

## Tecniche di diagnosi prenatale a confronto

F. ARCIDIACONO, A. GIANNINOTO, L. SCIASCIA, D. CARASTRO, C. CARDEA,  
L. BIONDO, H. CARASTRO

RIASSUNTO: Tecniche di diagnosi prenatale a confronto.

F. ARCIDIACONO, A. GIANNINOTO, L. SCIASCIA, D. CARASTRO,  
C. CARDEA, L. BIONDO, H. CARASTRO

*Obiettivo: scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare e valutare le metodiche diagnostiche per la diagnosi prenatale. A causa delle incertezze delle indagini di screening, da una parte, e dei rischi legati alle procedure invasive dall'altra, c'è attualmente un considerevole interesse nello sviluppo di nuovi approcci finalizzati ad una diagnosi prenatale non invasiva. Il recupero, l'isolamento e lo studio di cellule fetali dal sangue materno rappresentano il più promettente mezzo diagnostico non invasivo.*

*Materiale e metodo: abbiamo analizzato campioni di sangue di 50 donne gravide selezionate da sottoporre ad amniocentesi (alla 15<sup>a</sup>-18<sup>a</sup> settimana) per una o più indicazioni.*

*Risultati: confrontando i dati ottenuti con i risultati delle amniocentesi, si è visto che tutti quei casi dove fu rilevato un numero significativamente più alto di FNRBCs (coefficiente di significatività  $p < 0,01$ ) nel sangue materno, corrispondevano ad alterazioni genetiche identificate con l'amniocentesi.*

*Conclusioni: la ricerca delle FNRBCs (coefficiente di significatività  $p < 0,01$ ) nel sangue materno rappresenterebbe un significativo test di screening che da un lato aumenterebbe il numero di casi di diagnosi prenatale positiva e dall'altro diminuirebbe il numero di amniocentesi.*

SUMMARY: Comparison between techniques of prenatal diagnosis.

F. ARCIDIACONO, A. GIANNINOTO, L. SCIASCIA, D. CARASTRO,  
C. CARDEA, L. BIONDO, H. CARASTRO

*Objective: aim of our work has been to compare and value diagnostic methods of prenatal diagnosis. Because of the uncertainties of screening tests and because of the risk of invasive procedures currently there is a considerable interest in development of new approaches to non-invasive prenatal diagnosis. The recovery, isolation and analysis of fetal cells from maternal blood may represent the most promising non-invasive diagnostic procedure.*

*Material and Method: we analyzed blood samples from 50 selected pregnant women referred for amniocentesis (performed at 15-18 weeks) for any one or more indications.*

*Results: comparing our results with the amniocentesis results, we have seen that all those cases in which we had identified a significantly (coefficient of significativity  $p < 0,01$ ) higher number of FNRBCs (fetal nucleated red blood cells) in maternal blood, corresponded to genetic abnormalities identified with amniocentesis.*

*Conclusions: the research of FNRBCs from maternal blood may represent a significant screening test that, from one side, increases the number of cases of positive prenatal diagnosis and, from the other one, reduces the number of amniocentesis.*

KEY WORDS: Amniocentesi - Bi-test - Diagnosi prenatale - Screening - Cellule fetali.  
Amniocentesis - Bi-test - Prenatal diagnosis - Screening - Fetal cells.

## Introduzione

Negli ultimi 30 anni si sono verificati degli enormi miglioramenti nelle conoscenze dello sviluppo del feto nell'utero materno, dal momento del concepimento fino alla nascita, grazie anche alla progressiva diffusione

delle tecniche della diagnosi prenatale che coinvolgono le competenze di medici ostetrici-ginecologi, di citogenetisti, di genetisti molecolari e di biochimici.

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

Università degli Studi di Catania  
Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Scienze Microbiologiche  
Ospedale S.Bambino  
(Direttore: C. Pafumi)

© Copyright 2006, CIC Edizioni Internazionali, Roma

Secondo una recente indagine effettuata dall'Istituto Superiore della Sanità, in Italia vi è una preoccupante carenza di conoscenze sulle principali tecniche diagnostiche prenatali. Infatti, secondo questo studio, il 30% delle donne in gravidanza non sa nulla della diagnosi prenatale, il cui obiettivo fondamentale è quello di consentire una *Procreazione Responsabile*.

Questo obiettivo si può ottenere offrendo ai genitori le migliori informazioni possibili sulle varie tecniche diagnostiche e sui rischi di dare alla luce un bambino con una anomalia congenita.

Attraverso una diagnosi precoce, spesso è possibile fornire il trattamento ottimale per molte delle gravidanze affette, grazie alla scelta della sede, del momento e della modalità migliore per il parto.

Nei casi più gravi, come quando ad esempio la malformazione fetale non sia compatibile con la vita od anche quando siano accertate *“rilevanti anomalie o malformazioni del nascituro che determinino un grave pericolo per la salute fisica o psichica della madre”*, vi è la possibilità di optare – anche se dolorosamente – per una interruzione volontaria della gravidanza, secondo quanto previsto dalla Legge n. 194 del 1978.

In molti altri casi invece, fortunatamente, è possibile rassicurare le coppie e ridurre il notevole livello di ansietà associato spesso ad un evento tanto importante e delicato – nella vita di ciascuno – come la riproduzione umana.

Fin dai tempi dei grandi medici dell'antichità, come Ippocrate e Galeno, l'etica ha sempre avuto un ruolo fondamentale nel guidare il comportamento del medico.

Certamente non è facile semplificare l'approccio ai problemi etici nella medicina in generale ed è ancora più difficile realizzare un simile obiettivo nel settore della riproduzione umana.

Questo è ancora più vero per una società disomogenea e multi-etnica, come quella attuale, composta da una pluralità di individui con diverse nazionalità, culture, tradizioni, religioni.

Nella storia della Medicina – schematicamente – il rapporto medico-paziente è stato contrassegnato, nei tempi successivi, prevalentemente da tre indirizzi: autoritario, paternalistico, libertario.

L'indirizzo *autoritario* ha dominato i rapporti medico-paziente fino ai primi decenni di questo secolo: il medico era il depositario del sapere; il paziente, viceversa, era ignorante in materia e quindi non aveva il diritto di discutere con il curante gli indirizzi diagnostici o terapeutici, ma aveva soltanto la possibilità di accettare e subire passivamente quanto descritto.

L'indirizzo *paternalistico* è andato progressivamente sostituendo quello autoritario. Il paziente, influenzato dalla personalità del medico e dalla fiducia che esso ispira, si affida completamente a quanto gli viene sug-

gerito, come farebbe un figlio con il padre. Ancora una volta, però, la libertà del paziente è estremamente esigua ed il medico conserva tutto il potere decisionale.

L'ultimo indirizzo, quello *libertario* è andato sempre più sviluppandosi negli ultimi anni, nelle società più avanzate. Il medico resta depositario delle conoscenze sanitarie ma il suo atteggiamento nei riguardi del paziente è cambiato: egli è il titolare di un servizio e pertanto mette a disposizione dei pazienti le sue conoscenze scientifiche.

Compito del ginecologo moderno, quindi, non è quello di scegliere al posto della coppia ma, al contrario, è quello di informare – senza lasciare prevalere la parzialità delle opinioni personali – in maniera chiara, esauriente e corretta sui rischi ed i benefici delle varie tecniche diagnostiche disponibili nel settore della medicina prenatale e sulle conseguenze che potrebbero verificarsi se qualche esame non fosse effettuato.

Per questa ragione, i test di screening dovrebbero essere effettuati nel totale rispetto di una effettiva libera scelta della donna in gravidanza.

Circa il 3% dei neonati è affetto da una malattia o anomalia congenita. In molti casi questa può essere prevista, diagnosticata, trattata o prevenuta attraverso la conoscenza e l'identificazione dei fattori di rischio che ne sono alla base e l'adozione di opportune tecniche di indagine. La diagnosi prenatale comprende appunto l'insieme delle procedure che permettono di riconoscere o escludere la presenza nel feto di anomalie congenite.

Esistono quattro gruppi principali di patologie fetali, nelle quali è possibile la diagnosi prenatale: anomalie cromosomiche, geniche (tra cui rientrano gli errori congeniti del metabolismo e le emoglobinopatie), malformazioni congenite e infezioni.

