

INFORMATIVA E CONSENSO INFORMATO ALLA DIAGNOSI CITOGENETICA PRENATALE TRADIZIONALE E MOLECOLARE (ARRAY-CGH) SU CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO O VILLI CORIALI

A. Finalità

L'indagine citogenetica fetale (o **cariotipo**) viene eseguita su cellule fetali presenti nel liquido amniotico, e prelevate mediante amniocentesi, oppure nei villi coriali, prelevate mediante villocentesi.

La sua finalità è lo studio dell'assetto cromosomico fetale, al fine di evidenziare la presenza di eventuali anomalie cromosomiche, sia numeriche (quali trisomie, monosomie e presenza di un marcatore), che strutturali (traslocazioni, delezioni ed inversioni). Le malattie provocate dalle anomalie cromosomiche sono tra le più importanti cause di abortività, di morte fetale o malformazioni congenite.

B. Le anomalie Cromosomiche

In seguito a mutazioni il cariotipo può modificarsi nel numero o nella morfologia dei cromosomi che lo costituiscono, dando così origine rispettivamente alle **anomalie numeriche dei cromosomi (aneuploidie)** e alle **anomalie strutturali dei cromosomi**.

Le **aneuploidie numeriche** più frequenti osservate nell'uomo sono la **monosomia** (assenza di un elemento nella coppia di cromosomi omologhi) e la **trisomia** (presenza di un elemento addizionale in una coppia di cromosomi omologhi). In questi casi si parla di monosomia e trisomia completa, ma si possono verificare anche **monosomie/trisomie parziali**, per assenza o presenza in triplice copia di singoli segmenti di cromosoma.

Le **monosomie** complete sono incompatibili con la vita postnatale, l'eccezione è rappresentata dalla monosomia del cromosoma X, associata alla sindrome di Turner (**45,X**).

Le **trisomie** complete di alcuni cromosomi, come la trisomia 21 o sindrome di Down (**47,XX,+21**), trisomia 18 o sindrome di Edwards (**47,XX,+18**), trisomia 13 o sindrome di Patau (**47,XX,+13**) sono invece compatibili con la vita postnatale e sono associate a ritardo mentale e, talora, a malformazioni e difetti di crescita. Anche i cromosomi del sesso possono andare incontro a difetti sia numerici (polisomie, **47,XXY;47,XXX; 47,XYY**) compatibili con la vita postnatale, ma spesso sono causa di una sintomatologia più lieve. Le più frequenti alterazioni dei cromosomi sessuali sono la sindrome di Turner, dovuta alla mancanza di un cromosoma X nelle femmine e la sindrome di Klinefelter dovuta alla presenza di un cromosoma X in più nei maschi.

L'**aneuploidia** è causata, nella maggior parte dei casi, da **errori di non-disgiunzione** alla meiosi che causano la formazione di due cellule (gameti) che contengono rispettivamente un cromosoma in più ed uno in meno. La causa della non-disgiunzione si verifica con maggior frequenza nella meiosi femminile ed aumenta con l'età. Da ciò deriva un aumentato rischio di patologia cromosomica fetale in madri di età superiore o uguale a 35 anni.

Patologia	Anomalia cromosomica	Frequenza alla nascita
Sindrome di Down	47,XX(oppure XY),+ 21	1 :700
Sindrome di Edwards	47,XX(oppure XY),+ 18	1: 6.000- 8.000

Sindrome di Patau	47,XX(oppure XY),+ 13	1: 10.000
Sindrome di Turner	45,X	1: 5.000 femmine
Sindrome di Klinefelter	47,XXY	1: 1.000 maschi

Con il cariotipo è inoltre possibile individuare anche **alterazioni di struttura** dei cromosomi.

Le **anomalie strutturali** originano dalla rottura di uno o più cromosomi e, poiché queste rotture possono teoricamente avvenire ovunque nel genoma, il numero di potenziali riarrangiamenti è praticamente infinito.

I riarrangiamenti strutturali si dividono in due grandi gruppi: **bilanciati** e **sbilanciati**.

