

## **PROPOSTA DI LINEE GUIDA PER LA CITOGENETICA** **AGGIORNAMENTO DIAGNOSI PRENATALE**

### **PRESENTAZIONE**

La commissione di Diagnosi Prenatale è stata costituita dalla Società Italiana di Genetica Umana allo scopo di affrontare problemi inerenti il campo applicativo della diagnostica genetica prenatale. Il gruppo partecipante a tale commissione costituitosi spontaneamente è formato da persone professionalmente qualificate e di comprovata esperienza, acquisita grazie all'attività pluriennale che ciascun componente ha svolto nei laboratori di Citogenetica/Genetica Medica. La commissione si è riunita in più occasioni discutendo ogni frase del documento definitivo, ponendo sul tavolo esperienze e opinioni, documentandosi con la letteratura scientifica internazionale, interpellando persone esperte ed ascoltando i consigli dei colleghi. Nonostante ciò, il gruppo è consapevole, che il documento non copre ogni necessità e non soddisferà tutto il popolo dei citogenetisti/genetisti. Lo sforzo fatto è solo un ulteriore passo avanti che servirà agli esperti per riflettere ed ai neofiti per affrontare meglio il lavoro di ogni giorno.

### **Componenti la commissione**

**F.Chiodo; UONACitogenetica Prenatale,Serv.Anatomia Patologica,AOIRM S.Anna, Torino**

**L.Dalprà;dip.Medicina Sperimentale,Ambientale e Biotec.Med.,Uni. MI-Bicocca**

**D.Giardino; lab.Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano**

**P. Granata;lab.Microbiologia e Citogenetica Medica,Osp. di Circolo e Uni.dell'Insubria, Varese**

**M.G.Grimoldi;lab.Citogenetica,Serv.Anat Patol,Dip.Medicina,Chirurgia e Odontoiatria, Uni.Mi**

**S.Gueneri; lab. Genetica Medica, Az.Osp. ICP, Milano**

**E.Lenzini;Az Osp, Dip.Pediatria,Uni.Padova**

**G.Nocera; UO Citogenetica, Clinica Ostetrico Ginecologica, Osp.Melloni, Milano**

**V.Pecile; Serv. Genetica,I.R.C.C.S."Burlo Garofolo",Trieste**

**G.Piombo; lab. Genetica Umana, E.O Osp. Galliera,Genova**

**M.A.Police; lab.Genetica Medica, Az.Osp.S.Giuseppe Moscati, Avellino**

**L.Romitti; Servizio Anatomia Patologica, lab. Citogenetica, AO Niguarda, Milano**

**P.Simi; U.O.Citogenetica e Genetica Molecolare, Az.Osp.Pisana, Pisa**

**E.Savin; UOADU Genetica Medica, Az. Osp.S.Giovanni Battista,Torino**

**F.Torricelli; U.O. Citogenetica e Genetica Molecolare, Az.Osp.Careggi, Firenze**

**Viene qui di seguito riportata la revisione delle “Linee-guida per la diagnosi cromosomica prenatale”.**

**L’aggiornamento di quanto scritto nella Consensus Conference 1995 non ha modificato lo spirito con cui erano state elaborate le Linee-guida citogenetiche. Infatti ciò che si propone è un protocollo per l’esecuzione di analisi citogenetiche prenatali che consenta di definire i criteri minimi per le procedure più comunemente eseguite nei laboratori di genetica.**

## **CITOGENETICA COSTITUZIONALE PRENATALE**

**Si fa riferimento alle indagini citogenetiche che vengono applicate a cellule fetali.**

### **INDICAZIONI ALL’ANALISI**

**Nessun cambiamento importante è avvenuto nelle indicazioni al prelievo di cellule fetali per diagnosi cromosomica. Se ne riporta pertanto l’elenco riconosciuto a livello internazionale:**

**età materna > e = ai 35 anni**

**precedente figlio affetto da anomalia dei cromosomi**

**genitori portatori di anomalia strutturale dei cromosomi geneticamente bilanciata**

**genitori con riscontro citogenetico di mosaicismo cellulare**

**anomalie fetali osservate in ecografia**

**test biochimici indicanti un aumento del rischio cromosomico**

**malattia genetica**

**Situazioni particolari devono essere valutate singolarmente con appropriata consulenza multidisciplinare, che valuti i rischi genetici del caso in oggetto e i rischi connessi con il prelievo di cellule fetali.**

**E’ possibile che per il completamento dell’iter diagnostico si renda necessaria l’estensione dell’esame citogenetico e/o molecolare ai genitori.**

