



Società Italiana di Genetica Umana
Italian Society of Human Genetic



SIGO
SOCIETÀ ITALIANA
DI GINECOLOGIA E OSTETRICIA



Conferma diagnostica dopo NIPT con risultato ad alto rischio, non informativo o sesso discordante

Redatto da: GdL SIGU di Citogenetica e Citogenomica; **Approvato da:** Società Italiana di Ecografia Ostetrica e Ginecologica e Metodologie Biofisiche (SIEOG), Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia (SIGO) e Associazione Ostetrici e Ginecologi Ospedalieri Italiani (AOGOI).

Coordinatore: Francesca Romana Grati

Estensori: Francesca Romana Grati,¹ Simona Cavani,² Laura Cardarelli,³ Anna Capalbo,⁴ Domenico Bizzoco,⁵ Silvana Gueneri,⁶ Laura Bernardini,⁴ Michela Malacarne,² Paola Battaglia,⁷ Maria Carla Pittalis,⁷ Antonio Novelli⁸.

¹ R&D, Citogenetica e Genetica Medica, TOMA Advanced Biomedical Assays, Impact Lab Group, Busto Arsizio, Varese

² U.O.C. Laboratorio di Genetica Umana, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova

³ Laboratorio di Genetica Medica, Rete Diagnostica Italiana, Gruppo Lifebrain, Limena, Padova

⁴ Laboratorio di Citogenetica, Istituto CSS-Mendel, Roma

⁵ UOSD Genetica Medica, Ospedale San Giovanni Calibita-Fatebenefratelli, Roma

⁶ Laboratorio di Genetica Medica degli Istituti Clinici di Perfezionamento di Milano, Fondazione IRCCS Policlinico Ca' Granda di Milano

⁷ Laboratorio di Genetica, U.O. Genetica Medica, Dipartimento della donna, del bambino e delle malattie urologiche, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna

⁸ UOC, Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, Polo di ricerca, Roma

Revisionato da: Presidenza e Consiglio Direttivo SIGU, Presidenza e gruppo di esperti SIEOG, Presidenza e gruppo di esperti SIGO e AOGOI.



Indice

Introduzione	3
Scopo del documento	3
1. Introduzione	3
2. Concetti principali	4
2.1. Statistica degli screening	4
3. Colloquio pre-test e consulenza genetica post-test	5
4. Conferma diagnostica prenatale dopo NIPT ad alto rischio	6
5. Conferma diagnostica prenatale dopo NIPT ad alto rischio	7
6. Risultati non informativi	15
6.1. Frazione Fetale	16
6.2. Follow up prenatale dopo risultato non informativo	17
7. Discordanze di sesso tra NIPT ed ecografia	19
8. Conferma diagnostica postnatale dopo NIPT risultato ad alto rischio e non informativo	20
8.1. Aneuploidie (T21, T18, T13, TR, SCA) (Grafici 3 e 4)	20
8.2. Microdelezioni ricorrenti e aneusomie segmentali (Grafico 5)	21
8.3. NIPT non informativo (Grafici 6 e 7)	22
9. NIPT per patologie monogeniche e gestione dei risultati ad alto rischio.	22
10. Criticità del NIPD per condizioni monogeniche e impatto sulla gestione dei risultati	23
11. Conclusioni	25
13. Tabelle	35
14. Grafici	37



Introduzione

I test non invasivi basati sull'analisi del DNA libero circolante nel plasma materno (anche detti cfDNA test – cell-free DNA test - o NIPT – Non Invasive Prenatal Test - o NIPS – Non Invasive Prenatal Screening) sono sempre più utilizzati nei percorsi di screening prenatali, tanto da diventare, spesso, parte integrante del management clinico della gravidanza. L'analisi del cfDNA non ha valore diagnostico ma di screening: seppur caratterizzata da sensibilità e specificità elevate, fornisce soltanto una predizione di rischio. Un test con riscontro di 'basso rischio' deve essere considerato rassicurante ma non dà certezza circa l'assenza della patologia indagata e va quindi valutato nel contesto del quadro clinico ed anamnestico della gestante. Per contro, un risultato 'ad alto rischio' non indica che il feto sia sicuramente affetto, in quanto il suo valore predittivo positivo (VPP) non è mai pari al 100%. Pertanto, è sempre raccomandata la conferma dell'anomalia riscontrata mediante test diagnostico.

Nell'1-2% dei casi il NIPT può fornire un risultato non conclusivo e, in rari casi, un risultato sul sesso fetale discordante da quello identificato tramite ecografia.

Scopo del documento

Questo documento ha lo scopo di fornire algoritmi che possano essere di supporto ai clinici ed ai laboratoristi nella scelta dei possibili test di conferma e dei criteri d'analisi più appropriati in tutte queste situazioni.

Infine, il documento ha lo scopo di introdurre l'argomento del cfDNA test per malattie monogeniche e della gestione dei risultati ad alto rischio per tali patologie.

1. Introduzione

Introdotta nel 2011, il NIPT su plasma materno è stato inizialmente proposto per lo screening della trisomia 21 per cui mostrava elevati livelli di sensibilità e specificità e maggiori validazioni cliniche. A questo si è aggiunto in breve tempo lo screening per le trisomie 18 e 13, seppur con performance inferiori e meno validate rispetto alla trisomia 21. Conseguentemente a spinte tecnologiche e commerciali, nel corso degli anni si è assistito ad una rapida e progressiva aggiunta di altre anomalie cromosomiche, quali le aneuploidie dei cromosomi sessuali (SCA)¹⁻³, alcune sindromi da microdelezione⁴, trisomie rare (TR) e sbilanciamenti genomici parziali o aneusomie segmentali⁵⁻⁷, fino a poter comprendere malattie monogeniche. Tali ampliamenti d'indagine non sono però supportati da casistiche scientifiche sufficientemente estese, infatti a tutt'oggi, le maggiori società scientifiche nazionali (SIGU) ed internazionali (sMFm, ESHG/ASHG, ACMG, ISPD)⁸⁻¹² e le linee guida del Ministero della Salute (2015)¹³, hanno assunto posizioni per lo più concordanti sul ruolo del NIPT, riconoscendone una chiara validità e utilità clinica¹⁴ limitatamente alle tre trisomie principali (T21, T18 e T13) per le quali risulta attualmente il test di screening con i maggiori valori di sensibilità e specificità.

Trattandosi di un test di screening, i risultati positivi ('ad alto rischio') devono essere confermati mediante l'esecuzione di un esame diagnostico appropriato, che in epoca prenatale può essere effettuato su campioni



di liquido amniotico (LA) o villi coriali (CVS) prelevati mediante amniocentesi (AC) o villocentesi (VC). Nei casi in cui la gestante rifiuti l'opzione di eseguire una diagnosi prenatale invasiva, potrebbe essere valutata, in sede di consulenza genetica, la possibilità di eseguire test diagnostici di conferma in epoca postnatale.

Relativamente all'erogazione dei test di conferma, i LEA (D.M. 09.12.2015 "Condizioni di erogabilità e indicazioni di appropriatezza prescrittiva delle prestazioni di assistenza ambulatoriale erogabili nell'ambito del Servizio Sanitario Nazionale")¹⁵ hanno previsto una voce di rimborso (C27) da parte del Sistema Sanitario Nazionale (SSN) relativo all'analisi citogenetica "per la conferma di aneuploidie riscontrate nel DNA fetale su sangue materno per le aneuploidie validate da Linee Guida e Società Scientifiche Nazionali ed Internazionali". Pertanto, in base a tali disposizioni, attualmente il SSN garantirebbe l'erogazione del percorso diagnostico di conferma per risultati ad alto rischio concernenti le sole trisomie 21, 18 e 13.

2. Concetti principali

2.1. Statistica degli screening

La validità clinica di un test di screening è definita da alcuni parametri quali:

- Sensibilità (SENS): proporzione di casi affetti dalla patologia indagata dal test correttamente identificati come 'positivi' o 'ad alto rischio'; il rischio di falso negativo (RFN) è $1 - \text{SENS}$;
- Specificità (SPEC): proporzione di casi non affetti dalla patologia indagata dal test correttamente identificati come 'negativi' o 'a basso rischio'; il rischio di falso positivo (RFP) è $1 - \text{SPEC}$;
- Valore predittivo negativo (VPN): probabilità che un risultato negativo rifletta la reale assenza della patologia indagata dal test;
- Valore predittivo positivo (VPP): probabilità che un risultato positivo rifletta la reale presenza della patologia nel feto. Il VPP dipende tanto dalla specificità e sensibilità analitica del test quanto dalla prevalenza della patologia nella popolazione. Più basse sono la specificità del test e la prevalenza della malattia, minore sarà anche il VPP. Nel caso di patologie la cui prevalenza è legata all'età materna, come le T21, T18 e T13, questa diventa un fattore importante nel determinare la predittività di un risultato positivo. Un NIPT ad alto rischio per trisomia 21 in una donna con più di 35 anni avrà dunque un VPP maggiore di quello di una gestante di età inferiore. Risultati ad alto rischio per T13 o T18, data la minor prevalenza di queste aneuploidie, avranno una predittività più bassa rispetto a quelli della più comune trisomia 21 a parità di età materna. Per la stessa ragione, patologie con prevalenza ancora inferiore (es: trisomie rare, sindromi da microdelezione, aneusomie segmentali) avranno VPP ancora minori.

2.2. Cause di risultati discordanti

Diverse sono le cause biologiche alla base della possibile discordanza tra il risultato del NIPT ed il reale assetto genomico del feto. Tra queste, tre risultano essere le più frequenti:



- i. **Mosaicismi feto-placentari:** la componente fetale del DNA libero circolante nel plasma materno deriva dall'apoptosi delle cellule dello strato esterno della placenta, detto citotrofoblasto. La presenza di un mosaicismo cromosomico può essere una delle cause biologiche alla base dei risultati discordanti del NIPT. Nei casi di *mosaicismo confinato alla placenta* (CPM), in cui l'anomalia è presente nei tessuti placentari ma non in quelli fetali, esiste la possibilità che il NIPT dia un risultato falso positivo. Di contro nei casi di *mosaicismo confinato ai tessuti fetali* (TFM), in cui l'anomalia, omogenea o a mosaico, coinvolge il feto ma non è presente o non è sufficientemente rappresentata nella placenta, esiste la possibilità di un risultato falso negativo¹⁶. Si faccia riferimento alla tabella 1 per la descrizione schematica dei vari tipi di CPM e TFM.
- ii. **Gemello riassorbito (*vanishing twin*):** il citotrofoblasto di un gemello riassorbito può gradualmente fondersi con la placenta del gemello vitale e continuare a rilasciare il proprio cfDNA nel circolo materno. La persistenza di questa seconda fonte di cfDNA fetale può permanere anche molte settimane dopo la scomparsa della camera gestazionale. Considerato che il 50-80% degli aborti spontanei nel primo trimestre di gravidanza è causato da anomalie cromosomiche identificabili mediante NIPT, in caso di gravidanze con gemello riassorbito, una errata valutazione del rischio potrebbe essere determinata da un'erronea attribuzione al feto vitale dell'assetto cromosomico presente nel gemello abortito¹⁷⁻¹⁹. Attualmente non è stato definito un periodo, dalla scomparsa della camera gestazionale, trascorso il quale sia, ragionevolmente, sicuro eseguire il NIPT²⁰⁻²². Di conseguenza non è raccomandata l'esecuzione del NIPT nelle gravidanze con gemello riassorbito;
- iii. **cfDNA materno:** nel plasma di una gestante la maggior parte del DNA libero circolante è di origine materna e solo una proporzione minore, mediamente circa il 10%, è fetale. Poiché con gli attuali metodi risulta tecnicamente impossibile separare fisicamente i due DNA, i NIPT analizzano simultaneamente sia il cfDNA di origine placentare che quello materno. Per tale motivo i test NIPT sono quindi potenzialmente in grado di identificare eventuali anomalie cromosomiche, sia costitutive che somatiche, a carico del genoma materno.²³ Il cfDNA materno è causa di risultati falsi positivi soprattutto per monosomia X, tripla X ed aneusomie segmentali di tutti i cromosomi; più raramente per le trisomie degli autosomi. La presenza di anomalie citogenetiche nel sangue materno può essere conseguenza di: mosaicismi somatici correlati all'età (es.: 45,X/46,XX), anomalie costitutive (es.: cariotipi materni 47,XXX, o a mosaico 45,X/46,XX, 47,XXX/46,XX, 47,XX,+21/46,XX, 47,XX,+8/46,XX), sbilanciamenti cromosomici parziali e neoplasie materne (benigne o maligne).^{6,23-25}

Quanto più l'analisi viene estesa a cromosomi diversi dei 13, 18 e 21, tanto più il cfDNA materno sarà rilevante come fonte di risultati falsi positivi.

3. Colloquio pre-test e consulenza genetica post-test

È necessario offrire alla gestante un colloquio pre-test che deve fornire informazioni su vantaggi e limiti di questo tipo di test di screening, sulle possibili cause di discordanza e sulle possibili alternative (sia diagnostiche che di screening). Per assicurarsi che la decisione di eseguire il NIPT sia l'esito di una scelta



informata, il colloquio dovrebbe includere **spiegazioni accurate ed aggiornate** sulle implicazioni relative ai risultati sia ad alto che a basso rischio, anche in relazione al tipo di anomalia ricercata, sulle possibilità di falsi positivi o negativi, sul VPP, sui test diagnostici di conferma disponibili, sul campione su cui questi ultimi possono essere effettuati e sui rischi connessi al tipo di prelievo necessario.

In tutti i casi in cui il NIPT abbia dato un **risultato ad alto rischio** è raccomandato, soprattutto per risultati diversi dalle trisomie 13, 18, 21, offrire alla gestante una consulenza genetica post-test allo scopo di

discutere le possibili implicazioni cliniche dell'anomalia rilevata, informarla circa il suo VPP e valutare l'opportunità di sottoporsi ad un prelievo invasivo, presentando i possibili percorsi diagnostici in relazione al tipo di anomalia rilevata dal NIPT, all'epoca gestazionale e alle eventuali evidenze cliniche.

Nei casi di **gravidanza non evolutiva**, in cui non sia possibile verificare il risultato del NIPT in seguito ad aborto spontaneo precoce, sarebbe auspicabile la valutazione del rischio di ricorrenza in sede di consulenza genetica.

In tutti i casi in cui il NIPT abbia dato un **esito non informativo**, anche dopo l'analisi di un secondo campione, è raccomandato proporre alla gestante una consulenza genetica al fine di valutare quale sia il percorso successivo più appropriato. In questo percorso è opportuno considerare le valutazioni ecografiche, la settimana di gestazione, i risultati di eventuali test di screening eseguiti precedentemente, l'anamnesi clinica, il rischio a priori e la disposizione della gestante all'esecuzione di prelievi invasivi.

4. Conferma diagnostica prenatale dopo NIPT ad alto rischio

È necessario offrire alla gestante un colloquio pre-test che deve fornire informazioni su vantaggi e limiti di questo tipo di test di screening, sulle possibili cause di discordanza e sulle possibili alternative (sia diagnostiche che di screening). Per assicurarsi che la decisione di eseguire il NIPT sia l'esito di una scelta informata, il colloquio dovrebbe includere **spiegazioni accurate ed aggiornate** sulle implicazioni relative ai risultati sia ad alto che a basso rischio, anche in relazione al tipo di anomalia ricercata, sulle possibilità di falsi positivi o negativi, sul VPP, sui test diagnostici di conferma disponibili, sul campione su cui questi ultimi possono essere effettuati e sui rischi connessi al tipo di prelievo necessario.