Le alterazioni cromosomiche strutturali **bilanciate** non danno luogo né a perdita né ad guadagno di materiale genetico e le persone portatrici sono generalmente fenotipicamente normali. Possono essere sia ereditate da un genitore (portatore sano) o possono verificarsi “*de novo*” e quindi essere riscontrate solo nelle cellule fetali.

Le **anomalie sbilanciate**, invece, provocano perdita/guadagno di materiale genetico, perciò vengono identificate in soggetti con fenotipo clinico. I principali tipi di anomalie strutturali sono:

- 1) Le **delezioni**, che consistono nella perdita di un segmento di un cromosoma, che può essere terminale o interstiziale. Di solito le sindromi da delezione interessano segmenti relativamente grandi di cromosoma (> 10 Mb = Megabasi). Delezioni di queste dimensioni possono essere identificate con tecniche di citogenetica tradizionale. Delezioni di dimensione inferiore, definite “**microdelezioni**” possono essere identificate solo con le più moderne tecniche di citogenetica molecolare (**FISH**) o di biologia molecolare (**array-CGH**).
- 2) Le **duplicazioni** consistono nella presenza di due copie di un segmento di cromosoma, e pertanto costituiscono delle trisomie parziali.
- 3) Le **inversioni** originano da 2 rotture che avvengono sullo stesso cromosoma e dalla successiva rotazione di 180° del segmento compreso tra i punti di rottura. Le inversioni producono un nuovo allineamento dei geni lungo l'asse di un cromosoma e di solito non si associano ad alterazioni cliniche.
- 4) Le **traslocazioni reciproche**, originano dalla rottura di due o, raramente, di più cromosomi e dallo scambio reciproco dei segmenti, senza perdita o acquisizione di materiale cromosomico, nel caso in cui sono bilanciate.
- 5) Le **traslocazioni Robertsoniane**, originano dalla fusione di due cromosomi acrocentrici, che si sono rotti al centromero od in prossimità di questo, senza perdita o acquisizione di materiale cromosomico, nel caso in cui sono bilanciate.
- 6) I **cromosomi ad anello**, detti anche **ring**, sono originati dalla rottura di entrambe le braccia di un cromosoma, perdita delle regioni distali alle rotture e riunione delle due estremità in una struttura ad anello, appunto. I ring possono essere soprannumerari, ed in tal caso il portatore avrà 47 cromosomi e sarà trisomico per le regioni comprese nel ring, oppure possono aver sostituito un cromosoma normale, ed in tal caso il portatore avrà 46 cromosomi ma sarà parzialmente monosomico, per la perdita delle regioni distali alle rotture. Poiché il segmento di cromosoma deletato di solito contiene numerosi geni, le conseguenze cliniche sono generalmente gravi.
- 7) I **Markers** o **cromosomi marcatori**, sono anomalie cromosomiche particolari di cui non si conosce l'espressività fenotipica, caratterizzate dalla presenza piccoli porzioni cromosomiche soprannumerarie di cui non si conosce l'origine, e cioè da quali cromosomi queste porzioni derivino.

C. Cariotipo Tradizionale: Procedura

Il **cariotipo da liquido amniotico** viene effettuato mediante il prelievo di 15-20 ml di liquido amniotico per via trans-addominale, sotto controllo ecografico, tra la 15° e la 18° settimana di gestazione. Il liquido prelevato viene centrifugato per separare la parte liquida (che verrà utilizzata per il dosaggio dell'alfafetoproteina - AFP) dalla frazione corpuscolata, costituita dalle cellule fetali che sono in sospensione nel liquido amniotico. Tali cellule, definite **amniociti**, sono poste in coltura con un terreno nutritivo in un adatto incubatore, alla temperatura di 37°C. Vengono allestite 3 colture distinte in contenitori sterili costituiti da una plastica particolare che lascia aderire gli amniociti e ne consente la moltiplicazione. Ciascuna cellula che aderisce alla fiasca di coltura inizia la divisione cellulare e forma un "clone" di cellule tutte uguali tra loro. Quando i cloni sono ben sviluppati e in numero sufficiente, e ciò avviene in media in **12-15 giorni**, si procede con il blocco della crescita cellulare ed alla successiva osservazione microscopica dei cromosomi.