*Anomalie cromosomiche.* Queste malattie sono causate da alterazioni nel numero (anomalie numeriche o aneuploidie) o nella struttura (anomalie strutturali) dei cromosomi. Possono essere in linea pura, cioè presenti in tutte le cellule dell'individuo o, più raramente, in mosaico, cioè solo in una percentuale variabile di cellule, ed interessare gli autosomi o i cromosomi sessuali.

Le più comuni sono le anomalie numeriche e tra queste in particolare le trisomie, nelle quali è presente un cromosoma soprannumerario in una coppia. Esse non sono in genere trasmesse ereditariamente, ma insorgono quasi sempre per fenomeni di non disgiunzione, verificatesi prima del concepimento o subito dopo. Il più importante fattore causale della non disgiunzione è rappresentato dall'invecchiamento degli ovociti legato all'età materna.

Le anomalie strutturali, quali delezioni e traslocazioni, sono molto più rare, ma possono essere trasmesse da uno dei genitori che ne sia portatore sano.

In linea di massima le anomalie cromosomiche, ed

in particolare quelle degli autosomi, determinano in chi ne è affetto danni a livello fisico, mentale e psicomotorio, rendendosi responsabili di tipiche sindromi cliniche (Tab. 1).

**Malattie geniche.** Più di 7.000 malattie conosciute sono legate ad alterazioni a livello di singoli geni, codificanti la sintesi di proteine strutturali o funzionali anomale. Solo una parte di esse sono diagnosticabili in epoca prenatale. Il loro numero è comunque in continua crescita, in seguito soprattutto al diffondersi delle tecniche di analisi del DNA. A tal proposito può essere interessante sapere che è in corso di realizzazione un progetto internazionale, ideato nel 1986 dal Prof. R. Dulbecco, denominato *Progetto Genoma Umano*, che permetterà di giungere, tra qualche anno, alla mappatura completa del genoma umano. Il genoma è costituito dall'insieme dei geni, localizzati all'interno dei cromosomi. Ogni gene codifica una proteina la quale svolge un'azione specifica. Qualunque alterazione di ogni singolo gene può manifestarsi con un'anomalia, clinicamente evidente in un individuo. Si stima che

nell'uomo esistano tra gli 80.000 ed i 100.000 geni diversi, i quali sono presenti all'interno del nucleo delle cellule in due copie: una di provenienza materna e l'altra paterna. Quindi, complessivamente, in ogni cellula sono conservati tra i 160.000 ed i 200.000 geni. Considerando il numero dei laboratori coinvolti nella ricerca in tutto il mondo ed il tempo medio necessario per la decodifica di ogni gene, si stima che il progetto potrà essere completato entro l'anno 2005.

Tra le malattie geniche distinguiamo:

- A. **Malattie autosomiche dominanti:** interessano in genere proteine strutturali e si traducono clinicamente in sindromi malformative scheletriche o in malattie spesso insorgenti in età adulta. La situazione tipica è quella nella quale uno dei genitori è affetto e ha una probabilità del 50% di trasmettere la malattia alla prole, indipendentemente dal sesso.
- B. **Malattie autosomiche recessive:** nelle quali, perché si manifesti la malattia nella prole, è necessario che entrambi i genitori siano portatori sani dello stesso gene. In questo caso il rischio di trasmissione è del

TABELLA 1 - SINDROMI CROMOSOMICHE PIÙ FREQUENTI.

Anomalia e sindrome	Intelligenza	Principali segni generali	Fertilità	Prognosi
Trisomia 21 (S. di Down)	Ritardo mentale ( $QI=25-50$ )	Ipotonia, brachicefalia, microcefalia, facies tipica, difetti cardiaci nel 40%	Sterilità maschile, subfertilità femminile	Attesa di vita ridotta (<40-50 anni) per la cardiopatia e la predisposizione alla leucemia acuta
Trisomia 18 (S. di Edwards)	Grave ritardo mentale	Grave ritardo di crescita, facies tipica; difetti cardiaci > 50%, renali 10-50%, intestinali 10-50%	Non raggiungono l'età fertile	Generalmente incompatibile con la vita postnatale
Trisomia 13 (S. di Patau)	Grave ritardo mentale	Oloprosencefalia, anomalie facciali, difetti neurologici nel 50%, cardiaci nell'80%, renali nel 30%	Non raggiungono l'età fertile	Generalmente incompatibile con la vita postnatale
S. di Klinefelter (47, XXY)	QI normale o lievemente ridotto	Ipogonadismo in soggetto di sesso maschile	Sterilità	Attesa di vita normale. Possibili problemi comportamentali
S. di Turner (45, X)	QI generalmente normale	Sesso femminile. Disgenesia ovarica; bassa statura; pterigium colli; coartazione aortica	Sterilità (fertilità possibile in caso di mosaico)	Attesa di vita normale
S. del doppio Y (47, XYY)	QI generalmente normale	Sesso. Alta statura	Fertilità normale	Attesa di vita normale. Possibili problemi comportamentali
S. del triplo X (47, XXX)	QI normale o lievemente ridotto	Aspetto fisico normale	Fertilità normale	Attesa di vita normale. Possibili problemi comportamentali

25%, indipendentemente dal sesso. In questo gruppo rientrano la maggior parte degli errori congeniti del metabolismo e delle malattie genetiche diagnosticabili con l'amniocentesi o meglio con il prelievo dei villi coriali attraverso la dimostrazione del difetto biologico o enzimatico o del DNA.

C. **Malattie legate al cromosoma X (X-linked):** nelle quali la madre è portatrice sana del difetto genetico in uno dei due cromosomi X. Il rischio di trasmissione è del 50% per i soli figli maschi, mentre le femmine hanno un rischio del 50% di essere a loro volta portatrici. Molte di queste malattie sono diagnosticabili attraverso esami biochimici o l'analisi del DNA. Dove ciò non sia possibile, può essere offerta la diagnosi di sesso fetale.

Nella Tabella 2 vengono indicate le principali malattie attualmente diagnosticabili mediante l'analisi del DNA.

TABELLA 2 - PRINCIPALI MALATTIE GENICHE DIAGNOSTICABILI IN EPOCA PRENATALE CON ANALISI DEL DNA.

Malattia	Modo di trasmissione
Talassemia alfa e beta	AR
Fibrosi cistica	AR
Malattia di Gaucher	AR
Distrofia muscolare di Duchenne	XLR
Sindrome del cromosoma X fragile	XLR
Emofilia A\B	XLR
Sindrome di Marfan	AD
Malattia di Tay-Sachs	AR
GM1- Gangliosidosi	AR
GM2-Gangliosidosi	AR
Rene policistico dell'adulto tipo 1	AD
Ipofosfatasia	AR
MPSI Pfaundler-Hurler	AR
MPAIII Pfaundler-Hurler	AR
MPSIV Morquio	AR
Sindrome surreno genitale	AR
Malattia di Krabbe	XLR
MPS II Hunter	XLR
Sindrome di Wiskott-Aldrich	XLR
Sindrome di Lowe	XLR
Malattia di Niemann-Pick	AR
Deficit di alfa-1-antitripsina	AR
Acidemia propionica	AR
Condrosplasia puntata	AR
Atrofia muscolare spinale SMA II	AR

AR = autosomica recessiva; AD = autosomica dominante;  
XLR = X-linked recessiva

1. **Malformazioni congenite:** circa il 2% dei neonati è affetto da un difetto morfologico, che può interessare un singolo organo o distretto del corpo, o presentarsi in associazione ad altre malformazioni e spesso anche a deficit mentali e motori, configurando talora vere e proprie sindromi. Le cause di tali problematiche possono essere molteplici e comprendono anomalie cromosomiche, difetti genetici, esposizione a teratogeni (farmaci, radiazioni, virus o malattie materne come il diabete o l'epilessia). Molte delle più comuni malformazioni congenite, come i difetti del tubo neurale (anencefalia e spina bifida), la labiopalatoschisi, numerose cardiopatie congenite, sono comunque dovute ad una combinazione di fattori genetici predisponenti ed ambientali scatenanti, con un meccanismo di trasmissione che viene chiamato multifattoriale. In linea di massima i rischi di ricorrenza, dopo la nascita di un figlio affetto, oscillano tra il 2% e il 5%, ma dipendono da fattori come: il tipo di malformazione, la sua gravità, il sesso della persona affetta. Le malformazioni congenite sono spesso diagnosticate per mezzo dell'ecografia, attraverso un accurato studio morfologico fetale nel secondo trimestre.
2. **Infezioni fetali.** Alcuni agenti infettivi possono rendersi responsabili di infezioni nel prodotto del concepimento, tali da produrre anomalie, disfunzioni d'organo, difetti dell'accrescimento e talora anche la morte in utero. Le principali tra queste, che possono essere anche diagnosticabili in epoca prenatale con differenti modalità (analisi del DNA, indagini immunoematologiche, evidenziazione diretta o in coltura dell'agente patogeno, dimostrazione ecografica di eventuali anomalie fetali) sono rappresentate da: rosolia, toxoplasmosi, infezione da citomegalovirus, varicella, infezione da parvovirus B19.

