante un'analisi targeted con una risoluzione del backbone inferiore a quella utilizzata nella diagnosi postnatale. La risoluzione del backbone non deve essere maggiore di 500 kb. Fanno eccezione le situazioni in cui l'indagine sia indicata per caratterizzare un riarrangiamento cromosomico de novo rilevato dal cariotipo, in cui la risoluzione deve essere scelta opportunamente di volta in volta. I risultati dell'analisi devono essere valutati dall'équipe multidisciplinare che ha in carico il caso. La scelta sulla refertazione delle varianti non chiaramente patogenetiche e non correlate al fenotipo fetale in esame deve tenere in considerazione le scelte della coppia, preliminarmente informata in merito ai possibili esiti dell'indagine, e deve essere esplicitata nel consenso informato.
6. Il laboratorio che offre l'analisi CMA prenatale deve essere integrato in un percorso di secondo livello, all'interno del quale operi un'équipe multidisciplinare comprendente un ginecologo esperto in medicina fetale, un genetista clinico ed un genetista di laboratorio esperto nell'analisi CMA. Il laboratorio deve essere in grado di: garantire il completamento del percorso diagnostico nella fase analitica; confermare i risultati con altre tecniche di genetica molecolare; se necessario, confrontarli con l'analisi dei genitori, il cui campione deve sempre essere disponibile. Il Laboratorio deve partecipare ai controlli di qualità già esistenti e possibilmente implementati specificamente per l'analisi prenatale.

Tavolo di lavoro

Membri SIEOG

Giuseppe Cali¹, Mario Lituania², Enrico Periti³, Federico Prefumo⁴, Georgios Rembouskos⁵, Andrea Sciarrone⁶, Giuliana Simonazzi⁷.

Membri SIGU

Francesca Forzano⁸, Mattia Gentile⁹, Antonio Novelli¹⁰, Gioacchino Scarano¹¹, Lorenzo Sinibaldi¹²

Revisione a cura di Bruno Dallapiccola¹³

Revisione medico legale a cura di Anna Aprile¹⁴

1 UOS Medicina Perinatale ed Assistenza alla Nascita AORNAS CIVICO Palermo

2 S.S.D. Fisiopatologia preconcezionale e prenatale E.O. Ospedali Galliera Genova

3 SSD Diagnosi Prenatale, Dipartimento Materno Infantile ASF Firenze

4 Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia A.O. Spedali Civili di Brescia

5 UOC Aziendale Medicina Fetale - ASL BARI, Bari

6 SSCVD di Ecografia e Diagnosi Prenatale ,Azienda Ospedaliera Universitaria ,Città della Salute e della Scienza,Torino

7 Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche Clinica Ostetrica e Medicina dell'Età Prenatale

Policlinico Universitario Sant'Orsola-Malpighi Bologna

8 S.S.D. Genetica Medica E.O. Ospedali Galliera Genova

9 UOC Aziendale Laboratorio Genetica Medica - ASL BARI, Bari

10 UOS di Citogenetica Istituto CSS Mendel,Roma,IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza S.Giov.Rotondo

11 UO Complessa di Genetica Medica Azienda Ospedaliera "Gaetano Rummo" Benevento

12 Istituto CSS Mendel,Roma,IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza S.Giov.Rotondo e Biologia

Molecolare, Citogenetica, Citomorfologia E. e V., Ospedale Belcolle, AUSL Viterbo

13 Direttore Scientifico Ospedale Pediatrico Bambino Gesù' IRCCS,Roma

14 Laboratorio di Bioetica clinica, Dipartimento di Medicina molecolare, Università degli Studi di Padova

Nota 1: le tecniche di *Chromosomal microarray Analysis* si basano sull'ibridazione comparativa del DNA del genoma in esame (paziente) con quello di un genoma di 'controllo'. Le tecniche disponibili comprendono le piattaforme array-CGH, basate su BAC o su oligonucleotidi, nelle quali vengono ibridati piccoli frammenti di sequenze nucleotidiche, e le piattaforme SNP-array, nelle quali vengono ibridati sonde specifiche per polimorfismi a singolo nucleotide (SNP).