Il **cariotipo da Villi Coriali** viene effettuato mediante il prelievo di 20 mg circa di villi coriali per via trans-addominale sotto controllo ecografico, tra la 11° e la 13° settimana di gestazione. Il materiale prelevato viene lavato ed osservato al microscopio per separare il tessuto materno, che potrebbe essere presente, dal tessuto fetale. Nel caso dei villi coriali, si possono usare due metodi analisi cromosomica: **diretto** e **coltura**.

Con il **metodo diretto** si sfruttano le divisioni spontanee delle cellule. Un'aliquota dei villi, precedentemente puliti, verrà quindi esaminata direttamente dopo una breve incubazione a 37°C. Tale procedura permette di ottenere dei risultati preliminari entro **48-72h**.

Con il **metodo della coltura**, le cellule sono poste in coltura su un apposito vetrino e incubate alla temperatura di 37°C, in modo tale da potersi moltiplicare. Vengono allestite 2 colture distinte. In questo caso ogni cellula dividendosi più volte darà origine a una colonia (un "clone" di cellule tutte uguali tra loro), cioè ad un insieme di cellule che hanno tutte lo stesso corredo cromosomico della cellula originaria. Quando i cloni sono ben sviluppati e in numero sufficiente, e ciò avviene in media in **9-15 giorni**, si procede con il blocco della crescita cellulare ed alla successiva osservazione microscopica dei cromosomi.

Questa osservazione viene eseguita sui preparati sottoposti ad entrambe le procedure, con la differenza che nella metodica **diretta** si esaminano le cosiddette "metafasi spontanee", che si possono ottenere più rapidamente (ed infatti sono sufficienti solo alcuni giorni per poter studiare il cariotipo fetale), ma la cui qualità è inferiore a quella che si ottiene con i preparati derivanti dalla **coltura** prolungata, che quindi costituiscono una conferma della prima diagnosi ed anche un approfondimento, perché è possibile vedere maggiori dettagli della struttura cromosomica.

D. Limiti del cariotipo tradizionale

L'esame del cariotipo tradizionale, pur mettendo in evidenza le principali anomalie cromosomiche, ha tuttavia dei limiti diagnostici:

- **Limiti di risoluzione:** con l'esame standard, che viene eseguito di routine in tutti i laboratori, vengono messe in evidenza con chiarezza sia le aneuploidie, cioè le alterazioni del numero dei cromosomi, responsabili delle Sindromi più frequenti, che le alterazioni

strutturali di una certa entità. Cioè sono evidenziabili con l'esame standard le anomalie strutturali **più grandi di 10-15 Mb** con una risoluzione di bandeggio di 350-400 bande. Quindi, le patologie derivanti da alterazioni cromosomiche submicroscopiche (microdelezioni o microduplicazioni), sfuggono alla diagnosi. L'analisi citogenetica fetale, comunque, non evidenzia patologie genetiche e/o malformative dovute ad altre cause.

