

Cos'è PrenatalSAFE® Karyo?

PrenatalSAFE® Karyo è un esame prenatale **non invasivo** che, analizzando il DNA fetale libero circolante isolato da un campione di sangue materno, rileva aneuploidie e alterazioni cromosomiche strutturali fetali a carico di **ogni cromosoma**, con risultati molto simili alla determinazione del **cariotipo fetale** eseguito con tecniche invasive di diagnosi prenatale.



Il test evidenzia sia aneuploidie fetali comuni in gravidanza, quali quelle relative al cromosoma **21 (Sindrome di Down)**, al cromosoma **18 (Sindrome di Edwards)**, al cromosoma **13 (Sindrome di Patau)** e dei cromosomi sessuali **X e Y** (quali per esempio la **Sindrome di Turner** o Monosomia del cromosoma X), che aneuploidie meno comuni (quali per esempio la **trisomia** dei cromosomi **9, 16, 22**) e **delezioni o duplicazioni segmentali**, rilevabili su tutti i cromosomi.

PrenatalSafe® Karyo Plus rappresenta un'evoluzione del test **PrenatalSafe® Karyo**, e aggiunge alle potenzialità di **PrenatalSafe® Karyo** la possibilità di individuare la presenza nel feto di alterazioni cromosomiche **strutturali** submicroscopiche, quali alcune comuni sindromi da **microdelezione**.

PrenatalSAFE® Karyo e Karyo Plus comprendono anche la determinazione del sesso fetale (opzionale).

PrenatalSAFE® Karyo e Karyo Plus sono integrati gratuitamente con il test **RhSafe®**, un esame prenatale non invasivo che, analizzando il DNA fetale isolato da un campione di sangue della gestante, consente di determinare il Fattore Rh(D) fetale. Il test **RhSafe®** è opzionale, e viene eseguito (su richiesta) in gestanti Rh(D) negative, con partner maschile Rh(D) positivo.

PrenatalSAFE® Karyo: anomalie cromosomiche fetali evidenziabili

ANEUPLOIDIE COMUNI

- **Trisomia 21 (Sindrome di Down)**
- **Trisomia 18 (Sindrome di Edwards)**
- **Trisomia 13 (Sindrome di Patau)**
- **Monosomia X (Sindrome di Turner)**
- **XXX (Trisomia X)**
- **XXY (Sindrome di Klinefelter)**
- **XYY (Sindrome di Jacobs)**

ALTRE ANEUPLOIDIE CROMOSOMICHE MENO FREQUENTI

- **Trisomia 1**
- **Trisomia 4**
- **Trisomia 5**
- **Trisomia 7**
- **Trisomia 9***
- **Trisomia 12**
- **Trisomia 16***
- **Trisomia 22***

* A maggiore incidenza tra le aneuploidie fetali meno frequenti. Il test **PrenatalSAFE® Karyo** consente di rilevare aneuploidie su tutti i cromosomi.

La presenza nel feto della **trisomia dei cromosomi 9, 16, 22**, nella forma completa, è incompatibile con la vita ed esita generalmente in aborti spontanei. Le forme a mosaico possono generare sopravvivenza postnatale.

ALTERAZIONI CROMOSOMICHE STRUTTURALI

In linea generale, il test **PrenatalSAFE® Karyo** consente di rilevare **Delezioni e Duplicazioni segmentali** a carico di ciascun cromosoma del cariotipo fetale.

PrenatalSafe® Karyo Plus consente di individuare la presenza nel feto di **9** tra le più comuni **sindromi da microdelezione**:

Sindrome da microdelezione	Regione cromosomica	Prevalenza (alla nascita)
Sindrome di DiGeorge	delezione 22q11.2	1/2.000 - 1/4.000
Sindrome Cri-du-chat	delezione 5p15.3	1/15.000 - 1/50.000
Sindrome di Prader-Willi	delezione 15q11.2	1/25.000
Sindrome Angelman	delezione 15q11.2	1/10.000 - 1/20.000
Sindrome da delezione 1p36	delezione 1p36	1/5.000 - 1/10.000
Sindrome di Wolf-Hirschhorn	delezione 4p16.3	1/20.000 - 1/50.000
Sindrome di Jacobsen	delezione 11q23-q24.3	1/100.000
Sindrome di Langer-Giedion	delezione 8q24.11-q24.13	1/200.000
Sindrome di Smith-Magenis	delezione 17p11.2	1/15.000 - 1/25.000

Tali sindromi presentano un'importanza clinica variabile a seconda del cromosoma coinvolto, della regione cromosomica interessata e delle relative dimensioni.

Tuttavia è consigliabile ricorrere all'utilizzo del **PrenatalSafe® Karyo Plus** solo in determinati contesti clinici (esempio dubbi ecografici suggestivi di sindrome da microdelezione cromosomica) per i quali risulta giustificato un approfondimento diagnostico di secondo livello.

Cosa sono le aneuploidie?

Le aneuploidie sono anomalie cromosomiche caratterizzate da alterazioni del numero dei cromosomi, cioè da un numero maggiore o minore di cromosomi rispetto al numero standard. Si parla, ad esempio, di **trisomia**, quando si riscontra la presenza di un cromosoma in più o di **monosomia**, quando si riscontra l'assenza di un cromosoma. In questi casi si parla di monosomia e trisomia completa, ma si possono verificare anche **monosomie/trisomie parziali**, per assenza o presenza in triplice copia di singoli segmenti di cromosoma.

Le **monosomie** complete sono incompatibili con la vita postnatale, l'eccezione è rappresentata dalla monosomia del cromosoma X, associata alla sindrome di Turner (**45,X**).

Le **trisomie** complete di alcuni cromosomi, come la trisomia 21 o sindrome di Down (**47,XX,+21**), trisomia 18 o sindrome di Edwards (**47,XX,+18**), trisomia 13 o sindrome di Patau (**47,XX,+13**) sono invece compatibili con la vita postnatale e sono associate a ritardo mentale e, talora, a malformazioni e difetti di crescita.

