

Screening prenatale dei difetti cromosomici. Risultati di uno studio effettuato nella ASL RM/A nel periodo gennaio 2003 - gennaio 2008

M.R. Boccolini^a, R. De Angelis^a, R. Mattei^a, M.A. Spina^a, R. Impera^b, V. Sargentini^b

^aU.O. Perinatologia, Centro S. Anna, ASL RM/A, Roma
^bU.O. Patologia Clinica Interdistrettuale, ASL/RMA, Roma

Riassunto

Premesse. E' nata recentemente l'esigenza di elaborare un metodo efficace, economico e non invasivo, che permetta di valutare il rischio genetico dell'intera popolazione delle gestanti. Da alcuni anni è stato dimostrato come la combinazione dell'età materna, della translucenza nucale fetale e dei markers biochimici su siero materno (free-βHCG e PAPP-A, Proteina A plasmatica associata alla gravidanza) nel primo trimestre, abbia permesso di identificare l'85-90% dei feti affetti da trisomia 21. Inoltre, mediante lo sviluppo di nuove metodiche che consentono il dosaggio dei marcatori biochimici entro 30 minuti dal prelievo di sangue materno, è stato possibile introdurre una metodica di screening che permette di valutare il rischio di difetti cromosomici nel corso di una sola visita (OSCAR - One Stop Clinics for Assessment of Risk).

Pazienti e metodi. Sono state esaminate 7727 pazienti di età compresa tra i 20 e i 46 anni. E' stata eseguita la misurazione ecografica della nuchal

translucency secondo i criteri della Fetal Medicine Foundation di Londra ed il dosaggio dei marcatori biochimici free-βHCG e PAPP-A con metodica fluoro immuno-enzimatica con il sistema Kryptor di Dasit.

Risultati. In 287 casi si è ottenuto un indice di rischio >1/300. 237 sono stati sottoposti a diagnosi invasiva che ha evidenziato 35 aneuploidie. 18 pazienti avevano un'età inferiore a 35 anni (9 trisomia 21, 2 trisomia 13, 2 trisomia 18, 2 monosomia X, 3 mosaicismo).

Conclusioni. I risultati ottenuti sono conformi a quanto riportato in letteratura, e dimostrano che lo screening condotto nel 1° trimestre di gravidanza, relativamente alla individuazione della patologia cromosomica fetale, presenta una maggiore efficacia rispetto a quanto attualmente proposto dal SSN, in quanto consente di esaminare tutta la popolazione delle gestanti, riducendo il ricorso alle tecniche invasive, che andrebbero limitate ai casi in cui l'indice di rischio ecceda il cut-off 1/300.

Summary

Pre-natal screening of chromosomal defects. Updated results of a study carried out at the Rome Health District from Jan 2003 to Jan 2008

Background. Recently there has been a need to develop a good, inexpensive and non-invasive method to estimate the genetic risk of the total gestational population.

It was demonstrated a few years ago that the fetal nuchal translucency and the biochemical markers of the mother's serum (free-βHCG and PAPP-A, that is, Pregnancy-associated plasma protein-A) during the first

trimester have allowed for the identification of 85% to 90% of the fetuses suffering from trisomy 21 syndrome.

Furthermore, the new methods, which permit the measuring of the biochemical markers within 30 minutes from the taking of a mother's blood sample, have allowed the introduction of a new screening method that can evaluate the risk of chromosomal deficiency in only one visit (OSCAR - One-Stop Clinics for Assessment of Risk).

Patients and methods. The study was comprised of 7727 patients (age range 20-46 years). The nuchal translucen-

cy measurement was performed following the criteria of the London Fetal Medicine Foundation, and the maternal serum levels of free- β HCG and PAPP-A were measured by a fluoro-immuno-enzymatic method using the Kryptor analyser by Dasit.

Results. An index risk $>1/300$ was obtained in 287 cases. Among 237 cases put through an invasive diagnosis, 35 reported aneuploidy. Eighteen patients were less than 35 years old (9 with trisomy 21, 2 with trisomy 13, 2 with trisomy 18, 2 with monosomia X, 3 with mosaicism).

