

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Genoma Umano	1
1.2 Embriologia	2
1.3 Sviluppo embrionale ed organogenesi	4
1.4 Malattie genetiche	5
1.5 La Diagnosi Prenatale	15
1.6 Indagini citogenetiche in prenatale	17
<i>1.6.1 Amniocentesi</i>	<i>18</i>
<i>1.6.2 Villocentesi</i>	<i>19</i>
1.7 Tecniche di diagnostica prenatale non invasiva	21
1.8 Tecnologia cffDNA/NIPT	25
1.9 Scopo	27
2. MATERIALI E METODI	28
2.1 Casi valutati sia in citogenetica che in NIPT	28
2.2 Citogenetica su Villi coriali e amniociti	29
<i>2.2.1 Esame citogenetico su Villi Coriali</i>	<i>29</i>
<i>2.2.2 Esame citogenetico sul liquido amniotico</i>	<i>35</i>
<i>2.2.3 FISH</i>	<i>39</i>
2.3 Studio cffDNA	44
<i>2.3.1 Tecnologia utilizzata, MPS Illumina e l'algoritmo VeriSeq</i>	<i>46</i>
3. RISULTATI e DISCUSSIONI	51
3.1 Risultati generali	51
3.2 Casi particolari	56
4. CONCLUSIONI	68
5. BIBLIOGRAFIA	70

1. INTRODUZIONE

1.1 Genoma Umano

Il patrimonio genetico di ogni essere vivente sulla Terra prende il nome di *genoma*, il quale è l'insieme dei geni di un organismo. I geni sono delle sequenze di DNA che codificano per proteine, per RNA ribosomiali o transfer, o semplicemente geni che svolgono una funzione regolatrice.

Il genoma è stato oggetto di studio negli ultimi anni per andare a costruire una libreria genetica in modo da essere a conoscenza di tutti i geni che lo compongono. Lo "Human Genome Project" ha condotto degli studi di sequenziamento per mappare il genoma umano e solo recentemente è riuscito a concluderli. Infatti, ci sono voluti circa vent'anni, affinché il lavoro fosse completato.

Il DNA o acido desossiribonucleico, contiene al suo interno l'insieme di tutte le informazioni necessarie affinché un individuo si sviluppi e funzioni nel modo corretto.

Il DNA è costituito da due filamenti complementari costituiti da fosfato, desossiribosio e le basi azotate- l'adenina e la guanina (basi puriniche che sono formate da due anelli fusi), citosina e timina (basi pirimidiniche formate da un solo anello) -che, nel loro susseguirsi, determinano la sequenza specifica codificante per la produzione di ogni proteina nonché l'identità di ogni individuo. I cromosomi sono il risultato della condensazione del DNA ad opera di proteine istoniche. Il DNA viene ristretto quindi in singole unità dette nucleosomi e ulteriormente in strutture ancora più compatte che prendono il nome di cromosomi.

Il DNA, che si presenta in segmenti a doppia elica complementare, si organizza, nella sua forma più condensata quindi, a formare 23 coppie di cromosomi: 22 coppie di autosomi e una coppia che andrà determinare il sesso dell'individuo (XX-femmina; XY-maschio). Il DNA umano è diploide e ogni individuo eredita metà del pattern cromosomico dalla madre e metà dal padre poiché nei gameti (cellule germinali) di ognuno di essi, si ha un corredo cromosomico costituito da 23 cromosomi (aploide). Ogni gene è presente in duplice copia all'interno di ogni cellula somatica ed è localizzato in una determinata regione a livello del cromosoma specifico che prende il nome di locus genico. Un gene può presentarsi con una sequenza genica che differisce dal gene corrispettivo presente sul cromosoma omologo: ciascuna variazione della sequenza di nucleotidi che è codificante

per lo stesso prodotto genetico prende il nome di allele. Pertanto, possiamo dire che l'allele è una delle forme con cui si presenta un gene.

La definizione del sesso è determinata dal gamete maschile, lo spermatozoo, che presenta nel suo profilo genetico uno dei due cromosomi sessuali, X o Y. Il gamete femminile, differentemente, presenta esclusivamente il cromosoma X (1,2).

1.2 Embriologia

La fecondazione è il processo di fusione del gamete femminile e maschile per formare la prima cellula dell'individuo, lo zigote. Ciò avviene all'interno della tuba di Falloppio. I nuclei dell'ovocita e dello spermatozoo, chiamati pronuclei, contengono un numero di cromosomi aploidi (23 cromosomi). La fusione degli involucri nucleari porta alla scomparsa di questi e i cromosomi si vanno a disporre sul piano equatoriale per prepararsi alla fusione. La fusione dei gameti dà origine alla prima cellula con corredo cromosomico diploide, ovvero, con 23 coppie di cromosomi (46 totali) (3).

Durante il primo trimestre di gravidanza, vi è la formazione della placenta, un organo fetale costituito dal parenchima, dal corion, dall'amnios e dal cordone ombelicale. La placenta interagisce con l'ambiente esterno e separa il feto dall'endometrio. La formazione membranosa materna, proveniente dall'endometrio e sottoposta a regolazione ormonale durante tutto il ciclo mestruale, è chiamata decidua un tessuto che, se avviene la fecondazione, si stabilizza e si accresce. I tessuti fetali si formano dal sacco corionico, che comprende l'amnios, il corion, il sacco vitellino e l'allantoide.

Una volta avvenuta la fecondazione, la cellula fecondata si evolverà in morula da cui si avrà lo sviluppo dell'embrione e della placenta fetale. L'ammasso di cellule interno da origine all'embrioblasto mentre la massa di cellule esterna prende il nome di trofoblasto. Successivamente, dalla morula si ha l'evoluzione in blastocisti che si impianta nell'utero dopo fecondazione. La porzione che entra in contatto col tessuto uterino è la porzione trofoblastica che, a seguito dell'annidamento nella parete dell'utero, da origine al sinciziotrofoblasto, direttamente a contatto con la mucosa, secernente la gonadotropina corionica umana (hCG), una proteina ad attività ormonale; il citotrofoblasto, più interno, secernente enzimi (4).

Entrambi fanno parte, insieme al mesoderma extraembrionale, del corion o disco coriale. A livello del sinciziotrofoblasto si formano degli spazi che prendono il nome di lacune trofoblastiche che si riempiono di sangue materno proveniente dalla decidua materna limitrofa. Il corion va a delimitare la cavità coriale al cui interno è sospeso l'embrioblasto il quale è sostenuto dal peduncolo embrionale. L'embrioblasto presenta superiormente la cavità amniotica e inferiormente il sacco vitellino.

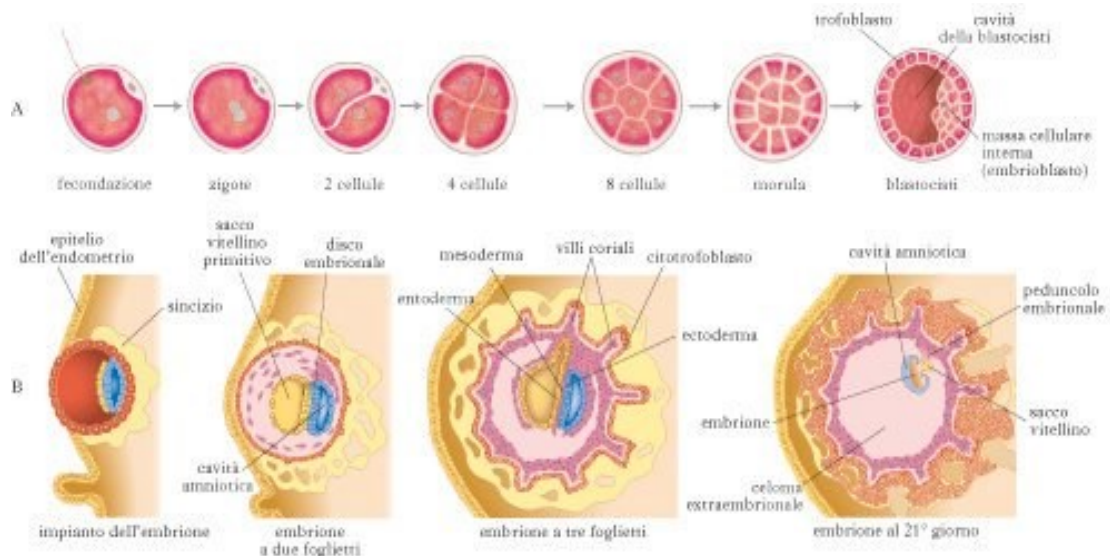


Figura 1-Embriogenesi

Durante l'annidamento, nella parte più esterna del corion si generano delle estroflessioni prima digitiformi poi arboriformi detti villi coriali. Questi sono fondamentali per la futura circolazione placentare. I villi evolvono durante le prime settimane di gravidanza e per questo possono essere distinte tre fasi di sviluppo. I villi primari originano dal sinciziotrofoblasto, tra le lacune, e si estendono verso la decidua andando poi a invadere l'area citotrofoblastica che presenterà, quindi, l'asse centrale del villo stesso. Successivamente, il mesenchima della somatopleura extraembrionale va a spingersi verso il centro di ogni villo. Il villo ora presenta quindi una struttura costituita da tre strati concentrici di tessuto (villi secondari). Dopo la seconda settimana di gravidanza si definiscono i villi terziari (fine terza settimana): liberi, negli spazi intervillosi e aderenti, che si estendono fino alla decidua materna e restano a stretto contatto con esso (5).

La placenta è un organo villosa emocoriale che oltre alla sua funzione vascolarizzante, metabolica e immunitaria è produttrice di ormoni e fattori di crescita che modulano la

gestazione, sostenendo e promuovendo la crescita fetale fino all'avvio al parto. È un organo altamente vascolarizzato e problematiche a questo livello sia nello sviluppo che funzionale compromettono la gravidanza. L'unità funzionale della placenta è il villo corionico. Lo sviluppo della placenta inizia il 10° giorno e il completamento di essa avviene tra la 18° e 20° settimana. La placenta si presenta a forma di disco grande 16-20 cm dove possono essere distinte due facce: una materna, aderente alla decidua nella sua porzione basale presentante strutture che consentono gli scambi di ossigeno e sostanze nutritive detti villi coriali e, una fetale, quindi verso il feto, rivestita dall'amnios (piatto coriale), annesso embrionale che circonda e isola l'embrione e delimita un'area interna contenente il liquido amniotico. (6,7)

1.3 Sviluppo embrionale ed organogenesi

Le prime immagini ecografiche possono essere acquisite dopo 10 giorni dalla fecondazione. Intorno alla 5° settimana di gestazione è possibile rilevare un embrione di circa 5 mm dove si osserva un marcato sviluppo della testa per la progressione dell'accrescimento di encefalo e volto, quest'ultimo in prossimità della prominente cardiaca. Lo sviluppo di arti inizia nel medesimo periodo gestazionale. Nella 7° si forma il peduncolo vitellino, struttura di connessione tra sacco vitellino e intestino primitivo. Successivamente, all'8° settimana, dall'embrione si passa al feto. Tra la 9° e la 12° settimana si possono apprezzare abbozzi di ossa e muscoli, nervi, occhi e genitali interni ed esterni. L'attività escretoria dei reni (urina) inizia. Verso la fine del 4° mese si evidenziano più chiaramente i genitali esterni. Al 5° mese (17-20 settimane) il feto inizia a muoversi più energicamente, si definiscono i primi depositi adiposi (grasso bruno, ricco di mitocondri). Nel periodo tra la 21° e la 25° settimana, inizia la produzione di surfattante per l'apertura degli alveoli. Nelle rimanenti settimane di gravidanza, il feto si accresce e inizia a depositare grasso chiaro e la milza ha ruolo attivo nell'ematopoiesi fino alla 28° settimana, dove verrà sostituita dall'azione del midollo osseo. Fino al completamento dello sviluppo, il feto continuerà ad accrescersi e a definirsi fino al momento dell'espulsione. Durante tutta la gravidanza il sistema nervoso centrale continua il suo sviluppo. (7)

1.4 Malattie genetiche

Concetti Chiave

- **Mutazione** = alterazione permanente all'interno del genoma di un individuo che può interessare le cellule somatiche (non trasmissibile) e germinali (ereditabile). Le mutazioni possono essere distinte in base all'origine (spontanea o indotta), all'effetto funzionale sul fenotipo (letali, subletali, condizionali, neutre, silenti, vantaggiose, svantaggiose e pleiotropiche) e alla tipologia dell'estensione (cromosomiche, genetiche).
- **Malattie genetiche cromosomiche** = le malattie genetiche cromosomiche sono causate dall'alterazione del numero o della struttura dei singoli cromosomi. Le malattie genetiche cromosomiche numeriche sono le poliploidie, trisomie, monosomie, marker sovranumerari; quelle strutturali sono le traslocazioni, le delezioni, inserzioni, duplicazioni e cromosomi ad anello.
- **Traslocazione**= scambio di frazioni cromosomiche di grandezza variabile tra cromosomi non omologhi. La traslocazione può essere bilanciata, quando non vi è l'alterazione del patrimonio genetico e sbilanciata se vi è la perdita. Possiamo ulteriormente definire le traslocazioni in reciproche e robertsoniane o fusioni centriche.
- **Mosaicismo cromosomico**= assetto cromosomico costituito da due linee cellulari differenti nello stesso individuo, organo o tessuto. Questa condizione si origina nelle prime mitosi post concepimento. Per quanto riguarda il periodo gestazionale, il mosaicismo può presentarsi sia nella placenta che nel feto, unitamente o separatamente, in base all'epoca in cui si genera la nuova linea cellulare durante la formazione dell'embrione.
- **Imprinting** = meccanismo di espressione diversificata che si manifesta nel feto ed origina durante la gametogenesi che porta all'espressione selettiva o dell'allele paterno o dell'allele materno. Ciò avviene a seguito di una metilazione differenziale del DNA a livello delle citosine dei tratti regolatori. Tale fenomeno è correlato ad alcune patologie umane. (8)

Ogni individuo possiede una costituzione genetica che viene indicata come genotipo. Questo, attraverso l'interazione con l'ambiente esterno, va a manifestarsi nell'uomo e prende il nome di fenotipo. Le mutazioni sono molto spesso il primo degli effetti fenotipici: in questo caso, sono varianti normali quelle indicate come polimorfismi, che si verificano con una frequenza superiore all'1% nella popolazione studiata. Ad esempio, le mutazioni a bassa frequenza riscontrate in una sola famiglia o in un piccolo gruppo di membri della famiglia sono classificate come varianti private.

Tuttavia, ci sono anche mutazioni che possono compromettere la funzione o la quantità del prodotto genico e quindi avere un effetto fenotipico. Grazie allo sviluppo tecnologico nel campo della genetica molecolare e all'introduzione di metodi di sequenziamento, si è riusciti, negli ultimi anni, a identificare le mutazioni responsabili di determinate patologie che hanno così permesso di studiare i meccanismi patogenetici che determinano l'insorgenza di uno specifico fenotipo.

Le anomalie cromosomiche possono essere distinte in anomalie di numero, in cui il corredo cromosomico è in eccesso o in difetto rispetto al normale numero di 46, e anomalie di struttura, nelle quali il numero totale dei cromosomi non è alterato. A scopo pratico si devono distinguere le anomalie cromosomiche in bilanciate e sbilanciate.

Oggi la diagnostica delle malattie genetiche ha messo in luce alcune delle patologie che più frequentemente si possono verificare e che vengono studiate mediante diversi esami diagnostici (9).

Di seguito, sono descritte alcune delle principali malattie di interesse diagnostico.

Trisomia 21

La trisomia 21, clinicamente associata alla sindrome di Down, rappresenta la causa genetica più comune di disabilità intellettiva ed è anche il disordine cromosomico più frequente nell'uomo. La causa che sovente determina la trisomia è una non-disgiunzione meiotica, che solitamente avviene nella prima divisione meiotica materna. Tale condizione però può generarsi anche in seguito a traslocazione e mosaicismo: nel primo caso, circa il 4 %, quello che avviene è la presenza di un cromosoma 21 in più, fuso a livello centromerico con un altro cromosoma e che, in seguito a gametogenesi,

questo cromosoma anormale costituirà, insieme agli altri cromosomi un cariotipo a 46 cromosomi e darà le stesse caratteristiche della sindrome di Down; meno frequente è la condizione di mosaicismo, rappresentante il 2 % dei casi, verificatasi dopo il concepimento e quindi non riscontrabile in tutte le cellule dell'individuo.

I segni clinici più significativi della sindrome di Down includono ipotonia, un aspetto peculiare del volto, con brachicefalia, viso rotondeggiante. La presenza di una cardiopatia condiziona la prognosi sia nei confronti della sopravvivenza sia nei confronti della qualità della vita, anche se la prognosi dipende comunque dal tipo e dalla gravità della cardiopatia. In associazione alla sindrome di Down possono ritrovarsi anche malformazioni extra cardiache soprattutto del tratto gastrointestinale. Il deficit cognitivo è costante ma è di grado variabile. Il sospetto in fase prenatale si ha a seguito dell'osservazione di anomalie ecografiche riconducibili alla patologia ed età avanzata della madre. Tuttavia, solo il 30-40% di feti affetti da tale condizione nasce da donne con età ≥ 35 anni. (9,10,11)

Trisomia 18

La trisomia 18 o sindrome di Edwards origina da una non disgiunzione meiotica ed è quindi associata ad età materna relativamente avanzata. In una elevata percentuale di casi, la trisomia 18 compromette lo sviluppo prenatale che, talvolta, porta a morte fetale intrauterina. È' una condizione molto grave la cui prognosi è sfavorevole: la mortalità durante i primi giorni di vita è molto alta; sono molto rari i casi di bambini con trisomia 18 sopravvissuti fino all'adolescenza.

Esistono tre tipi di trisomia 18: la forma completa interessa il 94% dei bambini ed è la condizione più grave che porta a morte precoce; la trisomia a mosaico, con una percentuale pari al 5%, forma meno grave la cui complessità è direttamente correlata al tipo e al numero di cellule che hanno il cromosoma supplementare; la forma parziale, meno frequente, dove un solo segmento del cromosoma 18 è triplicato. In quest'ultima, il tratto e la grandezza del segmento sono responsabili dell'espressione della malattia.

Segni clinici specifici includono ritardo della crescita, microcefalia con dolicocefalia, un aspetto peculiare del volto. Le anomalie fisiche maggiormente riscontrate sono muscoli

e grasso corporeo sottosviluppati, microretrognazia (bocca e mascella piccole), orecchie a impianto basso e malformate, mani chiuse a pugno e conformazione dei piedi alterata (piede equino o a picozza). Si osservano inoltre malformazioni gastro-intestinali con atresia esofagea, ano-rettale, onfalocele.

La maggior parte degli individui affetti sono di sesso femminile. Originando da un evento casuale di non-disgiunzione meiotica, il rischio di ricorrenza familiare per trisomia 18 è trascurabile, con un piccolo incremento per i genitori del soggetto affetto, verosimilmente legato a mosaicismo germinale (9,12).

Trisomia 13

La trisomia 13 è clinicamente associata alla sindrome di Patau. Si tratta di una condizione molto grave, con alta selezione negativa prenatale. Durante il periodo gestazione i bambini presentano un ridotto accrescimento e basso peso alla nascita con gravi malformazioni. I segni clinici distintivi includono: labio-palatoschisi, oloprosencefalia ovvero la incompleta o assente separazione dei due emisferi del cervello durante lo sviluppo intrauterino, microftalmia, anoftalmia, ipotelorismo, microcefalia, aplasia della cute, emangioma capillari, onfalocele, polidattilia. Le malformazioni negli organi interni sono comuni con gravi anomalie cerebrali e del sistema nervoso e difetti cardiaci congeniti. Il ritardo psicomotorio è molto grave.