- **TRISOMIA 21:** E' causata dalla presenza di una copia in più del cromosoma 21 ed è anche conosciuta come **Sindrome di Down**. E' la causa genetica più comune di ritardo mentale. Si stima che la trisomia 21 sia presente in 1/700 nati.
- **TRISOMIA 18:** E' causata dalla presenza di una copia in più del cromosoma 18. Conosciuta anche come **Sindrome di Edwards**, si associa a una elevata abortività. E' causa di grave ritardo mentale. Neonati affetti da trisomia 18 hanno spesso difetti cardiaci congeniti, nonché altre condizioni patologiche che riducono la loro aspettativa di vita. Si stima che la trisomia 18 sia presente in 1/5.000 nati.
- **TRISOMIA 13:** E' causata dalla presenza di una copia in più del cromosoma 13. Nota anche come Sindrome di Patau, si associa a elevata abortività. Neonati affetti da trisomia 13 hanno numerosi difetti cardiaci e altre condizioni patologiche. La sopravvivenza oltre l'anno di età è rara. Si stima che la trisomia 13 sia presente in 1/16.000 nati.

- **ANEUPLOIDIE DEI CROMOSOMI SESSUALI:** Anche i cromosomi del sesso possono andare incontro a difetti numerici (47,XXY;47,XXX; 47,XYY) compatibili con la vita postnatale, ma spesso sono causa di una sintomatologia più lieve. Le più frequenti aneuploidie dei cromosomi sessuali sono le seguenti:

Sindrome di Turner o Monosomia X: E' la più frequente aneuploidia dei cromosomi sessuali. Questa sindrome è causata dalla mancanza di una copia del cromosoma X. Ne sono affette solo le donne, che presentano una statura inferiore alla media. Alcune hanno difetti cardiaci o renali, problemi di udito, o difficoltà di apprendimento.

Altre aneuploidie dei cromosomi sessuali riscontrabili con l'esame sono: **Trisomia X (XXX); Sindrome di Klinefelter (XXY); Sindrome di Jacobs (XYY)**.

Cosa sono le alterazioni cromosomiche strutturali?

Con il **PrenatalSAFE® Karyo** è inoltre possibile individuare anche **alterazioni di struttura** dei cromosomi.

Le **anomalie strutturali** originano dalla rottura di uno o più cromosomi e, poiché queste rotture possono teoricamente avvenire ovunque nel genoma, il numero di potenziali riarrangiamenti è praticamente infinito. Tali alterazioni provocano perdita/guadano di materiale genetico, perciò vengono identificate in soggetti con fenotipo clinico. I principali tipi di anomalie strutturali sono:

- 1) Le **delezioni**, che consistono nella perdita di un segmento di un cromosoma, che può essere terminale o interstiziale. Di solito le sindromi da delezione interessano segmenti relativamente grandi di cromosoma (> 10 Mb = Megabasi).

- 2) Le **duplicazioni** consistono nella presenza di due copie di un segmento di cromosoma, e pertanto costituiscono delle trisomie parziali.
- 3) Le **traslocazioni sbilanciate**, originano dalla rottura di due o, raramente, più cromosomi, con perdita o acquisizione di materiale cromosomico.

Cosa sono le Microdelezioni?

Le **sindromi da microdelezione** sono anomalie cromosomiche caratterizzate dalla perdita (microdelezione) di un tratto cromosomico di piccole dimensioni e, di conseguenza, dei geni localizzati su quel frammento cromosomico. Queste alterazioni causano sindromi di importanza clinica variabile a seconda del cromosoma coinvolto, della regione cromosomica interessata e delle relative dimensioni.

La **Sindrome di DiGeorge**, è una malattia causata da una delezione submicroscopia del braccio lungo del cromosoma 22 (regione cromosomica 22q11.2), ed è caratterizzata dall'insieme di diverse malformazioni: ipoplasia del timo e delle ghiandole paratiroidi, cardiopatia congenita e dimorfismi del viso caratteristici. La prevalenza è di 1/2.000-1/4.000 nati vivi. La maggior parte dei casi non è trasmessa per via ereditaria (de novo) ma si rileva la trasmissione da un genitore portatore di delezione 22q11 in ~7% dei casi.

Sindrome Cri-du-chat: è una malattia cromosomica dovuta alla delezione di una porzione variabile del braccio corto del cromosoma 5 (5p-). I segni clinici principali comprendono il pianto acuto monotono (da cui origina il nome della sindrome del "miagolio del gatto"), la microcefalia, tratti caratteristici del volto e il grave ritardo psicomotorio e mentale. L'incidenza varia tra 1/15.000 e 1/50.000 nati vivi. La maggior parte dei casi non è trasmessa per via ereditaria (de novo) ma la trasmissione da un genitore non malato portatore di una traslocazione bilanciata è rilevata in ~10% dei casi.

Sindrome di Prader-Willi/ Angelman: queste due sindromi coinvolgono lo stesso tratto cromosomico (regione critica 15q11.2-q13), ma presentano manifestazioni differenti a seconda se il cromosoma interessato è di origine materna o paterna.

La sindrome di **Prader-Willi** è una condizione caratterizzata principalmente da bassa statura, obesità, ipotonia muscolare, alterazioni endocrinologiche, dismorfismi del volto e ritardo di sviluppo psicomotorio. La malattia colpisce 1/25.000 nati.

La sindrome di **Angelman** è una malattia neurologica caratterizzata da grave ritardo mentale e dismorfismi facciali caratteristici. La sua prevalenza è stimata tra 1/10.000 e 1/20.000.

Sindrome da delezione 1p36: è un'anomalia cromosomica causata da una delezione eterozigote parziale della parte distale del braccio corto del cromosoma 1, con punti di rottura tra 1p36.13 e 1p36.33, caratterizzata da dismorfismi facciali tipici, ipotonia, ritardo dello sviluppo, deficit cognitivo, convulsioni, cardiopatie, sordità e ritardo della crescita a esordio prenatale. È considerata una delle più comuni sindromi da delezione cromosomica, con un'incidenza di 1/5.000-10.000 nati vivi. Nella maggior parte dei casi non è trasmessa per via ereditaria (de novo).

La **Sindrome di Wolf-Hirschhorn** è una malattia dello sviluppo, determinata da una delezione del braccio corto del cromosoma 4 (regione 4p16.3), e caratterizzata da segni craniofacciali caratteristici, ritardo della crescita prenatale e postnatale, deficit cognitivo, grave ritardo dello sviluppo psicomotorio, convulsioni e ipotonia. La prevalenza è di 1:50.000 nati. Interessa più spesso le femmine rispetto ai maschi (2:1). Nella maggior parte dei casi non è trasmessa per via ereditaria (de novo).