Nota 2: nelle piattaforme di a-CGH cosiddetta "*targeted*", le sonde sono più densamente rappresentate nelle regioni associate alle patologie genomiche note, ed hanno quindi una distribuzione disomogenea e "mirata".

Nota 3: nelle piattaforme di a-CGH cosiddetta "*targeted*", le sonde distribuite in modo da coprire in maniera omogenea le regioni non associate a patologie genomiche note , ad un intervallo correlato alla risoluzione media della piattaforma utilizzata, costituiscono la "spina dorsale" dell'array ("*backbone*").

Allegato 1
consenso informato

Principali Riferimenti Bibliografici

- Ahn JW, Bint S, Irving MD, Kyle PM, Akolekar R, Mohammed SN, Ogilvie CM. 2014. A new direction for prenatal chromosome microarray testing: software-targeting for detection of clinically significant chromosome imbalance without equivocal findings. *PeerJ PrePrints* 2:e221v1 <http://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.221v1>.
- Bernhardt BA, Soucier D, Hanson K, Savage MS, Jackson L, Wapner RJ. 2013. Women's experiences receiving abnormal prenatal chromosomal microarray testing results. *Genet Med* 15:139-45.
- Bilardo CM, Müller MA, Pajkrt E, Clur SA, van Zalen MM, Bijlsma EK. 2007. Increased nuchal translucency thickness and normal karyotype: time for parental reassurance. *Ultrasound Obstet Gynecol* 30:11-8.
- Bilardo CM, Timmerman E, Pajkrt E, van Maarle M. 2010. Increased nuchal translucency in euploid fetuses-what should we be telling the parents? *Prenat Diagn* 30:93-102.
- Brady PD, Delle Chiaie B, Christenhusz G, Dierickx K, Van Den Bogaert K, Menten B, Janssens S, Defoort P, Roets E, Sleurs E, Keymolen K, De Catte L, Deprest J, de Ravel T, Van Esch H, Fryns JP, Devriendt K, Vermeesch JR. 2013. A prospective study of the clinical utility of prenatal chromosomal microarray analysis in fetuses with ultrasound abnormalities and an exploration of a framework for reporting unclassified variants and risk factors. *Genet Med* doi:10.1038/gim.2013.168.
- Callaway JL, Huang S, Karampetsou E, Crolla JA. 2014. Perspective on the technical challenges involved in the implementation of array-CGH in prenatal diagnostic testing. *Mol Biotechnol* doi: 10.1007/s12033-013-9710-4.
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, Abdel-Hamid H, Bader P, McCracken E, Niyazov D, Leppig K, Thiese H, Hummel M, Alexander N, Gorski J, Kussmann J, Shashi V, Johnson K, Rehder C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE. 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 43:838-46.
- Crolla JA, Wapner R, Van Lith JM. 2014. Controversies in prenatal diagnosis 3: should everyone undergoing invasive testing have a microarray? *Prenat Diagn* 34:18-22.
- de Jong A, Dondorp WJ, Macville MV, de Die-Smulders CE, van Lith JM, de Wert GM. 2104. Microarrays as a diagnostic tool in prenatal screening strategies: ethical reflection. *Hum Genet* 133:163-72.
- de Wit MC, Srebniak MI, Govaerts LC, Van Opstal D, Galjaard RJ, Go AT. 2014. Additional value of prenatal genomic array testing in fetuses with isolated structural ultrasound abnormalities and a normal karyotype: a systematic review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol* 43:139-46.
- Duclos A, Charbonnier F, Chambon P, Latouche JB, Blavier A, Redon R, Frébourg T, Flaman JM. 2011. Pitfalls in the use of DGV for CNV interpretation. *Am J Med Genet* 155A:2593-6.
- Evangelidou P, Alexandrou A, Moutafi M, Ioannides M, Antoniou P, Koumbaris G, Kallikas I, Velissariou V, Sismani C, Patsalis PC. 2013. Implementation of high resolution whole genome array CGH in the prenatal clinical setting: advantages, challenges, and review of the literature. *Biomed Res Int* doi: 10.1155/2013/346762.
- Ganesamoorthy D, Bruno DL, McGillivray G, Norris F, White SM, Adroub S, Amor DJ, Yeung A, Oertel R, Pertile MD, Ngo C, Arvaj AR, Walker S, Charan P, Palma-Dias R, Woodrow N, Slater HR. 2013. Meeting the challenge of interpreting high-resolution single nucleotide polymorphism array data in prenatal diagnosis: does increased diagnostic power outweigh the dilemma of rare variants? *BJOG* 120:594-606.
- Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, Togneri FS, James N, Maher EJ, Meller CH, Williams D, Wapner RJ, Maher ER, Kilby MD. 2013. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 41:610-20.
- Huang J, Poon LC, Akolekar R, Choy KW, Leung TY, Nicolaides KH. 2014. Is high fetal nuchal translucency associated with submicroscopic chromosomal abnormalities by array CGH? *Ultrasound Obstet Gynecol* doi: 10.1002/uog.13384.
- Klugman S, Suskin B, Spencer BL, Dar P, Bajaj K, Powers J, Reichling J, Wasserman D, Dolan SM, Merkatz IR. 2013. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis: report of first 6 months in clinical practice. *J Matern Fetal Neonatal Med* PMID:24147763.
- Linea Guida Gravidanza Fisiologica. Ministero della Salute, 2011, pp.121-8.
- Linee Guida per la diagnosi citogenetica 2013, SIGU.
- Linee Guida per la diagnosi citogenetica, sezione Note operative citogenetica costituzionale 2013, SIGU.
- Linee Guida Società Italiana di Ecografia Ostetrico Ginecologica. 2010.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biasecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler
- Raccomandazioni congiunte SIGU (Società Italiana Genetica Umana) e SIEOG (Società Italiana di Ecografia Ostetrico-Ginecologica)

- EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. 2010. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86:749-64.
- NHS Fetal Anomaly Screening Programme. Programme Statement: Normal variant screening in pregnancy. 2010. http://fetalanomaly.screening.nhs.uk/fetalanomalyresource/images/stories/Downloads/2.4.3_Normal_variants/normal_variant_statement_%20final_2010.pdf
- Novelli A, Grati FR, Ballarati L, Bernardini L, Bizzoco D, Camurri L, Casalone R, Cardarelli L, Cavalli P, Ciccone R, Clementi M, Dalprà L, Gentile M, Gelli G, Grammatico P, Malacarne M, Nardone AM, Pecile V, Simoni G, Zuffardi O, Giardino D. Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012 Jan 20. doi: 10.1002/uog.11092.
- Riggs ER, Jackson L, Miller DT, Van Vooren S. 2012. Phenotypic information in genomic variant databases enhances clinical care and research: the International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium experience. *Hum Mutat* 33:787-96.
- Riggs ER, Wain KE, Riethmaier D, Savage M, Smith-Packard B, Kaminsky EB, Rehm HL, Martin CL, Ledbetter DH, Faucett WA. 2013. Towards a universal clinical genomics database: the 2012 International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium Meeting. *Hum Mutat* 34:915-9.
- Rooryck C, Toutain J, Cailley D, Bouron J, Horovitz J, Lacombe D, Arveiler B, Saura R. 2013. Prenatal diagnosis using array-CGH: a French experience. *Eur J Med Genet* 56:341-5.
- Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW, Ravnan JB, Torchia BS, Ballif BC, Rosenfeld JA. 2012A. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenat Diagn* 32:976-85.
- Shaffer LG, Dabell MP, Rosenfeld JA, Neill NJ, Ballif BC, Coppinger J, Diwan NR, Chong K, Shohat M, Chitayat D. 2012B. Referral patterns for microarray testing in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 32:344-50.
- Shaffer LG, Rosenfeld JA, Dabell MP, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW, Ravnan JB, Torchia BS, Ballif BC, Fisher AJ. 2012C. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. *Prenat Diagn* 32:986-95.
- Souka AP, von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonke JD, Nicolaidis KH. 2005. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 192:1005-21.
- Vanakker O, Vilain C, Janssens K, Van der Aa N, Smits G, Bandelier C, Blaumeiser B, Bulk S, Caberg JH, De Leener A, De Rademaeker M, de Ravel T, Desir J, Destree A, Dheedene A, Gaillez S, Grisart B, Hellin AC, Janssens S, Keymolen K, Menten B, Pichon B, Ravoet M, Revencu N, Rombout S, Staessens C, Van Den Bogaert A, Van Den Bogaert K, Vermeesch JR, Kooy F, Sznajer Y, Devriendt K. 2014. Implementation of genomic arrays in prenatal diagnosis: The Belgian approach to meet the challenges. *Eur J Med Genet* 57:151-6.
- Vetro A, Bouman K, Hastings R, McMullan DJ, Vermeesch JR, Miller K, Sikkema-Raddatz B, Ledbetter DH, Zuffardi O, van Ravenswaaij-Arts CM. 2012. The introduction of arrays in prenatal diagnosis: a special challenge. *Hum Mutat* 33:923-9.
- Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. 2012. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 367:2175-84.