La maggior parte dei casi di sindrome di Patau ha un cariotipo a 47 cromosomi per trisomia 13 libera. Anche in questo caso la sindrome correla con l'età materna avanzata. Il rischio di ricorrenza familiare è basso. La trisomia 13, in circa il 10% dei casi, è associata alla traslocazione robertsoniana t (13;14) mentre in circa il 5 % dei casi, a mosaico. In circa il 5-10% dei bambini con quest'ultima forma o con trisomia 13 parziale ha un'aspettativa di vita maggiore. La traslocazione può essere de novo o ereditata da uno dei genitori. In quest'ultimo caso, quando uno dei due genitori è portatore di una traslocazione in forma bilanciata, il rischio di ricorrenza è consistente (9,13).

Sindrome di Klinefelter

La sindrome di Klinefelter, che si associa a un cariotipo 47, XXY è un'aneuploidia dei cromosomi sessuali dove si osserva la presenza di un cromosoma X in più nelle persone di sesso maschile. L'età materna avanzata è un fattore di rischio rilevante.

È di norma dovuta a una non disgiunzione meiotica e pertanto si presenta in forma sporadica. Esistono diverse forme di Klinefelter che presentano un assetto genetico alterato dovuto, nei vari profili, a un numero di cromosomi X doppio, triplo o quadruplo.

Oltre al cromosoma in eccedenza, il fenotipo clinico è direttamente correlato a un polimorfismo del recettore degli androgeni (esone 1), che causa un'elevata eterogeneità dei principali sintomi clinici, ovvero ipogonadismo, alterazioni endocrinologiche, infertilità, ginecomastia, ridotto sviluppo dei caratteri sessuali maschili. Dal momento che i sintomi clinici sono molto variabili (senza considerare eventuali casi di mosaicismo) la diagnosi risulta incerta e molti casi non vengono rilevati o vengono scoperti in ritardo.

Le persone con la sindrome di Klinefelter sono maggiormente esposte allo sviluppo di malattie croniche come diabete di tipo 2, osteoporosi, ansia, tumore della mammella maschile, ipotiroidismo. Non è associata problemi intellettivi. (9,14,15)

Sindrome di Turner

La sindrome di Turner, conosciuta anche come sindrome da ipoplasia ovarica congenita, è per definizione associata a monosomia X (cariotipo: 45, X) che può essere completamente assente o parziale. Tale aneuploidia è la più frequentemente riscontrata nelle donne. Posta in diagnosi differenziale con la sindrome di Noonan per quanto riguarda la clinica poiché questa non presenta, invece, un'anomalia cromosomica. Una parte della popolazione affetta da tale sindrome ha un mosaicismo cromosomico con una linea cellulare a 45,X ed una normale a 46,XX. Si manifesta negli individui femminili, che presentano bassa statura, amenorrea ed infantilismo dei caratteri sessuali secondari. Il rischio di mortalità risulta aumentano in seguito a correlazione con lo sviluppo di malformazioni cardiovascolari come anomalie della valvola aortica (bicuspid), arco aortico trasversale allungato, anomalie venose polmonari. A incrementare il quadro clinico abbiamo la perdita dell'udito, anomalie renali del sistema collettore, alterazioni

visive. La sindrome di Turner accresce il rischio di sviluppare malattie autoimmuni come ipotiroidismo e malattia infiammatoria intestinale. Tale sindrome può essere identificata in fase prenatale attraverso ecografia dove si evidenzia un'aumentata translucenza nucale, igroma cistico nucale, brachicefalia, rene a ferro di cavallo, polidramnios, oligoidramnios o idrope fetale non immune e coartazione dell'aorta/anomalie cardiache del lato sinistro. A completare la diagnosi è utile lo studio dei villi coriali o l'esame del liquido amniotico. In caso di mosaicismo è necessario effettuare una FISH. Durante l'adolescenza, in caso di amenorrea, livelli aumentati di ormone follicolo-stimolante (FSH) e ormone anti-Mulleriano (AMH) convergono nella diagnosi di tale sindrome. (9).

Trisomia 22

La trisomia 22 è un disordine cromosomico causato dalla presenza di un cromosoma 22 sovranumerario dove, appunto, si osservano 3 copie. Tale condizione porta ad aborto spontaneo durante il primo trimestre di gravidanza e, in una piccola percentuale di casi, questa può proseguire verso il secondo e terzo trimestre. Può presentarsi come trisomia vera o sotto forma di mosaicismo, dove la trisomia è presente in una delle due linee cellulari. Gli individui con questa condizione hanno anomalie cardiache e ritardo nello sviluppo fisico e mentale. La severità, nel caso di una forma a mosaico, è determinata dal numero di cellule presentanti l'anomalia. (17)

Trisomia 16

La trisomia 16 è una condizione estremamente rara influenzata dalla presenza di età materna avanzata. L'embrione può modificarsi e "correggersi" mediante la perdita post zigotica del cromosoma aggiuntivo ma la placenta rimane parzialmente o totalmente trisomica. È responsabile della maggior parte degli aborti ed è dovuta a errori durante la meiosi I materna. La trisomia 16 a mosaico ha un'associazione con livelli molto bassi con la PAPP-A durante il primo trimestre e questo comporta un rischio di preeclampsia per la madre. Studi su questa condizione in forma di mosaico hanno evidenziato un alto rischio di esito anomalo con ritardo nella crescita intrauterina, difetti cardiaci congeniti, sviluppo lento e altre anomalie minori. Sono nati alcuni casi di nati vivi con quadri clinici molto

differenti tra i soggetti ma comunque presentanti complessità come asimmetrie corporali e ipospadia. (17)

Sindromi malformative da microdelezione o microduplicazione

Si tratta di sindromi malformative con vario grado di ritardo mentale in cui l'anomalia cromosomica non interessa un intero cromosoma ma una parte relativamente piccola di esso che può essere mancante (microdelezione) o doppia (microduplicazione). Sono patologie rare ma, relativamente, le sindromi da microdelezioni sono più frequenti.

Sindrome del cri du chat o sindrome da delezione del braccio corto 5p

La sindrome del cri du chat è una condizione genetica causata dalla delezione parziale del braccio corto del cromosoma 5 (5p) e fa parte delle sindromi da microdelezioni rare con una frequenza di 1/50.000 nati vivi. Fra le cause di tale delezione abbiamo una segregazione sbilanciata di un riarrangiamento cromosomico presente in uno dei due genitori, riarrangiamenti strutturali de novo, formazione di cromosomi ad anello o delezioni de novo, che si presentano nella maggior parte dei casi. È presente anche una piccola percentuale di casi a mosaico. La delezione può interessare tratti cromosomici più o meno estesi. A livello clinico, il fenotipo è variabile. Tale sindrome risulta essere compatibile con la vita e la sopravvivenza non è compromessa; questo si può dire però solo una volta superata l'età pediatrica dove, per la presenza di malformazioni congenite, cardiache o renali, il rischio di morte nei primi anni di vita non è raro. I bambini affetti presentano ritardo nello sviluppo psicomotorio, microcefalia, volto tondeggiante, strabismo divergente, ipertiroidismo, ipotonia. Tipico è il pianto del neonato simile ad un miagolio, da cui il nome della patologia. (8)

Sindrome da 18q-

La sindrome da 18q- è causata da una delezione in corrispondenza del braccio lungo del cromosoma 18. Può essere dovuta a mutazione de novo e distale con punto di rottura preferenziale a livello della banda q21.2 oppure per una delezione interstiziale. Clinicamente si osserva microcefalia, marcata ipotonia, dismorfismo facciale e ipoplasia

della regione media del volto e sordità. I bambini presentano ritardo mentale, di grado variabile ma frequentemente grave e sono noti episodi di iperattività o aggressività. I primi mesi di vita risultano essere quelli a più alto rischio di mortalità. (8)

Sindrome da delezione 4p o di Wolf-Hirshhorn

Con una frequenza di 1/50.000 nati, la sindrome di Wolf-Hirshhorn rientra tra le patologie cromosomiche più rare. Essa è causata da una delezione parziale (di grandezza variabile) rilevabile a livello del braccio corto del cromosoma 4; la regione critica è la banda 4p16.3, che sembra essere quella causativa di malattia, con la manifestazione dei sintomi tipici. La delezione può essere de novo (90%), dovuta a segregazione sbilanciata di una traslocazione familiare o per presenza di cromosomi ad anello. Come detto prima, la delezione può essere più o meno estesa e quindi i sintomi sono variabili: ritardo mentale e scarso accrescimento, microcefalia con dolicocefalia e asimmetria cranica, dismorfismi del volto, labiopalatoschisi e malformazioni congenite sono solo alcune delle plurime manifestazioni di questa condizione. Data la presenza di un quadro clinico piuttosto complesso, solitamente il tasso di mortalità nei primi mesi di vita è molto alto; si registrano però soggetti che hanno raggiunto l'età adulta. (8)

Sindrome di Angelman e Sindrome di Prader-Willi

Entrambe con una frequenza di 1/20.000 nati.

La Sindrome di Angelman è una malattia genetica dovuta alla presenza del gene UBE3A non funzionante. Questo gene, primo responsabile di questa condizione, si localizza a livello della regione cromosomica 15q12-13 ed è di fondamentale importanza per lo sviluppo encefalico embrionale e fetale. Questo gene è soggetto a imprinting. Il malfunzionamento di questo gene può avvenire a causa di: una delezione della regione 15q11-13 presente sull'omologo di origine materna, riarrangiamenti cromosomici della regione precedentemente detta, disomia uniparentale paterna, mutazione del centro di imprinting (IC) all'interno della suddetta regione che porta alla regolazione del gene UBE3A o mutazioni nella copia materna di UBE3A. Sebbene siano conosciute molte

dinamiche che portino a tale malattia, in una piccola parte dei casi analizzati (10%), il meccanismo alla base è sconosciuto.

A livello clinico, i soggetti affetti presentano: grave ritardo psicomotorio, assenza di linguaggio, problemi di equilibrio e movimento con atassia e tremore degli arti, comportamento con riso eccessivo, ipereccitabilità, iperattività, scarsa attenzione. Possono esserci dei sintomi più o meno gravi che però non sono riscontrabili in tutti i pazienti.

La Sindrome di Prader-Willi è una malattia a ereditarietà non mendeliana scaturita da molteplici mutazioni biomolecolari. In particolare, la delezione della regione 15q11-13 (area d'interesse in questa patologia) presente sull'omologo di origine paterna, è quella più frequente (70%). Già in epoca prenatale, all'ecografia, il feto presenta ritardo nella crescita e diminuzione dei movimenti fetali. Alla nascita il neonato presenta grave ipotonia, iporefflessia, ipoplasia dei genitali e problematiche nell'alimentazione. In un'età più tardiva, si affermano dei sintomi più complessi che interessano l'accrescimento e la stabilità. I pazienti sono sottoposti a visite neurologiche, endocrinologiche, neuropsichiatriche e riabilitative continue. (8)

Sindrome del 22q11.2 o di de George

Più frequente rispetto alle sindromi precedentemente descritte, la sindrome di Di George ha un'incidenza di 1/ 4.000 nati vivi. Questa malattia genetica origina da una mutazione de novo nell'85% dei casi ma sono note anche trasmissioni familiari di tipo autosomico dominante, più o meno espresse. Alla base della sindrome vi è la delezione del 22q11.2 che, oltre alla sindrome di Di George, è responsabile di altre sindromi che hanno determinato l'accorpamento. Quadri analoghi sono provocati da altre regioni cromosomiche con delezioni (es: 10p) o da esposizione a sostanze teratogene come alcol, acido retinoico e diabete materno. A livello clinico, si osserva una vasta eterogeneità dei sintomi che differiscono nelle diverse sindromi. Il quadro clinico, solitamente, non porta a morte precoce. Nell'ambito della consulenza genetica, il riscontro di questa delezione porta ad un approfondimento che si traduce in un'estensione dell'indagine ai genitori, data la possibilità di ricorrenza familiare dove tale mutazione si comporta come una mutazione autosomica dominante ad espressività variabile. Tuttavia, in una parte dei casi, le mutazioni sono de novo. (8)

Sindrome di Williams

La sindrome di Williams è dovuta a una microdelezione nella regione 7q11.23, solitamente de novo, comprendente i geni: LIMK1, codificante per la LIM-chinasi 1; RFC2, fattore di replicazione e subunità 2; WSCR1, codificante per una proteina legante l'RNA; WSCR2, WSCR3, WSCR5 a funzione ignota; FZD3, fondamentale per lo sviluppo dell'SNC; STX1A, codificante per una proteina di membrana neuronale volta alla regolazione del rilascio di calcio; GTF21 e FKBP6. Oltre che a mutazioni de novo, la delezione può essere trasmessa in maniera autosomica dominante.

Le manifestazioni cliniche sono: nell'accrescimento, ritardo mentale, dismorfismi facciali caratteristici che si accentuano con la crescita dell'individuo, multipli difetti cardiovascolari come stenosi sopraaortale dell'aorta e dei rami periferici dell'arteria polmonare e ipercalcemia infantile. I pazienti sono soggetti a programmi di monitoraggio clinico periodico data la complessità dei difetti cardiaci. (8)

1.5 La Diagnosi Prenatale

La diagnosi prenatale, secondo quanto proposto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), può essere definita come “qualunque attività prenatale che abbia come scopo la diagnosi dei difetti congeniti, che devono essere interpretati come qualsivoglia anomalia nello sviluppo, presente alla nascita. L'anomalia può essere esterna od interna, morfologica o strutturale, funzionale o molecolare, familiare o sporadica, singola o multipla”. (19)

La diagnosi prenatale consiste in una serie di esami volti allo studio del feto in modo da individuare eventuali anomalie che possano essere motivo di morte intrauterina o per effettuare uno screening a conoscenza di condizioni potenzialmente patologiche. Le indicazioni alla diagnosi prenatale sono quelle indicate di seguito:

- Età materna avanzata (≥ 35 anni);
- Precedente figlio con patologia cromosomica;
- Presenza in uno dei genitori di un riarrangiamento cromosomico bilanciato, come una traslocazione robertsoniana o una traslocazione reciproca;
- Genitori portatori di una mutazione responsabile di una malattia autosomica recessiva o madre portatrice eterozigote di una mutazione responsabile di una malattia legata al cromosoma X. In questi casi il rischio di avere figli affetti dalla specifica condizione genetica di cui i genitori o la madre sono portatori è pari al 25%;
- Genitore portatore di una mutazione causa di malattia dominante;
- Precedente figlio con difetto di chiusura del tubo neurale;
- Aumento del rischio di sindrome di Down al di sopra di un valore soglia generalmente fissato intorno a 1:250, per effetto della positività di uno o più test predittivi;
- Malformazioni fetali e/o ritardo di crescita intrauterino, rilevati ecograficamente (9).

Grazie alle conoscenze sullo sviluppo fetale e al continuo aggiornamento delle metodiche, si è raggiunto uno iter diagnostico accettabile e sufficiente all'individuazione di particolari condizioni patologiche.

Attraverso una diagnosi precoce, spesso, è possibile fornire il trattamento ottimale per molte delle gravidanze affette, grazie alla scelta della sede, del momento e della modalità migliore per il parto. Nei casi più gravi, come quando ad esempio la malformazione fetale non sia compatibile con la vita od anche quando siano accertate “rilevanti anomalie o malformazioni del nascituro che determinino un grave pericolo per la salute fisica o psichica della madre”, vi è la possibilità di optare per una interruzione volontaria della gravidanza, secondo quanto previsto dalla Legge n. 194 del 1978 (19).

La necessità di essere a conoscenza dello stato di salute del feto o di una condizione fetale anomala, qualora vi sia, pone il ginecologo a consigliare alla gestante di eseguire un esame diagnostico o di screening, consistente in un complesso di indagini strumentali e laboratoriali. La diagnosi prenatale permette di individuare attraverso analisi, una vasta gamma di anomalie cromosomiche, disordini genetici e condizioni legate all’X, difetti del tubo neurale e infezioni prima della nascita del feto (20).

Possiamo dividere questo vasto assortimento di analisi invasive e non invasive.

Le indagini di tipo invasivo tra le quali abbiamo il prelievo amniocentesi, villocentesi e funicolocentesi, che tratteremo poi nello specifico, sono considerate indagini diagnostiche con potenziale rischio abortivo.

Le indagini di tipo non invasivo, invece, sono tecniche che danno un risultato di tipo probabilistico. Le tecniche non invasive sono l’ecografia, i test sierologici su sangue materno e lo studio delle cellule fetali e del DNA fetale nel sangue materno, quest’ultime eseguibili durante i primi due trimestri di gravidanza. I test non invasivi hanno in genere una DR (detection rate) di patologia fetale, molto elevata, soprattutto per quanto riguarda la sindrome di Down.

Dato il rischio abortivo riconducibile all’utilizzo di esami di tipo invasivo, si dovrebbe cercare di ridurre al minimo l’impiego di questi test, optando per questi solo se a conoscenza di analisi biochimiche e strumentali sospette (11).

1.6 Indagini citogenetiche in prenatale

Prima dell'avvento delle tecniche di Screening Prenatale Non Invasivo (NIPS), o più comunemente NIPT (Test Prenatale Non Invasivo), l'individuazione di cariotipi patologici poteva essere riscontrata esclusivamente con metodi invasivi come l'amniocentesi, il prelievo di sangue fetale (funicolocentesi) o il prelievo dei villi coriali. I primi test genetici prenatali erano limitati dalla semplice osservazione dei cromosomi, un metodo ampiamente noto come analisi del cariotipo.

Con l'introduzione di tecniche sempre più all'avanguardia, dalla coltura di cellule di liquido amniotico e villi coriali fino al bandeggio cromosomico, l'ibridazione in situ fluorescente (FISH) o gli Array, si è potuto avere a disposizione un maggior numero di dati per determinare la condizione fetale.

Il cariotipo e la FISH sono diventati il *gold standard* a basso costo nello screening prenatale di numerose anomalie cromosomiche (21).

