

**Rev. 01 Del 07/06/2018**

## **DIAGNOSI PRENATALE NON INVASIVA MEDIANTE ANALISI DEL DNA FETALE DAL SANGUE MATERNO**

### **FINALITÀ DEL TEST PRENATALSAFE®**

**PrenatalSAFE®** è un esame prenatale non invasivo che, analizzando il DNA fetale libero circolante isolato da un campione di sangue materno, valuta la presenza di aneuploidie fetali comuni in gravidanza, quali quelle relative al cromosoma 21 (Sindrome di Down), al cromosoma 18 (Sindrome di Edwards), al cromosoma 13 (Sindrome di Patau) e dei cromosomi sessuali (X e Y), quali per esempio la Sindrome di Turner o Monosomia del cromosoma X. Il test prevede anche un livello di approfondimento che consente di valutare aneuploidie e alterazioni cromosomiche strutturali fetali a carico di ogni cromosoma, con risultati molto simili all'analisi del cariotipo fetale mediante tecniche invasive di diagnosi prenatale.

Il test **PrenatalSAFE® 3** valuta le aneuploidie dei cromosomi 21, 18, 13, e comprende la determinazione del sesso fetale (opzionale).

Il test **PrenatalSAFE® 5** valuta le aneuploidie dei cromosomi 21, 18, 13 e dei cromosomi sessuali (X e Y), e comprende la determinazione del sesso fetale (opzionale).

Il test **PrenatalSAFE® Plus** valuta, oltre alle aneuploidie dei cromosomi 21, 18, 13 e dei cromosomi sessuali (X e Y), anche la trisomia dei cromosomi 9 e 16 (opzionale) e consente di individuare la presenza nel feto di alterazioni cromosomiche strutturali submicroscopiche, quali alcune comuni sindromi da microdelezione. L'esame comprende inoltre la determinazione del sesso fetale (opzionale).

Il test **PrenatalSAFE® Karyo**, invece, consente di rilevare aneuploidie e alterazioni cromosomiche strutturali fetali a carico di ogni cromosoma, con risultati molto simili alla determinazione del cariotipo fetale eseguito con tecniche invasive di diagnosi prenatale. L'esame comprende la determinazione del sesso fetale (opzionale).

Il test **PrenatalSAFE® Karyo Plus** rappresenta un'evoluzione del test **PrenatalSAFE® Karyo**, e aggiunge alle potenzialità di **PrenatalSAFE® Karyo** la possibilità di individuare la presenza nel feto di alterazioni cromosomiche strutturali submicroscopiche, quali alcune comuni sindromi da microdelezione. L'esame comprende la determinazione del sesso fetale (opzionale).

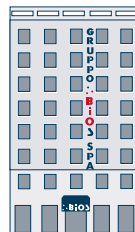
Il test **PrenatalSAFE® Complete** rappresenta un'evoluzione dei test di screening prenatale non invasivi e aggiunge alle potenzialità del **PrenatalSAFE® Karyo** la possibilità di individuare nel feto gravi malattie genetiche, a trasmissione ereditaria (es. Fibrosi Cistica, Beta Talassemia, etc.) o ad insorgenza de novo (es. Acondroplasia, Ipocondroplasia, Sindrome di Noonan, Craniosinostosi, etc.). Il test **PrenatalSAFE® Complete**, costituito dall'unione del test **PrenatalSAFE® Karyo** o **PrenatalSAFE® Karyo Plus** con il test **GeneSAFE® Complete**, fornisce il più approfondito livello d'informazione ottenibile in gravidanza mediante un test di screening prenatale non invasivo.

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

### **ANEUPLOIDIE CROMOSOMICHE VALUTATE DAL TEST PRENATALSAFE®**

**TRISOMIA 21:** È causata dalla presenza di una copia in più del cromosoma 21 ed è anche conosciuta come Sindrome di Down. È la causa genetica più comune di ritardo mentale. Si stima che la trisomia 21 sia presente in 1/700 nati.

**TRISOMIA 18:** È causata dalla presenza di una copia in più del cromosoma 18. Conosciuta anche come Sindrome di Edwards, si associa a una elevata abortività. È causa di grave ritardo mentale. Neonati affetti da trisomia 18 hanno spesso difetti cardiaci congeniti, nonché altre condizioni



patologiche che riducono la loro aspettativa di vita. Si stima che la trisomia 18 sia presente in 1/5.000 nati.

**TRISOMIA 13:** È causata dalla presenza di una copia in più del cromosoma 13. Nota anche come Sindrome di Patau, si associa a elevata abortività. Neonati affetti da trisomia 13 hanno numerosi difetti cardiaci e altre condizioni patologiche. La sopravvivenza oltre l'anno di età è rara. Si stima che la trisomia 13 sia presente in 1/16.000 nati.

**ANEUPLOIDIE DEI CROMOSOMI SESSUALI:** PrenatalSAFE® analizza le sequenze dei cromosomi X e Y, fornendo informazioni in merito al sesso fetale e alle aneuploidie dei cromosomi X, Y. Le aneuploidie dei cromosomi sessuali riscontrabili con il test sono le seguenti:

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

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

**PrenatalSAFE® Plus** è inoltre in grado di evidenziare la trisomia dei cromosomi 9 e 16 (test opzionale), che nella forma completa è incompatibile con la vita ed esita generalmente in aborti spontanei. Le forme a mosaico possono generare sopravvivenza postnatale.

