

La diagnostica molecolare in epoca prenatale: evoluzione tecnologica ed implicazioni etiche in medicina della riproduzione

Assunta Naclerio^{1§}, Chiara Sacco^{1§}, Valeria D'Argenio^{2,3}, Rossella Tomaiuolo¹, Chiara Di Resta¹

¹Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

²Università Telematica San Raffaele, Roma

³CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli

ABSTRACT

Molecular diagnostics in the prenatal age: technological evolution and ethical implications in reproductive medicine.

Congenital anomalies have a birth rate of 3-5% in the general population. The ability to identify genetic alterations in the prenatal age is noticeably increased with the advancement of molecular diagnostic techniques, which are included today in clinical practice. Nowadays, we have several non-invasive and invasive testing options and it is relevant to consider that some of them have a screening value while others have a proper diagnostic role. Based on that, when we are approaching prenatal molecular tests, it is crucial to weigh the multiple ethical implications, related to specific single testing or shared by more of them. Indeed, the interpretation of the testing results may be straightforward especially when the test aims to assess a known familial alteration, while it is more challenging when a genetic variation of unknown significance has to be reported. Thus, prenatal genetic counselling, pre and post-test, is essential to drive the couples to balance the desire to acquire as much information as possible and the real clinical utility of prenatal genetic investigations.

Parole chiave: diagnosi prenatale, test prenatali non invasivi, etica

INTRODUZIONE

Le anomalie congenite hanno una frequenza alla nascita del 3-5% nella popolazione generale (1). La loro eziologia riconosce nel 25% dei casi un'aberrazione cromosomica e nel 30% un'alterazione genica, mentre nei restanti casi l'origine è sconosciuta o multifattoriale (ambientale, infettiva o iatrogena) (2). La possibilità di identificare malattie genetiche in epoca prenatale è aumentata notevolmente con l'ulteriore sviluppo delle tecniche di diagnostica molecolare (3-5), ormai diventate parte integrante della pratica clinica.

Le indagini molecolari in epoca prenatale sono quindi raccomandate in differenti contesti, quali l'anamnesi familiare positiva per malattia genetica (6,7), l'età materna e/o paterna avanzata, l'identificazione di aneuploidie di coppia emerse durante un percorso di screening pre-concezionale (8) o la diagnosi di conferma di un'anomalia riscontrata durante un controllo ecografico di routine. Inoltre negli anni è aumentato il numero di coppie che,

anche in assenza di indicazioni specifiche, si sottopone o richiede di sottoporsi ad un'indagine genetica. L'identificazione infatti di specifiche alterazioni geniche nel feto in epoca prenatale permette di pianificare interventi terapeutici specifici, nonché di valutare una eventuale interruzione di gravidanza.

Va sottolineato tuttavia che l'interpretazione delle varianti genetiche identificate nel periodo prenatale pone diverse sfide mediche, spesso dovute alla mancanza in molti casi della corrispondenza genotipo-fenotipo (9). Pertanto è bene che tutte le coppie che scelgono di avvalersi della diagnosi prenatale ricevano una consulenza in merito a rischi, benefici e limiti dell'esame indicato dal ginecologo o dal genetista (1).

In diagnostica prenatale possono essere distinti test di screening e test diagnostici che si differenziano per motivazione della richiesta, epoca gestazionale in cui vengono eseguiti, modalità di prelievo (invasivo o non invasivo), materiale biologico prelevato e analizzato e metodica analitica utilizzata (Tabella 1).

Corrispondenza a: Rossella Tomaiuolo, Università Vita-Salute San Raffaele, Via Olgettina, 58 - Milano - E-mail, tomaiuolo.rossella@hsr.it

§ Questi autori hanno contribuito in maniera uguale alla stesura dell'articolo

Ricevuto: 22.05.2022

Revisionato: 08.06.2022

Accettato: 23.06.2022

Publicato on-line: 08.07.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.047

Tabella 1*Approcci diagnostici utilizzati in epoca prenatale*

	Motivazione della richiesta	Settimana gestazionale	Metodo di campionamento	Campione biologico	Metodica
Screening prenatale	età materna avanzata precedenti aborti anamnesi familiare o anamnesi patologica positiva per malattie genetiche	9 ^a -12 ^a	venopuntura	sangue periferico	diagnostica per immagini combinata a esami biochimici tecniche di diagnostica molecolare
Diagnosi prenatale	rischio procreativo noto rischio procreativo evidenziato durante la gravidanza	10 ^a -14 ^a dalla 15 ^a	villocentesi amniocentesi	villi coriali liquido amniotico	tecniche di diagnostica molecolare

I test di screening permettono di effettuare una valutazione su larga scala al fine di individuare le coppie potenzialmente a rischio di generare prole affetta da malattia genetica (8,10); in caso di alto rischio stimato, alla coppia viene indicata la possibilità di sottoporsi ad esami diagnostici per confermare o escludere l'anomalia sospettata e poterne conoscere il tipo, comprenderne l'entità, le eventuali possibilità terapeutiche pre e/o postnatali e la probabilità del rischio di ricorrenza della stessa anomalia in gravidanze successive (2).

