

Test genetici per diagnosi prenatale

Test Genetici Prenatali

- La **Diagnosi Prenatale** ha lo scopo di monitorare lo stato di salute del feto durante la gravidanza.
- Le periodiche indagini ecografiche sono indagini non invasive che hanno questo scopo.
- A queste, si possono affiancare indagini invasive, volte ad identificare patologie che interessano il feto su base genetica o infettiva

Materiale impiegato per lo svolgimento di test genetici prenatali

- Liquido e cellule amniotiche (**amniocentesi**)
- Villi coriali (**villocentesi**)
- Sangue fetale (**funicolocentesi**)
- Sangue materno: analisi del DNA fetale libero nel plasma materno (**NIPT**, Non Invasive Prenatal Test)

Principali indicazioni per test genetici prenatali

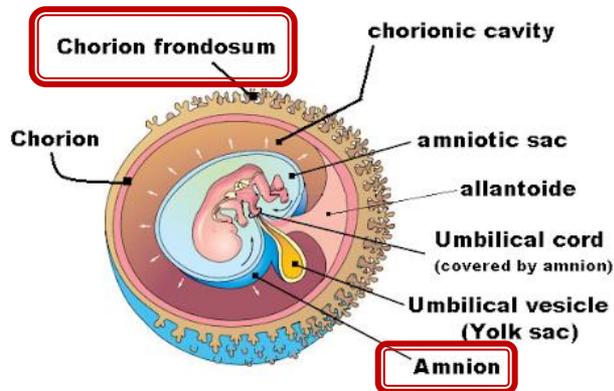
- Età materna avanzata (≥ 35 anni) -> aumentato rischio di eventi di non disgiunzione cromosomica
- Figlio precedente affetto da anomalia cromosomica o anomalie fisiche;
- Aneuploidie o anomalie cromosomiche in uno dei partner;
- Familiarità per malattie genetiche
- Consanguineità

- Segni ecografici di anomalie fetali
- Precedenti aborti spontanei
- Indicazioni teratologiche (assunzione di farmaci, esposizione a radiazioni)
- Malattie infettive in gravidanza.

Test Genetici Prenatali

Tabella 14.1 Confronto tra villocentesi, amniocentesi e funicolocentesi

Metodo	Tasso di successo (%)	Settimane di gestazione	Attendibilità del cariotipo fetale	Tasso di perdita fetale (%)
Villocentesi	> 99	> 10	Alta	< 1
Amniocentesi	> 99	≥ 15	Alta	< 1
Funicolocentesi	> 95	≥ 18	Alta	2-3



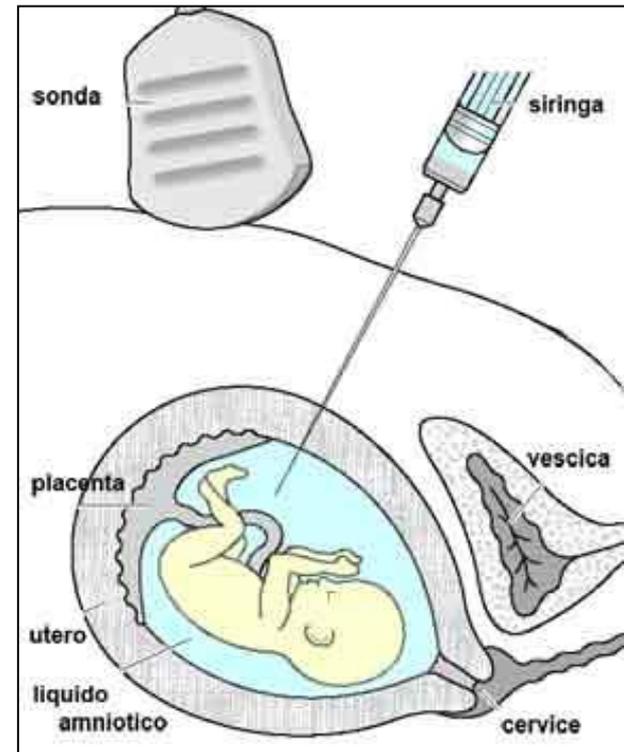
FETAL MEMBRANES

L'**amnios** o **amnion** è un annesso embrionale che forma una sacca membranosa che circonda e protegge l'embrione.

Il **corion frondoso** (*chorion frondosum*), presenta i **villi coriali**, che si allungano e si ramificano, e corrisponde alla zona di inserzione dell'uovo che darà luogo alla placenta.