Conclusions. The results obtained are consistent with the data reported in the literature and demonstrate that the screening related to fetal chromosomal pathology performed during the first trimester of pregnancy is more effective than that proposed by the Italian National Health System in that it permits screening the total gestational population, thereby limiting the need to use invasive methods to only those cases with an index risk cut-off $>1/300$.

Key-words: prenatal diagnosis, nuchal translucency, One Stop Clinics for Assessment of Risk (OSCAR).

Introduzione

Al momento attuale la determinazione dell'assetto cromosomico fetale è offerta, dal Sistema Sanitario Nazionale, alle gestanti considerate ad alto rischio genetico sulla base dell'età materna (> 35 anni).

Poiché, l'età media delle pazienti è aumentata in tutti i Paesi industrializzati, il gruppo di gravide che affrisce alla diagnostica invasiva costituisce il 15% delle gravidanze e contribuisce in misura del 30% alla totalità dei neonati con anomalie cromosomiche.

Ciò significa che il 70% delle aneuploidie proviene dal resto della popolazione delle gravide, considerate a basso rischio genetico (età materna < 35 anni) e che un considerevole numero di feti, potenzialmente sani, viene esposto al rischio di abortività legato all'esecuzione di una diagnosi invasiva (0,5 - 1%).

E' nata quindi l'esigenza di elaborare un metodo efficace, economico, non invasivo che permetta di valutare il rischio genetico dell'intera popolazione delle gestanti, prendendo in considerazione l'età materna, la settimana di gravidanza, lo spessore della nuchal translucency ed il dosaggio della free- β HCG e della proteina A plasmatica associata a gravidanza (PAPP-A).

Da alcuni anni è stato dimostrato come la combinazione dell'età materna, della translucenza nucale fetale e dei markers biochimici su siero materno (free- β HCG e PAPP-A) nel primo trimestre, abbia permesso di identificare l'85-90% dei feti affetti da trisomia 21¹⁻⁵.

I livelli di free- β HCG nel sangue materno solitamente diminuiscono con l'avanzare della gravidanza, mentre nelle gravidanze con trisomia 21 a 11-13 settimane i valori di free- β HCG risultano aumentati (circa 2 MoM); al contrario, i livelli di PAPP-A che solitamente aumentano con il progredire della gravidanza, nelle madri di feti con trisomia 21 risultano diminuiti (circa 0.5 MoM). Ambedue i markers subiscono invece un significativo decremento nei casi di Trisomia 13 e 18⁶.

Non è stata dimostrata alcuna associazione significativa tra l'NT fetale ed i livelli sierici di free- β HCG e PAPP-A; questi markers biochimici ed ecografici possono dunque essere combinati per ottenere uno screening più efficace rispetto ad entrambi i metodi considerati individualmente.

Inoltre, mediante lo sviluppo di nuove metodiche che consentono il dosaggio di marcatori biochimici entro 30 minuti dal prelievo di sangue materno, è stato possibile introdurre una metodica di screening che permette di valutare il rischio di difetti cromosomici nel corso di una sola visita (OSCAR - One-Stop Clinics for Assessment of Risk)^{7,8}.

Più recentemente sono stati messi a punto test di tipo sequenziale e integrato, in cui i dati ecografici sono abbinati a quelli sierologici del primo e del secondo trimestre^{9,10}, i cui risultati, peraltro ancora esigui, sembrano essere migliori di quelli relativi al bi-test e al tri-test.

Materiali e metodi

Il Centro di Diagnosi Prenatale della ASL RM/A ha intrapreso lo Screening del I trimestre di gravidanza nel gennaio 2003 dopo il training e l'accreditamento di tutti gli operatori presso la Fetal Medicine Foundation di Londra alla quale periodicamente viene inviato l'audit dei dati ottenuti.

Attualmente il Centro costituisce un presidio riconosciuto dalla Fetal Medicine Foundation (FMF) per l'accreditamento nazionale del centro e sud Italia.

