



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 06/6808142 - Tel. 06/6875119 - C/C postale N. 20857009

Uso appropriato delle tecniche di CMA (Chromosomal Microarray Analysis) nella diagnosi prenatale

Le seguenti Raccomandazioni Congiunte SIGU (*Società Italiana Genetica Umana*) e SIEOG (*Società Italiana di Ecografia Ostetrico-Ginecologica*) sostituiscono le precedenti del 2014

Sommario

<i>Premessa</i>	3
1. <i>Finalità delle indagini prenatali e ambito di applicazione</i>	4
2. <i>Anomalie ecografiche fetali</i>	5
3. <i>Translucenza nucale</i>	5
4. <i>Criticità e aspetti organizzativo gestionali</i>	7
5. <i>Fase analitica</i>	7
6. <i>Altri aspetti tecnici ed operativi</i>	8
Raccomandazioni	10
<i>Bibliografia</i>	11
Appendice 1 <i>Utilità clinica e resa diagnostica della ricerca di CNV patogenetiche nelle gravidanze a basso rischio</i>	14
Appendice 2 <i>Studio collaborativo del GdL SIGU Citogenetica/genomica sull'offerta di diagnosi prenatale mediante CMA (Chromosomal Microarray Analysis)</i>	17
<i>Glossario e abbreviazioni</i>	19
<i>Allegati 1-4 facsimile informative e consensi informati</i>	21

Approvato dai rispettivi Consigli Direttivi SIGU e SIEOG, maggio 2017

Tavolo di lavoro

Membri SIEOG

Giuseppe Calì¹, Enrico Periti³, Federico Prefumo⁴, Georgios Rembouskos⁵, Giuseppe Rizzo⁸, Andrea Sciarrone⁶,

Membri SIGU

Mattia Gentile⁹, Daniela Giardino², Francesca Romana Grati⁷, Antonio Novelli¹⁰, Gioacchino Scarano¹¹, Lorenzo Sinibaldi¹²

Coordinatore del tavolo di Lavoro: Antonio Novelli

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 Laboratorio di Citogenetica Medica, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano

3 SSD Diagnosi Prenatale, Dipartimento Materno Infantile, USL Toscana Centro - Firenze

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

5 UOC Aziendale Medicina Fetale - ASL BARI, Bari

6 SSVD di Ecografia Ostetrica e Ginecologica e Diagnosi Prenatale, Azienda Ospedaliera Universitaria, Città della Salute e della Scienza, Torino

7 Unità di Genetica Medica e Citogenetica, TOMA Advanced Biomedical Assays S.p.A, Busto Arsizio (Varese)

8 Dipartimento di Ginecologia e Ostetricia, Università degli Studi *Tor Vergata*, Roma

9 UOC Aziendale Laboratorio Genetica Medica - ASL BARI, Bari

10 UOC. Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, Roma

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

12, Laboratorio di Genetica Medica, 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 (a-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 malattie 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 omogeneamente le regioni non associate alle malattie genomiche note, ad un intervallo correlato alla risoluzione media della piattaforma utilizzata, costituiscono la "spina dorsale" dell'array ("*backbone*").

Premessa

Nell'ultimo decennio l'analisi cromosomica supportata da tecniche di genetica molecolare e tecniche di microarray genomici (*Chromosomal Microarray Analysis, CMA*) ha integrato e, in specifici casi, sostituito il cariotipo convenzionale nell'identificazione degli sbilanciamenti correlati alla disabilità intellettiva isolata o sindromica, compresi alcuni fenotipi a segregazione "mendeliana" [Miller et al., 2010; Linee Guida SIGU 2013; E.C.A. – European Cytogeneticists Association, Newsletter No.29, January 2012].

L'utilizzo della tecnica CMA nella diagnosi prenatale è tuttora oggetto di dibattito, che trova molti riscontri nella letteratura biomedica, nella pubblicazione dei risultati di CMA su svariate casistiche, che consentono di valutare l'utilità clinica di tali analisi ed il loro impatto nella gestione e nella presa in carico della gravidanza. Infatti, se da un lato la tecnica permette di identificare le basi biologiche di molte patologie e di offrire una consulenza genetica mirata, in particolare a fronte della caratterizzazione di anomalie riscontrate al cariotipo fetale (riarrangiamenti strutturali insorti *de novo* apparentemente bilanciati, riarrangiamenti strutturali sbilanciati, marcatori cromosomici soprannumerari (ESACs) o difetti strutturali eco-evidenziati [Warburton et al., 1991; Wapner et al., 2012, Shaffer et al., 2012B], dall'altro il suo utilizzo può presentare una serie di problemi nel contesto prenatale, ad esempio per la scarsità dei dati clinici disponibili (per lo più ecografici), per la lunghezza dei tempi necessari a completare l'iter diagnostico e per le difficoltà che può avere la coppia nel prendere decisioni sull'evoluzione della gravidanza. A queste ragioni si aggiunge la limitata conoscenza degli effetti fenotipici di numerose variazioni del numero di copie del genoma (*Copy Number Variations, CNV*). L'impiego diagnostico prenatale della CMA può infatti risultare critico soprattutto nei casi in cui si identifichino CNV con effetti funzionali e clinici non definiti (*Variant Of Uncertain Significance, VoUS*). Le criticità inerenti l'utilizzo prenatale dei microarray genomici, sia dal punto di vista tecnico che dell'impatto psicologico dei risultati sull'emotività e la capacità decisionale della coppia, sono state ampiamente valutate e discusse a livello internazionale [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; Werner-Lin et al., 2016, 2017].

Il continuo sviluppo scientifico/tecnologico e la necessità di individuare percorsi di appropriatezza diagnostica aggiornati, rendono opportuno, a distanza di due anni, l'aggiornamento del documento della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) e della Società Italiana di Ecografia Ostetrico-Ginecologica (SIEOG) circa l'applicazione della CMA nella diagnosi prenatale.

1. Finalità delle indagini prenatali e ambito di applicazione.

Le indagini prenatali hanno due principali finalità:

- lo screening della sindrome di Down e delle altre aneuploidie cromosomiche, dei difetti congeniti e dei difetti della crescita;
- la diagnosi di specifiche patologie, come le aberrazioni cromosomiche associate ad anomalie ecografiche e/o lo studio di specifiche malattie genetiche ad eredità mendeliana.

Il primo gruppo di indagini comprende gli accertamenti proposti nella maggior parte delle gravidanze; il secondo riguarda indagini mirate, indicate solo nelle gravidanze che presentano rischi specifici.

Sono stati pubblicati numerosi studi in diagnosi prenatale nei quali la CMA è stata utilizzata in base a varie indicazioni, ad esempio dopo un test di screening biochimico suggestivo di aumento del rischio per la sindrome di Down, o per un'età materna ≥ 35 anni, o per ansia materna, o per un approfondimento diagnostico successivo al riscontro di anomalie ecografiche e/o cromosomiche nel feto, non integralmente caratterizzabili con l'analisi cromosomica standard. Il confronto dei risultati di questi studi presenta un primo limite legato alle piattaforme utilizzate, che sono diverse per tipologia (*targeted*, cioè a risoluzione differenziata, maggiore nelle regioni genomiche in precedenza associate a specifiche condizioni patologiche, rispetto a *whole-genome*, in cui l'intero genoma è analizzato alla stessa risoluzione) e/o per potere di risoluzione [Callaway et al., 2014; Chen et al., 2017]. Un secondo limite è la non univoca e disomogenea interpretazione attribuita alle CNV. Le CNV possono essere classificate in *benigne*, *probabilmente benigne*, a *significato incerto* (VoUS), *probabilmente patogenetiche* e *patogenetiche*. Possono originare *de novo* oppure segregare da un genitore.

Le CNV patogenetiche possono associarsi ad una significativa variabilità fenotipica ed avere penetranza incompleta. Possono anche essere individuate CNV considerate "*patogenetiche*" o "*probabilmente patogenetiche*", ma non correlate alle indicazioni per cui era stato richiesto la CMA. Queste CNV rientrano tra gli eventi definiti come risultati incidentali (*Incidental Findings*, IF). Nelle casistiche pubblicate non è sempre possibile stabilire se nelle CNV considerate clinicamente significative siano state incluse anche quelle "*probabilmente patogenetiche*", in genere non correlabili al quadro clinico in esame. Inoltre, solo in alcuni studi è stato esplicitato che tra le CNV "clinicamente significative" erano state incluse anche quelle "*probabilmente patogenetiche*" [Wapner et al., 2012]. E' anche importante sottolineare come, in epoca prenatale, il quadro clinico raramente sia completamente espresso; le anomalie riscontrate sono spesso aspecifiche e non sempre di univoca interpretazione e le loro implicazioni, nel lungo periodo, non sono prevedibili.

Pur tenendo in considerazione questi limiti, è importante sottolineare che l'utilizzo della CMA nella diagnosi prenatale aumenterebbe di circa il 7% la *detection rate* (DR) delle anomalie genomiche nei casi analizzati dopo il riscontro di anomalie ecografiche nel feto [Shaffer et al., 2012A, 2012C], e di circa l'1% in quelli analizzati senza specifica indicazione (ad es. ansia materna, età materna ≥ 35 anni, rischio aumentato per la sindrome di Down in base ai test di screening) [Callaway et al., 2014]. La percentuale delle VoUS varia a seconda degli studi (1-3%), soprattutto in relazione con la diversità delle piattaforme utilizzate [Brady et al., 2013; Hillman et al., 2013; Klugman et al., 2013].

I dati della letteratura evidenziano comunque un'evidente sproporzione tra il potenziale incremento diagnostico ottenuto con la CMA, quando utilizzata senza una specifica indicazione, rispetto al possibile riscontro di VoUS, alla relativa complessità ed ai costi dell'analisi, ai problemi derivanti dall'interpretazione dei risultati ed alla necessità di offrire la consulenza genetica post-test. Al momento, tuttavia, non sono stati pubblicati studi di *Health Technology Assessment* inerenti l'applicazione della CMA nella diagnosi prenatale ed è quindi impossibile stabilire l'effettivo rapporto costo-beneficio e neppure la

sostenibilità economica da parte del Servizio Sanitario Nazionale di un'analisi di questo tipo nel caso in cui venisse offerta su larga scala [Appendice 1].

2. Anomalie ecografiche fetali.

La presenza di anomalie fetali rilevate con le indagini ecografiche riclassifica una gravidanza “a basso rischio” (o “fisiologica”), come gravidanza “a rischio” (“moderato” o “alto”), oppure diagnostica una specifica patologia in una gravidanza considerata *a priori* “a rischio aumentato”.

