

I test rapidi per aneuploidie in diagnostica prenatale mediante QF-PCR e/o FISH

Luca Sbaiz, Silvia Cavalchini, Isabella Battistella, Sabina Siviero, Valentina Asnaghi, Maria Grazia Bonissone, Cristina De Leo, Caterina Mari, Federica Lombardo, Anna Maria Sedita, Chiara Michielotto, Alessandro Brussino, Monica Salvego, Marina Duvant, Cinzia Luciano, Irene Impoco, Maria Stella Russo, Helga Buoso, Fabiola Conte, Marilena Innocentin, Guglielmo Bracco, Gabriella Restagno

Dipartimento di Diagnostica e Servizi, S.S. Diagnosi e Consulenza Genetica, AO OIRM-S. Anna, Torino

RIASSUNTO Recentemente sono state sviluppate tecniche molecolari, come la QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction) e la FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), i cui vantaggi rispetto alla citogenetica classica sono l'automazione, i bassi costi, la rapidità di risposta (24-72 ore). Queste metodiche applicate alla diagnosi prenatale invasiva cioè su campioni di liquido amniotico o di tessuto coriale prelevati a donne classificate ad alto rischio di cromosomopatia in base al rilievo ecografico di malformazioni, oppure al risultato positivo di un test di screening o ritenute a rischio aumentato di non disgiunzioni cromosomiche a causa dell'età materna avanzata, rivelano la presenza di un'anomalia numerica dei cromosomi (trisomie 21, 13, 18 e variazioni numeriche di X). I risultati di 7665 campioni di villi coriali o liquido amniotico dimostrano un'ampia concordanza tra citogenetica e test rapidi nelle anomalie responsabili delle sindromi di Down, Patau, Edwards, Turner e Klinefelter e nelle triploidie. Anomalie differenti, per altro non patologiche, in oltre la metà dei casi (presenti in un genitore oppure de novo, ma apparentemente bilanciate), non possono essere evidenziate dai test rapidi: solo l'esame dell'intero corredo cromosomico è in grado di rivelare trisomie parziali, traslocazioni bilanciate o sbilanciate, inversioni, inversioni/duplicazioni, delezioni o altro, che interessano regioni dei cromosomi 21, 13, 18, X ed Y diverse rispetto a quelle prese in esame dai due test rapidi, oppure che coinvolgono altri cromosomi.

Parole chiave: QF-PCR; FISH; Diagnosi prenatale invasiva; Trisomia 21; Trisomia 18; Trisomia 13; Sindrome di Turner; Sindrome di Klinefelter

ABSTRACT *Rapid Prenatal Diagnosis of Aneuploidy Using QF-PCR and/or FISH.* The object of this report is to describe our experience over the past five years of chorionic villi (CVS) and amniotic fluid (LA) prenatal diagnosis in a high-risk for chromosomal disorders population, and to analyze, according to the results, the advantages and disadvantages of using quantitative fluorescence polymerase chain-reaction (QF-PCR). QF-PCR can detect rapidly the most common chromosomal abnormalities (21, 13, 18 trisomy and sex chromosome aneuploidy). The test was applied on 7655 clinical samples; most common indications were maternal age (51%), biochemical risk (25%) and ultrasound abnormalities (21%), while in 349 cases the indications were: ultrasound abnormalities (47%), maternal age (30%) and biochemical risk (21%). Aneuploidies involving chromosomes 21, 18, 13, X and Y were detected with 100% specificity. The main advantages of this assay are low cost, speed and automation, and the short time between the collection of the samples and the final report. This is particularly important in case of parents' anxiety, and when biochemical and/or ultrasound screening tests suggest an increased risk of chromosomal disorders. QF-PCR in 24-72 hours detects major chromosome abnormalities, without waiting 14-20 days for the cytogenetic results.

Key words: QF-PCR; FISH; Prenatal diagnosis; Trisomy 21; Trisomy 18; Trisomy 13; Turner Syndrome; Klinefelter Syndrome

INTRODUZIONE

Circa il 5% dei neonati è affetto da una malattia o anomalia congenita¹. Opportune indagini consentono una diagnosi in epoca prenatale precoce e compatibile con interventi di prevenzione secondaria e comprendono un insieme di tecniche strumentali e di laboratorio finalizzate al riconoscimento o all'esclusione di una malattia genetica (principalmente cromosomica) nel feto.

Le tecniche oggi disponibili consentono di studiare l'unità feto-placentare con procedure che possono essere non invasive (cioè senza alcun rischio di conseguenze per la prosecuzione della gravidanza) oppure invasive² e correlate ad un rischio di perdita fetale di circa 1%³.