- **Rischio di mancanza di crescita della coltura:** a volte è possibile che le cellule poste in coltura non crescano adeguatamente, con conseguente necessità di ripetizione del prelievo al fine di allestire nuove colture cellulari. Questo problema è ben conosciuto, sebbene non sia molto frequente; avviene infatti **1 volta su 500** nel caso di cariotipo da liquido amniotico e **1 volta su 100** in caso di cariotipo da villi coriali. Nel caso in cui si verifichi una mancanza di crescita della coltura cellulare, la paziente viene contattata immediatamente dal ns. Centro per effettuare o un nuovo prelievo al fine di allestire altre colture cellulari o optare per il cariotipo molecolare mediante tecnica array-CGH, senza la necessità di ripetere il prelievo.
- La possibilità di **contaminazione con cellule materne**, che avviene nello 0.3% dei casi e richiede ulteriori indagini.
- **Rischio interpretativo:** l'analisi citogenetica delle cellule fetali riflette nel 99% dei casi il patrimonio cromosomico del feto, ed identifica il corrispondente fenotipo. Tuttavia vi sono dei casi in cui traslocazioni o mosaicismi rendono difficile la definizione fenotipica.
- **Possibilità di artefatti "in vitro":** il più delle volte riferibili a pseudomosaicismi, senza significato clinico. Questo può avvenire nel 2-3% delle colture.
- **Mosaicismo** (la presenza cioè di due linee cellulari con differente assetto cromosomico all'interno dello stesso individuo): Il mosaicismo cromosomico rappresenta uno dei principali problemi diagnostici nella determinazione del cariotipo fetale sia da villi coriali che da liquido amniotico. In caso di mosaicismo la cromosomopatia potrebbe coinvolgere il feto o essere confinata solamente agli annessi extra-embionari, occorre perciò estendere l'indagine ad altri tessuti fetali (es. liquido amniotico o sangue) per chiarirne il significato clinico. Il mosaicismo fetale vero, il mosaicismo confinato alla placenta (CPM) e lo pseudomosaicismo nelle colture di liquido amniotico sono stati classificati in letteratura sulla base di situazioni osservate nella pratica di laboratorio. Nei **Villi Coriali** il mosaicismo può presentarsi in tre distinte situazioni:

- **Tipo I:** l'anomalia cromosomica a mosaico è solo osservata nelle metafasi ottenute con il metodo diretto e non in quelle ottenute dopo coltura;
- **Tipo II:** il cariotipo anomalo a mosaico si osserva solo nella coltura e non si evidenzia con il metodo diretto;
- **Tipo III:** la linea cellulare anomala è presente sia con il metodo diretto e sia nella coltura. Il riconoscimento di una condizione di mosaicismo nei villi coriali richiede generalmente una conferma nel secondo trimestre. Nel caso in cui la linea cellulare anomala sia confermata si è in presenza di un mosaicismo vero, nel caso contrario si ha un CPM o un mosaicismo a basso livello non evidenziato.

Il mosaicismo viene riscontrato in circa l'**1-2%** dei prelievi di villi coriali.

Nel **liquido amniotico** si possono evidenziare tre livelli di mosaicismo:

- **Livello I:** presenza di singola cellula con anomalia numerica o strutturale, osservabile con una frequenza che varia dal 2.5% al 7%.

- **Livello II:** due o più cellule con la stessa alterazione provenienti da una coltura in fiasca oppure singola colonia o più colonie anomale osservate in una singola coltura in situ; si è stimata una frequenza pari allo 0.7 – 1.1% per tale osservazione.
- **Livello III:** più metafasi o colonie osservate in almeno due preparati provenienti da due colture in fiasca diverse o da due colture in situ indipendenti

Livello I e livello II sono comunemente definiti come pseudomosaicismo mentre il Livello III viene definito mosaicismo fetale vero. La condizione di mosaicismo fetale vero osservata in prelievi di liquido amniotico è un fenomeno raro, stimato intorno al **2 per 1000**, mentre lo pseudomosaicismo risulta più frequente.

E. Specifici problemi correlati al cariotipo fetale da villi coriali:

La possibile **discrepanza** tra l'assetto cromosomico dei villi coriali e il cariotipo fetale con la possibilità di **falsi positivi** o **falsi negativi**. I falsi positivi (l'incidenza riportata in ampie casistiche è 1%) sono segnalati soprattutto quando viene utilizzata la sola tecnica diretta e sono controllabili sulla coltura o eventualmente sul liquido amniotico nel secondo trimestre. I falsi negativi sono rari (0.02%), e anche questi legati alla sola tecnica diretta.