Amniocentesi

- Questa procedura viene in genere eseguita in regime ambulatoriale.
- Tramite guida ecografica, un ago viene inserito nell'addome, nell'utero e nella cavità amniotica.
- In centri specializzati, il rischio di aborto indotto si aggira sullo 0,1% o meno.
- Le cellule del liquido amniotico sono successivamente analizzate in laboratorio per la presenza di anomalie cromosomiche

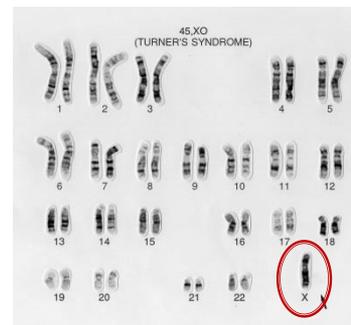
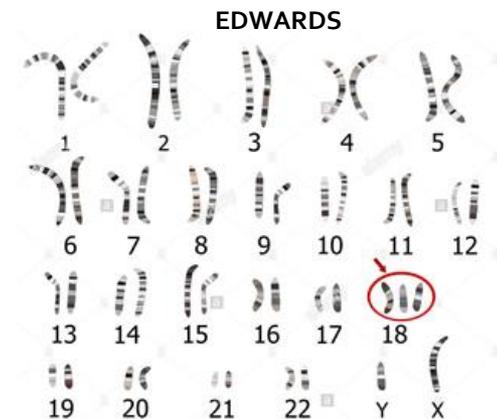
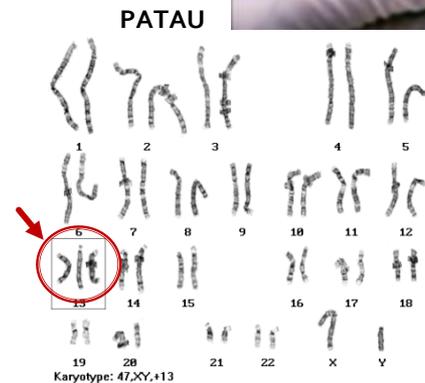
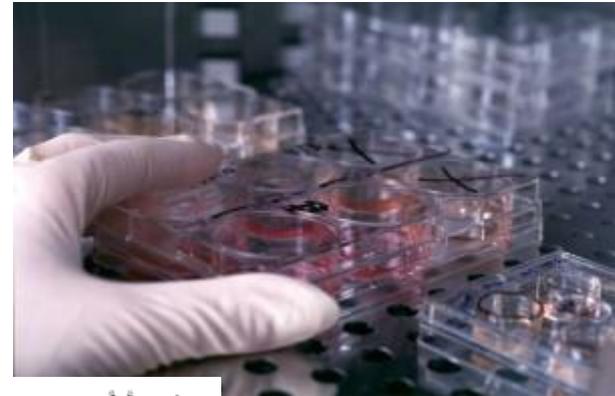


Analisi di cellule e liquido amniotico

Le cellule del liquido amniotico vengono coltivate in vitro, e tradizionalmente esaminate per la presenza di anomalie cromosomiche.

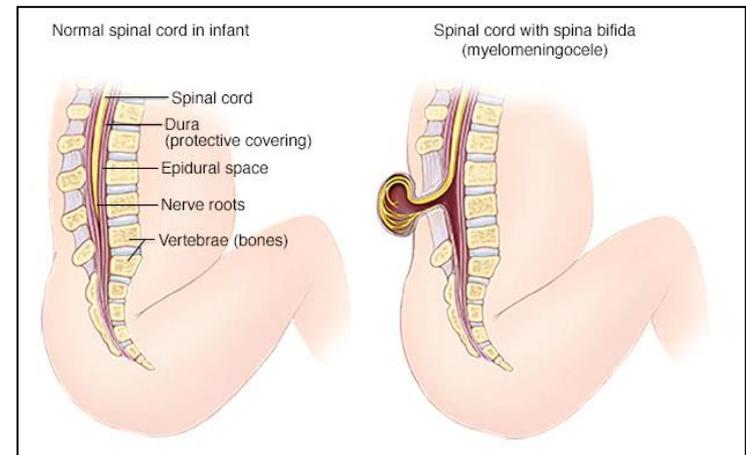
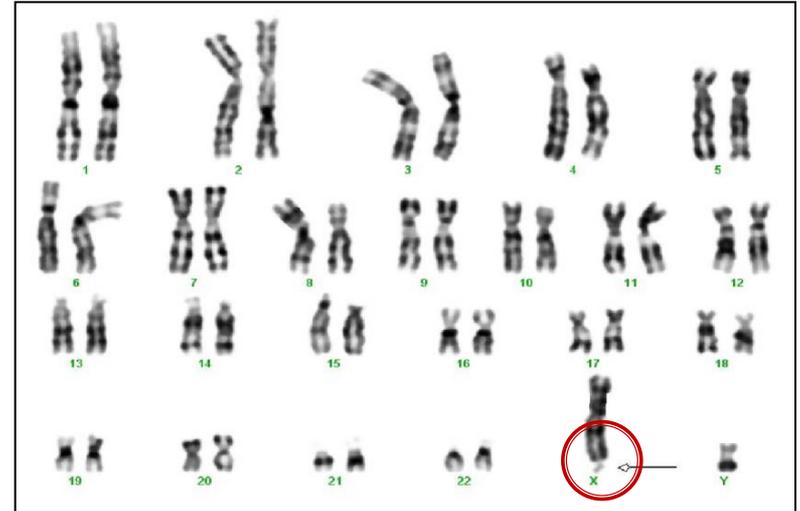
Le principali sono