Vengono sottoposte allo screening circa 40 gestanti alla settimana.

Le pazienti si presentano alle 8:30 e ricevono una prima informativa sull'indagine a cui verranno sottoposte. Al momento non è ancora prevista la firma di un consenso informato, ma è in corso di elaborazione un modulo appositamente preparato. Vengono successivamente eseguiti il prelievo ematico (per il dosaggio della free- β HCG e della PAPP-A) e l'esame ecografico con la misurazione della nuchal translucency; alle 13:00 dopo, una dettagliata consulenza perinatale finalizzata alla comprensione del risultato, alle sue possibili implicazioni e alla sua affidabilità, si consegna la risposta sulla stima del rischio di trisomia 21, 13 e 18. Nel caso di un rischio che ecceda il cut-off posto ad 1:300, viene offerta alla paziente la possibilità di eseguire un cariotipo mediante amniocentesi o villocentesi.

L'indagine ultrasonografica viene eseguita con l'ausilio di un ecografo ATL 5000 SonoCT con sonda con-

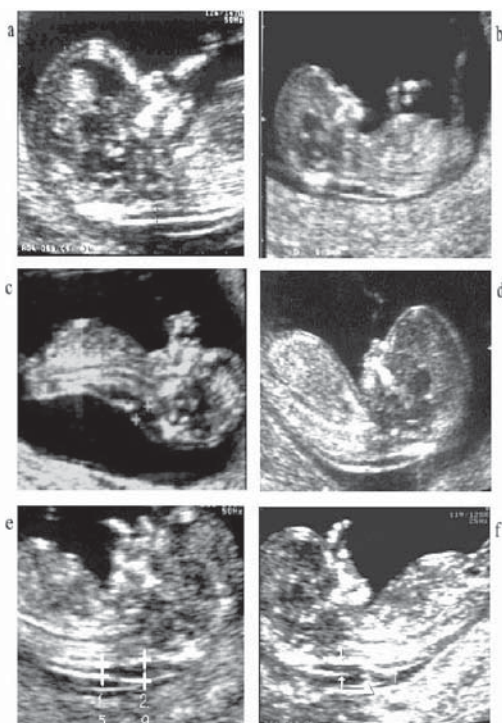


Figura 1. Immagini ecografiche per NT.

vex da 3.5 MHz (Fig. 1 e 2).

I dati ultrasonografici considerati sono la misurazione della Nuchal translucency (NT), il Crown-Rump Length (CRL), il diametro biparietale (DBP) e la frequenza cardiaca (FC). L’osservazione ecografica inoltre consente di escludere la presenza di anomalie fetali maggiori, visibili nel I trimestre.

La misurazione della NT viene effettuata secondo i criteri standardizzati dalla FMF di Londra (Tab. I).

Le determinazioni biochimiche vengono effettuate su siero, con metodica fluorimmunoenzimatica, utilizzando il sistema Kryptor Dasit (Milano, Italia) (Fig. 3).

Lo strumento Kryptor usa la tecnologia TRACE in



Figura 2. Immagine ecografica per NT.

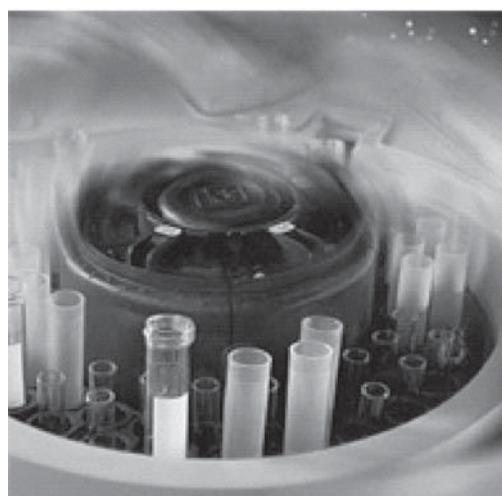


Figura 3. Analizzatore Kryptor Dasit, sistema Brahms.

fase omogenea, basata sul trasferimento di energia non radiante da un donatore (il criptato di europio) fluorescente ad un vicino accettore, la proteina alloflociani-

Tabella I. Translucenza nucale-misurazione.