In questa rassegna, sono descritti i diversi approcci e le differenti tecniche attualmente disponibili e comunemente utilizzate per la diagnostica molecolare in epoca prenatale, ponendo l'attenzione sui possibili approcci di analisi, l'interpretazione dei risultati e le implicazioni etiche correlate.

METODOLOGIA

Per questa rassegna è stata effettuata la ricerca sul database PubMed di articoli in lingua inglese indicizzati riguardanti la diagnostica in epoca prenatale. In particolare, sono state utilizzate le seguenti parole chiave: "diagnosi prenatale" (prenatal diagnosis), "amniocentesi e villocentesi" (amniocentesis and chorionic villus sampling), "screening prenatale" (prenatal screening), "malattie late onset" (prenatal testing for Adult-Onset Conditions), "NIPT" (Non Invasive Prenatal Test), "considerazioni etiche nella diagnosi prenatale" (ethical consideration in prenatal testing). La ricerca ha prodotto circa 1 200 risultati.

Al fine di focalizzarsi sulle più recenti e rilevanti pubblicazioni in materia, è stata definita poi una finestra temporale per la ricerca dal 2015 al maggio 2022; si è scelto di consultare articoli pubblicati su giornali con impact factor (IF) ≥ 3 . Tuttavia, quando appropriato, è stata effettuata anche una valutazione di pubblicazioni significative, anche se antecedenti o con minore IF, citate negli articoli precedentemente selezionati. Sono stati esclusi le pubblicazioni puramente metodologiche.

LO STATO DELL'ARTE NELLA DIAGNOSTICA PRENATALE

Le informazioni genetiche derivanti dagli esami prenatali possono guidare diverse decisioni circa la gestione della gravidanza, orientando gli operatori sanitari verso la scelta terapeutica più appropriata e "caso-specifica". Esse consentono infatti, di programmare interventi terapeutici in alcune condizioni, come ad esempio alcuni difetti del tubo neurale candidabili al trattamento prenatale, con conseguente miglioramento degli esiti neonatali (11) o, al contrario, consentono di evitare interventi non necessari in un neonato potenzialmente a rischio per una patologia genetica (ad esempio, restrizione proteica empirica per prevenire eventuali crisi metaboliche nel sospetto di un disturbo del ciclo dell'urea) (12).

Nel contempo, essere a conoscenza di informazioni genetiche riguardanti il nascituro può influenzare la coppia nella scelta di un'eventuale interruzione della gravidanza, sebbene questa decisione sia indirizzata anche, e forse soprattutto, da fattori soggettivi come convinzioni personali, religiose, esperienze precedenti e aspettative future.

L'identificazione di anomalie genetiche in un'età gestazionale abbastanza precoce offre la possibilità di scegliere l'interruzione della gravidanza ma anche di poter effettuare ulteriori indagini prenatali, di poter elaborare la diagnosi, documentarsi con consulenze specialistiche, prepararsi all'accoglienza di un neonato affetto e alle cure eventualmente necessarie dopo il parto. Tutte le coppie che scelgono di avvalersi della diagnosi prenatale dovrebbero ricevere una consulenza in merito a rischi, benefici e limiti dell'esame a cui si sottopongono (1).

Nel corso del primo trimestre, il test di screening comunemente utilizzato è il Duo Test. Esso stima il rischio di trisomie compatibili con la vita grazie ad un algoritmo che combina la misurazione della traslucenza nucale e la visualizzazione/assenza dell'osso nasale

all'ecografia con il valore di due marcatori sierici materni (free-βhCG e PAPP-A) e dati materni quali l'età, il peso, l'etnia, l'anamnesi ostetrica remota e il numero di feti nella gestazione in corso. Il tasso di rilevamento per la trisomia 21 (sindrome di Down) varia dall'82% all'87% a seconda del laboratorio, utilizzando un tasso di positività allo screening del 5% (1).