## **PARAMETRI PER L’ANALISI DI CELLULE DA LIQUIDO AMNIOTICO**

### **METODO “IN FIASCA” ED “IN SITU”**

**Per ogni liquido amniotico vanno allestite non meno di 3 colture primarie, da mantenere in due diversi incubatori.**

**E’ buona norma usare due diversi tipi di terreno o due lotti diversi dello stesso terreno, onde limitare i rischi di contaminazione delle colture e/o scarsa crescita cellulare.**

**Lo studio del cariotipo va eseguito analizzando cellule provenienti da un minimo di due colture primarie.**

**Per il metodo “in fiasca” vanno esaminate almeno 16 cellule derivanti da due colture indipendenti ed in cui sia cresciuto un minimo di 10 colonie in totale.**

**Per il metodo “in situ” vanno esaminate almeno 10 metafasi, una per colonia, provenienti da 2 o più colture indipendenti.**

**Indipendentemente dal metodo di coltura utilizzato devono essere analizzate almeno 4 metafasi, con un livello di risoluzione non inferiore alle 320 bande, per riconoscimento degli**

omologhi e con ricostruzione del cariotipo, di cui 2 su stampa fotografica o con sistema automatico di analisi d'immagine.

In caso di mosaicismo è necessario aumentare il numero di metafasi/colonie analizzate esaminando altre colture ed eseguire un cariotipo per ogni linea cellulare trovata.

Per approfondimento si rimanda al paragrafo sulle problematiche legate ai mosaicismi in diagnosi prenatale.

In caso di scarso bandeggio e scarsa crescita cellulare, è responsabilità di chi firma il referto dare le adeguate spiegazioni sui limiti dell'analisi.

**N.B.** Si consiglia di non processare tutte le colture allestite per la diagnosi ma di mantenere in vitro come riserva una piccola aliquota di cellule da utilizzare per ulteriori indagini; ciò evita la ripetizione del prelievo di cellule fetali.

## **PARAMETRI PER L'ANALISI CITOGENETICA DA CELLULE DI VILLO CORIALE METODO "DIRETTO" E "COLTURA"**

L'analisi citogenetica dei villi coriali può essere eseguita sia con metodo "diretto" che metodo "coltura".

Nel metodo "diretto" le cellule del citotrofoblasto, che sono in divisione spontanea, possono essere analizzate dopo un breve periodo di incubazione.

Nel metodo "coltura" il villo viene disgregato mediante tecniche meccaniche od enzimatiche che permettono il rilascio di cellule del mesenchima, le quali proliferano in coltura e possono venir utilizzate dopo circa una settimana di crescita.

Allo scopo di ottimizzare l'affidabilità della diagnosi, per la valutazione del cariotipo fetale è necessario utilizzare entrambe le metodiche.

Infatti è stato ampiamente dimostrato in letteratura che si possono verificare situazioni di discrepanza :

- tra il cariotipo osservato da metafasi ottenute con metodo diretto e quello osservato in metafasi ottenute con metodo coltura;
- tra il cariotipo osservato su villo coriale (diretto e/o coltura) e quello osservato su altri tessuti fetali.

Nelle situazioni in cui la quantità di villo coriale non sia sufficiente per allestire entrambe le metodiche (quantità inferiori a 10 mg) si ritiene preferibile scegliere il metodo diretto che esclude il rischio di analizzare cellule di origine materna.

### **1. Modalità di analisi dopo applicazione di un unico metodo**

Nel caso in cui si possa utilizzare solo uno dei due metodi, si procede all'analisi del cariotipo contando almeno 16 metafasi e analizzando 4 metafasi per riconoscimento degli omologhi e ricostruzione del cariotipo, di cui 2 su stampa fotografica o con sistema automatico di analisi d'immagine. L'eventuale presenza di un mosaico richiede l'esecuzione di almeno un cariotipo per linea cellulare.

In particolare nel caso di applicazione del solo metodo coltura, si consiglia di analizzare metafasi provenienti da più aree di crescita ottenute da almeno due colture indipendenti.

### **2. Combinazione dei metodi "diretto" e "coltura"**

Per l'analisi del cariotipo vanno analizzate 4 metafasi, con un livello di risoluzione non inferiore alle 320 bande, mediante l'appaiamento degli omologhi e 2 di queste con

**ricostruzione del kariogramma su stampa fotografica o con sistema automatico di analisi d'immagine.**

**Per la definizione del cariotipo si devono analizzare in totale almeno 16 metafasi provenienti dai preparati ottenuti con entrambe le metodiche.**

**L'eventuale presenza di un mosaico richiede l'esecuzione di almeno un cariotipo per linea cellulare ed il confronto dei risultati ottenuti con le due metodiche. Inoltre ogni situazione di mosaicismo richiede un'attenta valutazione per poter discernere la necessità di ripetere l'indagine nel II trimestre di gravidanza.**