Se si escludono l'ecografia, fondamentale strumento per lo studio dell'anatomia fetale, nonché momento preliminare in tutte le tecniche di prelievo dei tessuti fetali, e i test di screening sul siero materno, utilizzati per la valutazione del rischio di anomalie cromosomiche o di difetti di chiusura del tubo neurale, tutti i test di diagnosi prenatale si avvalgono di procedure invasive che rendono disponibili cellule o tessuti del feto sui quali è possibile effettuare analisi cromosomiche o studi sul DNA.

Le tecniche di prelievo sono la villocentesi, utilizzata tra le 11-13 settimane, l'amniocentesi utilizzata tra le 15-18 settimane e la cordocentesi (o funicolocentesi) per il prelievo di sangue fetale che si esegue non prima delle 20 settimane di gravidanza.

La diagnosi prenatale può essere effettuata con quattro principali gruppi di indicazioni (malattie cromosomiche, malattie genetiche, malformazioni congenite e infezioni fetali), ma qui si prenderà in considerazione solamente l'ambito delle malattie cromosomiche.

In base alle Linee Guida di diagnostica citogenetica (*Consensus* del 1995 e del 2005), le indicazioni per effettuare esami prenatali invasivi volti a valutare direttamente il cariotipo del feto sono:

- età materna ≥ 35 anni al momento del concepimento;
- positività dell'anamnesi personale, familiare o di coppia (precedente figlio affetto da anomalia dei cromosomi, genitori portatori di anomalia strutturale dei cromosomi geneticamente bilanciata, genitori con riscontro citogenetico di mosaico cellulare);
- anomalie fetali osservate in ecografia;
- rischio aumentato di anomalia cromosomica in base a parametri biochimici, cioè in base al risultato di test di screening volti a ridefinire il generico rischio di anomalia cromosomica legato all'età materna.

L'analisi citogenetica classica, studiando i cromosomi in metafase, rileva aneuploidie e riarrangiamenti cromosomici. Richiede tuttavia un certo tempo (circa 21 giorni)⁴ ed un quantitativo di campione relativamente grande (circa 20 ml).

In alcune situazioni cliniche, come la necessità di una diagnosi d'urgenza relativa ad aneuploidie dei cromosomi maggiormente responsabili di malformazioni fetali vitali o non (trisomie 21, 18, 13, monosomia X, ecc.) il tempo richiesto per completare l'analisi cromosomica può avere un notevole impatto clinico sulla paziente⁵⁻⁷. Oltre a generare tensione psicologica ed ansia, associate al periodo d'attesa che intercorre tra il prelievo e la comunicazione dei risultati, questo periodo di incertezza sul futuro della gravidanza può anche influire sullo sviluppo del feto ritardando il legame materno-fetale⁵. In questa situazione, metodi diagnostici capaci di dare risultati entro pochi giorni dal prelievo del campione possono essere una preziosa alternativa. La capacità di individuare in modo rapido un'aneuploidia o di identificare piccole anomalie strutturali è la caratteristica di tecniche molecolari in grado di analizzare i polimorfismi, principio su cui si basano la QF-PCR (*Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction*) e l'analisi di *melting* degli SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), oppure di rilevare anomalie di sequenza o variazioni numeriche dei cromosomi, come la *real-time* PCR, MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), MAPH (*Multiplex Amplifiable Probe Hybridization*) e la FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*)^{8,9}. Attualmente, per questioni di rapidità e di costi, nella diagnostica prenatale vengono utilizzate solo due delle tecniche sopra citate: la FISH e la QF-PCR, entrambe applicate a DNA estratto da cellule di liquido amniotico o di villi coriali non coltivate. Con queste tecniche è possibile diagnosticare in 24/48 ore un'anomalia numerica dei cromosomi 21, 18 e 13, il sesso fetale (utile anche in caso di madre portatrice di malattie *X-linked*) e le eventuali anomalie di numero dei cromosomi sessuali (47,XXY - 45,X - 47,XXX).

Lo scopo di questo lavoro è confrontare i risultati ottenuti con la citogenetica classica, analizzando liquido amniotico e villi coriali, con quelli dell'analisi rapida (QF-

PCR e FISH) per capire, sulla base delle indicazioni cliniche all'esame, quante e quali anomalie strutturali o numeriche (a carico o dei cromosomi 21, 18, 13 ed X o di cromosomi diversi) si sarebbero perse con l'utilizzo delle sole tecniche QF-PCR e FISH e se quindi sia ipotizzabile utilizzare i soli test rapidi per la ricerca di anomalie cromosomiche.

