



# Diagnosi prenatali

di Virginia Gatta, biologa

**La diagnosi molecolare comprende un insieme di tecniche, applicate alla patologia clinica, necessarie ad evidenziare patologie sia ereditarie che acquisite.**

**L**e tecniche utilizzate per l'identificazione di mutazioni che determinano malattie, a livello pre e neonatale, sono le stesse tecniche utilizzate per la diagnosi di malattie neoplastiche, tumori, infezioni o per i test di paternità. Le malattie genetiche sono state classificate in autosomiche dominanti, autosomiche recessive, sessuali ma si possono distinguere anche aminoacidopatie o difetti del metabolismo di basi azotate. La loro incidenza è piuttosto variabile e possono essere abbastanza frequenti (come fibrosi cistica e sordità genetica) o molto rare. Ogni Stato ha una sua definizione "legale" di malattia rara e per l'Europa, quindi anche l'Italia, una malattia è definita rara se ha un'incidenza di 1/20.000 nati. Per tale definizione si fa riferimento alle malattie già diagnosticate, molte infatti non lo sono e l'incidenza potrebbe essere superiore, con conseguenze sull'approccio diagnostico-terapeutico.

**L'ecografia è il metodo meno invasivo per eccellenza che con gli ultrasuoni identifica, in alcuni casi, la patologia sulla base degli effetti dovuti ad una particolare mutazione**

La diagnosi viene fatta a livello pre-natale e più spesso neonatale, quindi nei primi giorni di vita del bambino, con tecniche più o meno invasive. Per la scelta delle tecniche è necessario valutare il rapporto costo/beneficio, ponendo inoltre sul piatto della bilancia il possibile miglioramento della vita del bambino e i rischi derivanti dall'uso di una tecnica invasiva. Dunque si può decidere di rischiare un'amniocentesi (tecnica invasiva), se il rischio di malattia genetica è molto alto o se la donna è in età avanzata. È infatti noto che la probabilità che il nascituro sia affetto, ad esempio, dalla sindrome di Down, è più alta se la madre ha superato i 35 anni, età in cui il rischio di un aborto spontaneo dato dall'amniocentesi comincia ad avere lo stesso valore del rischio di avere un bimbo affetto dalla trisomia 21. In questo caso il Sistema Sanitario Nazionale rende gratuita la possibilità, per donne sopra i 35 anni, di fare l'amniocentesi.

## **TECNICHE NON INVASIVE**

L'ecografia è il metodo meno invasivo per eccellenza che con gli ultrasuoni identifica, in alcuni casi, la patologia sulla base degli effetti dovuti ad una particolare mutazione.

Si divide in: **ecografia di primo livello**, effettuata a tutte le donne con lo scopo di individuare le gravidanze extra uterine, riducendo così i rischi per la ma-



dre e, individuare il numero di feti, l'evoluzione e il sesso degli stessi e **ecografia di secondo livello**, detta anche morfologica effettuata tra 20°/22° settimana. Si tratta di un'ecografia approfondita che riporta informazioni sulla facies del bambino, utile ad evidenziare eventuali anomalie sullo sviluppo del cuore e degli organi addominali, sulla colonna vertebrale e anche informazioni sulla polidattilia. Questo tipo di ecografia permette di individuare fino al 90%

di tutte le patologie che determinano anomalie, ma non riesce ad individuare i danni strutturali nel bambino, i difetti più piccoli come quelli a carico degli atri del cuore, i difetti evolutivi e problemi ostruttivi del tratto gastroenterico.