Per anomalie fetali si intendono: 1. le malformazioni isolate o multiple; 2. l'associazione tra difetti che configurano un quadro sindromico; 3. i difetti significativi della crescita fetale, in particolare ad esordio precoce, in assenza di alterazioni significative della velocimetria doppler del distretto utero-placentare. Non vengono considerate anomalie significative i cosiddetti *soft marker* del II trimestre di gravidanza [Linee Guida SIEOG 2015; NHS Fetal Anomaly Screening Programme. Programme Statement: Normal variant screening in pregnancy, 2010].

In presenza di anomalie fetali, gli approfondimenti di laboratorio mediante test genetici hanno finalità diagnostiche e non di screening. Nei casi in cui vengono formulate specifiche ipotesi diagnostiche, possono essere indicati approfondimenti diagnostici mirati. Viceversa, spesso non è possibile formulare una specifica diagnosi clinica. Proprio in questi casi, la CMA offre un incremento diagnostico medio del 7% ed identifica sbilanciamenti cromosomici non rilevati dal cariotipo, nei casi che presentano una o più anomalie ecografiche [Shaffer et al., 2012C; Brady et al., 2013; Ahn et al., 2014; Callaway et al., 2014; de Wit et al., 2014; Srebniak et al. 2017], ed un incremento ancora più significativo (9,1%) nei casi con malformazioni multiple [de Wit et al., 2014].

A differenza di quanto avviene con l'analisi del cariotipo, non sono ancora disponibili dati certi in grado di correlare i micro-sbilanciamenti evidenziati con la CMA con le malformazioni fetali [Shaffer et al., 2012C] e di conseguenza la CMA non ha ancora indicazioni mirate in presenza di specifici difetti eco-evidenziati. Sono comunque state pubblicate limitate casistiche relative ad alcune categorie di malformazioni. Una revisione di Jansen et al (2015) ha evidenziato CNV patogenetiche nel 12% dei feti con anomalie cardiache; l'esclusione dei casi di microdelezione 22q11 riduceva tale percentuale al 3,4% in presenza di un difetto cardiaco isolato e al 9,3% nei casi con cardiopatie associate ad altri difetti. Sono state descritte CNV patogenetiche anche in alcuni casi di trasposizione delle grandi arterie e di eterotassia, condizioni genericamente ritenute non correlate alle anomalie cromosomiche [Cowan et al., 2016]. Altri studi confermano l'utilità della CMA in presenza di labiopalatoschisi (330 feti, 5% di CNV patogenetiche) [Fleurke-Rozema et al., 2016]. Per quanto riguarda la restrizione di crescita intrauterina è stato stimato che, nei casi ad esordio prima delle 32 settimane e con biometria fetale <3° percentile, l'utilizzo della CMA aumenterebbe la DR del 4.8% nei casi senza malformazioni associate [Borrell et al., 2016].

3. Translucenza nucale

L'utilizzo della CMA nelle gravidanze che presentano un aumento della translucenza nucale fetale (*nuchal translucency*, NT) apparentemente isolato, nel corso dello screening combinato/integrato del I trimestre, merita una considerazione a parte. Un rischio aumentato allo screening del I trimestre costituisce un'indicazione allo studio del cariotipo fetale. I dati della letteratura dimostrano che, una volta escluse le aneuploidie cromosomiche, l'aumento della NT evolve, nella maggior parte dei casi, nello sviluppo normale [Bilardo et al., 2007; 2010]. Tuttavia l'aumento della NT può associarsi ad altre patologie fetali, come le cardiopatie, le malformazioni extra-cardiache, alcune sindromi

genetiche, la morte endouterina [Souka et al., 2005], il che raccomanda un follow-up dedicato in queste gravidanze.

Alcuni studi hanno proposto la CMA in presenza di aumento della NT, anche se isolata [Hillman et al., 2013; Yang X. et al. 2016]. Tuttavia l'impiego della CMA in questi casi ha fornito risultati non univoci [Shaffer e al., 2012B; Brady et al., 2013, Ahn et al., 2014; Huang et al., 2014; Lund et al., 2015]. Diversi fattori quali la numerosità del campione, il livello della risoluzione della piattaforma utilizzata, la mancanza di una loro analisi scorporata dal gruppo delle "anomalie fetali", giustificano questi risultati controversi. Una revisione di 18 studi [de Wit et al., 2014] ha documentato, nei casi con NT $\geq 3,5$ mm (99 centile), un'incidenza di CNV del 3,1% (95% C.I. 0,4-5,7), cioè significativamente più bassa rispetto a quella osservata nei feti con anomalie strutturali. D'altro canto, una metanalisi ha stimato che nella popolazione dei feti a cariotipo normale che mostrano un aumento della NT, il 5% mostra CNV patogenetiche; la percentuale scende al 4% nei casi con aumento della NT apparentemente isolato e sale al 7% nei casi in cui coesistono malformazioni fetali [Grande et al., 2015].

In base a questi risultati, alcune Società Scientifiche raccomandano la CMA in presenza di aumento isolato della NT. In particolare, nel documento canadese "*Prenatal genomic microarray and sequencing in canadian medical practice: towards consensus*" (aprile 2015) è stata fissata come soglia per la CMA un valore di NT $>3,5$ mm [Buchanan et al., 2015]. In un documento congiunto del "*Royal College of Pathology*", della "*British Society for Genetic Medicine*", è stato raccomandato per la CMA un valore di NT $\geq 3,5$ mm associato ad un test di QF-PCR normale [Gardiner et al., 2015].

In considerazione di ultimi dati, si ritiene giustificato individuare in uno spessore di NT $\geq 3,5$ mm la soglia per raccomandare la CMA, in presenza di un cariotipo normale, ovvero dopo l'esclusione delle principali trisomie mediante i test rapidi. E' utile sottolineare l'importanza della conservazione di un campione di DNA fetale nelle gravidanze che presentano un aumento della NT che si sottopongono alle indagini invasive, come indicato dalla SIGU nelle "Linee-Guida per la Diagnosi citogenetica" [2013], al fine di consentire la CMA o altri test genetici nel follow-up, in presenza di eventuali ulteriori anomalie fetali.

Un cenno particolare merita il gruppo delle RASopatie (sindrome di Noonan e Noonan-like, sindrome di Costello, sindrome cardiocutanea) che hanno un'incidenza stimata in 1/700-1/1250. In epoca prenatale, queste condizioni si associano ai segni della displasia linfatica in oltre il 50% dei casi [Myers et al., 2014; Hakami et al., 2016]. Esiste un generale consenso sull'opportunità di raccomandare l'analisi molecolare (geni associati alle RASopatie) nei casi di NT aumentata e cariotipo/CMA negativi, in presenza di altri segni suggestivi per le RASopatie, come alcune cardiopatie, le malformazioni renali, l'igroma cistico/idrope, il polidramnios, i versamenti pleurici/idrotorace. In questi casi, la positività ai test molecolari per le RASopatie può essere del 17% [Croonen et al., 2013; Hakami et al., 2016]. E' invece controverso l'impiego dei test di genetica molecolare quando il cariotipo/CMA sono normali e l'aumento della NT è isolato (positività 2%) [Lee et al., 2009].

Si ritiene pertanto che vada incoraggiato l'avvio di studi sperimentali e progetti pilota in grado di: 1. valutare la fattibilità in termini sia di protocollo diagnostico e tempistica del monitoraggio prenatale delle RASopatie mediante NGS e pannelli dedicati; 2. definire/escludere la validità clinica della diagnosi in fase precoce, cioè in feti con NT aumentata e cariotipo/CMA normale; 3. valutare le difficoltà della consulenza genetica in relazione alla notevole eterogeneità genetica e alla variabilità di espressione clinica delle RASopatie [Baldassarre et al., 2013].

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 "*clanicamente significative*".

Quasi tutti i dati disponibili nei database riguardano casistiche analizzate con CMA in epoca postnatale, in base ad indicazioni mediche, che pertanto presentano possibili *bias* di selezione e spesso fanno riferimento a dati clinici incompleti [Riggs et al., 2012; Riggs et al., 2013]. Analogamente, i database che raccolgono le popolazioni "apparentemente sane" spesso non contengono i dati clinici dei soggetti analizzati e sono perciò poco attendibili [Duclos et al., 2011]. Questi aspetti sono ulteriormente limitanti 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", al quale possono essere conseguentemente indicati accertamenti clinici, può introdurre una destabilizzazione rispetto alle aspettative di salute e agli equilibri familiari [Klugman et al., 2013].

Nelle gravidanze in cui è indicato l'approfondimento con CMA, la coppia deve perciò essere informata: 1. sul guadagno di diagnosi reso possibile dall'eventuale identificazione di CNV patogenetiche non rilevate con l'analisi del cariotipo; 2. sulla possibilità che la CMA identifichi patologie che presentano quadri clinici altamente variabili e perciò sull'impossibilità di conoscere *a priori* la gravità del fenotipo; 3. sulla possibilità che il test, in particolare lo SNP-array, identifichi una condizione di consanguineità o una non-paternità; 4. sulla possibilità che vengano rilevati "*incidental findings*" (IF), comprese eventuali patologie ad insorgenza nella vita adulta, che possono segregare da un genitore ancora asintomatico; 5. sulla possibilità di individuare varianti di significato incerto (VoUS) [ACOG, Committee Opinion Number 682, 2016].

L'impatto di queste informazioni sulla coppia può essere estremamente gravoso ed avere connotazioni devastanti o fortemente negative, come ha dimostrato uno studio qualitativo nel quale i futuri genitori hanno definito "*tossica*" l'informazione ricevuta [Bernhardt et al., 2013].

5. Fase analitica.

Il beneficio dell'analisi CMA, ovvero del potenziamento della capacità diagnostica, deve essere bilanciato con le criticità in precedenza discusse, secondo i principi di opportunità e proporzionalità [de Jong et al., 2013]. I dati disponibili e la rapida evoluzione delle tecniche non giustificano la proposta di una specifica piattaforma da raccomandare nella diagnosi prenatale.

Le criticità principali sono le VoUS, le varianti di suscettibilità e le 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:

1. L'applicazione di un "filtro tecnico", per limitare il potere di risoluzione della piattaforma;

2. Il ricorso ad un "filtro interpretativo", ovvero demandato ad un gruppo di esperti ("*expert review panel*") che operi a livello "centrale" [del singolo laboratorio (Wapner et al., 2012) oppure a livello nazionale come ad esempio avviene in Belgio (Vanakker et al., 2014) o nel Regno Unito (progetto EACH)], ma che non sono direttamente coinvolti nella

gestione clinica del caso, a cui compete la valutazione dei risultati e la definizione delle varianti che devono essere refertate.