INFORMATIVA PER L'INDAGINE MEDIANTE MICROARRAY CROMOSOMICI IN EPOCA PRENATALE

Che cosa è l'analisi con microarray cromosomici? Cosa si può individuare con i microarray cromosomici?

L'analisi con microarray cromosomici (CMA, Chromosome Microarray Analysis) è una tecnica in grado di analizzare contemporaneamente tutti i cromosomi in modo maggiormente approfondito rispetto al cariotipo fetale standard: consente di identificare alterazioni cromosomiche molto piccole, che non possono essere evidenziate con la analisi classica del cariotipo fetale.

La metodica, tuttavia, come meglio sotto esplicitato, presenta dei limiti e delle problematiche interpretative per cui il suo utilizzo va attentamente valutato, specie in epoca prenatale.

1

Quali sono le indicazioni alla CMA?

Prima della nascita le indicazioni più appropriate e frequenti per l'utilizzo di questa metodica di indagine sono:

1. la necessità di caratterizzare in maniera più approfondita alcune anomalie cromosomiche fetali;
2. il riscontro alla ecografia di anomalie strutturali del feto;
3. un iposviluppo fetale con insorgenza precoce da causa incerta.

Quali sono i limiti di questa metodica diagnostica ?

Al pari di qualsiasi metodica diagnostica, anche la CMA presenta dei limiti. In particolare non sono in genere evidenziabili:

1. riarrangiamenti cromosomici bilanciati (es. traslocazioni reciproche, inversioni);
2. mosaicismi cromosomici scarsamente rappresentati (< 30%);
3. varianti/anomalie cromosomiche non evidenziabili con la piattaforma di microarray utilizzata;
4. patologie genetiche non causate da duplicazioni/delezioni cromosomiche.

L'eventuale contaminazione materna (contemporanea presenza nel campione di cellule del feto e della madre) può inficiare l'attendibilità del risultato: in alcuni casi è opportuno escludere una eventuale contaminazione del campione fetale con cellule materne. Tale indagine richiede il confronto del DNA fetale con il DNA materno.

La presenza di sbilanciamenti può rendere necessario l'uso di tecniche aggiuntive per caratterizzare il riarrangiamento e può rendere necessario estendere l'analisi ad entrambi i genitori ai fini di una corretta interpretazione del risultato.

Per questi motivi è opportuno che il campione fetale sia sempre essere accompagnato da un campione ematico dei genitori, che viene utilizzato solo nei casi in cui sia necessario effettuare una comparazione tra il profilo del feto e quello parentale. In questi casi è in genere indispensabile più tempo per le conclusioni diagnostiche.

In rari casi, gli esiti dell'esame potrebbero rilevare la non corrispondenza biologica tra il DNA della coppia e quello fetale (ad esempio in caso di fecondazione eterologa). Delle informazioni non corrette sul ruolo biologico della coppia potrebbero impedire una corretta interpretazione del test.

I risultati forniti dalla metodica sono sempre facili da interpretare ?