## Tecniche non invasive di screening prenatale

Lo screening della patologia congenita fetale si avvale oggi di varie tecniche indirette che permettono, attraverso la valutazione nel sangue materno di determinate sostanze di origine fetale o placentare o di caratteristiche strutturali del feto rilevabili con l'ecografia, di individuare situazioni che possono configurare un rischio accresciuto di anomalie fetali, soprattutto cromosomiche.

Esse possono essere quindi usate alternativamente o anche in integrazione tra loro, nelle gravidanze considerate a basso rischio, per selezionare i casi a rischio più elevato, da indirizzare alla diagnosi prenatale.

Il vantaggio di tali tecniche è naturalmente rappre-

sentato dalla loro mancanza di invasività sul feto, che le rende appunto utilizzabili su larga scala su tutta la popolazione ostetrica, senza rischi di complicazioni sul decorso della gravidanza.

Il limite è però dato dal fatto di non dare una diagnosi diretta, ma solo una indicazione di rischio che, in ultima analisi risolve l'attesa diagnostica della gravidanza. Il problema diviene particolarmente sentito allorché il test configuri un rischio più elevato di quello atteso in base all'età, ma non tanto alto da rendere indicato il ricorso alla diagnosi diretta.

L'esecuzione dei test di screening è dettata dall'età gestazionale. Ecco quindi che distinguiamo tecniche da effettuare nel primo trimestre di gravidanza, quali il *Bi test* e l'*indagine ecografica* (in particolare la *translucenza nucale*), e tecniche da effettuare nel secondo trimestre, quali il *Tri test*.

### Bi test (o Ultrascreening)

È il test di screening biochimico di più recente acquisizione, che si esegue tra la 10° e la 14° settimana. Esso consiste nel dosaggio nel sangue materno della frazione  $\beta$  libera della gonadotropina corionica umana ( $\beta$ -HCG) e della PAPP-A (*pregnancy-associated plasma protein* = proteina A associata alla gravidanza) e in un esame ecografico, per stabilire precisamente l'epoca della gravidanza. La  $\beta$ -HCG e la PAPP-A subiscono delle variazioni in presenza di anomalie del cariotipo, in particolare è stata studiata l'associazione con la trisomia 21, la più frequente anomalia cromosomica presente alla nascita: un aumento della  $\beta$ -HCG ed una diminuzione della PAPP-A sono considerati indice di un aumentato rischio di sindrome di Down. Le variazioni delle concentrazioni delle due sostanze moltiplicate per il rischio di base, dato dall'età materna, permette di calcolare il rischio individuale, individuando quelle pazienti più a rischio, alle quali eventualmente offrire l'opportunità di una diagnosi prenatale. L'attendibilità dell'esame è circa pari a quella del Tri test, riuscendo a riconoscere circa il 60% dei casi di sindrome di Down, una percentuale maggiore rispetto a quella attesa per la sola età materna. Secondo recenti studi, questa percentuale può salire fino ad oltre l'80% se si integra con il dato ecografico dello spessore della plica nucale. Attualmente nel Regno Unito, grazie a metodiche automatizzate come il Kriptor, è possibile ottenere il dosaggio della  $\beta$ -HCG e della PAPP-A entro 30 minuti dal prelievo. Grazie a questa tecnica, è stata realizzata, la *One-Stop Clinic for Assessment of Risk* (OSCAR) con la quale in un'ora si fornisce alla paziente il dosaggio dei marker biochimici, la misurazione della translucenza nucale e la consulenza riguardante il rischio combinato.

### Screening ecografico

L'esame ecografico eseguito in epoca prenatale può diagnosticare una certa quantità di malformazioni e la precoce identificazione, oltre ai potenziali effetti sul tasso di handicap e sulla mortalità perinatale, permette delle scelte che vanno oltre l'interruzione della gravidanza. In alcune condizioni è proponibile una terapia intrauterina e, laddove essa non sia indicata, una diagnosi accurata può aiutare a decidere il corso successivo del management ostetrico, a scegliere il luogo più appropriato per la nascita dove le cure post-natali siano più consone e tempestive. Inoltre la preparazione psicologica dei genitori alla nascita di un bambino che avrà problemi può essere migliore se acquisita gradualmente durante la gravidanza. In pratica, lo screening ultrasonografico è applicabile a due tipi di popolazione, un gruppo ad alto rischio e l'altro a basso rischio. In termini generali lo screening sulla popolazione ad alto rischio è teoricamente più facile, essendo note le particolari anomalie da ricercare. Nella popolazione a basso rischio lo screening deve prevedere una valutazione quanto più accurata possibile di tutta l'anatomia fetale in modo sistematico, in un tempo ragionevolmente breve e in un'epoca precisa della gravidanza, sufficientemente avanzata per rilevare la maggior parte delle malformazioni (compatibilmente quindi alla possibilità di identificazione delle strutture e alla storia naturale delle anomalie), ed al tempo stesso sufficientemente precoce per programmare eventuali esami complementari e permettere, per le patologie più gravi, l'interruzione della gravidanza, nei termini previsti dalla legge. Va comunque considerato che il 90% dei neonati malformati nasce da coppie in cui non è stato identificato alcun fattore di rischio ed è pertanto proprio questa la situazione in cui gli ecografisti si trovano ad operare. A tutt'oggi non sono molti i lavori in letteratura concernenti i risultati dello screening ultrasonografico delle malformazioni. Va ricordato che la sensibilità e specificità variano, oltre che in funzione dell'epoca gestazionale e dell'organo/apparato considerato, anche in base ad altri parametri tecnici quali l'ecografo utilizzato, la posizione del feto, la quantità di liquido amniotico e lo spessore della parete addominale materna. Nell'ambito del primo trimestre di gravidanza, una tecnica ecografica di screening eseguita è la misurazione della translucenza nucale (detta anche plica retronucale). Quest'ultima corrisponde ad un ispessimento dei tessuti della regione posteriore del collo fetale, compreso tra la colonna vertebrale e la cute, valutabile ecograficamente a partire dalla 10° settimana di gravidanza. Il suo spessore aumenta nelle prime settimane per poi diminuire fino a scomparire dopo la 14° settimana. Un aumento dello spessore, dovuto ad un accumulo transitorio di liquidi

per meccanismi fisiopatologici in gran parte sconosciuti, è spesso associato ad anomalie del cariotipo. Per tale motivo la valutazione dello spessore rettronucleare, mediante un'ecografia transvaginale o transaddominale tra la 10<sup>°</sup> e la 14<sup>°</sup> settimana, è utilizzata per lo screening delle anomalie del cariotipo. In effetti questa misurazione consente di individuare madri a rischio di partorire feti affetti non solo da cromosomopatie, ma anche da molte cardiopatie, nonché da altre malformazioni di tipo osteoarticolare (ricordiamo che il Tri test individua invece solo una cromosomopatia, quella legata alla sindrome di Down). L'attendibilità del risultato è alta, raggiungendo una sensibilità del 70% che aumenta se si associa al Bi test. Come già sopra accennato, è stata inoltre verificata l'associazione tra ispessimento della plica nucleare e difetti cardiaci, anche in presenza di un cariotipo fetale normale. In tal caso è opportuno un esame ecografico alla 20<sup>°</sup> settimana per un attento studio della morfologia cardiaca. Altra valutazione ecografica nel primo trimestre, anche se ancora in fase sperimentale, è quella delle ossa nasali. Infatti, i feti affetti per esempio da trisomia 21 e 18 hanno ritardi generalizzati delle ossificazioni, tra cui anche quelli delle ossa nasali. Mettendo insieme la misurazione della translucenza nucleare con la valutazione delle ossa nasali, quindi solo con uno screening ecografico, si avrebbe una sensibilità nei confronti della trisomia 21 del 92%, con falsi positivi del 3%.