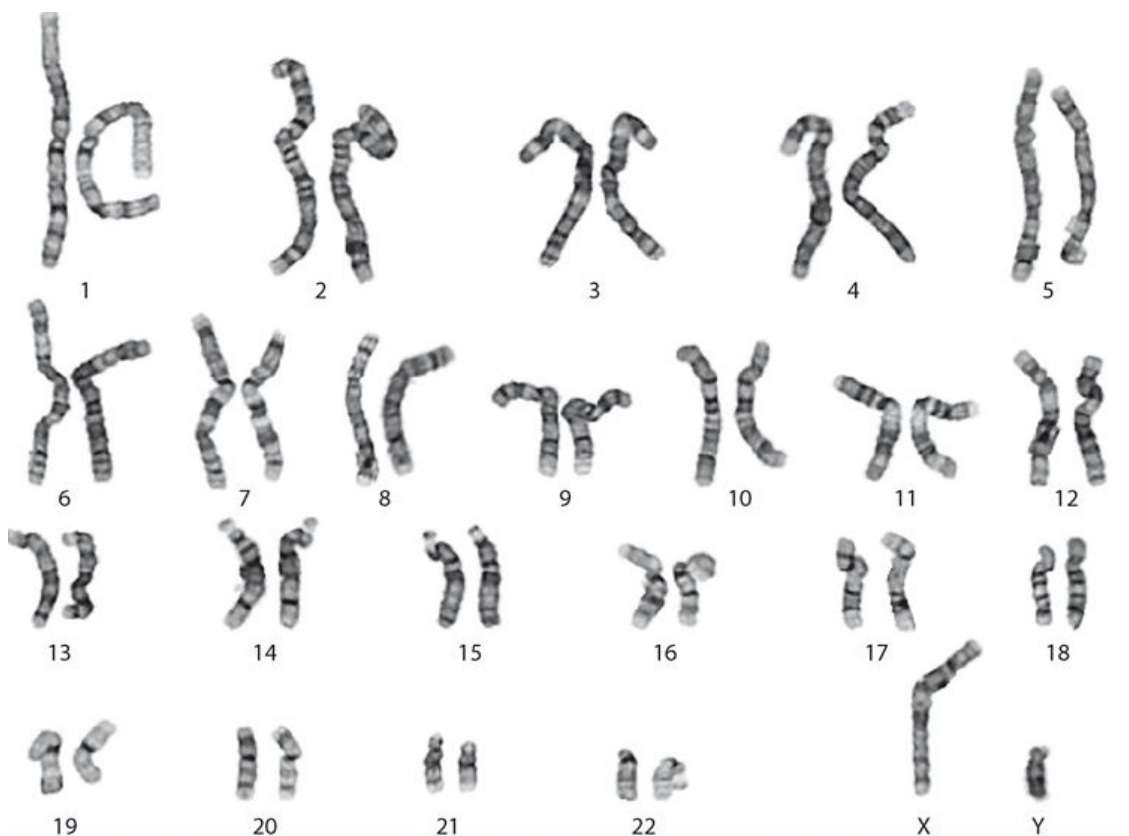


Figura 2-Cariogramma maschile (cariotipo 46, XY).

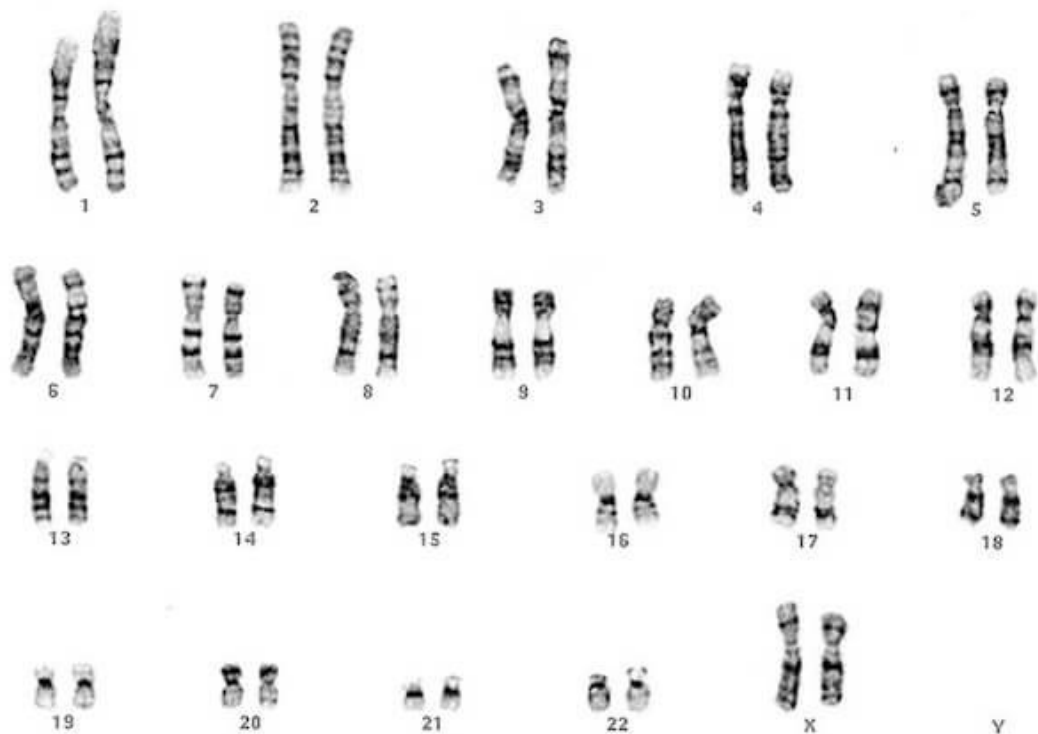


Figura 3-Cariogramma femminile (cariotipo 46, XX)

Descriviamo ora le metodiche più utilizzate per la diagnostica prenatale.

1.6.1 Amniocentesi

L'amniocentesi è un test diagnostico invasivo che presenta un rischio di perdita fetale tra lo 0,5-1%. L'amniocentesi viene eseguita a partire dalla 15^o settimana di gestazione. Oltre che per scopi diagnostici, può essere eseguita per scopo terapeutico per andare a diminuire il volume del liquido nei pazienti con polidramnios, dove c'è una sovrapproduzione di liquido durante la gravidanza. Il liquido amniotico è trasparente con un colore giallastro chiaro ed è costituito da una miscela di urina fetale, secrezioni polmonari, trasudati, che contiene anche cellule esfoliate fetali (20).

L'embrione e il feto durante lo sviluppo intrauterino sono immersi nel liquido amniotico. Questo svolge innumerevoli funzioni, tra le quali abbiamo quella di protezione del feto da traumi, del cordone ombelicale e dagli agenti infettive grazie alle sue proprietà antibatteriche, e quella nutritizia, con apporto di sostanze nutritive quali proteine, elettroliti, immunoglobuline e vitamine (22).

Il prelievo del liquido amniotico, detto amniocentesi, prevede una puntura transaddominale mediante ago e sotto guida ecografica. Una volta inserito l'ago, il liquido viene aspirato lentamente. I primi 3 ml raccolti vengono scartati data la probabile contaminazione da parte di cellule materne. Per condurre l'analisi sono necessari circa 20 ml di liquido amniotico per i test cariotipici e dai 2 ml ai 5 ml per i test enzimatici. I risultati dei test richiedono dai dieci giorni alle tre settimane. Si eseguono quindi test genetici e chimici. Per quanto concerne i test genetici o cromosomici, il liquido amniotico viene messo in coltura cellulare convenzionale, che descriveremo in seguito. Nei test chimici, il liquido amniotico viene analizzato per rilevare la presenza di proteine, minerali e altri composti. In particolare, la valutazione dell'acetilcolinesterasi (AChE), in combinazione con un indice elevato di alfa-fetoproteina (AFP), sono indicativi di problematiche al tubo neurale. La presenza di un campione torbido pone il sospetto di infezione da parte di microrganismi ed è quindi inviato per la coltura microbiologica (20).

1.6.2 Villocentesi

Il prelievo dei villi coriali, ovvero la villocentesi, è una procedura invasiva eseguita nel primo trimestre (tra la 10° e 13° settimana) per la diagnosi prenatale. L'utilizzo dei villi coriali trae fondamento dal concetto che sia placenta che feto condividono lo stesso patrimonio genetico e quindi l'individuazione del cariotipo villare, identifica, indirettamente quello fetale.

La procedura di prelievo viene eseguita attraverso puntura con ago spinale o doppio ago coassiale, per via transaddominale o per via transcervicale sotto guida ecografica con sonda settoriale curvilinea in presenza di personale qualificato. Si raggiunge la regione del corion frondosum, sede dove il citotrofoblasto dei villi coriali è in attiva fase mitotica.

Nel caso in cui il prelievo di materiale biologico risulti scarso o assente, la procedura può essere ripetuta nella stessa seduta fino a un massimo di 3 volte complessive. La quantità media di campione deve aggirarsi intorno ai 15-20 mg. Il rischio abortivo della procedura è simile all'amniocentesi ,0,5-1%. Il campione raccolto viene valutato per verificarne l'adeguatezza e la presenza di componente villosa prima di terminare la procedura. L'eventuale presenza di decidua materna deve essere rilevata e asportata poiché potrebbe inficiare l'interpretazione dei risultati.

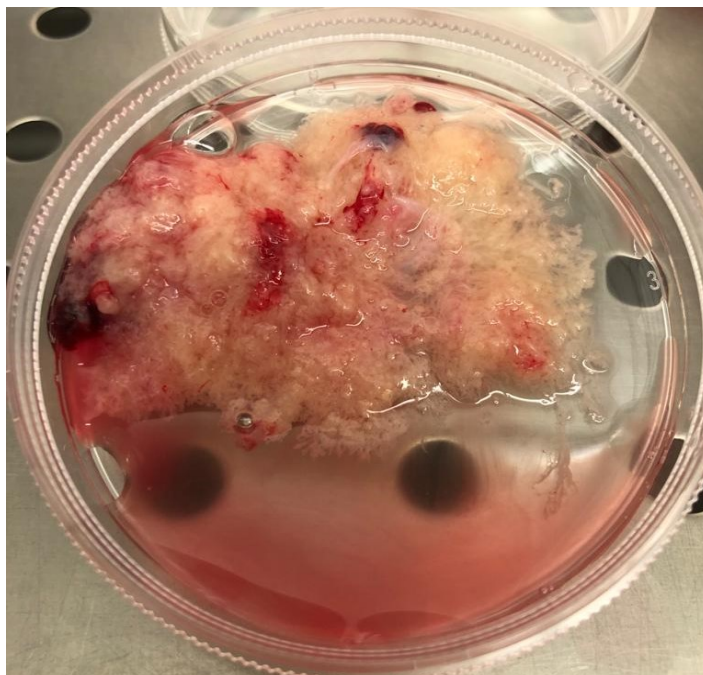


Figura 4-Villi coriali di aborto spontaneo

I campioni di tessuto vengono inviati in laboratorio dove verranno sottoposti a due tipi di analisi: diretta e/o coltura dei villi a lungo termine. I due test sono eseguiti per ogni campione in modo da diminuire la possibilità di avere dei risultati falsi positivi e/o negativi. Tale problema è dovuto soprattutto alla presenza di contaminazione deciduale materna o a mosaicismo placentare. Quest'ultimo è causato durante la forma di blastula, da una non disgiunzione nel trofoblasto che provoca la formazione di cellule aneuploidi nei tessuti extraembrionali, quindi non fetali, dando un falso positivo all'analisi diretta ma non nella colturale. Analogamente, la stessa condizione nel citotrofoblasto andrà a dare un risultato falso positivo all'esame colturale ma non nel diretto e nel feto. Entrambe le procedure necessitano la messa in coltura delle cellule per la costruzione del cariotipo convenzionale ma, talvolta, possono essere indispensabili per la diagnosi alcune tecniche come FISH e microarray cromosomico.

Nel caso in cui si evidenzi un mosaicismo nell'analisi colturale (lungo termine), al fine di avere una diagnosi certa, è necessario eseguire un'ulteriore procedura diagnostica come un'amniocentesi o una funicolocentesi, ovvero il prelievo di sangue fetale.

(23,24).

1.7 Tecniche di diagnostica prenatale non invasiva

Ecografia

L'ecografia è una tecnica di diagnostica per immagini che si avvale dell'utilizzo di ultrasuoni per costruire delle immagini, grazie a apparecchiature specifiche in grado di elaborare i segnali rilevati, e quindi consentendo l'osservazione dei compartimenti interni. Gli ultrasuoni utilizzati in diagnostica medica, sono oscillazioni meccaniche o vibrazioni di tipo longitudinale e hanno una frequenza dai 2 ai 50 MHz (Hertz) che stimolano una vibrazione di particelle nella direzione di propagazione. Questo particolare assetto oscillatorio è l'unico adoperabile per i tessuti molli. Differentemente da altre tecniche di diagnostica per immagini come la TC, le immagini ecografiche vengono prodotte in base all'ecogenicità dei tessuti, quindi sulla capacità di emettere echi di ritorno. L'impiego dell'ecografia in diagnostica per immagini è molto ampio: la tecnica infatti non utilizzando radiazioni ionizzanti, è innocua e in una donna gestante è di particolare importanza data la necessità di ripetere più volte l'esame per il monitoraggio.

L'impiego delle indagini ecografiche è stato di fondamentale importanza per lo studio dei processi di sviluppo intrauterini. Nel 1973, a Campbell, grazie all'utilizzo di queste metodiche, si è riusciti a individuare una malformazione fetale, quale l'anencefalia, prima condizione patologica rilevata in diagnosi ecografica. Da qui, l'impiego dell'ecografia ha subito un rapido accrescimento. Bisogna ricordare però che, bensì sia una metodica con bassa percentuale di falsi positivi, è influenzata dall'esperienza e praticità dell'operatore eseguito.

L'ecografia viene adoperata durante la gravidanza per determinare l'epoca gestazionale, verificare gravidanze multiple e identificare eventuali anomalie strutturali e di accrescimento fetale. L'ecografia viene utilizzata inoltre per verificare la presenza di gravidanze ectopiche o per una minaccia d'aborto. L'ecografia ostetrica può essere effettuata per via addominale o vaginale (3,5 MHz o 5MHz). Le linee guida SIEOG, Società Italiana di Ecografia Ostetrica e Ginecologica Metodologie Biofisiche correlate, (2015-2021) suggeriscono 3 "periodi" ecografici: al primo trimestre (fino a 13 settimane e 6 giorni), secondo trimestre (20-22 settimane) e terzo trimestre (30-32 settimane).

L'esame ecografico del primo trimestre ha come finalità la datazione della gravidanza, la verifica della presenza e del numero di feti e dell'attività cardiaca, la visualizzazione della sede d'impianto e il numero di camere gestazionali, la misurazione della translucenza nucale e, in caso di gravidanza multipla la "definizione di cronicità ed amnionicità". La corionicità indica il numero di placenti; l'amnionicità il numero di cavità amniotiche. L'ecografia permette di effettuare delle misurazioni sull'embrione/feto in merito a lunghezza cranio-caudale e/o al diametro biparietale, ovvero la dimensione della testa del feto.

La **translucenza nucale** è un parametro valutato ecograficamente che consiste nella misurazione dell'accumulo sottocutaneo di fluido in corrispondenza della zona nucale durante il primo trimestre di gravidanza (11-13 settimane + 6 gg di gestazione). La lunghezza cranio-caudale (CRL) deve essere compresa tra i 45 e gli 84 mm. Essa appare come un'area di piccole dimensioni grigia all'interno di due segmenti iperecogeni. Il cut-off per la translucenza nucale è di 3,0 mm; al di sopra dei 3,5 mm si ha il sospetto di anomalie cromosomiche e deformità strutturali. La valutazione di questa è di particolare importanza nei feti con sospetta trisomia 21 dove, valori al di sopra del 95 percentile della distribuzione normale, avvalorano il sospetto di tale condizione oltre che a difetti cardiaci maggiori. È considerato il marker biofisico più sensibile per il calcolo del rischio per la sindrome di Down. (24,25)



Figura 5-Translucenza nucale.

Test biochimici/combinati:

Bi-test

Il Bi-test è un esame di screening prenatale non invasivo eseguito nel 1° trimestre di gravidanza. È un test predittivo e non diagnostico il quale permette di calcolare il rischio che il feto sia affetto. Le anomalie cromosomiche rilevabili con questo test sono alcune o, meglio, le più comuni ovvero trisomia 21(Sindrome di Down),18 (Sindrome di Edwards) e 13(Sindrome di Patau). L'esame consiste nella valutazione della condizione fetale andando a rilevare dati derivanti dall'ecografia, transaddominale o transvaginale, eseguita tra l'11° e la 13° settimana di gestazione, dove si verifica l'anatomia del feto e la translucenza nucale prevalentemente e, secondariamente, l'analisi del sangue materno per il dosaggio della gonadotropina corionica o β -HCG, un ormone prodotto dall'embrione e della PAPP-A, proteina plasmatica A associata alla gravidanza.

A livello ecografico, la misurazione della translucenza nucale (NT), ovvero dello spazio dietro la nuca del feto che tende a diminuire con il passare delle settimane di gestazione a seguito del riassorbimento del fluido, è molto importante e costituisce un importante parametro per la valutazione del rischio. Infatti, è direttamente correlato con alcune anomalie cromosomiche. La positività di tale valore porta all'esecuzione di un test prenatale invasivo, quale villocentesi o amniocentesi, che mi fornisce un risultato diagnostico.

La β -HCG è un ormone prodotto dal sinciziotrofoblasto che ha il compito di stimolare il corpo luteo alla produzione di ormoni, quali estrogeni e progestinici, che verrà poi proseguita dalla placenta. Il dosaggio di questo ormone, oltre come parametro diagnostico per patologie neoplastiche, test di screening e monitoraggi, viene adoperato nei test di gravidanza. La concentrazione di HCG aumenta esponenzialmente durante le prime settimane di gravidanza raggiungendo poi il picco massimo intorno alla decima settimana, cui segue un declino graduale. Questo ormone è un eterodimero costituito da 2 catene, α e β , quest'ultima importante nel legame con il recettore e quindi indispensabile per l'effetto biologico. Il dosaggio delle β -HCG, in gravidanza, maggiore di 2500-3000 μ U per ml, indica la possibilità di effettuare l'esame ecografico dato che, a livelli inferiori, non sarebbe possibile l'osservazione.

La PAPP-A o *Pregnancy Associated Plasma Protein A* è una glicoproteina plasmatica presente nel sangue materno in gravidanza. È prodotta dal sinciziotrofoblasto e aumenta in modo crescente fino alla fine del periodo gestazionale. Tale proteina è molto importante poiché la sua diminuzione è indicativa di una minaccia d'aborto, quindi utile per la prognosi nella gravidanza iniziale; inoltre, viene adoperata nelle diagnosi, in particolare nelle malformazioni embrio-fetali.

In alcune patologie i risultati dei due esami possono essere discordanti l'uno dall'altro e nel caso la translucenza nucale risultasse normale, il calcolo del rischio combinato risulterà comunque alto. È importante combinare i test in modo da ottenere un profilo di rischio affidabile, che ad esempio, nella sindrome di Down può arrivare al 96% (7,26).

1.8 Tecnologia cffDNA/NIPT

Il cffDNA/NIPT (in inglese *Cell-free fetal DNA*) è un test di diagnosi prenatale non invasivo basato sulla presenza di DNA fetale libero da cellule nel sangue materno per lo screening delle anomalie cromosomiche fetali. Il DNA preso in considerazione proviene da cellule dei villi placentari. La concentrazione a livello del plasma materno aumenta all'aumentare dell'età gestazionale e consente di studiare il profilo genetico fetale da cui possiamo trarre importanti informazioni sulla condizione e sviluppo fetale. Oltre a essere un test non invasivo, possiede altri vantaggi, fra i quali elevata precisione e il possibile utilizzo in diverse fasi della gravidanza.

Il cffDNA fetale consiste in frammenti della lunghezza di circa 150 bp e viene rilasciato dalle cellule apoptotiche del sinciziotrofoblasto. La placenta rilascia, attraverso la sua circolazione sanguigna, quantità significative di DNA fetale. Questo può essere utilizzato in diversi ambiti, tra i quali anche la determinazione non invasiva di paternità (27). La tecnologia NIPT trova applicazione soprattutto nello screening di trisomie 21,18 e 13 (T21, T18, T13) ma, con lo sviluppo di tecniche di sequenziamento del DNA, tale metodica è riuscita a identificare rare aneuploidie autosomiche e varianti del numero di copie (CNV) (28). Inoltre, il test può dare informazioni sul sesso del feto se è individuabile il cromosoma sessuale maschile(Y).