La **Sindrome di Jacobsen** è causata da una delezione del braccio lungo del cromosoma 11 (11q23). È caratterizzata da ritardo dello sviluppo, facies caratteristica, malattie emorragiche e alcuni disturbi del comportamento. La prevalenza è di 1:100.000 nati. Nella maggior parte dei casi non è trasmessa per via ereditaria (de novo).

La **Sindrome di Langer-Giedion** o sindrome tricinofalangeale tipo 2, è causata da una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 8 (regione 8q24.11-q24.13), che porta alla perdita di almeno due geni: TRPS1 e EXT1.. È caratterizzata da deficit cognitivo, associato a varie anomalie, compresa la cute ridondante, le esostosi cartilaginee multiple, la facies caratteristica e le epifisi falangeali "a cono". Sono stati descritti anche ritardo di crescita, microcefalia, ipotonia e problemi uditivi. Si trasmette come carattere autosomico dominante, ma sono stati descritti soprattutto casi sporadici.

La **Sindrome di Smith-Magenis** è una malattia genetica complessa con deficit cognitivo variabile, disturbi del sonno, anomalie craniofacciali e scheletriche, disturbi psichiatrici, ritardo motorio e del linguaggio. La prevalenza mondiale è di 1/15.000-25.000. Sono comuni il deficit cognitivo lieve-moderato, il ritardo significativo del linguaggio, la ridotta sensibilità al dolore, la neuropatia periferica, i disturbi del sonno (caratteristici) e i comportamenti disadattivi (capricci/scatti d'ira, ricerca costante dell'attenzione, aggressività, disobbedienza, distrazione e comportamenti autolesionistici). La SMS è una malattia sporadica da delezione 17p11.2 del gene RAI1 (retinoic acid-induced 1; 90%) o da mutazione del gene stesso (10%).

Il rischio di queste sindromi non è aumentato a causa dell'età, ma è, in assenza di storia familiare, lo stesso per tutte le coppie. La ragione per la quale è stato scelto di rappresentare in maniera specifica queste 9 patologie si basa sui seguenti criteri selettivi:

- frequenza relativamente alta nei nati vivi (1:4000' 1:200.000), rispetto ad altre sindromi rare;
- esistono mutazioni diverse dalle microdelezioni o microduplicazioni identificate dalla tecnica, ma nella maggior parte dei casi (>70%) per queste sindromi il meccanismo patogenetico è questo, ed è identificabile dalla tecnica;
- assenza di segni ecografici prima delle 26 settimane, quindi mancanza di segni che possano ragionevolmente indirizzare la diagnosi in modo specifico su sospetto clinico in assenza di storia familiare;
- elevata mortalità e morbilità alla nascita;
- quadro clinico e storia naturale post-natale noti, anche se in alcuni casi la penetranza è variabile e non sempre tutti i segni e sintomi descritti sono presenti.

Indicazioni al test PrenatalSAFE® Karyo

PrenatalSAFE® Karyo è indicato nei seguenti casi:

- Gravidanze in cui è controindicata la diagnosi prenatale invasiva (es. rischio di aborto spontaneo);
- Screening del primo trimestre (Bi-Test) positivo;
- Età materna avanzata (>35 anni);
- Positività ai test di screening del primo o secondo trimestre;
- Quadro ecografico di anomalie fetali suggestive di aneuploidia.
- Anamnesi personale/familiare di anomalie cromosomiche
- Partner(s) della coppia portatore di traslocazione bilanciata.

Chi può sottoporsi al test PrenatalSAFE® Karyo?

Tutte le donne in gravidanza con un'età gestazionale di almeno **10 settimane**.

Il test può essere utilizzato in caso di:

- **gravidanze singole**, ottenute mediante concepimento **naturale**;
- **gravidanze singole**, ottenute con tecniche di **fecondazione assistita omologhe**;
- **gravidanze singole**, ottenute con tecniche di **fecondazione assistita eterologhe**;
- **gravidanze gemellari**, ottenute mediante concepimento **naturale**;
- **gravidanze gemellari**, ottenute con tecniche di **fecondazione assistita omologhe**;
- **gravidanze gemellari**, ottenute con tecniche di **fecondazione assistita eterologhe**;
- precedenti gravidanze andate a termine;
- precedenti gravidanze esitate in aborto spontaneo o seguite da interruzione volontaria di gravidanza.

In cosa PrenatalSAFE® Karyo differisce da altri test prenatali non invasivi?

Il test PrenatalSAFE® Karyo è un esame diverso dai test di screening del primo e secondo trimestre. Questi sono test statistici indiretti che si basano su valutazioni di rischio a priori (età della gestante), riscontri ecografici sul feto e/o indagini biochimiche sul sangue materno. L'insieme di questi dati produce una percentuale di rischio di aneuploidia fetale.

PrenatalSAFE® Karyo, invece, è un'analisi diretta del DNA fetale circolante. Il test misura, con grande accuratezza, la quantità relativa di DNA fetale in tutti i cromosomi del cariotipo fetale, per rilevare l'eventuale presenza di aneuploidie fetali e alterazioni cromosomiche strutturali (delezioni/duplicazioni).

I test di screening del primo trimestre, a differenza di PrenatalSAFE®, hanno una percentuale di **falsi positivi** fino al **5%** e non rilevano il **5-15%** dei casi di trisomia 21 (falsi negativi).

Come viene effettuato il test PrenatalSAFE® Karyo?

Il test PrenatalSAFE® Karyo analizza il DNA fetale circolante nel sangue materno mediante tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) sofisticate analisi bioinformatiche.

Durante la gravidanza, alcuni frammenti del Dna del feto circolano nel sangue materno. Il DNA fetale consiste in corti frammenti di DNA (~145/200 bp), presenti nel plasma in percentuali variabili a seconda del periodo gestazionale, derivanti dai trofoblasti placentari. Tale DNA è rilevabile a partire dalla 5° settimana di gestazione; la sua concentrazione aumenta nelle settimane successive e scompare subito dopo il parto. La quantità di DNA fetale circolante dalla 9°-10° settimana di gestazione è sufficiente per garantire l'elevata specificità e sensibilità del test.

