



Documento di indirizzo sull'impiego di indagini prenatali non invasive

Premessa

La diagnosi prenatale delle malattie monogeniche e delle aneuploidie è attualmente eseguita nel I-II trimestre di gravidanza attraverso procedure di prelievo invasive (DPI), quali la villocentesi e l'amniocentesi, associate tuttavia ad un rischio di perdita fetale stimato intorno allo 0,5-1%.

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

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

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

Una svolta fondamentale nella NIPD si ebbe quando YMD Lo nel 1997 descrisse per la prima volta la diagnosi del sesso fetale attraverso l'analisi del cfDNA (cell-free DNA) estratto da plasma materno, in un gruppo di donne in gravidanza con feto di sesso maschile.

La scoperta che, nel corso della gravidanza, nel plasma materno è presente DNA libero fetale (cffDNA) insieme con lo sviluppo di tecnologie avanzate, in special modo nel campo della NGS (Next Generation Sequencing) ha aperto nuove prospettive per lo sviluppo di protocolli di NIPT (Non Invasive Prenatal Testing).

Studi successivi hanno definito in dettaglio le caratteristiche del cffDNA. Il DNA fetale costituisce una frazione variabile tra il 3-20% del DNA totale extracellulare rilevabile nel circolo materno, ha una concentrazione che tende ad aumentare progressivamente nel corso della gravidanza ed in presenza di aneuploidie fetali; esso è presente sotto forma di frammenti di dimensioni ridotte rispetto a quelli che costituiscono la frazione materna.

La placenta e, in particolare, le cellule del sinciziotrofoblasto in apoptosi, sono la fonte principale di cffDNA, il quale è poi completamente rimosso dalla circolazione materna, probabilmente attraverso l'escrezione renale, entro poche ore dal parto.

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



Le applicazioni principali della NIPT su cfDNA sono:

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

Mentre per le malattie monogeniche l'evoluzione di tali tecniche ed il loro trasferimento nella pratica clinica ha un andamento scarsamente progressivo, la NIPT per la diagnosi delle più frequenti anomalie cromosomiche di numero ha avuto una evoluzione incontenibile, principalmente dovuta alla spinta impressa dagli interessi commerciali.

Già dall'ottobre del 2011, negli USA, l'uso del test è entrato nella pratica clinica ed è reperibile in commercio. Le aziende che hanno sviluppato e commercializzano tali sistemi sono essenzialmente:

- Sequenom (Maternity T21 Plus) utilizza piattaforma Illumina e metodologia MPSS (Massive parallel shogun sequencing) per diagnosi di trisomie 13-18-21, determinazione del sesso e aneuploidie dei cromosomi sessuali;
- Verinata Health (Verifi) utilizza piattaforma Illumina e metodologia MPSS (Massive parallel shogun sequencing) per diagnosi di trisomie 13-18-21, determinazione del sesso e aneuploidie dei cromosomi sessuali;
- Ariosa diagnostics (Harmony prenatal test) utilizza piattaforma Illumina e tecnologia DANSR di sequenziamento target per diagnosi di trisomie 13-18-21, determinazione del sesso e aneuploidie dei cromosomi sessuali;
- Natera (Panorama prenatal test) utilizza piattaforma Illumina e tecnologia di sequenziamento NGS di polimorfismi SNP su sequenze target per diagnosi di trisomie 13-18-21, determinazione del sesso, aneuploidie dei cromosomi sessuali e triploidie.
- BGI (NIFTY) utilizza piattaforma Illumina e metodologia MPSS per diagnosi di trisomie 13-18-21, determinazione del sesso e aneuploidie dei cromosomi sessuali

Il trasferimento della NIPT nella pratica clinica ed il suo ruolo nella diagnosi delle anomalie cromosomiche ha suscitato un profondo dibattito alimentato dallo sviluppo di decine di trials clinici per definirne la consistenza.

I risultati di tali trial possono essere così riassunti:

- Tutti gli studi indicano che i risultati sono molto promettenti.
- I dati in letteratura riguardano principalmente lo screening per la trisomia 21 (T21) nella popolazione di donne ad alto rischio, per la quale il test presenta l'attendibilità maggiore con



sensibilità e specificità superiori al 99% (in particolare 98,6-100% riferita ai falsi negativi e 99,7-100% ai falsi positivi).

- Un'attendibilità di poco inferiore è stata riportata per la trisomia del cromosoma 18 (T18, sensibilità 97,4%), sensibilmente inferiore per la trisomia del cromosoma 13 (T13, sensibilità 83,3%), mentre dati meno consistenti sono stati ottenuti per le aneuploidie dei cromosomi sessuali (aneuploidie X 60-100%).