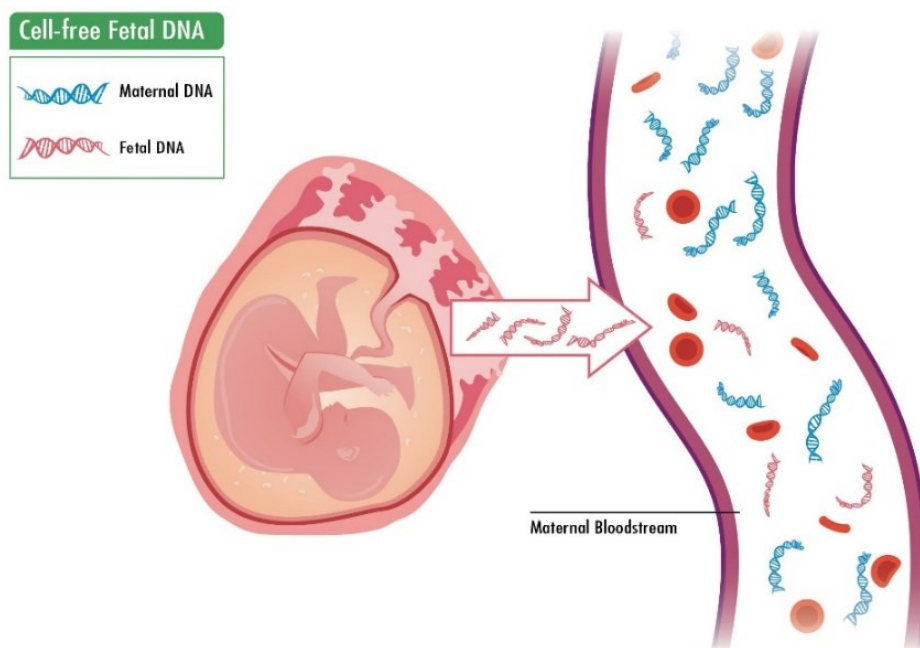


Figura 6- CffDNA per diagnosi prenatale non invasiva

Sono disponibili vari test di screening e test diagnostici che si differenziano tra loro per la tipologia delle informazioni offerte e la performance, così come per i vantaggi e i limiti. La scelta del test è determinante e avviene mediante l'interazione tra personale specialistico e la paziente durante la visita di consulenza. Questa è fondamentale prima dell'esecuzione del test cfDNA/NIPT per informare la paziente sui vantaggi e limiti del test di screening e le implicazioni dei risultati, sia ad alto che a basso rischio, anche in relazione al tipo di anomalie identificate. Il test è preceduto da un'ecografia per rilevare le condizioni fetali. I risultati che esprimono un alto rischio di patologia fetale, poiché è un test di tipo probabilistico sul rischio di affezione fetale, devono essere sottoposti a conferma mediante un ulteriore test diagnostico idoneo all'individuazione dello stato reale fetale. Infatti, il test non fornisce un'analisi genetica completa del feto che è attuabile solo con tecniche invasive (villocentesi ed amniocentesi) (29).

1.9 Scopo

Questo lavoro è stato programmato in collaborazione con gli specialisti del Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale "G. Salesi" di Ancona.

Lo scopo è stato quello di ristabilire il ruolo attuale delle indagini citogenetiche classiche in rapporto alle nuove tecnologie diagnostiche non invasive per l'individuazione delle più frequenti anomalie cromosomiche fetali.

La valutazione è stata condotta con la descrizione delle procedure di ciascun test utilizzato e con la comparazione dei risultati dei test prendendo in esame una popolazione campione di 47 casi clinici per i quali sono state impiegate entrambe le diagnostiche, non invasiva prima e invasiva poi.

I test citogenetici su amniocentesi e villocentesi sono stati effettuati presso il laboratorio di Genetica Medica di Ancona mentre i test NIPT su sangue materno sono stati eseguiti in un a struttura esterna, che ha fornito le metodiche, ed i risultati sono stati estratti dai referti dei test.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Casi valutati sia in citogenetica che in NIPT

I test genetici vengono proposti alle gravide dallo specialista Ginecologo in base alla valutazione della storia personale e familiare della madre e all'andamento della gravidanza in corso: evidenze ecografiche, metaboliche, infettive, etc.

Alcune gravide scelgono comunque di eseguire accertamenti genetici anche in assenza di indicazioni cliniche.

Nel corso dell'anno 2022 nel Laboratorio di Genetica Medica sono state eseguite indagini citogenetiche su 201 campioni di amniocentesi e su 259 campioni di villocentesi.

La maggior parte di questi test costituivano l'unico esame genetico eseguito per la diagnosi prenatale del caso mentre una parte è stata eseguita come esame di conferma dopo un precedente NIPT, il test genetico fetale su sangue materno.

In particolare, i test citogenetici post-NIPT sono stati in totale 47, di cui 31 su amniocentesi e 16 su villocentesi, e su questi si è incentrato il lavoro di questa tesi.

Anno 2022	Amniocentesi	Villocentesi
Totale	201	259
Post NIPT	31 (15,4%)	16(5,8%)

Di seguito sono riportate le procedure utilizzati per i test genetici e citogenetici eseguiti.

2.2 Citogenetica su Villi coriali e amniociti

2.2.1 Esame citogenetico su Villi Coriali

Il prelievo dei villi coriali è un esame invasivo, consigliato alle pazienti gravide che presentano condizioni che possono essere rischiose per il corretto sviluppo fetale. L'esame si compone di due parti: attraverso la processazione del campione con tecnica semidiretta, si può studiare il cariotipo fetale sulle colture del citotrofoblasto mentre, dopo coltura a lungo termine si ottengono metafasi che consentono di visualizzare il cariotipo fetale su cellule provenienti dal mesenchima. L'analisi del cariotipo fetale sui due tessuti permette di riconoscere eventuali discrepanze e mosaicismi placentari.

La procedura di prelievo dei villi coriali è chiamata villocentesi. Questa viene eseguita tra l'undicesima e la dodicesima settimana di gestazione compiuta. Il prelievo dei villi coriali viene effettuato in sala chirurgica. Viene predisposto l'esame ecografico in modo da studiare la procedura prima dell'inizio del prelievo così da individuare il punto migliore per l'inserimento dell'ago e quindi il raggiungimento del trofoblasto. L'esame è eco-guidato e il prelievo viene effettuato mediante infissione transaddominale di due aghi coassiali fino a raggiungere il tessuto placentare. L'asportazione del campione avviene tramite siringa connessa all'ago.

Il campione prelevato viene valutato e successivamente trasportato, in terreno di coltura idoneo e in provetta sterile, al laboratorio. Qui, il materiale viene valutato all'invertoscopio dal personale tecnico che ne stima la quantità e l'eventuale presenza di decidua materna.

Tabella 1-Strumentazione per esame villi coriali

STRUMENTAZIONE
Cappa a flusso laminare
Incubatori Heraeus impostati a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), atmosfera 5% di CO ₂ ($\pm 0,5$) e 90% di umidità ($\pm 5\%$)
Invertoscopio
Postazione per cariotipizzazione

Tabella 2-Materiali per esame villi coriali

MATERIALI
Capsule Petri da 60 mm sterili
Capsule Petri da 35 mm sterili
Conetti Eppendorf da 1,5 ml
Pipette da 10 ml sterili
Pipette Pasteur monouso graduate da 3ml sterili
Pipette Pasteur monouso graduate da 3 ml non sterili
Pipette Pasteur di vetro sterilizzate
Fiasche tipo Falcon da 50 ml sterili ventilate
Complessi filtranti (0,2 µm) NALGENE
Vetrini portaoggetto mm 26x76
Vetrini coprioggetto rotondi 33mm appositamente tagliati
Vetrini coprioggetto 24x50
Bisturi sterili con lama arrotondata

Tabella 3-Reagenti per esame villi coriali

REAGENTI
Alcool etilico assoluto
Acido acetico glaciale
Citrato trisodico biidrato
Cloruro di potassio (KCl)
H ₂ O distillata in fiale da 10 ml
Terreno Chang Medium C+B (Irvine Scientific)
Colcemid (10 ug/ml in PBS)
Penicillina- Streptomycin stoccata in aliquote da 1 ml in conetti Eppendorf sterilizzati
Glutammina 200 mM stoccata in aliquote da 1 ml in conetti Eppendorf sterilizzati

Preparazione dei reagenti

Terreno Chang Medium

In ambiente sterile, ricostituire la componente C con 10 ml di acqua sterile e aggiungere alla componente B; aggiungere l'1% di Penicillina-Streptomycin e 1% di Glutammina

200 mM; il terreno così costituito deve essere utilizzato entro 30 giorni e mantenuto a 5 ± 3 °C.

Soluzione di citrato trisodico

Pesare 1,14 g di polvere e sciogliere in 100 ml di H₂O distillata. Mantenere alla temperatura di 5 ± 3 °C.

Fissativo forte giornaliero

Miscelare 3 parti di alcool etilico ed 1 parte di acido acetico glaciale.

Fissativo debole giornaliero

Miscelare 1 parte di fissativo forte e 1 parte di H₂O distillata

Alcool 70% e 50%

Miscelare rispettivamente 70 ml di alcool etilico assoluto con 30 ml di H₂O e 50 ml di alcool etilico assoluto con 30 ml di H₂O.

Acido acetico al 60% (dissociante)

Miscelare 60 ml di acido acetico e 40 ml di H₂O.

Semina e processazione

La semina del campione deve essere eseguita sotto cappa a flusso laminare e indossando i guanti. L'ambiente interno deve essere opportunamente disinfettato con alcool 70%. I campioni devono essere trattati uno alla volta. La procedura prevede un primo lavaggio dei villi in terreno o fisiologica sterile. Successivamente si procede con l'eliminazione, mediante osservazione all'invertoscopio, dei frammenti di decidua materna eventualmente presenti, aiutandosi con una pipetta Pasteur di vetro sterile. Suddividere quindi il campione in due aliquote: una per l'esame semidiretto e una per l'esame colturale.

Esame semidiretto

- Suddividere il materiale in 2 capsule da 35 mm con 2 ml di terreno e incubare in due termostati a CO₂ diversi;
- Dopo 1/2 overnight bloccare una capsula con 200 µl di Colcemid per 1.30/2ore;
- Aspirare il terreno e aggiungere 2 ml di Citrato trisodico;
- Incubare 15 min in termostato a 37°C;
- Aspirare e aggiungere 2 gocce di fissativo gelato;
- Aggiungere 2 ml di fissativo gelato;
- Incubare per almeno 30 min a -20°C (± 3°C);
- Aspirare e aggiungere 2 ml di alcool etilico assoluto per 1 min;
- Aspirare e aggiungere 2 ml di alcool etilico al 70% per 1 min;
- Aspirare e aggiungere 2 ml di alcool etilico al 50 % per 1 min;
- Aspirare e aggiungere 2 ml di acqua per 1 min;
- Aspirare e aggiungere 2 ml di acqua per 1 min;
- Aspirare e asciugare bene con carta bibula attorno ai villi;
- Aggiungere 4-5 gocce di dissociante (acido acetico al 60% in acqua) e attendere alcuni minuti;
- Strisciare su vetrini portaoggetto contrassegnati con il numero del caso, il cognome della paziente e la sigla del tecnico processatore, puliti e preriscaldati su piastra a 37-40°C con ansa di vetro; il tutto mantenendo la goccia sospesa;
- Invecchiare i vetrini su piastra a 60°C (± 5°C) per 30 min (± 5 min);
- Proseguire con bandeggio Q.

Esame colturale a lungo termine

- Frammentare il materiale il più possibile con bisturi e distribuirlo con pochissimo terreno (800 uL) in 2 fiasche contrassegnate con H ed F;
- Incubare la fiasca H nel termostato Haereus 1 e la fiasca F nel Haereus 2;
- Il giorno dopo, aggiungere alcune gocce di terreno in ogni fiasca;
- Dopo 2 overnight aggiungere 3/4 ml di terreno e reincubare;

- L'8° giorno cambiare il terreno; quando la crescita è sufficiente procedere alla tripsinizzazione. La tripsina viene lasciata agire per pochi minuti. Il fine ultimo è l'ottenimento del monostrato.
- Scrivere sulla piastra il giorno di tripsinizzazione. Provvedere alla scrittura delle piastre (2 solitamente) con riportato l'identificativo del paziente, il nome, numero della piastra (h1-h2; f1-f2), la data. Controllare che le piastre i vetrini al loro interno siano intatti.
- Eliminare il terreno dalla piastra e aggiungere la soluzione isotonica per effettuare vari lavaggi.
- Agitare la fiasca in modo da favorire il distacco delle cellule dal fondo. Osservare all'invertoscopio. Per arrestare l'azione della tripsina aggiungere il terreno.
- Inoculare la sospensione all'interno di due piastre andando a valutare la cellularità di entrambi i preparati che non deve essere eccessiva ma omogenea.
- Incubare per 1-2 overnight.
- Bloccare la crescita con Colcemid, il quale viene posto nelle capsule e lasciato incubare a 37°C in termostato per 2 ore circa.
- Procedere con la processazione (fissazione con acidi) operando in condizioni ambientali controllate di T(21±3°C) e di umidità (50±5%) lavorando sotto cappa chimica e indossando i guanti:
 - Aspirare il terreno
 - Aggiungere in ogni capsula 3 ml di sol. ipotonica (1:1 Citrato e KCl);
 - Lasciare a TA per 25 min;
 - Aggiungere 1 ml di fissativo forte goccia a goccia a croce;
 - Aggiungere 0,5 ml di fissativo debole (1:1 fissativo forte e H₂O) (FD) in tondo aspirare 2 ml;
 - Aggiungere e togliere 1 ml di fissativo debole per 5 volte;
 - Aspirare tutto;
 - Aggiungere 0.5 ml di fissativo forte goccia a goccia a croce;
 - Aggiungere 0.5 ml di fissativo forte in tondo;
 - Aspirare. aggiungere e togliere 0.5 ml di fissativo forte per 7 volte;
 - Aspirare tutto;

- Togliere i vetrini dalle capsule con l'ago di una siringa piegato, asciugarli sotto ed incollarli con Eukitt su vetrini portaoggetto precedentemente contrassegnati con il n° caso, il cognome della paziente e la sigla del Tecnico processatore;
- Invecchiare i vetrini per 30 min (\pm 5 min) su piastra a 60° C (\pm 5°C°).

Colorazione

I vetrini allestiti sia per l'esame semidiretto che colturale vengono posti in una soluzione di quinacrina. È un colorante fluorescente che ha affinità per le regioni ricche di Adenina e Timina. La quinacrina è diluita 1:10 in H₂O. Inoltre, essa colora selettivamente anche il braccio lungo del cromosoma Y, nella sua porzione eterocromica. Dopo colorazione vengono fatti due lavaggi in tampone B per eliminare l'eccesso di colorante. Il tampone utilizzato è il Soresen a pH 6,7. Dopo il risciacquo, su ogni vetrino viene posta una goccia di tampone per idratare il preparato e si posiziona il vetrino coprioggetto tondo o rettangolare sopra e si fa aderire. I vetrini coprioggetto tondi vengono posti in alcool per essere puliti prima di essere utilizzati e vengono attentamente asciugati prima di farli aderire al campione. Ultimato questo passaggio, si sigillano i bordi dei due vetrini in modo da non far asciugare il preparato. La sigillatura avviene con dello smalto trasparente. Lasciare asciugare quest'ultimo. Il preparato è pronto per essere letto dal personale medico. Al microscopio si cercano le metafasi migliori.

2.2.2 Esame citogenetico sul liquido amniotico

L'esame del liquido amniotico è un test invasivo di diagnostica prenatale effettuabile a un'età gestazionale di circa 16-19 settimane. Durante il prelievo vengono aspirati attraverso agopuntura eco guidata, dai 20 ai 30 ml di liquido amniotico, aliquotati in due provette sterili da 15 ml. Il liquido amniotico è costituito da acqua, urina fetale, proteine, alpha-feto proteina, soluti e amniociti; quest'ultimi sono oggetto d'interesse per gli studi genotipici. La cellularità del campione aumenta all'aumentare del numero delle settimane di gestazione. La coltura degli amniociti su terreno idoneo consente di ottenere metafasi sulle quali effettuare lo studio del cariotipo fetale.

Tabella 4- Strumentazione per esame amniociti

STRUMENTAZIONE
Centrifuga
Cappa a flusso laminare
Incubatori Heraeus 1, 2,3,4 e impostati a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), atmosfera al 5% di CO ₂ (± 0.5) e 90% di umidità ($\pm 5\%$)
Invertoscopio
Postazione per cariotipizzazione

Tabella 5- Materiali per esame amniociti

MATERIALI
Provette da 10 ml coniche, non sterili
Conetti Eppendorf da 1,5 ml
Pipette da 10 ml sterili
Pipette Pasteur monouso graduate da 3ml sterili
Pipette Pasteur monouso graduate da 3ml non sterili
Capsule Petri da 35 mm sterili con vetrino all'interno
Fiasche tipo Falcon da 50 ml sterili ventilate
Complessi filtranti (0,2 micron) NALGENE
Vetrini portaoggetto mm 26x76
Vetrini coprioggetto rotondi 33mm appositamente tagliati

Tabella 6- Reagenti per esame amniociti

REAGENTI
Alcool etilico assoluto
Acido acetico glaciale
Citrato trisodico biidrato
Cloruro di potassio (KCl)
H2O distillata in fiale da 10 ml
Terreno Chang Medium C+B (Irvine Scientific)
Terreno Chang Amnio (Irvine Scientific)
Glutammina 200mM stoccata in aliquote da 1ml in conetti Eppendorf sterilizzati
Penicillina-Streptomicina stoccata in aliquote da 1ml in conetti Eppendorf sterilizzati
Colcemid (10 ug/ml in PBS)

Preparazione dei reagenti

Terreno Chang

In ambiente sterile, ricostituire la componente C con 10 ml di acqua sterile e aggiungere alla componente B; aggiungere l'1% di penicillina-streptomicina e 1% di glutammina 200 mM. Il terreno così ricostituito deve essere utilizzato entro 3 giorni e mantenuto a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Soluzione KCl 0,075 M

Pesare 2,8 g di polvere e sciogliere in 500 ml di H₂O distillata. Filtrare con complesso filtrante. Ultimato questo passaggio, conservare in frigo a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Soluzione di citrato trisodico

Pesare 1,14 g di polvere e scioglierla in 100 ml di H₂O distillata. Filtrare con complesso filtrante. Conservare in frigo a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Soluzione ipotonica giornaliera

Miscelare 1 parte di KCl 0,075M ed 1 parte di soluzione di Citrato trisodico.

Fissativo forte giornaliero

Mescolare 3 parti di Alcool Etilico ed 1 parte di Acido acetico glaciale.

Fissativo debole giornaliero

Mescolare 1 parte di fissativo forte ed 1 parte di H₂O distillata.