**Si rimanda per approfondimento allo specifico paragrafo delle linee guida sulle problematiche legate ai mosaicismi in diagnosi prenatale.**

**N.B. Si consiglia di non processare tutte le colture allestite per la diagnosi ma di mantenere in vitro come riserva una piccola aliquota di cellule da utilizzare per ulteriori indagini; ciò evita la ripetizione del prelievo di cellule fetali.**

## **PARAMETRI PER L'ANALISI DI CELLULE DA SANGUE FETALE**

**L'indagine citogenetica prenatale su sangue fetale viene eseguita solo in presenza di particolari indicazioni quali:**

- **riscontro tardivo di condizioni ad alto rischio di anomalia cromosomica**
- **malformazione fetale evidenziata ecograficamente**
- **controllo di mosaicismo cromosomico e/o anomalie strutturali riscontrati su amniociti o su cellule di villi coriali**

**Per l'analisi del cariotipo del feto vanno contate almeno 16 metafasi: 4 devono essere analizzate con appaiamento degli omologhi, 2 delle quali con ricostruzione del cariotipo su stampa fotografica o con sistema di analisi computerizzata**

**Nel caso di controllo su sangue fetale di un mosaicismo precedentemente riscontrato su amniociti o cellule di villi coriali è necessario contare 100 cellule.**

**Se il numero di metafasi analizzabili non fosse elevato, nel formulare la diagnosi citogenetica si dovrebbe fare riferimento alla tabella di esclusione di mosaicismo cromosomico e al relativo grado di confidenza (Hook 1977).**

**In considerazione del fatto che l'analisi citogenetica su sangue fetale è spesso eseguita dopo l'accertamento ecografico di una malformazione fetale, è consigliabile utilizzare un bandeggio cromosomico con una risoluzione non inferiore alle 550 bande.**

### **Tecniche di analisi**

**Si segnala il seguente testo per l'allestimento delle colture, dei preparati cromosomici e delle colorazioni:**

**The AGT Cytogenetics Laboratory Manual**

**eds: M.J.Barch, T.Knutsen, J.L.Spurbeck**

**Lippincott-Raven Publishers**

## **MOSAICISMO IN DIAGNOSI PRENATALE**

**Il mosaicismo cromosomico rappresenta uno dei principali problemi diagnostici nella determinazione del cariotipo fetale sia da villi coriali che da liquido amniotico. 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.**

**Il CPM, lo pseudomosaicismo e il mosaicismo vero possono avere origine da:**

- **un errore mitotico postzigotico precoce in un embrione diploide normale,**
- **un fenomeno di ricostituzione della disomia da un concepimento trisomico (rescue)**

## **VILLI CORIALI**

**Il mosaicismo può presentarsi in tre distinte situazioni:**

- |                 |  |
|-----------------|--|
| <b>Tipo I</b>   | <b>l'anomalia cromosomica a mosaico risulta presente solo nel citotrofoblasto,</b><br>cioè osservata nelle metafasi ottenute con il metodo diretto e non in quelle ottenute dopo coltura |
| <b>Tipo II</b>  | <b>il cariotipo anomalo a mosaico si osserva solo nella componente mesenchimale del villo, indagabile con il metodo colturale e non nel citotrofoblasto</b>                              |
| <b>Tipo III</b> | <b>la linea cellulare anomala è presente sia nel citotrofoblasto che nel mesenchima.</b>   |

**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.**

**Differenze nel cariotipo delle diverse componenti dell'unità feto-placentare (citotrofoblasto, mesenchima e feto) vengono osservate nell'1-2% circa dei prelievi di villi coriali.**

## **LIQUIDO AMNIOTICO**

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

- |                   |  |
|-------------------|--|
| <b>I Livello</b>  | <b>presenza di singola cellula con anomalia numerica o strutturale osservabile con una frequenza che varia dal 2.5% al 7% nelle colture di amniociti</b> |
| <b>II Livello</b> | <b>due o più cellule con la stessa alterazione provenienti da una coltura in</b>   |

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

**III Livello** più metafasi o colonie osservate in almeno due preparati provenienti da due colture in fiasca diverse o da due colture in situ indipendenti

I Livello e II livello sono comunemente definiti come pseudomosaicismo mentre il III Livello 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, come ricordato prima.

