

La determinazione della Frazione Fetale nei test prenatali non invasivi (NIPT): linee guida italiane ed internazionali a confronto

Il presente documento confronta le diverse linee guida, italiane e internazionali, sull'utilizzo dei test di screening prenatali non invasivi (NIPT) per lo studio delle più comuni aneuploidie. Attraverso l'accostamento dei diversi documenti chiarisce le motivazioni che hanno portato alla frequente adozione del valore di frazione fetale (FF) del 4% come limite di cut-off, sottolineando nel contempo l'importanza di condurre studi sperimentali per la determinazione dell'effettivo Limit of Detection (LOD) della metodica NIPT utilizzata, cioè la più bassa FF alla quale è possibile rilevare una aneuploidia. Infine commenta l'incidenza dei risultati non conclusivi (con conseguente riprelievo) a causa di bassa frazione fetale derivanti dall'adozione del cut-off di FF al 4% e la maggiore incidenza di aneuploidie cromosomiche riscontrata in campioni a bassa FF.

Nel maggio del 2015 il Ministero Italiano della Salute ha divulgato le sue linee guida per il corretto utilizzo dei test prenatali non invasivi (NIPT) basati sullo studio del cell-free DNA (cfDNA) fetale¹. Tale documento, chiaro e completo, oltre a illustrare in modo generale i NIPT, a valutarne i possibili impatti sociali ed economici e a descriverne le esperienze sul relativo uso, ne commenta anche la sensibilità, la specificità e l'affidabilità con particolare attenzione al tema della Frazione Fetale (FF).

Come chiaramente riportato su tale documento, molte delle metodologie NIPT richiedono che la FF, cioè la quantità di cfDNA fetale rilevata nel campione di plasma analizzato rispetto al cfDNA totale, sia superiore al 4%²⁻⁴. Questo limite si basa sull'assunto che a basse percentuali di FF le aneuploidie cromosomiche potrebbero non essere identificate. Il documento riporta testualmente in più passaggi infatti che una "soglia $\geq 4\%$ sia critica per evitare di avere risultati falsi negativi (FNR)" e che "per essere affidabile il risultato debba essere ottenuto a partire da una percentuale di DNA fetale libero non inferiore al 4% del totale del DNA libero presente nel plasma materno".

La letteratura scientifica e le linee guida internazionali⁵⁻⁹ concordano nel sottolineare l'importanza della FF per una corretta applicazione delle metodologie NIPT, anche se non menzionano il limite assoluto del 4%. E' infatti importante non trascurare la differenza tra le metodologie, e le differenze di sensibilità e risoluzione che ne derivano. La **Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM)** evidenzia che la FF rappresenta un importante parametro di riferimento per valutare la qualità dei dati derivanti dall'analisi del DNA fetale ad sangue materno, ma allo stesso tempo afferma che non tutte le metodologie hanno le medesime caratteristiche, e quindi esigenze. Il "Committee Opinion" della sopra citata società, pubblicato su *American Journal of Obstetrics & Gynecology* nel Giugno 2015⁶, afferma che "alcune" tecnologie hanno l'esigenza di limitare le analisi ai campioni che presentano frazione fetale $\geq 4\%$ per esigenze di laboratorio, di conseguenza per altre non è ritenuto un requisito fondamentale. Anche il recente "Position Statement" dell'**International Society of Prenatal Diagnosis (ISPD)**, pubblicato su *Prenatal Diagnosis* nell'Agosto 2015⁷, non menziona il limite di cut-off del 4% ma, riconoscendo le limitazioni derivanti da una bassa FF nel campione, commenta che "alcuni" laboratori

hanno adottato come strategia, per la corretta interpretazione dei dati, quella di stabilire un limite (non specificato) sotto il quale non si effettua l'analisi. Il valore del 4%, è indispensabile precisarlo, è un valore che deriva da modelli statistici teorici^{3,10-12}, non basati su studi di validazione diretta delle specifiche metodiche NIPT. Il limite del 4% di FF citato delle Linee Guida Italiane, sotto il quale i risultati non sono da considerarsi attendibili, non è quindi un dato sperimentale.

La questione su cui riflettere diviene, quindi, la reale motivazione del fatto che, nonostante molti test richiedano la $FF \geq 4\%$ per assicurare una elevata attendibilità e un ridotto numero di insuccessi o fallimenti, a oggi non siano stati effettuati studi per verificare il "reale" valore più basso di FF al quale una specifica metodologia possa rilevare la presenza di un'aneuploidia, cioè il cosiddetto ***Limit of Detection (LOD)***.

E' altresì importante notare come tutti i documenti considerati, sia le Linee Guida Italiane che Internazionali⁵⁻⁷, concordino nell'identificare come campioni a maggiore rischio (da 4 a 10 volte maggiore) di aneuploidie cromosomiche, proprio i campioni a bassa FF (<4%), spesso non analizzati da alcune metodiche NIPT proprio a causa dell'adozione del cut-off di FF del 4%. La minore frazione fetale è quindi considerata, a giudizio unanime, una spia di possibili anomalie cromosomiche fetali. Da tale considerazione deriva la conclusione che, rinunciando ad analizzare campioni con alta probabilità di aneuploidia, si possano ritardare i tempi di diagnosi con le problematiche tecniche ed etiche che ne conseguono. Non è da trascurare, in aggiunta a quanto discusso, che proprio perché la letteratura e le Linee Guida convengono nel dedicare particolare attenzione ai campioni a bassa frazione fetale,

l'adozione da parte del professionista di metodi NIPT non adeguati per l'analisi di campioni con $FF < 4\%$, potrebbe rappresentare un elemento di pregiudizio in caso di controversie medico-legali.

Un'ulteriore riflessione è stata fatta sulle linee guida della **SMFM**⁶, dell'**ISPD**⁷ e dell'**American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)**⁵ in relazione alle percentuali di fallimento derivanti dall'utilizzo di un limite di cut-off del 4% di FF. Secondo i citati documenti, il ricorso a tale limite determina un'incidenza di riprelievi fino all'8% dei casi, allungando i tempi di diagnosi, come precedentemente osservato, e diminuendo la *compliance* della gestante al test. Comunque, anche dopo l'esecuzione di un nuovo prelievo, un risultato conclusivo viene ottenuto in circa il 50% dei casi.

Genoma, in relazione a quanto sopra, ha condotto al proprio interno, diversi studi di validazione volti ad identificare con precisione il LOD delle tecnologie di cui dispone, individuandolo ad un valore del 2% di frazione fetale.

Il laboratorio ha inoltre condotto ulteriori ricerche di approfondimento, rilevando nei campioni a FF compresa tra 2% e 4% una percentuale di aneuploidie di 6 volte superiore rispetto ai campioni con $FF > 4\%$. Utilizzando un cut-off "sperimentale" del 2% ha ridotto il numero dei risultati non conclusivi (e quindi dei riprelievi) e rilevato le aneuploidie con tempestività. I dati relativi agli studi di cui sopra sono stati presentati a congressi internazionali come lo European Human Genetics Conference (EHGC) di Glasgow nel 2015 e l'International Conference On Prenatal Diagnosis (ISPD) di Washington sempre nel 2015¹³⁻¹⁴. Al momento tali dati sono in attesa di pubblicazione su un'importante rivista scientifica del settore.

Bibliografia.

1. Ministero della Salute. Linee-Guida Screening prenatale non invasivo basato sul DNA (Non Invasive Prenatal Testing – NIPT). Maggio 2015
2. Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207:137.e1-8.
3. Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors. *Fetal Diagn Ther* 2012; 31:237-43.
4. Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012;14:296-305.
5. Committee Opinion No. 640: Cell-free DNA Screening for Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2015; 126:e31-7.
6. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Publications Committee #36: Prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212:711-6.
7. Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn* 2015; 35:725-34.
8. Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. Summary and recommendations. *Eur J Hum Genet* 2015 Apr 1. doi: 10.1038/ejhg.2015.56
9. Gregg AR, Gross SJ, Best RG, et al. ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genet Med* 2013;15:395-8.
10. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 2013;33:667-74.
11. Benn P, Cuckle H. Theoretical performance of non-invasive prenatal testing for chromosome imbalances using counting of cell-free DNA fragments in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2014; 34:778-83
12. Fan HC, Quake SR. Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. *PLoS One* 2010;5: e10439
13. Fiorentino F, Spinella F, Bono S, Pizzuti F, Mariano M, Polverari A, Duca S, Cottone G, Nuccitelli A, Sessa M, Baldi M. Feasibility of noninvasive prenatal testing for common fetal aneuploidies in maternal serum with low levels circulating fetal cell-free DNA fraction. *Prenat Diagn* 2015; 35 Suppl. 1: pag 1
14. Bono S, Pizzuti F, Mariano M, Polverari A, Duca S, Cottone G, Nuccitelli A, Sessa M, Spinella F, Baldi M, Fiorentino F. Massively Parallel Sequencing (MPS) reliably identifies trisomy 21, 18, and 13 in maternal plasma with low-level fetal cell-free DNA fractions. Poster presentation from the European Society of Human Genetics (ESHG) meeting Glasgow 2015.