Semina e processazione

La semina del campione viene eseguita sotto cappa a flusso laminare predisposta e utilizzando guanti monouso. Le provette con il liquido amniotico vengono centrifugate a 1200 rpm per 2 minuti. Ottenuto il pellet cellulare ben separato dal sopranatante, portare il campione sotto cappa e procedere con la semina del campione:

- Eliminare il sopranatante fino a 1 ml separandone 10 ml circa suddivisi in 2 provette non sterili per il dosaggio dell'alpha-fetoproteina;
- aggiungere alla provetta I 5 ml di terreno Chang I e alla provetta II 5 ml di terreno Chang II. Si utilizzano due terreni appartenenti a due lotti diversi che verranno poi incubati in due termostati distinti. Il terreno viene inserito nella fiasca (3ml) e nella provetta madre con le cellule (7 ml);
- Contrassegnare con il numero del caso ed il cognome della paziente 4 capsule da 35 mm con vetrino e due fiasche da 50 ml per ogni campione
- Risospendere il sedimento;
- Inoculare circa 2 ml di terreno con le cellule nelle quattro capsule (amniodish) contenenti il vetrino avendo cura di far aderire quest'ultimo alla base della capsula;
- Prelevare 2 ml e posizionarli nel terreno in fiasca già allestito;
- Fare roteare la fiasca per favorire l'adesione. Si devono ottenere 2 piastre e una fiasca (C) dalla prima provetta (A e B) e altre 2 (D e E) e una fiasca (F) dalla seconda provetta;
- Una volta allestite, mettere le fiasche e le capsule (amniodish) in due termostati diversi in base al lotto di terreno utilizzato;
- Il 5° giorno dalla semina aggiungere 1 ml di terreno ad ogni capsula;
- L'8° giorno dalla semina sostituire il terreno con terreno fresco nelle capsule ed iniziare l'osservazione all'invertoscopio;

- Quando i cloni appaiono opportunamente cresciuti bloccare le capsule con 200 µl di Colcemid e reincubare a 37°C per 1.30 - 2 ore;
- Procedere con la processazione operando in condizioni ambientali controllate di T (21±3°C) e di umidità (50±5%) lavorando sotto cappa chimica e indossando i guanti;
- Aspirare il terreno;
- Aggiungere in ogni capsula 3 ml di sol. ipotonica (1:1 Citrato e KCl);
- Lasciare a TA per 25 min;
- Aggiungere 1 ml di fissativo forte goccia a goccia a croce;
- Aggiungere 0,5 ml di fissativo debole (1:1 fissativo forte e H₂O) in tondo;
- Aspirare 2 ml;
- Aggiungere e togliere 1 ml di fissativo debole per 5 volte;
- Aspirare tutto;
- Aggiungere 0.5 ml di fissativo forte goccia a goccia a croce;
- Aggiungere 0.5 ml di fissativo forte in tondo;
- Aspirare. aggiungere e togliere 0.5 ml di fissativo debole per 7 volte;
- Aspirare tutto;
- Togliere i vetrini dalle capsule con l'ago di una siringa piegato, asciugarli sotto ed attaccarli con Eukitt su vetrini portaoggetto precedentemente contrassegnati con il n° caso, il cognome della paziente e la sigla del Tecnico processatore;
- Invecchiare i vetrini per 30 min (± 5 min) su piastra a 60° C (± 5°C°).

Nel caso in cui le metafasi ottenute da cloni non siano sufficienti o sia necessario fare approfondimento sul caso procedere alla tripsinizzazione di una o entrambe le fiasche.

Colorazione

I preparati su vetrino vengono coloranti attraverso l'utilizzo di una soluzione fluorescente contenente quinaria. L'iter di colorazione è il medesimo descritto precedentemente per l'esame dei villi coriali. (30)

2.2.3 FISH

La FISH o ibridazione in situ fluorescente è una tecnica di indagine di biologia molecolare che, attraverso l'utilizzo di sonde sequenza specifica, permette l'individuazione di sequenze geniche all'interno delle cellule in modo da determinarne la presenza (o l'assenza) e la localizzazione. Questa tecnica è utilizzabile sia in cellule che si presentano nello stato di interfase che metafase, durante il ciclo cellulare. Conferisce un risultato di tipo quantitativo che permette di evidenziare anomalie numeriche e strutturali.

La tecnica è applicabile a varie tipologie di campioni: sangue periferico, cellule di liquido amniotico etc.

La tecnica ha una risoluzione di circa 100kb-1Mb. Come precedentemente detto, la tecnica consta dell'utilizzo di sonde ottenute dallo studio del DNA e, dall'informazione di questo, è stato possibile progettare sequenze (sonde) complementari al filamento di DNA da testare. Oltre che a sonde specifiche complementari per il gene d'interesse, sono presenti delle sonde per sequenze di geni detti housekeeping, utilizzate nell'analisi FISH come controlli interni positivi col fine di verificare la riuscita della metodica.

I frammenti di DNA (probes) sono costituiti da sequenze di DNA sintetizzate in laboratorio, marcate con molecole fluorescenti che rendono visibile la regione identificata attraverso l'ibridizzazione.

La procedura è manuale e non necessita l'esecuzione sotto cappa a flusso purché vengano rispettate le indicazioni riportate in letteratura e con le corrette precauzioni. I campioni utilizzati devono essere opportunamente fissati al fine di mantenere l'integrità dell'acido nucleico.

La FISH consta di più fasi per la realizzazione di un preparato idoneo alla lettura al microscopio a fluorescenza. (31)

Fase preanalitica

I campioni di interesse provengono da amniocentesi e villocentesi. Per le procedure relative all'allestimento dei preparati, fare riferimento al capitolo precedente relativo

alla citogenetica sua amniociti e villi coriali. Il vetrino allestito e correttamente fissato può procedere alla marcatura mediante sonda fluorescente.

Fase analitica

A seconda delle disposizioni del medico richiedente, le sonde vengono selezionate per essere poste su vetrino. Si hanno a disposizione diversi tipi di sonde:

- Centromeriche: sono sonde costruite per riconoscere sequenze alfa satellite altamente ripetute ricche di adenina e timina nelle regioni centromeriche. Ogni sequenza è specifica di un determinato cromosoma;
- Locus specifiche: sonde che ibridano un'unica sequenza di DNA. Queste sonde sono in grado di identificare anomalie strutturali come delezioni, amplificazioni, traslocazioni e riarrangiamenti;
- Telomeriche: sono sonde in grado di ibridizzare la regione terminale 5' e 3' di tutti i cromosomi simultaneamente perché costituite dalle stesse sequenze ripetute TTAGGG;
- Subtelomeriche: riconoscono delle sequenze prossime ai telomeri e sono specifiche di ogni cromosoma. Queste hanno la particolarità di riuscire a rilevare alterazioni strutturali come microdelezioni non identificabili con cariotipo convenzionale e riarrangiamenti causativi di ritardo mentale e aborti;
- Whole chromosome painting (WCP): anche dette paint, sono sonde specifiche di ciascun cromosoma che ne permettono l'intera colorazione. Questi tipi di sonde vengono impiegate per l'individuazione di traslocazioni, alterazioni numeriche, strutturali e intercromosomiche. Questo tipo di sonde non sono in grado di rilevare microdelezioni, microduplicazioni, inversioni, e piccole traslocazioni.

Dato il gran numero di sonde presenti in commercio, sulle base del quesito clinico, è possibile isolare le più adatte alla formulazione della diagnosi. La sonda viene posizionata sul vetrino secondo le disposizioni del medico richiedente che indica al personale tecnico le aree maggiormente rappresentative idonee alla colorazione. Possono essere richieste per l'indagine più sonde e quindi si può optare per dei pannelli.

La sonda, preallestita o da ricostituire secondo le indicazioni riportate dalla casa produttrice, viene posizionata nella quantità idonea sul vetrino, coperta poi con vetrino

portaoggetti e, successivamente, lasciata ibridare al buio al disopra di una piastra termoriscaldata alla temperatura di 75°C per 5'. Quest'ultima fase, detta di denaturazione, è fondamentale per favorire l'apertura della doppia elica di DNA e quindi, per permettere ibridizzazione della/e sonda/e sequenza specifica sul filamento complementare del DNA da testare.

Di seguito, i vetrini vengono posti per 24h in termostato per far in modo che DNA e sonde ibridino.

Trascorso il tempo di incubazione in termostato, si procede con la rimozione del vetrino portaoggetti e della sonda non legata che altrimenti creerebbe degli artefatti che inficerebbero la lettura al microscopio a fluorescenza. La rimozione prevede dei passaggi in tamponi SSC come di seguito descritti:

- Immergere i vetrini in una vaschetta munita di tappo contenente tampone SSC 0,4X per circa 2-5 minuti;
- Rimuovere il vetrino coprioggetto e posizionare i vetrini portaoggetto all'interno di un contenitore con SSC 0,4X, posto all'interno di un bagnetto termico alla temperatura di circa 70°C. La temperatura all'interno della vaschetta con il tampone deve aggirarsi intorno ai 68-70° ma il bagnetto termico viene posto a una temperatura superiore poiché il vetro del contenitore andrebbe a influire sulla temperatura interna, abbassandola. In genere si aumenta di 1°C la temperatura all'aumentare del numero di vetrini nel recipiente. Lasciare in immersione per 2 minuti al massimo;
- Immergere i preparati in un contenitore al di fuori del bagnetto, contenente SSC 2X per almeno 2-5 minuti;
- Una volta ultimato questo passaggio, lasciare i vetrini ad asciugare a TA per circa 10 minuti;
- Predisporre i vetrini coprioggetto delle misure adeguate e posizionare su ognuno di essi il DAPI. Quest'ultimo è un colorante fluorescente sensibile alla luce utilizzato come contrasto per le sonde FISH ed è in grado di conferire al preparato una colorazione blu scura, permettendo, quindi, di mettere in risalto il colore verde e rosso delle sonde. In base alla grandezza del copri oggetto (differente per pannelli e sonde singole) 10 µl in due punti distinti (coprioggetto

- rettangolare per pannelli di sonde) o 4 μ l in una sola area (coprioggetto quadrato-sonda singola);
- Far aderire successivamente il vetrino porta-oggetto e sigillare con smalto trasparente;
 - Riporre i preparati in apposite scatole scure in attesa della lettura al microscopio a fluorescenza.

Preparazione di cellule non colturali da Amniocentesi per FISH

- Il campione in provetta viene posto in centrifuga a 1200 rpm per 3 minuti. Una volta ultimata la centrifugazione, si ottiene un pellet cellulare di amniociti. Con una pipetta Pasteur prelevare il soprannatante ed eliminarlo;
- Accendere il bagnetto termico e impostarlo a 37°C, temperatura necessaria per favorire l'azione enzimatica. Vengono inseriti all'interno della provetta 3-3,5 ml di tripsina-EDTA 1x per permeabilizzare le cellule. La provetta viene quindi posta in un supporto galleggiante e messa nel bagnetto per 15-20 minuti. Successivamente, centrifugare e aspirare poi il surnatante;
- Risospendere il fondello in 3-3,5 ml in ipotonica (KCl) e mettere a 37°C per circa 20 minuti;
- Aggiungere 3 ml di fissativo (3 etilico:1 acetico) a goccia, miscelando e incubare TA. per 10 minuti. Centrifugare ed eliminare il surnatante;
- Risospendere il fondello in 3 ml di fissativo e tenere per 20-30 minuti a 2-8°. Si può passare allo striscio subito dopo oppure mettere in frigo per massimo 72 ore. Se si deve far subito lo striscio, in base al numero di loci da voler studiare, allestire i vetrini (se si devono studiare 4 loci- 2 vetrini; 13/21 insieme, 18 singolo, XY singolo). Centrifugare le provette se tolte da frigorifero; si aspira il fissativo in eccesso in modo da avere il pellet in una sospensione concentrata (1:1 pellet – fissativo);
- Posizionare sul vetrino 10 microlitri di campione in 1-2 aree e far stendere il preparato sulla superficie. Asciugare utilizzando la fiamma;
- Con la vetrografica, segnare le aree più rappresentative;

- Si può passare alla reidratazione subito o dopo un intervallo di tempo massimo di 6 ore;
- La reidratazione inizia andando a utilizzare l'SSC2x per 30 minuti a 37°C (bisogna aver precedentemente impostato il bagnetto a 40°). Passare alla digestione: fare un lavaggio in pepsina 100mg/ml in HCl 0,01 M per 30 minuti a 37°C. Agito 2/3 volte. Fare un lavaggio con PBS 1x con Mg per 5 minuti a T.A;
- Preparare a temperatura ambiente in ordine: PBS, alcool 70%, alcool 85%, alcool 100%. I passaggi vanno fatti ogni 2 minuti. Ultimato quest'ultimo passaggio si lascia asciugare per 20'. Dopo asciugatura si può passare alla deposizione delle sonde fluorescenti.
- Porre i vetrini con la sonda a ibridare in termostato a 37° C per una overnight. Il giorno successivo procedere alla rimozione del vetrino e della sonda non legata secondo la procedura riportata per la FISH standard. (30)

2.3 Studio cfDNA

Test Personal Vision

Il test NIPT Personal Vision, offerto dall'azienda Personal Genomics, è un test di screening prenatale non invasivo su DNA fetale libero (cfDNA) circolante nel sangue materno. Questo tipo di test viene proposto alle pazienti della clinica di Ostetricia dell'ospedale Salesi che intendono eseguire una diagnosi genetica non invasiva.

Il prelievo di sangue intero periferico materno di donne in gravidanza, pari a un volume di 7-10 ml, viene eseguito a partire dalla decima settimana di gestazione. In questo periodo il sangue della madre contiene una quantità ottimale di DNA fetale. I frammenti di DNA fetale derivano dalla porzione placentare di origine embrionale e passano nel circolo materno in seguito alla morte per apoptosi a causa del turn over cellulare.

Essendo un test prenatale non invasivo, è un test probabilistico e non diagnostico.

La determinazione del sesso fetale viene effettuata sulla presenza/assenza di sequenze riconducibili al cromosoma Y.

Il test NIPT Personal Vision può essere effettuato anche in caso di gravidanza gemellare con due feti, ovodonazione e gravidanza surrogata.

Sono disponibili varie tipologie di questo test che differenziano per il numero di anomalie rilevabili; i test disponibili sono il "BASIC", "MEDIUM", "FULL" E "PLATINUM". L'ospedale Salesi, in particolare, offre alle proprie pazienti i test "BASIC" e "MEDIUM": il primo permette di testare i campioni per la Trisomia 21,18,13, Sindrome di Turner, Trisomia X, Sindrome di Klinefelter, Sindrome di Jacobs, sesso fetale (test CE-IVD); il secondo, oltre che per le aneuploidie precedentemente nominate, individua aneuploidie cromosomi non sessuali. Per quanto concerne i test personal vision "FULL" e "PLATINUM", questi rilevano anomalie più rare e di dimensioni più ridotte come le sindromi da microdelezioni o microduplicazione, se superiori alle 7 Mb.

La tecnica utilizzata è la MPS Illumina e l'algoritmo VeriSeq di Illumina. L'MPS o sequenziamento massivo parallelo permette di analizzare e mettere a confronto i frammenti di DNA libero ottenuti dal campione di sangue materno. In questo modo, i vari segmenti di DNA vengono allineati al genoma per identificare il cromosoma entro il quale

è contenuto il frammento. Il confronto avviene andando a misurare le quantità di sequenze per un cromosoma specifico nel campione da testare rispetto a quello di un paziente di riferimento. (32)

Questi test hanno un grado di sensibilità e specificità variabile. Ricordiamo che la sensibilità in questi test è la capacità di identificare correttamente come rischio elevato un vero caso a rischio elevato mentre, la specificità, è la capacità di identificare correttamente un caso non affetto come a basso rischio.

Di seguito, si riportano le informazioni relative a sensibilità e specificità del test per quanto riguarda le principali anomalie:

Condizione	Sensibilità	IC	Specificità	IC
Trisomia 21	> 99,9% (130/130)	97,1%, 100%	99,90% (1.982/1.984)	99,63%, 99,97%
Trisomia 18	> 99,9% (41/41)	91,4%, 100%	99,90% (1.995/1.997)	99,64%, 99,97%
Trisomia 13	> 99,9% (26/26)	87,1%, 100%	99,90 (2.000/2.002)	99,64%, 99,97%
RAA	96,4% (27/28)	82,3%, 99,4%	99,80% (2.001/2.005)	99,49%, 99,92%
CNV ≥ 7 Mb	74,1% (20/27)	55,3%, 86,8%	99,80% (2.000/2.004)	99,49%, 99,92%
Qualsiasi anomalia	95,5% (318/333)	92,7%, 97,3%	99,34% (1.954/1.967)	98,87%, 99,61%

IC = intervallo di confidenza al 95%.
Le informazioni della tabella riguardano le prestazioni generali del test.

Figura 7- Tabella specificità-sensibilità test Personal Genomics

Tra i possibili risultati del test abbiamo:

- Bassa probabilità: indica un basso rischio che il feto sia affetto da una delle patologie presenti nel pannello.
- Alta probabilità: indica un rischio aumentato che il feto sia affetto da una delle patologie indagate. Il risultato deve essere confermato da test diagnostici invasivi
- Nessun risultato: a causa di una bassa frazione fetale, di particolari condizioni biologiche o per altre cause legate alla bassa qualità dei risultati. Nel caso in cui il test non sia valido per l'assenza di una quantità idonea di DNA o per problematiche di estrazione, il test può essere ripetuto su altro prelievo effettuato a distanza di una settimana dal precedente campione.

- Sesso del feto: conoscere il sesso fetale è un'opzione e non lo scopo del test. Nel caso in cui dovesse risultare un sospetto di aneuploidia dei cromosomi sessuali, il sesso del feto non è specificato.

Essendo un test predittivo, probabilistico, non conferisce un risultato diagnostico e non sostituisce quindi l'accuratezza e la precisione di un test diagnostico invasivo. Risultati falsi positivi o negativi sono possibili. Bisogna ricordare che questi test non sono in grado di rilevare tutti i difetti genetici o altre anomalie genetiche/cromosomiche sia nei cromosomi testati che non testati e non riesce a rilevare duplicazioni e delezioni di dimensione inferiore alle 7Mb e riarrangiamenti cromosomici bilanciati. Inoltre, condizioni biologiche presenti nella madre e/o nel feto/placenta possono causare un risultato discordante dalla reale costituzione fetale oppure non fornire risultato. Altre condizioni che possono conferire risultati ambigui sono: trasfusioni di sangue recenti, trapianto di organi o cellule staminali, malattie autoimmuni della madre e tumori, mosaicismi materni e fetali e morte fetale/gemello scomparso. Il test ha un rischio fallimentare di circa l'1-4% determinato da una bassa % di frazione fetale (FF) il quale valore deve essere $>4\%$, dal mancato superamento dei controlli di qualità e dalle condizioni biologiche fetali o materne. I risultati arrivano dopo circa 3-6 giorni mentre per il pannello "PLATINUM" sono necessari 10 giorni (33,34).

2.3.1 Tecnologia utilizzata, MPS Illumina e l'algoritmo VeriSeq

Grazie all'avvento delle nuove tecnologie, in particolare alle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next Generation Sequencing), si è potuta effettuare un'analisi più efficace in merito a rapidità ed economicità. In questo modo, l'individuazione di geni causativi di malattia è risultata molto più semplice, permettendo di esaminare milioni di singole sequenze di DNA.

La tecnica di sequenziamento utilizzata nel test Personal Vision è la MPS Illumina combinata all'algoritmo VeriSeq di Illumina. L'MPS (sequenziamento massivo parallelo), permette di analizzare e mettere a confronto i frammenti di DNA libero ottenuti dal campione di sangue materno. In questo modo, i vari segmenti di DNA vengono allineati a genoma per identificare il cromosoma entro il quale è contenuto il frammento. Il confronto avviene andando a misurare le quantità di sequenze per un cromosoma specifico nel campione da testare rispetto a quello di un paziente di riferimento.