Nel primo caso viene predisposto un sistema che consente di analizzare ad una risoluzione elevata le regioni che, quando coinvolte, si associano a quadri patologici noti, mantenendo una risoluzione più bassa nell'analisi del 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*” presenta l'indiscutibile vantaggio di escludere sistematicamente numerose VoUS potenzialmente repertate. L'approccio “*expert review panel*” presenta l'apparente vantaggio di una maggiore flessibilità, a scapito di una possibile interpretazione soggettiva della CNV identificata, che potrebbe variare in base alla composizione del gruppo degli esperti. Va inoltre considerata la difficoltà organizzativa e gestionale del sistema. I due approcci possono comunque essere utilizzati in una strategia combinata [Wapner et al., 2012]. In base alle considerazioni espresse appare chiaro che la scelta della piattaforma e della risoluzione da applicare sono cruciali. La strategia deve privilegiare il quesito clinico e la proporzionalità tra l'utilità, le incertezze e la complessità dei risultati.

Nei casi in cui l'analisi CMA miri a caratterizzare un riarrangiamento cromosomico *de novo* evidenziato con l'analisi del cariotipo (ad es. un marcatore cromosomico soprannumerario, una traslocazione reciproca apparentemente bilanciata, etc.), è il genetista del laboratorio a scegliere di volta in volta la risoluzione più appropriata.

Negli altri casi, tenuto conto dei dati scientifici disponibili, si ritiene ragionevole l'impiego di piattaforme “*targeted*” con un livello di risoluzione nel *backbone* non superiore a 500 kb. Questo valore rappresenta infatti un compromesso rispetto alla 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 offre 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 la CMA prenatale e, in particolare, se siano maggiormente appropriati gli amniociti o le cellule dei villi coriali, il DNA estratto direttamente dall'intera biopsia o dalle cellule coltivate (quelle mesenchimali). 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 [Appendice 2].

E' opportuno validare/confermare la presenza di una determinata CNV e/o eventuali anomalie con altre tecniche oppure ripetendo la CMA, come indicato dalle Linee guida dedicate. Deve inoltre essere sempre reso disponibile un campione di sangue dei genitori, che spesso è indispensabile nell'interpretazione dei risultati ottenuti dall'analisi del feto, che deve essere accompagnato da un consenso informato scritto, che autorizzi l'estensione dell'indagine parentale [Linee guida SIGU per la diagnosi citogenetica, 2013; Note operative citogenetica costituzionale, 2013].

Nella verifica della segregazione di una CNV è consigliato, quando possibile, ricorrere a tecniche mirate all'analisi nei genitori della sola regione in esame (MLPA, FISH, Real-Time PCR), che peraltro potrebbero non essere sempre disponibili nei tempi richiesti, a causa dei tempi di produzione del test 'customizzato'.

Qualora, per ragioni tecniche o pratiche, il laboratorio decidesse di procedere all'analisi dei genitori mediante microarray genomici, si raccomanda di refertare solo il risultato relativo alle regioni di interesse (CNV riscontrate nel feto) in modo da ottenere risultati appropriati e utili in relazione alla specifica regione per la quale i campioni parentali sono stati richiesti e processati, evitando di considerare altre varianti di potenziale difficile gestione e comunque non pertinenti con il quesito posto dall'analisi del feto, in accordo con le linee guida nazionali ed Europee (SIGU ed ECA)

E' necessario ottenere il consenso informato da ciascun genitore e produrre referti separati per ciascun soggetto analizzato.

Alcune Società Scientifiche internazionali (ad es. The Royal College of Pathologists, UK) hanno stilato un elenco di regioni genomiche a penetranza incompleta ed espressività variabile che non dovrebbero essere refertate, per l'elevata incertezza interpretativa, l'impossibilità di formulare correlazioni genotipo-fenotipo, la necessità di verificare la segregazione dai genitori e le implicazioni sui familiari, nonché i costi, e i risultati non sempre dirimenti (ereditato # benigno, de novo # patologico) in quanto difficilmente interpretabili nella consulenza genetica post test.

In base alla letteratura e in accordo con le raccomandazioni di alcune società scientifiche internazionali, la Commissione SIGU/SIEOG ritiene opportuno non riportare nel referto le seguenti CNV:

- ✓ del/dup 15q13.3 (*CHRNA7*)
- ✓ del/dup 15q11.2 (*NIPA1*)
- ✓ del/dup 16p13.11 (*MYH11*)
- ✓ dup regione PAR1 (anche se comprendente il gene *SHOX*)
- ✓ del regione PAR1 (non comprendente il gene *SHOX*)
- ✓ dup Xp22.31 (*STS* e regione adiacente)
- ✓ del/dup regione PAR2.

Al momento è disponibile un circuito europeo di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) relativo all'analisi CMA in diagnosi postnatale (CEQAS: Cytogenetic External Quality Assessment Service). Recentemente è stato anche introdotto il CEQAS per la CMA in diagnosi prenatale. Si raccomanda ai laboratori che offrono la CMA prenatale di partecipare a questo schema di VEQ.

Si raccomanda l'implementazione e la definizione di studi a livello nazionale sull'impiego diagnostico della 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.

E' utile sottolineare che nonostante gli indiscutibili vantaggi apportati dalla CMA anche nel suo impiego diagnostico prenatale, compresa la maggiore sensibilità e la possibilità di utilizzare cellule non coltivate, con conseguente accorciamento dei tempi di risposta, una serie di importanti informazioni diagnostiche ancora oggi possono essere ottenute solo con l'analisi del cariotipo. La CMA non permette infatti di identificare le aberrazioni cromosomiche bilanciate né di localizzare sul cromosoma le microduplicazioni. Per questo la CMA va sempre eseguito in parallelo all'analisi del cariotipo ed eventuali FISH, allo scopo di offrire alla coppia informazioni corrette e complete anche in vista di eventuali gravidanze future.

Infine va sottolineato come con il presente Documento si vogliono produrre delle Raccomandazioni per la buona pratica clinica, in attesa che SIGU e SIEOG siano chiamate a rimodulare lo stesso seguendo la metodologia per la stesura di Linee Guida, come previsto dalla recente normativa in tema di *Responsabilità Professionale del personale sanitario* (DDL n. 2224).

Raccomandazioni

- 1. La Commissione SIGU-SIEOG ritiene al momento complessa l'applicazione routinaria della CMA come test di primo livello nella diagnosi prenatale, in sostituzione o in affiancamento del cariotipo, al di fuori delle indicazioni approfondite in questo documento (ad es. malformazioni fetali, incremento della NT, iposviluppo fetale precoce, etc..). Sebbene la Commissione riconosca che esiste una letteratura consolidata che indica una prevalenza dell'1% di CNV patogenetiche nelle gravidanze 'a basso rischio' (si veda Appendice 1), la difficoltà di offrire attualmente percorsi condivisi, strutturati e consolidati, nonché la mancanza di analisi costo-beneficio, rendono complessa l'applicazione della CMA in questa popolazione. Si ritiene comunque opportuno la definizione di un percorso informativo finalizzato a comunicare alla gestante/coppia che intende monitorare la gravidanza con una tecnica invasiva (villocentesi e/o amniocentesi), anche attraverso l'informativa alla diagnosi prenatale, la possibilità di utilizzare tecniche che aumentano la risoluzione rispetto al cariotipo convenzionale, e che permettono di identificare CNV patogenetiche (vedi facsimile allegati 3 e 4)*
- 2. In presenza di una anomalia ecografica fetale, come sopra definita, la 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 all'analisi deve scaturire dalla valutazione complessiva del quadro clinico, dalle informazioni scientifiche disponibili, anche in relazione alla categoria/tipologia della malformazione, dal rischio connesso all'invasività della tecnica impiegata per acquisire i tessuti fetali, dall'epoca della gravidanza, dall'utilità dell'indagine nel modificare l'evoluzione della gravidanza, dalle possibili decisioni della coppia opportunamente informata sulle caratteristiche dell'indagine.*
- 3. Nei feti che mostrano un valore della NT $\geq 3,5$ mm (99 centile), in presenza di un cariotipo normale, la CMA può essere proposta, anche se questo segno ecografico è apparentemente isolato. In ogni caso, in presenza di un aumento della NT, nelle gestanti che si sottopongono ad una tecnica invasiva, si raccomanda la conservazione di un campione fetale per eventuali analisi molecolari successive, in rapporto ai riscontri ecografici (ad es. studio della cascata dei geni associati alle RASopatie).*
- 4. La complessità della gestione della CMA prenatale, dell'interpretazione e della comunicazione dei risultati ne giustifica un uso cauto e ponderato. L'analisi, come per tutti i test genetici, deve essere "offerta" e mai "imposta". La sua integrazione nel percorso della diagnosi prenatale deve essere affidata solo a centri di documentata esperienza, nei quali opera un'équipe multidisciplinare composta da un ginecologo, un genetista clinico ed un genetista di laboratorio competenti nella diagnosi prenatale, in grado di garantire la presa in carico della gravidanza e della coppia. E' opportuna la disponibilità di uno psicologo esperto in questo settore.*
- 5. Al momento non è possibile organizzare un "expert review panel" a valenza nazionale. Pertanto si raccomanda di utilizzare un filtro 'tecnico', mediante 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 con l'analisi del cariotipo. In questo caso, la risoluzione deve essere scelta in base all'anomalia cromosomica rilevata (regioni cromosomiche coinvolte, geni presenti nella regione). I risultati dell'analisi devono essere valutati dall'équipe multidisciplinare che ha in carico il caso. L'eventuale comunicazione ai genitori delle varianti non chiaramente patogenetiche e non correlate al fenotipo del feto in esame deve tenere in considerazione le scelte della coppia, preliminarmente informata sui possibili esiti dell'indagine. La strategia comunicativa che si intende adottare deve essere preliminarmente condivisa con la coppia nel consenso informato sottoscritto.*
- 6. Il laboratorio che offre la CMA prenatale deve essere integrato in un percorso di secondo livello, all'interno del quale opera un'équipe multidisciplinare comprendente un ginecologo esperto in medicina fetale, un genetista clinico ed un genetista di laboratorio esperto nella CMA. Il laboratorio deve essere in grado di garantire il completamento del percorso diagnostico nella fase analitica; confermare i risultati con tecniche alternative di genetica molecolare; se necessario, confrontarli con l'analisi del genoma dei genitori, il cui campione deve sempre essere disponibile. Il laboratorio deve partecipare alle Valutazioni Esterne di Qualità già esistenti e possibilmente implementati specificamente per la diagnostica prenatale.*