## **Tri test**

È il test di screening biochimico più largamente utilizzato; si esegue tra la 15<sup>°</sup> e la 17<sup>°</sup> settimana e consiste nel dosaggio ematico materno dell'alfa-fetoproteina (AFP), dell'HCG e dell'estriolo non coniugato, associato ad un esame ecografico, per stabilire precisamente l'epoca di gravidanza. I risultati ottenuti in relazione all'età materna permettono di calcolare il rischio al quale è esposta la donna e di decidere se tale rischio risulta maggiore di un certo valore soglia, l'opportunità di eseguire un'amniocentesi. L'alfa-fetoproteina è una proteina oncofetale prodotta dal fegato fetale e dal sacco vitellino; si utilizza per lo screening della sindrome di Down (SD) e dei difetti del tubo neurale. In presenza di sindrome di Down diminuisce di circa il 25-30% nel liquido amniotico e nel sangue materno, rispetto ai controlli; invece in caso di difetti del tubo neurale o della parete addominale aumenta in maniera significativa, indicando in questo caso l'opportunità di eseguire un esame ecografico per lo studio della morfologia fetale. L'estriolo non coniugato è un ormone steroideo, prodotto dal sinciziotrofoblasto, che ha precursori prodotti dal fegato fetale e, come l'AFP, diminuisce di circa il 25-30% in caso di SD.

L'hCG, la gonadotropina corionica umana, è anch'essa un prodotto di secrezione del sinciziotrofoblasto e ha un valore circa doppio nelle gravidanze complicate da una SD. L'effettuazione del Tri test viene routinariamente proposta alle pazienti di età inferiore a 35 anni; il test però può anche essere effettuato dalle pazienti di età superiore a 35 anni che non vogliono sottoporsi all'amniocentesi (Tab. 3).

Tri test positivo significa che si ha un alto rischio di avere un feto affetto, ma non significa che il feto sia sicuramente malato. Se ad esempio il rischio è 1:200, si hanno 199 probabilità di avere un feto sano ed 1 probabilità di avere un reale problema cromosomico. Sulla base di questa stima, la paziente può decidere se effettuare o meno un'amniocentesi. La soglia del rischio attualmente utilizzata è di 1:250. Qualsiasi soglia deve essere comunque considerata come arbitraria.

L'attendibilità del Tri test è abbastanza alta, riuscendo a riconoscere circa il 60% dei casi di SD, una percentuale quindi maggiore rispetto a quella attesa per la sola età materna. Il test risulta però poco attendibile nelle seguenti condizioni:

- Elevato peso materno
- Diabete insulino-dipendente
- Gemellarità
- Precedente figlio affetto da sindrome di Down
- Precedente falso positivo.

## **Tecniche invasive di diagnosi prenatale**

La diagnosi diretta delle principali anomalie genetiche del feto è possibile solo con il prelievo e l'analisi di cellule o tessuti fetali. Ciò può essere effettuato attraverso tre tecniche principali: la biopsia dei villi coriali o villocentesi, l'amniocentesi e la funicolocentesi o cordocentesi. Le potenzialità diagnostiche e quindi anche le indicazioni generali di queste tecniche sono analoghe. Esse si differenziano tra loro per epoca di effettuazione, tipo di tessuto fetale utilizzato, tecniche di laboratorio, tempi di risposta e rischi di complicazioni associate, per cui nella pratica clinica il campo di impiego di ciascuna metodica finisce per assumere configurazioni sufficientemente differenziate (vedi Tabella 3). Uno dei fattori più importanti che influenza la scelta della coppia è l'epoca del prelievo. Sicuramente la precocità dell'intervento porta ad una notevole riduzione dell'ansia di attesa e riduce i traumi fisici e psicologici di un eventuale interruzione terapeutica della gravidanza effettuata in epoca gestazionale tardiva. Per questi motivi la richiesta di tecniche sempre più precoci è destinata ad aumentare, soprattutto nelle gravidanze a rischio genetico elevato (per esempio talassemia, fibrosi cistica, emofilia, Duchenne), o quando la coppia sia reduce da precedenti esperienze negative.

TABELLA 3 - METODI DI SCREENING DI SINDROME DI DOWN A CONFRONTO.

Confronto tra i vari metodi di screening per la sindrome di Down ( <i>trisomia 21</i> )		
	Sensibilità del test	Falsi positivi
Età materna	30%	45%
Tri Test ( <i>T. di Wald</i> )	60%	15%
Età materna + traslucenza nucale	75%	5%
Età materna + traslucenza nucale + $\beta$ hCG + PAPP-A	85%	3%
Età materna + traslucenza nucale + *ossa nasali	92%	3%
Età materna + traslucenza nucale + *ossa nasali + $\beta$ hCG + PAPP-A	98%	2%

$\beta$ -hCG = frazione libera della  $\beta$ -gonadotropina corionica umana;  
PAPP-A = proteina plasmatica associata alla gravidanza.  
\*N.B. La valutazione ecografica delle ossa nasali è ancora in fase sperimentale, i dati potrebbero subire prossimamente delle variazioni.

Oltre le tecniche di diagnosi prenatale sopra menzionate, che riguardano il periodo post-impianto, esistono tecniche attuabili nella fase del concepimento e del preimpianto. Benché siano ormai nati circa 200 bambini sani dopo diagnosi pre-concepimento o pre-impianto, questo tipo di analisi genetica è da considerarsi ancora allo stadio sperimentale, ed è stata applicata solo in pochi centri al mondo. Infatti, l'utilizzo

di tecniche di fecondazione *in vitro*, di micromanipolazione e dell'analisi genetica di una singola cellula ed i costi molto alti ne limitano ancora una larga diffusione. In attesa che la diagnosi pre-impianto possa diventare routinaria, le tecniche di diagnosi prenatale invasiva più comunemente applicate sono, come già detto, la villocentesi, l'amniocentesi e la funicolocentesi (Tab. 4).

TABELLA 4 - TECNICHE DI DIAGNOSI PRENATALE A CONFRONTO.

	VILLOCENTESI	AMNIOCENTESI	FUNIColocENTESI
<b>Epoca (settimane)</b>	10-12	15-17	>18°
<b>Regime</b>	Ambulatoriale	Ambulatoriale	Breve Day Hospital
<b>Preparazione della paziente</b>	Nessuna. Necessario il gruppo sanguigno	Nessuna. Necessario il gruppo sanguigno	Nessuna. Necessario il gruppo sanguigno
<b>Tessuto analizzato</b>	Trofoblasto	Liquido amniotico	Sangue
<b>Tecnica di laboratorio</b>	1. Indagini citogenetiche: dirette e dopo coltura cellulare	Indagini citogenetiche dopo coltura cellulare	1. Indagini citogenetiche dopo coltura dei linfociti
	2. Analisi del DNA		2. Analisi sierologiche, ematologiche, ecc. ( <i>casi specifici</i> )
<b>Tempi medi di risposta</b>	1. Indagini citogenetiche: 3 giorni con tecnica diretta; 3 settimane con coltura	3 settimane ( <i>possibile esito parziale 2-3 giorni con FISH</i> )	1. Indagini citogenetiche: 3-5 giorni
	2. DNA: 2-3 settimane		2. Altre analisi: variabile in rapporto al tipo
<b>Rischio di aborto (%)</b>	0,5-2	0,5-1	2-3

## Come si esegue la diagnosi prenatale: aspetti pratici delle singole metodiche

### *La biopsia dei villi coriali (CVS)*

La biopsia dei villi coriali, o villocentesi, consiste nell'aspirazione di una piccola quantità di tessuto coriale (10-15 mg). Le cellule presenti nei villi coriali, che costituiscono la parte fetale della placenta e che hanno la stessa origine embriologica del feto, una volta analizzate e poste in coltura, vengono esaminate dal punto di vista del corredo cromosomico.