- Trisomia 21 (sindrome di Down)
- Trisomia 13 (sindrome di Patau)
- Trisomia 18 (sindrome di Edwards)
- Aneuploidie dei cromosomi sessuali: X- (sindromi di Turner) o XXY (Klinefelter)



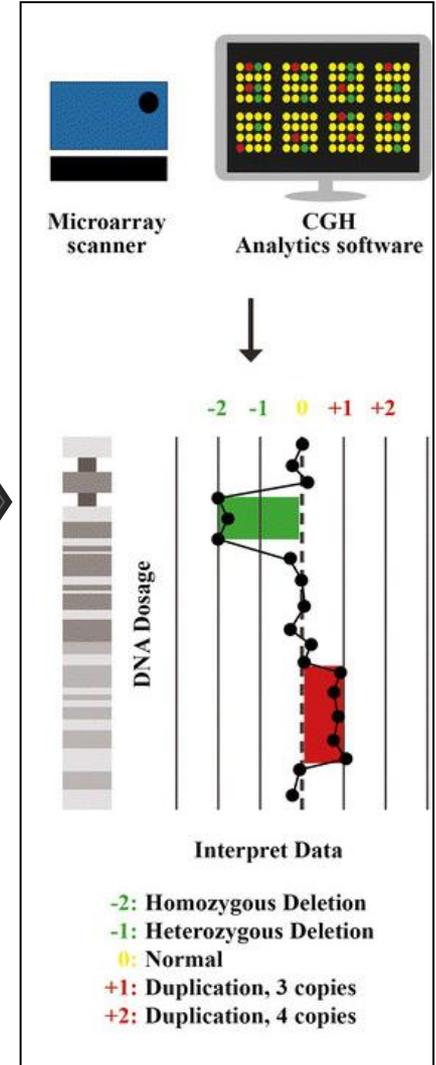
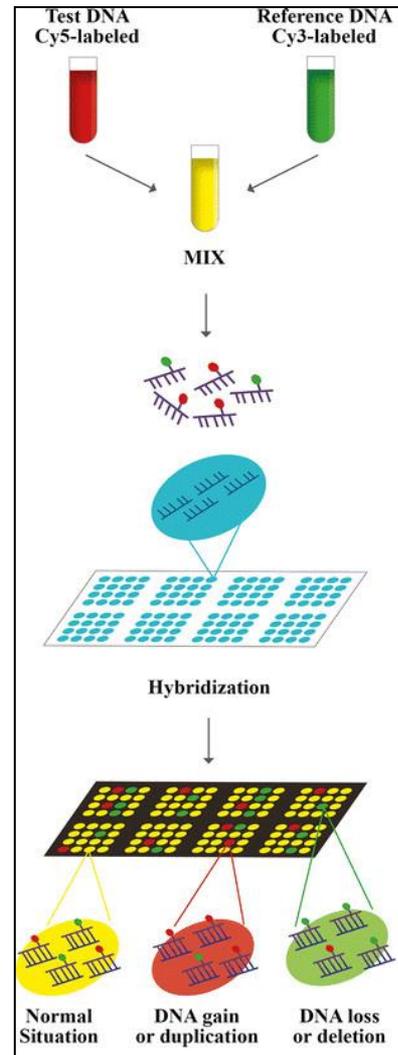
Analisi di cellule e liquido amniotico

- Altre indagini diagnostiche riguardano:
- Sindrome del X Fragile
- Dosaggio di alfafetoproteina o di acetilcolinesterasi nel liquido amniotico: se presenti in quantità superiori alla norma sono indicativi di un'anomalia di sviluppo del tubo neurale fetale (a causa di anencefalia o spina bifida).