Bibliografia

- 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* 22;2:e354. doi: 10.7717/peerj.354.
- Baldassarre G, Mussa A, Silengo M, Ferrero GB. 2013. Comment on "prenatal diagnosis and prognosis in Noonan syndrome". *Prenat Diagn* 33(13):1318-20.
- 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.
- Borrell A, Grande M, Meler E, Sabrià J, Mazarico E, Muñoz A, Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Figueras F. Genomic microarray in fetuses with early growth restriction: a multicenter study. *Fetal Diagn Ther* 2016 Nov 2.
- 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* 16(6):469-76.
- Buchanan JA, Chitayat D, Kolomietz E, Lee HC, Scherer SW, Speevak MD, Sroka H, Stavropoulos DJ. 2015. Prenatal genomic microarray and sequencing in Canadian medical practice: towards consensus. *J Med Genet* 52(9):585-6.
- 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* 56(4):312-8.
- Chen Y, Bartanus J, Liang D, Zhu H, Breman AM, Smith JL, Wang H, Ren Z, Patel A, Stankiewicz P, Cram DS, Cheung SW, Wu L, Yu F. 2017. Characterization of chromosomal abnormalities in pregnancy losses reveals critical genes and loci for human early development. *Hum Mutat*. 2017 Feb 28
- Committee Opinion Number 581- December 2013 Committee on Genetics Society for Maternal-Fetal Medicine.
- Committee Opinion Number 682- December 2016 Committee on Genetics Society for Maternal-Fetal Medicine.
- 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.
- Cowan JR, Tariq M, Shaw C, Rao M, Belmont JW, Lalani SR, Smolarek TA, Ware SM. 2016. Copy number variation as a genetic basis for heterotaxy and heterotaxy-spectrum congenital heart defects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 19;371(1710). pii: 20150406.
- 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.
- Croonen EA, Nillesen WM, Stuurman KE, Oudesluijs G, van de Laar IM, Martens L, Ockeloen C, Mathijssen IB, Schepens M, Ruitkamp-Versteeg M, Scheffer H, Faas BH, van der Burgt I, Yntema HG. 2013. Prenatal diagnostic testing of the Noonan syndrome genes in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Eur J Hum Genet* 21(9):936-42.
- de Jong A, Dondorp WJ, Macville MV, de Die-Smulders CE, van Lith JM, de Wert GM. 2014. 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* 2013:346762. doi: 10.1155/2013/346762.
- Fleurke-Rozema JH, van de Kamp K, Bakker MK, Pajkrt E, Bilardo CM, Sniijders RJ. 2016. Prevalence, diagnosis and outcome of cleft lip with or without cleft palate in The Netherlands. *Ultrasound Obstet Gynecol* 48(4):458-463.
- 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.
- Gardiner C, Wellesley D, Kilby MD, Kerr B. On behalf of the Joint Committee on Genomics in Medicine. 2015. Recommendations for the use of chromosome microarray in pregnancy.
- Grande M, Jansen FA, Blumenfeld YJ, Fisher A, Odibo AO, Haak MC, Borrell A. 2015. Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 46(6):650-8.
- Hakami F, Dillon MW, Lebo M, Mason-Suares H. 2016. Retrospective study of prenatal ultrasound findings in newborns with a Noonan spectrum disorder. *Prenat Diagn* 36(5):418-23.
- 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* 43(6):620-4.
- 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* 27(13):1333-8.
- Lee KA, Williams B, Roza K, Ferguson H, David K, Eddleman K, Stone J, Edelmann L, Richard G, Gelb BD, Kornreich R. 2009. PTPN11 analysis for the prenatal diagnosis of Noonan syndrome in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Clin Genet* 75(2):190-4.
- Linea Guida Gravidanza Fisiologica. Ministero della Salute, 2011, pp.121-8.
- Linee Guida SIGU per la diagnosi citogenetica 2013.
- Linee Guida SIGU per la diagnosi citogenetica, sezione "Note operative citogenetica costituzionale 2013".
- Linee Guida Società Italiana di Ecografia Ostetrico Ginecologica. 2015.
- Lund IC, Christensen R, Petersen OB, Vogel I, Vestergaard EM. Chromosomal microarray in fetuses with increased nuchal translucency. 2015. *Ultrasound Obstet Gynecol* 45(1):95-100.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler 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.
- Myers A, Bernstein JA, Brennan ML, Curry C, Esplin ED, Fisher J, Homeyer M, Manning MA, Muller EA, Niemi AK, Seaver LH, Hintz SR, Hudgins L. 2014. Perinatal features of the RASopathies: Noonan syndrome, cardiofaciocutaneous syndrome and Costello syndrome. *Am J Med Genet* 164A(11):2814-21.
- 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. 2012. Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian

- Society of Human Genetics (SIGU). *Ultrasound Obstet Gynecol* 39(4):384-8.
- 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.
- Srebniak MI, Knapen MFCM, Polak M, Joosten M, Diderich KEM, Govaerts LCP, Boter M, Kromosoeto JNR, van Hassel DACM, Huijbregts G, van Ijcken WFJ, Heydanus R, Dijkman A, Toolenaar T, de Vries FAT, Knijnenburg J, Go ATJI, Galjaard RH, Van Opstal D. 2017; The influence of SNP-based chromosomal microarray and NIPT on the diagnostic yield in 10,000 fetuses with and without fetal ultrasound anomalies. *Hum Mutat*. 2017 Apr 14
- Souka AP, von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek 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, Sznajder 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, Beudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. 2012. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 367:2175-84.
- Warburton D. 1991. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 49(5):995-1013.
- Werner-Lin A, Barg FK, Kellom KS, Stumm KJ, Pilchman L, Tomlinson AN, Bernhardt BA. 2016. Couple's Narratives of Communion and Isolation Following Abnormal Prenatal Microarray Testing Results. *Qual Health Res* 26(14):1975-87.
- Werner-Lin A, Walser S, Barg FK, Bernhardt BA. 2017. "They Can't Find Anything Wrong with Him, Yet": Mothers' experiences of parenting an infant with a prenatally diagnosed copy number variant (CNV). *Am J Med Genet A* 173(2):444-51.
- Yang X, Li R, Fu F, Zhang Y, Li D, Liao C. 2017. Submicroscopic chromosomal abnormalities in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017 Jan;30(2):194-198.

APPENDICE 1

Utilità clinica e resa diagnostica della ricerca di CNV patogenetiche nelle gravidanze a basso rischio

Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi sull'utilità e la resa diagnostica delle CNV in ambito prenatale, sui feti a cariotipo normale, in assenza di reperti ecografici evocativi di patologia [età materna avanzata (≥ 35 anni), scelta elettiva/ansia (< 35 anni), risultato del test biochimico del I trimestre anomalo, storia familiare per anomalie cromosomiche, precedente figlio/feto affetto da anomalia cromosomica] (Van den Veyver et al., 2009; Armengol et al., 2012; Breman et al., 2012; Lee et al., 2012; Novelli et al., 2013; Shaffer et al., 2012; Wapner et al., 2012; Scott et al., 2013; Papoulidis et al., 2015; Srebniak et al. 2017). In tali studi sono state utilizzate piattaforme e strategie eterogenee per la rilevazione e la refertazione delle CNV.

Da essi si evince che è possibile utilizzare diverse strategie e filtri interpretativi, a diversi livelli del processo, allo scopo di ridurre la possibilità di rilevare reperti incidentali (*incidental findings* - IF) o varianti di incerto significato clinico (VoUS):

- in fase di disegno della piattaforma, includendo solo i pannelli più o meno espansi di CNV patogenetiche secondo criteri variabili;
- in fase di consenso informato, utilizzando una strategia “*opt-in/opt-out*” in base alla quale, dopo la consulenza genetica pre-test, la gestante esprime un consenso ad essere informata solo se sono presenti specifiche categorie di CNV;
- in fase di analisi dei dati grezzi, con l'applicazione di filtri bioinformatici che riducono la risoluzione e l'indagine è limitata solo a specifiche regioni critiche selezionate;
- in fase interpretativa, utilizzando gruppi di esperti che rivalutano le varianti di incerto significato;
- combinando le diverse strategie.

L'analisi congiunta dei risultati ottenuti da questi studi mostra che, la ricerca degli sbilanciamenti submicroscopici, nei casi con indicazione età materna avanzata e cariotipo normale, porta ad un guadagno di diagnosi delle CNV submicroscopiche clinicamente significative pari a circa l'1%, che non è statisticamente diverso da quello rilevato nei casi con altre indicazioni a basso rischio [OR 1.13 (95% CI 0.81-1.57)] (Tabella 1).

(Tabella 1).

Studio	Età materna avanzata (%)	Altre indicazioni [^] (%)	Tipo di piattaforma
Van den Veyver et al., 2009	2/123 (1.6)	5/132 (3.8)	BAC + oligo
Armengol et al., 2012	3/273 (1.1)	5/450 (1.1)	BAC
Breman et al., 2012	5/394 (0.8)	16/235 (6.8)	BAC + oligo
Lee et al., 2012	10/1891 (0.5)	5/1009 (0.5)	BAC + oligo
Shaffer et al., 2012	0/161 (0)	11/345 (3.2)	BAC + oligo
Wapner et al., 2012	34/1966 (1.7)	17/1101 (1.5)	Oligo
Scott et al., 2013	9/743 (1.2)	6/602 (1.0)	Oligo
Papoulidis et al, 2015	4/592 (0.7)	3/486 (0.6)	BAC
Grati et al., 2015	3/1667 (0.2)	7/3064 (0.2)	Prenatal BACs-on-Beads
Studi combinati	70/7810** (0.9 - 1/112) 95%CI: 0.71-1.11	75/7424** (1.0 - 1/99) 95%CI: 0.81-1.26	
**differenza non stat. significativa, OR 1.13 (95% CI 0.81-1.57)			

[^]Ansia materna/scelta elettiva; Precedente figlio/feto con anomalia cromosomica; Aumentato rischio dopo test di screening per sindrome di Down; Storia familiare

L'analisi dettagliata dei singoli risultati ottenuti dal trial clinico NICHD [Wapner et al, 2012] consente di stratificare le CNV clinicamente significative rilevate in una popolazione di 3067 feti anatomicamente normali e con cariotipo normale (~1.7%):

- ~0.5% CNV a penetranza completa o molto elevata con correlazioni note genotipo-fenotipo;
- ~0.6% a penetranza incompleta e/o espressione variabile (associate ad aumentato rischio di autismo, ritardo dello sviluppo psico-motorio, schizofrenia, etc.)
- ~0.6% di significato clinico incerto, ri-classificate successivamente come potenzialmente rilevanti dal punto di vista clinico, da un team di esperti appositamente designato per analizzare queste varianti.