Pertanto il test presenta ancora alcuni limiti:

1. la sensibilità e la specificità non sono così elevate per tutti i cromosomi e questo sarebbe principalmente dovuto alla variabilità intercromosomica nel contenuto di basi CG. Pertanto la stima del rischio è al momento limitata alle aneuploidie su elencate. Il 50% delle anomalie identificate di routine con la diagnosi prenatale invasiva (DPI) non viene di conseguenza identificata.
2. le performances descritte si riferiscono a popolazioni di gestanti ad alto rischio: è ragionevole pensare che il valore predittivo negativo (VPN) e il valore predittivo positivo (VPP) di questi test risultino inferiori in popolazioni di gestanti a basso rischio. Studi su popolazioni a basso rischio sono in corso e faranno chiarezza circa questi aspetti.
3. Non distingue tra diversi tipi di aneuploidie (T21 libera, da traslocazione cromosomica o mosaicismo alto).
4. La presenza di falsi positivi e negativi, dovuti principalmente a mosaicismi fetto-placentari o a gravidanze gemellari in cui uno dei gemelli sia stato riassorbito nelle prime settimane di gestazione (vanishing twins), malattie metastatiche materne e condizioni di mosaicismo cromosomico nella madre, rende il test non diagnostico. Nei casi positivi è quindi fondamentale una conferma con il test invasivo, preferenzialmente attraverso prelievo di liquido amniotico, per evitare di incorrere in un mosaicismo fetto-placentare, che possa avere causato il risultato riscontrato.
5. Il risultato del test è condizionato dalla quantità percentuale di DNA fetale presente nel plasma che deve essere superiore al 5%; quantità inferiori possono esitare in risultati falsi negativi. La quantità relativa di DNA fetale risulta ridotta in particolari condizioni quali età gestazionale inferiore alla 10^a settimana ed un indice di massa corporea elevato.
6. Nei casi di gravidanza gemellare non è possibile distinguere la condizione del singolo feto.

Per tutti questi motivi il test non invasivo può essere collocato al momento all'interno del percorso degli screening prenatali nelle coppie ad alto rischio, preceduto e seguito da consulenza genetica, con l'intento di aumentare in maniera considerevole l'efficienza diagnostica del percorso "combinato". Per questa ragione è talvolta indicato con la sigla NIPS (non invasive prenatal screening). In questo contesto la sua rilevanza è consistente come ausilio agli altri test ecografici e biochimici, che svolgono comunque una loro funzione non sostituibile. In particolare potrebbe rivelarsi di particolare utilità nell'evitare la diagnosi invasiva nei casi in cui lo screening prenatale tradizionale definisse un rischio elevato dovuto a un risultato "falso positivo", evento che si verifica nel 5% dei casi e quando la coppia a rischio elevato fosse contraria all'esecuzione di test invasivi.

Le maggiori società scientifiche americane (ACOG, ACMG, ISPD, NSGC, etc.) nonché il Californian Technology Assessment Forum, hanno nell'ultimo anno assunto posizioni per lo più concordanti sulla validità clinica, i limiti, gli aspetti etici ed economici e sul significato o ruolo



stesso del test che tengono conto dei dati su riportati. Tutte le Società approvano l'offerta di NIPT sebbene di fatto non la raccomandino attivamente.

Parere

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

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

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

- determinazione del sesso fetale applicata alle gravidanze a rischio per malattie genetiche X-linked, al fine di evitare DPI nei feti di sesso femminile, e per Iperplasia surrenale congenita (CAH) a fini terapeutici;
- nella determinazione del genotipo fetale RHD (Rh blood group, D antigen) in donne Rh D-negative a rischio per malattia emolitica del neonato
- nelle malattie autosomiche dominanti di origine paterna e in quelle *de novo* il cui sospetto clinico viene posto in sede ecografica (es. alcune condrodiplosie);

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

- autosomiche recessive;
- X-linked;
- dominanti di origine materna;

Per quanto attiene l'utilizzo di NIPT per la ricerca di aneuploidie, questo si ritiene appropriato solo in particolari condizioni di seguito specificate:

- Il ruolo del test è aumentare il potere predittivo degli screening prenatali (ecografici e biochimici) nelle gravidanze ad alto rischio di aneuploidie (età materna avanzata, anomalie ecografiche e biochimiche deponenti per un rischio aumentato); pertanto si colloca come test di screening avanzato per la valutazione del rischio di trisomia 21, 18 e 13 (per le quali i dati di letteratura sono più consistenti). In questo contesto concorre nel ridurre il ricorso alla diagnosi prenatale invasiva (DPI).
- Il test NIPT non è diagnostico, pertanto non è sostitutivo della diagnosi prenatale invasiva, né allo scopo di escludere tali patologie né tantomeno allo scopo di diagnosticarle. Pertanto in caso di risultato patologico questo deve essere confermato con il test invasivo (amniocentesi). In caso di risultato negativo deve essere sottolineato che il risultato, grazie all'elevato VPN, è relativamente affidabile, ma che a causa della fisiologia placentare, tale risultato potrebbe non riflettere un reale stato di normalità del feto, anche per il limitato tipo di anomalie cromosomiche che sono oggetto del test (T21, T18 e T13).
- Il test può essere proposto nei casi sopra menzionati ma sempre con il supporto di consulenza genetica, durante la quale i limiti ed i benefici dell'esame devono essere chiaramente esposti. In particolare la consulenza genetica può essere di grande ausilio nei casi in cui l'attitudine della coppia sia orientata verso un rifiuto dell'indagine invasiva. La



semplicità di accesso, attraverso un semplice prelievo venoso, rende il test molto popolare ed un uso improprio o un abuso molto probabile. Pertanto è compito del consulente genetista individuare i casi in cui esso è appropriato e rendere questo concetto chiaro ai richiedenti.

Le informazioni della consulenza pretest devono includere:

1. Il test NIPT non è un test di routine ma può essere una scelta della coppia dopo la consulenza genetica;
2. NIPT non è un test diagnostico, ma come test di screening presenta sensibilità e specificità elevate;
3. vantaggi rispetto allo screening su siero materno
 - detection rate più alta,
 - alto valore predittivo negativo in particolare per T21 e T18 (importante per chi vuole evitare DPN invasiva),
 - bassa percentuale di falsi positivi,
 - è meno dipendente dall'età gestazionale rispetto agli screening tradizionali (si può accedere dalla 11 settimana e per tutta la gravidanza);
4. il test studia solo le trisomie più frequenti, che rappresentano il 50% della patologia cromosomica fetale clinicamente rilevante, e non dà altre informazioni genetiche sul feto;
5. una accurata storia familiare deve essere ottenuta prima del test per valutare l'appropriatezza dell'approccio diagnostico;
6. un test negativo non assicura assenza di patologia;
7. un test positivo necessita di conferma diagnostica con approccio invasivo (amniocentesi);
8. la quantità di plasma fetale può essere insufficiente all'esecuzione del test. Il rischio di fallimento dell'esame è di circa 4-5%;
9. il test NIPT non sostituisce la DPI (con amniocentesi o villocentesi) che deve rimanere una opzione percorribile
10. in caso di anomalie ecografiche fetali resta indicata la DPI.

La consulenza genetica post-test è raccomandata in caso di esito positivo. In questi casi la necessità di conferma con test invasivo deve essere fortemente rimarcata e raccomandata.

In caso di esito negativo dovrebbe essere spiegato chiaramente che il test non è diagnostico e che esiste un rischio residuo di patologia. Deve essere fornita anche una consulenza in caso di test "non informativo", includendo, se appropriato, anche la possibilità di una DPI.

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

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



Conclusioni

Lo studio del cfDNA, se utilizzato come test di screening avanzato per la valutazione del rischio di trisomia 21, 18 e 13 in donne ad alto rischio, rappresenta un approccio sicuro ed efficace ed un miglioramento nel percorso della gravidanza fisiologica e di conseguenza il suo uso nelle condizioni indicate, si ritiene appropriato.

Nelle pazienti che non presentano un rischio aumentato, il test NIPT è considerato molto promettente per il futuro ma al momento non sono ancora disponibili trial di validazione consistenti. Poiché la tecnologia è in continua evoluzione si presuppone che, in un futuro prossimo, la capacità predittiva dei test non invasivi tenderà ad aumentare. La raccolta di un numero sempre più ampio di dati e la disponibilità di nuovi trial clinici contribuiranno inoltre ad una loro più accurata valutazione, specialmente in termini di falsi positivi e falsi negativi, VPP e VPN, e di conseguenza cambieranno le indicazioni alla loro esecuzione. Pertanto la Società Italiana di Genetica Umana si impegna ad aggiornare questo documento con cadenza annuale o ogniqualvolta i progressi rendano l'attuale documento obsoleto.

Il test NIPT, in quanto erogato prevalentemente dal settore privato, e perciò a totale carico della paziente, introduce un aspetto di discriminazione nel trattamento sanitario che si auspica possa a breve essere corretto attraverso il suo inserimento, se pur con le dovute limitazioni, tra i test offerti dal Sistema Sanitario Nazionale.

Documento elaborato dalla Commissione SIGU composta da:

Maria Cristina Rosatelli (Coordinatore)

Faustina Lalatta

Elisabetta Lenzini

Antonio Novelli

Chiara Pescucci

Alessandra Renieri

Gabriella Restagno

Gioacchino Scarano