Attualmente, l'esecuzione dello screening nel primo trimestre è prevista dalle linee guida delle gravidanze fisiologiche per tutte le donne, ottenendo una stratificazione in gruppi ad alto, medio e basso rischio. Al gruppo a basso rischio non vengono proposti ulteriori esami; il gruppo ad alto rischio viene indirizzato verso un esame diagnostico invasivo di conferma; al gruppo a medio rischio può essere proposto il quadruplo esame, un ulteriore test di screening non routinario (eseguibile tra la 15^a e la 22^a settimana di gestazione), che comprende la misura di α-feto proteina, gonadotropina corionica, estriolo libero ed inibina A (1).

Test prenatale molecolare non invasivo

Tra le analisi di screening prenatale, il Non-Invasive Prenatal Test (NIPT) si basa sull'analisi del DNA libero circolante nel plasma materno. Dal momento che la tecnica di campionamento richiede un prelievo di sangue venoso periferico materno, il NIPT ha il vantaggio di non porre alcun rischio di aborto.

L'identificazione della presenza di DNA fetale libero (cffDNA) nel plasma materno risale al 1997 e da subito si intuirono le possibilità che questa scoperta avrebbe potuto offrire nel contesto della diagnostica prenatale (13). La presenza di cellule di origine fetale nel sangue materno era già nota, ma a causa della possibile persistenza nel torrente ematico materno di progenitori ematopoietici fetali anche decenni dopo il parto, il loro impiego in ambito diagnostico è rimasto limitato (14).

Al contrario, il DNA fetale circolante risulta rilevabile nel plasma materno già a partire dalla 5^a-7^a settimana di gestazione con un progressivo aumento nelle settimane successive (15) ma già poche ore dopo il termine della gravidanza non risulta più rilevabile (16). La possibilità di differenziare il DNA circolante di origine materna da quello fetale è legata al diverso peso molecolare tra i due (17).

L'analisi del cffDNA viene condotta attraverso diverse tecniche [sequenziamento parallelo massivo o analisi dei Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNP) per valutare la distribuzione relativa degli alleli materni e fetali] [15], ormai comunemente utilizzate ma gravate dalla probabilità di incorrere in risultati falsi positivi (FP) in casi di mosaicismo placentare confinato (CMP) (il cffDNA proviene, in realtà, dal citotrofoblasto) (18), gravidanze gemellari, vanishing twin (cioè una gravidanza che inizialmente si presenta come gemellare, ma che, non proseguendo come tale, a causa dell'aborto di uno dei feti), malattia neoplastica o aberrazione cromosomica materna sconosciute (15). È noto anche il rischio di un risultato falso negativo (FN) o risultato inconclusivo che può dipendere da una frazione di DNA fetale troppo scarsa (15). Si cerca di ovviare a tale

circostanza eseguendo il NIPT intorno alla 10^a settimana di gestazione, ma l'evenienza di scarso materiale valutabile pone la necessità di considerare la ripetizione dell'esame in un'epoca gestazionale più avanzata o la possibilità di eseguire un esame diagnostico invasivo.

Inoltre è bene anche considerare che il NIPT, basato sull'analisi del cffDNA, è tutt'oggi caratterizzato da problemi tecnici relativi alle caratteristiche del cffDNA, legate all'impossibilità di identificare tutti i tipi di mutazioni legate a malattie ereditarie, in particolare le mutazioni da espansione di triplette, che invece sono spesso richieste in diagnosi prenatale.

Sono stati quindi sviluppati degli approcci che permettessero di isolare e analizzare le cellule fetali trofoblastiche circolanti (CFTC) per la NIPT di malattie monogeniche causate dall'espansione ripetuta di triplette o da mutazioni (19).

È importante sottolineare che il NIPT è considerato un esame di screening, pertanto in caso di positività è necessaria l'esecuzione di un esame diagnostico di conferma.

Nelle gravidanze considerate ad alto rischio per malattie rare, così come per anomalie fetali identificate all'ecografia, il NIPT potrebbe non modificare il percorso diagnostico: un risultato positivo necessita di un test diagnostico di conferma, a causa del basso valore predittivo positivo (PPV) del test su cffDNA per malattie rare. Un risultato negativo indirizza, comunque, a considerare l'opzione di un test diagnostico, visto il rischio residuo significativo (20).

Ad oggi in Italia il NIPT non è inserito nei Livelli Essenziali di Assistenza (anche se una possibile revisione sembra prevista per questo stesso anno) (21), eccetto che per la regione Toscana in cui dal 2019 è stato inserito nel percorso di assistenza sanitaria pubblica regionale (22). Rientra, pertanto, nelle prestazioni a pagamento, con gli interessi economici e la scarsità di regolamentazione che ne derivano.

La Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) già nel 2016 si è espressa positivamente sull'utilizzo del NIPT in determinati contesti quali:

- l'identificazione delle principali trisomie compatibili con la vita (T21, sindrome di Down; T18, sindrome di Edwards; e T13, sindrome di Patau) (23);
- la determinazione del sesso fetale nelle gravidanze a rischio per malattie genetiche X-linked e per iperplasia surrenale congenita (CAH) a fini terapeutici;
- la determinazione del genotipo fetale RDH in donne Rh D-negative a rischio di malattia emolitica neonatale;
- in presenza di alcune malattie autosomiche dominanti di origine paterna e in quelle *de novo*, il cui sospetto clinico sia posto in sede ecografica (24).

Non essendo ritenuto validato a livello diagnostico nella pratica clinica, anche per le limitazioni tecniche menzionate, il NIPT non è ad oggi utilizzabile per le malattie monogeniche autosomiche recessive, X-linked e dominanti di origine materna (24), sebbene siano disponibili sul mercato kit specifici per l'indagine di queste patologie. Per le malattie autosomiche recessive

infatti, per esempio, il NIPT potrebbe essere utile nel determinare l'assenza o la presenza dell'allele paterno (25-27).

Per ciò che riguarda T21, T18 e T13, il NIPT risulta essere il test di screening con i maggiori valori di sensibilità e specificità (23): in donne a rischio aumentato per T21 vengono riportati valori di sensibilità e specificità >99%; per T18, la sensibilità risulta del 97,4% e la specificità del 99,8; per T13, queste risultano rispettivamente del 91,4% e del 99,8% (24).

La SIGU raccomanda che gli esami prenatali non invasivi siano eseguiti in laboratori selezionati, certificati ed accreditati per le attività di Genetica Medica e qualificati a svolgere tali indagini.

Il NIPT è scelto spesso dalle donne in gravidanza per evitare di sottoporsi a procedure invasive, ma potrebbe non essere realmente dirimente in presenza di alterazioni genetiche sconosciute o di significato incerto o con presentazione fenotipica variabile: in caso di esiti inaspettati e/o di significato incerto, si dovrà comunque prendere in considerazione la successiva esecuzione di un esame diagnostico invasivo, con il conseguente carico psicologico negativo per la coppia (20).

Per quanto riguarda le potenzialità delle cellule fetali presenti nel sangue materno nell'ambito della diagnosi prenatale, sono stati pubblicati recenti studi sul possibile utilizzo delle fnRBC (Fetal Nucleated Red Blood Cells) e dei trofoblasti. Tuttavia svantaggi quali l'esigua quantità di DNA estraibile per il Whole Genome Analysis (WGA), i costi dell'analisi e un tempo di risposta (TAT) maggiore di quello del NIPT, hanno limitato la loro applicazione nel NIPT. L'analisi del trofoblasto presenta inoltre il rischio di falsi positivi dovuti ad un possibile mosaicismismo placentare confinato (28).

Villocentesi e amniocentesi

Gli esami diagnostici prenatali vengono eseguiti a seguito di procedure invasive quali l'amniocentesi e il prelievo dei villi coriali (CVS) le cui principali indicazioni sono un rischio procreativo noto, come ad esempio un genitore portatore di anomalie cromosomiche o mutazioni geniche, ed un rischio fetale evidenziato nel corso della gestazione, legato a malformazioni evidenziate al controllo ecografico, malattie infettive contratte durante la gravidanza o positività ai test di screening. Diversi fattori, come il tipo e la quantità di campione biologico necessari, l'epoca della gravidanza ed il rischio per il feto, guidano nella scelta di quale delle due procedure effettuare.