In sintesi, circa l'1% delle varianti patogenetiche rilevate hanno un chiaro significato clinico, in accordo con i risultati dell'analisi congiunta, e circa la metà di esse ha penetranza completa. A tutt'oggi non sono disponibili evidenze che indicano una correlazione tra l'incidenza delle CNV submicroscopiche e l'età materna, a differenza di quanto è noto sulla prevalenza delle trisomie fetali [Papoulidis et al., 2015; Grati et al., 2015; Ferreira et al., 2016]. Ciò indica l'esistenza di un rischio condiviso da tutte le coppie di concepire un feto portatore di una CNV patogenetica a penetranza completa (fino allo 0.5%) o incompleta/espressività variabile (0.6%) non rilevabili con il cariotipo standard [Wapner et al., 2012]. Le gestanti che, per scelta personale, in assenza di una indicazione che conferisca loro un rischio "a priori" elevato per le microdelezioni/microduplicazioni, decidano di sottoporsi ad una diagnosi prenatale invasiva, dovrebbero essere informate dell'esistenza della CMA come tecnica di approfondimento diagnostico, ad integrazione del cariotipo fetale. La sua applicazione in questa popolazione dovrebbe rispondere all'obiettivo di ridurre il rischio di sindromi note da microdelezione/microduplicazione associate a fenotipi clinici gravi. La strategia dovrebbe quindi mirare a fornire informazioni solo sulle CNV di chiaro significato patogenetico a penetranza elevata o completa (0.5%). Pertanto, tutte le indagini in precedenza riportate finalizzate a raggiungere questo obiettivo appaiono accettabili purché accompagnate dal consenso informato che contenga, nel caso dell'impiego di una strategia 'targeted', di un elenco delle regioni correlate a sindromi che vengono indagate, nonché la risoluzione applicata alle regioni genomiche analizzate (si veda facsimile dell'informativa). In questa situazione è consigliabile, seguendo un criterio di utilità clinica e di appropriatezza analitica, una risoluzione nel backbone (intesa come limite risolutivo della piattaforma o filtro analitico a posteriori) medio-bassa (intorno alle 3Mb), garantendo un supporto alla citogenetica tradizionale, ed una risoluzione maggiore (>250 Kb) nelle regioni critiche (Alesi V. et al. 2015).

In considerazione delle problematiche che l'impiego di tale metodica diagnostica comporta, relative all'informazione e ad una sua corretta veicolazione alla persona assistita e di quelle relative al contesto organizzativo della diagnosi prenatale invasiva (come ad esempio una fattiva offerta di tale accertamento su tutto il territorio nazionale), si ritiene necessario un congruo intervallo di tempo, che il tavolo di lavoro ha definito essere compreso fra la pubblicazione di questo documento e la fine del 2017, durante il quale si renderà opportuna, dopo una preliminare consensus conference fra le Società Scientifiche interessate, l'organizzazione di iniziative formative indispensabili per la preparazione delle figure professionali coinvolte nella gestione delle gravidanze in merito a tale metodica diagnostica, alle problematiche dell'informazione e al suo possibile impiego nelle pazienti che scelgono di effettuare una diagnosi prenatale invasiva. Questo intervallo di tempo potrà anche consentire una adeguata organizzazione da parte delle strutture per la erogazione di tale tipologia di accertamento.

In Appendice 2 (Studio Collaborativo SIGU) sono indicati i Laboratori già operativi per la esecuzione della CMA in epoca prenatale cui è possibile riferirsi per i Centri che non sono ancora operativi.

Bibliografia appendice 1

- Alesi V, Bernardini L, Goidin D, Canestrelli M, Dentici ML, Barrano G, Giuffrida MG, Nardone AM, Postorivo D, Laino L, Genesio R, Dallapiccola B, and Novelli A, *J Genet Syndr Gene Ther* 2016, 7:1 Easychip 8x15k: A New Tool for Detecting Chromosome Anomalies in Low Risk Pregnancies, Supporting and Integrating Standard Karyotype
- Armengol L, Nevado J, Serra-Juhé C, Plaja A, Mediano C, García-Santiago FA, García-Aragonés M, Villa O, Mansilla E, Preciado C, Fernández L, Ángeles Mori M, García-Pérez L, Lapunzina PD, Pérez-Jurado LA. 2012. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum Genet* 131(3):513-23.
- Breman A, Pursley AN, Hixson P, Bi W, Ward P, Bacino CA, Shaw C, Lupski JR, Beaudet A, Patel A, Cheung SW, Van den Veyver I. 2012. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. *Prenat Diagn* 32(4):351-61.
- Committee Opinion Number 682 - December 2016 Committee on Genetics Society for Maternal-Fetal Medicine.
- Grati FR, Molina Gomes D, Ferreira JC, Dupont C, Alesi V, Gouas L, Horelli-Kuitunen N, Choy KW, García-Herrero S, de la Vega AG, Piotrowski K, Genesio R, Queipo G, Malvestiti B, Hervé B, Benzacken B, Novelli A, Vago P, Piippo K, Leung TY, Maggi F, Quibel T, Tabet AC, Simoni G, Vialard F. 2015. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenat Diagn* 35(8):801-9.
- Ferreira JC, Grati FR, Bajaj K, Malvestiti F, Grimi MB, Trotta A, Liuti R, Milani S, Branca L, Hartman J, Maggi F, Simoni G, Gross SJ. 2016. Frequency of fetal karyotype abnormalities in women undergoing invasive testing in the absence of ultrasound and other high-risk indications. *Prenat Diagn* 36(12):1146-1155.
- Lee CN, Lin SY, Lin CH, Shih JC, Lin TH, Su YN. 2012. Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171 pregnancies. *BJOG* 119(5):614-25.
- Novelli A, Cavalli P, Bernardini L. 2013. The future of prenatal diagnosis: karyotype, microarray or both? Technical and ethical considerations. *Expert Rev Proteomics* 10(2):131-4.
- Papoulidis I, Sotiriadis A, Siomou E, Papageorgiou E, Eleftheriades M, Papadopoulos V, Oikonomidou E, Orru S, Manolakos E, Athanasiadis A. 2015. Routine use of array comparative genomic hybridization (aCGH) as standard approach for prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities. Clinical experience of 1763 prenatal cases. *Prenat Diagn* 35(13):1269-77.
- Scott F, Murphy K, Carey L, Greville W, Mansfield N, Barahona P, Robertson R, McLennan A. 2013. Prenatal diagnosis using combined quantitative fluorescent polymerase chain reaction and array comparative genomic hybridization analysis as a first-line test: results from over 1000 consecutive cases. *Ultrasound Obstet Gynecol* 41(5):500-7.
- 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.
- Srebniak MI, Knapen MFCM, Polak M, Joosten M, Diderich KEM, Govaerts LCP, Boter M, Kromosoeto JNR, van Hassel DACM, Huijbregts G, van Ijcken WFJ, Heydanus R, Dijkman A, Toolenaar T, de Vries FAT, Knijnenburg J, Go ATJI, Galjaard RH, Van Opstal D. 2017; The influence of SNP-based chromosomal microarray and NIPT on the diagnostic yield in 10,000 fetuses with and without fetal ultrasound anomalies. *Hum Mutat*. 2017 Apr 14.
- Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang SH, Simovich MJ, Ward PA, Darilek S, Johnson A, Neill SE, Bi W, White LD, Eng CM, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet AL. 2009. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn* 29(1):29-39.
- 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.

APPENDICE 2

Studio collaborativo del GdL SIGU Cito-genetica/-genomica sull'offerta di diagnosi prenatale mediante CMA (Chromosomal Microarray Analysis)

APPENDICE 2

Indagine conoscitiva del GdL SIGU Cito-genetica/-genomica sull'offerta della diagnosi prenatale mediante CMA (Chromosomal Microarray Analysis).



Figura 1: Distribuzione territoriale dei 24 laboratori partecipanti allo studio

Sono state raccolte, mediante questionario, informazioni sull'offerta delle diagnosi prenatali effettuate mediante CMA dai laboratori Italiani nel periodo giugno 2014-giugno 2016. Scopo dell'iniziativa era quella di ottenere una fotografia del contesto all'interno del quale venivano eseguite le suddette analisi, entrando nel merito del percorso clinico nel quale erano state inserite, le piattaforme tecnologiche utilizzate e la relativa risoluzione, la partecipazione a schemi di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ) da parte dei laboratori che offrivano questa analisi.

Al questionario hanno risposto 24 laboratori, 15 pubblici e 9 privati accreditati: 15 localizzati al Nord Italia, 6 al Centro e 3 al Sud (Figura 1).

L'indagine prenatale mediante CMA viene inserita in un percorso clinico che la vede preceduta da un colloquio pre-test assicurato direttamente dai 24 laboratori e da una

consulenza post-test offerta direttamente da 20 laboratori; 4 l'assicurano attraverso convenzioni con i Servizi di Genetica Clinica.

La maggior parte dei laboratori ha iniziato l'attività di CMA prenatale tra il 2010 ed il 2015 (Figura 2), ma solo il 33% dei laboratori pubblici ed il 55% dei privati hanno dichiarato di partecipare a circuiti di VEQ.

Tutti i laboratori eseguono CMA su DNA estratto da liquido amniotico coltivato (LA-C), mentre solo una quota di essi esegue le indagini sul DNA estratto direttamente dal liquido amniotico (LA-NC) o dai villi coriali (CVS-NC) o dopo coltura dei villi coriali (CVS-C) (Figura 3). Solo 15 laboratori hanno dichiarato di eseguire CMA sia da DNA estratto direttamente, sia dopo coltura indifferentemente dai villi coriali o dal liquido amniotico.