Il test viene eseguito mediante il prelievo di un campione ematico della gestante con un'età gestazionale di almeno **10 settimane**. Tramite un'analisi complessa di laboratorio, il DNA fetale libero circolante è isolato dalla componente plasmatica del sangue materno. Successivamente, attraverso un processo tecnologico avanzato, le **regioni cromosomiche del DNA fetale** circolante vengono sequenziate ad elevata profondità di lettura (~30 milioni di sequenze), mediante l'innovativa tecnologia di **sequenziamento massivo parallelo (MPS) dell'intero genoma fetale**, utilizzando sequenziatori *Next Generation Sequencing (NGS) ILLUMINA*. Le sequenze cromosomiche vengono quindi

Pagina 4 di 10

quantificate attraverso una **sofisticata analisi bioinformatica**, per determinare la presenza di eventuali aneuploidie cromosomiche fetali, identificate da un sovrannumero di sequenze allineabili ad uno specifico cromosoma.

PrenatalSAFE® Karyo: determinazione della frazione fetale e limit of detection della metodica

La **frazione fetale (FF)**, cioè la quantità di cfDNA fetale rilevata nel campione di plasma analizzato rispetto al cfDNA totale, è un parametro importante da determinare durante l'esecuzione dei test NIPT, in quanto a FF molto basse le aneuploidie potrebbero non essere rilevabili, e quindi produrre risultati falsi negativi.

Per ridurre tale rischio, alcune metodiche NIPT attualmente in uso utilizzano un **cut-off del 4%** di frazione fetale. A valori di FF inferiori a tale **cut-off**, viene refertato un **risultato non conclusivo** a causa di bassa quantità di DNA fetale e viene richiesto un **nuovo prelievo**.

Il limite di FFe4% necessario per refertare un risultato è stato determinato utilizzando un modello statistico, e non tramite studi di validazione che determinano l'effettivo Limit of Detection (LOD) della metodica NIPT, cioè la più bassa FF alla quale è possibile rilevare un'aneuploidia.

Un recente studio condotto da Genoma (Fiorentino et al. 2016), ha avuto l'obiettivo di determinare l'effettivo LOD del test Prenatalsafe per la trisomia 21, 18 e 13 e di valutare la *performance* del test a basse frazioni fetali (<4%) su campioni clinici.

Lo studio ha dimostrato che le principali aneuploidie cromosomiche possono essere rilevate in modo affidabile dal test Prenatalsafe a **FFe2%**. Ciò ha consentito di **ridurre l'incidenza dei risultati non conclusivi a causa di bassa frazione fetale**, dal 8.7% (se si fosse utilizzato un **cut-off** del 4% di FF), al 2.2% (utilizzando un **cut-off** del 2% di FF).

Inoltre, se si fosse utilizzando il **cut-off** FF>4%, il **23,8%** delle aneuploidie non sarebbero state rilevate.

Lo stesso studio ha evidenziato che **l'incidenza delle aneuploidie è 6 volte più elevata** nei campioni con bassa frazione fetale (2%<FF<4%) rispetto a quelli con FF>4%. Un aumentata incidenza di aneuploidie cromosomiche, **da 4 a 10 volte**, è stata riportata anche da altri studi in campioni con risultato non conclusivo a causa di bassa frazione fetale (<4%). Quindi, **utilizzando il cut-off FF>4%, si escludono dall'analisi i campioni a rischio maggiore di aneuploidia**.

Risultati ottenibili

“POSITIVO“ – Presenza di aneuploidia o alterazione cromosomica strutturale: indica che il test ha rilevato nel feto un'aneuploidia o un'alterazione cromosomica strutturale a livello di uno (o più) dei cromosomi investigati. L'affidabilità del risultato viene riportato nella sezione “Risultati” del referto e nella sezione “Accuratezza del test” della relazione tecnica. Tale risultato indica che il feto presenta una specifica anomalia cromosomica, ma non assicura che il feto abbia tale condizione. Il *follow-up* consigliato è un test di diagnosi prenatale invasiva, come il prelievo dei villi coriali (Villocentesi) o l'Amniocentesi. Il nostro genetista (o in generale uno specialista in genetica), in sede di consulenza genetica, vi spiegherà in maniera dettagliata il risultato del test e vi consiglierà di confermare il risultato mediante diagnosi prenatale invasiva. In nessun modo è possibile avvalersi della Legge 194/78 sulla interruzione volontaria della gravidanza senza prima aver confermato il risultato del test mediante amniocentesi o villocentesi.

“NEGATIVO” - Assenza di aneuploidia o alterazione cromosomica strutturale: indica che il test non ha rilevato la presenza di aneuploidie o alterazioni cromosomiche strutturali a livello dei cromosomi esaminati. L'affidabilità del risultato viene riportato nella sezione “Risultati” del referto e nella sezione “Accuratezza del test” della relazione tecnica. Tale risultato indica che il feto non presenta aneuploidie o alterazioni cromosomiche strutturali a livello dei cromosomi investigati, ma non assicura che il feto sia sano per tali anomalie. Infatti, a causa della fisiologia placentare, tale risultato potrebbe non riflettere un reale stato di normalità del feto.

In alcuni casi (circa il 2%) il test potrebbe produrre un **risultato non ottimale o non conclusivo**. In tali evenienze verrà richiesto alla gestante il prelievo di un nuovo campione ematico al fine di ripetere l'esame. Anche dopo la ripetizione, il test potrebbe non produrre un risultato conclusivo. In questi casi, è consigliato di ricorrere a metodi di diagnosi prenatale alternativi, quali per esempio l'amniocentesi o la villocentesi, in quanto in letteratura scientifica è stato riportato un aumento dell'incidenza di aneuploidie fetali nei campioni con risultato non conclusivo, per esempio a causa di bassa frazione fetale.

In altri casi, l'esame potrebbe fornire un risultato che indica un **sospetto** di presenza di aneuploidia o alterazione cromosomica strutturale (**risultato borderline**). In tale evenienza verrà consigliato di confermare il risultato mediante diagnosi prenatale invasiva, così come per il risultato positivo.

Nel caso in cui venga richiesta l'analisi del sesso del feto, può essere fornito anche questo risultato.

Nelle **gravidanze gemellari**, verrà riportato un unico risultato per entrambi i feti. Il sesso fetale, in queste gravidanze, viene indicato come maschile o femminile, basandosi sulla presenza o assenza del cromosoma Y.