In tutti i casi in cui il NIPT abbia dato un **risultato ad alto rischio** è raccomandato, soprattutto per risultati diversi dalle trisomie 13, 18, 21, offrire alla gestante una consulenza genetica post-test allo scopo di discutere le possibili implicazioni cliniche dell'anomalia rilevata, informarla circa il suo VPP e valutare l'opportunità di sottoporsi ad un prelievo invasivo, presentando i possibili percorsi diagnostici in relazione al tipo di anomalia rilevata dal NIPT, all'epoca gestazionale e alle eventuali evidenze cliniche.

Nei casi di **gravidanza non evolutiva**, in cui non sia possibile verificare il risultato del NIPT in seguito ad aborto spontaneo precoce, sarebbe auspicabile la valutazione del rischio di ricorrenza in sede di consulenza genetica.



In tutti i casi in cui il NIPT abbia dato un **esito non informativo**, anche dopo l'analisi di un secondo campione, è raccomandato proporre alla gestante una consulenza genetica al fine di valutare quale sia il percorso successivo più appropriato. In questo percorso è opportuno considerare le valutazioni ecografiche, la settimana di gestazione, i risultati di eventuali test di screening eseguiti precedentemente, l'anamnesi clinica, il rischio a priori e la disposizione della gestante all'esecuzione di prelievi invasivi.

5. Conferma diagnostica prenatale dopo NIPT ad alto rischio

5.1. Considerazioni generali

La conferma diagnostica prenatale, necessaria per verificare la reale presenza dell'anomalia nei casi di NIPT con esito 'ad alto rischio', può essere effettuata su campioni di LA o CVS prelevati mediante amniocentesi o villocentesi. In caso di gravidanza gemellare, data l'impossibilità di attribuire un rischio specifico a ciascun feto, la conferma dell'anomalia deve essere effettuata prelevando un campione biologico rappresentativo di entrambi i gemelli.

L'analisi del **liquido amniotico** consente di analizzare cellule prevalentemente di origine fetale e, per tale motivo, risulta il campione biologico di elezione per le conferme diagnostiche dei NIPT positivi. Tuttavia, attendere fino alla 15-16 settimane di gestazione per poter eseguire un'amniocentesi, per le donne che ricevono un risultato ad alto rischio nel primo trimestre, comporta un'attesa che può generare ansia e, talvolta, può indurre la gestante a richiedere un'interruzione di gravidanza senza la necessaria conferma diagnostica del risultato.²⁶

La **villocentesi**, eseguibile da 11 settimane di gestazione, consente di ottenere un risultato più precocemente rispetto all'amniocentesi ma, nella scelta di questo percorso diagnostico, è assolutamente necessario considerare attentamente la probabilità che il risultato ad alto rischio del NIPT possa essere causato dalla presenza di un mosaicismo placentare. L'eventuale riscontro di anomalia a mosaico su CVS richiederebbe, infatti, un'ulteriore conferma mediante amniocentesi. Poiché la probabilità di mosaicismo su villo coriale è correlata al tipo di aneuploidia e, talvolta, anche al dato ecografico, nel valutare la villocentesi come test di conferma, sarebbe opportuno considerare il rischio di mosaicismo placentare correlato alla specifica anomalia (vedi Tabella 2).

Il tipo di **esame diagnostico di conferma** deve essere scelto in modo da risultare il più adeguato e appropriato nell'identificare l'anomalia individuata dal NIPT (es.: cariotipo per le anomalie numeriche, come trisomie e aneuploidie dei cromosomi X e Y, FISH o analisi microarray per sindromi da microdelezione e aneusomie segmentali). Qualsiasi indagine di conferma deve essere eseguita secondo

i criteri stabiliti dalla versione corrente delle LINEE GUIDA PER LA DIAGNOSI CITOGENETICA 2013 a cura del Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU, LINEE GUIDA PER LA DIAGNOSI CITOGENETICA Sezione Note Operative Citogenetica Costituzionale 2013 e delle Raccomandazioni Congiunte SIGU (Società Italiana Genetica Umana) - SIEOG (Società Italiana di Ecografia Ostetrico-Ginecologica) sull'uso degli array in



diagnosi prenatale).²⁷⁻²⁹ Si faccia riferimento ai grafici 1 e 2 per una sintesi delle informazioni utili nella scelta dell'analisi citogenetica/molecolare di conferma in epoca prenatale.

Si rammenta che **il NIPT e l'esame cromosomico diretto su villi coriali analizzano lo stesso tessuto placentare, il citotrofoblasto**. Pertanto, un risultato ad alto rischio potrebbe anche essere riconducibile alla presenza di un mosaicismo. Di conseguenza, quando si procede direttamente alla conferma su LA, può essere appropriato eseguire l'analisi secondo quanto indicato dai criteri SIGU^{27,28} per le analisi su LA a seguito di riscontro di mosaicismo nei CVS. Per le stesse ragioni la ricerca di aneuploidie tramite microarray potrebbe non essere esaustiva nell'evidenziare mosaicismi in bassa percentuale. In aggiunta al cariotipo su LA è possibile eseguire un test rapido (QF-PCR o FISH) in attesa del risultato definitivo su amniociti coltivati.

Inoltre, l'indagine citogenetica su CVS, condotta combinando il metodo diretto con quello della coltura a lungo termine, risulta quindi essere la più appropriata e completa per garantire la conferma diagnostica del risultato del NIPT. Nei casi in cui l'analisi del CVS con il metodo diretto sia sostituita, nella pratica di laboratorio, da quella mediante QF-PCR (Quantitative Fluorescent – Polymerase Chain Reaction), oltre all'ovvia necessità che il cromosoma per cui il NIPT ha dato il rischio aumentato sia compreso tra quelli indagati, si deve ricordare che questa tecnica non consente di evidenziare mosaicismi in bassa percentuale. Un profilo normale di QF-PCR in presenza di un cariotipo normale su coltura a lungo termine non permetterà di escludere la presenza nel citotrofoblasto di aneuploidie a mosaico non sufficientemente rappresentate. Al contrario, un profilo di QF-PCR patologico, pur in presenza di un cariotipo su coltura a lungo termine omogeneamente aneuploide, non sarà dirimente nel distinguere tra la presenza di una anomalia omogenea o a mosaico in alta percentuale nel citotrofoblasto. Per tali ragioni, nell'indagine citogenetica su villi coriali, la combinazione di QF-PCR e metodo della coltura a lungo termine ha minori capacità nell'individuare eventuali mosaicismi nel CVS, rispetto all'abbinamento di metodo diretto e coltura con conseguente maggior rischio di scorretta classificazione della costituzione fetale.

Cariotipo anormale concordante col NIPT (Grafico 1): nei casi di NIPT ad alto rischio per aneuploidia, un'analisi citogenetica, su LA o CVS, che evidenzi la presenza in forma omogenea della trisomia o dell'anomalia numerica dei cromosomi X e Y identificata dal cfDNA test, è da considerarsi una conferma del risultato ed indicativa di feto affetto. In caso di riscontro di anomalia diversa da quella evidenziata dal NIPT è raccomandato discuterne in consulenza genetica e valutare eventuali ulteriori approfondimenti.

Cariotipo normale discordante col NIPT (Grafico 1): un'analisi citogenetica che esiti in un cariotipo normale non necessita di ulteriori approfondimenti. Va comunque ricordato che il mosaicismo fetale può essere confermato e mai escluso con certezza. Pertanto, anche applicando tecniche sofisticate, rimarrà sempre un minimo rischio residuo di mosaicismo fetale associato ad un risultato normale le cui conseguenze cliniche sono per lo più sconosciute.^{27,30,31}



Cariotipo a mosaico concordante col NIPT (Grafico 1): se evidenziato dall'esame cromosomico su **villi coriali**, non deve essere considerato sufficiente per la conferma di feto affetto, ma solo una spiegazione biologica del risultato del NIPT anche nel caso che l'anomalia identificata corrisponda a quella evidenziata dal cfDNA test. Come già detto, infatti, un cariotipo non omogeneo nei villi coriali potrebbe essere dovuto ad un mosaicismo confinato alla placenta (CPM). Il cariotipo placentare potrebbe discordare da quello fetale anche completamente, se la conferma viene effettuata con la sola analisi del CVS, a causa dell'impossibilità di discriminare tra un CPM ed un vero mosaicismo coinvolgente anche il feto (TFM) (Tabella 1). Per distinguere tra queste due ipotesi, come indicato anche dalle Linee Guida SIGU,^{27,28} in presenza di un mosaicismo su villi coriali, è raccomandato eseguire un'amniocentesi di controllo, con l'eventuale estensione della conta cromosomica o eseguendo altri esami di approfondimento (es: FISH interfascica).

È noto che alcune aneuploidie hanno probabilità più alta di presentarsi a mosaico nel CVS, piuttosto che in forma omogenea con la conseguente necessità di completamento dell'analisi su LA per dirimere il tipo di mosaicismo identificato (CPM vs TFM) (vedi paragrafi specifici successivi). In Tabella 2 sono riportate le probabilità attese di mosaicismo su villi coriali per le principali aneuploidie. In generale la probabilità di conferma nel feto è del 14,3% quando l'anomalia è presente nel citotrofoblasto (mosaici nei villi tipo 1 e 3) e del 12,05% quando lo è solo nel mesenchima (mosaico nei villi di tipo 2).³²

In caso di riscontro di cariotipo a mosaico su **liquido amniotico** è raccomandato eseguire gli approfondimenti necessari (es: analisi di un maggior numero di cellule o cloni da colture indipendenti, FISH interfascica, valutazione dell'estensione dell'analisi ad altri tessuti fetali) al fine di discriminare con maggiore accuratezza un pseudomosaicismo da un TFM, come indicato in merito dalle Linee Guida SIGU.^{27,28}

Per le **sindromi da microdelezione ricorrenti** (Grafico 2), un esame diagnostico di conferma su CVS o LA, può essere eseguito mediante FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) con sonde specifiche o mediante analisi microarray (CMA). I laboratori devono **accertarsi che la regione da indagare sia adeguatamente coperta dalla sonda FISH o dal disegno della piattaforma microarray utilizzata** per l'analisi di conferma. Ad esempio, la microdelezione 22q11.2 è causata per lo più da microdelezioni coinvolgenti la zona prossimale della regione critica, in cui mappano le sonde FISH di uso più comune e disponibili a livello commerciale; più raramente essa può essere causata da una microdelezione centrale o distale che però rimane al di fuori della zona di ibridazione delle sonde di uso comune. Conseguentemente, in caso di mancata conferma tramite FISH con sonda commerciale, dato che le coordinate della microdelezione evidenziata dal NIPT potrebbero non essere disponibili, è importante considerare la possibilità di utilizzare sonde aggiuntive che ibridino il resto della regione critica. Tale limite verrebbe superato avvalendosi come test di conferma di una piattaforma microarray, in cui le sonde siano in grado di coprire in modo omogeneo l'intera regione.

In presenza di un risultato di FISH o CMA sia normale che patologico non è necessario procedere con l'esecuzione di ulteriori indagini (vedi paragrafo specifico). Se si esegue una conferma su villo coriale bisogna comunque ricordare i limiti dovuti al mosaicismo in quanto, sebbene non se ne conosca la



prevalenza, sono riportati in letteratura alcuni casi di mosaicismo placentare per microdelezioni/duplicazioni.^{33,34}

Per le **aneusomie segmentali non ricorrenti** (Grafico 2), la **strategia diagnostica di conferma va valutata in relazione alla dimensione ed al tipo di sbilanciamento** e, come verrà spiegato più in dettaglio nel paragrafo specifico, bisognerà tenere presente le stesse considerazioni e avvertenze riportate per le conferme delle microdelezioni, sia in relazione alla scelta del test che alla possibile presenza di mosaicismi nel CVS.

5.2. Aneuploidie comuni (T21, T18, T13, Monosomia X, altre aneuploidie dei cromosomi X e Y)

Un risultato falso positivo per queste aneuploidie si associa, prevalentemente, ad un mosaicismo confinato alla placenta (CPM) o alla presenza di un gemello riassorbito. Un risultato falso positivo per monosomia o trisomia del cromosoma X può anche essere dovuto a una condizione materna costitutiva o somatica.

L'incidenza generale del mosaicismo su CVS è circa del 2%.³⁵⁻³⁹ La probabilità di riscontro di mosaicismo nella placenta dopo NIPT risultato ad alto rischio è $\approx 2\%$ per T21, $\approx 4\%$ per T18, 47,XXX e 47,XXY, $\approx 8\%$ per 47,XYY, quindi simile o di poco superiore a quella generale.^{40,41} Pertanto, nei casi ad alto rischio per queste aneuploidie la villocentesi può essere considerata una valida opzione. La probabilità di mosaicismo nel CVS per T13 è del $\approx 22\%$ e del $\approx 50\%$ per 45,X. In tali casi l'ecografia è dirimente: se il risultato ad alto rischio è accompagnato da una ecografia normale, la probabilità che un mosaicismo confinato alla placenta sia la causa di tale risultato aumenta (fino al 70% per 45,X) e pertanto l'amniocentesi è da privilegiarsi. Se il risultato ad alto rischio è accompagnato da un'ecografia anormale, la conferma su prelievo di CVS può risultare già esaustiva in considerazione dell'elevata probabilità che il concepito abbia un cariotipo omogeneamente aneuploide ($>90\%$ per 45,X) (Tabella 2).

È opportuno sottolineare che nei casi di NIPT ad alto rischio per monosomia o trisomia X l'esecuzione di **un cariotipo alla madre, per evitare la diagnosi prenatale invasiva, non è dirimente circa la costituzione fetale** nel caso in cui il cariotipo materno risultasse anormale. In tali circostanze non è comunque esclusa l'assenza della stessa anomalia anche nel feto.

5.3. Sindromi da microdelezione ricorrenti (es: 22q11.2DS, Cat-eye-Sy, 1p36DS, PWS, AS, ...)



Lo screening delle microdelezioni con punti di rottura ricorrenti su cfDNA non è ad oggi raccomandato. I risultati positivi si associano generalmente a bassi VPP in relazione alla prevalenza delle diverse microdelezioni.⁴²⁻⁴⁴ In particolare per quelle microdelezioni che risultano associate a espressività fenotipica variabile un risultato falso positivo può essere causato sia da una microdelezione confinata alla placenta che da una presente nel genoma materno. La prevalenza dei CPM per microdelezioni non è stimata e, pertanto, sia le indagini su CVS che su LA rimangono egualmente perseguibili come metodo di conferma diagnostica utilizzando l'analisi microarray (CMA) o, alternativamente, la FISH, previa verifica della copertura della regione critica da indagare. Per microdelezioni ricorrenti a penetranza incompleta e/o espressività variabile, nel caso in cui il CMA fetale risulti normale, potrebbe essere opportuno valutare, in sede di consulenza genetica, la possibilità di eseguire l'esame diagnostico anche sulla madre al fine valutare possibili rischi di ricorrenza in future gravidanze.

5.4. Sbilanciamenti genomici

Trisomie rare (TR), aneusomie segmentali (AS) e aneuploidie multiple (AM) sono sbilanciamenti genomici identificabili solo tramite un approccio NIPT genomico o 'genomewide' basato su Next Generation Sequencing (NGS) (detto anche Massive Parallel Shotgun Sequencing, MPSS). Ad oggi tale estensione d'indagine tramite screening di routine in ambito clinico non è raccomandata e presenta problematiche di tipo clinico, etico e legale, in gran parte riconducibili alla difficoltà o all'impossibilità di interpretare correttamente il significato clinico di una larga parte delle anomalie individuabili con questo approccio tecnologico e, conseguentemente, di una presa in carico valida di tipo clinico. Tali risultati generano ansia nella coppia (proprio quella che si ripropone di abbassare col NIPT), e può portare a procedure invasive non necessarie e consulenze genetiche molto difficoltose e poco derimenti. Sulla base di tali implicazioni, **è necessario che la scelta di eseguire un NIPT che comprenda altre condizioni oltre alle trisomie 21,18 e 13 venga discussa, caso per caso, nel corso della consulenza pre-test al fine di affrontare tutti i limiti e le criticità di ogni condizione aggiuntiva.** A queste considerazioni vanno aggiunte la possibilità che si debba valutare l'eventuale presenza di condizioni costitutive o neoplastiche materne. Infine, non bisogna sottovalutare l'incremento del numero di test invasivi non necessari e tutte le possibili implicazioni etiche correlate allo screening di condizioni ad incerto significato.⁴⁴⁻⁴⁶

Relativamente alle TR e alle AS la prevalenza di ciascuna di queste anomalie, presa singolarmente, nella popolazione di feti ecograficamente normali è molto bassa e, conseguentemente, lo è anche il corrispondente VPP.