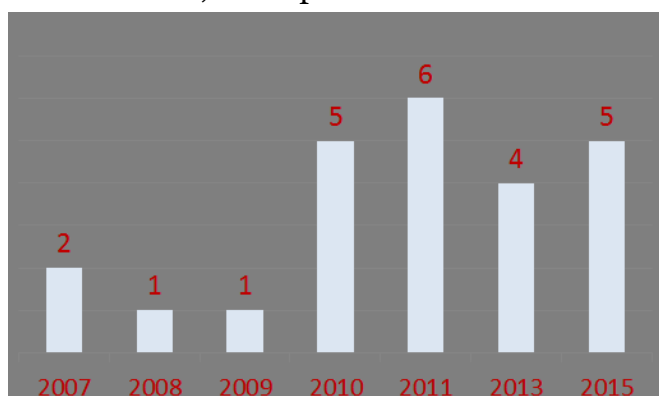


Figura 2: Anno di inizio dell'attività di CMA nei 24 laboratori partecipanti allo studio

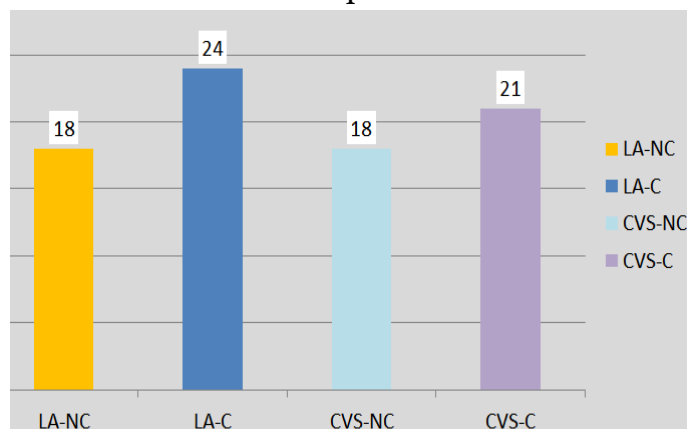


Figura 3: Distribuzione dei laboratori in base alla tipologia di materiale su cui eseguono CMA.

La Figura 4 mostra la tipologia delle piattaforme utilizzate dai diversi laboratori per le indagini prenatali mediante CMA; tutti hanno utilizzato vetrini Genome-Wide o su disegno ISCA, con una risoluzione arricchita nelle regioni associate a patologia e risoluzione compresa tra 37 e 200Kb sul resto del genoma. Un solo laboratorio ha dichiarato di utilizzare una piattaforma a BAC, con risoluzione di 150 Kb nelle regioni associate a patologia ed 1Mb sul resto del genoma.

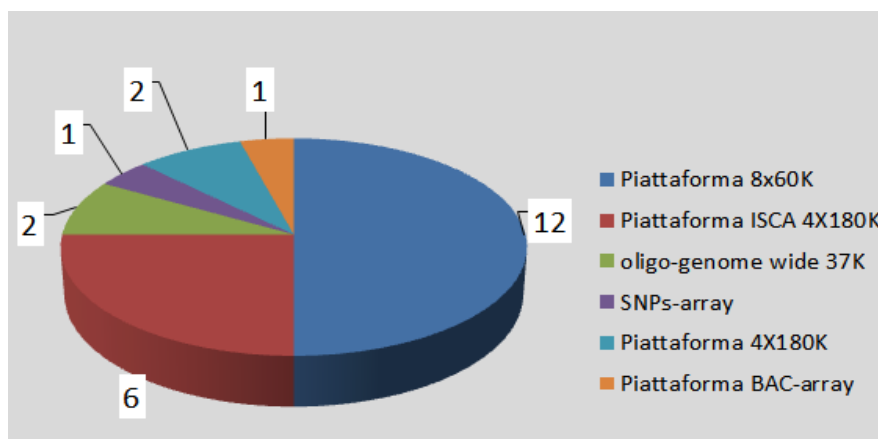


Figura 4: Piattaforme utilizzate dai laboratori partecipanti allo studio per indagini prenatali mediante CMA.

Nel periodo giugno 2014-giugno 2016 i 24 laboratori hanno eseguito complessivamente 4893 CMA prenatali, di cui il 42% per malformazioni fetali eco-evidenziate, il 13% per età materna avanzata, il 10% per NT $\geq 3,5$ mm, il 7% per caratterizzare un riarrangiamento cromosomico complesso e il 4% per la presenza di CNV familiari. Il 20% del totale delle analisi (961/4893) è stato eseguito in gravidanze in assenza di indicazioni specifiche (gravidanze a basso rischio).

Quest'ultimo dato merita una riflessione: dopo il colloquio pre-test molte coppie, pur essendo state informate di non rientrare nelle categorie a "rischio", hanno comunque optato per la diagnosi prenatale mediante CMA.

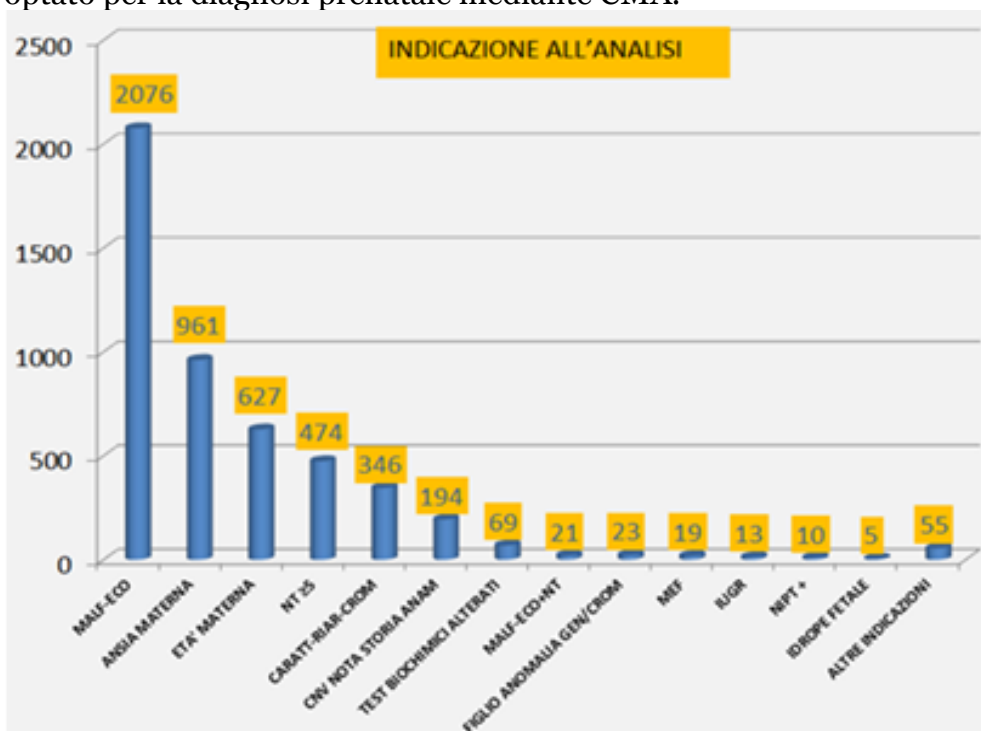


Figura 5: Numero di CMA prenatali eseguite nelle diverse categorie di indicazione all'indagine

Glossario:

Allele: forma alternativa di un gene, che occupa la stessa posizione su una coppia di cromosomi omologhi.

Aneuploidie: variazione nel numero dei cromosomi, rispetto a quello che normalmente caratterizza le cellule di un individuo della stessa specie.

Backbone: *spina dorsale* della piattaforma array

Fenotipo: l'aspetto (fisico, biochimico e fisiologico) di una persona, che è dovuto all'interazione del genotipo con l'ambiente.

Genoma: l'insieme di tutte le informazioni genetiche depositate nella sequenza del DNA contenuto nel nucleo delle cellule sotto forma di cromosomi.

Genotipo: tutti i geni che compongono il DNA di un organismo o di una popolazione.

Incidental Findings: riscontro incidentale di una variante clinicamente rilevante non associata all'indicazione clinica.

Malattie mendeliane: malattie genetiche che seguono la modalità dell'ereditarietà monogenica, dovute alle mutazioni di un singolo gene, definito gene-malattia.

Marcatori cromosomici soprannumerari o ESACs: piccoli cromosomi soprannumerari. Possono avere o non avere un significato patologico a seconda della loro derivazione

PCR: tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali.

Penetranza: la frequenza con cui un allele (sia esso dominante o recessivo) si manifesta fenotipicamente all'interno di una popolazione; ciò dipende sia dal genotipo (ad esempio la presenza di geni epistatici o di altri geni) sia dall'influenza dell'ambiente.

Piattaforme Targeted: a risoluzione differenziata, maggiore nelle regioni genomiche già associate a specifiche condizioni patologiche

RASopatie: una famiglia di malattie dello sviluppo contraddistinte da cardiopatia congenita con ritardo di crescita, facies dismorfica, difetto cognitivo mutevole, deformità scheletriche e tendenza all'insorgenza di tumori, originate dalla mutazione di uno dei geni della cascata di RAS-MAPK.

Real-Time PCR: PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR); un metodo che simultaneamente amplifica (reazione a catena della polimerasi o PCR) e quantifica il DNA.

Sequenziamento: metodica che permette di determinare l'ordine dei nucleotidi nella molecola del DNA.

Sequenziamento esomico: sequenziamento della parte del genoma formato dagli esoni, la porzione codificante del DNA. Pur interessando solo l'1% del materiale genetico, è costituito da oltre 30 megabasi di DNA ed è responsabile di tutta (o quasi) la costruzione dell'organismo. Le sue variazioni di sequenza determinano oltre il 90% delle anomalie congenite e delle malattie da alterata suscettibilità.

Sequenziamento Sanger: metodo di sequenziamento enzimatico a terminazione di catena.

Varianti polimorfiche: sostituzioni nucleotidiche del DNA che si presentano con una frequenza maggiore dell'1%

ABBREVIAZIONI

Array-CGH: array-comparative genomic hybridization

DNA: acido desossiribonucleico o deossiribonucleico (DNA)

SNP-array: Single Nucleotide Polymorphism array

CMA: Chromosomal Microarray Analysis

CNV: Copy Number Variation (variazione del numero di copie di una regione del genoma)

DP: Diagnosi Prenatale

DR: Detection Rate

NGS: Next-Generation Sequencing (sequenziamento di nuova generazione)

WES: Whole Exome Sequencing (sequenziamento dell'esoma)

WGS: Whole Genome Sequencing (sequenziamento del genoma)

VoUS: Variants of Uncertain Significance (varianti di significato incerto)

QF-PCR: PCR Quantitativa Fluorescente.

NT: Trasparenza Nucale

DR: Detection Rate (sensibilità diagnostica)

ESACs: Extra Structurally Abnormal Chromosomes

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

NICHD: National Institute of Child Health and Human Development

IF: Incidental Findings

CI: Confidence Interval

OR: Odds Ratio

PCR: Polymerase Chain Reaction

ALLEGATO 1

Facsimile INFORMATIVA AL TEST MEDIANTE MICROARRAY CROMOSOMICI (CMA) SU CAMPIONE DI DNA FETALE

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.