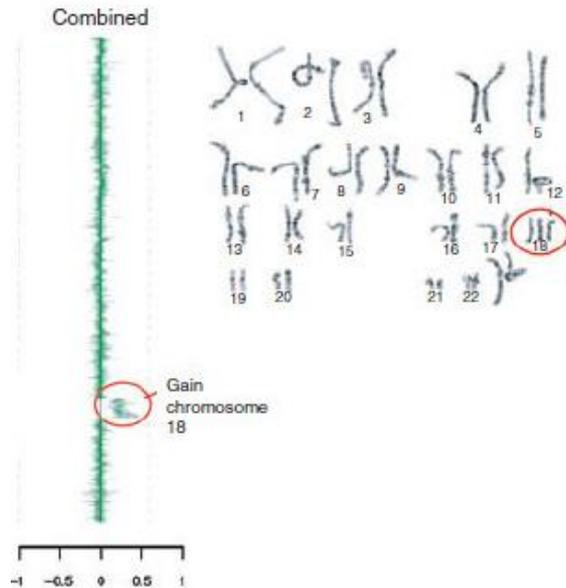
Array CGH (Comparative Genomic Hybridization)

- Tecnica di Array-CGH è una indagine di citogenetica molecolare
- consente di analizzare rapidamente l'intero genoma per perdita o acquisizione di interi o parti di cromosomi

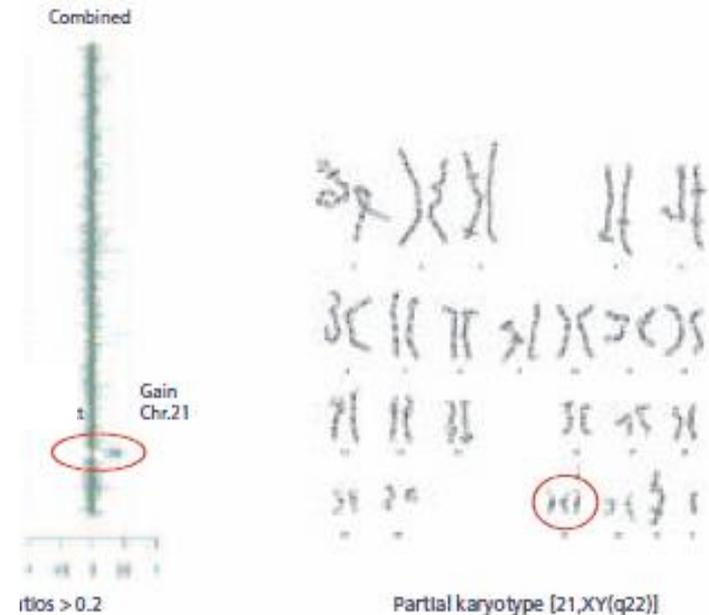


Array CGH: trisomie cromosomiche

- Esempio di trisomia 18 in Array CGH e analisi citogenetica tradizionale



- Esempio di trisomia 21 in Array CGH e analisi citogenetica tradizionale



Array CGH: microdelezioni e microduplicazioni

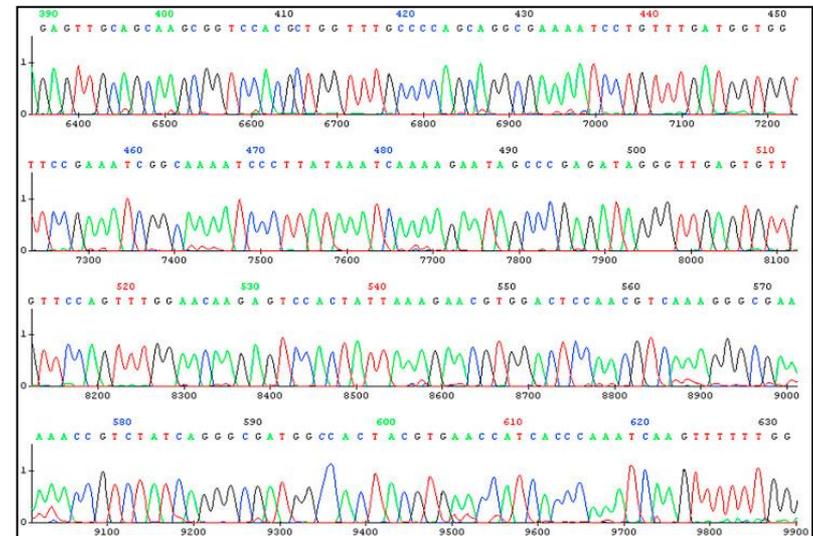
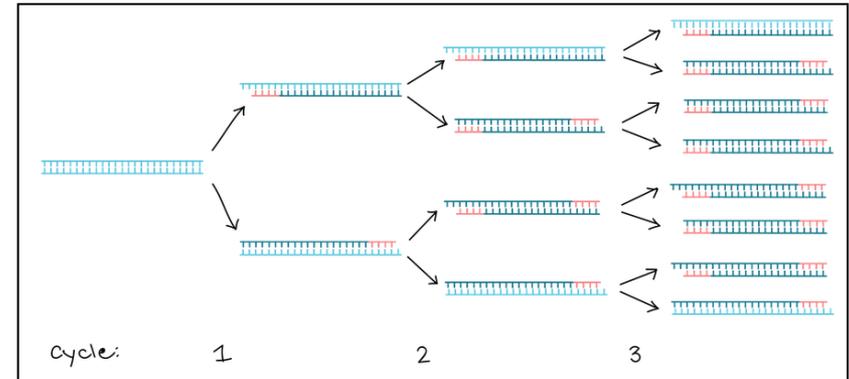
- Rispetto all'esame citogenetico tradizionale, l'analisi Array CGH ha una risoluzione 100 volte più elevata,
- Ciò consente di identificare alterazioni cromosomiche submicroscopiche (microdelezioni o microduplicazioni) e le eventuali malattie associate