5.4.1. Trisomie rare (TR)

Numerosi sono i fattori che influiscono sull'incidenza, variabile da studio a studio, degli outcome avversi associati a risultati ad alto rischio per TR: la presenza di anomalie ecografiche fetali o di un risultato ad alto rischio dopo test combinato, la settimana di gestazione in cui è stato eseguito il NIPT,



la profondità del sequenziamento e i cutoffs del test utilizzati dal laboratorio.³² Pertanto, la probabilità complessiva di conferma fetale (TFM) delle TR non è stimabile con certezza variando, nei

diversi studi, in un range compreso tra lo 0% e il 18%, con una media del 9% e una capacità del NIPT di identificare un TFM per TR ogni ~5000 gravidanze sottoposte allo screening.³² Inoltre va considerato che il 27% (range 0-52%) delle gravidanze con NIPT ad alto rischio per TR esita in aborto spontaneo nel primo trimestre di gravidanza, come conseguenza delle anomalie dello sviluppo determinate dalla presenza della TR nel prodotto del concepimento.³² Ciò significa che, in più di un quarto dei cfDNA test con risultato ad alto rischio per TR (in ~1 ogni 1700 gravidanze sottoposte allo screening),³² il NIPT identifica una condizione comunque non compatibile con la vita, rendendo dunque superfluo e non raccomandato il loro screening.^{42,47} A causa delle stesse variabili, anche i rischi di altre complicanze della gravidanza quali, ridotta crescita, basso peso alla nascita, o la presenza di anomalie fetali sono poco definiti e differiscono nei diversi studi.²²

Un risultato falso positivo per TR può essere dovuto a numerose cause biologiche: mosaicismo confinato alla placenta (CPM), gemello riassorbito e condizioni materne costitutive o somatiche (correlate anche a neoplasie benigne o maligne).³² Vi sono alcuni aspetti clinici e biologici da considerare relativamente alle TR e, conseguentemente, al NIPT rivolto all'identificazione di queste condizioni:

- Le TR sono presenti nei tessuti fetali di gravidanze evolutive esclusivamente in forma di mosaico in quanto, se omogenee, sono causa di aborto spontaneo precoce.⁴⁸ Di conseguenza è opportuno tenere presente che, anche in presenza di un cariotipo normale, l'analisi su LA non permette di escludere con certezza l'assenza di un TFM coinvolgente altri tessuti fetali. Al contrario, in assenza di segni ecografici, un'indagine citogenetica che confermi la presenza di un TFM non consente comunque di predire le possibili correlazioni genotipo-fenotipo nel nascituro;⁴⁸
- I CPM rappresentano la causa principale dei risultati NIPT ad alto rischio per TR. Infatti, benché i mosaicismi per TR coinvolgenti il citotrofoblasto siano frequenti quanto quelli per le aneuploidie comuni (T21, T18, T13, SCA), il 97% di essi risulta essere confinato alla sola placenta e solo il 3% coinvolge anche il feto, contro una probabilità di conferma nel feto per le aneuploidie comuni del 26% e il più delle volte in forma omogenea;³²
- Benché in letteratura vi siano studi contrastanti, vi è nel complesso una generale evidenza che nelle gravidanze a basso rischio, cioè senza anomalie ecografiche o altre indicazioni di rischio, i CPM per le diverse TR, ad eccezione di quelli coinvolgenti la T16, non siano associati ad una maggiore incidenza di complicanze della gravidanza o anomalie fetali (es.: rottura prematura delle membrane, parto pretermine, IUGR, malformazioni fetali, basso peso alla nascita) rispetto alle gravidanze con cariotipo normale su CVS.^{49,50} I CPM per T16 mostrano invece una correlazione statisticamente significativa con basso peso alla nascita, parto pretermine e basso punteggio apgar;
- Tra i CPM potenzialmente identificabili dal NIPT (tipo 1 e 3) solo quelli di tipo 3, in cui sia il citotrofoblasto che il mesenchima sono interessati dalla linea trisomica, sarebbero associati ad



- un basso peso alla nascita.^{51,52} Tuttavia, data la rarità delle singole TR, non risulta possibile stabilire eventuali correlazioni con eventi avversi o anomalie fetali per ciascuna delle singole TR;
- Il cfDNA è espressione del genotipo del citotrofoblasto e, di conseguenza, un NIPT può evidenziare alto rischio per TR sia in caso di CPM tipo 1 e 3 che di TFM tipo 4 e 6. Tuttavia, occorre considerare che alcuni TFM per TR non necessariamente si associano a fenotipi anormali e che i CPM di possibile interesse clinico (tipo 3) rappresentano solo una porzione minore tra i CPM individuabili dal test. Pertanto, non vi è una chiara evidenza circa l'utilità clinica dell'applicazione del NIPT genomico per TR.^{49,53} Infine, ogni risultato positivo per TR richiederebbe un'analisi di conferma sia sul CVS che sul LA per discriminare tra CPM e TFM, e tra i CPM, per individuare quelli di tipo 3. Ciò comporterebbe un aumento del numero delle diagnosi prenatali invasive in assenza di evidenze cliniche a supporto del fatto che un monitoraggio più intensivo di queste gravidanze possa migliorarne l'outcome clinico.

È quindi raccomandato che le gestanti con risultato NIPT ad alto rischio per queste condizioni effettuino una consulenza genetica e che i test eventualmente prescelti per la conferma diagnostica vengano eseguiti seguendo i criteri definiti dalle Linee Guida SIGU.^{27,28} **La rarità delle singole TR, l'imprevedibilità della loro distribuzione nei tessuti fetali e placentari e le poco conosciute implicazioni cliniche della loro presenza, come CPM o TFM, rendono estremamente difficile definire sia il prelievo invasivo di elezione per eseguire i test diagnostici di conferma che il management clinico più appropriato.**

In relazione al tipo di TR il solo monitoraggio ecografico, senza conferma invasiva, può rappresentare un'opzione, anche in considerazione del fatto che molte TR si associano ad un rischio nullo o trascurabile di conferma come TFM. Le TR che, se identificate nel citotrofoblasto tramite analisi citogenetica, mostrano una maggiore probabilità di essere confermate come TFM nel LA sono: T4 (25%), T12 (50%), T14 (10%), T16 (15.8%) e T20 (4.5%).³²

Il cariotipo su CVS, se condotto combinando metodo diretto e coltura a lungo termine, permette di eseguire una conferma biologica del risultato ad alto rischio e di discriminare tra mosaicismo di tipo 1 e 3 ma non consente di distinguere tra CPM e TFM, cosa possibile solo con l'analisi combinata di CVS e LA.

La T16 è la TR che più frequentemente viene identificata tramite NIPT e che mostra maggior rischio di essere successivamente ritrovata come TFM.³² Di conseguenza, per la sua conferma, potrebbe essere più utile eseguire un'amniocentesi piuttosto che una villocentesi. Tuttavia, bisogna ricordare che, sebbene i TFM per T16 siano correlati ad un aumentato rischio di preeclampsia, anomalie e morte fetale, i rischi associati a ciascuno di questi outcome sfavorevoli non sono quantificati e la correlazione genotipo-fenotipo dei singoli casi non è, al momento, nota.

Per la conferma di TR, l'analisi del LA è indicata in modo specifico nel caso in cui la trisomia coinvolga un cromosoma *imprinted* (6,7,11,14,15,20); in questi casi è infatti il tessuto più idoneo per eseguire l'esclusione di disomia uniparentale (UPD), evenienza che può insorgere prevalentemente in conseguenza a meccanismi di correzione di un'aneuploidia zigotica (*'trisomy/monosomy rescue'*). La



probabilità di riscontro di UPD per cromosomi *imprinted* in casi con NIPT positivo per TR è del 2% (variabile nei diversi studi tra 0% e 10%) con una capacità del NIPT di identificare un feto con UPD clinicamente significativa ogni circa 24'000 gravidanze sottoposte allo screening.³²

Per i risultati ad alto rischio per T8 e T9, l'analisi del sangue fetale prelevato mediante cordocentesi può risultare più informativa del LA. Tali trisomie infatti non sempre sono evidenziabili con l'analisi del cariotipo su questo tipo di tessuto. Per la T9 potrebbe essere utile eseguire una FISH interfascica su amniociti non coltivati qualora non venga eseguita la cordocentesi.

5.4.2. Aneusomie segmentali (AS) con breakpoint non ricorrenti

Analogamente a quanto detto per le TR, anche per le aneusomie segmentali (AS) con breakpoint non ricorrenti il VPP di un risultato ad alto rischio è influenzato da diversi fattori e varia, nei diversi studi, dal 15% al 30%.^{45,54,55}

Occorre infatti considerare che:

- un risultato ad alto rischio per AS potrebbe essere dovuto a CPM le cui implicazioni cliniche sono largamente sconosciute⁵⁶;
- per molte delle AS identificabili vi è difficoltà o impossibilità nell'interpretarne le correlazioni genotipo-fenotipo⁴⁴⁻⁴⁶;
- non è attualmente noto quante AS, per quanto confermate nel feto, siano associate ad anomalie fetali evidenziabili ecograficamente^{45,54,55};
- un NIPT positivo per AS potrebbe essere originato da un'alterazione presente nel genoma materno⁵⁴; questo implica che, se il test di conferma sul feto risulta normale, sarebbe opportuno discutere con la gestante la possibilità di eseguire su di lei un eventuale approfondimento diagnostico.

Di conseguenza, a seguito di un risultato NIPT ad alto rischio per una qualunque AS, è raccomandato che le gestanti effettuino una consulenza genetica per valutare il significato clinico dello sbilanciamento (es: varianti a significato incerto). **Sulla base della dimensione e del tipo di sbilanciamento (duplicazione o delezione) e sul potere di risoluzione dei diversi tipi di indagine è opportuno valutare quale sia il test più appropriato tra CMA o FISH.** I laboratori devono accertarsi che la regione da indagare sia sufficientemente coperta dal disegno della piattaforma microarray utilizzata o da uno o più sonde nel caso di conferma mediante FISH. Quest'ultima tecnica è da utilizzare con cautela, dato che non sempre i confini dello sbilanciamento sono definiti con precisione e le sonde prescelte potrebbero effettivamente non mappare all'interno della regione coinvolta. Per



la stessa ragione, anche nel caso in cui le dimensioni dell'aneusomia sia francamente superiore alle 10-20Mb, va valutata con cautela la possibilità di fermarsi alla sola conferma mediante cariotipo.

Un'analisi microarray su CVS o LA con esito normale o patologico, coerente con lo sbilanciamento identificato dal NIPT, non comporta l'esecuzione di ulteriori indagini. **Un risultato anomalo**, che non corrisponda a quanto individuato dal cfDNA test, implica l'esecuzione di esami di approfondimento a seconda del tipo di anomalia rilevata. Per l'analisi condotta su CVS si rimanda alle stesse avvertenze descritte nelle conferme per le sindromi da microdelezione comprese le estensioni su DNA materno in casi di risultato fetale normale.

5.4.3. Anomalie multiple (AM)

Un profilo 'caotico' con aneuploidie multiple (AM), con o senza aneusomie segmentali, viene identificato in media ogni 3 campioni su 10.000 analizzati mediante NIPT genome-wide.⁵⁷ Tale profilo potrebbe essere rappresentativo dello stato placentare, che include cotiledoni con differenti linee cellulari aneuploidi/anormali o aneuploidie multiple, o di quello materno.^{23,58} In quest'ultimo caso le AM possono essere correlate a neoplasie benigne (prevalentemente fibromi uterini)⁶⁰ o, più raramente, a condizioni maligne individuabili dal NIPT in quanto il cfDNA derivato dall'apoptosi delle cellule tumorali viene anch'esso rilasciato nel circolo sanguigno.^{57,59,60} In caso di risultato NIPT con AM il VPP per neoplasia materna varia tra 8% e 45%.^{55,60-62} La maggior parte dei tumori materni identificati a seguito di NIPT si presenta ad uno stadio avanzato o metastatico (stadio IV).⁶² Dato che la diagnosi precoce è fondamentale nella prevenzione tumorale e che la diagnosi in fase avanzata rimane comunque associata ad elevati tassi di mortalità ed a trattamenti per lo più inefficaci, l'utilità clinica della ricerca e refertazione delle AM tramite NIPT non è ancora dimostrata e rimane tutt'ora molto dibattuta.⁶³ Nei casi positivi per AM è comunque utile escludere la presenza di fibromi materni, se non accertati precedentemente. Le neoplasie maligne identificate in gravidanza sono molteplici (tumori al seno, alla cervice uterina, alle ovaie, alla tiroide, coloretali, melanoma e linfoma).⁶⁴ Il NIPT non è predittivo dell'origine tissutale e pertanto il management risulta essere molto complesso e può generare nella donna ansia, che può protrarsi anche dopo la gravidanza⁶³, anche in considerazione del fatto che il rischio per tumori, soprattutto ematologici, può persistere per anni anche a seguito di indagini negative. Attualmente un solo studio suggerisce il *check-up* per la ricerca del tumore materno e, gli stessi autori riportano che tale approccio comporta non solo apprensione nella donna ma anche un dispendio elevato di risorse.⁶⁵ Ad oggi, data la complessità delle implicazioni e la scarsa evidenza di utilità clinica, l'ESHG e l'ASHG non raccomandano una valutazione delle condizioni materne a seguito di NIPT ad alto rischio per AM e nessuna società scientifica fornisce raccomandazioni per un management appropriato di questi risultati (ISPD, ACOG, sMFM e ACMG).⁸⁻¹²

6. Risultati non informativi

Il NIPT può essere eseguito utilizzando diverse tecnologie (es.: sequenziamento di nuova generazione o NGS, microarray, piastre per nanofiltraggio con scansione delle fluorescenze, etc.) e due tipi di approccio all'analisi: *'targeted'* (o mirati), in cui si prendono in esame specifici loci genomici sui cromosomi di interesse; e *'genome-wide'* (o genomici), che coinvolgono nell'indagine sequenze distribuite sull'intero genoma.