Un'altra tecnica non invasiva è **translucenza nucale**, una fessura translucida in ecografia, situata nella cute nucale del feto. In questa fessura vi è una raccolta di linfa, osservabile nel primo trimestre di gravidanza e, in genere, ha un volume specifico che tuttavia risulta alterato quando il bambino è portatore di una particolare malattia, principalmente la sindrome di Down. Esiste un dibattito sui valori di riferimento da prendere in considerazione per la predizione della patologia e, poiché il volume della fessura cambia da settimana a settimana, tale test deve essere effettuato durante la 20° settimana e la buona pratica prevede di tenere buoni i valori compresi tra 1,1 e 1,4 mm, considerando patologico il valore di 2,5 mm. Spesso alla translucenza nucale sono accoppiati anche il Bi-test e il Tri-test, esami non invasivi per il bambino, che consistono nel prelievo del sangue della mamma. Si misura una serie di composti prodotti dal feto e circolanti nel sangue materno, PAPP (Proteina plasmatica A associata alla gravidanza) e la frazione libera della gonadotropina corionica nel Bi-test, HCG (Gonadotropina corionica), uE3 (Estriolo

non coniugato) e AFP ( $\alpha$ -fetoproteina) nel Tri-test. I valori restituiti sono del tutto probabilistici, consentono di fare uno screening iniziale delle patologie che possono colpire il feto, aiutando quindi ad individuare quali test eseguire nello step successivo. Ad esempio, l'aumento del valore dell' $\alpha$ -feto-proteina nella spina bifida (difetto nella chiusura del tubo neurale) viene ancora accettato collettivamente come valore predittivo. Uno studio ha dimostrato che se si considera solo l'età della mamma e il Bi-Tri-test si ha il 60% di probabilità di diagnosticare in modo efficace la sindrome di Down, con la translucenza nucale il 90%. Quindi è importante accoppiare i test per ottenere un risultato più predittivo.

#### TECNICHE INVASIVE

Le tecniche invasive per eccellenza sono metodiche di prelievo del liquido amniotico, del tessuto dei villi o del cordone ombelicale, che hanno lo scopo di isolare un quantitativo di materiale fetale, necessario per le indagini. Queste tecniche sono consigliate solo in casi specifici, perché hanno un'incidenza di rischio abbastanza elevata, ad esempio l'amniocentesi e la villocentesi hanno un'incidenza di rischio dell'1% di aborto, la cordocentesi è molto meno rischiosa ma anche meno predittiva.

**L'amniocentesi** e quindi il prelievo di liquido amniotico, può essere classificata in:

- precocissima, effettuata prima della 12° settimana. In questo caso il rischio di aborto è nettamente maggiore perché il liquido che si è formato non è ancora ben sviluppato, quindi è maggiore la probabilità di toccare il bambino durante l'esecuzione;
- classica, effettuata tra la 12° e 15° settimana;
- tardiva effettuata nel momento in cui le indagini nel corso della gravidanza suggeriscano la possibilità di altri rischi. Le cellule che vengono isolate con l'amniocentesi, possono essere utilizzate per indagini di qualunque tipo, come le citogenetiche (cariotipo), molecolari (NGS o sequenziamento in parallelo che permette di sequenziare interi genomi) oppure per i dosaggi biochimici. L'amniocentesi è tutt'ora la tecnica più predittiva. La villocentesi è meno rischiosa perché può essere eseguita precocemente e consiste nel prelievo di piccole quantità di tessuto dai villi coriali, ma è meno predittiva perché la contaminazione della materia placentare è molto elevata.



L'analisi della materia placentare, prelevata per errore, può indurre a pensare che ci siano anomalie e che quindi sia necessario un intervento con analisi più invasive. Queste in realtà non sono altro che i "mosaicismi placentari", dovuti alla non uniformità della placenta e alla presenza di aree non perfettamente funzionanti, che non compromettono l'esito della gravidanza o il benessere del bambino.

La **villocentesi** è un test molto precoce che può essere effettuato entro la 9°/12° settimana, senza aumentare troppo il rischio di aborto.