Esempi di alcune malattie genetiche evidenziabili mediante Array CGH, ma oltre un centinaio si possono aggiungere

Malattia	Alterazione Cromosomica
Sindrome di Angelman	Del 15q12-13
Sindrome di Charcot-Marie-Tooth	Dup 17p12
Malattia del Cri-du-chat	Del 5p15
Sindrome di Di George/Velocardiofaciale	Del 22q11.2
Lissencefalia isolata	Del 17p13.3
Sindrome di Miller-Dieker	Del 17p13.3
Sindrome della Neuropatia Ereditaria (HNPP)	Del 17p12
Sindrome di Prader-Willi	Del 15q12-q13
Sindrome di Rubinstein-Taybi	Del 16p13.3
Sindrome di Smith-Magenis	Del 17p12.2
Sindrome di Sotos	Del 5q35
Sindrome Trico-Rino-Falangea	Del 8q24.1
Sindrome di Williams	Del 7q11.23
Sindrome di Wolf-Hirschhorn	Del 4p16

Analisi di cellule e liquido amniotico: Indagini molecolari

- Indagini molecolari:
- Qualora la storia familiare lo suggerisca, indagini molecolari su **specifici geni** possono essere svolte tramite l'impiego di
 - tecnologie basate su PCR
 - sequenziamento del DNA
- Nel nostro territorio, per l'alta incidenza, analisi molecolari per mutazioni in geni per beta-talassemia (β -globina) o fibrosi cistica (CTFTR) sono frequenti



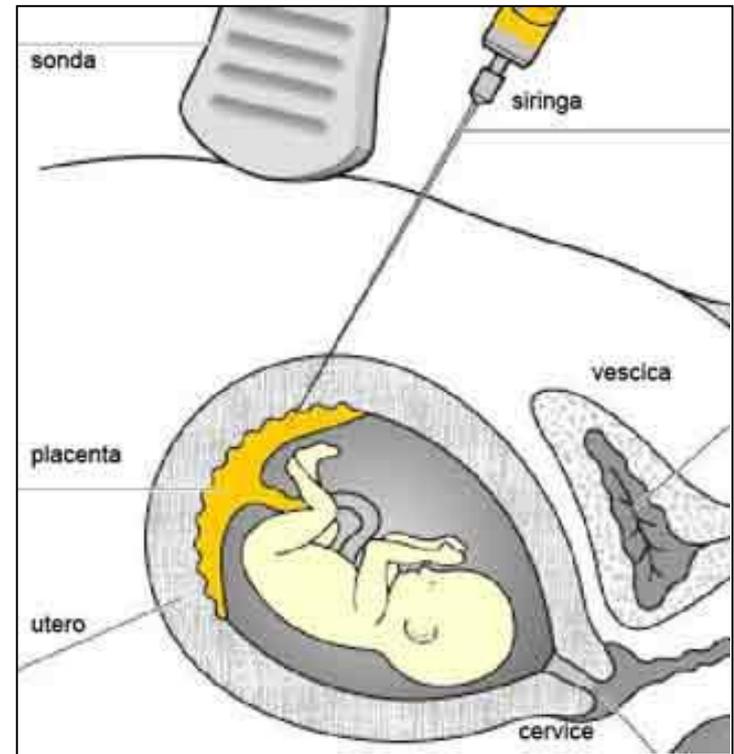
Amniocentesi in sintesi

AMNIOCENTESI: Scheda tecnica

Periodo di esecuzione:	dalla settimana 15 alla 20 di gravidanza
Metodica:	prelevati circa 25 cc. di liquido amniotico introducendo un ago nell'utero attraverso l'addome, sotto controllo ecografico
Indicazioni:	determinazione del cariotipo fetale; verifica del passaggio transplacentare di patogeni infettivi (rosolia, toxoplasma ect.) mediante PCR, diagnosi molecolare di malattie genetiche.
Risposta:	~ 12-15 giorni per cariotipo fetale tradizionale ~ 2-3 giorni per cariotipo fetale mediante array-CGH ~ 24-48 ore per PCR quantitativa (trisomia 21, 18, 13, ed alterazioni dell'X e dell'Y) ~ 24 ore per valore dell'alfa – feto proteina (AFP), marcatori di difetti del tubo neurale
Successo del prelievo:	nel 98% dei casi al primo tentativo e 99,8% circa al secondo.
Svantaggi:	- abortività in seguito all'esame circa l'0.2-0.5%; - fallimento dell'analisi nello 0.2% circa (1:500)