L'analisi dei villi coriali rimane l'unico esame diagnostico disponibile nel primo trimestre di gravidanza (1). Attraverso un approccio trans-addominale o trans-cervicale ecoguidato viene raggiunto il tessuto placentare senza entrare nel sacco amniotico e permettendo il prelievo dei villi coriali, contenenti tessuto trofoblastico, per la valutazione genetica. I tempi necessari per l'indagine, mediamente 14 giorni, possono rappresentare un limite, ma il CVS ha il grande vantaggio della precocità dell'epoca gestazionale di esecuzione. Raramente sono descritti FN da un campione CVS (29). Uno svantaggio di tale procedura diagnostica è

rappresentato dall'1-2% dei risultati patologici legati ad un CMP (mosaicismo placentare confinato) e non a vere anomalie cromosomiche fetali (1). La perdita della gravidanza stimata, attribuita alla procedura, è di circa 1 su 455 (1). Eseguire la CVS prima della 10^a settimana gestazionale può risultare tecnicamente più impegnativo nell'accesso al tessuto placentare che risulta più sottile e meno sviluppato. Sono inoltre segnalate possibili associazioni tra CVS e rottura oromandibolare o difetti di riduzione degli arti a seguito di procedure eseguite tra la 8^a e la 9^a settimana di gestazione, (parzialmente confutate) sebbene la maggior parte delle procedure vengano eseguite dopo 10^a settimana (30,31).

La valutazione del liquido amniotico attraverso l'amniocentesi rimane l'unico esame diagnostico disponibile nel secondo e nel terzo trimestre di gravidanza. Viene eseguita tra la 15^a e la 18^a settimana gestazionale nelle gravidanze con un rischio noto o evidenziato da un test di screening, ma può essere eseguita anche tardivamente, se necessario, per confermare un sospetto sorto da esami di controllo o per monitoraggio della gravidanza. Oltre all'esecuzione di esami genetici, l'esame del liquido amniotico permette di valutare la presenza di un'infezione intra-amniotica o fetale e di misurare l' α -fetoproteina nel liquido amniotico per la diagnosi di spina bifida. La perdita della gravidanza attribuita alla procedura è di circa 1 su 900 (1). Le complicanze dovute al prelievo sono più comuni quando questo è effettuato in epoche gestazionali precoci. L'amniocentesi eseguita precocemente, ovvero prima della 15^a settimana gestazionale, incorre in un aumentato rischio di interruzione della gravidanza e in un maggior rischio di sviluppo del piede torto, oltre a implicazioni citogenetiche, quali aumento del rischio di coltura fallita e possibilità di FN (32,33).

I tempi di risposta per le analisi genetiche sono paragonabili al CVS ma in questo caso rappresentano un importante limite soprattutto quando l'analisi si rende necessaria a seguito di un riscontro ecografico in epoca gestazionale avanzata. Rispetto al NIPT e al CVS, non risente dei CMP.

L'amniocentesi può essere indicata come esame di conferma a seguito dell'analisi del cfDNA, in particolare quando sorge il dubbio di un FP per la discrepanza tra un risultato di screening molecolare ad alto rischio e i reperti ecografici che non evidenziano anomalie fetali. Inoltre, può anche essere utile per la diagnosi di alcune condizioni che presentano mosaicismismo fetale, con varianti causative assenti nel sangue ma presenti in altri tessuti (ad esempio. Sindrome di Pallister-Killian, per la quale in epoca postnatale si richiede una biopsia cutanea e il cariotipo) (34).

Gli esami di diagnosi invasiva possono essere gravati da complicanze legate alla procedura, quali infezioni derivanti da organismi presenti sulla cute, sonda ecografica e gel o tramite puntura accidentale dell'intestino, anche se la sepsi materna grave è una complicanza molto rara. Tale rischio può essere diminuito con la decontaminazione cutanea e con l'uso di materiali sterili che avvolgano la sonda e il gel ma è noto come i rischi strettamente legati alla manovra tendono ad

umentare quando essa viene eseguita da operatori meno qualificati. Esiste un'associazione inversa tra perdita di gravidanza correlata alla procedura ed esperienza dell'operatore basata sul numero di procedure eseguite. Non esistono però prove che indichino il numero ottimale di procedure da eseguire per garantire il mantenimento delle competenze per gli operatori addestrati (32).

A tal riguardo, va anche considerato che il numero di amniocentesi e villocentesi è diminuito con l'implementazione dello screening prenatale grazie al cfDNA (1). Tuttavia, dato che le complicanze degli esami invasivi di diagnosi prenatale sono inversamente proporzionali all'esperienza dell'operatore, la diminuzione del numero di procedure eseguite a favore del NIPT potrebbe causare una carenza di ginecologi esperti in queste tecniche invasive, con il rischio di vedere un aumento delle suddette complicanze.

CONSIDERAZIONI GENERALI DI CARATTERE ETICO

La maggior parte delle coppie che si avvicina alla diagnosi prenatale si aspetta un esame diagnostico che fornisca chiarezza e dia rassicurazione. In realtà i test di screening e di diagnosi prenatale possono sì fornire un risultato certo e di chiara prognosi in taluni casi ma possono anche portare a situazioni di incertezza e di dubbio in altri. I risultati inaspettati, non correlati e/o non risolutivi il quesito clinico, l'identificazione di una variante genetica di significato incerto oppure un risultato non conclusivo in presenza di un'anomalia fetale possono infatti portare a situazioni delicate da gestire.