Il test **PrenatalSAFE® Karyo**, oltre alle aneuploidie cromosomiche comuni in gravidanza, consente di rilevare aneuploidie su tutti i cromosomi.

## ESEMPI DI ANEUPLOIDIE CROMOSOMICHE MENO FREQUENTI RILEVABILI CON PRENATALSAFE® KARYO

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

\* A maggiore incidenza tra le aneuploidie fetali meno frequenti.

## ALTERAZIONI CROMOSOMICHE STRUTTURALI (DELEZIONI E DUPLICAZIONI SEGMENTALI) VALUTATE DAL TEST PRENATALSAFE® KARYO

Con il **PrenatalSAFE® Karyo**, è possibile individuare anche alterazioni di struttura dei cromosomi (rilevabili su tutti i cromosomi).

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

1. Le **delezioni**, che consistono nella perdita di un segmento di un cromosoma, che può essere terminale o interstiziale. Di solito le sindromi da delezione interessano segmenti relativamente grandi di cromosoma (> 10 Mb = Megabasi).
2. Le **uplicazioni** consistono nella presenza di due copie di un segmento di cromosoma, e pertanto costituiscono delle trisomie parziali.
3. Le **traslocazioni sbilanciate**, originano dalla rottura di due o, raramente, di più cromosomi, con perdita o acquisizione di materiale cromosomico.

## SINDROMI DA MICRODELEZIONE VALUTATE DAL TEST PRENATALSAFE® PLUS

**PrenatalSAFE® Plus** prevede anche la possibilità (opzionale) di eseguire un approfondimento di secondo livello, che consente di individuare la presenza nel feto di 6 tra le più comuni sindromi da microdelezione.

Le sindromi da microdelezione sono anomalie cromosomiche caratterizzate dalla perdita (microdelezione) di un tratto cromosomico di piccole dimensioni e, di conseguenza, dei geni localizzati su quel frammento cromosomico.

Queste alterazioni causano sindromi di importanza clinica variabile a seconda del cromosoma coinvolto, della regione cromosomica interessata e delle relative dimensioni. Le principali sindromi da microdelezione investigate comprendono:

- **Sindrome di Di George** (delezione 22q11.2):  
è una malattia dovuta ad una microdelezione nella regione cromosomica 22q11.2, ed è caratterizzata dall'insieme di diverse malformazioni: ipoplasia del timo e delle ghiandole paratiroidi, cardiopatia congenita e dimorfismi del viso caratteristici. L'incidenza mondiale è di 1/2.000-1/4.000 nati vivi.
- **Sindrome Cri-du-chat** (delezione 5p):  
è una malattia cromosomica dovuta alla delezione di una porzione variabile del braccio corto del cromosoma 5 (5p-). I segni clinici principali comprendono il pianto acuto monotono (da cui origina il nome della sindrome del "miagolio del gatto"), la microcefalia, tratti caratteristici del volto e il grave ritardo psicomotorio e mentale. L'incidenza varia tra 1/15.000 e 1/50.000 nati vivi.
- **Sindrome di Prader-Willi/Angelman** (delezione 15q11.2):  
queste due sindromi coinvolgono lo stesso tratto cromosomico (regione critica 15q11.2-q13), ma presentano manifestazioni differenti a seconda se il cromosoma interessato sia di origine materna o paterna.
- o **La sindrome di Prader-Willi** è una condizione caratterizzata principalmente da bassa statura, obesità, ipotonia muscolare, alterazioni endocrinologiche, dismorfismi del volto e ritardo di sviluppo psicomotorio. La malattia colpisce 1/25.000 nati.
- o **La sindrome di Angelman** è una malattia neurologica caratterizzata da grave ritardo mentale e dismorfismi facciali caratteristici. La sua prevalenza è stimata tra 1/10.000 e 1/20.000.
- **Sindrome da delezione 1p36:**  
è un'anomalia cromosomica causata da una delezione eterozigote parziale della parte distale del braccio corto del cromosoma 1, con punti di rottura tra 1p36.13 e 1p36.33, caratterizzata da dismorfismi facciali tipici, ipotonia, ritardo dello sviluppo, deficit cognitivo, convulsioni, cardiopatie, sordità e ritardo della crescita a esordio prenatale. È considerata una delle più comuni sindromi da delezione cromosomica, con un'incidenza di 1/5.000-10.000 nati vivi.
- **La Sindrome di Wolf-Hirschhorn** (delezione 4p):  
è una malattia dello sviluppo, determinata da una delezione del braccio corto del cromosoma 4 (regione 4p16.3), e caratterizzata da segni craniofacciali caratteristici, ritardo della crescita renatale e postnatale, deficit cognitivo, grave ritardo dello sviluppo psicomotorio, convulsioni e ipotonia. La prevalenza è di 1:50.000 nati. Interessa più spesso le femmine rispetto ai maschi (2:1).