MATERIALI E METODI

A partire da marzo 2003 fino a marzo 2008 sono stati analizzati 7665 campioni, 1819 villi coriali e 5846 liquidi amniotici, per cui è pervenuta la richiesta di determinazione del cariotipo.

All'inizio del 2003 il Laboratorio di citogenetica dell'A.O. OIRM-Sant'Anna di Torino ha concordato con la Direzione Sanitaria un protocollo di applicazione di test rapidi prenatali, in aggiunta al cariotipo, per le seguenti indicazioni:

- età materna superiore a 40 anni al momento del concepimento;
- precedente figlio affetto da trisomia;
- sospetto ecografico di trisomia;
- gemellarità;
- Test integrato positivo;
- Test combinato positivo;
- Tri-test positivo con rischio $\geq 1/100$;
- età gestazionale superiore alla 18^a settimana.

Il test molecolare ormai routinariamente in uso è una PCR semiquantitativa che coamplifica sette STR (*Short Tandem Repeats*) sul cromosoma 21, otto sul cromosoma 13, nove sul cromosoma 18 e 10 sui cromosomi X e Y. I marcatori utilizzati sono indicati nella Tabella 1. In caso di normalità si ha la presenza di due picchi con un rapporto d'area tra 0,8 e 1,4. La trisomia è indicata dalla presenza di tre picchi allelici con area uguale (trisomia allelica) oppure di due picchi le cui aree hanno rapporto $>1,8$ o $<0,65$ (trisomia diallelica)^{10,11}. Nelle Figure 1 e 2 è rappresentato un esempio di lettura.

La seconda tecnica molecolare utilizzata è la FISH applicata ai nuclei in interfase. Le sonde che vengono utilizzate sono indicate nella Tabella 2: una sonda *locus* specifica per il cromosoma 21 e per il cromosoma 13 e tre sonde alfoidi per la regione centromerica dei cromosomi 18, X ed Y. Il numero minimo di nuclei interfasici analizzati, in cui si riconoscano i segnali per ciascuna sonda utilizzata, è di 50. La trisomia a carico dei cromosomi 21, 13 e 18 viene indicata dalla presenza di tre segnali ben distinti, mentre la variazione numerica dei cromosomi sessuali viene rivelata rispettivamente con un segnale per il cromosoma X in caso di sindrome di Turner e con due segnali per la X ed uno per la Y in presenza di sindrome di Klinefelter. La Figura 3 riporta alcuni esempi.

I campioni

Se la procedura diagnostica è l'amniocentesi, vengono prelevati circa 20 mL di liquido amniotico (LA): il numero di cellule presenti varia da 10^3 a 10^6 /mL ed aumenta progressivamente durante la gravidanza. Contemporaneamente però aumenta la percentuale delle cellule morte (verso la

Screening e diagnosi prenatale

Tabella 1

Marcatori utilizzati in QF-PCR ELUCIGENE QST*R

Marcatore	Posizione	Eterozigosità osservata	Intervallo dimensione allele (bp)	Colorante del marcatore
Marcatori STR per il cromosoma 21				
D21S11	21q21.1	0,90	220-283	6-FAM
D21S1437	21q21.1	0,84	307-343	6-FAM
D21S1409	21q21.2	0,81	160-220	PET
D21S1411	21q22.3	0,93	256-345	NED
D21S1435	21q21.3	0,75	152-210	6-FAM
D21S1442	21q21.3	0,96	290-360	VIC
D21S1446	21q22.3	0,71	180-250	VIC
Marcatori STR per il cromosoma 18				
D18S386	18q22.1	0,88	320-407	VIC
D18S390	18q22.3	0,75	345-400	NED
D18S391	18q11.31	0,75	196-230	VIC
D18S535	18q12.3	0,92	450-500	6-FAM
D18S819	18q11.2	0,70	370-450	PET
D18S978	18q12.3	0,67	180-230	NED
D18S847	18q21.1	0,80	180-280	6-FAM
D18S977	18q21.31	0,77	180-330	PET
D18S1002	18q11.3	0,81	300-400	6-FAM
Marcatori STR per il cromosoma 13				
D13S252	13q12.2	0,85	260-330	PET
D13S305	13q13.3	0,75	418-470	VIC
D13S628	13q31.3	0,69	425-472	NED
D13S634	13q21.33	0,81	355-440	6-FAM
D13S325	13q14.11	0,86	235-320	VIC
D13S797	13q33.2	0,68	152-206/250	6-FAM
D13S800	13q22.1	0,73	256-345	NED
D13S762	13q31.3	0,80	260-350	6-FAM
Marcatori STR per i cromosomi X e Y				
DXS981	Xq13.1	0,86	225-260	6-FAM
DXS1187	Xq26.2	0,72	122-170	VIC
HPRT	Xq26.2	0,78	265-300	VIC
DXS7423	Xq28	0,74	372-388	VIC
DXYS267	Xq21.3/Yp11.2	0,87	240-280	PET
AMEL	Xp22.22/Yp11.2	-	104/110	NED
DXS6807	Xp22.32	0,70	331-351	6-FAM
DXS1283E	Xp22.31	0,89	292-340	NED
SRY	Yp11.31	-	248	NED
DYS448	Yq11.223	-	323-381	PET