Un importante aspetto da considerare è la differenza tra il proporre un esame genetico per ricercare una determinata mutazione suggerita dall'anamnesi familiare o da specifici reperti ecografici patologici e sequenziare l'intero genoma, ancor più se utilizzando il cfDNA. Nel primo caso, la richiesta mirata dovrebbe evitare in un risultato preciso, nel secondo scenario invece vi è il rischio di ottenere un risultato difficilmente interpretabile e con una scarsa utilità diagnostica e clinica. Un esempio può essere l'identificazione di "copy number variants" (CNV) di significato incerto, che possono non manifestarsi clinicamente o avere una variabilità di presentazione fenotipica. Simile problema si pone con la diagnosi di malattie a penetranza incompleta (35,36).

Spesso l'indagine genetica è richiesta come approfondimento dopo il riscontro di un'anomalia all'imaging fetale. Tuttavia quest'ultimo ha sensibilità e specificità variabili, strettamente dipendenti sia dall'esperienza dell'operatore che esegue o interpreta l'esame, sia dalla tecnologia utilizzata. Inoltre, la maggior parte delle condizioni diagnosticabili in utero include presentazioni fenotipiche a differente gravità, per le quali è difficile fornire una prognosi accurata prima del parto ed in molti casi anche dopo (37).

L'interesse delle coppie a sottoporsi a esami prenatali estesi spesso è basato sull'idea che questi possano restituire un numero maggior di informazioni tali da rendere più semplice la decisione circa la prosecuzione

o l'interruzione della gravidanza (37). Purtroppo la reale possibilità, spesso non preventivata, di ricevere risultati di non facile interpretazione può risultare una spiacevole sorpresa. Le risposte emotive rilevate di fronte alla comunicazione di risultati positivi o incerti possono essere diverse in relazione al personale senso di ottimismo e alle personali esperienze ma nella maggior parte dei casi includono shock, ansia, confusione riguardo la mancanza di informazioni e/o le informazioni non certe (38). Inoltre, la percezione di avere a disposizione un tempo limitato per prendere una decisione diventa emotivamente stressante, soprattutto quando si avverte il bisogno della coppia e degli operatori sanitari di ulteriore tempo per interpretare i risultati inattesi e/o incerti. La necessità di ricorrere all'esecuzione di ulteriori esami di approfondimento pone la possibilità di chiarire l'incertezza ma anche di sollevare nuovi dubbi, tanto che le coppie che decidono per la prosecuzione della gravidanza si sentono meno coinvolte negli aspetti emotivi della genitorialità e la sensazione di incertezza e preoccupazione può persistere per l'intera durata della gravidanza (38). Inoltre, nei casi in cui uno o entrambi i componenti della coppia scopra di essere portatore di una variante genetica, vi può essere una ripercussione psicologica importante sulla sfera intima e personale (39).

La decisione in seguito ai risultati di un test di screening o diagnosi prenatale rappresenta un aspetto peculiare. In ambito pediatrico infatti i genitori decidono per i loro figli massimizzando i benefici e riducendo al minimo i danni, bilanciando gli interessi del piccolo paziente e della famiglia (40) mentre le decisioni in ambito prenatale sono una scelta autonoma da parte delle coppie.

Le attuali tecnologie dei test di screening molecolare sono vantaggiose poiché forniscono informazioni clinicamente rilevanti con un rischio di aborto spontaneo inferiore rispetto ad esami invasivi. Tuttavia, l'incertezza che deriva da alcuni risultati può creare ansia oltre al potenziale rischio di interruzione di una gravidanza di un feto che potrebbe essere sano (39). In particolare, i dati relativi alle varianti di significato incerto sono limitati allo stato attuale delle conoscenze e di conseguenza il processo diagnostico per le malattie genetiche, in assenza di studi di storia naturale prospettici e longitudinali, potrebbe talvolta sovrastimarne sia l'incidenza che la gravità (37).

L'aumento della richiesta di screening prenatale, unito alla concomitante attuale carenza di consulenti e genetisti medici (41), rischia di creare una pressione significativa sui ginecologi, che si trovano a richiedere esami genetici prenatali e interpretare in autonomia i risultati. Al fine di soddisfare l'aumentata richiesta, sarebbe necessario fornire agli specialisti medici non genetisti un'adeguata formazione, tale da migliorare la qualità della consulenza pre e post-test genetico, fornendo alla coppia un adeguato supporto.