Età gestazionale	Compresa tra le 11 e le 13 ⁺⁶ settimane e il CRL fra i 45 e gli 84 mm.
Posizione fetale adeguata	Deve essere ottenuta una buona sezione sagittale del feto e l’NT deve essere misurata quando il feto è in una posizione neutrale.
Visualizzazione profilo fetale	Si deve includere nell’immagine soltanto la testa fetale e la porzione superiore del torace. L’ingrandimento deve essere il maggiore possibile e sempre tale per cui, ad un aumento minimo della distanza fra i calipers, corrisponda una variazione della misurazione di soli 0,1 mm.
Ampiezza massima NT	Deve essere misurato lo spessore massimo della translucenza sottocutanea tra la cute e i tessuti molli che ricoprono la colonna cervicale. Bisogna porre molta attenzione nel distinguere correttamente la cute fetale dalla membrana amniotica.
Posizionamento calipers	I calipers devono essere posizionati sulle linee che definiscono la translucenza nucale; la croce del caliper deve essere posizionata in modo tale che sia difficilmente distinguibile nell’immagine in quanto deve confondersi all’interno della linea bianca dell’NT e non deve invece essere posizionata all’interno del fluido nucale.
Acquisizione della misura	Durante l’ecografia deve essere ottenuta più di una misurazione dell’NT e la maggiore tra queste deve essere annotata.

na (XL665). Questa interazione avviene entro distanze tipiche dei complessi antigene-anticorpo e non per distanze maggiori. Un laser di azoto eccita l'immuno-complesso e viene calcolato il rapporto tra il segnale emesso dalla XL665 a 665 nm ed il criptato a 620 nm; questo segnale è proporzionale alla concentrazione di antigene e non risente delle interferenze endogene del siero assicurando un'elevata precisione e ripetibilità del dato analitico.

Il laboratorio analisi partecipa al programma VEQ per marcatori biochimici della sindrome di Down QUALIMEDLAB di EQAS CNR di Pisa.

Le pazienti forniscono dettagli sulle loro caratteristiche demografiche, fisiche e si effettua una rapida anamnesi.

Il calcolo del rischio, effettuato con un programma computerizzato fornito dalla stessa Fetal medicine Foundation (ambiente ViewPoint), viene effettuato tramite un approccio analitico multivariato che contempla l'età materna, la settimana gestazionale, lo spessore della nuchal translucency ed i dosaggi della free-βHCG e della PAPP-A aggiustati per il peso materno.

Per una data epoca gestazionale, ogni valore di free-βHCG e PAPP-A rappresenta la likelihood ratio per la quale si deve moltiplicare il rischio a priori, per ottenere il nuovo rischio¹¹.

Risultati

Dal gennaio 2003 al gennaio 2008 sono state esaminate 7727 gravidanze evolutive a 11-14 settimane di gestazione. La NT è stata ottenuta in tutti i casi.

Nel 17% (1313) dei casi è stata necessaria la ripetizione dell'esame (nella stessa giornata) per la corretta acquisizione della NT.

La mediana dell'età materna è risultata di 30 anni (range 20-46 anni) e in 1473 (19,06%) casi l'età era di 35 anni o più.

Il rischio stimato per Trisomia 21 basato sull'età materna, la NT ed i valori sierici della free-βHCG e della PAPP-A era maggiore di 1/300 nel 3,7% (287 su 7727) dei casi.

In 25 casi (8,71%) le pazienti, nonostante fossero state edotte dell'incremento del rischio genetico, hanno scelto di non ricorrere a tecniche invasive.

Altre 25 pazienti sono state perse al follow-up. Purtroppo nonostante le nostre raccomandazioni non è stato possibile acquisire informazioni su di loro, anche in base all'attuale normativa sulla privacy.

Nella valutazione globale non rientrano pertanto eventuali difetti che potrebbero essere stati riscontrati in questi casi.