Tabella 2

Pannello di sonde genetiche FISH AneuVysion™

CROMOSOMA	SONDA
cromosoma 21	Sonda di DNA <i>locus</i> specifica (LSI) (loci D21S259, D21S341e D21S342 della regione 21q22.13-q22.2) Spectrum Orange
cromosoma 13	Sonda di DNA <i>locus</i> specifica (LSI) (13q14) Spectrum Green
cromosoma 18	Sonda di DNA alfa satellite (CEP) Regione del centromero (18p11.1-q11.1) Spectrum Aqua
cromosoma X	Sonda di DNA alfa satellite (CEP) Regione del centromero (Xp11.1-q11.1) Spectrum Green
cromosoma Y	Sonda di DNA alfa satellite (CEP) Regione del centromero (Yp11.1-q11.1) Spectrum Orange

20^a settimana le cellule morte sono la maggioranza) e solo poche cellule sono in grado di formare colonie¹²; per questo motivo il periodo più adatto per l'amniocentesi è tra le 15 e le 16 settimane.

Per le colture di villi coriali (VC) il materiale proviene dal *corion frondosum* (parte fetale della placenta) con una vascolarizzazione ben sviluppata. Nelle colture sono presenti tre tipi di cellule: citotrofoblasti, sinciziotrofoblasti e cellule del mesenchima.

Sono necessari almeno 10 mg di villi per un esame completo che consiste in una coltura a breve termine (analisi di cellule del citotrofoblasto) e in una coltura a lungo termine (analisi di cellule del mesenchima).

RISULTATI

Analizzando i 1819 casi di VC, si nota piena concordanza (100%) tra test rapidi e citogenetica classica per

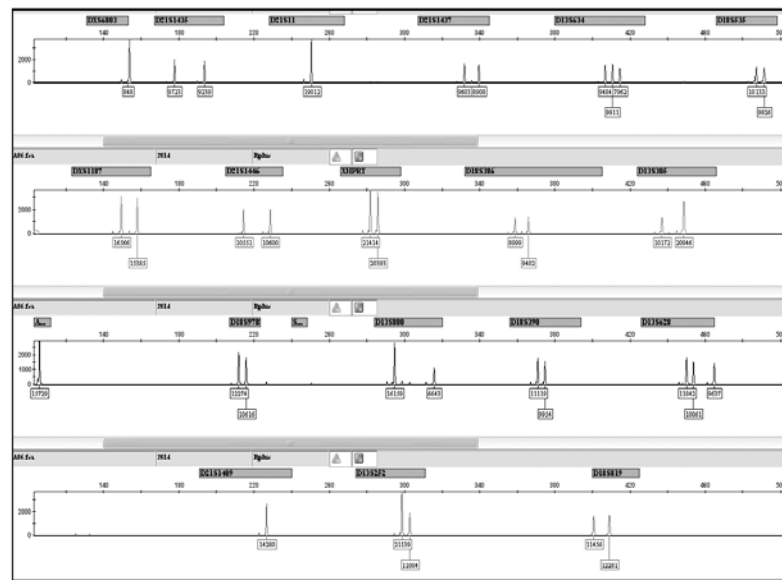


Figura 1
Trisomia del cromosoma 13

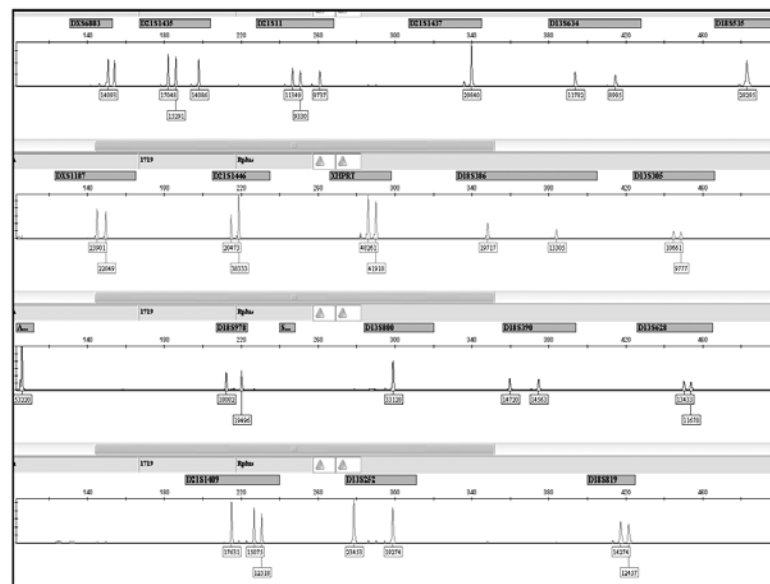


Figura 2
Trisomia del cromosoma 21

tutti i casi con trisomia 13; per quanto concerne la trisomia 21 e la trisomia 18, rispettivamente 108 casi su 109 (99%) e 48 su 50 (95%), per un caso di trisomia 21 e per due casi di trisomia 18, i risultati della QF-PCR non sono stati informativi.

Dall'analisi del cariotipo emergono inoltre alcune anomalie come trisomie parziali, traslocazioni bilanciate o sbilanciate, inversioni (compreso inversioni sul cromosoma Y), inversioni/duplicazioni, delezioni o altro, che interessano regioni dei cromosomi 21, 13, 18, X ed Y diverse rispetto a quelle prese in esame dai due test rapidi oppure che coinvolgono altri cromosomi. Senza la richiesta dell'analisi del cariotipo queste patologie non sono evidenziabili.

Vanno considerati a parte 3 prelievi di VC con carioti-

po rispettivamente +13,der(13;14), +13,der(13;13) e +21der(21;21) ed uno con cariotipo a mosaico (47,XY,+21/45,X,+21). Nei primi 3 casi i test rapidi sono riusciti a rivelare la trisomia dei cromosomi 21 e 13, ma non sono stati in grado di indicarne l'origine: l'analisi citogenetica classica, oltre a confermare la presenza delle trisomie 21 o 13, ha anche rivelato che le trisomie originano per la segregazione sbilanciata di un cromosoma derivativo [der(13;14), der(13;13) e der(21;21)] presente in uno dei due genitori. Nel caso del cariotipo a mosaico 47,XY,+21/45,X,+21, la QF-PCR e la FISH hanno evidenziato la presenza di un cromosoma 21 in più in tutte le cellule e, grazie alla FISH, l'assenza del cromosoma Y nella seconda linea cellulare.

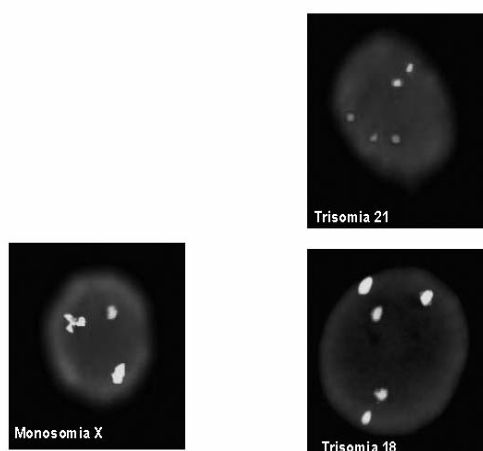


Figura 3
FISH: trisomia 21, trisomia 18, monosomia X

Prendendo in considerazione i 5846 casi di LA, si osserva una piena concordanza (100%) tra il numero di casi con trisomia 21 (98 casi) e trisomia 13 (6 casi) diagnosticati con l'analisi del cariotipo e il numero di casi rilevati con la QF-PCR/FISH. La stessa situazione di piena corrispondenza si ottiene anche per i casi di triploidia: 6 casi su 6.

Invece i casi di trisomia 18 diagnosticati con i test rapidi sono 31, contro 33 individuati dalla citogenetica classica (concordanza 92%); questo non per errori di interpretazione, bensì per la non informatività dei test rapidi: i 2 casi risultavano omozigoti per tutti gli alleli analizzati.

In 4 casi l'esame citogenetico del liquido amniotico ha prodotto un cariotipo 45,X/46,X,i(X): in questi casi, come già descritto per un caso di CV, con la FISH si può apprezzare solo la linea cellulare 45,X, perchè l'i(X), identificabile con il cariotipo, viene visto come un cromosoma X normale. Emergono anche qui una serie di anomalie: trisomie, traslocazioni bilanciate o sbilanciate, inversioni (compreso inversioni sul cromosoma Y), inversioni/duplicazioni e delezioni, che interessano regioni dei cromosomi 21, 13, 18, X ed Y diverse rispetto a quelle prese in esame dai due test rapidi o che coinvolgono altri cromosomi.

Anche qui, un caso di liquido amniotico con +21der(21;21) merita un commento separato: i test rapidi infatti sono riusciti a rivelare la trisomia dei cromosomi 21, ma non sono stati in grado di indicarne l'origine. L'analisi del cariotipo oltre a confermare la presenza della trisomia 21, ha anche rivelato che essa origina per la segregazione sbilanciata di un cromosoma derivativo [der(21;21)] presente in uno dei due genitori.

COMMENTO

Analizzando i 7665 casi totali (Tab. 3) si nota che dei 396 casi che presentavano le classiche anomalie coinvolgenti i cromosomi 21 (SD), 13 (sindrome di Patau), 18 (sindrome di Edwards), X ed Y e identificati mediante la citogenetica classica, 349 sono stati rivelati anche dai test rapidi: la differenza è dovuta fondamentalmente al fatto che il test rapido non era stato richiesto nella totalità dei casi.

Si sono evidenziate delle discrepanze solo in caso di:

- anomalie coinvolgenti i cromosomi sessuali;
- presenza di una seconda linea cellulare aneuploide a bassa percentuale (20-30%)¹³, tale da non essere rivelata dalla sola QF-PCR;
- non informatività dei risultati della QF-PCR (presenza di un solo picco per omozigosi degli alleli esaminati), risolvibile con l'ausilio della FISH.

Degli 85 casi che, con la citogenetica classica, presentano un cariotipo anomalo, coinvolgente o i cromosomi 21, 13, 18, X ed Y o cromosomi diversi, 45 risultano essere non patologici (anomalie presenti in uno dei genitori o *de novo* ma apparentemente bilanciate), e 40 invece patologici.

Con i test rapidi, invece, tutti e 5 i casi "altro" sono risultati patologici:

- quattro casi con +13,der(13;14) (1), +13,der(13;13) (1) e +21der(21;21) (2).
- un caso di villo coriale con cariotipo 47,XY,+21/45,X,+21. Per questo caso la QF-PCR e la FISH hanno evidenziato la presenza di un cromosoma 21 in più in tutte le cellule e l'assenza del cromosoma Y.

Discorso a parte si deve fare per l'unico caso che nella Tabella 3 è inserito tra "altre anomalie a carico dei cromosomi sessuali": si tratta di un LA con cariotipo 45,X/46,X,i(X). In realtà si può parlare di una situazione vista solo in parte con i test rapidi perchè con la FISH è solo apprezzabile la linea cellulare 45,X e non l'i(X) che viene invece visto come un cromosoma X normale.

Valutando le indicazioni cliniche per la diagnosi invasiva nei 349 casi risultati affetti da anomalia cromosomica in base ai risultati dei test rapidi si può vedere nella Figura 3 che l'indicazione più rappresentata è costituita dal riscontro di anomalie morfologiche all'esame ecografico (47%), seguita dall'età materna (30%) e dal risultato positivo di un test di screening (Test integrato 9%, Tri-test 7% e Test combinato 6%).

Se si considera la totalità degli esiti patologici in base all'esame del cariotipo, si ha una situazione analoga a quella descritta prima: anche in questo caso l'indicazione più frequente è un reperto ecografico anomalo (42%), seguita dall'età materna (33%) e poi dai test di screening positivi (Test integrato 9%, Tri-test 5% e Test combinato 5%).

Tabella 3
Analisi casistica di villi coriali: risultati

Anomalia cromosomiche	Cariotipo	QF-PCR/FISH
+21 (a mosaico o no)	211	210
+13 (a mosaico o no)	29	25
+18 (a mosaico o no)	86	82
45,X (a mosaico o no)	38	22
47,XXY (a mosaico o no)	9	3
Altre anomalie a carico dei sessuali (mosaico o no)	17	1
TRIPLOIDIE	6	6
TOTALE	396	349
Altro	85 di cui:	5 (patologici)
	- 40 patologici	
	- 45 non patologici	
NORMALI (46,XX46,XY)	7184	7311

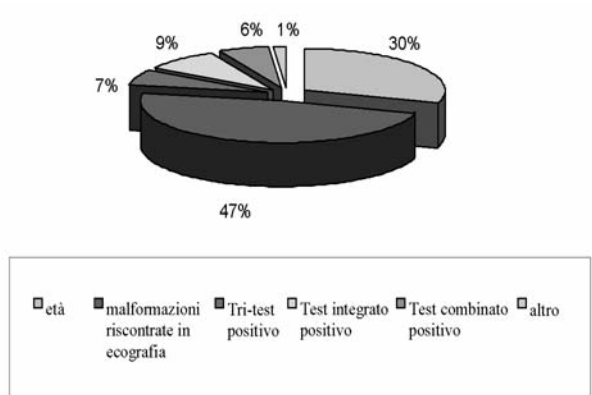


Figura 4
Indicazione clinica per l'esecuzione della diagnosi invasiva nei 349 casi risultati patologici in base ai test rapidi.

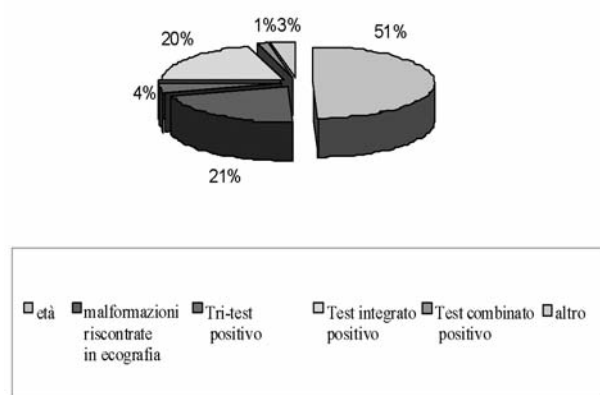


Figura 5
Indicazione clinica per l'esecuzione delle 7.665 procedure invasive

Analizzando le indicazioni cliniche di tutti i 7665 casi (Fig. 5) l'indicazione che prevale risulta essere l'età (51%): in effetti nella popolazione piemontese le gestanti di età superiore ai 35 anni sono sempre più numerose (erano il 20% del totale nel 2003 e il 31% nel 2006); seguono le malformazioni riscontrate in ecografia (21%) ed i risultati positivi al test di screening: Test integrato (20%), Tri-test (4%) e Test combinato (1%). Considerando il fatto che i test rapidi prenatali vengono richiesti soprattutto per effettuare una diagnosi d'urgenza per le aneuploidie dei cromosomi maggiormente responsabili di malformazioni fetali evidenziabili ecograficamente, o in seguito a un risultato positivo dei test di screening per anomalie cromosomiche o per il generico rischio legato all'età materna, i dati ottenuti con i test rapidi sono ampiamente concordanti con quanto si sospettava dai riscontri ecografici e dai test di screening.

Nella Tabella 4 si stima il "peso" dell'indicazione alla diagnosi invasiva calcolando il valore dell'OAPR (*Odds of being Affected with a Positive Result*). Nella popolazione ritenuta ad alto rischio per età si trova un caso patologico ogni 30-37 procedure invasive, tra le donne con reperti ecografici sospetti di anomalia cromosomica una ogni 10 ha davvero una gravidanza affetta, tra le donne con test di screening positivo una su 25 è un vero positivo.

CONCLUSIONI

In base ai dati a nostra disposizione, la QF-PCR si può considerare una tecnica rapida di biologia molecolare in grado di diagnosticare, entro 24-72 ore, la presenza di un'anomalia numerica dei cromosomi maggiormente coin-

volti nelle malformazioni fetali, legate o no all'età materna, o identificati dalle alterazioni dei valori biochimici nel siero materno: la trisomia 21 associata alla SD, la trisomia 13 associata alla sindrome di Patau e la trisomia 18 associata alla sindrome di Edwards. È così possibile con la QF-PCR ridurre i tempi d'attesa della risposta e quindi l'ansietà materna.

La QF-PCR è anche in grado di identificare (ma non di quantificare) la presenza di una seconda linea cellulare aneuploide (mosaicismo) quando rappresenta una buona percentuale della popolazione cellulare (20%-30%). Se la seconda linea cellulare è inferiore al 20%-30%, la QF-PCR non è in grado di rilevarla: in questo caso è utile la FISH, che non solo identifica la seconda linea, ma le assegna un valore percentuale. La FISH, pur essendo una tecnica impegnativa che richiede operatori preparati per la lettura dei nuclei, risulta di aiuto anche in altre situazioni: nel caso in cui tutti i microsatelliti utilizzati in QF-PCR risultassero non informativi (presenza di un solo picco per omozigosi degli alleli esaminati), la FISH potrebbe subentrare come tecnica alternativa per l'analisi del campione. La QF-PCR è anche in grado di diagnosticare rapidamente il sesso fetale e le anomalie numeriche del cromosoma X.

La QF-PCR, pur prendendo in considerazione diverse regioni di ogni cromosoma che analizza per minimizzare il rischio di errori diagnostici dovuti a piccoli sbilanciamenti, non è comunque in grado di valutarne eventuali traslocazioni oppure qualsiasi altra variazione numerica o di struttura che coinvolga cromosomi diversi dal 21, 13, 18. Lo stesso discorso è valido per la FISH: infatti l'analisi su nuclei in interfase non permette di rilevare riarrangiamenti

Tabella 4
Risultati secondo l'indicazione clinica: il valore predittivo positivo dell'indicazione clinica è espresso come 1/... (OAPR)

Indicazione	Campioni analizzati		Cariotipo patologico			Test rapido patologico		
	%	numero	%	numero	1/...	%	numero	1/...
Età materna	51	3.909	33	131	30	30	105	37
Segni ecografici	21	1.610	42	166	10	47	164	10
Screening positivo	25	1.916	19	77	25	22	75	25
Altro	3	230	6	22	10	1	5	76
Totale	100	7.665	100	396	19	100	349	22

strutturali che coinvolgono i cromosomi 21, 13, 18, X ed Y oppure altri cromosomi (la FISH ha il limite di evidenziare solo ciò che si va a cercare con le sonde ma è "cieca" a tutto il resto).

In conclusione, come dimostrato anche in letteratura, i test rapidi presi in esame sono tecniche molecolari che, pur riducendo i tempi d'attesa della risposta e l'ansietà materna, sono a tutt'oggi da affiancare alla citogenetica classica.

La citogenetica classica, infatti, ha il vantaggio di prendere in esame l'intero corredo cromosomico ed è utile per individuare un gran numero di anomalie numeriche e strutturali dei cromosomi. Inoltre, la lettura al microscopio ottico dell'intero assetto cromosomico, permette l'analisi di ogni singolo cromosoma. In questo modo vengono messe in evidenza anomalie cromosomiche quali trisomie, traslocazioni bilanciate, inversioni, delezioni, duplicazioni o altro, non solo a carico dei cromosomi 21, 13, 18, X ed Y ma dell'assetto cromosomico completo.

RINGRAZIAMENTI

Parte di questo lavoro è stato eseguito con fondi della Regione Piemonte, Ricerca Sanitaria Finalizzata R282 (DD n.466 25/07/2008). I.B. è titolare di una borsa per la RSF Regione Piemonte R282: "Diagnosi Prenatali invasive: test rapido sul DNA o cariotipo? Razionalizzazione per l'appropriatezza delle diverse indicazioni".

Si ringraziano per la costante collaborazione gli ecografisti del Centro di Diagnosi Prenatale dell'ASO OIRM-S. Anna di Torino e tutto il personale ostetrico ed infermieristico.

BIBLIOGRAFIA

1. **Cummings MR.** Human heredity-Principles and Issues. Thomson Brooks/Cole, VI ed. 2003.
2. **Dalla Piccola B, Novelli G.** Genetica medica essenziale. Phoenix Editrice 1998.
3. **Faris Mujezinovic F, Alfirevic Z.** Procedure-Related Complications of Amniocentesis and Chorionic Villous Sampling. A Systematic Review. *Obstet Gynecol* 2007;110:687-94
4. **Ried T, Landes G, Dackowski W et al.** Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured liquid amniotic cellules. *Hum Mol Genet.* 1992;1:307-13.
5. **Caccia N, Johnson JM, Robinson GE et al.** Impact of prenatal testing on maternal-fetal bonding; chorionic vil-lus sampling versus amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165:1122-5.
6. **Beeson D, Golbus MS.** Anxiety engendered by amniocentesis. *Birth Defect.* 1979;15:191-7.
7. **Evers-Kiebooms G, Swerts A, Van Den Berghe H.** Psychological aspects of amniocentesis: anxiety feelings in three different risk groups. *Clin Genet.* 1988;33:196-206.
8. **Dudarewicz L, Holzgreve W, Jeziorowska A et al.** Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. *J Appl Genet* 2005;46(2):207-15.
9. **Shaffer LG, Bui TH.** Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 2007;145(C):87-98.
10. **Mann K, Fox SP, Abbs SJ et al.** Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnosis service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet.* 2001;;58:1057-61.
11. **Mann K, Donaghue C, Fox SP et al.** Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *Eu. J. Hum. Genet.* 2004;12:907-15.
12. **Ventruto V, Sacco G, Lonardo F.** Testo-Atlante di Citogenetica Umana. Springer Editrice 2001.
13. **Donaghue C, Mann K, Docherty Z et al.** Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. *Prenat Diagn.* 2005;25:65-72.

Per corrispondenza:

Dott. Luca Sbaiz
AO OIRM-S. Anna, Torino
C.so Spezia 60 - 10126 Torino
Tel.: 011 3135649 - Fax: 011 3135582
e-mail: luca.sbaiz@oirmsantanna.piemonte.it