L'analisi dei risultati può talora essere problematica, poiché allo studio del genoma mediante microarray cromosomici possono risultare varianti (chiamate tecnicamente Variazioni del Numero di Copie; CNV) di non facile/immediata interpretazione, quali:

- ✓ varianti/CNV rare, per le quali non esistono ancora sufficienti conoscenze per comprendere se siano benigne o potenzialmente associate a patologie di qualche tipo. Queste varianti vengono definite VOUS (varianti di incerto significato);
- ✓ varianti/CNV a significato patogenico, ma per le quali non è certa l'esistenza di un nesso con la condizione per la quale è stata indicata l'analisi;
- ✓ varianti/CNV associate a patologie ad espressività variabile e/o penetranza incompleta (per cui la malattia eventualmente associata al riarrangiamento evidenziato può non manifestarsi oppure manifestarsi con gravità variabile e non prevedibile) oppure a suscettibilità a malattie complesse;
- ✓ varianti varianti/CNV che hanno implicazioni cliniche non correlate con l'indicazione all'analisi (es. patologie ad insorgenza tardiva, predisposizione all'insorgenza di tumori, stato di portatore sano di malattie a trasmissione recessiva etc.), occasionalmente a trasmissione familiare.

2

Quali sono le caratteristiche tecniche principali della metodica che verrà impiegata ?

Allo scopo di ridurre la possibilità di individuare varianti di significato incerto, il test verrà effettuato utilizzando dei filtri tali da ricercare principalmente sbilanciamenti di regioni responsabili di sindromi da microdelezione/microduplicazione e/o contenenti geni-malattia: in queste regioni 'critiche' la risoluzione è di circa 100-200 Kb; tutte le altre regioni del genoma saranno comunque analizzate, ma con un filtro di 500 kb.

Quando sarà disponibile l'esito del test ?

Entro circa 10 giorni dall'estrazione del DNA dalle cellule fetali (coltura cellulare, frustoli di villi coriali, amniociti) l'esito del test sarà disponibile e verrà consegnato ai genitori nel corso di una consulenza genetica.

In casi particolari sono peraltro possibili prolungamenti del tempo necessario a fornire una risposta.

CONSENSO INFORMATO

ALL' ESECUZIONE DEL TEST MEDIANTE MICROARRAY CROMOSOMICI (CMA) SU CAMPIONE DI DNA FETALE

Il/La/I sottoscritto/a/i Sig.ra _____, nata a _____ il _____

e Sig. _____, nato a _____, il _____

in qualità di _____

DICHIARA/DICHIARANO

- di aver discusso con il Dr. _____ nell'ambito di una Consulenza genetica, le caratteristiche, le potenzialità e i limiti dell'esame prenatale basato sulla tecnica di microarray;
- di aver avuto la possibilità di rivolgere tutte le domande ritenute opportune;
- di aver ricevuto risposte esaurienti e comprensibili;
- di ritenere tutte le informazioni ricevute (come da **INFORMATIVA PER L'INDAGINE MEDIANTE MICROARRAY CROMOSOMICI IN EPOCA PRENATALE** allegata al presente modulo di consenso) appropriate ed esaustive.

Pertanto, sulla base delle informazioni ricevute

acconsentono

non acconsentono

all'esecuzione del test e al prelievo (per eventuale estensione dell'analisi) di un loro campione di sangue periferico.

Il/La/I sottoscritto/a/i dichiara/dichiarano inoltre di voler ricevere informazioni:

su tutte le varianti/CNV evidenziate

solo su varianti/CNV a chiaro significato patogeno correlate alla indicazione per l'analisi

per tutte le varianti/CNV a chiaro significato patogeno a prescindere dalla indicazione per la analisi

su _____

Il/La/I sottoscritto/a/i dichiara/dichiarano inoltre di:

Volere NON volere che il materiale biologico possa essere eventualmente utilizzato in forma anonima per studi o ricerche

Volere NON volere rendere partecipe dei risultati il Dott. _____

Il/La/I sottoscritto/a/i dichiara/dichiarano che quanto sopra corrisponde a verità e si impegnano a comunicare tempestivamente ogni eventuale cambiamento di opinione in merito.

Firma _____

Firma _____

acconsentono

non acconsentono

al trattamento, in forma codificata, dei propri dati personali, sensibili e genetici ai sensi del D. lgs 196/2003 e alla conservazione del materiale biologico residuo, in forma codificata, per un anno solare, successivo a quello dell'esame.

Firma _____

Firma _____

Firma e timbro dello specialista che ha raccolto il consenso informato _____

Data _____