**Preparazione:** l'esame è indolore e non richiede anestesia locale, né alcuna preparazione particolare della paziente. È opportuna la conoscenza preliminare del gruppo sanguigno, per procedere, in caso di gravida Rh negativa con partner positivo, alla immunoprofilassi anti-D dopo il prelievo.

**La tecnica:** viene eseguita in genere tra la 10<sup>o</sup> e la 12<sup>o</sup> settimana, ma può anche essere effettuata in epoche più avanzate della gravidanza (prende allora il nome di biopsia placentare). Essa consiste nel prelievo, sotto controllo ecografico continuo, di alcuni frammenti di tessuto coriale, mediante l'introduzione per via transaddominale di un ago guida, che raggiunge la parete uterina e di un ago da prelievo che, scorrendo all'interno della guida, viene sospinto fino al trofoblasto. Quest'ultimo, dal quale deriverà la futura placenta, contiene infatti materiale genetico identico a quello fetale, che può essere utilizzato per lo studio del cariotipo e per tutte le analisi genetiche in genere eseguibili sulle cellule fetali. Dopo aver prelevato alcuni frammenti di materiale, si rimuove l'ago da prelievo (lasciando la guida in sede) e si verifica l'adeguatezza del campione prelevato. Se questo è sufficiente, si rimuove anche l'ago guida e si ricontrolla la vitalità fetale. In caso contrario, si reinsertisce l'ago da prelievo nella guida e si asporta una ulteriore piccola quantità di trofoblasto.

**Dopo il prelievo:** non sono necessarie terapie particolari. L'insorgenza di crisi dolorose addominali o di lipotimie dopo il prelievo è molto rara; la gravida può comunque essere tenuta sotto controllo per alcuni minuti dopo il CVS, quindi dimessa senza altri accorgimenti. Viene generalmente consigliato un giorno di riposo e la ripresa graduale delle proprie attività.

**Il risultato:** sul tessuto coriale possono essere eseguite sia indagini citogenetiche, che biochimiche e del DNA. Anzi, si può ritenere che i villi rappresentino il tessuto d'elezione a quest'ultimo riguardo. Le analisi citogenetiche vengono generalmente effettuate in due fasi: rapida, dopo breve incubazione, sulle mitosi spontanee del citotrofoblasto, che fornisce un primo risultato entro 2-3 giorni dal prelievo, e dopo coltura delle cellule mesenchimali, che fornisce l'esito definitivo in 2-3 settimane.

**Indicazioni:** l'esame viene proposto alle pazienti ad elevato rischio di anomalie cromosomiche nei seguenti casi:

- età materna superiore a 35 anni;
- aumentato rischio di patologia cromosomica evidenziato all'ecografia eseguita per la misurazione della translucenza nucale;
- precedente figlio affetto da anomalia cromosomica;
- genitori portatori di alterazioni cromosomiche.

Inoltre, in caso di rischio per alcune malattie ereditarie (talassemia alfa e beta, emofilia A e B, fibrosi cistica, ecc.) può essere effettuata l'analisi del DNA.

**Rischi:** i rischi fetali sono:

- rischio aggiuntivo di aborto, rispetto a quello di base, pari all'1%;
- malformazioni: vi sono alcune segnalazioni circa un'aumentata incidenza di malformazioni a carico di arti e viso, in riferimento a prelievi eseguiti molto precocemente. Recenti esperienze su casistiche molto ampie hanno riportato un'incidenza di malformazioni sovrapponibile a quella attesa nella popolazione generale.

I rischi materni sono rari. Possono verificarsi perdite ematiche e/o liquide dai genitali, contrazioni uterine, infezioni intrauterine con febbre, ecc.

**Attendibilità:** il risultato dell'esame è altamente attendibile. Esiste la possibilità che il risultato dell'esame non sia definitivo, rendendosi eventualmente necessari ulteriori accertamenti quali l'amniocentesi e/o la fuicolocentesi.

### *L'amniocentesi*

L'amniocentesi consiste nel prelievo di circa 20 ml di liquido dal sacco amniotico: le cellule presenti in tale liquido, provenienti dallo sfaldamento del feto, una volta poste in coltura, vengono esaminate dal punto di vista del loro corredo cromosomico.

**Preparazione:** è analoga a quella del CVS.

**La tecnica:** viene eseguita, per indicazioni genetiche, tra la 15<sup>o</sup> e la 18<sup>o</sup> settimana di gravidanza e consiste nel prelievo di 20 ml di liquido amniotico, mediante l'introduzione di un sottile ago in cavità amniotica sotto controllo ecografico continuo. Questo contiene cellule di sfaldamento provenienti dalla cute o dalle mucose del feto. L'esame è preceduto da un controllo ecografico per lo studio della vitalità fetale, dell'epoca gestazionale e dell'inserzione placentare.

Recentemente è stata messa a punto anche un'amniocentesi molto precoce che si effettua a 10-14 settimane e necessita di un prelievo di pochi ml di liquido amniotico (2-3 ml). La possibilità di eseguirla non ha trovato, però, larga diffusione e unanimi consensi, per i rischi di abortività, di malformazioni fetali e di insuccessi diagnostici, considerati ancora



troppo alti rispetto alla villocentesi ed alla amniocentesi tradizionale.

**Dopo il prelievo:** non sono necessarie terapie particolari e la gravida può essere dimessa pochi minuti dopo l'amniocentesi. Viene generalmente consigliato un giorno di riposo e, successivamente, la graduale ripresa delle proprie attività astenendosi dall'effettuare viaggi, lavori pesanti, attività sessuale per circa una settimana.

**Il risultato:** l'indagine che viene comunemente eseguita sul liquido amniotico è la determinazione del cariotipo fetale. A questo scopo le cellule fetali presenti nel liquido amniotico devono essere prima poste in coltura e stimolate ad entrare in mitosi: l'esito delle indagini richiede quindi un tempo tecnico di almeno 2-3 settimane. La lunghezza dei tempi di risposta può in parte essere abbreviata ricorrendo alla tecnica detta FISH (*Fluorescent In Situ Hybridation*, ibridazione *in situ* fluorescente) che può permettere lo studio dei cromosomi sulle cellule non in mitosi. Con questa tecnica è possibile ottenere informazioni relative al numero di specifici cromosomi presenti: nella pratica essa può essere utilizzata per avere, nel giro di poche ore, il numero dei cromosomi 21 (e se necessario 13 e 18) e dei cromosomi sessuali, permettendo così di escludere rapidamente le anomalie cromosomiche più frequenti (trisomia 21 e anomalie dei cromosomi sessuali). In aggiunta all'esame citogenetico, viene effettuato un esame biochimico che consiste nel dosaggio dell'alfa-fetoproteina (AFP), una particolare proteina prodotta dal fegato del feto. Nel caso in cui il suo valore fosse eccessivamente elevato, questo indicherebbe la possibilità di alcune severe malformazioni fetali quali:

1. difetti del tubo neurale come la spina bifida, l'anencefalia o il meningocele;
2. difetti della parete addominale come l'onfalocele o la gastroschisi;
3. ostruzioni prossimali del tratto gastro-intestinale;
4. anomalie renali;
5. tumori cisto-adenomatoidi del polmone;
6. l'igroma cistico del collo, il teratoma sacro-coccigeo.

In caso di riscontro di aumentata AFP occorre, quindi, effettuare un accurato esame ecografico mirato alla identificazione di tali malformazioni.

**Indicazioni:** le principali indicazioni per eseguire un'amniocentesi diagnostica per anomalie cromosomiche sono le seguenti:

- età materna superiore a 35 anni;
- aumentato rischio di patologia cromosomica evidenziato all'ecografia eseguita per la misurazione delle trasparenze nucale;
- aumentato rischio di patologia cromosomica evidenziato al Tri test;

- aumentato rischio di patologia cromosomica evidenziato all'ecografia del II trimestre, per presenza di malformazioni o di varianti anatomiche fetali;
- precedente figlio affetto da anomalia cromosomica;
- genitori portatori di alterazioni cromosomiche.