F. Diagnosi Citogenetica

- I criteri utilizzati per l'indagine citogenetica sono quelli raccomandati dalle linee guida della Società Italiana di Genetica Umana e del Gruppo Europeo di Studio sulla Diagnosi Prenatale.
- **L'impossibilità di pervenire ad una diagnosi** può verificarsi in rarissimi casi, per motivi generalmente correlati ad una ridotta crescita delle cellule in coltura oppure alla massiva presenza di sangue o meconio.
- La qualità dei preparati cromosomici non garantisce la possibilità di individuare **anomalie strutturali di ridottissima dimensione**.
- Esiste la possibilità di **errore diagnostico**, limitata a rarissimi casi, dovuto a discordanza fra l'esito della diagnosi citogenetica prenatale ed il cariotipo riscontrato alla nascita. Tale discordanza può essere imputata a cause diverse: contaminazione del campione con cellule di origine materna, mosaici a bassa percentuale o presenza di anomalie cromosomiche di struttura non rilevabili con le tecniche applicate.
- Qualora si riscontrasse una anomalia cromosomica fetale verranno comunque valutate le possibili implicazioni e gli effetti sul feto. In quelle situazioni in cui tale valutazione è estremamente complessa, potrà essere formulata soltanto sulla base di stime di rischio empiriche. I chiarimenti del caso saranno forniti in sede di consulenza.
- In caso di **esito patologico**, la paziente può scegliere direttamente l'interruzione volontaria di gravidanza se la diagnosi è definitiva, oppure, qualora il Genetista lo ritenesse necessario, potrebbero essere richiesti ulteriori approfondimenti. Per la legge italiana che regola l'interruzione volontaria della gravidanza (Legge 194/78), la richiesta di interruzione per la gestante a cui venga fatta diagnosi di grave anomalia fetale, dopo i primi 90 giorni e prima della 22° settimana di gestazione, è subordinata all'accertamento medico della condizione di grave minaccia alla salute psichica della gestante costituita dalla prosecuzione della gestazione.

- Esistono difetti congeniti che, non essendo associati ad anomalie cromosomiche, non possono essere diagnosticati mediante l'analisi citogenetica prenatale.

G. Necessità di approfondimenti diagnostici di 2^a livello

- In alcuni casi si riscontrano anomalie cromosomiche particolari di cui non si conosce l'espressività fenotipica. Si tratta il più delle volte di piccoli porzioni cromosomiche soprannumerarie (**markers**), oppure anomalie cromosomiche strutturali come **inversioni** o **traslocazioni**, apparentemente bilanciate, che interessano essenzialmente gli autosomi. In tali casi si richiede l'indagine sui genitori al fine di accertare se in uno di loro sia presente la stessa anomalia. Qualora ci si trovasse di fronte ad una mutazione "*de novo*" avvenuta nel feto, non si riuscirebbe a stabilire se nelle suddette anomalie strutturali vi sia stata perdita (delezione) o guadagno (duplicazione) di materiale genetico. A tal fine verrà consigliato un approfondimento diagnostico mediante tecnica **array-CGH (cariotipo molecolare)**,
- In caso di riscontro di due o più linee cellulari con diverso cariotipo (**mosaico**), potranno essere necessari ulteriori approfondimenti diagnostici su un altro campione (liquido amniotico, sangue fetale). In questa circostanza la paziente viene informata, in sede di consulenza genetica, riguardo alle possibilità di approfondimento diagnostico.
- E' possibile che il risultato richieda, per una sua più corretta interpretazione, l'estensione dell'esame citogenetico ai genitori o l'applicazione di indagini molecolari.

H. Cariotipo Molecolare: Procedura

Il **cariotipo da liquido amniotico** viene effettuato mediante il prelievo di 15-20 ml di liquido amniotico per via trans-addominale, sotto controllo ecografico, tra la 15[°] e la 18[°] settimana di gestazione. Il liquido prelevato viene centrifugato per separare la parte liquida (che verrà utilizzata per il dosaggio dell'alfafetoproteina - AFP) dalla frazione corpuscolata, costituita dalle cellule fetali che sono in sospensione nel liquido amniotico. Tali cellule, definite **amniociti**, sono sottoposte ad estrazione del DNA. Una parte del campione verrà sottoposto ad esame citogenetico tradizionale (metodo coltura), per analisi di follow-up, senza nessun costo aggiuntivo per la paziente.