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

## SINDROMI DA MICRODELEZIONE VALUTATE DAL TEST PRENATALSAFE® KARYO PLUS

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

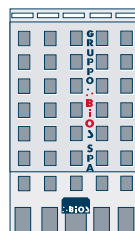
SINDROME DA MICRODELEZIONE	REGIONE CROMOSOMICA	PREVALENZA (ALLA NASCITA)
Sindrome di DiGeorge	delezione 22q11.2	1/2.000 - 1/4.000
Sindrome Cri-du-chat	delezione 5p15.3	1/15.000 - 1/50.000
Sindrome di Prader-Willi	delezione 15q11.2	1/25.000
Sindrome Angelman	delezione 15q11.2	1/10.000 - 1/20.000
Sindrome da delezione 1p36	delezione 1p36	1/5.000 - 1/10.000
Sindrome di Wolf-Hirschhorn	delezione 4p16.3	1/20.000 - 1/50.000
Sindrome di Jacobsen	delezione 11q23-q24.3	1/100.000
Sindrome di Langer-Giedion	delezione 8q24.11-q24.13	1/200.000
Sindrome di Smith-Magenis	delezione 17p11.2	1/15.000 - 1/25.000

- **La Sindrome di Jacobsen** è causata da una delezione del braccio lungo del cromosoma 11 (11q23). È caratterizzata da ritardo dello sviluppo, facies caratteristica, malattie emorragiche e alcuni disturbi del comportamento. La prevalenza è di 1:100.000 nati. Nella maggior parte dei casi non è trasmessa per via ereditaria (de novo).
- **La Sindrome di Langer-Giedion** o sindrome tricornofalangeale tipo 2, è causata da una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 8 (regione 8q24.11-q24.13), che porta alla perdita di almeno due geni: TRPS1 e EXT1.. È caratterizzata da deficit cognitivo, associato a varie anomalie, compresa la cute ridondante, le esostosi cartilaginee multiple, la facies caratteristica e le epifisi falangeali "a cono". Sono stati descritti anche ritardo di crescita, microcefalia, ipotonia e problemi uditivi. Si trasmette come carattere autosomico dominante, ma sono stati descritti soprattutto casi sporadici.
- **La Sindrome di Smith-Magenis** è una malattia genetica complessa con deficit cognitivo variabile, disturbi del sonno, anomalie craniofacciali e scheletriche, disturbi psichiatrici, ritardo motorio e del linguaggio. La prevalenza mondiale è di 1/15.000-25.000. Sono comuni il deficit cognitivo lieve-moderato, il ritardo significativo del linguaggio, la ridotta sensibilità al dolore, la neuropatia periferica, i disturbi del sonno (caratteristici) e i comportamenti disadattivi (capricci/scatti d'ira, ricerca costante dell'attenzione, aggressività, disobbedienza, distrazione e comportamenti autolesionistici). La SMS è una malattia sporadica da delezione 17p11.2 del gene RAI1 (retinoic acid-induced 1; 90%) o da mutazione del gene stesso (10%).

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

## MALATTIE GENETICHE INDAGATE DAL TEST GENESAFE® COMPLETE

Il test **GeneSAFE® Complete**, effettua lo screening nel feto sia di malattie genetiche a trasmissione ereditaria che ad insorgenza de novo. In particolare, il test **GeneSAFE® Complete** permette di individuare mutazioni su 4 geni responsabili delle 4 malattie genetiche a trasmissione ereditaria più frequentemente riscontrate nella popolazione Italiana, quali Fibrosi Cistica, Anemia Falciforme, Beta Talassemia e Sordità Ereditaria.



I geni investigati dal test **GeneSAFE® Inherited**, e le relative patologie genetiche, sono riportati nella tabella sottostante.

Tabella: Lista delle malattie genetiche a trasmissione ereditaria indagate dal test **GeneSAFE® Complete**

<b>MALATTIE GENETICHE EREDITARIE INDIVIDUATE DA GENESAFE® GENE</b>	
Fibrosi Cistica	CFTR
Beta Talassemia	HBB
Anemia Falciforme	HBB
Sordità Ereditaria autosomica recessiva tipo 1A	CX26(GJB2)
Sordità Ereditaria autosomica recessiva tipo 1B	CX30(GJB6)

Il test **GeneSAFE® Complete** permette inoltre di rilevare mutazioni su 25 geni in relazione a 44 malattie monogeniche non ereditate dai genitori, ma comparse de novo nel feto. Le mutazioni individuate possono insorgere in modo casuale per la prima volta nel feto e in questi casi denominate de novo. Tali mutazioni non sono rilevabili con i test di screening pre-concezionali eseguiti sui genitori poiché a carattere non ereditario. Le suddette mutazioni de novo possono determinare nel bambino displasie scheletriche, difetti cardiaci, anomalie congenite multiple, e/o deficit intellettivi. I geni investigati dal test, e le relative patologie genetiche, sono riportati nella tabella sottostante.