Tra le malattie potenzialmente diagnosticabili in epoca prenatale rientrano anche quelle con esordio tardivo e questo pone ulteriori problematiche. Le linee guida concordano sul non testare i minori, lasciando loro il diritto

di scelta una volta raggiunta la maggiore età, a meno che non esistano interventi di screening o terapeutici in grado di modificare positivamente la naturale evoluzione della patologia; la diagnosi prenatale nega al futuro adulto la possibilità di decidere se e quando effettuare l'esame genetico. Pertanto in assenza di studi sistematici che valutino l'impatto psicosociale dell'esecuzione di test genetici sui bambini, si raccomanda di evitarli in epoca prenatale qualora vi sia la convinzione di voler comunque portare avanti la gravidanza (42).

Per la malattia di Huntington (HD), una fra le più conosciute malattie con esordio tardivo, le prime linee guida circa il test predittivo risalgono al 1994 e sono state usate come modello per altre patologie di questo tipo, quali la demenza frontotemporale familiare, atassia spinocerebellare e tumori ereditari. Tali linee guida, aggiornate quasi vent'anni dopo, attestano che la decisione di sottoporsi all'esame debba essere del singolo individuo e riportano l'estrema necessità di un'attenta consulenza genetica pre e post-test.

CONCLUSIONI

Le opportunità offerte dalla diagnostica molecolare prenatale seguono la rapida evoluzione delle tecnologie di sequenziamento genomico e di interpretazione dei dati così ottenuti.

Ad oggi, la diagnostica in epoca prenatale è preziosa per la gestione della gravidanza e fondamentale per la gestione del neonato. In futuro, l'evoluzione degli interventi terapeutici fetali e neonatali permetterà di sfruttare appieno le opportunità offerte dalla diagnostica prenatale.

È necessario tuttavia considerare le molteplici problematiche etiche collegate a questo tipo di indagini e come tali aspetti siano amplificati dalla disponibilità di metodologie di analisi molecolare, che permettono di effettuare esami sempre più estesi e con conseguente maggior rischio di risultati inattesi o dubbi. Questi ultimi risultano difficili da gestire sia da parte degli operatori sanitari che della coppia, complicando la possibilità di prendere decisioni informate relativamente alla gestione della gravidanza.

Di certo l'implementazione nonché l'aggiornamento delle linee guida, associata ad una maggiore formazione relativa alla consulenza pre e post-test, permetterà di migliorare ulteriormente il percorso diagnostico delle coppie in epoca prenatale.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Carlson LM, Vora NL. Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2017;44:245-56.
- Bolis G. *Manuale di GINECOLOGIA E OSTETRICIA*. Napoli: EdiSES, 2011:393-415.
- Cariati F, Savarese M, D'Argenio V, et al. The SEEMORE strategy: single-tube electrophoresis analysis-based genotyping to detect monogenic diseases rapidly and effectively from conception until birth. *Clin Chem Lab Med* 2017;56:40-50.
- Cariati F, D'Argenio V, Tomaiuolo R. The evolving role of genetic tests in reproductive medicine. *J Transl Med* 2019;17:267.
- Castaldo G, Lembo F, Tomaiuolo R. Molecular diagnostics: between chips and customized medicine. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:973-82.
- Fuccio A, Iorio M, Amato F, et al. A novel DHPLC-based procedure for the analysis of COL1A1 and COL1A2 mutations in osteogenesis imperfecta. *J Mol Diagn* 2011;13:648-56.
- Tomaiuolo R, Nardiello P, Martinelli P, et al. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: an experience of 181 cases. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:2227-32.
- Veneruso I, Di Resta C, Tomaiuolo R, et al. Current updates on expanded carrier screening: new insights in the omics era. *Medicina (B Aires)* 2022;58:455.
- Polizzi A, Francavilla R, Castaldo G, et al. Phenotypic expression of genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients carrying the 852del22 mutation. *Am J Med Genet* 2005;132A:434-40.
- D'Argenio V, Cariati F, Tomaiuolo R. One4two®: An integrated molecular approach to optimize infertile couples' journey. *Forests* 2021;12:1-12.
- Adzick NS, Thom EA, Spong CY, et al. A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *N Engl J Med* 2011;364:993-1004.
- Häberle J, Boddaert N, Burlina A, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:32.
- Dennis Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:705-8.
- Carbone L, Cariati F, Sarno L, et al. Non-invasive prenatal testing: current perspectives and future challenges. *Genes (Basel)* 2020;12:15.
- Dennis Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-24.
- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 2004;50:1002-11.
- Flori E, Doray B, Gautier E, et al. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report. *Hum Reprod* 2004;19:723-4.
- Cayrefourcq L, Vincent MC, Pierredon S, et al. Single circulating fetal trophoblastic cells eligible for non invasive prenatal diagnosis: the exception rather than the rule. *Sci Rep* 2020;10:9861.
- 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;220:537-42.
- Cambia C. Nuovi livelli essenziali di assistenza www.snlgiss.it/lgn_gravidanza_fisiolo-gica_agg_2011
- Zaami S, Orrico A, Signore F, et al. Ethical, Legal and Social Issues (ELSI) Associated with Non-Invasive Prenatal