Il **cariotipo da Villi Coriali** viene effettuato mediante il prelievo di 20 mg circa di villi coriali per via trans-addominale sotto controllo ecografico, tra la 11[°] e la 13[°] settimana di gestazione. Il materiale prelevato viene prima lavato ed osservato al microscopio per separare il tessuto materno dal tessuto fetale, e successivamente sottoposto ad estrazione del DNA, che verrà analizzato mediante tecnica **array-CGH**. Una parte del campione verrà sottoposto ad esame citogenetico tradizionale (metodo coltura), per analisi di follow-up, senza nessun costo aggiuntivo per la paziente.

La tecnica: Grazie ai recenti progressi della citogenetica molecolare è adesso possibile esaminare i cromosomi in maniera più approfondita ed accurata rispetto all'analisi citogenetica tradizionale, utilizzando il cosiddetto **Cariotipo Molecolare**, procedura diagnostica che impiega una tecnica molecolare innovativa conosciuta come **array-CGH**.

L'ibridazione genomica comparativa su microarray (**Array - Comparative Genomic Hybridization o Array-CGH**) è una tecnica sviluppata per identificare anomalie cromosomiche di tipo numerico (aneuploidie) a carico dei 22 autosomi (cromosomi dal nr. 1 al nr. 22) e dei cromosomi sessuali (X e Y), o anche variazioni (Variazioni del numero di copie - CNV) del contenuto di piccole porzioni cromosomiche, come duplicazioni/amplificazioni (presenza di copie in eccesso di segmenti di DNA), o delezioni

(perdite di porzioni di genoma). Queste anomalie del DNA possono essere la causa di diverse patologie quali, ad esempio, sindromi malformative, ritardo mentale, autismo, epilessia e tumori.

Il principio su cui si basa la tecnica dell'Array CGH è la comparazione quantitativa del DNA in esame o **DNA test** (estratto dalle cellule fetali, in caso di diagnosi prenatale, o dal prelievo ematico del paziente, in caso di diagnosi post-natale) e del DNA genomico di riferimento proveniente da un soggetto sano (**reference DNA**).

Durante il processo analitico questi DNA sono marcati in maniera differenziale con molecole fluorescenti (generalmente si utilizza un fluorocromo rosso per il DNA test ed un fluorocromo verde per il **reference DNA**) e, successivamente, vengono mescolati in parti uguali e fatti incubare (Ibridazione) su un microarray, costituito da un supporto di vetro la cui superficie è coperta di frammenti di DNA, noti come sonde o cloni. Ognuno di questi cloni rappresenta una specifica regione del genoma umano, fino a ricomprendere l'intero assetto cromosomico umano. Tanto più è elevato il numero di cloni maggiore è l'efficacia dell'array nell'identificazione delle variazioni del numero di copie corrispondenti a piccole porzioni di ciascun cromosoma. Il potere risolutivo della piattaforma utilizzata può variare in funzione della densità e della tipologia delle sonde utilizzate; attualmente per scopi diagnostici vengono impiegati array tra 1 Mb e 100 kb.

Al termine della suddetta incubazione, sia il DNA in esame che quello di controllo si legheranno ai cloni presenti sull'array. Il risultato sarà l'emissione di due distinti segnali fluorescenti le cui intensità saranno misurate a seguito di lettura degli arrays mediante un apposito strumento (scanner). Sull'immagine ottenuta verrà poi effettuata l'analisi comparativa tra le intensità di fluorescenza emesse dai due DNA e la relativa elaborazione dei dati mediante un apposito software, al fine evidenziare eventuali variazioni del numero di copie del DNA test.

In caso di assetto cromosomico normale, il rapporto tra le due emissioni è bilanciato (1:1). Qualora vi siano nel DNA in esame (fetale) delle **delezioni** (assenza di un cromosoma o parte di esso), il rapporto tra quest'ultimo ed il DNA di controllo sarà di 1:2 (monosomia completa o parziale). Nel caso di **duplicazioni** (presenza di un cromosoma soprannumerario o parte di esso) il rapporto tra il DNA embrionale e quello di controllo sarà di 2:1 (trisomia completa o parziale).