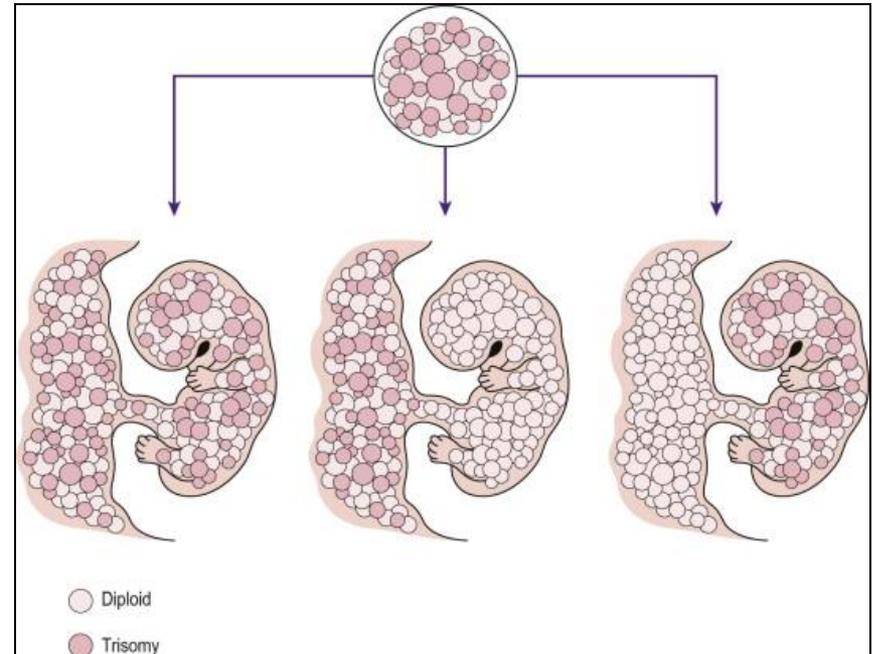
Villocentesi

- Un altro approccio per prelevare materiale fetale e diagnosticare l'eventuale presenza di anomalie cromosomiche o genetiche è tramite i villi coriali o villocentesi
- La villocentesi è il prelievo di materiale dai villi coriali, tessuto che formerà la placenta.
- Questo prelievo è svolto tra le 11 e 13 settimane di gravidanza, e comunque entro le 15 settimane
- Perciò, l'analisi sui villi può essere svolta più precocemente dell'amniocentesi
- Il rischio di aborto connesso alla villocentesi si aggira intorno allo 1 %.



Mosaicismo genetico nella villocentesi

- I villi coriali sono un annesso embrionale che non verrà a costituire il tessuto del feto.
- Ciò rende possibile discrepanza tra l'assetto cromosomico dei villi coriali e del feto
- **Mosaicismo**: due linee cellulari con differente assetto cromosomico.
- In caso di alterazioni queste potrebbero coinvolgere il feto o essere confinate ai villi
- Mosaicismo presente in circa 1% delle analisi sui villi coriali