Quali sono le indicazioni alla CMA?

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

- la necessità di caratterizzare in maniera più approfondita alcune anomalie cromosomiche fetali;
- il riscontro alla ecografia di anomalie strutturali del feto;
- 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 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 penetranza incompleta (per cui la malattia eventualmente associata al riarrangiamento evidenziato può non manifestarsi oppure manifestarsi con gravità variabile e non prevedibile) oppure alla suscettibilità a malattie complesse;
- ✓ 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.

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.

Facsimile **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
IL Sig. _____, nato a _____, il _____,
in qualità di _____

DICHIARANO

- di aver discusso con il Dr. _____ (Specialista in Genetica Medica) **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,
- e di ritenere tutte le informazioni ricevute (e contenute sull' **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. _____

I sottoscritti 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 _____

ALLEGATO 2

Facsimile INFORMATIVA ALL' ESECUZIONE DEL TEST MEDIANTE PIATTAFORMA CMA (Chromosomal Microarray Analysis) TARGETED PER LE GRAVIDANZE A BASSO RISCHIO

Si stima che il 3% circa dei neonati presenti un difetto dello sviluppo riconoscibile alla nascita o nei primi mesi di vita (cosiddetto rischio generico di popolazione), che in larga parte non è valutabile con indagini di laboratorio e/o strumentali e che può dipendere da cause genetiche (cromosomiche, geniche) o non genetiche (farmaci, infezioni, etc.). Questo rischio è comune a tutte le gravidanze ma può aumentare in base all'età della coppia o per altri fattori, spesso desumibili dalla storia personale e/o familiare, per cui talvolta possono essere richieste indagini specifiche (ad es. analisi cromosomiche e molecolari, indagini ecografiche, ecc.).

Tra le malattie genetiche comprese nel rischio generico di popolazione, le **sindromi da microdelezione o microduplicazione cromosomica** costituiscono un gruppo di patologie causate da microsbilanciamenti che coinvolgono regioni genomiche molto piccole (spesso <10 milioni di basi, Mb). Nella maggioranza dei casi si tratta di quadri sindromici associati a importante disabilità, intellettiva e/o comportamentale e/o fisica, che singolarmente sono condizioni rare, ma che nel complesso hanno una frequenza stimata di circa 1:1000-2000 nati.

La diagnosi di questi microsbilanciamenti spesso non è possibile mediante l'analisi del cariotipo fetale convenzionale, ma solo attraverso analisi genomiche a più alta risoluzione. Presso il nostro laboratorio, il test dedicato allo screening di queste condizioni, in assenza di indicazioni cliniche specifiche, è una piattaforma basata sulla consolidata metodologia della Comparative Genomic Hybridization mediante microarray (**array-CGH**). Questo test è stato sviluppato nell'ambito di un progetto multicentrico, specificamente per la diagnosi prenatale di microdelezioni/microduplicazioni in gravidanze a basso rischio, ad esempio in assenza di anomalie ecografiche, oppure di anomalie cromosomiche identificate mediante l'analisi cromosomica tradizionale oppure di storia familiare suggestiva di patologia cromosomica. La piattaforma permette di identificare **sindromi da microdelezione/microduplicazione** (vedi Tabella) congenite o riconoscibili entro i primi anni di vita e di rilevanza clinica per lo sviluppo del neonato. Inoltre il test permette di diagnosticare sbilanciamenti a significato clinico certo delle regioni subtelomeriche di tutti i cromosomi e delezioni e duplicazioni lungo l'intero genoma, di grandezza >2,5-3 Mb, integrando e supportando l'analisi cromosomica convenzionale.

Il disegno del test permette dunque di ottenere informazioni utili a proposito della prognosi fetale, minimizzando il rischio di riscontrare alterazioni genomiche dal significato clinico non chiaro e quindi difficili da interpretare, che invece possono essere identificate con piattaforme array-CGH a risoluzione ancora maggiore.

Si precisa che:

- Generalmente i risultati sono pronti in una settimana dal prelievo di liquido amniotico, fatta eccezione per i casi che richiedono la coltura cellulare (21 giorni circa). In rari casi, il tempo di refertazione può subire modifiche di pochi giorni in base alla necessità di eventuali ulteriori approfondimenti.
- La tecnica di array-CGH non è in grado di identificare riarrangiamenti cromosomici bilanciati (traslocazioni, inversioni, etc) e/o poliploidie, comunque identificabili mediante analisi cromosomica citogenetica tradizionale. Pertanto, le due tecniche sono da considerarsi complementari e la piattaforma *targetted* è da utilizzarsi in maniera integrativa, ma non sostitutiva, alla diagnosi cromosomica convenzionale. La refertazione dei risultati positivi può richiedere lo studio dell'eventuale trasmissione parentale delle varianti identificate. Pertanto, il campione biologico fetale deve essere sempre accompagnato da un campione ematico dei due genitori, se disponibili, suddiviso in due provette (una con eparina e una con EDTA). Gli effetti collaterali connessi al prelievo di sangue periferico sono infrequenti e generalmente di minima entità (esempi più frequenti: ematomi, lipotimia, piccole lesioni o infezioni locali). I campioni ematici saranno utilizzati solo se sarà necessario confrontare il profilo del feto con quello parentale.
- Non verranno considerate, nell'interpretazione dei risultati, le microdelezioni/microduplicazioni all'interno delle regioni subtelomeriche (<1Mb) non descritte in associazione a quadri sindromici, nè quelle all'interno delle regioni sindromiche che non siano francamente causative della malattia.
- A fronte delle circa 6.000 malattie genetiche note, la piattaforma genomica fornisce unicamente informazioni sulle microdelezioni o microduplicazioni delle regioni analizzate al livello di risoluzione della piattaforma e non sulle malattie causate da meccanismi patogenetici differenti (es. mutazioni

puntiformi, effetti di posizione, etc.) a carico dei geni-malattia localizzati sia all'interno delle regioni analizzate sia altrove. Inoltre, un risultato negativo non esclude l'insorgenza di condizioni genomiche, se causate da microsbilanciamenti in regioni scarsamente rappresentate nella piattaforma.

Syndrome*	Gene-disease*
1p36 deletion syndrome	/
1q41q42 microdeletion syndrome	DISP1
2p15-16.1 microdeletion syndrome	BCL11A
2q23.1 microdeletion syndrome	MBD5, EPC2
2q33.1 deletion (Glass syndrome)	STAB2
2q37 deletion syndrome	HDAC4
3pter-p25 deletion syndrome	CNTN4, ITPR1, SRGAP3, VHL
3q29 deletion syndrome	FBXO45, PAK2, DLG1
3q29 duplication syndrome	FBXO45, PAK2, DLG1
4p16.3 deletion syndrome (Wolf-Hirschhorn)	LETM1, WHSC1
4q21 deletion syndrome	PRKG2, RASGEF1B
5p deletion syndrome (Cri du chat)	CTNND2, TERT
5q14.3 deletion syndrome	MEF2C
5q35 deletion syndrome (Sotos)	NSD1
6q13-q14 deletion syndrome	COL12A1
7q11.23 deletion syndrome (Williams-Beuren)	ELN
7q11.23 duplication syndrome	/
8p23.1 deletion syndrome	GATA4
8p23.1 deletion syndrome	GATA4
8q21.11 microdeletion Syndrome	ZFXH4, PEX2
8q24.1 deletion syndrome (Langer-Giedion)	TRPS1, EXT1
9q34.3 deletion syndrome (Kleefstra)	EHMT1
10p14p13 deletion syndrome (DiGeorge type 2)	GATA3
11p13 deletion syndrome (WAGR)	PAX6, WT1
11p11.2 deletion syndrome (Potocki-Shaffer)	ALX4
11q deletion syndrome (Jacobsen)	/
14q12 microdeletion syndrome	FOXP1
15q11q13 deletion syndrome (Prader-Willi)	SNRPN
15q11q13 deletion syndrome (Angelman)	UBE3A
15q24 deletion syndrome	/
15q24 duplication syndrome	/
16p deletion syndrome (ATR-16)	HBA1, HBA2
16q24.1 micorodeletion syndrome	FOXF1, FOXC2
17p13.3 deletion syndrome (Miller dieker)	PAFAH1B1, YWHAE
17p11.2 deletion syndrome (Smith-Magenis)	RAI1
17p11.2 duplication syndrome (Potocki-Lupski)	RAI1
17q11.2 deletion syndrome	NF1, SUZ12
17q11.2 duplication syndrome	NF1, SUZ12
17q21.31 deletion syndrome (Koolen-De Vries)	KANSL1
17q23.1-q23.2 deletion syndrome	TBX2, TBX4
19q13.11 deletion syndrome	LSM14A, UBA2
Down Sndrome critical region (21q22.12q22.2)	/
22 partial tetrasomy (Cat-eye syndrome)	/
22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge)	HIRA, TBX1
22q11.2 duplication syndrome	HIRA, TBX1
22q11.2 distal deletion syndrome	MAPK1
Xp11.3 deletion syndrome	RP2
Xp11.22 microduplication syndrome	HUWE1
Xq12 deletion syndrome	OPHN1
Xq22.3 deletion syndrome (AMME COMPLEX)	COL4A5, ACS4
Xq28 duplication syndrome	MECP2

*Selezionate tra le sindromi determinate da microdelezioni e microduplicazioni genomiche nella maggioranza dei casi descritti e caratterizzate da elevata penetranza (numero di individui portatori che manifestano il fenotipo).

Consenso

Il/La/i sottoscritto/a/i:

_____ (Madre)

_____ (Padre)

DICHIARA, di avere avuto il tempo e la possibilità di rivolgere tutte le domande e di avere ricevuto risposte esaurienti e comprensibili su caratteristiche, potenzialità, limiti del test array-CGH prenatale , pertanto:

Acconsento

NON Acconsento

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

Luogo e Data _____

Firma _____ (Madre)

Firma _____ (Padre)

Acconsento

NON Acconsento

al trattamento dei dati personali e sensibili Art. 13,79 e 81 del D.Lgs 196/2003, dichiaro inoltre di aver ricevuto l'informativa, a norma dell'art.13 e di aver preso atto dei diritti di cui all'art.7 del D.Lgs 196/2003 ed esprimo il consenso al trattamento dei dati personali che mi riguardano

Luogo e Data _____

Firma _____ (Madre)

Firma _____ (Padre)

Nome leggibile (e/o timbro) e firma dello Specialista che ha raccolto il consenso: _____

Riferimenti bibliografici:

- ✓ Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler 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*;86:749-764.
- ✓ Alesi A, Bernardini L, Goidin D, Canestrelli M, Dentici ML, et al. (2015) Easychip 8x15k: A New Tool for Detecting Chromosome Anomalies in Low Risk Pregnancies, Supporting and Integrating Standard Karyotype. *J Genet Syndr Gene Ther* 6: 277.