I 237 casi rimasti hanno eseguito un test invasivo: 197 presso il nostro Centro e 40 presso altre strutture; in particolare sono stati effettuati 142 (59,9%) villocentesi e 95 (40,1%) amniocentesi. Nel 20% di questi casi è risultato determinante il dato biochimico a fronte di un dato ecografico normale.

Il follow up del gruppo delle pazienti che avevano eseguito il test presso altre strutture è stato condotto telefonicamente 6-12 mesi dopo il parto.

Sulle 237 pazienti studiate, sia presso il nostro centro che altrove, sono stati riscontrati 35 difetti cromosomici, come evidenziato nella Tabella II.

18 pazienti (51,4%), del gruppo dei 35 feti patologici, avevano un'età inferiore ai 35 anni. A tali pazienti quindi non sarebbe stato offerto l'accesso alla diagnosi invasiva.

Sui casi patologici, 8 volte (22,8%) il dato biochimico ha significativamente influito sulla stima del rischio, a fronte del dato ultrasonografico che risultava altrimenti normale.

202 diagnosi invasive hanno dato luogo a feti cromosomicamente normali.

In 1 dei feti cromosomicamente normali si è verificata un'ernia diaframmatica.

I falsi positivi, sul totale dei feti esaminati, costituiscono il 2,95%, inferiore al 5% descritto a livello nazionale. Questo dato è rimasto costante nel corso dei cinque anni, durante i quali si è mantenuta inalterata l'equipe degli ecografisti impiegati.

Si è verificato 1 falso negativo, costituito da un feto down con mosaicismo, identificato solo sei mesi dopo la nascita.

Discussione e conclusioni

I nostri risultati sono conformi a quanto riportato in letteratura e dimostrano che lo screening condotto nel I trimestre, relativamente all'individuazione della patologia cromosomica fetale, presenta maggior efficacia rispetto ai test attualmente offerti dal SSN (diagnostica invasiva riservata alla popolazione con età >35anni). La non invasività del test permette, infatti, di screenare anche la popolazione con età <35 anni (75% delle gestanti) senza il rischio di perdita fetale (0,5-1%) legata alla diagnostica invasiva ed incrementando il detection rate delle aneuploidie.

Le pazienti sono state adeguatamente informate circa l'opportunità di sottoporsi a diagnosi invasive, qualora l'indice di rischio fosse risultato superiore al cut-off previsto. Nella nostra casistica ciò si è verificato solamente in 287 casi rispetto ai 1473 previsti con i criteri attuali.

L'esecuzione dello screening nel I piuttosto che nel II trimestre di gestazione, fornisce inoltre una precoce rassicurazione per le pazienti con risultato normale, mentre in caso di anomalia cromosomica permette l'eventuale interruzione della gravidanza in un'epoca certamente meno traumatica.

La bassa percentuale dei falsi positivi, riscontrata nella nostra casistica, è probabilmente da ascrivere alla accuratezza delle misurazioni, effettuate scrupolosamente secondo gli standard della FMF¹².

Particolarmente importante, per la diffusione del test, risulta essere l'ottima accettazione dello stesso da parte

Tabella II. Difetti cromosomici evidenziati nelle 237 pazienti studiate.