- Testing: Reflections on the Evolution of Prenatal Diagnosis and Procreative Choices. *Genes (Basel)* 2021;12:19.
23. Conferma diagnostica dopo NIPT con risultato ad alto rischio, non informativo o sesso discordante https://www.sieog.it/wp-content/uploads/2020/12/2020_10_26_DOCUMENTO_NIPT_DEFINITIVO.pdf
 24. Rosatelli MC. Documento di indirizzo sull'impegno di indagini prenatali non invasive https://sigu.net/wp-content/uploads/2021/01/2016_07_01_DOCUMENTO_DI_INDIRIZZO_NIPT_versione_finale.pdf
 25. Papasavva T, Van Ijcken WFJ, Kockx CEM, et al. Next generation sequencing of SNPs for non-invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to β -thalassaemia. *Eur J Hum Genet* 2013;21:1403-10.
 26. Liu S, Chen L, Zhang X, et al. Primer-introduced restriction analysis polymerase chain reaction method for non-invasive prenatal testing of β -thalassemia. *Hemoglobin* 2015;39:18-23.
 27. Twiss P, Hill M, Daley R, et al. Non-invasive prenatal testing for Down syndrome. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014;19:9-14.
 28. Vossaert L, Chakchouk I, Zemet R, et al. Overview and recent developments in cell-based noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn* 2021;41:1202-14.
 29. Bianchi DW, Wilkins-Haug LE, Enders AC, et al. Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. *Am J Med Genet* 1993;46:542-50.
 30. Firth HV, Boyd PA, Lindenbaum RH, et al. Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56-66 days' gestation. *Lancet* 199;337:762-3.
 31. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, et al. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:16-26.
 32. Navaratnam K, Alfirevic Z. Amniocentesis and chorionic villus sampling. *BJOG* 2022;129: e1-e15.
 33. Farrell SA, Summers AM, Dallaire L, et al. Club foot, an adverse outcome of early amniocentesis: disruption or deformation? *J Med Genet* 1999;36:843.
 34. Kucińska-Chahwan A, Bijok J, Dąbkowska S, et al. Targeted prenatal diagnosis of Pallister-Killian syndrome. *Prenat Diagn* 2017;37:446-52.
 35. Tingaud-Sequeira A, Trimouille A, Sagardoy T, et al. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: new genes and literature review on a complex disease. *J Med Genet* 2022;59:417-27.
 36. Vincenten SCC, Van Der Stoep N, Paulussen ADC, et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy-Reproductive counseling, pregnancy, and delivery in a complex multigenetic disease. *Clin Genet* 2022;101:149-60.
 37. Richardson A, Ormond KE. Ethical considerations in prenatal testing: genomic testing and medical uncertainty. *Semin Fetal Neonatal Med* 2018;23:1-6.
 38. Bernhardt BA, Soucier D, Hanson K, et al. Women's experiences receiving abnormal prenatal chromosomal microarray testing results. 2013;15:139-45.
 39. Stark Z, Gillam L, Walker SP, et al. Ethical controversies in prenatal microarray. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013;25:133-7.
 40. Katz AL, Webb SA, Bioethics CO. Informed Consent in Decision-Making in Pediatric Practice. *Pediatrics* 2016;138:20161485.
 41. Werner-Lin A, Barg FK, Kellom KS, et al. Couple's narratives of communion and isolation following abnormal prenatal microarray testing results. *Qual Health Res* 2016;26:1975-87.
 42. Hercher L, Uhlmann WR, Hoffman EP, et al. Prenatal testing for adult-onset conditions: the position of the national society of genetic counselors. *J Genet Couns* 2016;25:1139-45.