L'MPS è un metodo di sequenziamento spesso indicato sotto l'acronimo NGS (Next Generation sequencing), che indica una serie di tecniche di analisi della sequenza di DNA. La tecnica utilizzata in questo caso (Illumina) appartiene alle tecniche di sequenziamento di seconda generazione. Questa, permette di identificare l'ordine con cui si dispongono i nucleotidi a formare la sequenza di DNA e, così facendo, è possibile conoscere la sequenza dell'intero genoma o di regioni target. L'NGS di Illumina utilizza una tecnologia di sequenziamento detta SBS o "sequencing by synthesis" dove, attraverso l'aggiunta progressiva di nucleotidi marcati per la formazione di una sequenza complementare a quella d'interesse, avviene il monitoraggio e quindi l'individuazione della sequenza. Tutto il processo avviene in modo massivo e parallelo, da cui deriva MPS, consentendo in tempi ridotti e a costi contenuti, la generazione di un gran numero di dati.

Il processo si avvale dell'utilizzo di classiche attrezzature di laboratorio e di due strumenti specifici: per la preparazione dei campioni si impiega il sistema VeriSeq NIPT Microlab STAR (Hamilton), ottimizzato per l'uso nel flusso di lavoro VeriSeq NIPT e, per il sequenziamento, si adotta lo strumento NextSeq 550 Dx, commercializzato dalla azienda produttrice Illumina. NextSeq 550Dx possiede una chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequencing By Synthesis, SBS).

Questo, grazie anche alla presenza di kit di reagenti idonei e alla presenza di un'interfaccia software (VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, VeriSeq Onsite Server v2 con VeriSeq NIPT Assay Software v2), permette di avere sotto controllo tutto l'iter a cui il campione è sottoposto e, alla fine, di ottenere i risultati.



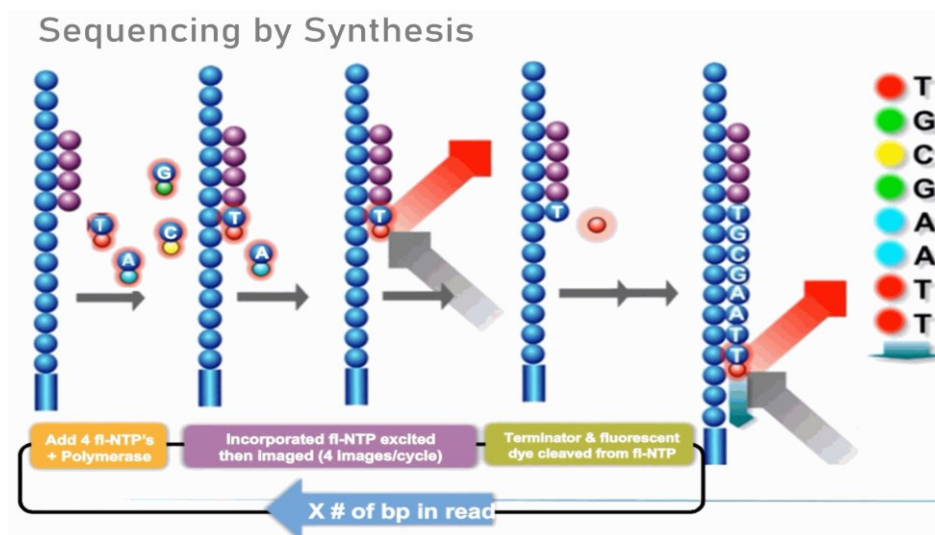
Come tutte le metodiche, il flusso di lavoro per quanto riguarda il test è dettagliato e preciso e può essere macroscopicamente suddiviso in sei fasi:

- 1) Raccolta del campione= il campione di sangue periferico materno intero deve avere un volume pari a 7-10 ml e deve essere contenuto all'interno di una provetta Cell-Free DNA BCT. Questo tipo di provette, oltre che ad essere esenti da frammenti di DNA contaminanti, stabilizzano il DNA e prevengono la lisi;
- 2) Preparazione del campione: affinché avvenga l'isolamento del plasma dalla componente corpuscolata, il campione viene sottoposto a centrifugazione. Il sistema automatizzato all'interno dello strumento permette la dispensazione del prodotto ottenuto all'interno di piastre con pozzetti per i successivi passaggi. Il plasma può essere conservato per 5 giorni a 4°C- Microbar Star;
- 3) Estrazione del cfDNA: dal campione di plasma si deve isolare il cfDNA attraverso un processo di purificazione utilizzando un sistema ad assorbimento su piastra legante sul quale si attuano degli step di lisi e lavaggio. La metodica prevede l'utilizzo di un kit "VeriSeq NIPT Extraction Box" (24,48,96) contenente tamponi di lisi, lavaggio ed eluizione, nonché proteinasi, proteasi e proteinasi K. Tutto il procedimento è finalizzato all'ottenimento di un campione puro ed esente da contaminanti;
- 4) Preparazione della libreria di sequenziamento: I frammenti purificati vengono modificati per mezzo dell'aggiunta di adattatori, sequenze artificiali adese alle estremità 5' e 3'. Ai frammenti con estremità 3' viene aggiunto un nucleotide deossiadenosina e successivamente vengono legati su frammenti di cfDNA elaborati con un nucleotide deossitimidina, su fase solida, ovvero su microsfera). Gli adattatori con deossiadenosina consentono l'identificazione del campione nel sequenziamento successivo mentre quelli con deossitimidina, oltre all'immobilizzazione del frammento sulla superficie della microsfera, favoriscono la formazione, all'interno della cella a flusso, di cluster di sequenziamento.;
- 5) Quantificazione del DNA: i frammenti immobilizzati vengono quantificati utilizzando coloranti fluorescenti e la loro concentrazione viene determinata andando a fare un confronto con una curva standard di DNA;

- 6) Raggruppamento e sequenziamento delle librerie: le librerie dei campioni vengono raggruppate in pool da 24 o 48 campioni in quantità adeguate a ridurre al minimo la variazione nella copertura. Ciascun pool viene quindi sequenziato utilizzando il sequenziamento NGS. Il materiale accumulato è pronto per essere sequenziato.

Il sequenziamento, come precedentemente detto, utilizza la tecnologia Illumina SBS; lo strumento aggiunge prima dei primer complementari che si vanno a legare all'estremità 3' di tutti i frammenti di DNA identici presenti in ogni cluster e successivamente la DNA polimerasi permette il legame al filamento stampo di dNTP particolari. Questi dNTP presentano ognuno, una molecola fluorescente diversa rimovibile. I gruppi 3'-OH di questi hanno un blocco chimico rimovibile che permette ad ogni primer l'aggiunta di una sola base per volta. Ciò permette allo strumento di rilevare le fluorescenze emesse delle basi aggiunte a ogni gruppo. Quindi, i fluorofori e il blocco sono allontanati. L'intero iter viene ripetuto dalle 50 alla 300 volte. È possibile così avere a disposizione milioni di letture delle varie sequenze divise in cluster e, grazie a sistemi informatici, è possibile, assemblando le reads (letture), risalire all'intera sequenza nucleotidica.

(35,36)



I dati di sequenziamento raccolti sono quindi elaborati dal software "VeriSeq NIPT Assay Software V2". Qui, oltre all'analisi e all'ottenimento dei report per ciascun campione, si ricavano i risultati relativi ai controlli di qualità, inseriti all'interno delle routine di lavoro.

L'algoritmo VeriSeq Nipt Solution V2 combina i dati ottenuti e, attraverso sistemi statistici, permette di evidenziare le regioni genomiche sotto o sovrarappresentate nella libreria di ogni singolo caso. I dati di sequenziamento sono allineati con il genoma di riferimento. Per ogni caso si va a calcolare un rapporto di verosimiglianza avendo a disposizione la stima della frazione fetale e i punteggi statistici per ciascun autosoma, che sono stati ottenuti per mezzo di un confronto tra le regioni di copertura che possono essere interessate dall'aneuploidia con il resto degli autosomi. Il rapporto di verosimiglianza rappresenta un valore probabilistico che mi definisce la possibilità che un feto sia affetto sulla base delle regioni di copertura osservata/utilizzata e la frazione fetale rispetto alla probabilità che un feto non sia affetto data la stessa regione di copertura osservata.

3. RISULTATI e DISCUSSIONI

3.1 Risultati generali

I risultati dei test eseguiti sui 47 casi selezionati sono riportati, singolarmente, nelle tabelle seguenti.

Anno 2022, *amniocentesi* post-NIPT

Caso	Risultato NIPT	Risultato citogenetica	Commento
006	45,X	46,XX	NIPT falso positivo
014	Non conclusivo	46,XX	
017	+ 21	+ 21	
020	46,XY	46,XX	
050	Non Conclusivo	46,XY	
052	+ 21	+21	
054 *	del22q	del22q	
057	+ 21	+ 21	
060	+ 14	+ 14	
072	XYY	XYY	
074	del6p25.3p24.3	46, XX	NIPT falso positivo
086 *	Non Conclusivo	XXY	
091	Dup9p24.3p13.2	46,XX	NIPT falso positivo
096	+3	46,XX	NIPT falso positivo
102	+ 21	+ 21	
109	Del22q11.2	46,XY	NIPT falso positivo
120	+ 21	+ 21	
126	XXY	XXY	
130	+14	46, XX	NIPT falso positivo
137	XXY	XXY	
142	+ 22	+ 22	
146	Non Conclusivo	46,XY	
147	XXY	XXY	
161	Non Conclusivo	46,XY	
167 *	delXq26.3q27.3	46,XY	NIPT falso positivo Madre con cariotipo 46,X.del(X)(q26q27) campione sangue periferico
172	+16	46,XY (normale)	NIPT falso positivo
181	+ 21	+21	
183 *	+ 13	+13	
189	XXY	XXY	
191	+ 13	+ 13	
200	+ 21	+ 21	

Anno 2022, villocentesi post-NIPT

Caso	Risultato NIPT	Risultato citogenetica	Commento
016 *	+ 21	+21	
021 *	Del10q25.1q26.3	46,XX	NIPT falso positivo
027 *	+21	+21	
034	+21	46,XX	NIPT falso positivo
038	+21	+21	
040	+21	+21	
066 *	+ 21	+21; +15	
075 *	+21	+21; -X	Mosaicismo di tipo III
101	+21	+21	
139	+21	+21	
155	+21	+21	
162	+21	+21	
193 *	+18	46,XX	Falso positivo
209 *	Dup(10)(p15.3q21.1)53.4 Mb	der10;22	
230	+21	+21	
250*	+21	+9; +21	Mosaicismo di tipo III

“*” = casi particolari descritti in seguito.

Per facilitare una visione d’insieme della casistica e per valutare i risultati d’insieme abbiamo raggruppato i casi in gruppi con caratteristiche comuni in base alle anomalie cromosomiche rilevate dal NIPT, come riportato nella seguente tabella.

Anomalie cromosomiche	NIPT		n° casi rilevati con NIPT	n° casi rilevati con citogenetica
Trisomie frequenti	Trisomia 21	20	23	21
	Trisomia 18	1		
	Trisomia 13	2		
Trisomie rare	Trisomia 22	1	5	2
	Trisomia 16	1		
	Trisomia 14	2		
	Trisomia 3	1		
Aneuploidie XY	45,X	1	7	5
	XYY	1		
	XXY	4		
	46,XY	1		
Microdelezioni e Microduplicazioni	del22q, del6p, dup9, del22q11.2, delX, dup10, del10	7	7	2
Non rilevate	test non conclusivo	5	5	1

Una diversa rappresentazione degli stessi dati ci consente di visualizzare le differenze di rilevazioni per ogni gruppo.

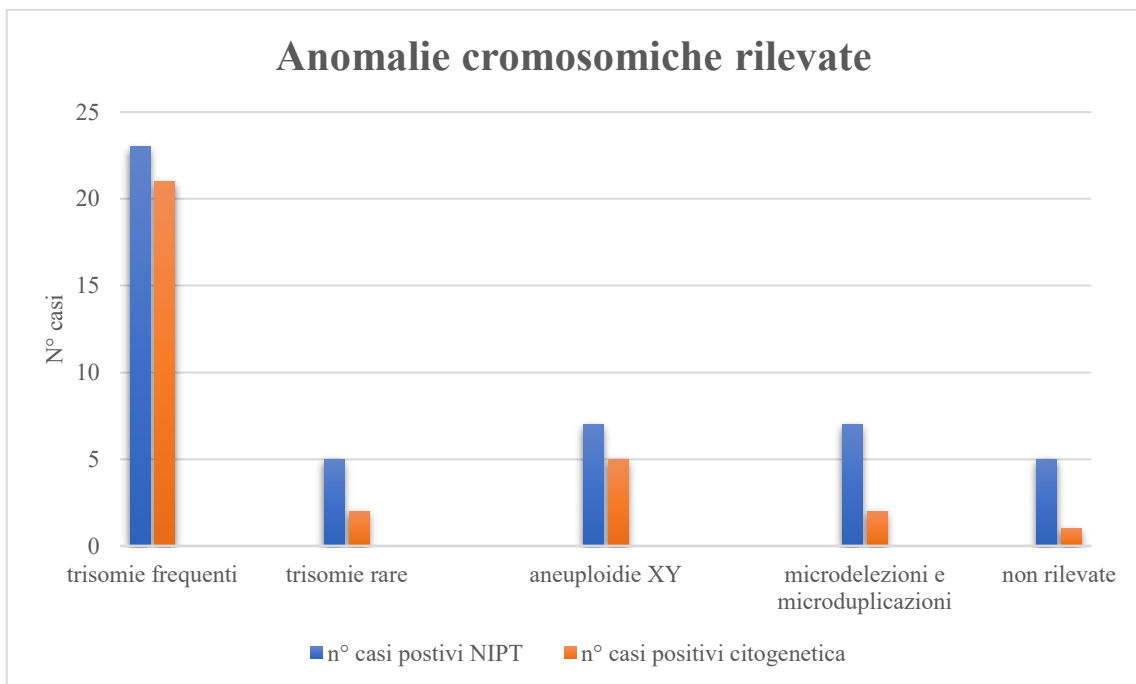


Figura 8-Confronto dei risultati ottenuti con metodiche NIPT e di citogenetica classica.

Il **primo gruppo**, e il più rilevante, è quello costituito dai casi delle trisomie più frequenti, quelle dei cromosomi 21, 13 e 18.

Con il test NIPT sono stati sospettati 23 casi totali, 21 dei quali sono stati confermati dalla citogenetica convenzionale.

Il caso n° 193 non è stato confermato: la trisomia 18 evidenziata dal NIPT è stata confermata dall'esame diretto su villi coriali ma non dal successivo esame culturale e dalla successiva amniocentesi eseguita a scopo discriminante. La concordanza tra NIPT ed esame diretto è spiegabile in quanto entrambi i test valutano l'assetto genetico del sinciziotrofoblasto che è quello a maggior rischio di alterazioni confinate alla placenta e non presenti nel feto. La normalità del cariotipo fetale è stata evidenziata sia dall'esame culturale dei villi sia dall'analisi del liquido amniotico.

Nel caso n°34 il NIPT aveva restituito un risultato positivo per trisomia 21, smentito poi nell'esame su villi coriali.

Rimane indiscutibilmente elevata la capacità predittiva del test NIPT per le trisomie classiche, anche nella nostra casistica, ma non assoluta, in quanto il raro evento di trisomia confinata alla placenta si è dimostrato possibile.

Il caso n°193 conferma indirettamente che il giusto esame da eseguire in caso di anomalia cromosomica evidenziata dal NIPT è l'amniocentesi, con la quale si analizzano cellule fetali evitando in tal modo i possibili risultati non dirimenti dell'analisi su villocentesi.

Nel **secondo gruppo** abbiamo compreso i casi caratterizzati da trisomie rare evidenziate dal NIPT. Nella nostra casistica si trattava di trisomie dei cromosomi 3, 14, 16 e 22.

Dei 5 casi complessivi solo 2 sono stati confermati dall'esame invasivo, l'amniocentesi: una trisomia 14 e una trisomia 22. In entrambi i casi la gravidanza ha subito una interruzione spontanea che è l'evento più frequente in questi casi di anomalie cromosomiche incompatibili con la vita.

Nei tre casi non confermati, e quindi con cariotipo fetale normale, si trattava sicuramente di una trisomia confinata alla placenta e la gravidanza ha avuto un esito favorevole.

I casi del **terzo gruppo** sono accomunati dalla presenza di anomalie numeriche dei cromosomi sessuali segnalate al NIPT. Tutti i 7 casi sono stati poi rivalutati, correttamente, con cariotipo su amniocentesi. Cinque casi caratterizzati dalla presenza di un cromosoma sessuale sovranumerario sono stati confermati. Un caso con monosomia X ha mostrato in realtà un cariotipo femminile normale XX. Un caso segnalato come assetto maschile XY ha mostrato un assetto femminile XX: il sesso del feto determinato col test NIPT (XY, maschile) non concordava con quello che figurava in ecografia (femminile) e per questo si è scelto di proseguire con una tecnica invasiva, che ha confermato il sesso rilevato con l'esame ecografico (XX).

In 7 casi, riuniti nel **quarto gruppo**, il test NIPT ha rilevato alterazioni quantitative a livello subcromosomico: microdelezioni e microduplicazioni di piccoli segmenti cromosomici. Tutti i casi sono stati rivalutati con il cariotipo e FISH, 5 su amniocentesi e 2 su villocentesi. Quattro casi non sono stati confermati in quanto, oltre al cariotipo normale, la FISH mostrava due copie normali per la regione sospettata.

La segnalazione di microdelezioni può essere riferita sia ad un errore effettivo del test che ad una effettiva presenza della alterazione stessa nelle sole cellule placentari. La realtà è difficile da stabilire e, di fatto, il test NIPT è ancora ritenuto poco affidabile nella individuazione delle microdelezioni.

In un altro caso la delezione interessava un X materno e non fetale. In un caso la delezione, che interessava il cromosoma 22 nella regione q11, è stata confermata in FISH.

Infine, in un caso, il test NIPT rilevava una delezione effettivamente presente che derivava da una traslocazione bilanciata presente nella madre, che è stato possibile definire con cariotipo e FISH su sangue materno. Per entrambi i casi segue una descrizione più dettagliata.

Il quinto gruppo è un raggruppamento anomalo in quanto comprende i 5 casi in cui il test NIPT è stato “non conclusivo”, cioè non è stato in grado di fornire un sospetto diagnostico. Il problema che accomunava tutti e 5 i casi era la scarsa presenza di frazione fetale (<4%). In questi casi la diagnostica invasiva si rendeva necessaria per allontanare i dubbi e per avere una diagnosi definitiva. Quattro casi si sono risolti con l'evidenza di un cariotipo fetale normale mentre uno, dopo amniocentesi, ha rilevato un'aneuploidia dei cromosomi sessuali con assetto XXY.

3.2 Casi particolari

Di seguito sono riportati ed illustrati alcuni dei casi valutati con la citogenetica convenzionale su prelievo “invasivo”.