Le cause che portano a risultati non informativi possono dipendere sia dal tipo di tecnologia utilizzata che dai parametri di qualità adottati da ciascun laboratorio o essere di tipo biologico. È possibile suddividerle in quattro categorie principali⁶⁶:

1. problemi di conservazione, trasporto e qualità del campione di sangue (es.: emolizzazione, quantità insufficiente, congelamento, contaminazione, etc.);
2. bassa Frazione Fetale (FF), cioè presenza di un'insufficiente quantità di cfDNA di origine fetale nel campione;
3. scarsa qualità dei parametri qualitativi di analisi imputabili a cause bioinformatiche e/o tecniche (es.: problemi di processamento, profilo non interpretabile, mancata informazione circa ovodonazione, trasfusioni, trapianti, etc.);
4. problemi di analisi legati alla costituzione del cfDNA di origine materna per presenza nella gestante di: mosaicismi, varianti costitutive, neoplasie, etc....²³

Un risultato non informativo può riguardare l'intero esame o interessare solo una o più delle anomalie indagate. **Più l'analisi è estesa maggiore sarà l'incidenza dei risultati completamente o parzialmente non informativi.**

6.1. Frazione Fetale

La Frazione Fetale (FF) è la percentuale di frammenti di cfDNA derivati dal citotrofoblasto in rapporto al cfDNA totale circolante nel sangue materno. Tra 10 e 20 settimane di gestazione la FF media varia in genere tra il 10 ed il 15%.^{21,67,68}

La FF dovrebbe sempre essere misurata e riportata nel referto in quanto indicativa della qualità del campione e della confidenza statistica dei risultati.¹³ Infatti, poiché il NIPT mira a identificare piccole variazioni nel numero di frammenti genomici riconducibili alla presenza di un'anomalia cromosomica fetale, l'affidabilità del risultato è strettamente dipendente dal livello di FF. Più alta è la FF, e quindi il numero di frammenti fetali disponibili per rilevare eventuali alterazioni di dosaggio, maggiore sarà la capacità del test di individuare i campioni con anomalie; più bassa è la FF, minore sarà la correttezza nel discriminare in maniera statisticamente significativa una gravidanza aneuploide da una euploidie.^{67,68} Dato che il calcolo statistico del rischio al di sotto di determinate percentuali non è attendibile, alcuni software/algoritmi di analisi, non forniscono un risultato.

La misurazione della FF può essere effettuata utilizzando metodi molto diversi tra loro e non direttamente confrontabili (es.: rilevamento sequenze dei cromosomi Y o X, analisi di SNPs, quantificazione dei frammenti genomici più corti con maggior probabilità di avere origine fetale, presenza di differenti siti di digestione o metilazione del cfDNA fetale e materno, etc).⁶⁹⁻⁷⁶ **Anche il tipo di algoritmo impiegato nell'analisi bioinformatica influisce notevolmente nella determinazione della FF così come la profondità di analisi.**⁷⁷ Ne deriva che la soglia della FF dovrebbe essere determinata e ottimizzata individualmente con studi statisticamente potenti per ciascuna piattaforma considerando tutte queste variabili. In genere i *cut-off* variano nelle diverse piattaforme tra il 2% e il 4%. I test con *cut-off* del 4% hanno un tasso di fallimento variabile tra 1 e 3%.^{22,23}



Nel colloquio pre-test la gestante dovrebbe essere informata di quale sia la soglia di FF adottata dal laboratorio al di sotto della quale non sarà possibile ottenere un risultato informativo e il relativo rischio di falso negativo collegato a quella soglia di FF adottata.

La FF presenta un'ampia variabilità interindividuale e risulta essere influenzata da diversi fattori, sia materni che feto-placentari (vedere Tabella 3). Qualsiasi condizione che incrementi la quantità di cfDNA materno o riduca quello di cfDNA fetale porterà ad un abbassamento della FF. Il tasso di risultati non informativi nelle gravidanze gemellari dizigoti è superiore, se i metodi misurano la FF di entrambi i gemelli e forniscono un risultato solo se entrambi superano il *cut-off*, rispetto a quelli in cui la FF non viene misurata o si utilizza una soglia dell'8%, assumendo un ugual contributo delle placente (4%+4%).

Conseguenza di una bassa frazione fetale sono il fallimento del test o risultati non informativi parziali. A seconda della tecnologia impiegata la percentuale di risultati non informativi varia tra l'1 e l'8%, la maggior parte dei quali è ascrivibile ad una ridotta FF.^{21,22,78} **La ripetizione del test su un secondo prelievo consentirà di ottenere un risultato conclusivo nel 50-60% dei casi. In media l'1-2% circa di tutti i NIPT eseguiti non consentirà di ottenere un risultato anche dopo l'esecuzione di una seconda indagine.**⁷⁹⁻⁸¹

I fallimenti conseguenti ad una bassa frazione fetale sono associati ad un rischio aumentato di aneuploidie, che, a seconda nei diversi studi, varia dal 2,7% al 23,3%.⁸²⁻⁸⁴ Le aneuploidie identificate a seguito di un fallimento del NIPT sono: trisomia 13, trisomia 18, trisomia 21, trisomia 16 a mosaico, monosomia X.^{82,83}

Attualmente, considerati i risultati discordanti di diversi studi, non è clinicamente validata l'associazione tra un'alta concentrazione di cfDNA fetale e complicazioni della gravidanza, come parto pretermine o pre-eclampsia.⁸⁵⁻⁸⁷ Vi sono tuttavia delle evidenze preliminari riguardanti una associazione tra bassa FF e complicanze della gravidanza (pre-eclampsia e restrizione di crescita).⁸⁸

6.2. Follow up prenatale dopo risultato non informativo

Un risultato inconclusivo o non informativo parziale su un primo campione, in considerazione delle molteplici cause che lo possono determinare, **non sarà necessariamente da intendersi rappresentativo di un aumentato rischio di anomalie fetali.**

Il fallimento del test su un primo prelievo dovrebbe portare innanzitutto ad una rivalutazione dei dati anamnestici, al fine di escludere eventuali informazioni non corrette o incomplete, così da poter valutare correttamente la possibilità di ripetere l'indagine su un nuovo campione. In assenza di fattori notoriamente legati ad un possibile insuccesso del test (es: epoca gestazionale precoce, elevato BMI, malattia autoimmune o infiammatoria, etc.) **ripetere il test su un secondo campione, darà un esito conclusivo nel 50-60% dei casi.** In linea generale quindi, a seguito di un fallimento su un primo prelievo, una volta valutata la sua possibile causa, sarebbe utile offrire alla gestante l'opportunità di eseguire un nuovo esame. È bene comunque ricordare che **in media l'1-2% circa di tutti i NIPT non darà comunque un esito, nonostante la ripetizione dell'indagine.**^{22,80} La scelta della strategia (secondo prelievo o proposta di percorso alternativo) andrà definita sia in relazione alla tipologia del fallimento che all'esperienza del laboratorio nella gestione di questi casi specifici. **La gestante va comunque informata,**



in sede di colloquio pre-test, circa la possibilità ed il tasso di fallimenti, sia su primo che secondo campione, nonché degli eventuali percorsi che potrebbero essere intrapresi a seguito di un tale esito.

In tutti i casi in cui il NIPT risulti inconclusivo anche dopo l'analisi di un secondo campione, in particolare se il fallimento è legato ad una bassa frazione fetale, è raccomandato proporre alla gestante l'esecuzione di un'ecografia se non è stata eseguita una precedente ecografia specificamente orientata alla misurazione della translucenza nucale ed una consulenza genetica allo scopo di valutare quale sia il percorso successivo più appropriato. Nel definire il percorso più opportuno bisognerà considerare le valutazioni ecografiche, la settimana di gestazione, i risultati di eventuali test di screening eseguiti precedentemente e della sua disposizione all'esecuzione di prelievi invasivi (VC, AC). In presenza di un risultato non conclusivo per bassa frazione fetale in assenza di altre condizioni note che la possano influenzare, la gestante deve essere informata dell'aumentato rischio di aneuploidie.

In presenza di anomalie ecografiche è raccomandata proporre una diagnosi prenatale invasiva con analisi del cariotipo ed eventuale CMA (*Raccomandazioni Congiunte SIGU (Società Italiana Genetica Umana) - SIEOG (Società Italiana di Ecografia Ostetrico-Ginecologica) sull'uso degli array in diagnosi prenatale.*)²⁹

Nei casi in cui l'ecografia risulti normale e non vi siano rischi a priori, le possibili opzioni da valutare sono:

- solo monitoraggio ecografico;
- test di screening alternativo qualora l'epoca gestazionale sia compatibile con i limiti previsti per la valutazione del rischio ecografico e/o biochimico (es.: test combinato, tritest, test integrato); nel caso in cui sia stato precedentemente eseguito un test di screening, il livello di rischio per la gestante sarà quello definito da esso;
- diagnosi prenatale invasiva;
- eventuale follow-up postnatale.

Non ci sono dati a supporto del fatto che eseguire un altro NIPT che utilizzi una tecnologia alternativa possa avere successo.

Nel caso di un risultato non informativo per le sole aneuploidie dei cromosomi sessuali e/o nella determinazione del sesso fetale è a discrezione del laboratorio la scelta di ripetere o meno il test su nuovo campione. Tale decisione dipende dal tipo del fallimento, dall'esperienza nella gestione di questi casi e dalla policy del laboratorio e va discussa nel colloquio pre-test. In tale sede la gestante dovrebbe anche essere informata del fatto che non è nota la probabilità di ottenere un risultato per i cromosomi sessuali dopo ripetizione dell'esame. In questi casi sarebbe utile eseguire un'ecografia morfologica, per identificare eventuali anomalie che possano associarsi alla presenza di mosaicismi fetali per monosomia X e andrebbe valutata la possibilità di eseguire anche un cariotipo della gestante. In caso di sospetto ecografico, l'esecuzione del cariotipo fetale su LA, con estensione della conta cromosomica o utilizzo della FISH interfascia, è il tipo di indagine più adeguata all'identificazione di possibili mosaicismi.

A oggi non vi sono dati sufficienti riguardo le cause dei risultati non informativi per condizioni diverse dalle comuni trisomie e neppure sul tasso di successo su secondo prelievo. È quindi a discrezione del laboratorio, che esegue l'analisi, offrire o meno la ripetizione del test. In caso di assenza di risultato, anche dopo secondo prelievo, non vi sono dati per valutare il rischio di anomalie fetali associato al risultato inconclusivo ed è raccomandato, proporre alla gestante, una consulenza genetica per valutare il possibile percorso successivo più appropriato.



7. Discordanze di sesso tra NIPT ed ecografia

La valutazione del sesso fetale tramite NIPT pone questioni etiche legate alla possibile interruzione volontaria della gravidanza basata sul sesso del concepimento. Sebbene nell'ambito della diagnosi preimpianto le società scientifiche abbiano prodotto raccomandazioni su questo argomento⁸⁹, per quello che concerne il NIPT mancano ancora raccomandazioni specifiche.

Alcuni studi hanno rilevato che è possibile utilizzare il NIPT, in ambito clinico, per determinare la presenza/assenza di un cromosoma Y in casi di feto ad alto rischio per patologie legate all'X.⁹⁰⁻⁹²

I tassi di concordanza del sesso fetale variano, a seconda del metodo utilizzato (basato su SNP o su counting), da 97.7% nelle femmine e 99.8% nei maschi fino al 100% per maschi e femmine (con IC 95%, variabili tra 99–100% e 97% variabili tra 67–100%)^{1,83,93,94}. Il metodo è piuttosto accurato tanto da essere considerato diagnostico ('NIPD'). La presenza di un cromosoma Y viene facilmente rilevata in un background materno che, generalmente, non dovrebbe contenere sequenze derivate dal cromosoma Y.

Tuttavia, bisogna ricordare che il livello di accuratezza nella determinazione del sesso fetale nelle gravidanze gemellari, per le quali la casistica è più limitata, potrebbe non essere paragonabile a quella delle gravidanze singole. In particolare, nelle gravidanze di gemelli dizigoti, in cui la rilevazione del cromosoma Y indica la presenza di almeno un feto di sesso maschile, le due placente potrebbero non contribuire allo stesso modo al cfDNA. Quindi è possibile che la quota di cromosoma Y di uno dei due feti possa essere talmente bassa da non essere rilevata portando ad una discordanza con il dato ecografico.⁹⁵

Nelle situazioni rare in cui il sesso fetale determinato dal NIPT e quello identificato dall'ecografia sono discordanti è opportuno segnalare la discordanza al laboratorio al fine di eseguire una verifica dei dati grezzi e del processo di analisi per escludere eventuali scambi di campioni. Se questa verifica non risolve l'incognita, è opportuno procedere con una seconda indagine ecografica a conferma del sesso fenotipico e, se la discordanza permane, rivedere i dati anamnestici della paziente per escludere la presenza di eventuali gemelli riassorbiti, trapianto/trasfusione materna o una condizione familiare nota legata a disordini genetici dello sviluppo sessuale. Se anche quest'ulteriore verifica non dirime il problema, è necessario valutare, in sede di consulenza genetica, l'opportunità di eseguire una amniocentesi per indagare la causa della discrepanza.

Qualora il risultato del sesso fetale derivato dal cariotipo/QF-PCR sia concorde col sesso ecografico ma discordante dal NIPT la causa è da ricondursi a problemi legati alla costituzione genetica della placenta o al cfDNA circolante.⁹⁶ Ad esempio, nei casi con cariotipo fetale ed ecografia femminile ma un NIPT maschile le cause possono essere: un gemello evanescente occulto di sesso maschile, trapianto/trasfusione materna da donatore maschio e un mosaicismo fetto-placentare 45,X/46,XY con linea prevalente 46,XY nel citotrofoblasto. Di contro, casi con cariotipo ed ecografia maschile ma un NIPT femminile sono imputabili: ad una frazione fetale troppo bassa affinché il NIPT possa identificare il segnale Y, ad un mosaicismo fetto-placentare 45,X/46,XY con linea prevalente 45,X nel citotrofoblasto, ad un gemello evanescente occulto di sesso femminile che sovrasta il segnale Y del gemello vitale.⁹⁶



Se il risultato del sesso fetale derivato dal cariotipo/QF-PCR è concorde col NIPT ma discordante dall'ecografia generalmente la causa è da ascrivere a problemi legati a disordini genetici dello sviluppo sessuale (DSD). Ad esempio, nei casi di cariotipo e NIPT femminile con una ecografia maschile si deve sospettare la mascolinizzazione di un feto 46, XX (es.: presenza di SRY criptico traslocato su un cromosoma X, androgeni esogeni, iperplasia congenita del surrene, tumore che produce androgeni). Quando, invece il NIPT e il cariotipo indicano un sesso maschile ma l'ecografia evidenzia un sesso femminile, si dovrebbe sospettare un DSD maschile con *sex reversal* in senso femminile (es.: delezione o mutazione di SRY, Sindrome Campomelica, Sindrome da insensibilità agli androgeni, Sindrome di Smith-Lemli-Opitz), o carenza di 5 α -reduttasi.⁹⁶

Nel caso in cui la gestante escluda la possibilità di procedere con indagini invasive, è opportuno condurre approfondimenti alla nascita tramite cariotipo. Se esso risulta concorde col sesso del neonato (ma discordante dal NIPT) non necessita di ulteriori indagini. Se invece discorda dal sesso del neonato (e concorda con quello del NIPT) è necessario effettuare ulteriori indagini per disordini dello sviluppo sessuale come descritto sopra. In combinazione con un fenotipo alterato (sia esso consistente o meno con l'esito del cfDNA test), è necessario considerare, in sede di consulenza ed in base ai segni clinici, la possibilità di procedere con ulteriori accertamenti.

8. Conferma diagnostica postnatale dopo NIPT risultato ad alto rischio e non informativo

Nei casi in cui la gestante rifiuti l'opzione di una diagnosi prenatale invasiva, rimandando l'eventuale conferma diagnostica all'epoca postnatale, la scelta degli esami più appropriati deve essere valutata in sede di consulenza genetica dopo una dettagliata valutazione clinica del neonato/bambino.

Questo documento fornisce solo un'indicazione di quali potrebbero essere le indagini eseguibili, per le quali si faccia riferimento ai grafici 3,4,5,6 e 7.

8.1. Aneuploidie (T21, T18, T13, TR, SCA) (Grafici 3 e 4)

In caso di risultato ad alto rischio per T21, T18 o T13, il riscontro di un fenotipo normale all'esame obiettivo da parte di un genetista clinico può essere sufficiente a non procedere con ulteriori accertamenti.

Qualunque sospetto di un fenotipo anomalo dovrebbe invece condurre all'esecuzione di indagini citogenetiche di conferma. Il cariotipo standard su campione di sangue periferico è il test di elezione e deve essere condotto secondo i criteri presenti nella versione corrente delle Linee Guida di Citogenetica della SIGU e nel relativo Manuale operativo.^{27,28} Se il cariotipo risulta anormale, in forma omogenea ed è in accordo con il risultato del NIPT, è da considerarsi diagnostico e non sono necessari approfondimenti. Se il cariotipo risulta anormale in forma a mosaico si può valutare, in sede di consulenza genetica, l'opportunità di estendere l'analisi ad altri tessuti per determinare il livello di mosaicismo e la sua



distribuzione. Se l'esame cromosomico risulta anormale ma non corrisponde all'anomalia identificata dal NIPT, va valutata, in sede di consulenza genetica, la necessità di effettuare ulteriori approfondimenti diagnostici (es.: CMA). **Un cariotipo normale in presenza di un fenotipo anormale** prevede l'estensione dell'analisi oltre le 16 metafasi previste dal cariotipo standard (es.: aumento delle conte, FISH interfascia, analisi di altri tessuti) al fine di escludere mosaicismi in bassa percentuale.^{27,28} In caso di ulteriore esito negativo va valutata, in sede di consulenza genetica, l'opportunità di eseguire altri tipi di test genetici.

Lo stesso percorso è valido per le TR in considerazione anche del loro basso rischio di conferma fetale. In particolare, se il cariotipo risulta normale o a mosaico va valutata, in sede di consulenza genetica, la necessità di estendere l'analisi (es.: aumento delle conte, FISH interfascia, analisi di altri tessuti) in considerazione della presentazione clinica del neonato/bambino, del tipo di TR indicata dal NIPT e dei casi clinici simili riportati in letteratura con la stessa TR a mosaico. Bisogna ricordare che un mosaicismo non può mai essere completamente escluso e che l'entità delle conseguenze cliniche può essere estremamente variabile (da normale a gravemente affetto) senza poter prevedere con certezza la loro evoluzione durante la crescita.

Infine, per le aneuploidie dei cromosomi X e Y, è importante considerare che, soprattutto se a mosaico, possono non associarsi a segni clinici evidenti, di conseguenza potrebbe essere opportuno valutare, in sede di consulenza genetica, la possibilità di eseguire un controllo del cariotipo anche in presenza di un fenotipo normale.

8.2. Microdelezioni ricorrenti e aneusomie segmentali (Grafico 5)

In caso di risultato ad alto rischio per microdelezioni ricorrenti o aneusomie segmentali in presenza di un fenotipo normale, sarà il genetista clinico a valutare l'opportunità di procedere con ulteriori accertamenti. **Qualunque sospetto di un fenotipo anormale** dovrebbe invece condurre all'esecuzione di indagini di conferma. Il CMA è il test di elezione e deve essere condotto secondo i criteri presenti nella versione corrente delle Linee Guida di Citogenetica della SIGU e del relativo Manuale Operativo.^{27,28} L'utilizzo del CMA consentirà inoltre di caratterizzare i punti di rottura ed il contenuto genico dell'eventuale aneusomia segmentale riscontrata.

Se il CMA risulta normale o anormale (concordante o non col NIPT) va valutata, in sede di consulenza genetica, la necessità di eseguire ulteriori approfondimenti diagnostici.

Le dimensioni dello sbilanciamento coinvolto nell'aneusomia segmentale potrebbero portare alla scelta di altri metodi di conferma quali il cariotipo o la FISH. Tali metodi possono essere utilizzati valutandone, caso per caso, l'adeguatezza in base alla risoluzione dell'indagine, alla regione cromosomica coinvolta ed alla sua effettiva copertura.



8.3. NIPT non informativo (Grafici 6 e 7)

In caso di NIPT non informativo va discussa, in sede di consulenza genetica, l'opportunità di eseguire specifici approfondimenti diagnostici per la valutazione del cariotipo/genotipo in epoca postnatale. La scelta andrà condotta valutando con attenzione vantaggi e svantaggi e, dopo un'attenta valutazione clinica mirata a verificare la possibile presenza di segni clinici nel neonato/bambino compatibili o meno con una aneuploidia (in particolare per la T13 e la T18 che si associano ad un tasso aumentato di fallimento del test). **Il cariotipo standard su linfociti da sangue periferico del neonato** è il test di elezione

e deve essere condotto secondo i criteri presenti nella versione corrente delle Linee Guida di Citogenetica della SIGU e del relativo Manuale Operativo.^{27,28}

Nel caso di risultato non informativo che coinvolga solo i cromosomi X e Y sarebbe opportuno valutare se effettuare un'estensione dell'analisi (aumentato numero di conte) o FISH interfascica, conducendo l'analisi secondo i requisiti previsti per sospetto mosaicismo.^{27,28}

In caso di soggetti con fenotipo anomalo è opportuno, in sede di consulenza genetica, un'attenta valutazione clinica così da poter procedere alla scelta del test più adeguato.

9. NIPT per patologie monogeniche e gestione dei risultati ad alto rischio.

L'analisi NGS su cfDNA può essere utilizzata nei casi di storia familiare positiva o di risultati ecografici suggestivi di una particolare patologia monogenica. In UK è stato istituito un servizio di diagnosi prenatale clinica non invasiva (NIPD) per malattie monogeniche. Inizialmente il NIPD si basava su metodi mirati/targeted, relativamente semplici, atti ad identificare varianti specifiche ereditate dal padre (quali ad esempio la determinazione del sesso fetale o lo stato RhD) e mutazioni *de novo*. L'avvento del NGS ha consentito l'espansione del NIPD permettendo lo sviluppo di pannelli genici più ampi e analisi più complesse per la diagnosi di patologie recessive, legate all'X e dominanti ereditate dalla madre.⁹⁷

Un esempio di ricerca targeted di varianti autosomiche *de novo* specifiche è rappresentato dal NIPD per displasia tanatofora. Quando un feto all'ecografia mostra arti corti e un torace piccolo, che sono caratteristiche compatibili con questa displasia scheletrica, si può eseguire il test mirato per ognuna delle 12 mutazioni causative. Il test per pannelli estesi basati su NGS prevede invece l'analisi contemporanea di molte più varianti, realizzata progettando una 'cattura mirata' di 29 mutazioni note nel gene *FGFR3*.

Questo stesso approccio in pannelli può essere usato anche nelle patologie recessive, nel caso i genitori fossero eterozigoti per mutazioni diverse. In tale caso l'esclusione dell'allele paterno indicherebbe un feto non affetto al contrario, nel caso fosse presente lo stesso allele paterno, sarà necessario un test



invasivo per determinare l'eredità o meno dell'allele materno. Con questo approccio si sono sviluppati test per la fibrosi cistica e la beta-talassemia.

Il test 'diagnostico' per le condizioni autosomiche recessive e legate all'X richiede la determinazione dell'eredità dell'allele materno su un background di alleli circolanti di origine materna. L'analisi, pertanto, si basa su un approccio sofisticato che non usa metodi qualitativi ma quantitativi che richiedono una valutazione delle quantità relative di alleli mutati e wild-type eseguibile tramite il dosaggio relativo delle mutazioni (RMD). Il RMD stabilisce le proporzioni degli alleli wild-type e di quelli mutati circolanti nel plasma materno e utilizza la metodologia di PCR digitale (dPCR) che consente una misurazione,

estremamente accurata, dell'RMD nei campioni di plasma materno. Laddove i due genotipi avessero eguale quantità questo significherebbe che essendoci equilibrio allelico il feto sarà eterozigote. L'osservazione di livelli aumentati dell'allele mutato implica la presenza di un genotipo fetale omozigote per la mutazione.

L'analisi del dosaggio relativo dell'aplotipo (RHDO) è un'evoluzione della RMD e combina il dosaggio relativo delle mutazioni con l'analisi di linkage. Mentre l'RMD quantifica direttamente i rapporti allelici in corrispondenza di una mutazione o di un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) specifico, l'approccio RHDO determina i rapporti allelici tra due aplotipi nel plasma materno usando SNP eterozigoti in linkage col gene in questione. Ciò significa che, anziché testare la mutazione specifica, i test RHDO analizzano l'aplotipo collegato alla mutazione. Maggiore è il numero di SNP inclusi nell'analisi maggiore sarà il potere statistico.

Alcuni esempi di applicazione del RHDO riguardano i disturbi legati all'X, distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e distrofia muscolare di Becker (BMD), per i quali non è richiesta la conoscenza dell'aplotipo paterno, o anche per condizioni autosomiche recessive, quali l'iperplasia congenita del surrene, l'atrofia muscolare spinale e la fibrosi cistica. Il vantaggio principale di RHDO è che l'analisi non è limitata dal tipo di mutazione dato che si basa sugli aplotipi collegati al gene.⁹⁷

10. Criticità del NIPD per condizioni monogeniche e impatto sulla gestione dei risultati

Il test NIPD per condizioni monogeniche presenta alcune criticità che hanno risvolti sulla interpretazione e gestione dei risultati:

- **Sebbene il test venga proposto come 'diagnostico' vi possono essere casi di falso positivo e negativo dovuti alle stesse cause biologiche che sottendono i risultati discordanti dei NIPT per condizioni cromosomiche.** I falsi positivi possono essere causati dalla presenza di un gemello riassorbito e da bassi livelli di mosaicismo materno identificabile tramite l'analisi in parallelo del DNA materno. I falsi negativi possono verificarsi a causa di FF molto basse. Pertanto, è consigliabile misurarla anche nel caso di malattie monogeniche per dimostrare la presenza di DNA fetale



sufficiente in relazione al tipo di metodologia utilizzata. L'uso del test in questi casi ha un impatto verosimilmente negativo nel rapporto costo-beneficio se confrontato con la diagnosi prenatale invasiva.⁹¹ In alcuni casi, in modo particolare per evidenze ecografiche associabili a difetti genetici

noti, l'eventuale esclusione dell'unica variante genetica causativa del quadro ecografico (ad esempio acondroplasia) con un test NIPT, deve tranquillizzare relativamente la coppia sull'eventuale assenza del difetto genetico in questione a causa dei limiti tecnici e biologici precedentemente illustrati. Per le stesse ragioni un risultato positivo non sarà diagnostico e la necessità di una conferma dovrà essere valutata, in sede di consulenza genetica, alla luce del risultato ottenuto, dell'andamento della gravidanza e della storia familiare della coppia;

- **Le tecniche da utilizzare per la conferma di un risultato positivo vanno valutate, in relazione alla settimana di gestazione, sulla base della specifica attendibilità diagnostica e dei tempi necessari per l'esecuzione.** La conferma di un NIPT positivo per una patologia monogenica può essere effettuato sia su campioni di villi coriali che di liquido amniotico con test mirato alla/e specifica/he varianti. In caso di varianti associate a patologie recessive o X-linked, è necessario procedere anche alla verifica su DNA materno o sulla coppia. Per patologie dominanti con espressività variabile, anche in assenza di segni clinici evocativi nei componenti della coppia, è raccomandabile procedere all'esclusione della variante nei genitori se non verificato in precedenza;
- **Il test non è adatto in gravidanze multiple** poiché, ad oggi, non è in grado di discriminare se uno o entrambi i gemelli siano affetti⁹⁷ tranne nei casi in cui la presenza di un'anomalia ecografica consenta un distinguo tra i feti.
- Uno dei principali fattori limitanti per l'applicazione del RHDO nei disturbi autosomici recessivi è che è necessario il genotipo di un precedente figlio affetto (probando). È possibile eseguire l'analisi senza probando ma avrebbe costi proibitivi.⁹⁷
- È bene sottolineare che la maggior parte dei test attualmente disponibili in Italia vengono proposti, in ambito privato, per lo screening diretto su cfDNA di varianti dominanti *de novo* o di varianti recessive e non come NIPD di specifiche varianti già note nei genitori e, pertanto, **se proposti in questo ambito, i NIPT presentano tutte le caratteristiche e limiti degli screening.**

I test offerti per **varianti dominanti *de novo*** indagano solo alcune tra le numerosissime possibili varianti patogenetiche dei geni causativi che, prese singolarmente, risultano essere rare o ultra-rare. In questi casi il VPP di un risultato positivo sarà molto basso e necessiterà di una diagnosi prenatale di conferma. In aggiunta, dopo un risultato negativo (assenza delle mutazioni indagate), il rischio residuo per patologie dominanti *de novo* rimarrà ancora consistente. Infine, data la rarità delle singole varianti, non è nota la sensibilità del test per ognuna di esse e, pertanto, un risultato 'normale' non fornirà la certezza dell'assenza della mutazione (valore predittivo negativo sconosciuto).

I test per **varianti recessive (autosomiche o X-linked)** non sono raccomandati se non è stato precedentemente identificato lo stato di portatore nei genitori. Come detto precedentemente, l'uso del NIPT per condizioni recessive in presenza di genitori portatori è diretto alla sola esclusione/conferma della variante di origine paterna. Tuttavia, il NIPT diretto su cfDNA con genotipo dei genitori/madre sconosciuto resta un test di screening e, conseguentemente, l'esclusione della



presenza delle varianti non potrà tranquillizzare la coppia a causa del valore predittivo negativo sconosciuto. La certezza dell'effettiva assenza potrà essere determinata solo con lo studio su materiale fetale ottenibile con procedure invasive (villocentesi o amniocentesi). Di contro, l'identificazione di una variante comporterebbe l'esecuzione dell'analisi dei genitori/madre in tutti i casi in cui non fosse stata eseguita precedentemente e, eventualmente, la necessità di eseguire una diagnosi prenatale invasiva per dirimere tra lo stato di portatore o di affetto. Inoltre, come per le AS, esiste la possibilità che l'estensione del NIPT per questo tipo di varianti genetiche, possa individuare la presenza di varianti genomiche a significato clinico incerto (VUS). La corretta valutazione delle VUS presenta, sia in caso di conferma con l'esame su materiale ottenuto da prelievo invasivo che sui genitori, difficoltà interpretative che rendono la consulenza genetica e il management clinico della gravidanza estremamente complesso.

In conclusione, **l'estensione del test NIPT per lo screening diretto su cfDNA delle patologie monogeniche resta al momento un percorso non raccomandato**. Per lo screening di patologie recessive, limitatamente a poche condizioni frequenti e clinicamente gravi, ha un valore clinico l'esecuzione del test del portatore sui futuri genitori, preferibilmente in epoca preconcezionale, piuttosto che l'analisi diretta non invasiva del cfDNA fetale.

Il NIPT per condizioni monogeniche dovrebbe essere limitato alle coppie note per essere portatrici di specifiche varianti patogenetiche recessive o, in casi estremamente selezionati, in cui le evidenze ecografiche fetali suggeriscono una specifica patologia monogenica causata da un numero ristretto (hot-spot) di varianti patogenetiche. Il test mirato alle singole varianti deve essere validato e le performance dichiarate. Si ricorda inoltre che **nei feti con anomalie congenite multiple la diagnosi prenatale invasiva che prevede l'esame del cariotipo e l'integrazione con CMA resta il percorso gold standard raccomandato da tutte le società scientifiche, inclusa SIGU**. Un NIPT condotto in questi casi, sia esso per varianti monogeniche che per anomalie cromosomiche, sarebbe ininfluenza per la gestione della gravidanza: un risultato positivo/alto rischio necessiterà infatti di conferma invasiva dato il VPP<100%; un risultato negativo non potrà fornire la certezza circa l'assenza delle anomalie genetiche indagate e non indagate dal test cosa, al contrario, possibile tramite l'analisi del DNA fetale puro prelevato in modo invasivo. **Il NIPT posporrebbe inutilmente la diagnosi, aumentando l'ansia e i costi per la coppia.**

11. Conclusioni

- 11.1. **Conferme dopo NIPT ad alto rischio:** a tutt'oggi le maggiori società scientifiche nazionali ed internazionali e le linee guida del Ministero della Salute (2015)⁸⁻¹³, hanno assunto posizioni per lo più concordanti sul ruolo dei NIPT, riconoscendone una chiara validità e utilità clinica¹⁴ limitatamente alle tre trisomie principali (T21, T18 e T13). Trattandosi di test di screening, la conferma di un risultato positivo (ad alto rischio) prevede l'esecuzione di un esame diagnostico di conferma appropriato, che, in epoca prenatale, può essere effettuato su campioni di liquido amniotico (LA) o villi coriali (CVS) prelevati mediante amniocentesi (AC) o villocentesi (VC). Nei casi in cui la gestante rifiuti l'opzione di eseguire una diagnosi prenatale invasiva, potrebbe essere valutata, in sede di consulenza genetica, la possibilità di eseguire test diagnostici di conferma in epoca postnatale. L'analisi del liquido amniotico consente di analizzare cellule prevalentemente di



origine fetale e risulta pertanto, un test informativo di prima scelta per le eventuali conferme dei NIPT positivi. La villocentesi, eseguibile da 11 settimane di gestazione, consente di ottenere un risultato più precocemente rispetto al LA ma, nella scelta, deve essere tenuta in considerazione la probabilità di mosaicismi placentari dopo NIPT ad alto rischio che richiederebbe un'ulteriore conferma mediante amniocentesi. Tale probabilità è correlata prevalentemente al tipo di aneuploidia per la quale il NIPT ha evidenziato un risultato ad alto rischio. Il NIPT e l'esame cromosomico a breve termine su villi coriali analizzano lo stesso tessuto placentare, il citotrofoblasto; per tale motivo, al fine di garantire la conferma diagnostica più completa ed

appropriata del risultato del NIPT, è importante che l'indagine citogenetica su VC sia condotta combinando il metodo diretto con quello della coltura a lungo termine;

- 11.2. **Consulenza pre- e post-test:** diverse sono le cause biologiche alla base della possibile discordanza tra il risultato del NIPT ed il reale assetto genomico del feto: mosaicismi feto-placentari, gemello riassorbito e anomalie nel genoma materno. È necessario offrire alla gestante un colloquio pre-test che deve fornire informazioni sui vantaggi e i limiti di questo tipo di screening, sulle le possibili cause di discordanza e sulle possibili alternative (sia diagnostiche che di screening). Un risultato ad alto rischio, soprattutto se diverso da T13, T18 e T21, va discusso, in sede di consulenza genetica post-test, per la valutazione del percorso più appropriato da seguire tenendo conto delle possibili cause di risultato falso positivo associate all'anomalia specifica identificata dal NIPT. Non necessariamente i casi positivi richiedono conferma prenatale invasiva; la scelta deve essere valutata caso per caso, in sede di consulenza genetica, alla luce del difetto per cui il NIPT ha dato un 'alto rischio', del quadro ecografico, della settimana di gestazione, delle correlazioni genotipo-fenotipo alla nascita e dell'orientamento della gestante;
- 11.3. **Esami diagnostici di conferma:** il tipo di esame diagnostico di conferma deve essere scelto in modo da risultare adeguato e appropriato nell'identificare l'anomalia individuata dal NIPT ed eseguito secondo i criteri stabiliti dalla versione corrente delle Linee Guida per l'Analisi Citogenetica e dal connesso Manuale Operativo per la Citogenetica Costituzionale della SIGU.^{27,28} Un test di conferma con un risultato normale, soprattutto su LA, deve essere considerato tranquillizzante sebbene non permetta di escludere con certezza la condizione di mosaico nel feto; in taluni casi (aneusomie segmentali, microdelezioni, XXX, 45,X, ...) la presenza dell'anomalia in questione potrebbe essere di origine materna. Un test di conferma su CVS con esito di mosaico non è conclusivo dello stato fetale e dovrebbe essere rimandato all'amniocentesi. Un test di conferma con risultato anormale e non concordante col NIPT potrebbe necessitare di ulteriori approfondimenti in base all'anomalia riscontrata. Nei casi ad alto rischio in cui la gestante rimandi l'eventuale conferma diagnostica all'epoca postnatale, la scelta degli esami più appropriati deve essere valutata, in sede di consulenza genetica, anche sulla base di una dettagliata valutazione clinica del neonato/bambino;
- 11.4. **Test inconclusivi o indicanti una sesso-discordanza:** nei casi in cui il test su primo prelievo risulti non conclusivo, è opportuno offrire alla gestante la possibilità di ripetere l'indagine su un secondo prelievo. In tutti i casi in cui il NIPT abbia dato un esito non informativo, anche dopo l'analisi di un secondo campione, è raccomandato proporre alla gestante un'ecografia ed una consulenza genetica allo scopo di valutare quale sia il percorso successivo più appropriato. Considerate le molteplici cause che possono sottendere ad un risultato non informativo, un tale riscontro, non è



necessariamente da intendersi rappresentativo di un effettivo aumentato rischio di anomalie fetali. La gestante deve essere informata che un fallimento del test, anche dopo ripetizione su un secondo campione, per bassa frazione fetale può essere associato ad un aumentato rischio di aneuploidie. Nei casi di sesso-discordanza vanno rivalutati sia i parametri tecnici di laboratorio sia l'anamnesi della paziente per escludere eventuali cause. Se la problematica permane, è opportuno valutare la possibilità di effettuare un'amniocentesi per dirimere tale discordanza.

- 11.5. **NIPT per condizioni monogeniche:** l'estensione del test NIPT per lo screening diretto su cfDNA delle patologie monogeniche resta al momento un percorso non raccomandato. Per lo screening di patologie recessive, limitatamente a poche condizioni frequenti e clinicamente gravi in epoca prenatale, ha un valore clinico l'esecuzione del test del portatore sui futuri genitori, preferibilmente in epoca pre-concezionale, piuttosto che l'analisi diretta non invasiva del cfDNA fetale. Il NIPT per condizioni monogeniche dovrebbe essere limitato alle coppie note per essere portatrici di varianti patogenetiche recessive o, in casi estremamente selezionati, quando le evidenze ecografiche fetali suggeriscono una specifica patologia monogenica causata da un numero ristretto (hot-spot) di varianti patogenetiche. Affinché la coppia comprenda soprattutto i limiti dell'analisi in tali circostanze di aumentato rischio e possa scegliere in modo consapevole tra diagnosi invasiva e test non invasivo, la consulenza pre-test è di fondamentale importanza. Il test mirato deve essere validato (almeno analiticamente)¹⁴ e le performance dichiarate per ognuna delle varianti indagate.

12. Bibliografia

1. Hooks J, Wolfberg AJ, Wang ET, Struble CA, Zahn J, Juneau K, Mohseni M, Huang S, Bogard P, Song K, Oliphant A, Musci TJ. Non-invasive risk assessment of fetal sex chromosome aneuploidy through directed analysis and incorporation of fetal fraction. *Prenat Diagn.* 2014 May;34(5):496-9.
2. Samango-Sprouse C, Banjevic M, Ryan A, Sigurjonsson S, Zimmermann B, Hill M, Hall MP, Westemeyer M, Saucier J, Demko Z, Rabinowitz M. SNP-based non-invasive prenatal testing detects sex chromosome aneuploidies with high accuracy. *Prenat Diagn.* 2013 Jul;33(7):643-9
3. Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, Marusiak B; Obstetrix Collaborative Research Network, Ehrich M, van den Boom D, Deciu C, Bombard A. Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Oct;211(4):365.e1-12.
4. Benn P. Expanding non-invasive prenatal testing beyond chromosomes 21, 18, 13, X and Y. *Clin Genet.* 2016 Dec;90(6):477-485.
5. Ehrich M, Tynan J, Mazloom A, Almasri E, McCullough R, Boomer T, Grosu D, Chibuk J. Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10 000 cases. *Genet Med* 2017; 19: 1332–1337.
6. Pertile MD, Halks-Miller M, Flowers N, Barbacioru C, Kinnings SL, Vavrek D, Seltzer WK, Bianchi DW. Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of feto-placental disease. *Sci Transl Med* 2017; 9: pii: eaan1240.
7. van der Meij KRM, Sistermans EA, Macville MVE, Stevens SJC, Bax CJ, Bekker MN, Bilardo CM, Boon EMJ, Boter M, Diderich KEM, de Die-Smulders CEM, Duin LK, Faas BHW, Feenstra I, Haak MC, Hoffer MJV, den Hollander NS, Hollink IHIM, Jehee FS, Knapen MFCM, Kooper AJA, van Langen IM,



- Lichtenbelt KD, Linskens IH, van Maarle MC, Oepkes D, Pieters MJ, Schuring-Blom GH, Sikkel E, Sikkema-Raddatz B, Smeets DFCM, Srebniak MI, Suijkerbuijk RF, Tan-Sindhunata GM, van der Ven AJEM, van Zelderen-Bhola SL, Henneman L, Galjaard RH, Van Opstal D, Weiss MM; Dutch NIPT Consortium. TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands. *Am J Hum Genet.* 2019 Dec 5;105(6):1091-1101.
8. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, Klugman S, Watson MS. *Genet Med.* 2016 Oct;18(10):1056-65. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics.
 9. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM). Electronic address: pubs@smfm.org, Norton ME, Biggio JR, Kuller JA, Blackwell SC. The role of ultrasound in women who undergo cell-free DNA screening. *Am J Obstet Gynecol.* 2017 Mar;216(3):B2-B7.
 10. Benn P, Borrell A, Chiu RW, Cuckle H, Dugoff L, Faas B, Gross S, Huang T, Johnson J, Maymon R, Norton M, Odibo A, Schielen P, Spencer K, Wright D, Yaron Y. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn.* 2015 Aug;35(8):725-34.
 11. Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, Bianchi DW, Bergmann C, Borry P, Chitty LS, Fellmann F, Forzano F, Hall A, Henneman L, Howard HC, Lucassen A, Ormond K, Peterlin B, Radojkovic D, Rogowski W, Soller M, Tibben A, Tranebjærg L, van El CG, Cornel MC; European Society of Human Genetics; American Society of Human Genetics. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1438-50.
 12. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Publications Committee. #36: Prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA. Electronic address: pubs@smfm.org. *Am J Obstet Gynecol.* 2015. PMID: 25813012
 13. Ministero della Salute, Consiglio Superiore di Sanità, Sezione I. Linee-Guida Screening prenatale non invasivo basato sul DNA (Non Invasive Prenatal Testing – NIPT). http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2381_allegato.pdf
 14. Genomics & Precision Health, ACCE Model Process for Evaluating Genetic Tests <https://www.cdc.gov/genomics/gtesting/acce/index.htm>
 15. 'Condizioni di erogabilità e indicazioni di appropriatezza prescrittiva delle prestazioni di assistenza ambulatoriale erogabili nell'ambito del Servizio Sanitario Nazionale' <http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/dettaglioAtto?id=53949>
 16. Grati FR, Malvestiti F, Ferreira JC, Bajaj K, Gaetani E, Agrati C, Grimi B, Dulcetti F, Ruggeri AM, De Toffol S, Maggi F, Wapner R, Gross S, Simoni G. Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results. *Genet Med.* 2014 Aug;16(8):620-4
 17. Thurik FF, Ait Soussan A, Bossers B, Woortmeijer H, Veldhuisen B, Page-Christiaens GC, de Haas M, van der Schoot CE. Analysis of false-positive results of fetal RHD typing in a national screening program reveals vanishing twins as potential cause for discrepancy. *Prenat Diagn.* 2015 Aug;35(8):754-60.



18. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, Kirkizlar E, Stosic M, Hall MP, Sigurjonsson S, Demko Z, Rabinowitz M, Gross SJ. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 Jan;212(1):79.e1-9.
19. Niles KM, Murji A, Chitayat D. Prolonged duration of persistent cell-free fetal DNA from vanishing twin. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018 Oct;52(4):547-548.
20. Galeva S, Gil MM, Konstantinidou L, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in singleton and twin pregnancies: factors affecting test failure. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019 Jun;53(6):804-809
21. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013 Jan;41(1):26-32
22. Hui L, Bianchi DW. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know. *Prenat Diagn.* 2020 Jan;40(2):155-163
23. Bianchi DW. Cherchez la femme: maternal incidental findings can explain discordant prenatal cell-free DNA sequencing results. *Genet Med.* 2018 Sep;20(9):910-917. doi: 10.1038/gim.2017.219.
24. Wang Y, Chen Y, Tian F, Zhang J, Song Z, Wu Y, Han X, Hu W, Ma D, Cram D, Cheng W. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clin Chem.* 2014 Jan;60(1):251-9.
25. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, Zhu Z, Lin M, Liu Q, Tian Z, Zhang H, Chen F, Lau TK, Zhao L, Yi X, Yin Y, Wang W. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146,958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 May;45(5):530-8.
26. Dar P, Curnow KJ, Gross SJ, Hall MP, Stosic M, Demko Z, Zimmermann B, Hill M, Sigurjonsson S, Ryan A, Banjevic M, Kolacki PL, Koch SW, Strom CM, Rabinowitz M, Benn P. Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Nov;211(5):527.e1-527.e17.
27. LINEE GUIDA PER LA DIAGNOSI CITOGENETICA 2013 a cura del Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU <https://www.sigu.net/show/documenti/5/1/?page=4#!>
28. LINEE GUIDA PER LA DIAGNOSI CITOGENETICA, Sezione NOTE OPERATIVE CITOGENETICA COSTITUZIONALE 2013 <https://www.sigu.net/show/documenti/5/1/?page=4#!>
29. Raccomandazioni Congiunte SIGU (Società Italiana Genetica Umana) - SIEOG (Società Italiana di Ecografia Ostetrico-Ginecologica) sull'uso degli array in diagnosi prenatale. [https://www.sigu.net/go/teras/Uf-HISD-qK74WIAFTx7QPiv61ySAhKuVuFTCzwcY/Raccomandazioni%20Congiunte%20SIGU%20\(Società%20Italiana%20Genetica%20Umana\)%20-%20SIEOG%20\(Società%20Italiana%20di%20Ecografia%20Ostetrico-Ginecologica\)%20sull'uso%20degli%20array%20in%20diagnosi%20prenatale](https://www.sigu.net/go/teras/Uf-HISD-qK74WIAFTx7QPiv61ySAhKuVuFTCzwcY/Raccomandazioni%20Congiunte%20SIGU%20(Società%20Italiana%20Genetica%20Umana)%20-%20SIEOG%20(Società%20Italiana%20di%20Ecografia%20Ostetrico-Ginecologica)%20sull'uso%20degli%20array%20in%20diagnosi%20prenatale).
30. Claussen U, Schäfer H, Trampisch HJ. Exclusion of chromosomal mosaicism in prenatal diagnosis. *Hum Genet.* 1984;67(1):23-8.
31. Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet.* 1977 Jan;29(1):94-7.
32. Benn P, Malvestiti F, Grimi B, Maggi F, Simoni G, Grati FR. Rare autosomal trisomies: comparison of detection through cell-free DNA analysis and direct chromosome preparation of chorionic villus samples. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019 Oct;54(4):458-467.



33. Bunnell M, Zhang C, Lee C, Bianchi DW, Wilkins-Haug L. Confined placental mosaicism for 22q11.2 deletion as the etiology for discordant positive NIPT results. *Prenat Diagn.* 2017 Apr;37(4):416-419.
34. Gu S, Jernegan M, Van den Veyver IB, Peacock S, Smith J, Berman A. Chromosomal microarray analysis on uncultured chorionic villus sampling can be complicated by confined placental mosaicism for aneuploidy and microdeletions. *Prenat Diagn.* 2018 Oct;38(11):858-865.
35. Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Pompili E, Izzi C, Martinoni L, Gaetani E, Liuti MR, Trotta A, Maggi F, Simoni G, Grati FR. Interpreting mosaicism in chorionic villi: results of a monocentric series of 1001 mosaics in chorionic villi with follow-up amniocentesis. *Prenat Diagn.* 2015 Nov;35(11):1117-27.
36. Vejerslev LO, Mikkelsen M. The European collaborative study on mosaicism in chorionic villus sampling: data from 1986 to 1987. *Prenat Diagn* 1989;9:575-88.
37. Ledbetter DH, Zachary JM, Simpson JL, et al. Cytogenetic results from the U.S. collaborative study on CVS. *Prenat Diagn* 1992;12:317-45.
38. Medical Research Council working party on the evaluation of chorionic villus sampling. Medical Research Council European trial of chorionic villus sampling. *Lancet* 1991;337:1491-99.
39. Association of Clinical Cytogeneticists Working Party on Chorionic Villi in Prenatal Diagnosis. Cytogenetic analysis of chorionic villi for prenatal diagnosis: an ACC collaborative study of UK data. *Prenat Diagn* 1994;14:363-79.
40. Grati FR, Bajaj K, Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Malvestiti B, Pompili E, Maggi F, Gross S, Simoni G, Ferreira JC. The type of fetoplacental aneuploidy detected by cfDNA testing may influence the choice of confirmatory diagnostic procedure. *Prenat Diagn.* 2015 Oct;35(10):994-8.
41. Grati FR, Bajaj K, Zanatta V, Malvestiti F, Malvestiti B, Marcato L, Grimi B, Maggi F, Simoni G, Gross SJ, Ferreira J. Implications of fetoplacental mosaicism on cell-free DNA testing for sex chromosome aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2017 Oct;37(10):1017-1027.
42. Yaron Y, Jani J, Schmid M, Oepkes D. Current Status of Testing for Microdeletion Syndromes and Rare Autosomal Trisomies Using Cell-Free DNA Technology. *Obstet Gynecol.* 2015 Nov;126(5):1095-9.
43. Petersen AK, Cheung SW, Smith JL, Bi W, Ward PA, Peacock S, Braxton A, Van Den Veyver IB, Berman AM. Positive predictive value estimates for cell-free noninvasive prenatal screening from data of a large referral genetic diagnostic laboratory. *Am J Obstet Gynecol.* 2017 Dec;217(6):691.e1-691.e6.
44. Di Renzo GC, Bartha JL, Bilardo CM. Expanding the indications for cell-free DNA in the maternal circulation: clinical considerations and implications. *Am J Obstet Gynecol.* 2019 Jun;220(6):537-542.
45. Jani JC, Gil MM, Benachi A, Prefumo F, Kagan KO, Tabor A, Bilardo CM, Di Renzo GC, Nicolaides KH. Genome-wide cfDNA testing of maternal blood. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2020 Jan;55(1):13-14.
46. Benn P, Grati FR, Ferreira J. Response to Sistermans et al. *Genet Med.* 2019 Nov 4. doi: 10.1038/s41436-019-0687-7.
47. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, Klugman S, Watson MS. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016 Oct;18(10):1056-65.
48. Gardner, R.J.M. et al. (2011) *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. 4th edition. Oxford University Press
49. Grati FR, Ferreira J, Benn P, Izzi C, Verdi F, Vercellotti E, Dalpiaz C, D'Ajello P, Filippi E, Volpe N, Malvestiti F, Maggi F, Simoni G, Frusca T, Cirelli G, Bracalente G, Re AL, Surico D, Ghi T, Prefumo F.



- Outcomes in pregnancies with a confined placental mosaicism and implications for prenatal screening using cell-free DNA. *Genet Med.* 2020 Feb;22(2):309-316.
50. Amor DJ, Neo WT, Waters E, Heussler H, Pertile M, Halliday J. Health and developmental outcome of children following prenatal diagnosis of confined placental mosaicism. *Prenat Diagn.* 2006 May;26(5):443-8.
 51. Benn P, Ferreira J, Grati FR. Response to Toutain et al. *Genet Med.* 2020 Feb;22(2):444-445.
 52. Toutain J, Horovitz J, Saura R. Type 3 confined placental mosaicisms excluding trisomies 16 are also associated with adverse pregnancy outcomes. *Genet Med.* 2019; <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0664-1>.
 53. Benn P, Grati FR, Ferreira J. Response to Sistermans et al. *Genet Med.* 2019 Nov 4. doi: 10.1038/s41436-019-0687-7.
 54. de Wergifosse S, Bevilacqua E, Mezela I, El Haddad S, Gounongbe C, de Marchin J, Maggi V, Conotte S, Badr DA, Fils JF, Guizani M, Jani JC. Cell-free DNA analysis in maternal blood: comparing genome-wide versus targeted approach as a first-line screening test. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019 Nov 13:1-10.
 55. van der Meij KRM, Sistermans EA, Macville MVE, Stevens SJC, Bax CJ, Bekker MN, Bilardo CM, Boon EMJ, Boter M, Diderich KEM, de Die-Smulders CEM, Duin LK, Faas BHW, Feenstra I, Haak MC, Hoffer MJV, den Hollander NS, Hollink IHIM, Jehes FS, Knapen MFCM, Kooper AJA, van Langen IM, Lichtenbelt KD, Linskens IH, van Maarle MC, Oepkes D, Pieters MJ, Schuring-Blom GH, Sikkel E, Sikkema-Raddatz B, Smeets DFCM, Srebniak MI, Suijkerbuijk RF, Tan-Sindhunata GM, van der Ven AJEM, van Zelderen-Bhola SL, Henneman L, Galjaard RH, Van Opstal D, Weiss MM; Dutch NIPT Consortium. TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands. *Am J Hum Genet.* 2019 Dec 5;105(6):1091-1101.
 56. Benn P, Grati FR. Genome-wide non-invasive prenatal screening for all cytogenetically visible imbalances. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018 Apr;51(4):429-433.
 57. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ, Bhatt S, Murray K, Prosen TL, Garber JE, Wilkins-Haug L, Vora NL, Warsof S, Goldberg J, Ziainia T, Halks-Miller M. Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies. *JAMA.* 2015 Jul 14;314(2):162-9.
 58. Grati FR, Maggi F, Simoni G. Unexpected results of non-invasive prenatal testing: are they all so unexpected? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016 Jan;47(1):125-6.
 59. Bianchi DW. Pregnancy: Prepare for unexpected prenatal test results. *Nature.* 2015 Jun 4;522(7554):29-30.
 60. Dharajiya NG, Grosu DS, Farkas DH, McCullough RM, Almasri E, Sun Y, Kim SK, Jensen TJ, Saldivar JS, Topol EJ, van den Boom D, Ehrich M. Incidental Detection of Maternal Neoplasia in Noninvasive Prenatal Testing. *Clin Chem.* 2018 Feb;64(2):329-335.
 61. Snyder HL, Curnow KJ, Bhatt S, Bianchi DW. Follow-up of multiple aneuploidies and single monosomies detected by noninvasive prenatal testing: implications for management and counseling. *Prenat Diagn.* 2016 Mar;36(3):203-9.
 62. Ji X, Li J, Huang Y, Sung PL, Yuan Y, Liu Q, Chen Y, Ju J, Zhou Y, Huang S, Chen F, Han Y, Yuan W, Fan C, Zhao Q, Wu H, Feng S, Liu W, Li Z, Chen J, Chen M, Yao H, Zeng L, Ma T, Fan S, Zhang J, Yuen KY, Cheng SH, Chik IWS, Liu NT, Zhu J, Lin S, Cao J, Tong S, Shan Z, Li W, Hekmat MR, Garshasbi M, Suela J, Torres Y, Cigudosa JC, Ruiz FJP, Rodríguez L, García M, Bernik J, Traven E, Reš U, Tul N, Tseng CF,



- Zhao D, Sun L, Pan Q, Shen L, Dai M, Wang Y, Wang J, Yang H, Yin Y, Duan T, Zhu B, Choolani M, Jin X, Chen Y, Mao M. Identifying occult maternal malignancies from 1.93 million pregnant women undergoing noninvasive prenatal screening tests. *Genet Med*. 2019 Oct;21(10):2293-2302.
63. Benn P, Plon SE, Bianchi DW. Current Controversies in Prenatal Diagnosis 2: NIPT results suggesting maternal cancer should always be disclosed. *Prenat Diagn*. 2019 Apr;39(5):339-343.
64. Salani R, Billingsley CC, Crafton SM. Cancer and pregnancy: an overview for obstetricians and gynecologists. *Am J Obstet Gynecol*. 2014 Jul;211(1):7-14.
65. Carlson LM, Hardisty E, Coombs CC, Vora NL. Maternal Malignancy Evaluation After Discordant Cell-Free DNA Results. *Obstet Gynecol*. 2018 Mar;131(3):464-468.
66. Grati FR, Kagan KO. Rate of no result in cell-free DNA testing and its influence on test performance metrics. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017 Jul;50(1):134-137
67. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, Nelson SF, Canick JA. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med*. 2011 Nov;13(11):913-20
68. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn*. 2013 Jul;33(7):667-74
69. Schmid M, White K, Stokowski R, Miller D, Bogard PE, Valmeekam V, Wang E. Accuracy and reproducibility of fetal-fraction measurement using relative quantitation at polymorphic loci with microarray. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018 Jun;51(6):813-817
70. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Oct 21;105(42):16266-71
71. Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem* 2014;60(1):243-50
72. Nygren AO, Dean J, Jensen TJ, Kruse S, Kwong W, van den Boom D, Ehrich M. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. *Clin Chem* 2010;56(10):1627-35
73. Yu SC, Chan KC, Zheng YW, Jiang P, Liao GJ, Sun H, et al. Size-based molecular diagnostics using plasmaDNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(23):8583-8
74. Kim SK, Hannum G, Geis J, Tynan J, Hogg G, Zhao C, et al. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat Diagn* 2015;35:810-5
75. Straver R, Oudejans CB, Sistermans EA, Reinders MJT. Calculating the fetal fraction for noninvasive prenatal testing based on genome-wide nucleosome profiles. *Prenat Diagn* 2016;36:614-21
76. Chan KC, Jiang P, Sun K, Cheng YK, Tong YK, Cheng SH, et al. Second generation noninvasive fetal genome analysis reveals de novo mutations, single-base parental inheritance, and preferred DNA ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E8159-68
77. Peng XL, Jiang P. Bioinformatics approaches for fetal DNA fraction estimation in non invasive prenatal testing. *Int J Mol Sci*. 2017;18: 453-462.
78. Yaron Y. The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon. *Prenat Diagn*. 2016;36: 391-396



79. Revello R, Sarno L, Ispas A, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016 Jun;47(6):698-704.
80. Sarno L, Revello R, Hanson E, Akolekar R, Nicolaides KH. Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016 Jun;47(6):705-11
81. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Mar;45(3):249-66.
82. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med.* 2015;372(17): 1589-1597.
83. Pergament E, Cuckle H, Zimmermann B, et al. Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. *Obstet Gynecol.* 2014;124:210-218.
84. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative? *Prenat Diagn.* 2015;35:289-293.
85. Dugoff L, Barberio A, Whittaker PG, Schwartz N, Sehdev H, Bastek JA. Cell-free DNA fetal fraction and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(2):231.e1-231.e7.
86. Rafaeli-Yehudai T, Imterat M, Douvdevani A, et al. Maternal total cellfree DNA in preeclampsia and fetal growth restriction: evidence of differences in maternal response to abnormal implantation. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200360.
87. Poon LC, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagn Ther.* 2013;33(4):215-223.
88. Rolnik DL, O'Gorman N, Fiolna M, van den Boom D, Nicolaides KH, Poon LC. Maternal plasma cell-free DNA in the prediction of preeclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):106-111.
89. Dondorp W, De Wert G, Pennings G, Shenfield F, Devroey P, Tarlatzis B, Barri P, Diedrich K. ESHRE Task Force on ethics and Law 20: sex selection for non-medical reasons. *Hum Reprod* 2013; 28: 1448–1454
90. Wright CF, Wei Y, Higgins JP, Sagoo GS. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res Notes* 2012; 5: 476
91. Hill M, Lewis C, Jenkins L, Allen S, Elles RG, Chitty LS. Implementing noninvasive prenatal fetal sex determination using cell-free fetal DNA in the United Kingdom. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: S119–126
92. Avent ND, Chitty LS. Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound. *Prenat Diagn* 2006; 26: 598–603
93. BianchiDW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP, MaternalBlood IS Source to Accurately diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012; 119: 890–901
94. Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, Marusiak B, Obstetrix Collaborative Research Network, Ehrich M, van den Boom D, Deciu C, Bombard A. Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am J Obstet Gynecol* 2014; 211: 365.e1-12



Società Italiana di Genetica Umana
Italian Society of Human Genetic



SIGO
SOCIETÀ ITALIANA
DI GINECOLOGIA E OSTETRICIA



95. Villela D, Che H, Van Ghelue M, Dehaspe L, Brison N, Van Den Bogaert K, Devriendt K, Lewi L, Bayindir B, Vermeesch JR. Fetal sex determination in twin pregnancies using non-invasive prenatal testing. NPJ Genom Med. 2019 Jul 4;4:15
96. Grati FR. Implications of fetoplacental mosaicism on cell-free DNA testing: a review of a common biological phenomenon. Ultrasound Obstet Gynecol. 2016 Oct;48(4):415-423
97. Hayward J, Chitty LS. Beyond screening for chromosomal abnormalities: Advances in non-invasive diagnosis of single gene disorders and fetal exome sequencing. Semin Fetal Neonatal Med. 2018 Apr;23(2):94-101.



13. Tabelle

Tabella 1: Riassunto schematico dei differenti tipi di mosaicismo fetto-placentare

Natura del mosaicismo	tipo di mosaicismo	CITOTROFOBLASTO°	MESENCHIMA	AMNIOCITI	Risultato NIPT atteso
Mosaicismo	CPM1	ANORMALE	Normale	Normale	Falso Positivo
Confinato alla Placenta (CPM)	CPM2	Normale	ANORMALE	Normale	Vero Negativo
	CPM3	ANORMALE	ANORMALE	Normale	Falso Positivo
Mosaicismo Fetale Vero (TFM)	TFM4	ANORMALE	Normale	ANORMALE	Vero Positivo*
	TFM5	Normale	ANORMALE	ANORMALE	Falso Negativo
	TFM6	ANORMALE	ANORMALE	ANORMALE	Vero Positivo*

° In grassetto la costituzione del tessuto da cui origina il cfDNA; *Assumendo che l'anomalia sia sufficientemente rappresentata da poter essere rilevata dal NIPT

Tabella 2: Probabilità di mosaicismo nel CVS per le principali aneuploidie

ANEUPLOIDIA	RISCHIO DI MOSAICISMO NEL VILLO CORIALE
T21	2%
T18	4%
T13*	22%
Monosomia X*	70%
Monosomia X^	2%
XXX	≈4%
XXY	≈4%
XYY	≈8%

*ecografia normale; ^ecografia anormale



Tabella 3: Fattori biologici che influenzano la Frazione Fetale ^{21-23,67,68,79,80}

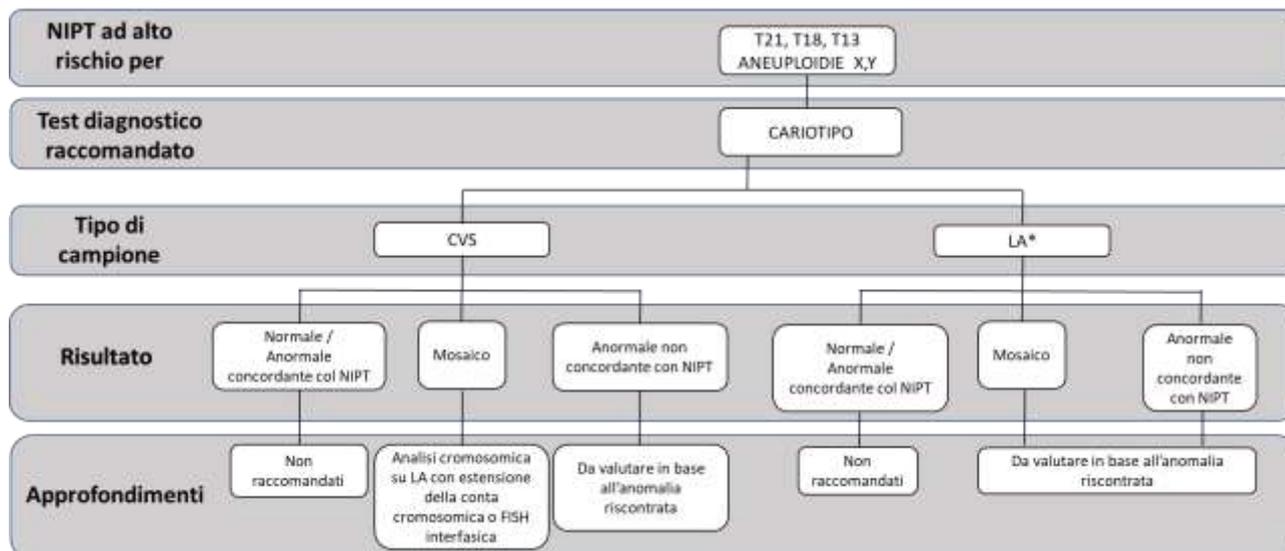
	Effetti sulla FF
Fattori feto-placentari	
Epoca gestazionale	Incremento con l'avanzare dell'epoca gestazionale
CRL	Incremento all'aumentare del CRL
Mosaicismo T16	Più bassa se presente
Triploidia	Più bassa se presente
Aneuploidie	Variabile a seconda dell'anomalia (es: più bassa per T13, T18)
Gravidanza multipla	Maggiore FF totale ma decremento di quella parziale di ciascun feto
Fattori materni	
Peso	Più bassa maggiore è il peso materno
Età materna	Più bassa maggiore è l'età materna
PMA	Più bassa se utilizzate tecniche di riproduzione assistita
Gravidanze pregresse	Più bassa per le nullipare rispetto alle donne con precedenti gravidanze
Malattia autoimmune	Più bassa con malattia in fase acuta
Malattie infiammatorie (es:Lupus, carenza B12)	Più bassa se presente
PAPP-A	Incremento con corrispondente aumento della PAPP-A
Free β -HCG	Incremento con corrispondente aumento delle free β -HCG
Etnia	Variabile (es: più alta nelle caucasiche – più bassa nelle africane e asiatiche)
Eparina a basso peso molecolare	Possibile decremento se in uso

CRL=lunghezza cranio caudale ('Crown Rump Length'); PAPP-A= Proteina Plasmatica Associata alla gravidanza; Free β -HCG= subunità beta libera della Gonadotropina Corionica Umana; PMA= Procreazione Medicalmente Assistita



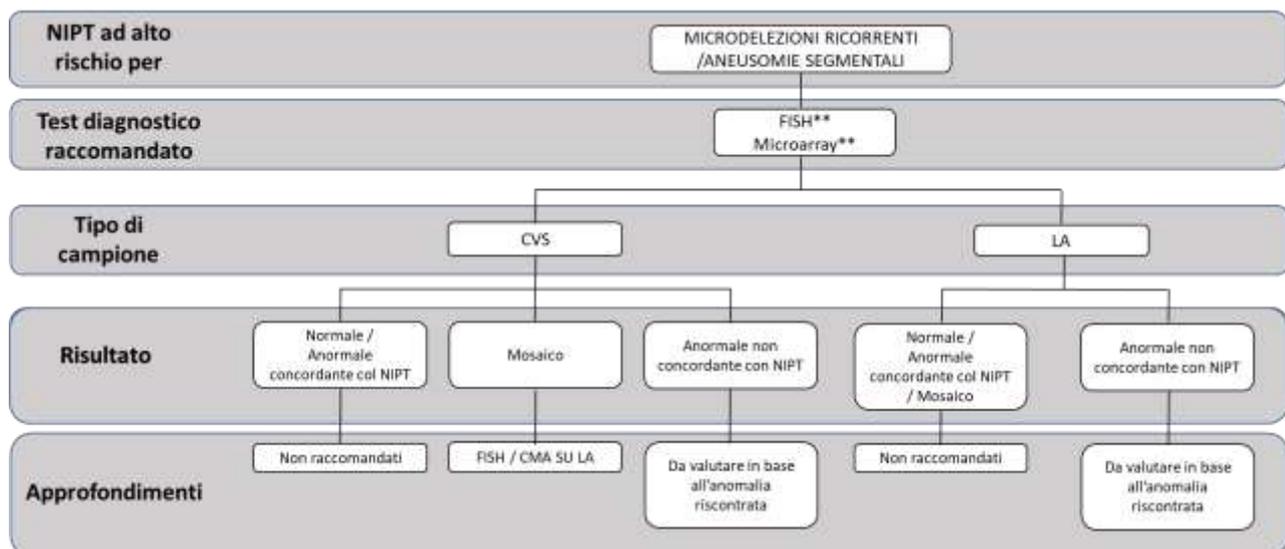
14. Grafici

Grafico 1: Test diagnostici di conferma fetale in epoca prenatale dopo NIPT con risultato ad alto rischio per T21,18,13 e aneuploidie X/Y[^]



CVS: villi coriali; LA: liquido amniotico; *Appropriato condurre analisi come a seguito di riscontro di mosaicismo su VC; ^Per TR: vedi paragrafo specifico

Grafico 2: Test diagnostici di conferma fetale in epoca prenatale dopo NIPT con risultato ad alto rischio per microdelezioni ricorrenti e aneusomie segmentali



CVS: villi coriali; LA: liquido amniotico; **i laboratori devono accertarsi che la regione genomica da analizzare sia adeguatamente coperta dalle sonde FISH o dal disegno della piattaforma microarray utilizzati



Grafico 3: Test diagnostici di conferma in epoca postnatale sul probando dopo NIPT con risultato ad alto rischio per T21,18,13,TR

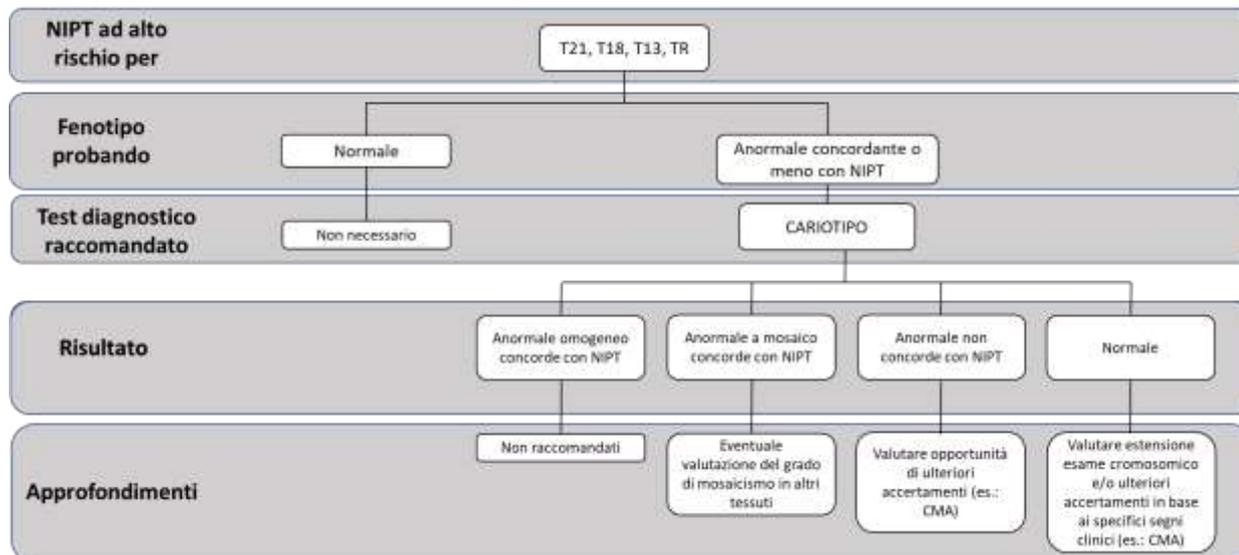


Grafico 4: Test diagnostici di conferma in epoca postnatale sul probando dopo NIPT con risultato ad alto rischio per aneuploidie X/Y

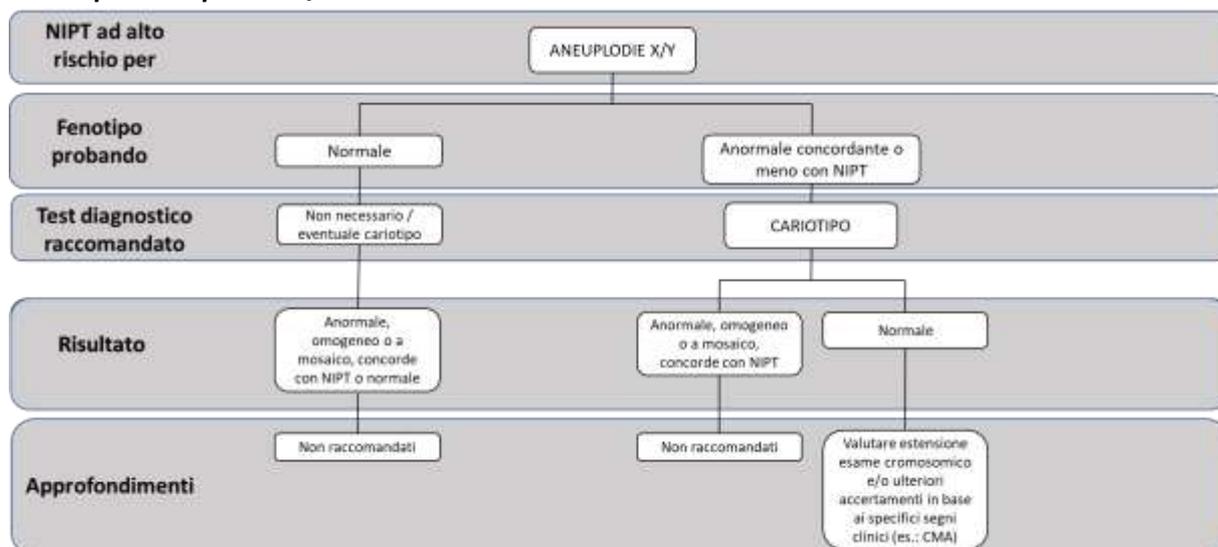




Grafico 5: Test diagnostici di conferma in epoca postnatale sul probando dopo NIPT con risultato ad alto rischio per microdelezioni ricorrenti e aneusomie segmentali

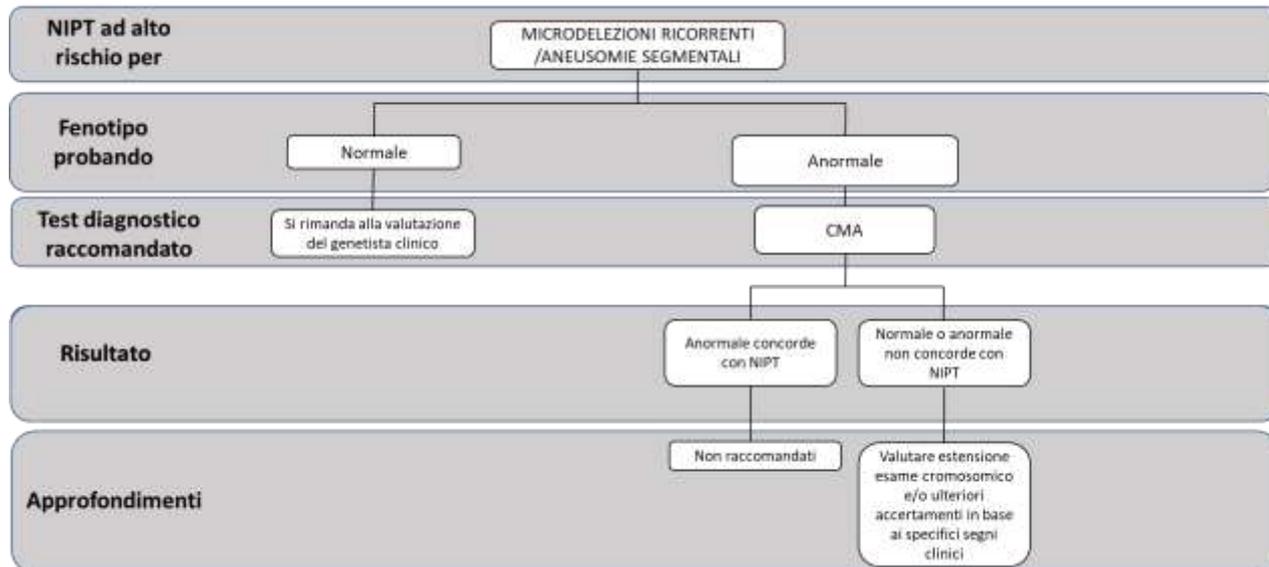


Grafico 6: Test diagnostici di conferma in epoca postnatale sul probando dopo NIPT con risultato non informativo

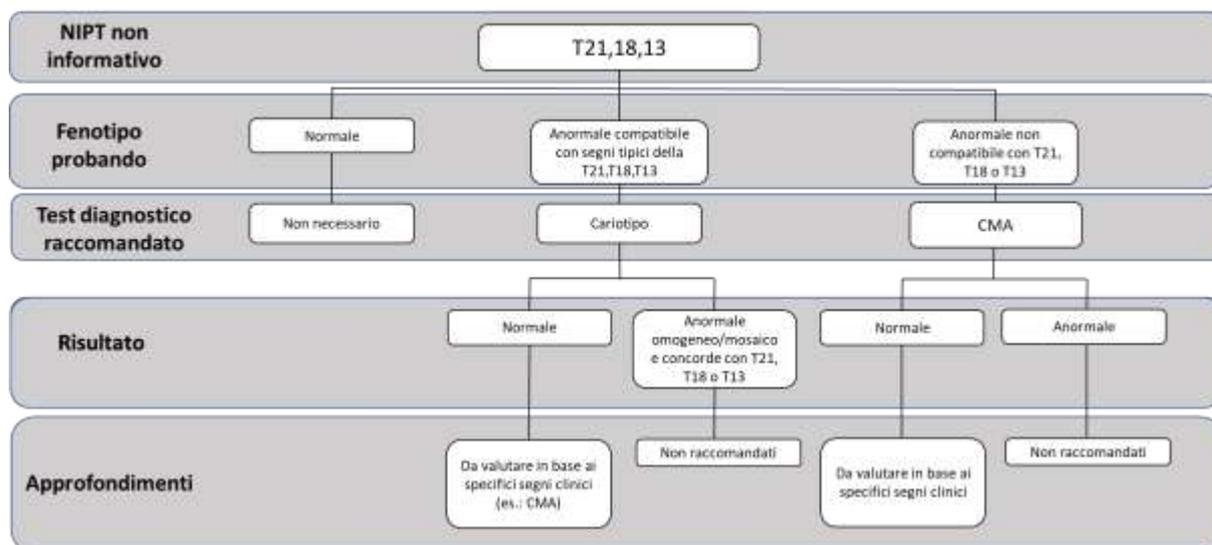




Grafico 7: Test diagnostici di conferma in epoca postnatale sul probando dopo NIPT con risultato non informativo per le sole aneuploidie X/Y