Accuratezza del test

L'esame ha dimostrato, in studi di validazione preclinica, un'attendibilità superiore al **99%** nel rilevare le aneuploidie cromosomiche comuni in gravidanza (**trisomia 21, trisomia 18, trisomia 13, Monosomia X**), con percentuali di falsi positivi **<0.1%**. Sebbene l'errore del test sia molto basso, tuttavia non è escludibile.

Di seguito si riportano le performance del test **PrenatalSAFE® Karyo** nella **casistica clinica**:

Performance PrenatalSAFE® Karyo: Casistica Clinica con Follow-up (aggiornamento Dicembre 2017)

	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13	SCA	Trisomie Rare	CNV
Sensibilità (95% CI)	100.00% (98.76% - 100.00%)	100.00% (94.22% - 100.00%)	100.00% (88.78% - 100.00%)	100.00% (97.45% - 100.00%)	100.00% (84.56% - 100%)	100.00% (84.56% - 100%)
Specificità (95% CI)	99.99% (99.98% - 100.00%)	99.99% (99.98% - 100.00%)	99.99% (99.97% - 100.00%)	99.93% (99.90% - 99.95%)	99.97% (99.95% - 99.99%)	99.97% (99.95% - 99.99%)
PPV (95% CI)	98.99% (96.94% - 99.67%)	95.38% (86.95% - 98.46%)	88.57% (74.42% - 95.38%)	84.62% (78.93% - 88.98%)	66.67% (52.55% - 78.31%)	68.75% (54.21% - 80.35%)
NPV (95% CI)	100.00% (99.98% - 100.00%)	100.00% (99.98% - 100.00%)	100.00% (99.97% - 100.00%)	100.00% (99.90% - 100.00%)	100% (99.95% - 100.00%)	100% (99.95% - 100%)

PPV: Valore Predittivo Positivo; NPV: Valore Predittivo Negativo; SCA: aneuploidie dei cromosomi sessuali; CNV: Copy Number Variation (alterazioni cromosomiche strutturali). Dati aggiornati da Fiorentino et al., Prenat Diagn 2017;37:593-601.

Limiti del test

L'esame prenatale non invasivo che analizza il DNA fetale libero circolante isolato da un campione di sangue materno è un **test di screening** e non è un **test diagnostico**. Benché questo test sia molto accurato, **i risultati non sono diagnostici** e devono essere valutati nel contesto del quadro clinico della gestante e dell'anamnesi familiare. Inoltre, l'esame **non è sostitutivo** della diagnosi prenatale invasiva (Villocentesi o Amniocentesi).

Il test è stato validato su gravidanze singole o gemellari, monozigotiche o dizigotiche, con almeno 10 settimane di gestazione.

Il test **PrenatalSAFE® Karyo** non può escludere la presenza di tutte le anomalie cromosomiche fetali. L'esame evidenzia il **92,6%** delle anomalie cromosomiche fetali rilevabili in epoca prenatale e il **96,2%** di quelle riscontrate alla nascita.

Il test **PrenatalSAFE® Karyo Plus** evidenzia il **95,5%** delle anomalie cromosomiche fetali rilevabili in epoca prenatale e il **99,1%** di quelle riscontrate alla nascita.

Il test **PrenatalSAFE® Karyo** non è in grado di evidenziare riarrangiamenti cromosomici bilanciati, mosaicismi cromosomici fetali e/o placentari (cioè la presenza di due linee cellulari con differente assetto cromosomico), mutazioni puntiformi, difetti di metilazione, poliploidie. Il test non evidenzia altre malformazioni o difetti non specificamente ricercati. In particolare, l'esame non evidenzia la presenza di malattie genetiche ereditarie a trasmissione mendeliana.

Il test **PrenatalSAFE® Karyo** evidenzia le alterazioni cromosomiche strutturali, con un limite di risoluzione stimato di circa 10 Mb, mentre il test **PrenatalSAFE® Karyo Plus** evidenzia alterazioni cromosomiche strutturali ad una risoluzione di circa 7 Mb.

Nelle **gravidanze gemellari** non è possibile distinguere la condizione del singolo feto, né di valutare le aneuploidie dei cromosomi sessuali. E' tuttavia possibile riscontrare la presenza/assenza del cromosoma Y. Nel caso in cui venga individuata la presenza del cromosoma Y, non è possibile discernere se solo uno o entrambi i feti siano di sesso maschile. Nelle gravidanze che sono iniziate come gemellari o plurime, seguite dall'aborto spontaneo di uno o più feti con riassorbimento della camera gestazionale (**vanishing twin**), potrebbe essere presente nel sangue materno anche il DNA fetale libero del feto abortito. Ciò potrebbe interferire nella qualità dei risultati, determinando falsi positivi nel caso in cui la causa dell'aborto sia dovuta alla presenza nel suddetto feto di aneuploidie cromosomiche a carico di uno dei cromosomi investigati. Similmente, potrebbe determinarsi una incongruenza nei risultati del sesso (es. diagnosi di sesso maschile, in cui la presenza del cromosoma Y è originata dal DNA feto abortito).

Nei casi di **gravidanze pregresse**, esitate in aborto spontaneo di uno o più feti o aborto terapeutico a causa di diagnosi di feto affetto da cromosomopatia, potrebbe essere presente nel sangue materno anche il DNA fetale libero del feto abortito. Ciò potrebbe interferire nella qualità dei risultati, determinando falsi positivi nel caso in cui la causa dell'aborto fosse dovuta alla presenza nel suddetto feto di aneuploidie cromosomiche a carico di uno dei cromosomi investigati. Similmente, potrebbe determinarsi una incongruenza nei risultati del sesso (es. diagnosi di sesso maschile, in cui la presenza del cromosoma Y è originata dal DNA feto abortito).

L'esistenza di una condizione tumorale (**metastasi**) nella gestante potrebbe determinare risultati del test falsi positivi.