Tabella: **LISTA DELLE MALATTIE GENETICHE AD INSORGENZA DE NOVO INDAGATE DAL TEST GENESAFE® COMPLETE**

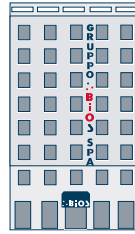
**TABELLA: LISTA DELLE MALATTIE GENETICHE AD INSORGENZA DE NOVO INDAGATE DAL TEST GENESAFE® COMPLETE**

#### **MALATTIE SINDROMICHE**

- Sindrome di Alagille
- Sindrome di CHARGE
- Sindrome di Cornelia de Lange tipo 5
- Sindrome di Cornelia de Lange tipo 1
- Sindrome di Rett
- Sindrome di Sotos tipo1
- Sindrome di Bohring-Opitz
- Sindrome di Schinzel-Giedion
- Oloprosencefalia

#### **CRANIOSINOSTOSI**

- Sindrome di Antley-Bixler senza anomalie genitali o disordini della steroidogenesi
- Sindrome di Apert
- Sindrome di Crouzon
- Sindromedi Jackson-Weiss
- Sindrome di Pfeiffer, tipo 1
- Sindrome di Pfeiffer, tipo 2
- Sindrome di Pfeiffer, tipo 3



### SINDROME DI NOONAN

Sindrome Cardio facio cutanea (CFS) tipo 1  
Sindrome di Noonan-simile con o senza leucemia mielomonocitica giovanile  
Sindrome di Noonan /cancers  
Sindrome Cardio facio cutanea (CFS) tipo e 3  
Sindrome Cardio facio cutanea (CFS) tipo 4  
Sindrome di Noonan 6/cancers  
Sindrome Noonan 1/ Sindrome di LEOPARD/cancers  
Leucemia mielomonocitica giovanile (JMML)  
Sindrome di Noonan 5/Sindrome di LEOPARD 2  
Sindrome di Noonan 8  
Sindrome Noonan-simile con capelli caduchi in fase anagen  
Sindrome di Noonan 4

### PATOLOGIE SCHELETRICHE

Acondrogenesi tipo 2  
Acondroplasia  
Sindrome CATSHL  
Sindromedi Crouzon con acanthosis nigricans  
Ipocondroplasia  
Sindrome di Muenke  
Displasia tanatafora, tipo I  
Displasia tanatafora, tipo II  
Sindrome di Ehlers-Danlos, classica  
Sindrome di Ehlers-Danlos, tipo VIIA  
Osteogenesi imperfetta, tipo I  
Osteogenesi imperfetta, tipo II  
Osteogenesi imperfetta, tipo III  
Osteogenesi imperfetta, tipo IV  
Sindrome di Ehlers-Danlos, forma cardiaco-valvolare  
Sindrome di Ehlers-Danlos, tipo VIIB  
Osteogenesi imperfetta, tipo II  
Osteogenesi imperfetta, tipo III  
Osteogenesi imperfetta, tipo IV

La patologie indagate dal test **GeneSAFE®** spesso non sono rilevabili alle indagini ecografiche del primo trimestre (alcune sono rilevabili ecograficamente solo al secondo o al terzo trimestre) e sono indipendenti dall'età materna.

A differenza dei NIPT tradizionali, che individuano anomalie fetali associate ad età materna avanzata (es. sindrome di Down), il test **GeneSAFE®** identifica malattie genetiche associate ad età paterna avanzata (es. Acondroplasia, sindrome di Pfeiffer, di Apert, di Crouzon, Osteogenesis Imperfecta, etc.), causate da errori genetici che insorgono durante il processo di spermatogenesi, fornendo alle coppie meno giovani la possibilità di utilizzare un test di screening più completo.

---

## CHI PUÒ SOTTOPORSI AL TEST PRENATALSAFE® ?

---

Tutte le donne in gravidanza con un'età gestazionale di almeno 10 settimane. Il test può essere eseguito sia in caso di gravidanze singole che gemellari, ottenute sia mediante concepimento naturale che con tecniche di procreazione medicalmente assistita, omologhe o eterologhe.

---

## COME VIENE EFFETTUATO IL PRENATALSAFE® ?

---

Durante la gravidanza, alcuni frammenti del Dna del feto circolano nel sangue materno. Il DNA fetale è rilevabile a partire dalla 5° settimana di gestazione. La sua concentrazione aumenta nelle settimane successive e scompare subito dopo il parto. La quantità di DNA fetale circolante dalla 9°-10° settimana di gestazione è sufficiente per garantire l'elevata specificità e sensibilità del test.

Il test viene eseguito mediante il prelievo di un campione ematico della gestante con un'età gestazionale di almeno 10 settimane. Tramite un'analisi complessa di laboratorio, il DNA fetale libero circolante è isolato dalla componente plasmatica del sangue materno. Successivamente, attraverso un processo tecnologico avanzato, le regioni cromosomiche del DNA fetale circolante vengono sequenziate a elevata profondità di lettura (~30 milioni di sequenze), mediante l'innovativa tecnologia di sequenziamento massivo parallelo (MPS) dell'intero genoma fetale, utilizzando sequenziatori Next Generation Sequencing (NGS) ILLUMINA. Le sequenze cromosomiche vengono quindi quantificate attraverso un'avanzata analisi bioinformatica, per determinare la presenza di eventuali aneuploidie cromosomiche fetali, identificate da un sovrannumero di sequenze allineabili a uno specifico cromosoma. Similmente si procede all'analisi per rilevare le varianti patologiche causa di malattie genetiche ereditare o de novo nel feto.

---

## RISULTATI OTTENIBILI CON IL TEST PRENATALSAFE® ?

---

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

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

In alcuni casi (circa l'1%) il test potrebbe produrre un risultato non ottimale o non conclusivo. In tali evenienze verrà richiesto alla gestante il prelievo di un nuovo campione ematico al fine di ripetere l'esame. Anche dopo la ripetizione, il test potrebbe non produrre un risultato conclusivo. In questi casi, è consigliato di ricorrere a metodi di diagnosi prenatale alternativi, quali per esempio l'amniocentesi o la villocentesi, in quanto in letteratura scientifica è stato riportato un aumento dell'incidenza di aneuploidie fetali nei campioni con risultato non conclusivo, per esempio a causa di bassa frazione fetale.