In casi particolari, possono essere effettuati altri tipi di indagini, come ad esempio la ricerca di particelle virali nel caso di infezioni, ecc.

**Rischi:** alla luce dell'esperienza trentennale di esecuzione dell'esame, si può affermare come l'amniocentesi sia da considerarsi una tecnica ormai consolidata. Esiste, tuttavia, una quota di rischio non eliminabile.

Per il feto l'amniocentesi comporta un rischio aggiuntivo di aborto, rispetto a quello di base, pari all'1%. Sono stati inoltre riportati traumi fetali da puntura, che, tuttavia, sono molto rari.

I rischi materni sono anch'essi rari. Possono verificarsi perdite ematiche, perdite di liquido amniotico e contrazioni uterine.

**Attendibilità:** è molto elevata, raggiungendo circa il 99,7%.

La Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) consiglia di eseguire l'indagine citogenetica analizzando almeno 16 metafasi provenienti da 12 colonie. Ciò consente di escludere le anomalie cromosomiche "a mosaico", quando presenti in percentuali superiori al 30%.

Naturalmente la presenza di un cariotipo normale e la normalità delle analisi biochimiche nel liquido amniotico non escludono completamente l'evenienza che il feto possa avere forme di ritardo mentale o anomalie congenite dovute ad altre cause, come ad esempio le anomalie genetiche o le malformazioni non legate ad alterazioni dei cromosomi.

Infine la possibilità che si verifichi un insuccesso della coltura delle cellule fetali, per cui potrebbe rendersi necessaria la ripetizione del prelievo, è intorno al 0,5%.

#### *La funicolocentesi*

La funicolocentesi, o cordocentesi, consiste nel prelievo di sangue fetale dal cordone ombelicale. Le cellule presenti, una volta poste in coltura, vengono esaminate dal punto di vista del corredo cromosomico.

**Preparazione:** è analoga a quella del CVS.

**La tecnica:** viene eseguita generalmente tra la 20° e la 22° settimana, ma in casi particolari vi si può ricorrere anche in epoche più avanzate. Essa consiste nel prelievo di circa 1-3 ml di sangue fetale da un vaso del cordone ombelicale (in genere un'arteria), che viene raggiunta mediante l'introduzione eco-guidata di un sottile ago attraverso la parete addominale.

**Dopo il prelievo:** viene generalmente consigliato

un giorno di riposo e la graduale ripresa delle proprie attività astenendosi dall'effettuare viaggi, lavori pesanti, attività sessuale per circa una settimana.

**Il risultato:** in caso di determinazione del cariotipo il tempo richiesto è di circa 3-4 giorni, mentre nel caso di infezioni fetali le indagini richiedono circa 3 settimane.

**Indicazioni:** per la sua maggiore invasività, per gli insuccessi di prelievo e per l'aumentato rischio di aborto (2-3%), la funicolocentesi ha oggi un campo di impiego piuttosto ristretto. Le principali indicazioni sono:

- determinazione rapida del cariotipo nelle malformazioni fetali;
- verifica dei mosaicismi e dei fallimenti colturali dopo villocentesi ed amniocentesi;
- valutazione dei ritardi di crescita fetale;
- emogasanalisi;
- diagnosi di alcune malattie del sangue quali emoglobinopatie, talassemie, coagulopatie, piastrinopenie;
- terapie in utero quali trasfusioni fetali;
- diagnosi di alcune malattie infettive fetali.

**Rischi:** in caso di esami eseguiti nel II trimestre, il rischio di aborto si colloca intorno al 2%. I rischi materni sono rari. Possono verificarsi perdite di sangue e/o di liquido dai genitali, contrazioni uterine, infezioni intrauterine con febbre, ecc.

**Attendibilità:** il cariotipo da sangue fetale è molto accurato: la funicolocentesi viene considerata l'indagine definitiva nei rari casi in cui l'amniocentesi o la villocentesi abbiano dato un risultato incerto.

#### *Come scegliere la tecnica della diagnosi prenatale?*

Fermo restando che l'ecografia è la tecnica di scelta per lo studio morfologico generale del feto e che il ricorso alla funicolocentesi è limitato solo ad alcune situazioni particolari, la scelta tra amniocentesi e biopsia dei villi coriali è evidentemente condizionata da svariati elementi, spesso collegati all'indicazione all'indagine e alle esperienze personali e conoscenze del ginecologo, della paziente e dell'operatore stesso. Può essere utile cercare di sintetizzare i principali vantaggi e svantaggi di queste tecniche nella Tabella 5. Sicuramente l'amniocentesi rappresenta la metodica standard di diagnosi prenatale per le anomalie del cariotipo ed essendo utilizzata già da parecchi anni, può essere considerata una metodica ampiamente consolidata eseguibile con tranquillità presso tutti i centri che se ne occupano.

La biopsia dei villi, invece, rappresenta la metodica di elezione in caso di gravidanza a rischio per malattie geniche. Queste infatti hanno invariabilmente rischi di ricorrenza alti (25% per le recessive; 50% per le dominanti): è quindi importante, anche da un punto di vi-

sta psicologico, la possibilità di offrire una diagnosi precoce, sia come epoca di effettuazione (I trimestre) che come tempi di risposta. I villi coriali sono il tessuto di elezione per le analisi biochimiche e del DNA richieste in tali situazioni.

#### *Cosa fare dopo la diagnosi prenatale?*

L'esclusione di anomalie congenite fetali, tramite le menzionate tecniche di indagine prenatale, libera la donna da stati d'ansia, consentendole di vivere la gravidanza con serenità. Un'anomalia fetale, diagnosticata in gravidanza, può essere trattata con opportuni provvedimenti terapeutici o interventi mirati. In presenza di un'anomalia grave, tale da determinare un grave pericolo per la salute fisica o psichica della madre, si può ricorrere all'interruzione della gravidanza, entro le 24 settimane compiute, ai sensi della legge 194.

#### *Tecniche diagnostiche future*

La diagnosi prenatale delle anomalie genetiche in gravidanze ad alto rischio necessita di cellule fetali nucleate che sono attualmente ottenute attraverso tecniche invasive, quali l'amniocentesi e la villocentesi; entrambe sono però gravate da rischi per il feto e qualche volta anche per la madre. La frequenza di tali rischi può essere ridotta ricorrendo a procedure di screening sierologico (ultrascreening e Tri test) ed ecografico (translucenza nucale) che non consentono però di giungere ad una diagnosi certa, ma solo all'identificazione di feti con un alto rischio di anomalie. A causa delle incertezze delle indagini di screening, da una parte e, dei rischi legati alle procedure invasive, dall'altra, c'è attualmente un considerevole interesse nello sviluppo di nuovi approcci finalizzati ad una diagnosi prenatale non invasiva. Il recupero, l'isolamento e lo studio di *cellule fetali dal sangue materno* rappresentano il più promettente mezzo diagnostico non invasivo. Cellule fetali nucleate (NFCs, *Nucleated Fetal Cells*) quali linfociti, globuli rossi e trofoblasti sono presenti nel sangue materno a bassi livelli e possono essere ottenute a partire dalla 6°-8° settimana senza rischi per la madre o il feto. Anche se l'esatta concentrazione deve ancora essere accertata, stime attuali riferiscono una frequenza di circa 1 cellula fetale ogni 100.000-1.000.000 cellule materne, anche se il numero delle cellule fetali è senz'altro aumentato nella circolazione di donne portanti feti aneuploidi.

In virtù della loro breve emivita, dell'abbondanza nel sangue fetale durante il primo trimestre, della precocità di sviluppo rispetto alla linea cellulare bianca e dell'espressione di particolari antigeni di membrana, quali il CD71 (recettore per la transferrina) e la glicoforina A, i globuli rossi nucleati fetali sono diventati il target di scelta.

TABELLA 5 - VANTAGGI E SVANTAGGI DI AMNIOCENTESI E VILLOCENTESI.