Il test è basato sulla quantificazione dei frammenti di DNA fetale libero circolante nel sangue materno, che sono di origine placentare. Pertanto, a causa di condizioni di **mosaicismo cromosomico** (frequenza: 1-2%) potrebbero esservi discordanze nei risultati (falsi positivi o falsi negativi) che giustificano la sensibilità e specificità del test <100%. In particolare, il test potrebbe produrre un risultato positivo (aneuploidia rilevata), ma tale anomalia cromosomica potrebbe essere confinata alla placenta a causa del mosaicismo cromosomico, e quindi il feto potrebbe infine risultare con cariotipo normale al controllo in diagnosi prenatale invasiva (**falso positivo**). Viceversa, il test potrebbe produrre un

risultato negativo (aneuploidia non rilevata), ma a causa del mosaicismo cromosomico il DNA fetale privo di aneuploidia potrebbe essere confinato alla placenta, e quindi il feto potrebbe infine risultare con cariotipo aneuploide al controllo in diagnosi prenatale invasiva (**falso negativo**).

Il sesso fetale viene indicato come maschile o femminile, basandosi sulla presenza o assenza del cromosoma Y, ma non dà informazioni sulla presenza o assenza del gene SRY.

Le gravidanze con **riscontri ecografici suggestivi di patologia fetale** dovrebbero essere studiate con altri tipi di indagini prenatali, quali il **cariotipo fetale molecolare** su villi coriali o liquido amniotico, in considerazione del maggiore *detection rate*.

Esiste la possibilità di identificare con questo test, anomalie dei cromosomi sessuali presenti nella madre (omogenee o a mosaico) che possono interferire con l'accuratezza dei risultati riguardanti i cromosomi sessuali fetali.

Un risultato **“NEGATIVO - Assenza di aneuploidia o alterazione cromosomica strutturale”** riduce notevolmente le possibilità che il feto abbia una aneuploidia o un'alterazione cromosomica strutturale a livello dei cromosomi esaminati, ma **non può garantire** che i cromosomi siano effettivamente normali o che il feto sia sano.

Non è possibile eseguire questo test a donne portatrici esse stesse di aneuploidie.

Per i limiti sopra esposti, in caso di risultato positivo si raccomanda di eseguire un colloquio con un genetista e la conferma del risultato attraverso l'analisi del cariotipo su liquido amniotico.

PrenatalSAFE® Karyo: Tempi di Refertazione

I tempi stimati di refertazione sono di circa **3-7 giorni** lavorativi, a seconda del tipo di test effettuato:

Tipo di esame	Procedura FAST	Procedura STANDARD
PrenatalSAFE® Karyo	~3 gg.	~5 gg.
PrenatalSAFE® Karyo Plus	Non Eseguitabile	~7 gg.

I tempi di refertazione, tuttavia, non sono perentori e potrebbero prolungarsi in caso di ripetizioni dell'esame, risultati non ottimali, approfondimenti dell'esame o dubbi interpretativi.

Alternative diagnostiche prenatali

L'esame prenatale non invasivo che analizza il DNA fetale presente nel sangue materno, è solo una delle opzioni per la gestante per determinare il rischio di patologie cromosomiche durante la gravidanza. Esistono diversi altri screening effettuabili in questo periodo. In particolare, un'indagine citogenetica (cariotipo fetale tradizionale) o molecolare (cariotipo fetale molecolare) più approfondita può essere ottenuta mediante “diagnosi prenatale invasiva”, che può essere eseguita su villi coriali o liquido amniotico.

Il prelievo dei villi coriali (tessuto placentare che, pur essendo separato dal feto, ne contiene lo stesso DNA), o villocentesi, è effettuato tra la 11^a e la 12^a settimana di gestazione e consiste nel prelievo, sotto controllo ecografico, di un piccolo campione di villi coriali mediante una puntura attraverso l'addome materno. Tale prelievo comporta un rischio di aborto inferiore al 2%. Il cariotipo fetale viene condotto sulle cellule fetali (o dal DNA estratto da queste cellule) contenute nei villi coriali.

Il prelievo del liquido amniotico o amniocentesi viene eseguito mediante puntura transaddominale ecoguidata tra la 16^a e la 18^a settimana di gravidanza e comporta un rischio di aborto inferiore all'1%. In questo caso, il cariotipo fetale viene condotto sulle cellule fetali (o dal DNA estratto da queste cellule) presenti nel liquido amniotico. Le suddette indagini possono inoltre fornire un'analisi cromosomica completa del feto e sono fortemente raccomandate, in particolar modo, alle gestanti con età superiore ai 35 anni.

Confronto del *detection rate* tra PrenatalSAFE® e cariotipo fetale

Il test **PrenatalSAFE® 3 e 5** permettono di evidenziare, rispettivamente, il **71%** e l'**83.1%** delle anomalie cromosomiche riscontrabili in gravidanza.

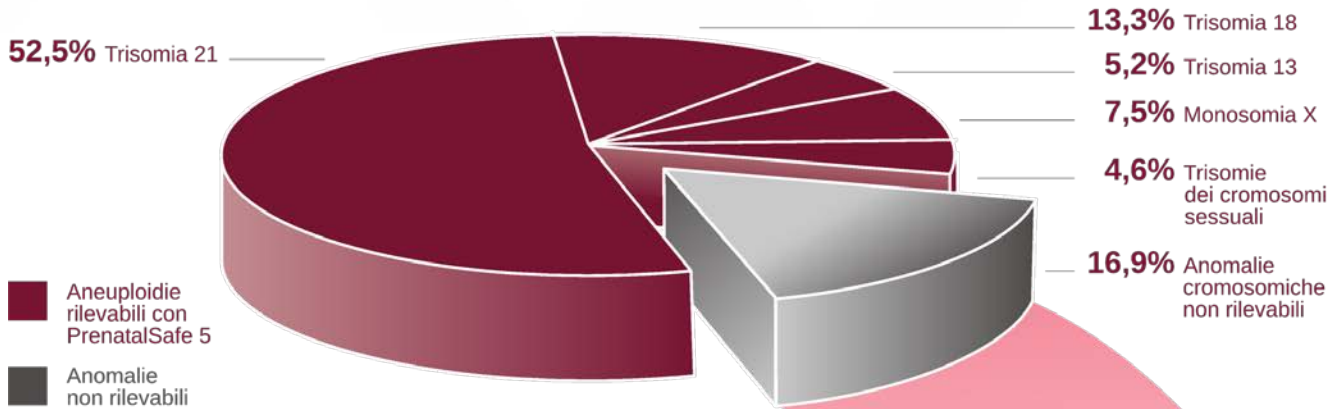
Con test **PrenatalSAFE® Plus** il *detection rate* diviene l'**86%**.