In altri casi l'esame potrebbe fornire un risultato che indica un sospetto di aneuploidia cromosomica fetale (risultato borderline). In tale evenienza verrà consigliato di confermare il risultato mediante diagnosi prenatale invasiva, così come per il risultato positivo. Nel caso in cui venga richiesta anche l'analisi del sesso del feto, può essere fornito anche questo risultato.

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

## ACCURATEZZA DEL TEST PRENATALSAFE®

L'esame ha dimostrato, in studi di validazione preclinica, un'attendibilità superiore al 99% nel rilevare le aneuploidie cromosomiche comuni in gravidanza (trisomia 21, trisomia 18, trisomia 13 e del 92% per rilevare la Monosomia X con percentuali di falsi positivi <0.1%..

### Performance PrenatalSAFE® (Protocollo Standard): casistica con follow-up (aggiornamento Marzo 2016)

	Trisomia 21 (n=31.800)	Trisomia 18 (n=31.800)	Trisomia 13 (n=31.800)	Monosomia X (n=31.800)	SCA (n=31.800)
Veri positivi	257	47	32	77	160
Falsi positivi	6	6	7	48	58
Veri negativi	31536	31746	31746	31675	31582
Falsi negativi	1	1	0	0	0
Sensibilità (95% CI)	99,81% (97,88% - 99,99%)	97,92% (88,93% - 99,95%)	100,00% (89,11% - 100,00%)	100,00% (95,32% - 100,00%)	100,00% (99,72% - 100,00%)
- % Falsi Negativi	0,38%	2,08%	0,00%	0,00%	0,00%
Specificità (95% CI)	99,98% (99,98% - 99,99%)	99,98% (99,98% - 99,99%)	99,98% (99,95% - 99,99%)	99,85% (99,80% - 99,89%)	99,82% (99,78% - 99,86%)
- % Falsi Positivi	0,02%	0,02%	0,02%	0,15%	0,18%
PPV (95% CI)	97,72% (95,10% - 99,16%)	88,68% (76,97% - 95,73%)	82,05% (66,47% - 92,46%)	61,60% (52,49% - 70,18%)	73,39% (67,01% - 79,13%)
NPV (95% CI)	100,00% (99,98% - 100,00%)	100,00% (99,98% - 100,00%)	100,00% (99,99% - 100,00%)	100,00% (99,99% - 100,00%)	100,00% (99,98% - 100,00%)

### Performance PrenatalSAFE® (Protocollo FAST): Casistica con follow-up (aggiornamento Marzo 2016)

	Trisomia 21 (n=15.258)	Trisomia 18 (n=15.258)	Trisomia 13 (n=15.258)	Monosomia X (n=15.258)	SCA (n=15.258)
Veri positivi	156	30	20	57	91
Falsi positivi	2	1	1	18	22
Veri negativi	15100	15227	15279	15183	15145
Falsi negativi	0	0	0	0	0
Sensibilità (95% CI)	100,00% (88,43% - 100,00%)	100,00% (88,43% - 100,00%)	100,00% (83,16% - 100,00%)	100,00% (93,73% - 100,00%)	100,00% (96,03% - 100,00%)
- % Falsi Negativi	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Specificità (95% CI)	99,99% (99,96% - 100,00%)	99,99% (99,96% - 100,00%)	99,99% (99,96% - 100,00%)	99,88% (99,81% - 99,93%)	99,85% (99,78% - 99,91%)
- % Falsi Positivi	0,01%	0,01%	0,01%	0,12%	0,15%
PPV (95% CI)	98,73% (83,30% - 99,92%)	96,77% (83,30% - 99,92%)	95,24% (76,18% - 99,88%)	76,00% (64,75% - 85,11%)	80,53% (72,02% - 87,38%)
NPV (95% CI)	100,00% (99,98% - 100,00%)	100,00% (99,98% - 100,00%)	100,00% (99,98% - 100,00%)	100,00% (99,98% - 100,00%)	100,00% (99,98% - 100,00%)



## Performance PrenatalSAFE® Karyo: dati validazione pre-clinica

	Trisomia 21 (n=1419)	Trisomia 18 (n=1419)	Trisomia 13 (n=1419)	SCA (n=1419)	CNV (n=1419)
Veri positivi	100	31	14	38	37
Falsi positivi	0	0	0	0	0
Veri negativi	1319	1388	1405	1383	1382
Falsi negativi	0	0	0	0	0
Sensibilità	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
(95% CI)	(98,38% - 100,00%)	(88,78% - 100,00%)	(78,84% - 100,00%)	(90,28% to 100,00%)	(90,51% to 100,00%)
Specificità	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
(95% CI)	(99,72% - 100,00%)	(99,73% - 100,00%)	(99,74% - 100,00%)	(99,73% to 100,00%)	(99,73% to 100,00%)
PPV	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
(95% CI)	(98,38% - 100,00%)	(88,78% - 100,00%)	(78,84% - 100,00%)	(90,28% to 100,00%)	(90,51% to 100,00%)
NPV	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
(95% CI)	(99,72% - 100,00%)	(99,73% - 100,00%)	(99,74% - 100,00%)	(99,73% to 100,00%)	(99,73% to 100,00%)