ALLEGATO 3

Facsimile CONSENSO INFORMATO ALLA DIAGNOSI CITOGENETICA PRENATALE SU VILLI CORIALI

(DA FAR COMPILARE ALLA PAZIENTE)

- L'indagine citogenetica prenatale su villi coriali ha lo scopo di accertare la presenza di anomalie cromosomiche visibili a livello della risoluzione delle metafasi .
- Numerosi difetti congeniti e malformazioni non associate ad anomalie cromosomiche , non possono essere diagnosticati con l'analisi citogenetica prenatale. Il risultato dell'analisi consente di solito di stabilire precise correlazioni tra il cariotipo e le sue implicazioni cliniche (ad es. trisomia 21 e ritardo mentale). Tuttavia in alcuni casi , le implicazioni di una anomalia non possono essere stabilite con sicurezza (ad es. alcune aneuploidia dei cromosomi sessuali che di solito si associano ad uno sviluppo psico-fisico normale [XXX,XY]; alcune anomalie in mosaico; le traslocazioni non familiari; alcuni piccoli cromosomi in sovrannumero)
- I criteri utilizzati per l'indagine citogenetica sono quelli raccomandati dalle linee guida della Società Italiana di Genetica Umana 2013 e del Gruppo Europeo di Studio Diagnosi Prenatale
- L'analisi congiunta del preparato mediante tecnica diretta e con coltura ottimizza l'accuratezza della diagnosi. Infatti una diagnosi basata sulla sola tecnica diretta produce circa 2% di risultati falsi positivi e 1/10000 falsi negativi .
- Le differenze nell'origine embrionale delle cellule utilizzate nell'allestimento dei preparati con le due tecniche giustifica la possibilità di discrepanze nei risultati dei due preparati. In caso di discrepanza si rende necessario l'approfondimento diagnostico sugli amniociti e/o sui linfociti del sangue fetale.
- L'impossibilità di raggiungere una diagnosi può verificarsi in rari casi , in genere per l'inadeguatezza del campione dei villi coriali (ad es. quantità ridotta) .
- E' possibile che l'interpretazione del risultato richieda l'analisi citogenetica dei genitori, di un altro tessuto fetale e/o eventualmente l'uso di indagini molecolari
- La qualità dei preparati cromosomici garantisce la possibilità di individuare anomalie solo a livello di risoluzione metafase (non meno di 320-400 bande) .
- **La possibilità di errore diagnostico (<2%) può essere correlato alla discordanza tra il risultato e la contaminazione materna del campione, cioè la presenza nel prelievo insieme alle cellule fetali , anche di cellule materne (che forniscono perciò informazioni sul cariotipo della madre); i mosaicismi molto diluiti (se la linea patologica e' presente solo in una piccola percentuale del campione può non essere individuata sulle cellule analizzate); i mosaicismi confinati alla placenta; la presenza di piccole anomalie cromosomiche al di sotto della risoluzione standard [l'analisi cromosomica si effettua sulle metafasi ad una risoluzione di circa 320-400 bande, che non consente di identificare i riarrangiamenti di struttura molto piccoli, che eventualmente possono essere riconosciuti con le tecniche ad alta risoluzione, indagini di citogenetica molecolare o ad alta specializzazione (es. array CGH); tali tecniche non sono utilizzate di routine nella diagnosi citogenetica prenatale, ma possono essere indicate in gravidanze a rischio, come, ad esempio, quelle con anomalie ecografiche fetali].” Ulteriori informazioni possono essere, eventualmente, acquisite attraverso uno specifico documento.**
- Per escludere la contaminazione materna del campione e' necessario ottenere un prelievo ematico (circa 3 ml di sangue in EDTA) della gestante.
- Il referto dell'esame diretto e' disponibile entro 7 giorni dalla data di arrivo del campione al laboratorio, l'analisi della coltura di trofoblasto entro 21 giorni . Questi tempi possono essere più lunghi quando il risultato dell'indagine richiede approfondimenti particolari (ad es. esame dei genitori, esame di altri tessuti, tecniche molecolari).
- L'eventuale materiale biologico residuo viene conservato per un anno solare successivo a quello dell'esame.

La sottoscritta:.....

acconsento **non acconsento** al trattamento dei dati personali e sensibili Art. 13,79 e 81 del D.Lgs 196/2003, dichiaro inoltre di aver ricevuto l'informativa, a norma dell'art.13 e di aver preso atto dei diritti di cui all'art.7 del D.Lgs 196/2003 ed esprimo il consenso al trattamento dei dati personali che mi riguardano

Firma paziente:

Dichiara inoltre di avere avuto il tempo e la possibilità di rivolgere tutte le domande e di avere ricevuto risposte esaurienti e comprensibili, per tale ragione

acconsente **non acconsente** all'analisi sopra descritta.

Luogo e Data..... Firma paziente:.....

Nome leggibile (e/o timbro) e firma dello Specialista che ha raccolto il consenso:.....

ALLEGATO 4

Facsimile CONSENSO INFORMATO ALLA DIAGNOSI CITOGENETICA PRENATALE SU CELLULE DI LIQUIDO AMNIOTICO

(DA FAR COMPILARE ALLA PAZIENTE)

- L'indagine citogenetica prenatale ha lo scopo di accertare la presenza di anomalie cromosomiche numeriche e/o strutturali.
- I criteri utilizzati per l'indagine citogenetica sono quelli raccomandati dalle linee guida della Società Italiana Genetica Umana e del gruppo Europeo di Studio sulla Diagnosi Prenatale.
- La componente cellulare del liquido amniotico viene raccolta e suddivisa in più colture cellulari parallele ed indipendenti; il successo delle colture cellulari è in relazione al numero di cellule vitali presenti nel campione.
- L'impossibilità di pervenire ad una diagnosi può verificarsi in rarissimi casi, per motivi generalmente correlati ad una ridotta crescita delle cellule in coltura oppure alla massiva presenza di sangue o meconio.
- La componente cellulare del liquido amniotico è utilizzata per allestire colture cellulari per l'analisi cromosomica fetale (cariotipo); la componente liquida è utilizzata per indagini biochimiche (dosaggio dell'alfafetoproteina, in service presso un centro esterno qualificato e certificato). Le cellule non coltivate possono essere utilizzate per identificare aneuploidie dei cromosomi 13, 18, 21, X e Y in tempi brevi (48-72h) mediante test di QF-PCR (reazione a catena della polimerasi a fluorescenza quantitativa); questo accertamento, non costituisce un'alternativa all'analisi del cariotipo, ma un test integrativo, preliminare e parziale: solo il cariotipo eseguito con tecniche convenzionali permette la definizione dell'assetto cromosomico del feto
- Di solito i risultati diagnostici sono disponibili entro 21 giorni dalla data di arrivo del campione in laboratorio; tuttavia i tempi della crescita cellulare possono variare notevolmente da caso a caso.
- L'indagine fornisce informazioni unicamente sulle analisi eseguite e non esclude altra patologia dovuta a cause diverse.
- In presenza di alcune anomalie cromosomiche può essere necessario procedere ad approfondimenti diagnostici di tipo molecolare sul campione fetale e/o sui campioni biologici dei genitori o di altri familiari; In questa circostanza la paziente viene informata, in sede di consulenza genetica, riguardo alle possibilità di approfondimento diagnostico.
- La presenza nella coltura di anomalie cromosomiche in mosaico può richiedere accertamenti anche su altri tessuti, per stabilire se la linea patologica sia originata da una mutazione in coltura o sia costituzionale del feto. In rari casi questi approfondimenti non consentono di pervenire a conclusioni sicure.
- Il risultato consente di regola di stabilire precise correlazioni tra il cariotipo osservato e le sue implicazioni cliniche (ad es. trisomia 21 e ritardo mentale). Tuttavia in rari casi le implicazioni di una anomalia non possono essere stabilite con sicurezza (ad es. alcune aneuploidie dei cromosomi sessuali che di solito si associano ad uno sviluppo psico-fisico normale [XXX, XYY]; alcune anomalie in mosaico; le traslocazioni non familiari; alcuni piccoli cromosomi marcatori in sovrannumero).
- **La probabilità di errore diagnostico viene calcolata in meno di 1 su 1000. Le cause più comuni di errore sono la contaminazione materna del campione, cioè la presenza nel prelievo, insieme alle cellule fetali, anche di cellule materne (che forniscono perciò informazioni sul cariotipo della madre); i mosaicismi molto diluiti (se la linea patologica è presente solo in una piccola percentuale delle cellule del campione può non essere individuata sulle cellule analizzate); la presenza di anomalie di struttura molto piccole e comunque al di sotto della risoluzione standard [l'analisi cromosomica si effettua sulle metafasi ad una risoluzione di circa 400 bande, che non consente di identificare i riarrangiamenti di struttura molto piccoli, che eventualmente possono essere riconosciuti con le tecniche ad alta risoluzione, indagini di citogenetica molecolare o ad alta specializzazione (es. array CGH); tali tecniche non sono utilizzate di routine nella diagnosi citogenetica prenatale, ma possono essere indicate in gravidanze a rischio, come, ad esempio, quelle con anomalie ecografiche fetali]. Ulteriori informazioni possono essere, eventualmente, acquisite attraverso uno specifico documento.**
- Il materiale biologico residuo viene conservato per un anno solare successivo a quello dell'esame.

La sottoscritta:.....

acconsento **non acconsento** al trattamento dei dati personali e sensibili Art. 13,79 e 81 del D.Lgs 196/2003, dichiaro inoltre di aver ricevuto l'informativa, a norma dell'art.13 e di aver preso atto dei diritti di cui all'art.7 del D.Lgs 196/2003 ed esprimo il consenso al trattamento dei dati personali che mi riguardano da parte .

Firma paziente:

Dichiara inoltre di avere avuto il tempo e la possibilità di rivolgere tutte le domande e di avere ricevuto risposte esaurienti e comprensibili, per tale ragione

acconsente **non acconsente** all'analisi sopra descritta.

Luogo e Data..... Firma paziente:

Nome leggibile (e/o timbro) e firma dello Specialista che ha raccolto il consenso: