



Università degli Studi di Padova
Dipartimento di salute della donna e del bambino – SDB
U.O.C. Clinica Ginecologica ed Ostetrica
Scuola di Specializzazione in Ginecologia e Ostetricia
Direttore Prof. Giovanni Battista Nardelli

CELL FREE FETAL DNA NEL PLASMA MATERNO: CARATTERISTICHE ED APPLICAZIONI NELLA DIAGNOSI PRENATALE NON INVASIVA

Dott.ssa Angela Dalla Toffola

Padova, 30,06,2015

Scuola di specializzazione in Ginecologia ed Ostetricia

CASO CLINICO



1

Una gravida di 36 anni è risultata ad alto rischio per la Sindrome di Down al test combinato.

NIPT su cfDNA può essere una giusta opzione?

2

A una gravida di 41 anni l'ecografia morfologica ha posto il sospetto di atresia esofagea (segno della doppia bolla) e riscontrato polidramnios. Non ha eseguito test combinato nè ha intenzione di sottoporsi a test invasivi

NIPT su cfDNA può essere una giusta opzione?

3

Una gravida di 40 anni a 9 s.g. richiede counselling circa le possibilità di diagnosi prenatale non invasiva

NIPT su cfDNA può essere una giusta opzione?



CARATTERISTICHE DEL cffDNA

THE LANCET

Early report

Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum

Y M Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F Chamberlain, Vik Rai, Ian L Sargent, Christopher W G Redman,
James S Wainscoat

- ✓ Frammenti corti, di dimensione < 150 bp derivati dai trofoblasti della placenta che possono perciò essere utilizzati per lo studio di patologie fetali

Size Separation of Circulatory DNA in Maternal Plasma Permits Ready Detection of Fetal DNA Polymorphisms

YING LI, BERNHARD ZIMMERMANN, CORINNE RUSTERHOLZ, ANJEUNG KANG,
WOLFGANG HOLZGREVE, and SINUHE HAHN*

Trophoblastic Oxidative Stress and the Release of Cell-Free Feto-Placental DNA

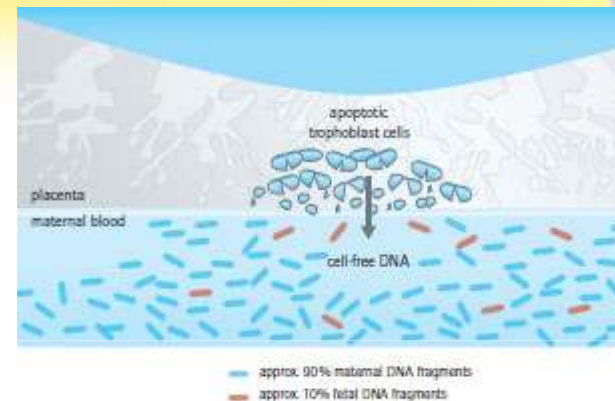
May Lee Tjoa,* Tereza Cindrova-Davies,†
Olivera Spasic-Boskovic,† Diana W. Bianchi,* and
Graham J. Burton†

- ✓ Evidenziabile nel plasma materno dalla quinta settimana di gestazione, dalla nona-decima settimana è sempre presente ed in quantità tale per fare diagnosi

Oepkes D et al
Prenatal Aneuploidy Screening using Cell Free DNA.
Am J Obstet Gynecol. 2015 Jun 10

CARATTERISTICHE DEL cffDNA

- ✓ Costituisce circa il 10 % del cell free DNA (cfDNA)
- ✓ 970 volte più abbondante delle cellule fetali
- ✓ La concentrazione incrementa con l'età gestazionale e in presenza di aneuploidie fetali
- ✓ Scompare dopo due ore dalla nascita



Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma

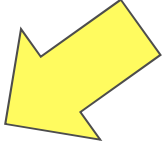
Y. M. Dennis Lo,¹ Jun Zhang,¹ Tse N. Leung,² Tze K. Lau,² Allan M. Z. Chang,² and N. Magnus Hjelm¹

Departments of ¹Chemical Pathology and ²Obstetrics and Gynecology, Chinese University of Hong Kong, Prince of Wales Hospital, Shatin, New Territories, Hong Kong

*Oepkes D et al
Prenatal Aneuploidy Screening using Cell Free DNA.
Am J Obstet Gynecol. 2015 Jun 10*

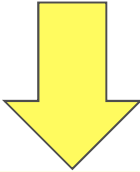


3 METODI PER L'ANALISI DEL cffDNA



Sequenziamento
massivo parallelo
(MPS)

Sequenziamento di tutti i frammenti di cfDNA estratti e conteggio del numero di frammenti ottenuti per ciascun cromosoma.
Il materiale in eccedenza da un cromosoma indica che il feto può essere portatore di una copia in più di quel cromosoma



Sequenziamento
di regioni target

Sequenziamento focalizzando l'analisi su specifici frammenti di DNA (13,18,21,X,Y).
Più efficiente del MRS e meno costoso



Sequenziamento basato sui
polimorfismi
a singolo nucleotide (SNP)

Valutazione dell'alterazione di singola base che si differenzia tra madre e feto genotipizzando il DNA materno estratto dal buffy coat e il genotipo materno-fetale estratto dal plasma

APPLICAZIONI DELLA NIPT SU cfDNA

- ✓ Determinazione del sesso fetale applicata alle gravidanze a rischio per malattie genetiche X-linked e per iperplasia surrenale congenita ai fini terapeutici
- ✓ Determinazione del genotipo fetale Rh in donne RhD negative a rischio di malattia emolitica neonatale
- ✓ Malattie autosomiche dominanti sporadiche o ad eredità paterna (Acondroplasia, Morbo di Huntigton)
- ✓ Alcune malattie autosomiche recessive (B-talassemia, fibrosi cistica)
- ✓ **Screening delle principali aneuploidie cromosomiche**

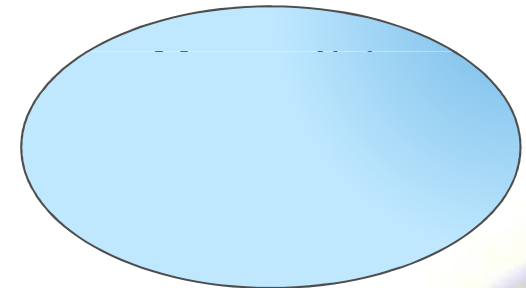
Noninvasive Prenatal Measurement of the Fetal Genome

H. Christina Fan^{1,5,*}, Wei Gu^{1,*}, Jianbin Wang¹, Yair J. Blumenfeld², Yasser Y. El-Sayed², and Stephen R. Quake^{1,3,4}



PERFORMANCE NELLO SCREENING DELLE ANEUPLODIE

Aneuploidia	Detection rate (%)	False positive rate (%)
Trisomia 21	99,2	0,09
Trisomia 18	96,3	0,13
Trisomia 13	91	0,13
Monosomia X	90,3	0,23
XXX, XXY, XYY	93	0,14
Trisomia 21 nelle gravidanze gemellari	93,7	0,23



PERFORMANCE NELLO SCREENING DELLE ANEUPLODIE

TRISOMIA 21

Nelle gravidanze singole, l'uso del cfDNA permette di individuare più del 99% delle T21 con un FPR di meno del 0,1%.

- ✓ 19 studi sono stati condotti su gravidanze ad alto rischio
- ✓ 4 studi sulla popolazione generale con un DR del 100% e FPR del 0,08%

Table 2 Studies reporting on the application of cell-free DNA analysis of maternal blood in screening singleton pregnancy

Study	Method	GA (weeks)	Trisomy 21		Non-trisomy 21	
			Total (n)	Detection (n (%), 95% CI)	Total (n)	False positive (n (%), 95% CI)
Chiu (2011) ⁴¹	MPSS	13 (—)	86	86 (100, 95.8–100)	146	3 (2.05, 0.43–5.89)
Ehrich (2011) ⁴²	MPSS	16 (8–36)	39	39 (100, 91.0–100)	410	1 (0.24, 0.01–1.35)
Palomaki (2011) ⁴³	MPSS	15 (8–21)	212	209 (98.6, 95.9–99.7)	1471	3 (0.20, 0.04–0.60)
Sehnert (2011) ⁴⁴	MPSS	15 (10–28)	13	13 (100, 75.3–100)	34	0 (0.00, 0.00–10.28)
Ashoor (2012) ⁴⁵	CSS	12 (11–13)	50	50 (100, 92.9–100)	347	0 (0.00, 0.00–1.06)
Bianchi (2012) ⁴⁶	MPSS	15 (10–23)	89	89 (100, 95.9–100)	404	0 (0.00, 0.00–0.91)
Jiang (2012) ⁴⁸	MPSS	— (10–34)	16	16 (100, 79.4–100)	887	0 (0.00, 0.00–0.42)
Lau (2012) ⁴⁹	MPSS	12 (11–28)	11	11 (100, 71.5–100)	97	0 (0.00, 0.00–3.73)
Nicolaidis (2012) ⁵⁰	CSS	12 (11–13)	8	8 (100, 63.1–100)	1941	0 (0.00, 0.00–0.19)
Norton (2012) ⁵¹	CSS	16 (10–38)	81	81 (100, 95.6–100)	2888	1 (0.04, 0.00–0.19)
Sparks (2012) ⁵³	CSS	18 (11–36)	36	36 (100, 90.3–100)	131	0 (0.00, 0.00–2.78)
Guex (2013) ⁵⁵	MPSS	12 (11–13)	30	30 (100, 88.4–100)	146	0 (0.00, 0.00–2.50)
Liang (2013) ⁵⁷	MPSS	21 (11–39)	39	39 (100, 91.0–100)	367	0 (0.00, 0.00–1.00)
Nicolaidis (2013) ⁵⁹	SNP	13 (11–13)	25	25 (100, 86.3–100)	204	0 (0.00, 0.00–1.79)
Song (2013) ⁶¹	MPSS	16 (11–21)	8	8 (100, 63.1–100)	1733	0 (0.00, 0.00–0.21)
Verweij (2013) ⁶²	CSS	14 (10–28)	18	17 (94.4, 72.7–99.9)	486	0 (0.00, 0.00–0.76)
Bianchi (2014) ⁶³	MPSS	17 (8–39)	5	5 (100, 47.8–100)	1947	6 (0.31, 0.11–0.67)
Comas (2014) ⁶⁴	CSS/SNP	14 (9–23)	4	4 (100, 39.8–100)	311	0 (0.00, 0.00–1.18)
Pergament (2014) ⁷¹	SNP	14 (7–40)	58	58 (100, 93.8–100)	905	0 (0.00, 0.00–0.41)
Porreco (2014) ⁷²	MPSS	17 (9–37)	137	137 (100, 97.3–100)	3185	3 (0.09, 0.02–0.28)
Shaw (2014) ⁷³	MPSS	> 12	11	11 (100, 71.5–100)	184	0 (0.00, 0.00–1.98)
Stumm (2014) ⁷⁴	MPSS	15 (11–32)	41	40 (97.6, 87.2–99.9)	430	0 (0.00, 0.00–0.85)
Quezada (2015) ⁷⁵	CSS	10 (10–11)	32	32 (100, 89.1–100)	2753	1 (0.04, 0.00–0.20)
Song (2015) ⁷⁶	MPSS	9 (8–12)	2	2 (100, 15.8–100)	201	0 (0.00, 0.00–1.82)

Pooled analysis (% (95% CI))

Fixed effects model

Random effects model

Cochran's Q

I² statistic (% (95% CI))

Egger bias



Only the first author of each study is given. CSS, chromosome-specific sequencing; GA, gestational age; MPSS, massively parallel shotgun sequencing; SNP, single nucleotide polymorphism-based method.

*Gil MM et al
Analysis of cell-free DNA in
maternal blood in screening for
fetal aneuploidies: updated
meta-analysis.
Ultrasound Obstet Gynecol.
2015 Mar;45(3)*

PERFORMANCE NELLO SCREENING DELLE ANEUPLODIE

TRISOMIA 18 e 13

La performance del cfDNA è peggiore rispetto alla T21 (T18 DR 96% e T13 91% con FPR combinato 0,26%).

L'obiettivo di saggiare le 3 trisomie assieme comporta un aumento del FPR complessivo da 0,09 a 0,35%

- ✓ 21 studi hanno analizzato la T18
- ✓ 18 studi hanno analizzato la T13

Table 3 Studies reporting on the application of cell-free DNA analysis of maternal blood in screening for trisomy 18 in singleton pregnancy

Study	Method	GA (weeks)	Trisomy 18		Non-trisomy 18	
			Total (n)	Detection (n (%), 95% CI)	Total (n)	False positive (n (%), 95% CI)
Chen (2011) ²	MPSS	—	37	34 (91.9, 78.1–98.3)	252	5 (1.98, 0.65–4.57)
Sehnert (2011) ⁴⁴	MPSS	15 (10–28)	8	8 (100, 63.1–100)	39	0 (0.00, 0.00–9.03)
Ashoor (2012) ⁴⁵	CSS	12 (11–13)	50	49 (98.0, 89.4–99.9)	347	0 (0.00, 0.00–1.06)
Bianchi (2012) ⁴⁶	MPSS	15 (10–23)	36	35 (97.2, 85.5–99.9)	460	0 (0.00, 0.00–0.80)
Jiang (2012) ⁴⁸	MPSS	— (10–34)	12	12 (100, 73.5–100)	891	1 (0.11, 0.00–0.62)
Lau (2012) ⁴⁹	MPSS	12 (11–28)	10	10 (100, 69.2–100)	98	0 (0.00, 0.00–3.69)
Nicolaides (2012) ⁵⁰	CSS	12 (11–13)	2	2 (100, 15.8–100)	1947	2 (0.10, 0.01–0.37)
Norton (2012) ⁵¹	CSS	16 (10–38)	38	37 (97.4, 86.2–99.9)	2888	2 (0.07, 0.01–0.25)
Palomaki (2012) ⁵²	MPSS	14 (9–22)	59	59 (100, 93.9–100)	1912	5 (0.26, 0.09–0.61)
Sparks (2012) ⁵³	CSS	18 (11–36)	8	8 (100, 63.1–100)	159	0 (0.00, 0.00–2.29)
Guex (2013) ⁵⁵	MPSS	12 (11–13)	20	19 (95.0, 75.1–99.9)	156	0 (0.00, 0.00–2.34)
Liang (2013) ⁵⁷	MPSS	21 (11–39)	13	13 (100, 75.3–100)	393	0 (0.00, 0.00–0.93)
Nicolaides (2013) ⁵⁹	SNP	13 (11–13)	3	3 (100, 29.2–100)	226	0 (0.00, 0.00–1.62)
Song (2013) ⁶¹	MPSS	16 (11–21)	2	2 (100, 15.8–100)	1739	1 (0.06, 0.00–0.32)
Bianchi (2013) ⁶³	MPSS	17 (8–39)	2	2 (100, 15.8–100)	1950	3 (0.15, 0.03–0.45)
Pergament (2014) ⁷¹	SNP	14 (7–40)	24	24 (100, 85.8–100)	938	0 (0.00, 0.00–0.39)
Porreco (2014) ⁷²	MPSS	17 (9–37)	39	36 (92.3, 79.1–98.4)	3283	0 (0.00, 0.00–0.11)
Shaw (2014) ⁷³	MPSS	> 12	7	7 (100, 59.0–100)	188	0 (0.00, 0.00–1.94)
Stumm (2014) ⁷⁴	MPSS	15 (11–32)	8	8 (100, 63.1–100)	463	1 (0.22, 0.01–1.20)
Quezada (2015) ⁷⁵	CSS	10 (10–11)	10	9 (90.0, 55.5–99.8)	2775	5 (0.18, 0.06–0.42)
Song (2015) ⁷⁶	MPSS	9 (8–12)	1	1 (100, 2.50–100)	202	0 (0.00, 0.00–1.81)

Pooled analysis (% (95% CI))
 Fixed effects model
 Random effects model
 Cochran's Q
 I² statistic (% (95% CI))
 Egger bias

–0.2031 (P = 0.2831) 0.4687 (P = 0.0513)

Only the first author of each study is given. CSS, chromosome-specific sequencing; GA, gestational age; MPSS, massively parallel shotgun sequencing; SNP, single nucleotide polymorphism-based method.

Table 4 Studies reporting on the application of cell-free DNA analysis of maternal blood in screening for trisomy 13 in singleton pregnancy

Study	Method	GA (weeks)	Trisomy 13		Non-trisomy 13	
			Total (n)	Detection (n (%), 95% CI)	Total (n)	False positive (n (%), 95% CI)
Chen (2011) ²	MPSS	—	25	25 (100, 86.3–100)	264	3 (1.14, 0.24–3.29)
Bianchi (2012) ⁴⁶	MPSS	15 (10–23)	14	11 (78.6, 49.2–95.3)	485	0 (0.00, 0.00–0.76)
Jiang (2012) ⁴⁸	MPSS	— (10–34)	2	2 (100, 15.8–100)	901	0 (0.00, 0.00–0.41)
Lau (2012) ⁴⁹	MPSS	12 (11–28)	2	2 (100, 15.8–100)	106	0 (0.00, 0.00–3.42)
Palomaki (2012) ⁵²	MPSS	14 (9–22)	12	11 (91.7, 61.5–99.8)	1959	16 (0.82, 0.47–1.32)
Ashoor (2013) ⁵⁴	CSS	13 (11–26)	10	8 (80.0, 44.4–97.5)	1949	1 (0.05, 0.00–0.29)
Guex (2013) ⁵⁵	MPSS	12 (11–13)	13	13 (100, 75.3–100)	163	0 (0.00, 0.00–2.24)
Liang (2013) ⁵⁷	MPSS	21 (11–39)	3	3 (100, 29.2–100)	403	1 (0.25, 0.01–1.38)
Nicolaides (2013) ⁵⁹	SNP	13 (11–13)	1	1 (100, 2.5–100)	228	0 (0.00, 0.00–1.61)
Song (2013) ⁶¹	MPSS	16 (11–21)	1	1 (100, 2.5–100)	1740	0 (0.00, 0.00–0.21)
Bianchi (2013) ⁶³	MPSS	17 (8–39)	1	1 (100, 2.5–100)	1913	3 (0.16, 0.03–0.46)
Pergament (2014) ⁷¹	SNP	16 (12–22)	14	14 (100, 76.8–100)	49	0 (0.00, 0.00–7.25)
Porreco (2014) ⁷²	SNP	14 (7–40)	11	11 (100, 71.5–100)	953	0 (0.00, 0.00–0.39)
Shaw (2014) ⁷³	MPSS	17 (9–37)	16	14 (87.5, 61.7–98.5)	3306	0 (0.00, 0.00–0.11)
Stumm (2014) ⁷⁴	MPSS	> 12	3	3 (100, 29.2–100)	192	0 (0.00, 0.00–1.90)
Quezada (2015) ⁷⁵	MPSS	15 (11–32)	5	5 (100, 47.8–100)	466	0 (0.00, 0.00–0.79)
Song (2015) ⁷⁶	CSS	10 (10–11)	5	2 (40.0, 52.8–85.3)	2780	2 (0.07, 0.01–0.26)
	MPSS	9 (8–12)	1	1 (100, 2.5–100)	202	0 (0.00, 0.00–1.81)

Pooled analysis (% (95% CI))
 Fixed effects model
 Random effects model
 Cochran's Q
 I² statistic (% (95% CI))
 Egger bias

21.6836 (P = 0.0001) 66.2 (38.7–78.2)
 –0.6143 (P = 0.1104) 0.5732 (P = 0.0907)

Only the first author of each study is given. *Hall reports 15 cases but one case is from Nicolaides 2013. CSS, chromosome-specific sequencing; GA, gestational age; MPSS, massively parallel shotgun sequencing; SNP, single nucleotide polymorphism-based method.

Gil MM et al
 Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies:
 updated meta-analysis.
 Ultrasound Obstet Gynecol. 2015 Mar;45(3)

PERFORMANCE NELLO SCREENING DELLE ANEUPLOIDIE

ANEUPLOIDIE DEI CROMOSOMI SESSUALI

La performance del cfDNA è **peggiore nelle aneuploidie dei cromosomi sessuali rispetto alle trisomie con una DR del 90% per la monosomia X e del 93% per le altre aneuploidie dei cromosomi sessuali**

- ✓ 16 studi hanno analizzato la monosomia X
- ✓ 12 studi hanno analizzato le aneuploidie dei cromosomi sessuali

Table 5 Studies reporting on the application of cell-free DNA analysis of maternal blood in screening for monosomy X in singleton pregnancy

Study	Method	GA (weeks)	Monosomy X		Non-monosomy X	
			Total (n)	Detection (n (%), 95% CI)	Total (n)	False positive (n (%), 95% CI)
Sehnert (2011) ⁴⁴	MPSS	15 (10-28)	2	2 (100, 15.8-100)	45	0 (0.00, 0.00-7.87)
Bianchi (2012) ⁴⁶	MPSS	15 (10-23)	20	15 (75.0, 50.9-91.3)	462	1 (0.22, 0.01-1.20)
Jiang (2012) ⁴⁸	MPSS	— (10-34)	3	3 (100, 29.2-100)	899	1 (0.11, 0.00-0.62)
Lau (2012) ⁴⁹	MPSS	12 (11-28)	8	8 (100, 63.1-100)	100	0 (0.00, 0.00-3.62)
Guex (2013) ⁵⁵	MPSS	12 (11-13)	15	15 (100, 78.2-100)	161	0 (0.00, 0.00-2.27)
Liang (2013) ⁵⁷	MPSS	21 (11-39)	5	5 (100, 47.8-100)	401	1 (0.25, 0.01-1.38)
Mazloom (2013) ⁵⁸	MPSS	— (10-20)	21	17 (81.0, 58.1-94.6)	390	1 (0.26, 0.01-1.42)
Nicolaides (2013) ⁵⁹	SNP	13 (11-13)	2	2 (100, 15.8-100)	227	0 (0.00, 0.00-1.61)
Samango-Sprouse (2013) ⁶⁰	SNP	13 (9-36)	12	11 (91.7, 61.5-99.8)	175	0 (0.00, 0.00-2.09)
Song (2013) ⁶¹	MPSS	16 (11-21)	3	2 (66.7, 9.4-99.2)	1737	0 (0.00, 0.00-0.21)
Comas (2014) ⁶⁴	CSS/SNP	14 (9-23)	0	—	315	1 (0.32, 0.01-1.76)
Hooks (2014) ⁶⁸	CSS	15 (10-34)	27	26 (96.3, 81.0-99.9)	387	2 (0.52, 0.06-1.85)
Nicolaides (2014) ⁷⁰	CSS	12 (11-13)	47	43 (91.5, 79.6-97.6)	116	0 (0.00, 0.00-3.13)
Porreco (2014) ⁷²	MPSS	17 (9-37)	9	9 (100, 66.4-100)	3269	11 (0.34, 0.17-0.60)
Shaw (2014) ⁷³	MPSS	> 12	3	3 (100, 29.2-100)	192	0 (0.00, 0.00-1.90)
Song (2015) ⁷⁶	MPSS	9 (8-12)	0	—	1	1 (100, 0.00-2.71)
Pooled analysis (% (95% CI))						
Fixed effects model				1.8 (0.0-48.4)		1.8 (0.0-46.4)
Random effects model				1.8 (0.0-48.4)		1.8 (0.0-46.4)
Cochran's Q				1.8 (0.0-48.4)		1.8 (0.0-46.4)
I ² statistic (% (95% CI))				1.8 (0.0-48.4)		1.8 (0.0-46.4)
Egger bias				-0.2358 (P=0.6481)		0.3781 (P=0.1668)

Only the first author of each study is given. CSS, chromosome-specific sequencing; GA, gestational age; MPSS, massively parallel shotgun sequencing; SNP, single nucleotide polymorphism-based method.

Table 6 Studies reporting on the application of cell-free DNA analysis of maternal blood in screening for 47,XXX; 47,XXY; 47,YYY (SCA) other than monosomy X in singleton pregnancy

Study	Method	GA (weeks)	47,XXX; 47,XXY; 47,YYY		Non-SCA	
			Total (n)	Detection (n (%), 95% CI)	Total (n)	False positive (n (%), 95% CI)
Bianchi (2012) ⁴⁶	MPSS	15 (10-23)	9	8 (88.9, 51.8-99.7)	453	0 (0.00, 0.00-0.81)
Jiang (2012) ⁴⁸	MPSS	— (10-34)	3	3 (100, 29.2-100)	896	0 (0.00, 0.00-0.41)
Lau (2012) ⁴⁹	MPSS	12 (11-28)	1	1 (100, 2.5-100)	99	0 (0.00, 0.00-3.66)
Guex (2013) ⁵⁵	MPSS	12 (11-13)	5	5 (100, 47.8-100)	156	0 (0.00, 0.00-2.34)
Liang (2013) ⁵⁷	MPSS	21 (11-39)	3	3 (100, 29.2-100)	398	1 (0.25, 0.01-1.39)
Mazloom (2013) ⁵⁸	MPSS	— (10-20)	8	8 (100, 63.1-100)	382	0 (0.00, 0.00-0.96)
Samango-Sprouse (2013) ⁶⁰	SNP	13 (9-36)	3	3 (100, 29.2-100)	172	0 (0.00, 0.00-2.12)
Hooks (2014) ⁶⁸	CSS	15 (10-34)	7	7 (100, 59.0-100)	380	0 (0.00, 0.00-0.97)
Nicolaides (2014) ⁷⁰	CSS	12 (11-13)	9	9 (100, 66.4-100)	107	1 (0.94, 0.02-5.10)
Porreco (2014) ⁷²	MPSS	17 (9-37)	6	6 (100, 54.1-100)	3263	5 (0.15, 0.05-0.36)
Shaw (2014) ⁷³	MPSS	> 12	1	1 (100, 2.5-100)	191	0 (0.00, 0.00-1.91)
Song (2015) ⁷⁶	MPSS	9 (8-12)	1	0 (0.0, 0.0-97.5)	202	0 (0.00, 0.00-1.81)
Pooled analysis (% (95% CI))						
Fixed effects model				0.0 (0.0-47.8)		0.0 (0.0-49.8)
Random effects model				0.0 (0.0-47.8)		0.0 (0.0-49.8)
Cochran's Q				0.0 (0.0-47.8)		0.0 (0.0-49.8)
I ² statistic (% (95% CI))				0.0 (0.0-47.8)		0.0 (0.0-49.8)
Egger bias				-1.4222 (P=0.1776)		-0.1007 (P=0.6579)

Only the first author of each study is given. All monosomy-X pregnancies have been excluded from these data. CSS, chromosome-specific sequencing; GA, gestational age; MPSS, massively parallel shotgun sequencing; SNP, single nucleotide polymorphism-based method.

Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2015 Mar;45(3)

Gil MM et al

PERFORMANCE NELLO SCREENING DELLE ANEUPLODIE

SCREENING NELLE GRAVIDANZE GEMELLARI

La performance del cfDNA è peggiore nelle gravidanze gemellari rispetto a quelle singole.

Nelle gemellari dizigotiche ciascun feto contribuisce in quantità differente al cfDNA ed è perciò possibile che la frazione fetale del feto affetto sia < al quantitativo minimo (4%) per avere un test valido.

- ✓ 5 studi hanno analizzato la performance del cfDNA nelle gravidanze gemellari

Table 7 Studies reporting on the application of cell-free DNA analysis of maternal blood in screening for fetal aneuploidies

Study	Method	GA (weeks)	Trisomy 21		Non-trisomy 21	
			Total (n)	Detection (n (%), 95% CI)	Total (n)	False positive (n (%), 95% CI)
Canick (2012) ⁴⁷	MPSS	14 (10–18)	7	7 (100, 59.0–100)	17	0 (0.0, 0.0–19.5)
Lau (2013) ⁵⁶	MPSS	13 (11–20)	1	1 (100, 2.5–100)	11	0 (0.0, 0.0–28.5)
del Mar Gil (2014) ⁶⁵	CSS	13 (12–13)	10	9 (90.0, 55.5–99.7)	181	0 (0.0, 0.0–2.0)
Grömminger (2014) ⁶⁶	MPSS	15 (10–18)	4	4 (100, 39.8–100)	12	0 (0.0, 0.0–26.5)
Huang (2014) ⁶⁹	MPSS	19 (11–36)	9	9 (100, 66.4–100)	178	0 (0.0, 0.0–2.1)
Pooled analysis (% (95% CI))						
Fixed effects model						
Random effects model						
Cochran's Q				1.3097 (P=0.8597)		1.4591 (P=0.8374)
I ² statistic (% (95% CI))				0.0 (0.0–64.1)		0.0 (0.0–64.1)
Egger bias				-0.0239 (P=0.0833)		—

Only the first author of each study is given. CSS, chromosome-specific sequencing; GA, gestational age; MPSS, massively parallel shotgun sequencing.

Gil MM et al
Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis.
Ultrasound Obstet Gynecol. 2015 Mar;45(3)

LIMITI DEL NIPT SU cfDNA

- ✓ **Fallimento nel 1-3% dei casi** per fetal fraction cfDNA < 4% o risultato non interpretabile. La ripetizione del test sarà condotta con successo nel 50-80% dei casi.



Una bassa FF è associata con aneuploidia fetale
(in particolare T13, 18 e triploidie):
offrire la possibilità di sottoporsi ad un test diagnostico!

- ✓ **Una bassa FF è associata a obesità materna:** fallimento nel 20% delle donne con BMI >25 e nel 50% delle donne con BMI > 35.

Nelle donne obese potrebbe non essere il miglior test di screening!

- ✓ **Gravidanze gemellari:**
 - ❖ Difficile assegnazione della possibile aneuploidia
 - ❖ La quota eccedente in presenza di trisomia di un feto può essere mascherata dall'altro gemello normale
 - ❖ Possibile effetto di un vanishing twin sul risultato dello screening
 - ❖ tasso di fallimento alto e DR minore

LIMITI DEL NIPT SU cfDNA

✓ **Microdelezioni:**

- ❖ Microdelezioni o microduplicazioni cromosomiche si verificano nel 1,2% dei feti e alcune di esse sono associate a deficit neurologici e dello sviluppo
*(incidenza 22 q microdelezione 1/4000-5000 individui,
le altre sono più rare, incidenza 1/30000-50000 individui)*
- ❖ Il cfDNA può riconoscere solo 4-5 di queste alterazioni
- ❖ Il VPP del cfDNA è molto basso (5-20%) con percentuale elevata di FP (aumento ingiustificato di procedure invasive NON giustificate)



Ad oggi, lo screening con cfDNA per le microdelezioni non è raccomandato!

- ✓ **Eterologa:** grossa difficoltà sia nel caso di donatore maschile che femminile, soprattutto nei test che utilizzano la SNP che basandosi sulla genotipizzazione non riesce a differenziare
- ✓ **Sensibilità e specificità sono elevate, ma non per tutti i cromosomi**
- ✓ **Possibili falsi positivi e falsi negativi**
- ✓ **Esperienza soprattutto su popolazioni a rischio**

*Oepkes D et al,
Prenatal Aneuploidy Screening using Cell Free DNA.
Am J Obstet Gynecol. 2015 Jun 10*

COME INTERPRETARE UN TEST POSITIVO

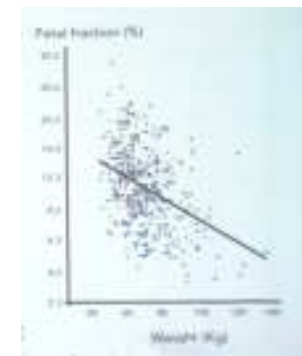
✓ Counselling pre e post test:

- ❖ Test di screening con la possibilità di risultati falsi positivi
- ❖ Offrire test diagnostico (amniocentesi) per la conferma del risultato

Dar P et al, Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. Am J Obstet Gynecol. 2014 Nov: studio su > 30.000 donne sottoposte a NIPT in cui il 6% con cfDNA positivo ha interrotto la gravidanza senza eseguire un test diagnostico di conferma

✓ Falsi positivi:

- ❖ Mosaicismo placentare: stessi limiti di villocentesi
- ❖ Vanishing twin sindrome (15% di tutti i FP):
alcuni test in commercio accettano il cfDNA dopo la 16^a s.g. se VT a 8^a s.g.
- ❖ Aumento o riduzione del DNA circolante di origine materna a causa di
infezioni, tumori (anche latenti), trasfusioni di sangue, mosaicismo latente, immunoterapia, trapianti, peso materno



Oepkes D et al, Prenatal Aneuploidy Screening using Cell Free DNA. Am J Obstet Gynecol. 2015 Jun 10

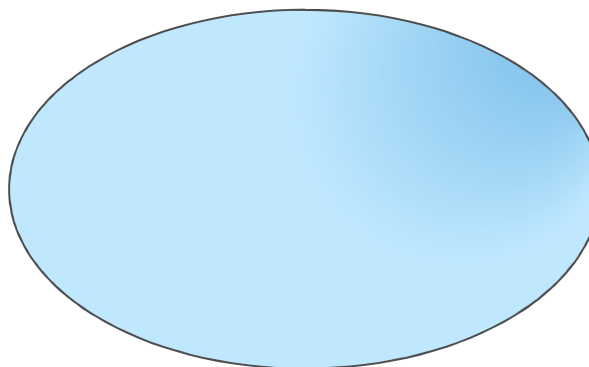
TEST IN COMMERCIO

G-test

HarmonyTM
PRENATAL TEST

Prénatest


prenataltest[®]



verifiTM
prenatal test

MaterniT21TM
PLUS

Tranquility

 **panorama**TM
prenatal test

*Allyse M et al,
Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges.
Int J Womens Health. 2015 Jan 16*

COMPARAZIONE TRA I TEST IN COMMERCIO

	S.G.	gg consegna	Dove si esegue	Cons gen pre/post	Anom crom sessuali	Micro del/dup	Sesso fetale	Rh	Calcolo FF
G-test	10	8-9	Italia	Si	Si	Si	Si	No	Si
Harmony	10	7	USA	Si	Si	No	Si	No	Si
Maternity T21	9	10	USA	Si	Si	Si	Si	No	Si
Panorama	10	5-6	USA	Si	Si	Si	Si	No	Si
Praenatest	10	10	Germania	No	Si	No	Si	No	Si
Prenataltest	10	8-10	Italia	Pre	Si opzionale	No	Si	Si	Si
Tranquility	10	5	Svizzera	No	Si	Si	Si	No	Si
Verifi	10	5	USA	No	Si	Si	Si	No	Si

Allyse M et al, Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges.

Int J Womens Health. 2015, Jan 16

SIGU-Documento di indirizzo sull'impiego di indagini prenatali non invasive, Feb 2014

COMPARAZIONE TRA I TEST IN COMMERCIO

	Tecnologia	Strumento	Validazioni scientifiche pubblicate	Gemellari	Eterologa
G-test	W-MPS	Life Tech	Si	Si	Si
Harmony	Target-SNP	Affimetrix	Si	Si (per trisomie, no vanishing)	Si
Maternity T21	W-MPS	Illumina	Si	Si	Si
Panorama	Target-SNP	Illumina	Si	No	No
Praenatest	W-MPS	Illumina	Si	Si	Si
Prenataltest	W-MPS	Illumina	In press	No	No
Tranquility	W-MPS	Life Tech	In press	Si	Si
Verifi	W-MPS	Illumina	Si	Si	Si

Allyse M et al, Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges.

Int J Womens Health. 2015, Jan 16

SIGU-Documento di indirizzo sull'impiego di indagini prenatali non invasive, Feb 2014

NIPT versus TEST COMBINATO

TEST COMBINATO:
11-13+6 s.g.
DR 92%, FPR 3%, FNR 3%

ECOGRAFIA:

Diagnosi > 65% delle malformazioni
Anticipa la diagnosi dal 2^o al 1^o trimestre

- ✓ **NT aumentata** (centili di riferimento: 2,5 mm=95^o centile): marcatore di aneuploidie/anomalie genetiche, CHD, malformazioni maggiori, infezioni, anemia

INTEGRAZIONE con:

- ✓ **Osso nasale assente** nel 70% T21
- ✓ **DV anomalie** in 80% feti aneuploidi
- ✓ **Tricuspidale reflusso** nel 30-60% feti aneuploidi (60% con T21)



DOSAGGIO EMATICO:

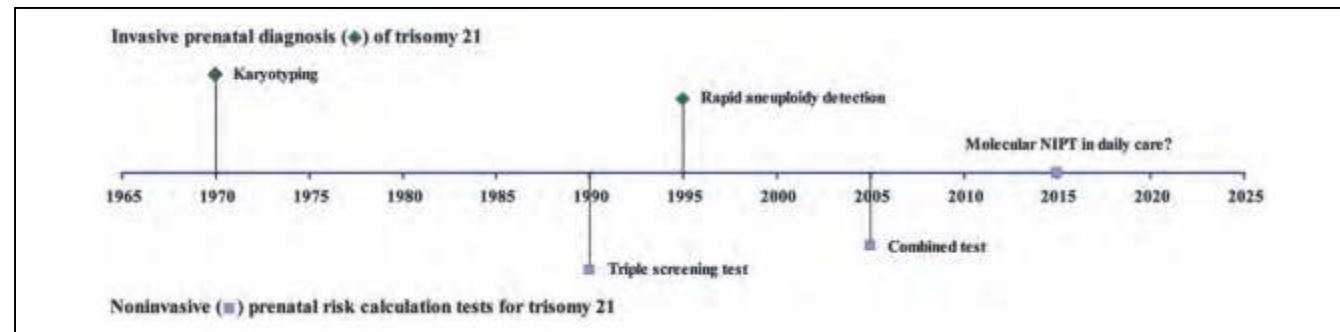
- ✓ **Free-Bhcg** diminuisce nelle gravidanze euploidi
- ✓ **PAPP-A** aumenta nelle gravidanze euploidi
- ✓ T21: alta Bhcg, bassa PAPP-A
- ✓ T13/18: bassa Bhcg, bassa PAPP-A (o indosabile)

Bhcg

PAPP-A

*Mersy E et al, Noninvasive detection of fetal trisomy 21: systematic review and report of quality and outcomes of diagnostic accuracy studies performed between 1997 and 2012. Hum Reprod Update. 2013 Jul-Aug
The fetal medicine foundation, 2015*

NIPT versus TEST COMBINATO



- ✓ NIPT più efficace rispetto ai test di screening tradizionali, con un'alta sensibilità e specificità per T21 e quindi riduzione di FP e FN
- ✓ NIPT più costoso
- ✓ Il test combinato ha il vantaggio di riconoscere molte malformazioni
- ✓ Un'ecografia a 11-13 s.g. è comunque conveniente prima di NIPT

*Mersy E et al, Noninvasive detection of fetal trisomy 21: systematic review and report of quality and outcomes of diagnostic accuracy studies performed between 1997 and 2012. Hum Reprod Update. 2013 Jul-Aug
The fetal medicine foundation, 2015*

NIPT versus INVASIVA



VILLOCENTESI:


- ✓ Si esegue a 10 s.g.
- ✓ Via transaddominale
- ✓ Rischio abortività 1%
- ✓ Cariotipo standard
- ✓ Preliminare 7 giorni-
definitivo 21 giorni

Test genetici

AMNIOCENTESI:

- ✓ Si esegue > 15 s.g.
- ✓ Via transaddominale
- ✓ Rischio abortività 1%
- ✓ Cariotipo preliminare 5-7 giorni con
FISH rapida/qfPCR – definitivo 21
giorni

Test genetici e infettivologici



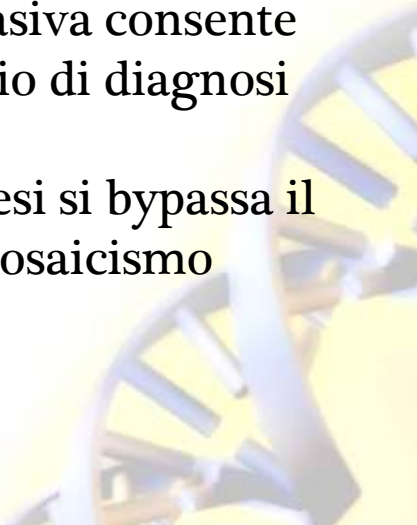
NIPT versus INVASIVA



NIPT

- ✓ Meno efficace di diagnosi invasiva ma non è un esame invasivo
- ✓ Fallisce nel 1-3 % di casi
- ✓ La diagnosi, se positiva, va verificata con test invasivo

AMNIOCENTESI- VILLOCENTESI

- ✓ Il rischio di tecnica invasiva è sovrastimato
 - ✓ La diagnosi invasiva consente spettro più ampio di diagnosi
 - ✓ Con amniocentesi si bypassa il problema del mosaicismo placentare
- 

INTEGRAZIONE DEL NIPT ALL'INTERNO DEL NHS

❖ CONTINGENT SCREENING

Offrire il test combinato a tutte le gravide e successivamente proporre il NIPT al sottogruppo identificato a rischio intermedio/alto (20%)



Riduzione dei test invasivi grazie alla diminuzione dei FP



Si potrebbero perdere alcune aneuploidie



NIPT COME PARTE DEL TEST COMBINATO

Associazione di NIPT e traslucenza nucale, utilizzando il freeDNA fetale da plasma materno al posto del dosaggio di PAPP-A e freeBhcg



Riduzione dei costi per il dosaggio proteico potrebbe aiutare nel rendere gratuito il NIPT



Alcuni studi sostengono l'uso di PAPP-A e freeBhcg nella predizione di preeclampsia o IUGR

INTEGRAZIONE DEL NIPT ALL'INTERNO DEL NHS

❖ TEST DI SCREENING PRIMARIO

Proporre NIPT come test di screening di I[^] livello per le donne che richiedono l'analisi delle aneuploidie



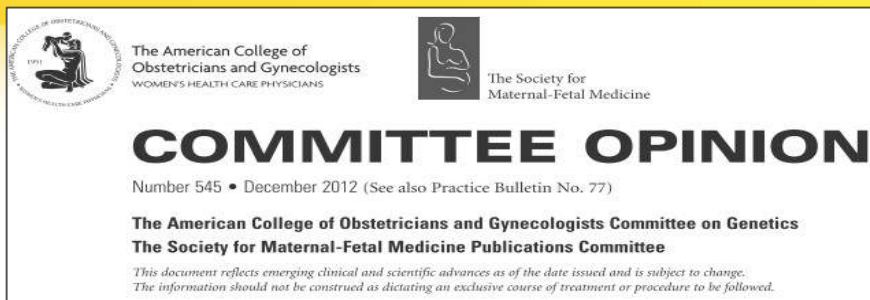
Alto DR con basso FPR, con di conseguenza un numero di gravidanze affette perse e di procedure invasive ridotto



Alto costo

Performance peggiore per T13, monosomia X, aneuploidie cromosomi sessuali e in gravidanze gemellari

INTERNATIONAL POLICY STATEMENT



2012, American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)

- ✓ Non dovrebbe essere offerto come test routinario
- ✓ Non è un test diagnostico ma di screening
- ✓ Va offerto alle gravidanze ad alto rischio di aneuploidie e non va offerto alle gravidanze a basso rischio e gemellari
- ✓ Funziona meglio > 35 anni e in T21
- ✓ Accurato counselling pre e post test
- ✓ Le Pazienti debbono essere informate che un test negativo non assicura che il feto sia sano
- ✓ Le Pazienti debbono essere informate che un test positivo non significa che il feto sia affetto e va offerta una tecnica invasiva
- ✓ In caso di malformazione fetale rilevata all'ecografia, va offerta tecnica invasiva

Indicazioni

- Età materna > 35 anni
- Segni ecografici fetali indicativi di aumentato rischio di aneuploidia
- Storia di precedente gravidanza con trisomia
- Risultato ad alto rischio da altri test di screening

American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 545: Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Obstet Gynecol. 2012 Dec,

INTERNATIONAL POLICY STATEMENT



2013, International Society for prenatal Diagnosis (ISPD)

- ✓ Ad oggi, lo screening più utilizzato e attendibile per le maggiori trisomie consiste nel test combinato
- ✓ Lo screening del DNA fetale su sangue materno sembra essere una tecnologia emergente, ma non può sostituire gli attuali test diagnostici
- ✓ La diagnosi di certezza delle aneuploidie fetali può essere ottenuta esclusivamente con l'amniocentesi o la villocentesi

Indicazioni

- Risultato ad alto rischio da altri test di screening
- Età materna > 35 anni
- Segni ecografici fetali indicativi di aumentato rischio di aneuploidia
- Storia di precedente gravidanza con trisomia
- Familiarità per trisomia

*Position Statement from the aneuploidy screening committee onBehalf
of the Board of the international society for prenatal diagnosis, April 2013. P. Benn et al*

INTERNATIONAL POLICY STATEMENT



2014, International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG)

- ✓ Non è un test diagnostico ed in caso di risultato positivo è necessaria la conferma da parte di un test invasivo
- ✓ Non va offerto nella popolazione generale a basso rischio
- ✓ Il test combinato non dovrebbe essere eseguito dopo un NIPT risultato a basso rischio
- ✓ NIPT può inserirsi come alternativa al test invasivo dopo un test combinato a rischio intermedio
- ✓ NIPT non può sostituirsi ai test invasivi in caso di test combinato ad alto rischio
- ✓ In caso di malformazione fetale rilevata all'ecografia, va offerta tecnica invasiva
- ✓ L'accuratezza di NIPT nelle gravidanze gemellari è da indagare ulteriormente

ISUOG consensus statement on the impact of non-invasive prenatal testing (NIPT) on prenatal ultrasound practice. Ultrasound Obstet Gynecol. 2014 Jul

INTERNATIONAL POLICY STATEMENT

The logo for SIEOG (Società Italiana di Ecografia Ostetrico Ginecologica) consists of the letters 'SIEOG' in a bold, white, sans-serif font, centered within a solid red square.

SIEOG

2014, Società Italiana di Ecografia Ostetrico Ginecologica (SIEOG)

- ✓ Il test va eseguito solo previa consulenza genetica ed ecografia
- ✓ L'utilizzo del test deve essere integrato con le strategie di screening attuali e non sostituendosi a queste
- ✓ Gli studi di validazione del cfDNA sono stati eseguiti principalmente su popolazioni ad alto rischio; i primi studi su popolazione generale sembrano confermare i dati degli studi precedenti
- ✓ il potenziale migliorativo di tale test riguarda in particolare l'apparente bassa percentuale di falsi positivi che potrà potenzialmente ridurre la necessità di utilizzo di metodiche invasive di diagnosi prenatale
- ✓ Il cfDNA non è un test diagnostico ma di screening per cui in nessun caso si può procedere ad interruzione di gravidanza senza una conferma attraverso esami diagnostici
- ✓ Il cfDNA ha dimostrato una buona attendibilità nell'identificazione della trisomia 21, una minore precisione per le trisomie 13, 18 e anomalie dei cromosomi X e Y. Non è in grado, attualmente, di identificare le altre patologie dei cromosomi che rappresentano oltre il 30% delle anomalie del cariotipo presenti nella popolazione a rischio.

INTERNATIONAL POLICY STATEMENT

2014, Società Italiana di Genetica Umana (SIGU)



Malattie monogeniche e determinazione del sesso fetale:


E' appropriato l'impiego del NIPT (sensibilità e specificità del test ben definite e test ritenuto attendibile e diagnostico) in:

- ✓ determinazione del sesso fetale applicata alle gravidanze a rischio per malattie genetiche X-linked evitando DPI in feti F, e
- ✓ per Iperplasia surrenale congenita a fini terapeutici;
- ✓ determinazione del genotipo fetale RHD in donne Rh D-negative a rischio per malattia emolitica del neonato
- ✓ nelle malattie autosomiche dominanti di origine paterna e in quelle de novo il cui sospetto clinico viene posto in sede ecografica (es. alcune condrodisplasie);

Nella ricerca di aneuploidie:

- ✓ Il ruolo del test è **aumentare il potere predittivo degli screening prenatali** (ecografici e biochimici) nelle gravidanze ad alto rischio di aneuploidie (età materna avanzata, anomalie ecografiche e biochimiche deponenti per un rischio aumentato); pertanto si colloca come test di screening avanzato per la valutazione del rischio di trisomia 21, 18 e 13
- ✓ Il test NIPT non è diagnostico, pertanto non è sostitutivo della diagnosi prenatale invasiva.
- ✓ Il risultato patologico deve essere confermato con il test invasivo.
- ✓ Il risultato negativo è relativamente affidabile grazie all'elevato VPN, ma a causa della fisiologia placentare, potrebbe non riflettere un reale stato di normalità del feto, anche per il limitato tipo di anomalie cromosomiche che sono oggetto del test (T21, T18 e T13).
- ✓ Il test va proposto sempre con il supporto di consulenza genetica


SIGU, Documento di indirizzo sull'impiego di indagini prenatali non invasive, Feb 2014



CONSULENZA GENETICA

Le informazioni della consulenza pretest devono includere:

- ✓ Il test NIPT non è un test di routine né un test diagnostico, ma come test di screening presenta sensibilità e specificità elevate (NIPT non sostituisce la DPI)
- ✓
 - Vantaggi rispetto allo screening su siero materno
 - DR più alta,
 - bassa % FP,
 - meno dipendente dall'età gestazionale rispetto agli screening tradizionali
- ✓ Il test studia solo le trisomie più frequenti (il 50% della patologia cromosomica fetale clinicamente rilevante), e non dà altre informazioni genetiche sul feto né rileva traslocazioni sbilanciate, duplicazioni e delezioni parziali e aneuploidie dei cromosomi non considerati
- ✓ Un test negativo non assicura assenza di patologia; un test positivo necessita di conferma diagnostica con approccio invasivo
- ✓ Rischio di fallimento dell'esame di circa 1-3%
- ✓ In caso di anomalie ecografiche fetali resta indicata la DPI
- ✓ Il test non deve essere eseguito in caso di trapianto allogenico d'organi, terapia con cellule staminali allogeniche, emotrasfusione (se trascorsi < 12 mesi dall'ultima trasfusione), vanishing twin (avvenuto dopo 8^a s.g.)



CONSULENZA GENETICA

La consulenza genetica post-test è raccomandata in caso di esito positivo

Tutti i casi positivi devono essere confermati con cariotipo

In caso di test “non informativo”

Deve essere fornita anche una consulenza, includendo, se appropriato, anche la possibilità di una DPI.

CASO CLINICO

1

Una gravida di 32 anni è risultata ad alto rischio per la Sindrome di Down al test combinato.

NIPT su cfDNA può essere una giusta opzione?



NIPT può essere proposto in caso di risultato ad alto rischio da altri test di screening



L'amniocentesi fornisce un risultato in tempi più rapidi

Se NIPT risultasse positivo, le linee guida raccomandano la conferma con test invasivo

CASO CLINICO 2

A una gravida di 41 anni l'ecografia morfologica ha posto il sospetto di atresia esofagea e riscontrato polidramnios.

Non ha eseguito test combinato nè ha intenzione di sottoporsi a test invasivi

NIPT su cfDNA può essere una giusta opzione?



NIPT non è un esame invasivo

Ha un'alta sensibilità e specificità per T21



L'amniocentesi è un test diagnostico

Il rischio di tecnica invasiva è sovrastimato

CASO CLINICO 3

Una gravida di 40 anni a 9 s.g. richiede counselling circa le possibilità di diagnosi prenatale non invasiva

NIPT su cfDNA può essere una giusta opzione?



Rientra per l'età tra le indicazioni

NIPT è un esame con elevata detection rate senza essere invasivo











NIPT non è un esame diagnostico

NIPT studia solo le trisomie più frequenti

Un test negativo non assicura assenza di patologia; un test positivo necessita di conferma diagnostica con approccio invasivo

Rischio di fallimento dell'esame di circa 1-3%

CONCLUSIONI

No.	Recommendations	GRADE
1	<p>Optimal candidates for routine cfDNA aneuploidy screening are women with:</p> <p>Maternal age ≥ 35 years at delivery.</p> <p>Fetal ultrasound finding that indicates an increased risk of aneuploidy, specifically for trisomies 13, 18, or 21.</p> <p>History of previous pregnancy with a trisomy detectable by cfDNA screening (trisomies 13, 18, or 21).</p> <p>Positive screening results for aneuploidy that include a first-trimester, sequential, integrated, or quadruple screen.</p> <p>Parental balanced Robertsonian translocation with increased risk of fetal trisomy 13 or 21.</p>	 Strong recommendation, moderate quality evidence
2	<p>Routine screening for microdeletions with cfDNA is not recommended.</p>	 Strong recommendation, moderate quality evidence
3	<p>For women who desire comprehensive testing for chromosomal disorders, diagnostic testing should be offered.</p>	 Strong recommendation, moderate quality evidence
4	<p>For women who undergo cfDNA aneuploidy screening, maternal serum alpha-fetoprotein, and/or second-trimester anatomy ultrasound scan should also be performed.</p>	
5	<p>Formal genetic counseling by maternal-fetal medicine subspecialist, geneticist, or genetic counselor after a positive cfDNA test is recommended</p>	
6	<p>Chorionic villous sampling or amniocentesis should be offered after a positive cfDNA screen to confirm the diagnosis.</p>	
7	<p>Traditional aneuploidy screening and cfDNA aneuploidy screening should not be performed at the same time.</p>	
8	<p>After a failed cfDNA test, genetic counseling should be performed that includes offering diagnostic testing (chorionic villous sampling or amniocentesis) and repeat cfDNA screening.</p>	

cfDNA, cell-free DNA.
 SMFM. Prenatal aneuploidy screening with cfDNA. Am J Obstet Gynecol. 2015.

Oepkes D et al,
 Prenatal Aneuploidy Screening using Cell Free DNA.
 Am J Obstet Gynecol. 2015 Jun 10