**Nell'analisi dei villi, sono possibili:
falsi positivi o falsi negativi**

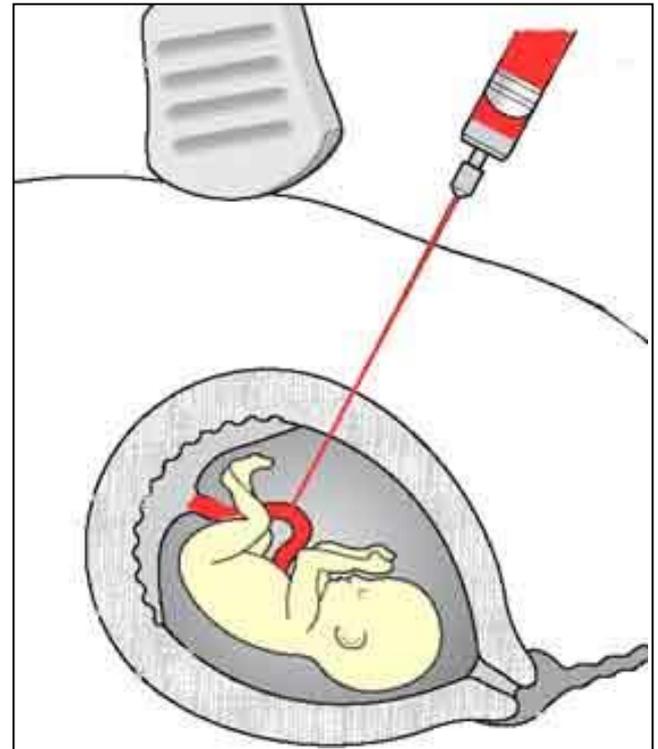
Villocentesi in sintesi

VILLOCENTESI: Scheda tecnica

Periodo di esecuzione:	non può essere eseguita prima della 10a settimana di gravidanza per legge ministeriale; il periodo ottimale è l'11a-12a settimana.
Metodica:	mediante controllo ecografico, l'ago viene inserito nell'addome materno e l'operatore preleva, piccoli frammenti di villi coriali
Indicazioni:	determinazione del cariotipo fetale; diagnosi molecolare di malattie genetiche.
Risposta:	<ul style="list-style-type: none">- 24-48 ore per PCR quantitativa (trisomia 21, 18, 13, ed alterazioni dell'X e dell'Y);- 24-48 ore per l'analisi citogenetica "diretta"- 2-3 giorni per il cariotipo fetale mediante array-CGH- 12-15 giorni per il cariotipo fetale tradizionale (metodo coltura cellulare);
Successo del prelievo:	nel 98% dei casi al primo tentativo e 99,8% circa al secondo.
Svantaggi:	<ul style="list-style-type: none">- abortività, circa l'1%;- Mosaicismo genetico, circa 1% dei casi.- fallimento dell'analisi nello 0.2% circa dei casi

Funicolocentesi o cordocentesi

- La funicolocentesi o cordocentesi è il prelievo di sangue dal cordone ombelicale del feto
- È utile quando non è possibile ottenere informazioni attraverso l'amniocentesi, la villocentesi o l'ecografia (o se i risultati di questi test erano inconcludenti);
- Infatti, questo prelievo comporta un rischio significativo di complicanze ed è in genere riservato a gravidanze ad alto probabilità di difetto genetico.



Cordocentesi o Funicolocentesi in sintesi

CORDOCENTESI o FUNICOLOCENTESI: Scheda tecnica

Periodo di esecuzione	Viene eseguita dopo la 18-20 ^a settimana di gravidanza.
Metodica:	prelevati 1-3 cc di sangue fetale dal cordone ombelicale, con un ago infisso attraverso l'addome materno, sotto guida ecografica
Indicazioni:	necessità di determinare il cariotipo fetale in epoca avanzata di gravidanza, dubbi diagnostici in seguito ad amniocentesi
Risposta:	- 72-96 ore per l'analisi citogenetica "diretta" - 2-3 giorni per il cariotipo fetale mediante array-CGH
Svantaggi:	- abortività elevata, circa 1-4%; - fallimento dell'analisi nello 1% circa

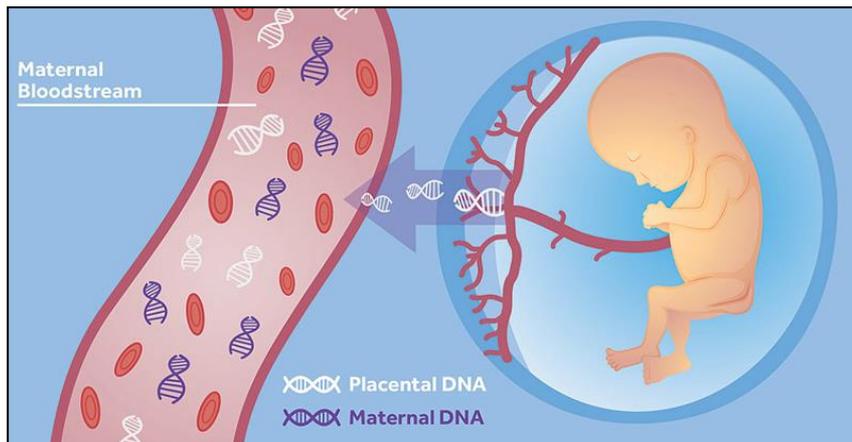
Disciplina della interruzione volontaria di gravidanza in Italia

- La diagnosi prenatale è spesso propedeutica ad una eventuale scelta di interruzione volontaria di gravidanza (IVG)
- In Italia, è la **legge n. 194 del 22 maggio 1978** che ha depenalizzato e disciplinato la IVG.
- La 194 consente alla donna di ricorrere alla IVG in una struttura pubblica o convenzionata, nei primi 90 giorni di gestazione (13 settimane)
- Mentre tra il quarto e quinto mese (20 settimane) è possibile ricorrere alla IVG solo per ragioni mediche.