AMNIOCENTESI	BIOPSIA DEI VILLI
Vantaggi	Vantaggi
Minore incidenza di mosaicismi	Effettuazione nel I trimestre
Possibilità di dosare l'AFP e l'acetilcolinesterasi	Tecnica di scelta per l'analisi del DNA
Metodica standard eseguibile presso tutti i centri di diagnosi prenatale	Rapidità nella risposta (2-3 giorni con la tecnica diretta)
Esame meno invasivo, meno doloroso???	Possibilità di IVG nel I trimestre in caso di grave anomalia fetale
Svantaggi	Svantaggi
Effettuazione nel II trimestre	Esame più invasivo, più doloroso???
Tempi di risposta lunghi (2-3 settimane)	Maggiore difficoltà tecnica
Difficoltà per l'analisi del DNA	Minore disponibilità di operatori qualificati
IVG nel II trimestre in caso di grave anomalia fetale	

A causa della bassa concentrazione di cellule fetali nel sangue materno, sono utilizzate diverse particolari metodiche di separazione o, come meglio si definiscono in un linguaggio tecnico, di arricchimento. Alcune utilizzano anticorpi rivolti contro antigeni di membrana di derivazione paterna, altre sfruttano le differenze cellulari nella mobilità elettroforetica.

Tra le varie metodiche di separazione si annoverano:

- La flussocitometria o **FACS** (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*);
- La **MACS** (*Magnetic-Activated Cell Sorting*);
- La **CFS** (*Charge Flow Separation*);
- La separazione tramite un **gradiente di densità** discontinuo e centrifugazione.

La FACS e la MACS utilizzano anticorpi, mentre la CFS è anticorpo-indipendente.

Tutte queste metodiche portano all'arricchimento delle cellule fetali tra la più larga popolazione di cellule materne, ma non sono capaci di recuperare popolazioni pure di cellule fetali. Per questo motivo ci si avvale, successivamente, di **colorazioni** specifiche per l'**emoglobina fetale** e di altre colorazioni (ad esempio May-Grunwald-Giemsa) che consentano la visualizzazione di caratteristiche morfologiche proprie delle cellule del feto.

Le cellule fetali separate dal sangue materno sono infine studiate attraverso tecniche di analisi come la **PCR** (*polymerase chain reaction*) e la **FISH** (*fluorescence in situ hybridization*).

Non solo, però, le cellule fetali intatte si ritrovano nel sangue materno, ma anche **DNA fetale libero**, che può quindi rappresentare un'ulteriore e utile fonte di materiale per una diagnosi prenatale non invasiva. La differenza consiste nel fatto che mentre le cellule fetali intatte consentono la diagnosi di anomalie cromosomiche (aneuploidie, in particolare le trisomie 21, 13 e 18) attraverso un'indagine citogenetica sull'intero assetto cromosomico della cellula (cariotipo), il DNA fetale libero permette la diagnosi di malattie geniche attraverso lo studio di particolari, singole sequenze geniche. Questo è reso possibile dall'applicazione della PCR, che offre la possibilità di rilevare la presenza, amplificandole, di piccolissime quantità di DNA.

Secondo recenti ricerche, il DNA fetale libero comparirebbe precocemente nella circolazione materna, potendo essere identificato dalla 4°- 7° settimana per poi venire eliminato circa 2 mesi dopo il parto. Al contrario, evidenze in aumento indicano che le cellule fetali possano persistere per lungo tempo dopo il parto, esponendo al rischio di una scorretta diagnosi nell'attuale gravidanza in esame. Nonostante ciò, queste osservazioni hanno probabilmente ben poca rilevanza per i globuli rossi fetali nucleati, in virtù della loro già menzionata breve emivita.

La base biologica della liberazione del DNA fetale nel sangue materno deve ancora essere del tutto chiarita. È però possibile supporre che ci sia un continuo passaggio di cellule fetali, attraverso la placenta, che vengono rapidamente distrutte dal sistema immunitario.

rio materno, lasciando DNA fetale circolante nel plasma materno. In aggiunta potrebbe contribuire anche un processo di apoptosi delle cellule fetali. La fonte del DNA fetale è comunque verosimilmente placentare. La misurazione del DNA fetale libero può essere utilizzata non solo per la diagnosi di patologie geniche come l'anemia a cellule falciformi o la talassemia, ma anche per l'identificazione del sesso, la tipizzazione Rh del gruppo sanguigno e infine come possibile marker di parto pretermine. Le cellule fetali invece oltre che essere utilizzate per la diagnosi non invasiva di anomalie cromosomiche, sono state associate a disturbi dermatologici come l'eruzione polimorfica della gravidanza, e a disturbi sistemici come la pre-eclampsia. Dopo il parto, inoltre esse sono associate ad una varietà di altri disturbi quali la sclerodermia e altre patologie autoimmuni. Infatti, sebbene gli studi iniziali abbiano focalizzato l'attenzione sulla scoperta delle cellule fetali nel sangue materno periferico, queste cellule sono anche capaci di migrare verso la cute e altri tessuti materni.

## Materiali e metodi

Abbiamo analizzato campioni di sangue di 50 donne gravide selezionate da sottoporre ad amniocentesi (alla 15<sup>a</sup>-18<sup>a</sup> settimana) per una o più delle seguenti indicazioni:

1. età materna avanzata (35-45 anni);
2. rischio di aneuploidia definito ultrasonograficamente (segni di malformazioni fetali), inclusi risultati positivi all'ultrascreening e misurazione della translucenza nucale;
3. risultati positivi al Tri test.

I campioni di sangue (8 ml) sono stati raccolti poche ore prima dell'amniocentesi ed esaminati in accordo con il protocollo descritto brevemente qui di seguito: i campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente per 5 ore, o a 4°C per tutta la notte.

Per eliminare la maggior parte delle cellule diverse dai globuli rossi fetali nucleati (FNRBCs, *Fetal Nucleated Red Blood Cells*), aliquote di sangue sono state

lentamente stratificate su un gradiente a doppia densità discontinuo di Ficoll (1.077 e 1.083 g/ml) e centrifugate.

Le cellule nell'interfaccia tra i gradienti 1.077 e 1.083 g/ml sono state raccolte con una pipetta Pasteur e lavate due volte con soluzione salina tamponata con fosfato. Quindi, per ogni campione sono stati eseguiti due strisci sottili su un vetrino da microscopio. Per identificare i globuli rossi fetali nucleati, ogni vetrino è stato quindi colorato con emoglobina fetale (HbF) (*Fetal Cell Stain Kit*). I globuli rossi fetali nucleati sono stati identificati sulla base della forte colorazione con emoglobina fetale, al contrario della assente o debole colorazione assunta dalle altre cellule nucleate.

La conferma dell'esatta identificazione delle FNRBCs è stata ottenuta con la differenziazione sulla base di caratteristiche morfologiche, grazie alla colorazione May-Grunwald-Giemsa. I globuli rossi fetali nucleati così identificati sono stati infine contati. Confrontando i dati ottenuti con i risultati delle amniocentesi, si è visto che tutti quei casi dove furono rilevati un numero significativamente più alto di FNRBCs (coefficiente di significatività  $p < 0,01$ ) nel sangue materno, corrispondevano ad alterazioni genetiche identificate con l'amniocentesi.

## Conclusioni

La possibilità di correlare un maggior numero di FNRBCs, nel sangue materno di quelle gestanti con feto con anomalie cromosomiche, rappresenta una possibilità di diagnosi prenatale non invasiva.

Se questi dati verranno confermati da ricerche future, le tecniche diagnostiche invasive potranno essere riservate solo a quei casi in cui nel sangue materno viene rilevato un elevato numero di FNRBCs. La ricerca, quindi, delle FNRBCs nel sangue materno rappresenterebbe un significativo test di screening, che da un lato aumenterebbe il numero di casi di diagnosi prenatale positiva e dall'altro diminuirebbe il numero di amniocentesi.

## Bibliografia

1. PARANO E., FALCIDIA E., GRILLO A., TAKABAYASHI H., TRIFILETTI R.R., PAVONE P.: *Fetal nucleated red blood cell counts in peripheral blood of mother bearing Down Syndrome fetus*. *Neuropediatrics* 2001; 32: 147-149.
2. AL-MUFTI R., HAMBLEY H., FARZANEH F., NICOLAIDES K.: *Investigation of maternal blood enriched for fetal cells: role in screening and diagnosis of fetal trisomies*. *Am J Med Genet* 1999; 85: 66-75.
3. BIANCHI D.W.: *Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis*. *Br J Haematol* 1999; 105: 574-583
4. BIANCHI D.W., WILLIAMS J.M., SULLIVAN L.M., HANSON F.W., KLINGER K.W., SHUBER A.P.: *PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies*. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 822-829.
5. FARINA A., BIANCHI D.W.: *Fetal cells in maternal blood as a second non-invasive step for fetal Down syndrome screening*.