Il **PrenatalSAFE® Karyo**, invece, consente di rilevare il **92.6%** delle anomalie cromosomiche evidenziabili in gravidanza ed il **96.2%** di quelle riscontrate alla nascita.

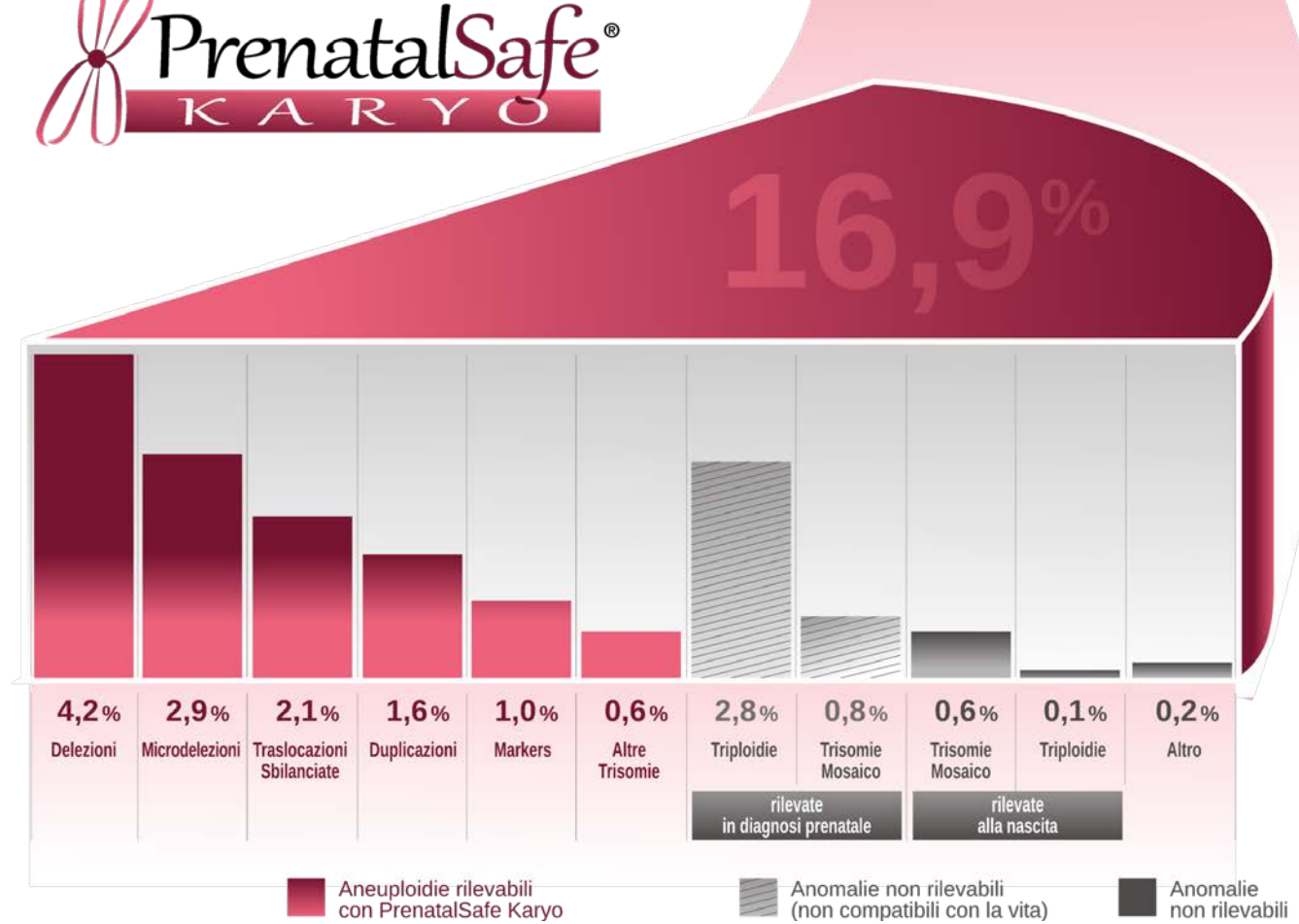
Il test **PrenatalSAFE® Karyo Plus** evidenzia il **95.5%** delle anomalie cromosomiche fetali rilevabili in epoca prenatale e il **99.1%** di quelle riscontrate alla nascita, raggiungendo un livello di *detection rate* molto simile a quello del **cariotipo fetale tradizionale (96.9%)**, ottenuto mediante tecniche di diagnosi prenatale invasiva.

Il **cariotipo fetale molecolare** – array-CGH (l'esame prenatale considerato il *gold standard*) eseguito su cellule fetali prelevate con amniocentesi o villocentesi, permette di rilevare il **99.8%** delle anomalie cromosomiche riscontrabili in gravidanza. (Wellesley, D, et al., 2012; Wapner et al., 2012; Fiorentino et al., 2011; 2013).

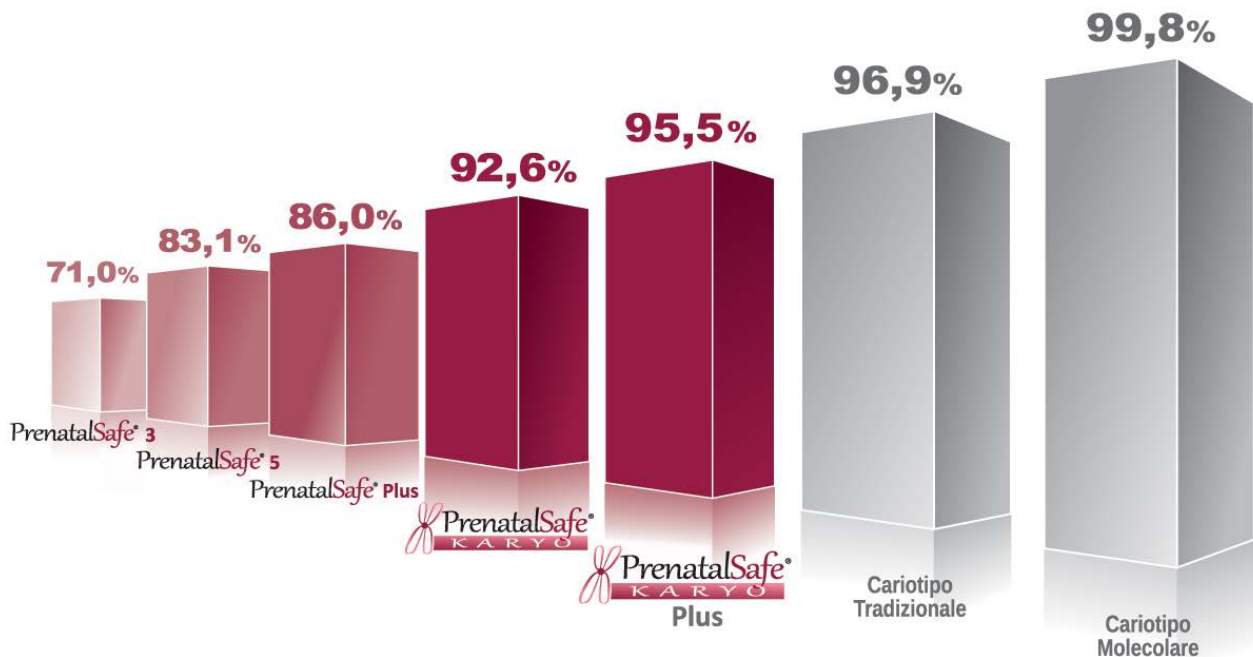
Incidenza aneuploidie rilevabili con PrenatalSafe® 5