I. Risoluzione del cariotipo molecolare

Rispetto all'esame del cariotipo tradizionale, l'analisi molecolare dei cromosomi ha una risoluzione molto più elevata (~**100 volte**). Ciò consente di identificare anche patologie derivanti da alterazioni cromosomiche submicroscopiche, non evidenziabili tramite il cariotipo tradizionale, aumentando sensibilmente l'**accuratezza** dell'esame.

Il cariotipo molecolare, infatti, consente di studiare un gruppo di **100 patologie** causate da **microdelezione / microduplicazione** cromosomica (es. Sindrome di DiGeorge, la Sindrome di Williams, la Sindrome di Prader-Willi/Angelman) ed oltre **150 geni** descritti nel database OMIM (vedi relazione tecnica).

Inoltre, grazie alla sofisticata **analisi bioinformatica**, che costituisce la fase terminale del processo analitico, si ha la possibilità di definire esattamente la regione genomica alterata, e quindi anche i geni in essa contenuti, permettendo di stabilire le conseguenze prodotte dall'anomalia cromosomica riscontrata.

Il cariotipo molecolare rappresenta anche la tecnica ideale di **approfondimento diagnostico** di 2^a livello, eseguita per integrare l'analisi citogenetica prenatale, particolarmente indicato nei casi di:

- **difetti dello sviluppo fetale** evidenziati tramite ecografia, riconducibili ad una patologia cromosomica, il cui cariotipo tradizionale è però risultato normale;
- **feto con anomalie cromosomiche** individuate attraverso l'analisi citogenetica tradizionale (riarrangiamenti sbilanciati, riarrangiamenti *de novo* apparentemente bilanciati e markers).

J. Limiti del cariotipo molecolare

I limiti di tale tecnica in ambito prenatale sono rappresentati dall'impossibilità di identificare **riarrangiamenti cromosomici bilanciati** (non patologici) e i **mosaicismi** (cioè la presenza cioè di due linee cellulari con differente assetto cromosomico) con una linea cellulare scarsamente rappresentata (inferiore al 10% circa). Inoltre, con questa procedura non è possibile diagnosticare patologie non ricomprese nella lista delle 100 patologie ricercate, specificate nella brochure informativa fornita al paziente e nella relazione tecnica dell'esame.

K. Diagnosi Citogenetica

- I criteri utilizzati per l'indagine citogenetica sono quelli raccomandati dalle linee guida della Società Italiana di Genetica Umana e del Gruppo Europeo di Studio sulla Diagnosi Prenatale.
- L'**impossibilità di pervenire ad una diagnosi** può verificarsi in rari casi, per motivi generalmente correlati alla massiva presenza di sangue o meconio.
- Esiste la possibilità di **errore diagnostico**, limitata a rari casi, dovuto a discordanza fra l'esito della diagnosi citogenetica prenatale ed il cariotipo riscontrato alla nascita. Tale discordanza può essere imputata a cause diverse: contaminazione del campione con cellule di origine materna, mosaici a bassa percentuale o presenza di anomalie cromosomiche di struttura di dimensioni inferiori ai limiti di risoluzione della tecnica o non ricomprese nella lista delle patologie ricercate.
- Qualora si riscontrasse una anomalia cromosomica fetale verranno comunque valutate le possibili implicazioni e gli effetti sul feto. In quelle situazioni in cui tale valutazione è estremamente complessa, potrà essere formulata soltanto sulla base di stime di rischio empiriche. I chiarimenti del caso saranno forniti in sede di consulenza.
- In caso di **esito patologico**, la paziente può scegliere direttamente l'interruzione volontaria di gravidanza se la diagnosi è definitiva, oppure, qualora il Genetista lo ritenesse necessario, potrebbero essere richiesti ulteriori approfondimenti. Per la legge italiana che regola l'interruzione volontaria della gravidanza (Legge 194/78), la richiesta di interruzione per la gestante a cui venga fatta diagnosi di grave anomalia fetale, dopo i primi 90 giorni e prima della 22[°] settimana di gestazione, è subordinata all'accertamento medico della condizione di grave minaccia alla salute psichica della gestante costituita dalla prosecuzione della gestazione.
- Esistono difetti congeniti che, non essendo associati ad anomalie cromosomiche, non possono essere diagnosticati mediante l'analisi citogenetica prenatale.

L. **Necessità di approfondimenti diagnostici di 2^a livello**

E' possibile che il risultato richieda, per una sua più corretta interpretazione, l'estensione dell'esame citogenetico ai genitori.

M. **Analisi integrative**

Su specifica richiesta è possibile effettuare, sullo stesso campione fetale, oltre allo studio del cariotipo tradizionale o molecolare, anche uno **screening genetico multiplo**, diretto alla diagnosi delle gravi malattie le malattie genetiche più frequenti nella popolazione Italiana, quali **Fibrosi Cistica, Sindrome del Cromosoma X Fragile (ritardo mentale), Beta Talassemia, Sordità Congenita, Distrofia Muscolare di Duchenne-Becker, Distrofia Miotonica** (e tante altre malattie genetiche) e l'analisi rapida delle principali aneuploidie (trisomia 21, 13 e 18) mediante tecnica QF-PCR.

N. **Tempi di attesa per i risultati**

Essendo una tecnica molecolare, che non necessita di coltura cellulare, con il Cariotipo Molecolare è possibile ottenere un'analisi cromosomica approfondita (risoluzione **600 Kb**) in circa **3 giorni**. Tali termini possono comunque prolungarsi in caso di ripetizioni dell'esame o approfondimenti diagnostici (analisi dei genitori) o dubbi interpretativi.

O. **Esperienza del Centro in diagnosi prenatale**

Il Gruppo **GENOMA** può vantare una tra le più vaste esperienze a livello europeo nel settore delle analisi di citogenetica prenatale e post-natale e della biologia molecolare. Grazie alla integrazione delle competenze del **Consultorio di Genetica Srl**, uno dei primi e più importanti laboratori di citogenetica tradizionale e molecolare del territorio nazionale, il Gruppo Genoma può contare su **oltre 30 anni** di attività ed esperienza nel settore della diagnosi prenatale.

Nel campo della **citogenetica tradizionale** (cariotipo) sono oltre **90.000** i casi ad oggi diagnosticati su cellule di liquido amniotico, più di **10.000** quelli su campioni di villi coriali e oltre **40.000** i casi su linfociti di sangue periferico, per un totale di oltre **140.000** determinazioni di cariotipo, mentre per quanto riguarda la **diagnostica molecolare**, i casi ad oggi eseguiti sono oltre **300.000**, che assieme alla casistica di citogenetica superano i **440.000** casi effettuati.

Pertanto, considerato il colloquio con il dott. ____ / la dott.ssa _____ Ginecologo/Genetista
chiaro, sufficiente ed esaustivo, ed avendo compreso e valutato tutti gli aspetti – come sopra evidenziati-

presto / **non presto**

il consenso all'esecuzione di una amniocentesi/villocentesi per **diagnosi citogenetica prenatale**. Tipo di
indagine citogenetica scelta:

Cariotipo Tradizionale / **Cariotipo Molecolare**

Dichiaro inoltre di avere appreso, compreso e valutato tutti gli aspetti inerenti l'esame
Citogenetico/Molecolare così come descritti dal dott./dott.ssa _____ e riportati nei punti A, B, C,
D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, di cui alla presente informativa e consenso informato.

Data ____/____/____

Firma della paziente

(in caso di minore o incapace, dovranno firmare,
rispettivamente, genitori/genitore esercenti/e
potestà ovvero tutore)

Dichiaro inoltre di avere scelto di integrare l'esame citogenetico con lo **screening genetico multiplo**, diretto
alla diagnosi delle seguenti malattie le malattie genetiche:

Fibrosi Cistica; **X Fragile**; **Sordità Congenita**; **Distrofia Muscolare DMD/DMB**
 Altre patologie genetiche _____

Firma della paziente

(in caso di minore o incapace, dovranno firmare,
rispettivamente, genitori/genitore esercenti/e
potestà ovvero tutore)

Consenso illustrato e raccolto da:

Firma di chi ha illustrato e raccolto il consenso: _____