- Prenat Diagn 1998; 18: 983-984.
6. WACHTEL S.S., SHULMAN L.P., SAMMONS D.: *Fetal cells in maternal blood*. Clin Genet 2001; 59: 74-79.
  7. BIANCHI D.W.: *Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism*. European Journal of Obstetric & Gynecology and Reproductive Biology 2000; 92: 103-108.
  8. WALD N.J., WALT H.C., HACKSHAW A.K.: *Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters*. N Engl J Med 1999; 341: 461-467.
  9. LO Y., ZHANG J., LEUNG T.N., LAU T.K., CHANG A.M., HJELM N.M.: *Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma*. Am J Hum Genet 1999; 64: 218-224.
  10. PERTL B., BIANCHI D.W.: *First trimester prenatal diagnosis: fetal cells in the maternal circulation*. Seminars in Perinatology 1999; 23: 393-402.
  11. PARANO E., FALCIDIA E., GRILLO A., PAVONE P., CUTULI N., TAKABAYASHI H., TRIFILETTI R.R., GILLIAM C.T.: *Non invasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by isolation and analysis of fetal cells from maternal blood*. American Journal of Medical Genetics 2001; 101:262-267.
  12. MALONE F.D., BERKOWITZ R.L., CANICK J.A., D'ALTONO M.E.: *First trimester screening for aneuploidy; research or standard of care?* Am J Obstet Gynecol 2000; 183: 490-496.
  13. PERTL B., BIANCHI D.W.: *Fetal DNA in maternal plasma: emergine clinical applications*. American College of Obstetrician and Gynecologist 2001; 98: 483-490.
  14. LO Y.M.D., LAU T.K., CHAN L.Y.S., LEUNG T.N., CHANG A.M.Z.: *Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA*. Clin Chem 2000; 46: 1301-9.
  15. AL-MUFTI R., LEES C., ALBAIGES G., HAMBLEY H., NICOLAIDES K.H.: *Fetal cells in maternal blood of pregnancies with severe fetal growth restriction*. Hum Reprod 2000; 15: 218-21.
  16. ZHONG X.Y., BURK M.R., TROEGER C., JACKSON L.R., HOLZGREVE W.: *Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses*. Prenat Diagn 2000; 20: 795-8.
  17. SEKIZAWA A., SAMURA O., ZHEN D.K., FALCO V., FARINA A., BIANCHI D.W.: *Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood*. Prenat Diagn 2000; 20: 886-9.
  18. HOUFFLIN-DEBARGE V., O'DONNELL H., OVERTON T., BENNET P.R., FISK N.M.: *High sensitivity of fetal DNA in plasma compared to serum and nucleated cells using unnnested PCR in maternal blood*. Fetal Diagn Ther 2000; 15: 102-7.
  19. PERTL B., SEKIZAWA A., SAMURA O., ORESCOVIC I., RAHAIM P.T., BIANCHI D.W.: *Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent PCR amplification of short tandem repeats*. Hum Genet 2000; 106: 45-9.
  20. CHEN C.P., CHERN S.R., WANG W.: *Fetal DNA in maternal plasma: the prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy*. Prenat Diagn 2000; 20: 353-7.
  21. ZHONG X.Y., HOLZGREVE W., HAHN S.: *Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction*. Br J Obstet Gynaecol 2000; 107: 766-9.
  22. FARINA A., LESHANE E.S., LAMBERT-MESSERLIAN G.M., CANICK J.A., LEE T., NEVEUX L.M., PALOMAKI G.E., BIANCHI D.W.: *Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down Syndrome pregnancy*. Clinical Chemistry 2003; 49: 239-242.
  23. OHASHI Y., MIHARU N., HONDA H., SAMURA O., OHAMA K.: *Quantification of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies*. Hum Genet 2001; 108:123-7.
  24. LEE T., LESHANE E.S., MESSERLIAN G.M., CANICK J.A., FARINA A., HEBER W.W., et al.: *Down syndrome and cell-free fetal DNA in archived maternal serum*. Am J Obstet Gynecol 2002; 187:1217-21.
  25. WALD N.J., HACKSHAW A.K., GEORGE L.M.: *Assay precision of serum alfa-fetoprotein in antenatal screening for neural tube defects and Down's syndrome*. J Med Screen 2000; 7: 74-7.
  26. LEUNG T.N., ZHANG J., LAU T.K., CHAN L.Y., LO Y.D.: *Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia*. Clin Chem 2001; 47: 137-9.
  27. LAMBERT-MESSERLIAN G.M., SILVER H.M., PETRAGLIA F., LUISI S., PEZZANI I., MAYBRUCK W.M., et al. *Second trimester levels of maternal serum inhibin A and human chorionic gonadotropin predict preeclampsia in the third trimester of pregnancy*. J Soc Gynecol Investig 2000; 7: 170-4.
  28. WATAGANARA T., LESHANE E.S., FARINA A., MESSERLIAN G.M., LEE T., CANICK J.A., BIANCHI D.W.: *Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18*.
  29. ARIGA H., OHTO H., BUSCH M.P., IMAMURA S., WATSON R., REED W., LEE T.H.: *Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for non-invasive prenatal diagnosis*. Transfusion 2001; 41: 1524-1530.
  30. BIANCHI D.W.: *Prenatal exclusion of recessively inherited disorders: should maternal plasma analysis precede invasive techniques?* Editorial. Clin Chem 2002; 48: 689-690.
  31. BIANCHI D.W., SIMPSON J.L., JACKSON L.G., ELIAS S., HOLZGREVE W., EVANS M.I., DUKES K.A., SULLIVAN S.M., KLINGER K.W., BISCHOFF F.Z., HAHN S., JOHNSON K.L., LEWIS D., WAPNER R.J., DE LA CRUZ F.: *Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data*. Prenat Diagn 2002; 22: 609-615.
  32. HONDA H., MIHARU N., OHASHI Y., OHAMA K.: *Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum*. Clin Chem 2001; 47:41-46.
  33. HONDA H., MIHARU N., OHASHI Y., SAMURA O., KINUTANI M., HARA T., OHAMA K.: *Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum*. Hum Genet 2002; 110: 75-79.
  34. SAITO H., SEKIZAWA A., MORIMOTO T., SUZUKI M., YANIHARA T.: *Prenatal diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma*. Lancet 2000; 356: 1170.
  35. SMID M., VASSALLO A., LAGONA F., VALSECCHI L., MANISCALCO L., DANTI L., LAJACONO A., FERRARI A., FERRARI M., CREMONESI L.: *Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma in pathological conditions associated with placental abnormalities*. Ann N Y Acad Sci 2001; 945: 132-137.
  36. FINNING K., MARTIN P., DANIELS G.: *A clinical service*

- in the UK to predict fetal Rb (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma.* Ann N Y Acad Sci 2004; 1022: 119-23.
37. CREMONESI L., GALBIATI S., FOGLIENI B., SMID M., GAMBINI D., FERRARI A., VIRA E., CAMPOGRANDE M., PAGLIANO M, TRAVI M, PIGA A, RESTAGNO G, FERRARI M.: *Feasibility study for a microchip-based approach for noninvasive prenatal diagnosis of genetic diseases.* Ann N Y Acad Sci 2004; 1022:105-12.
38. CHIU R.W., LO Y.M.: *Recent developments in fetal DNA in maternal plasma.* Ann N Y Sci 2004; 1022: 100-4.
39. WATAGANARA T., BIANCHI D.W.: *Fetal cell-free nucleic acids in the maternal circulation: new clinical applications.* Ann N Y Acad Sci 2004; 1022: 90-9.
40. BAHADO-SINGH R., CHENG C.C., MATTA P, SMALL M., MAHONEY M.J.: *Combined serum and ultrasound screening for detection of fetal aneuploidy.* Semin Perinatol 2003; 27: 145-51.
-