Trisomie Frequenti

Caso clinico n°183-Amniocentesi

Feto di sesso femminile con età gestazionale 12 settimane presentava un risultato sospetto per la presenza di un cromosoma 13 sovranumerario, compatibile con sindrome di Patau, dopo l'esecuzione del test NIPT. Data la positività al test, si predispondeva analisi cromosomica su amniociti prelevati mediante amniocentesi a 15+5. Le procedure utilizzate, coltura sia in situ che in fiasca e FISH, evidenziavano un cariotipo **47,XX,+13**, quindi una trisomia omogenea del cromosoma 13. Si consigliava consulenza genetica.

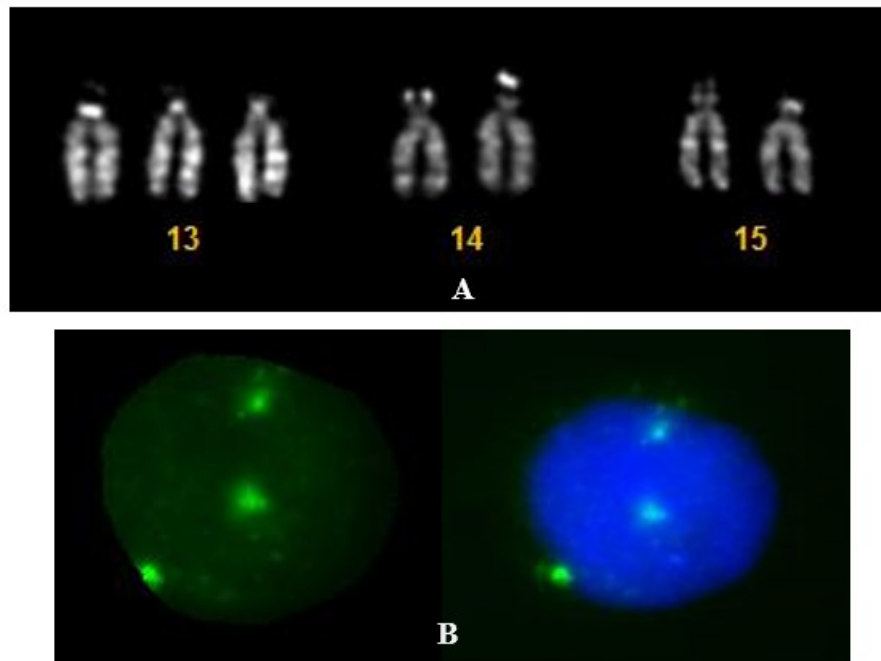


Figura 9- A: dettaglio del cariotipo fetale con trisomia 13; B: nuclei interfase in FISH con tre segnali relativi al cromosoma 13 con utilizzando sonda locus specifica RB1.

Caso clinico n° 193- Villocentesi

Feto di sesso femminile con età gestazionale di 11 settimane presentava un risultato positivo per trisomia 18 dopo l'esecuzione di test NIPT. Data la positività al test, si predisponneva analisi cromosomica su villi coriali. La donna veniva sottoposta a villocentesi a 13s+4d. Si evidenziava, dopo attuazione delle metodiche:

- all'analisi diretta, su 20 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 300 bande, la seguente formula cromosomica, **47,XX,+18**;

- all'analisi indiretta, su 2 colture pari a 30 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 400 bande, la seguente formula cromosomica, **46, XX**.

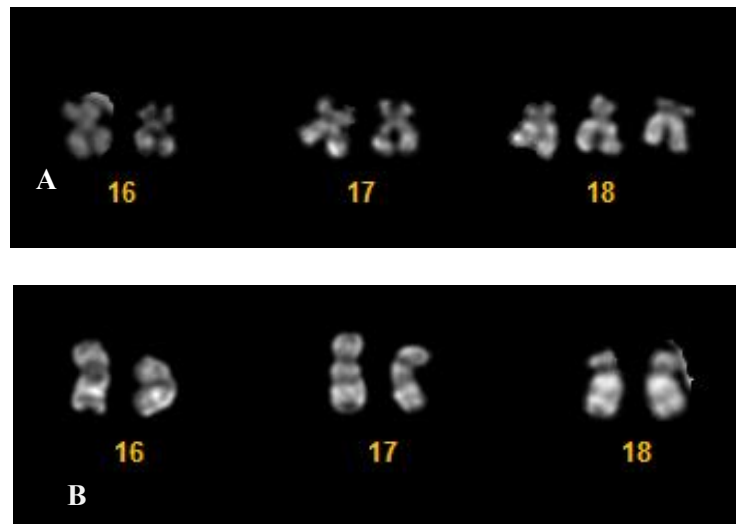


Figura 10- A: cariotipo parziale da analisi diretta con trisomia 18; B: cariotipo parziale da analisi indiretta con assetto cromosomico normale.

Si configurava pertanto una condizione di mosaicismo di Tipo I. Si consigliava analisi del cariotipo fetale su liquido amniotico e consulenza genetica. L'analisi su liquido amniotico delineava un cariotipo normale.

Caso clinico n°16- Villocentesi

Feto di sesso maschile con età gestazionale di 11 settimane presentava un risultato positivo per trisomia 21 dopo l'esecuzione di test NIPT per la rivelazione di aneuploidie dei cromosomi 21,18,13 e sessuali. Data la positività al test, si predisponeva analisi cromosomica su villi coriali. La villocentesi, effettuata a 13 settimane, evidenziava:

- all'analisi diretta, su 20 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 300 bande, la seguente formula cromosomica: 47,XY,+21;

- l'analisi indiretta, attraverso l'osservazione di due colture, pari a un numero di metafasi di 20, con bandeggio QFQ, risoluzione 400 bande, evidenziava un cariotipo: **47,XY,+21.**

Si configurava pertanto un cariotipo fetale maschile a 47 cromosomi per la presenza di trisomia libera ed omogenea del cromosoma 21, compatibile con sindrome di Down.

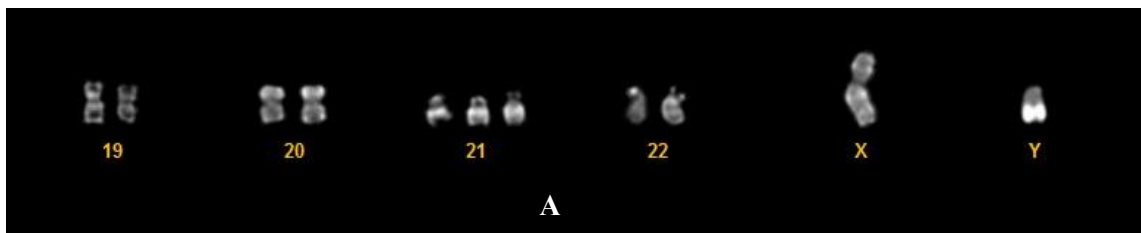


Figura 11- A: cariotipo parziale fetale con trisomia 21.

Caso clinico n°075- Villocentesi

Feto di sesso femminile con età gestazionale di 11 settimane presentava un risultato positivo per trisomia 21 dopo l'esecuzione di test NIPT. Data la positività al test, si predisponeva analisi cromosomica su villi coriali. La villocentesi effettuata a 13 settimane evidenziava:

- all'analisi diretta, su 23 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 300 bande, la seguente formula cromosomica, **46, X,+21**;

-All'analisi indiretta, su 14 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 400 bande, la seguente formula cromosomica, **47,XX,+21**.

All'analisi diretta tutte le metafasi analizzate presentavano un cariotipo a 46 cromosomi con trisomia libera ed omogenea del cromosoma 21 e monosomia del cromosoma X. All'analisi dopo coltura a lungo termine tutte le metafasi analizzate presentavano cariotipo femminile a 47 cromosomi e trisomia libera ed omogenea del cromosoma 21. Si configurava pertanto una condizione di mosaicismo di Tipo III con una anomalia confinata alla placenta, la monosomia X, ed una presente sia nella placenta che nel feto, la trisomia 21. Si consigliava consulenza genetica.

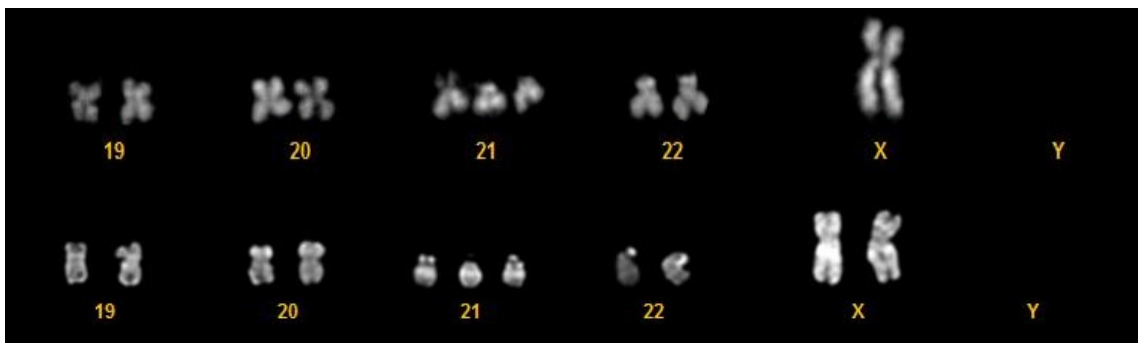


Figura 12- A: cariotipo parziale da analisi diretta con trisomia 21 e monosomia X; B: cariotipo parziale da analisi indiretta con la sola trisomia 21.

Caso clinico n° 250- Villocentesi

Feto di sesso maschile con età gestazionale di 11 settimane presentava un risultato positivo per trisomia 21 dopo l'esecuzione di test NIPT. Data la positività al test, si predisponneva analisi cromosomica su villi coriali. La donna veniva sottoposta a villocentesi a 13s+6d. Si evidenziava, dopo attuazione delle metodiche

- all'analisi diretta, su 22 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 300 bande, la seguente formula cromosomica, **47, XY,+21**;

- all'analisi indiretta, su 2 colture pari a 20 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 400 bande, la seguente formula cromosomica, **48,XY,+9,+21[10]/47,XY,+21[10]**.

Il cariotipo fetale si presentava maschile. All'analisi diretta tutte le metafasi presentavano un cariotipo a 47 cromosomi con trisomia del cromosoma 21. All'analisi dopo cultura a lungo termine sono presenti due linee cellulari: una (50%) a 48 cromosomi con trisomia dei cromosomi 9 e 21 ed una (50%) a 47 cromosomi con trisomia del cromosoma 21. Si configurava pertanto una condizione di mosaicismo di tipo III, analogo al precedente, con una anomalia confinata alla placenta, la trisomia 9, ed una presente sia nella placenta che nel feto, la trisomia 21. Si consigliava consulenza genetica.

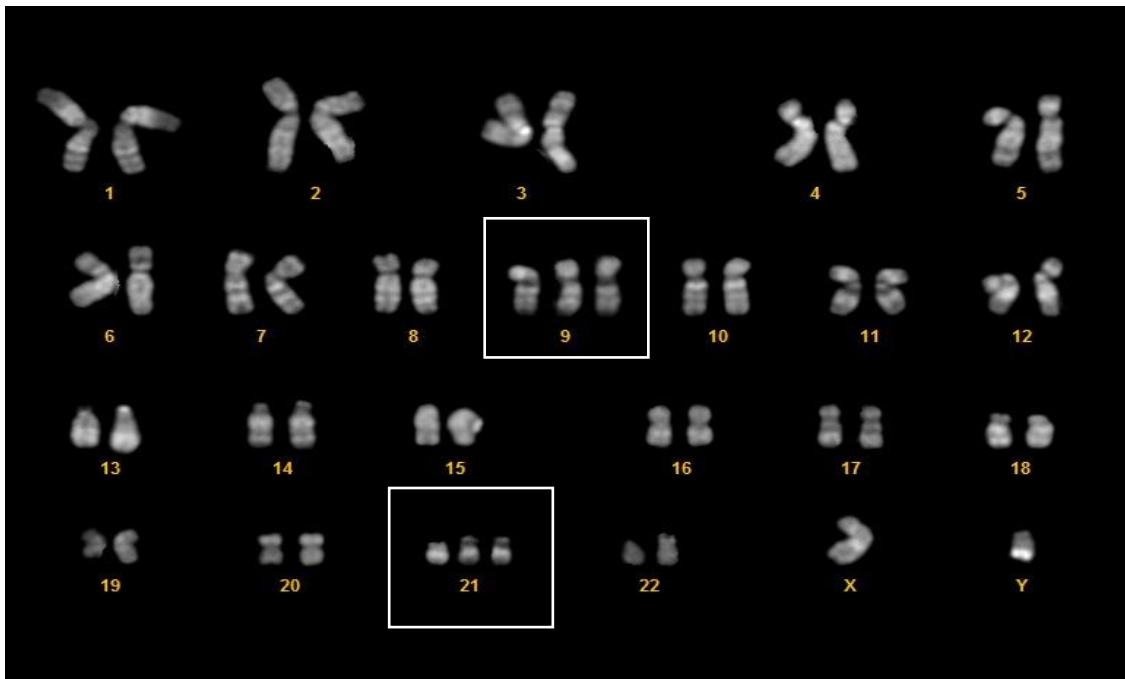


Figura 13- cariotipo da analisi indiretta con trisomia 9 e trisomia 21.

Caso clinico n° 066- Villocentesi

Feto di sesso femminile con età gestazionale di 12 settimane presentava un risultato positivo per trisomia 21 dopo l'esecuzione di test NIPT per la rivelazione di aneuploidie dei cromosomi 21,18 e 13. Data la positività al test, si predisponeva analisi cromosomica su villi coriali. La villocentesi, effettuata a 12+6, evidenziava:

- all'analisi diretta, su 27 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 300 bande, la seguente formula cromosomica,

46,XX,der(15;21)(q10;q10),+21[18]/46,XX,der(15;15)(q10;q10),+15[9]

Da ciò, si osserva la presenza di due linee cellulari a mosaico: un 67% con cariotipo femminile a 46 cromosomi e trisomia del cromosoma 21 per la presenza di un derivativo di traslocazione robertsoniana 15;21; l'altra (33%) con cariotipo femminile a 46 cromosomi e trisomia del cromosoma 15 per la presenza di un derivativo di traslocazione 15;15;

- l'analisi indiretta, attraverso l'osservazione di due colture, pari a un numero di metafasi di 35, con bandeggio QFQ, risoluzione 400 bande, evidenziava un cariotipo: 46, XX, der (15;21)(q10;q10), +21

Si configurava pertanto, anche in questo caso, come nei precedenti, una condizione di mosaicismo di tipo III. Seguiva consulenza genetica

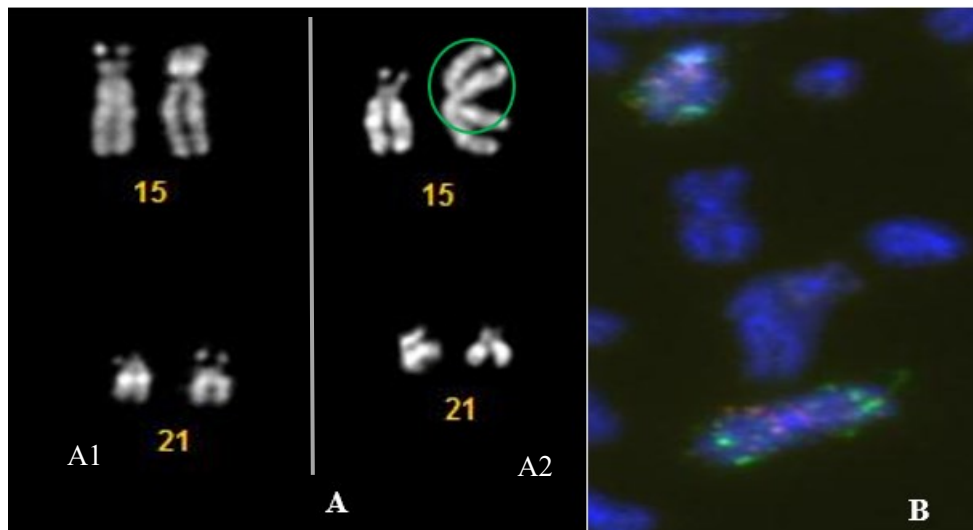


Figura 14- A: cariotipo parziale delle due linee cellulari presenti in mosaico: A1- trisomia 21 da robertsoniana (15;21); A2- trisomia 15 da robertsoniana (15;15). B: Cromosomi metafasici in FISH con conferma di traslocazione robertsoniana (15;15).

Aneuploidie XY

Caso clinico n° 086 -Amniocentesi

Feto di sesso sconosciuto con età gestazionale di 12 settimane +1 dopo test non conclusivo all'esecuzione di test NIPT, veniva sottoposto a indagine prenatale invasiva: amniocentesi. Il cariotipo degli amniociti, prelevati a 16+1, evidenziava la seguente formula cromosomica: 47,XXY, compatibile con S. di Klinefelter. Si consigliava consulenza genetica.

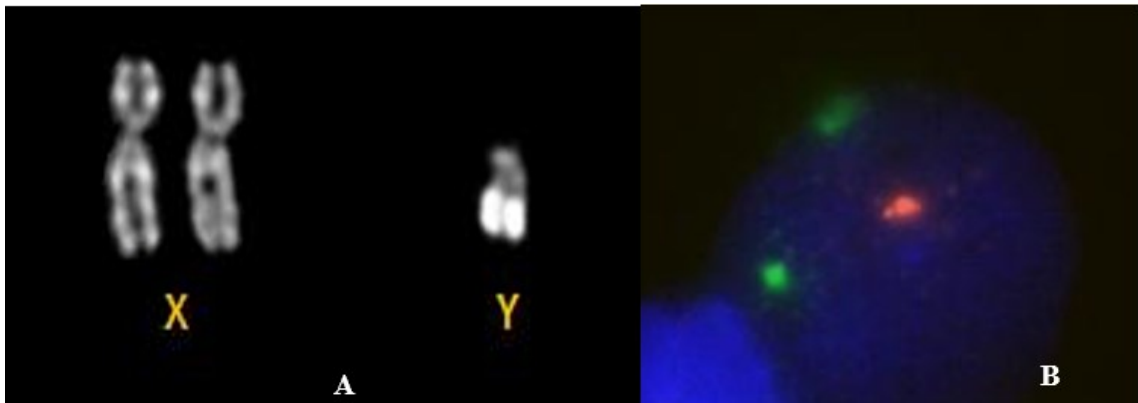


Figura 15- Assetto dei cromosomi al cariotipo convenzionale (due X e un Y) e alla FISH.

Microdelezioni e microduplicazioni

Caso clinico n° 054- Amniocentesi

Feto di sesso femminile con età gestazionale di 13 settimane presentava un risultato positivo per Sindrome di Di George (22q11.2) dopo l'esecuzione di test NIPT. Data la positività al test, si predisponeva analisi cromosomica su amniociti. Si eseguiva esame ecografico che evidenziava cardiopatia. Le cellule amniotiche prelevate mediante amniocentesi a 15+6, evidenziavano un cariotipo normale ma, dopo Ibridazione in situ fluorescente (FISH), si presentava un solo segnale relativo al locus TUPLE1, compatibile con **microdelezione della regione 22q11.2**. L'esame citogenetico, quindi, confermava il risultato NIPT. Contestualmente, i genitori si sottoponevano a prelievo di sangue periferico per esame FISH su linfociti per il medesimo locus, che è risultato in entrambi normale. Seguiva consulenza genetica.