Non Invasive Prenatal Test (NIPT)

Non Invasive Prenatal Test (NIPT)

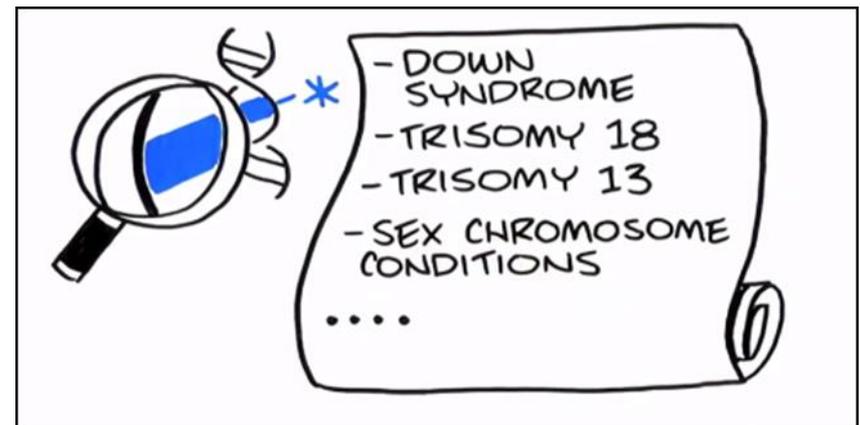
- DNA fetale libero (cell free fetal DNA, cffDNA) è presente nel sangue materno.
- Circa il 10-13% del DNA libero circolante è di origine fetale
- Il DNA fetale origina da microparticelle di placenta che vengono riversate nel sangue materno



- Perciò un prelievo venoso di sangue materno da cui è isolato il plasma che può essere usato per analizzare anche il DNA fetale.
- Può essere svolto a partire dalle 10 settimane di gestazione
- Principale vantaggio è che non è invasivo e non implica alcun rischio per il feto
- Tuttavia non è un'indagine diagnostica, ma di screening

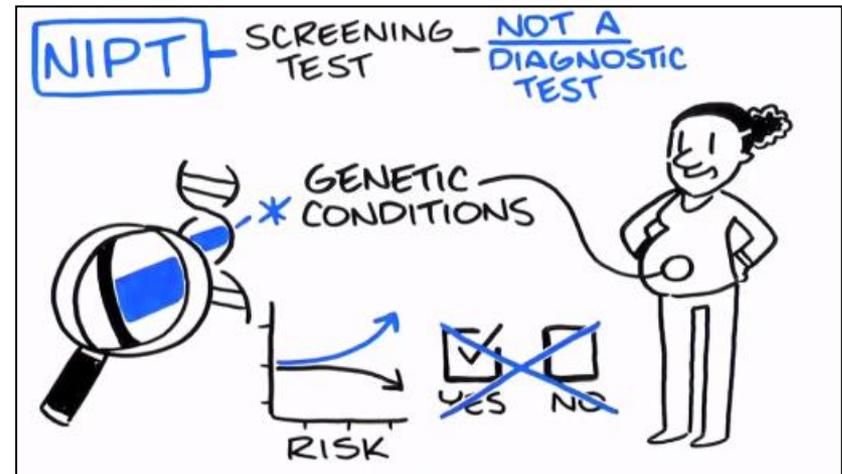
Non Invasive Prenatal Test (NIPT)

- NIPT può essere svolto a partire dalle 10 settimane di gestazione
- Le principali analisi svolte riguardano la ricerca di eventuali anomalie cromosomiche



Non Invasive Prenatal Test (NIPT)

- L'analisi del cffDNA mediante NIPT non è un metodo di diagnosi prenatale
- Bensì un metodo di screening non invasivo sul rischio di avere un figlio affetto da una patologia cromosomica
- spesso richiesto per donne in età avanzata.
- Qualora NIPT indichi un rischio elevato, la diagnosi dovrà basarsi su un approccio tradizionale, ad esempio sull'analisi di un campione prelevato mediante amniocentesi



NIPT in sintesi

- NIPT è uno strumento di screening opzionale che può essere incluso tra le analisi durante la gravidanza
- NIPT valuta DNA fetale che origina dalla placenta ed è presente nel sangue materno
- NIPT può essere svolto a partire dalle 10 settimane di gestazione
- I risultati non sono diagnostici, ma forniscono la probabilità di avere un feto con anomalie cromosomiche
- NIPT non rimpiazza i tradizionali approcci di amniocentesi o villocentesi, che, se necessari, hanno invece valore diagnostico

Fine