PPV: Valore Predittivo Positivo; NPV: Valore Predittivo Negativo; SCA: aneuploidie dei cromosomi sessuali; CNV: Copy Number Variation (alterazioni cromosomiche strutturali o trisomie non comuni) (Fiorentino et al., ESHG conference 2016; ISPD Conference 2016)

Sebbene l'errore diagnostico del test sia molto basso (<1% per le trisomie 21, 18 e 13, e circa l'8% per la monosomia del cromosoma X, con percentuali di falsi positivi <0.1%), questo tuttavia non è escludibile.

## ACCURATEZZA DEL TEST GENESAFE®

L'esame ha dimostrato, in studi di validazione preclinica, una sensibilità >99% nel rilevare le mutazioni nei geni investigati, con percentuali di falsi positivi <0.1%. Sebbene l'errore del test sia basso, tuttavia non è escludibile.

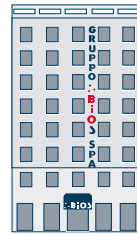
## LIMITI DEL TEST PRENATALSAFE®

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

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

Il test non può escludere la presenza di tutte le anomalie cromosomiche fetali. **PrenatalSAFE® 3** valuta solo le aneuploidie a carico dei cromosomi 13, 18, 21, **PrenatalSAFE® 5** valuta anche le aneuploidie dei cromosomi sessuali (X e Y); le aneuploidie di altri cromosomi sono identificabili solo con il test **PrenatalSAFE® Karyo**.

Il test **PrenatalSAFE® Karyo** evidenzia il 92,6% delle anomalie cromosomiche fetali rilevabili in epoca prenatale e il 96,2% di quelle riscontrate alla nascita.



Il test **PrenatalSAFE® Plus** evidenzia il 95,5% delle anomalie cromosomiche fetali rilevabili in epoca prenatale e il 99.1% di quelle riscontrate alla nascita.

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

Le alterazioni parziali dei cromosomi analizzati e le alterazioni cromosomiche strutturali possono essere evidenziate solo con i test **PrenatalSAFE® Karyo**. Il limite di risoluzione stimato del test è sovrapponibile a quello del cariotipo citogenetico (tradizionale) a 400 bande (circa 7-10 Mb). Il test **PrenatalSAFE® Plus** evidenzia alterazioni cromosomiche strutturali ad una risoluzione di circa 3 Mb, a livello delle regioni cromosomiche associate alle sindromi da microdelezione investigate.

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

Similmente, potrebbe determinarsi una incongruenza nei risultati del sesso (es. diagnosi di sesso maschile, in cui la presenza del cromosoma Y è originata dal DNA feto abortito).

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

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

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

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

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

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

Un risultato "NEGATIVO - Aneuploidia o alterazione cromosomica strutturale non rilevata" riduce notevolmente le possibilità che il feto abbia una aneuploidia o un'alterazione cromosomica strutturale a livello dei cromosomi esaminati, ma non può garantire che i cromosomi siano effettivamente normali o che il feto sia sano. Non è possibile eseguire questo test a donne portatrici esse stesse di aneuploidie. Per i limiti sopra esposti, in caso di risultato positivo si raccomanda di eseguire un colloquio con un genetista e la conferma del risultato attraverso l'analisi del cariotipo su liquido amniotico.

---

## LIMITI DEL TEST GENESAFE®

---

Questo esame valuta solo le malattie genetiche ed i geni elencati nelle Tabelle precedenti. Il test non evidenzia altre malattie genetiche o geni non specificamente investigati.

L'esame inoltre non è in grado di evidenziare:

- mutazioni localizzate nelle regioni introniche oltre  $\pm 5$  nucleotidi dai breakpoints;
- delezioni, inversioni o duplicazioni maggiori di 20 bp;
- mosaicismi.

**GeneSAFE®** è un **test di screening e non è un test diagnostico**. Benché questo test sia molto accurato, i risultati non sono diagnostici e devono essere valutati nel contesto del quadro clinico della gestante e dell'anamnesi familiare. Inoltre, l'esame non è sostitutivo della diagnosi prenatale invasiva (Villocentesi o Amniocentesi). Il test è stato validato su gravidanze singole o gemellari, monozigotiche o dizigotiche, con almeno 10 settimane di gestazione.

**Nelle gravidanze gemellari non è possibile distinguere la condizione del singolo feto.** Nelle gravidanze che sono iniziate come gemellari o plurime, seguite dall'aborto spontaneo di uno o più feti con riassorbimento della camera gestazionale (**vanishing twin**), potrebbe essere presente nel sangue materno anche il DNA fetale libero del feto abortito. Ciò potrebbe interferire nella qualità dei risultati, determinando **falsi positivi**.

L'esistenza di una condizione tumorale (metastasi) nella gestante potrebbe determinare risultati del test falsi positivi dovuti a mutazioni del DNA tumorale circolante (ctDNA) a livello di geni coinvolti nel processo di cancerogenesi (es. BRAF, KRAS, NRAS).