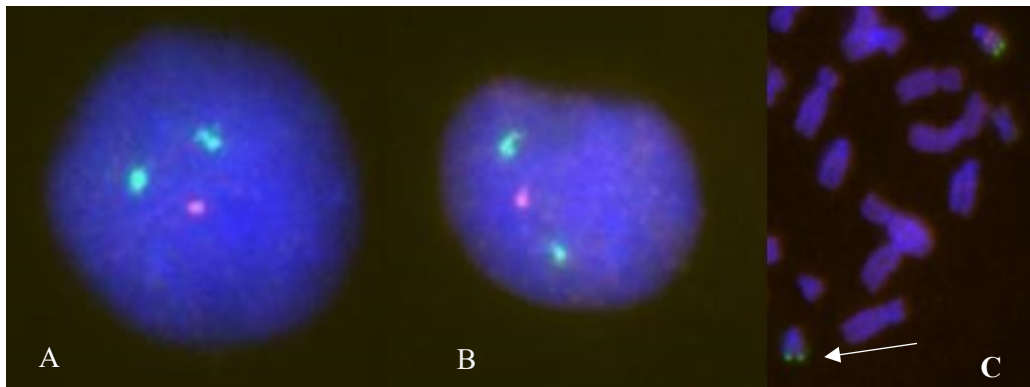


Figura 16- A/B: cellule amniotiche in interfase sottoposte a FISH. Cellula presentante due segnali verdi di controllo e un segnale rosso relativo alla regione 22q11.2 a indicare una microdelezione, quindi perdita dell'analoga frazione sul cromosoma omologo; Figura C: cellule amniotiche in metafase dove si può vedere il cromosoma presentante la delezione.



Figura 17- Cariotipo convenzionale normale.

Caso clinico n°167-Amniocentesi

Feto di sesso maschile con età gestazionale di 13 settimane presentava un risultato sospetto per una delezione interstiziale nel braccio lungo del cromosoma X nella regione q26.3q27.3 dopo l'esecuzione di test NIPT. Data la positività al test, si predisponeva analisi cromosomica su amniociti. Le cellule amniotiche prelevate a 15+6 presentavano un cariotipo normale 46, XY. Contestualmente, data la possibilità che il risultato NIPT corrispondesse al cariotipo materno, la madre si sottoponeva a analisi cromosomica su linfociti di sangue periferico e CGH-Array, i quali evidenziavano un cariotipo **46, X,del(X)(q26.3q27.3)**.

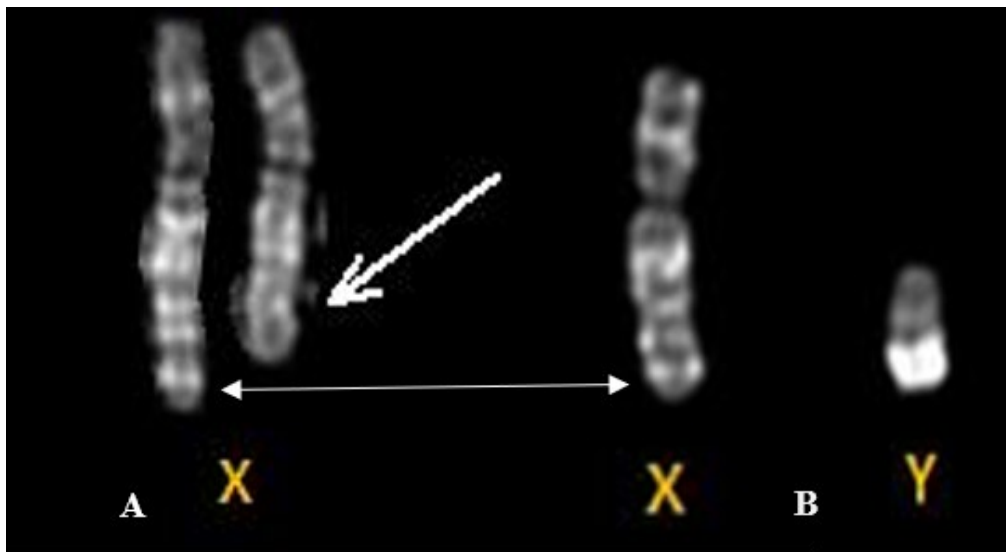


Figura 18- A: cromosomi sessuali materni con X delecto; B: cromosomi fetali con X materno normale.

Caso clinico n°21- Villocentesi

Feto di sesso femminile con età gestazionale di 11 settimane presentava un risultato sospetto per una delezione terminale nel braccio lungo del cromosoma 10 nella regione q25.1q26.3 dopo l'esecuzione di test NIPT. Data la positività al test, si predispondeva analisi cromosomica su villi coriali. La donna veniva sottoposta a villocentesi a 13s+5d. Si evidenziava, dopo attuazione delle metodiche:

- all'analisi diretta, su 32 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 300 bande, la seguente formula cromosomica: 46,XX;

- all'analisi indiretta, su 2 colture pari a 39 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 300 bande, la seguente formula cromosomica: **46, XX.**

Il cariotipo del feto risultava femminile e normale.



Figura 19- A: cariotipo fetale normale.

Caso clinico n° 209- Villocentesi

Feto di sesso maschile con età gestazionale di 11 settimane presentava un risultato positivo per una duplicazione cromosomica, dup(10)(p15.3q21.1)53.4Mb, dopo l'esecuzione di test NIPT. Data la positività al test, si predisponeva analisi cromosomica su villi coriali. La donna veniva sottoposta a villocentesi a 12s+2d. Si evidenziava, dopo attuazione delle metodiche:

- all'analisi diretta, su 22 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 300 bande, la seguente formula cromosomica,

46,XY,+10, der(10)t(10;22)(q21;q12),-22.ish der(10)(CEP10+,TUPLE1-,ARSA+);

- all'analisi indiretta, su 2 colture pari a 30 metafasi analizzate dopo bandeggio QFQ, risoluzione 400 bande, la seguente formula cromosomica,

46,XY,+10,der(10)t(10;22)(q21;q12),-22dmat.ish.der(10) (CEP10+,TUPLE1-,ARSA+)dmat.

Il cariotipo fetale si presentava maschile con presenza di un cromosoma 10 derivativo di una traslocazione bilanciata tra un cromosoma 10 ed un cromosoma 22 a segregazione materna. Si realizza pertanto la trisomia del tratto 10pter →10q21 e la monosomia del tratto 22p13 → 22q12. Conferma in FISH con sonde Abbott-Vysis CEP10 e TUPLE1/ARSA.

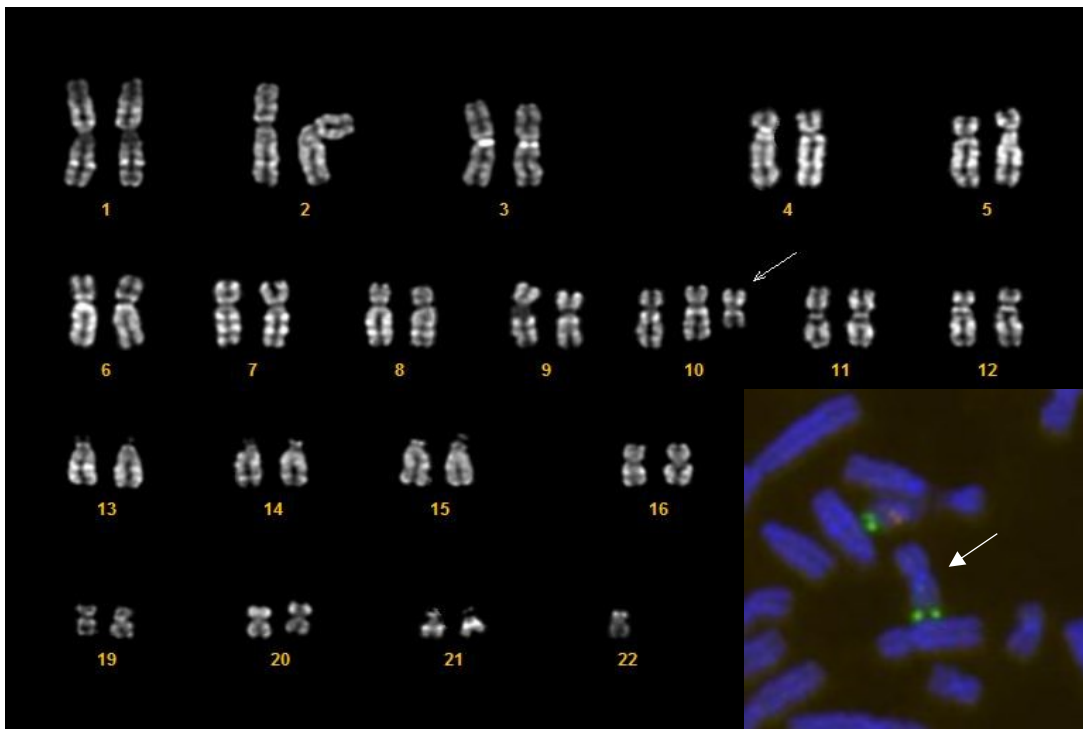


Figura 20- Cariotipo fetale con derivativo 10 sovranumerario. Nel riquadro, la FISH dimostra la presenza di materiale 22 sul derivativo 10.



Figura 21- Cariotipo materno da linfociti che mostra la traslocazione bilanciata $t(10;22)$.

C

4. CONCLUSIONI

I test citogenetici su amniocentesi e villocentesi sono stati effettuati presso il Laboratorio di Genetica Medica di Ancona mentre i test NIPT su sangue materno sono stati eseguiti in una struttura esterna, che ha fornito le metodiche, ed i risultati sono stati estratti dai referti dei test.

Le indagini genetiche su DNA fetale da sangue materno hanno delle peculiarità indubbiamente positive - non invasività dell'ambiente fetale con azzeramento del rischio abortivo, tempi di refertazione ridotti, sensibilità e specificità elevata per le trisomie 21,18,13 - a fronte però di limiti importanti - non distinguono tra patologie materne e fetali, non identificano il mosaicismo confinato alla placenta, causa di falsi positivi, né il mosaicismo fetale, causa di falsi negativi, necessitano di un campione ottimale con frazione di DNA fetale >4%, attendibilità ridotta per microdelezioni e microduplicazioni, non applicabilità in caso di gravidanza gemellare.

Complessivamente considerate queste caratteristiche fanno del NIPT un buon test di screening ma non un buon esame diagnostico.

La conoscenza della citologia e della fisiologia della placenta è un presupposto essenziale per la corretta interpretazione dei risultati del NIPT.

Il versante materno della placenta è costituito da un tessuto sinciziale rapidamente proliferante e che frequentemente acquisisce anomalie cromosomiche proprie senza perdere di funzionalità.

Il test NIPT analizza il DNA proveniente da questo particolare tessuto e le anomalie rilevate possono quindi non corrispondere all'effettivo assetto cromosomico fetale.

Questo spiega perché, allo stato attuale delle conoscenze e delle tecnologie, il test NIPT è utilizzato come test di screening e non come test diagnostico.

Inoltre, per la diagnosi definitiva è consigliata l'analisi del liquido amniotico, che valuta cellule di origine fetale, e non l'analisi dei villi coriali, che valuta cellule placentari.

Ciononostante, come si vede dalla nostra revisione, il ricorso al prelievo mediante villocentesi come esame invasivo di conferma, è frequente, e questo per due motivi:

l'analisi dei villi coriali è più precoce e fornisce una risposta intorno al 3° mese di gravidanza.

Il test NIPT ha la maggiore affidabilità per le trisomie più frequenti che interessano, di regola, sia la placenta che il feto, con rare ma possibili eccezioni.

Le indagini citogenetiche nella diagnosi prenatale sono basate su procedure tecnicamente articolate e complesse che prevedono una preparazione fatta di numerose fasi manuali e richiedono personale con esperienza sia per la preparazione che per la valutazione.

Le nuove indagini genetiche basate sullo studio del DNA hanno invece delle caratteristiche specifiche molto diverse: sono molto automatizzate, richiedono apparecchiature complesse, hanno bisogno di softwares specifici in continuo aggiornamento e di collegamenti a database internazionali. Si tratta comunque di indagini molto promettenti ed in continuo progresso, che fin dai loro primi utilizzi nella diagnostica hanno fatto ipotizzare il tramonto definitivo delle indagini citogenetiche tradizionali.

Questo in parte si è verificato ed effettivamente le indagini citogenetiche in prenatale si sono progressivamente ridotte di numero ma è emerso, e si è consolidato per loro, un nuovo ruolo: quello di conferma o smentita dei risultati delle tecniche NIPT. Attualmente le indagini citogenetiche sono, in molti casi, la sola indagine genetica in grado di chiarire, attraverso la valutazione dei cromosomi di specifici tessuti, la presenza di regioni cromosomiche, la loro localizzazione, le possibilità di essere ereditate o trasmesse alla discendenza, il rischio di generare una patologia.

Guardando a questo nuovo ruolo forse il titolo di questa tesi avrebbe potuto essere:

DIAGNOSI PRENATALE: DAI CROMOSOMI AL DNA E RITORNO.

5. BIBLIOGRAFIA

- (1) Web site: [genome.gov/about-genomics/educational-resources/fact-sheets/human-genome-project](https://www.genome.gov/about-genomics/educational-resources/fact-sheets/human-genome-project)
- (2) a cura di Roberto Colombo, Ettore Olmo: *Biologia -Cellula e Tessuti* (seconda edizione). Edi-ermes (2014)
- (3) Khan YS, Ackerman KM. Embryology, Week 1. 2022 Apr 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 32119449
- (4) Herrick EJ, Bordoni B. Embryology, Placenta. 2022 May 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 31869098.
- (5) Bertini Giuseppe, Beltivoglio Marina, Paolo Fabene and all: *Embiologia Umana*. Idelson-Gnocchi (2019)
- (6) Wang Y, Zhao S. *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. PMID: 21452443
- (7) Livio Zanoio, Eliana Barcellona, Gabrio Zacchè. *Ginecologia e Ostetricia*, seconda edizione. Edra Masson
- (8) Franca Dagna Bricarelli, Faustina Lalatta, Romeo Carrozzo, Mario Lituania, Simona Cavani, Umberto Nicolini. *Filodiretto con le malattie genetiche. Volume 2*. UTET periodici. Anno 2001
- (9) Giovanni Neri, Maurizio Genuardi: *Genetica umana e medica*. Edra Masson (2014)
- (10) Website: <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/s/sindrome-di-down?highlight=WyJ0cmIzb21pYSIsMjEsInNpbmRyb21lIiwidHJpc29taWEgMjEiLCJ0cmIzb21pYSAyMSBzaW5kcm9tZSIsIjIxIHNpbmRyb21lIi0=#cause>
- (11) Giandomenico Palka, Paolo Guanciali Franchi, Irene Iezzi, Elisena Morizio, Chiara Palka, Giuseppe Calabrese; Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Genetica Medica, Università “G. D’Annunzio”, Chieti, Servizio di

Genetica Medica, Ospedale Spirito Santo, Pescara; I nuovi orizzonti della diagnosi preinatale; Riv. It. Ost. Gin. - 2007 - Vol. 16 G. Palka et al pag. 733

(12) Website: <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/s/sindrome-di-edwards#bibliografia>

(13) Website: <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/p/patau?highlight=WyJ0cmlzb21pYSIsMTMsInRyaXNvbWlhIDEzIl0=#cause>

(14) Website: <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/s/sindrome-di-klinefelter?highlight=WyJrbGluZWZlbHRlciJd>

(15) F. Ceccato, D. Zuccarello, R. Selice, C. Foresta; Università di Padova, Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Centro di Crioconservazione dei Gameti Maschili, Padova, Italia; Nuove prospettive sulla sindrome di Klinefelter; GIMSeR 2006;13:127-139

(16) Website: Shankar Kikkeri N, Nagalli S.: Turner Syndrome. 2022 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 32119508.

(17) Website: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=IT&Expert=96068#:~:text=La%20trisomia%202022%20in%20mosaico,occhi%20e%20della%20cute%20C%20dismorfismi

(18) Gardner, RJM e Amor, DJ (2018) Anomalie cromosomiche e consulenza genetica di Gardner e Sutherland. Quinta edizione, Oxford University Press, Oxford

(19) F. Arcidiacono, A. Gianninoto, L. Sciascia, D. Carastro, C. Cardea, L. Biondo, H. Carastro; Tecniche di diagnosi prenatale a confronto; Giorn. It. Ost. Gin. Vol. XXVIII - n. 9 Settembre 2006

(20) Jindal A, Sharma M, Karena ZV, Chaudhary C. Amniocentesis. 2022 Sep 9. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 32644673.

- (21) Rather RA, Saha SC. Reappraisal of evolving methods in non-invasive prenatal screening: Discovery, biology and clinical utility. *Heliyon*. 2023 Feb 22;9(3):e13923. doi: 10.1016/j.heliyon. 2023.e13923. PMID: 36879971; PMCID: PMC9984859.
- (22) . Fitzsimmons ED, Bajaj T. Embryology, Amniotic Fluid. 2022 Jul 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 31082133.
- (23) Jones TM, Montero FJ. Chorionic Villus Sampling. 2022 Dec 11. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 33085448
- (24) Domenico Arduini, Gruppo di studio SIGO, Enrico Ferrazzi, Gianluigi Pilu, Filiberto Maria Severi, Tullia Todros. Trattato di Ecografia in Ostetricia e Ginecologia, seconda edizione.
- (25) LINEE GUIDA SIEOG. Società Italiana di Ecografia Ostetrico Ginecologica. Edizione 2015 e 2021.
- (26) Web site: <https://privato.policlinicogemelli.it/approfondimenti/bitest/>
- (27) Giannico R, Forlani L, Andrioletti V, Cotroneo E, Termine A, Fabrizio C, Cascella R, Salvaderi L, Linarello P, Varrone D, Gigante L, Giardina E. NIPAT as Non-Invasive Prenatal Paternity Testing Using a Panel of 861 SNVs. *Genes (Basel)*. 2023 Jan 25;14(2):312. doi: 10.3390/genes14020312. PMID: 36833238; PMCID: PMC9957069
- (28) Zhang M, Tang J, Li J, Wang C, Wei R, Fang Y, Zhu J. Value of noninvasive prenatal testing in the detection of rare fetal autosomal abnormalities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2023 May;284:5-11. doi: 10.1016/j.ejogrb.2023.03.002. Epub 2023 Mar 7. PMID: 36905803.
- (29) Ministero della salute, CSS Sezione I – Screening del DNA fetale non invasivo (NIPT) in sanità pubblica 2021
- (30) Procedure operative per amniocentesi e villocentesi. Laboratorio Genetica Medica-Azienda Ospedaliero Universitaria di Ancona.

- (31) Ishida C, Zubair M, Gupta V. Molecular Genetics Testing. 2023 Apr 7. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 32809547.
- (32) Website: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/clinical/rgh/flipbook/intl-presentation-0046-vc-italian.pdf>
- (33) Web site: <https://www.personalgenomics.it/i-nostri-test/personal-vision/>
- (34) Personal Genomics, Informativa PV, Rev1 (06/04/2022); Website: <https://www.personalgenomics.it/pdf/Personal-Genomics-brochure-Personal-Vision.pdf>
- (35) Website: <https://www.illumina.com/> and VeriSeq NIPT Solution v2 Package Insert
- (36) Michael Goldberg, Janice Fischer, Leroy Hood, Leland Hartwell. Genetica, Dall'analisi formale alla genomica. Edizione Italiana cura di Giorgio Pranterà. Terza edizione. Mc Graw Hill. ISBN 9788838654862