La Funicolocentesi (o cordocentesi) consiste nel prelevare una certa quantità di sangue dal cordone, dalla 16°/18° settimana. E' una tecnica poco rischiosa, dal momento che non risulta essere troppo invasiva per il bambino e per la madre, ma molto meno predittiva perché la contaminazione delle cellule materne è fortissima. La fase successiva è l'analisi del cariotipo che consiste nell'effettuazione di indagini citogenetiche, che analizzano le cellule prelevate con una delle 3 metodiche invasive. Si procede con l'induzione della proliferazione delle cellule per bloccarle poi in metafase e, con una soluzione ipotonica, si determina lo scoppio delle stesse per fissare il materiale in piastra. Si prosegue con una colorazione detta bandeggio che evidenzia la cromatina e dà informazioni sulla struttura del cromosoma, sulla posizione del centromero e sulla localizzazione delle varie bande. L'avvento della fluorescenza ha permesso la creazione di sonde specifiche per ogni porzione di cromosoma, che permettono di marcare i cromosomi sparpagliati nella piastra metafasica e, grazie ad un analizzatore di fluorescenza si osserva se la fluorescenza è giusta e in che posizione si trova. Ci sono sonde specifiche per una porzione di un cromosoma, dette locus specifiche utilizzate soprattutto per l'individuazione delle trisomie (trisomia 21), sonde centromeriche che si legano al centromero e danno informazione sul numero esatto dei cromosomi oppure sonde complete, dette SONDE PAINT che si legano all'intero cromosoma. Il costo per questo tipo di indagine è elevato, infatti essa viene effettuata per

identificare mutazioni particolari, che non possono essere viste con una colorazione normale. I limiti sono legati ai lunghi tempi di esecuzione, alla laboriosità della tecnica e soprattutto al materiale di partenza, che deve essere isolato efficacemente e deve essere in buone condizioni, altrimenti non si riuscirà ad ottenere una piastra metafasica adatta ad essere colorata con i fluorofori. Più moderno è il **cariotipo molecolare o CGHarray**, costituito da un chip da microarray su cui sono legati pezzi del genoma umano. Per l'indagine si utilizza un campione di controllo, quindi un campione di DNA sano (marcato in rosso) e, un campione con DNA del paziente (marcato in verde), che si fanno ibridare in piastra sul microarray per rilevare il segnale. Si analizza a questo punto la fluorescenza ottenuta e, se il rapporto tra la fluorescenza verde (paziente) è maggiore di quella in rosso, si avrà un numero maggiore di cromosomi nel paziente rispetto al controllo, quindi un'aneuploidia in senso positivo, se la fluorescenza verde è minore di quella rossa si avrà una delezione, in caso di parità si otterrà un rapporto di 1:1. Il limite è che si ottengono risultati quantitativi e non qualitativi ma si può analizzare il genoma in una sola ibridazione, si può vedere il singolo gene con ottima risoluzione e si possono analizzare più pazienti in parallelo. Il **prenatal safe**, alternativo all'amniocentesi ma non riconosciuto dal Sistema Sanitario Nazionale, è una tecnica del '97 che ha evidenziato la presenza di frammenti del DNA fetale nel sangue materno, già nelle prime fasi della gravidanza, quindi consiste in un semplice prelievo ematico della donna incinta. Dal materiale ottenuto si vanno ad isolare i frammenti del DNA fetale. Sulla base della quantità di frammenti del cromosoma del bambino ottenuti, si risale statisticamente alla probabilità di avere un bambino affetto da trisomie 13, 18 o 21. Se i frammenti di cromosoma presenti sono più di quelli attesi, quasi sicuramente il bambino sarà affetto da una delle trisomie. E' un'alternativa all'amniocentesi che si può applicare anche allo studio delle trisomie sessuali ed elimina la probabilità di aborto da indagine.

# Linea Activa

Integratori  
alimentari  
per aiutarti  
a vivere meglio



**ArterActiva**  
Capsico, Polygonum,  
con Pepe Nero e Rosa canina



**MioActiva**  
Carnitina e Coenzima Q10,  
con vitamine



**BrainActiva**  
Curcuma ed altri estratti



**MotoActiva**  
Ovomet, Curcuma, Boswellia  
e Coenzima Q10



**MagActiva**  
Aminoacidi ramificati  
con Potassio e Magnesio



**NeurActiva**  
Acetyl-Carnitina, Acido  
Lipoico, Taurina e Coenzima  
Q10, con vitamine



**MicroActiva**  
Riso rosso, vitamine  
ed estratti vegetali



**VenActiva**  
Esperidina, Diosmina, Rutina  
con Glicina

studio**3**farma 