**Un risultato "NEGATIVO - Basso rischio per malattia genetica"** riduce notevolmente le possibilità che il feto abbia le malattie genetiche esaminate, ma non può garantire che il feto sia sano.

Il test **GeneSAFE®** identifica esclusivamente mutazioni con significato patologico noto. Il **test non ricerca varianti con significato benigno**, cioè quelle riscontrabili in individui normali e che sono prive di significato patologico, e **varianti con significato clinico incerto**, cioè quelle non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica. L'interpretazione delle varianti genetiche si basa sulle più recenti conoscenze disponibili al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti.

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

**IL REFERTO DEL TEST PRENATALSAFE® COMPLETE SI COMPONE DI DUE DIVERSI REFERTI:** il primo riferito all'analisi non invasiva del cariotipo fetale, il secondo relativo alle patologie genetiche ereditarie e/o ad insorgenza de novo, disponibile dopo circa 10 giorni lavorativi dal primo.

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

---

## ALTERNATIVE AL TEST PRENATALSAFE®: LA DIAGNOSI PRENATALE INVASIVA

---

L'esame prenatale non invasivo che analizza il DNA fetale presente nel sangue materno, è solo una delle opzioni per la gestante per determinare la presenza di patologie cromosomiche durante la gravidanza.

Esistono diversi altri esami effettuabili in questo periodo gestazionale. In particolare, un'indagine citogenetica (cariotipo fetale tradizionale) o molecolare (cariotipo fetale molecolare) più approfondita può essere ottenuta mediante "diagnosi prenatale invasiva", che può essere eseguita su villi coriali o liquido amniotico. Il prelievo dei villi coriali (tessuto placentare che, pur essendo separato dal feto, ne contiene lo stesso DNA), o villocentesi, è effettuato tra la 11<sup>a</sup> e la 12<sup>a</sup> settimana di gestazione e consiste nel prelievo, sotto controllo ecografico, di un piccolo campione di villi coriali mediante una puntura attraverso l'addome materno. Tale prelievo comporta un rischio di aborto inferiore al 2%. Il cariotipo fetale viene condotto sulle cellule

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

---

## CONFRONTO DEL DETECTION RATE TRA PRENATALSAFE® E CARIOTIPO FETALE

---

Il test **PrenatalSAFE® 3** e **5** permettono di evidenziare, rispettivamente, il 71% e l'83.1% delle anomalie cromosomiche riscontrabili in gravidanza. Con test **PrenatalSAFE® Plus** la detection rate diviene l'86%. Il **PrenatalSAFE® Karyo**, invece, consente di rilevare il 92.6% delle anomalie cromosomiche evidenziabili in gravidanza ed il 96.2% di quelle riscontrate alla nascita. Il test **PrenatalSAFE® Karyo Plus** evidenzia il 95,5% delle anomalie cromosomiche fetali rilevabili in epoca prenatale e il 99.1% di quelle riscontrate alla nascita, raggiungendo un livello di detection rate molto simile a quello del cariotipo fetale tradizionale (96.9%), ottenuto mediante tecniche di diagnosi prenatale invasiva. Il cariotipo fetale molecolare - array-CGH (l'esame prenatale considerato il gold standard) eseguito su cellule fetali prelevate con amniocentesi o villocentesi, permette di rilevare il 99.8% delle anomalie cromosomiche riscontrabili in gravidanza. (Wellesley, D, et al., 2012; Wapner et al., 2012; Fiorentino et al., 2011; 2013).

---

## ALTRE ANALISI INTEGRATIVE AL TEST PRENATALSAFE®

---

Su specifica richiesta è possibile associare al test **PrenatalSAFE®** anche il test **RhSAFE®**, solo in gravidanze con gestante Rh(D) negativa e partner maschile Rh(D) positivo.

---

### RhSAFE®

---

Il test **RhSAFE®**, un esame prenatale non invasivo che, analizzando il DNA fetale isolato da un campione di sangue della gestante, consente di determinare il Fattore Rh(D) fetale. Il test si applica in gravidanze con gestanti Rh (D) negativo e partner Rh (D) positivo.

---

## IL FATTORE RHESUS (RH)

---

I globuli rossi umani presentano sulla loro superficie gli antigeni responsabili dei gruppi sanguigni ABO e gli antigeni che costituiscono il Fattore Rhesus (Rh). Tra gli antigeni del fattore Rh, il D è il più importante dal punto di vista clinico. Si definiscono Rh positivi i soggetti che presentano l'antigene D sulla superficie dei globuli rossi, sono Rh negativi i soggetti che non lo presentano (circa il 15% della popolazione caucasica). L'RhD svolge un ruolo fondamentale in quella che viene chiamata incompatibilità materno-fetale. Se il feto è Rh(D) positivo (Rh+) e la gestante Rh(D) negativa (Rh-) è probabile che i globuli rossi del feto con l'antigene Rh entrino nel circolo sanguigno materno. In assenza di opportune precauzioni durante la gravidanza, c'è il rischio che la gestante sviluppi una reazione immunitaria producendo anticorpi contro i globuli rossi del feto (sensibilizzazione o alloimmunizzazione), che rimarranno presenti nel suo sangue.