Incidenza aneuploidie cromosomiche aggiuntive rilevabili con PrenatalSafe® KARYO



Confronto del *detection rate* di anomalie cromosomiche tra il test PrenatalSAFE®, a diversi livelli di approfondimento, e cariotipo fetale



Wellesley et al. (2012) *European Journal of Human Genetics* 20:521–526

Bibliografia

1. Bianchi DW, Parsa S, Bhatt S, Halks-Miller M, Kurtzman K, Sehnert AJ, Swanson A. Fetal sex chromosome testing by maternal plasma DNA sequencing: clinical laboratory experience and biology. *Obstet Gynecol.* 2015 Feb;125(2):375-82.
2. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, Craig JA, Chudova DI, Devers PL, Jones KW, Oliver K, Rava RP, Sehnert AJ; CARE Study Group. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med.* 2014 Feb 27;370(9):799-808.
3. Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem.* 2014 Jan;60(1):243-50.
4. Bianchi DW, Prosen T, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Rava RP, Sehnert AJ; Maternal Blood is Source to Accurately diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group. Massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in 113 cases of fetal nuchal cystic hygroma. *Obstet Gynecol.* 2013 May;121(5):1057-62.
5. Futch T, Spinosa J, Bhatt S, de Feo E, Rava RP, Sehnert AJ. Initial clinical laboratory experience in noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy from maternal plasma DNA samples. *Prenat Diagn* 2013, 33, 569–574.
6. Srinivasan et al. Noninvasive Detection of Fetal Subchromosome Abnormalities via Deep Sequencing of Maternal Plasma *American Journal of Human Genetics* 2013, 92:167-176
7. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012;119:890–901.
8. Sehnert AJ, Rhee B, Comstock D, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem* 2011;57:1042–9.
9. Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F, Mariano M, Polverari A, Duca S, Cottone G, Nuccitelli A, Sessa M, Baldi M, Diano L, Spinella F. The importance of determining the limit of detection of non invasive prenatal testing methods. *Prenat Diagn* 2016 Apr;36(4):304-11.

Tween Pregnancy

10. Clinical laboratory experience with noninvasive prenatal testing in twin gestations. Poster presentation from the 2015 Annual Meeting of the Society for Maternal- Fetal Medicine.
11. Verinata Health, Inc. (2012) Analytical Validation of the veriFi Prenatal Test: Enhanced Test Performance For Detecting Trisomies 21, 18 and 13 and the Option for Classification of Sex Chromosome Status. Redwood City, CA

Studi di Validazione e determinazione della LOD del test PrenatalSAFE®

12. Fiorentino F, Spinella F, Bono S, Pizzuti F, Mariano M, Polverari A, Duca S, Cottone G, Nuccitelli A, Sessa M, Baldi M. Feasibility of noninvasive prenatal testing for common fetal aneuploidies in maternal serum with low levels circulating fetal cell-free DNA fraction. *Prenat Diagn 2015; 35 Suppl. 1: pag 1*
13. S. Bono, F. Pizzuti, M. Mariano, A. Polverari, S. Duca, G. Cottone, A. Nuccitelli, M. Sessa, F. Spinella, M. Baldi, F. Fiorentino. Massively Parallel Sequencing (MPS) reliably identifies trisomy 21, 18, and 13 in maternal plasma with low-level fetal cell-free DNA fractions. Poster presentation from the European Society of Human Genetics (ESHG) meeting Glasgow 2015.
14. Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F, Mariano M, Polverari A, Duca S, Cottone G, Nuccitelli A, Sessa M, Baldi M, Diano L, Spinella F. The importance of determining the limit of detection of non invasive prenatal testing methods. *Prenat Diagn 2016 Apr;36(4):304-11.*

Studi di Validazione PrenatalSAFE® Plus, PrenatalSAFE® Karyo e PrenatalSAFE® Karyo Plus

15. Chen et al. *Prenat Diagn* 2013; 33:584–590
16. Yu et al. *PLoS One* 2013 17;8(4):e60968
17. Srinivasan et al. *Am J Hum Genet* 2013; 92:167-176.
18. Zhao et al. *Clin Chem* 2015; 61:608-616
19. Bayindir et al., *Eur J Hum Genet* 2015; 23:1286-1293.
20. Helgeson et al. *Prenat Diagn* 2015; 35:999–1004
21. Lefkowitz et al., *Am J Obstet Gynecol.* 2016
22. Fiorentino et al., ESHG conference 2016, poster presentation
23. Fiorentino et al., ISPD conference 2016, poster presentation
24. Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F, Duca S, Polverari A, Faieta M, Baldi M, Diano L, Spinella F. The clinical utility of genome-wide non invasive prenatal screening. *Pren Diagn* 2017;37:593-601.

Altri riferimenti bibliografici:

25. Wellesley et al., 2012 *Eur J Hum Genet.* 20:521-526.
26. Wapner et al., 2012 *N Engl J Med.* 367:2175-2184.
27. Fiorentino et al., 2011 *Prenat Diagn.* 31:1270-1282.
28. Fiorentino et al., 2013 *Eur J Hum Genet.* 21:725-730.