Età	CRL(mm)	NT(mm)	BetaHCG (MoM)	PAPP-A (MoM)	Stima del rischio	Cariotipo
28.14	53	3.2	3.29	0.41	1:57	Trisomia 21
24.68	65	3.0	1.02	0.23	1:26	Trisomia 13
36.16	54	1.3	0.12	0.03	1:26	Triploidia
34.12	64	1.8	2.52	0.46	1:173	mos47,XX, +21[4]/46,XX [19]
35.58	69	5.5	2.46	0.97	1:4	Trisomia 21
40.24	55	4.5	3.44	0.74	1:2	Trisomia 21
37.75	45	5.1	5.03	1.04	1:3	Triploidia
30.42	57	2.7	2.10	0.46	1:35	Del 22q 11.2
33.84	51	igroma	0.73	0.14	1:15	Trisomia 18
46.15	68	2.8	3.68	0.51	1:6	Trisomia 21
33.07	70	2.6	3.61	0.67	1:35	Trisomia 21
28.77	45	4.6	0.48	0.56	1:78	Trisomia 13
30.42	58	1.6	7.06	1.66	1:284	45X0/47XXX
26.76	58	7.2	4.01	1.31	1:17	MonosomiaX
35.23	68	3.5	1.57	0.90	1:37	Trisomia 21
32.29	57	3.2	1.82	0.39	1:37	Trisomia 21
37.43	69	2.0	4.82	1.20	1:253	Trisomia 21
32.43	52	9.5	0.65	0.93	1:47	MonosomiaX
38.05	55	5.4	2.30	0.37	1:2	Trisomia 21
37.56	58	4.1	2.79	1.02	1:3	Trisomia 21
30.25	65	6.1	1.25	0.91	1:69	Trisomia 21
39.30	59	2.2	1.74	0.54	1:57	Trisomia 21
38.15	65	6.8	1.78	0.94	1:7	Trisomia 21
26.55	69	5.5	6.07	0.68	1:10	Trisomia 21
28.35	65	5.3	2.83	0.39	1:8	Trisomia 21
36.97	55	3.1	4.25	0.62	1:14	46,XY,ADD(3(q29)denovo
42.72	58	3.5	3.39	1.12	1:3	Trisomia 21
37.54	61	2.0	2.80	0.37	1:9	Trisomia 21
41.85	71	3.3	3.67	0.44	1:5	Trisomia 21
34.22	54	0.8	0.26	0.26	1:194	Trisomia 18
33.03	66	2.0	3.14	0.49	1:73	Trisomia 21
37.62	68	3.6	2.03	0.62	1:4	Trisomia 21
33.45	52	2.3	5.78	0.28	1:3	Trisomia 21
40.92	51	3.3	1.67	0.97	1:12	Trisomia 21
33.98	69	4.5	0.35	0.41	1:35	Trisomia 21

delle pazienti, per cui è auspicabile l'offerta di tale screening a tutte le gestanti; ciò consentirebbe il ricorso alla diagnostica invasiva, non solo alle gestanti di età superiore a 35 anni, come previsto dall'attuale normativa, ma a tutti i casi in cui la rielaborazione della stima del rischio ecceda il cut-off di 1/300.

Bibliografia

1. Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides KH. One stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: A prospective study of 15,030 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002; 20:219-25.
2. Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, McBride E, Connor JM. Combined ultrasound and biochemical screening for Down's syndrome in the first trimester: a Scottish multicentre study. *BJOG* 2002; 109:667-76.
3. Hecht CA, Hook EB. The imprecision in rates of Down syndrome by 1-year maternal age intervals: a critical analysis of rates used in biochemical screening. *Prenat Diagn* 1994; 14:729-38.
4. Malone FD, Wald NJ, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, et al. First- and second-trimester evaluation of risk (FASTER) trial: principal results of the NI-CHD multicenter Down syndrome screening study. *SMFM* 2004. Abstract 1.

5. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ* 1992; 304:867-9.
6. Nicolaides KH, Brizot ML, Snijders RJM. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *BJOG* 1994; 101:782-6.
7. Pandya PP, Snijders RJM, Johnson SJ, Brizot M, Nicolaides KH. Screening for fetal trisomies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10 to 14 weeks of gestation. *BJOG* 1995; 102:957-62.
8. Snijders RJM, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *Lancet* 1998; 351:343-6.
9. Malone FD, Canick JA, Bail RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowsky R, et al. First-Trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med* 2005; 353: 2001-11.
10. Malone F. Sequential pathways of testing after first-trimester screening for trisomy 21. *Obstet Gynecol* 2005; 105:438.
11. Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free b-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein A. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999; 13:231-7.
12. Spencer K, Spencer CE, Power M, Dawson C, Nicolaides KH. Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one stop clinic: A review of three years prospective experience. *BJOG* 2003; 110:281-6.