In caso di una seconda gravidanza con un feto Rh(D) positivo, gli anticorpi materni diretti contro gli antigeni eritrocitari del feto possono passare attraverso la placenta e aggredire i globuli rossi fetali, che verranno poi distrutti in quanto riconosciuti come "estranei". Si determina quindi la cosiddetta malattia emolitica del feto e del neonato (HDFN).

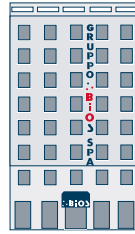
L'incompatibilità materno-fetale non si presenta quando entrambi i genitori sono Rh negativi, oppure se la madre è Rh positiva e il padre Rh negativo.

---

## COME EVITARE IL RISCHIO DI SENSIBILIZZAZIONE

---

Per prevenire la sensibilizzazione, la gestante può sottoporsi a immunoprofilassi con immunoglobuline anti-D, durante la gravidanza e dopo il parto. L'utilizzo dell'immunoprofilassi anti - D non è di per se privo di rischi, in quanto le immunoglobuline anti-D sono emoderivati di origine umana ottenuti da donazioni di sangue. Nonostante il rischio di trasmissione di infezioni virali sia molto basso, ciò tuttavia non può essere completamente escluso.



Il test per la determinazione precoce non invasiva del fattore Rh (D) fetale, mediante l'analisi del DNA fetale libero nel sangue materno, è un esame affidabile e utile, divenuto ormai una routine della gestione delle gravidanze caratterizzate dall'incompatibilità materno-fetale.

Il test consente di identificare le gravidanze a rischio per la malattia emolitica del feto e del neonato, e quindi di ridurre il ricorso alla profilassi anti-D nei casi in cui il feto risulti Rh(D) negativo come la madre. In questi casi, infatti, non vi è alcun rischio di sensibilizzazione, pertanto la somministrazione di immunoglobuline anti-D può essere evitata.

---

## CHI PUÒ SOTTOPORSI AL TEST RhSAFE® ?

---

Tutte le donne in gravidanza Rh (D) negative con un'età gestazionale di almeno 10 settimane. Il test **RhSAFE®** viene eseguito (su richiesta) solo in gravidanze con gestante Rh(D) negativa e partner maschile Rh(D) positivo. Per l'esecuzione del test è necessario produrre i referti attestanti il fattore Rh della coppia. Nel caso in cui i referti in questione non verranno prodotti entro 30 giorni dalla data di accettazione del campione, l'esame non verrà eseguito e il relativo campione verrà smaltito secondo la normativa vigente. Come si effettua il test **RhSAFE®**?

Durante la gravidanza, in conseguenza al ricambio fisiologico delle cellule della placenta, alcuni frammenti del DNA del feto circolano nel sangue materno. Il DNA fetale libero viene inizialmente isolato dalla componente plasmatica del sangue materno. Successivamente, attraverso un processo tecnologico avanzato ad elevata sensibilità, il DNA viene amplificato mediante tecnica Real Time PCR. L'analisi genetica automatizzata consente di identificare la presenza/assenza di sequenze di DNA appartenenti al gene RHD e permette, quindi, di definire se il feto è Rh(D) positivo (presenza del gene RHD) o negativo (assenza del gene RHD) in donne Rh (D) negative.

### Tempi di attesa per i risultati

I tempi stimati di refertazione sono di circa 5 (procedura FAST) o 9 giorni lavorativi (proceduta con tempi di refertazione standard). Tali termini, tuttavia, non sono perentori e potrebbero prolungarsi in caso di ripetizioni dell'esame, risultati non ottimali, approfondimenti del test o dubbi interpretativi.

---

## LIMITI DEL TEST RhSAFE®

---

Alcuni frammenti del gene RhD possono essere riscontrati in gestanti con fenotipo Rh-, questo può verificarsi per via di uno pseudogene (RhD $\Psi$ ), o di una variante d(C)ce haplotype, entrambi presenti soprattutto nella popolazione africana. Questi genotipi possono dare dei falsi positivi tramite l'analisi genetica del RHD. A causa della presenza di varianti localizzate nei siti di annealing dei primers, sono possibili anche falsi negativi, specialmente nelle popolazioni meno studiate. Per questo motivo è sempre consigliato di eseguire il genotipo RhD su sangue cordonale al momento del parto. La sensibilità dell'esame è del 99,7%, mentre la specificità è del 99,5%.

### Consulenza Genetica

Il nostro centro offre il servizio di consulenza genetica, sia pre-test che post-test, al fine spiegare alla gestante le finalità del test, i risultati ottenibili, e i risultati emersi al completamento dell'esame, in particolar modo nei casi di riscontro patologico, con rischio elevato di patologia cromosomica.

### Privacy

Tutti i vostri dati verranno trattati con estrema riservatezza e secondo le vigenti leggi sulla Privacy (Decreto Legislativo 30 giugno 2003, n° 196). I risultati dei test saranno comunicati solo agli operatori sanitari coinvolti nell'espletamento del test o al genetista (ove necessario). Inoltre, i risultati del test possono essere rilasciati a chi, per legge, può avere accesso a essi.

### Conservazioni dei campioni

I campioni biologici sono identificati con codice a barre e ID numerico, quindi nessun dato identificativo viene associato alla provetta. E' quindi impossibile che chiunque possa risalire ai dati personali. In ogni caso, trascorsi 30 giorni dall'emissione del referto i campioni biologici saranno smaltiti secondo la normativa vigente.

La DIREZIONE