#### **PROBLEMATICHE RELATIVE ALL'OSSERVAZIONE DI PSEUDOMOSAICISMO ED EVENTUALE SEGNALAZIONE DELLO STESSO NEL REFERTO**

Il riscontro di uno o più cloni (metodo in situ) o di più cellule (metodo in fiasca) in una singola coltura di liquido amniotico con corredo cromosomico diverso da quello riscontrato nelle colonie/ cellule delle altre colture, corrisponde ad un mosaicismo di secondo livello (Gardner and Sutherland, 1996) più comunemente definito come pseudomosaicismo. Al fine di chiarire al meglio la condizione fetale devono essere programmate le indagini più opportune. I problemi tecnici o scientifici non devono essere riversati sulla paziente. Il citogenetista responsabile dell'analisi ha due possibilità :

- non segnalare nel referto l'osservazione del/i singolo/i clone/i (metodo in situ) o cellule (metodo in fiasca) anomalo/i/e
- segnalare nel referto tale osservazione.

Nel primo caso il citogenetista arriva alla conclusione che l'osservazione tecnica non corrisponde ad un problema fetale importante e pertanto il cariotipo viene definito normale.

Nel secondo caso il citogenetista decide che l'osservazione di pseudomosaicismo sia una spia di un problema fetale effettivo e pertanto lo segnala nel referto, accompagnandolo dalle spiegazioni del caso o inviando la paziente ad un genetista esperto di diagnosi prenatale per una consulenza genetica.

Si offrono alcune considerazioni:

- i mosaicismi "a bassa percentuale" costituiscono uno dei limiti riconosciuti delle indagini citogenetiche prenatali; tali mosaicismi sono di difficile valutazione non solo a livello tecnico sia pre- che post-natale ma anche a livello di correlazione con il fenotipo;
- dati della letteratura indicano che è possibile che i singoli cloni siano derivati da cellule della placenta e pertanto essere indice di un probabile CPM;
- l'esistenza ormai comprovata della disomia uniparentale (UPD) apre la necessità di trasferire le informazioni al riguardo in diagnosi prenatale.
- Tenendo presente le considerazioni sopracitate, in caso di riscontro di singola cellula/ clone/ cloni anomala/o/i presenti in un'unica coltura, la Commissione è del parere che sia buona

pratica di laboratorio applicare i criteri di comportamento suggeriti da Hsu nel 1992 e successivamente modificati ed aggiornati nel 1999.(vedi bibliografia)

- Inoltre la commissione in merito alla condotta da assumere per la refertazione, si è espressa nel modo seguente:
  - a) il singolo clone con aneuploidia di cromosomi responsabili di patologie alla nascita (esempio: cr. 8,9,13,15,18 e 21) va segnalato nelle osservazioni, per la possibilità di ulteriori prelievi invasivi per la conferma del dato ed eventuale esclusione/accertamento di UPD.
  - b) il singolo clone con aneuploidia di cromosomi responsabili di anomalie cosiddette “rare” alla nascita (Hsu,1997; Hsu1999; Wallerstein,2000) non dovrebbe essere segnalato nel referto nemmeno nelle osservazioni.

## **DISOMIA UNIPARENTALE IN DIAGNOSI PRENATALE**

Con il termine disomia uniparentale (UPD) si definisce l’ereditarietà di due cromosomi omologhi da un solo genitore; è causata principalmente da eventi di non-disgiunzione, seguiti da meccanismi di correzione di trisomie o monosomie. La maggioranza dei casi sembra essere associata all’età materna e può venire individuata inizialmente in forma di trisomia a mosaico durante la diagnosi prenatale, sia nel caso di prelievi di villi coriali che nel caso di prelievi di liquido amniotico. Inoltre anomalie strutturali, come le traslocazioni Robertsoniane e cromosomi marcatori soprannumerari, sembrano essere associate ad un rischio aumentato di UPD (vedi bibliografia).

## **INDICAZIONI PER LO STUDIO DI UPD**

### **Condizioni di mosaicismo**

In considerazione del fatto che circa l’1% dei prelievi di villi coriali e lo 0.3% circa dei prelievi di liquido amniotico presentano trisomie a mosaico, ci si trova di fronte ad un sostanziale numero di casi per i quali potrebbe essere necessario eseguire questo tipo di test. Ogni sforzo deve essere compiuto per l’estensione dell’indagine citogenetica a più tessuti fetali nei casi in cui si osservi mosaicismo al fine di escludere l’evenienza di mosaicismo fetale vero.

Al momento attuale si rende necessaria l’esecuzione del test in tutti i casi in cui sia stata evidenziata la presenza di

- trisomia a mosaico per il cromosoma 15, in quanto è stata chiaramente dimostrata la correlazione tra UPD materna e paterna e l’espressione di fenotipi patologici come la sindrome di Prader-Willi e la sindrome di Angelman,
- trisomia a mosaico per i cromosomi 7,11 e 14 per la provata esistenza di regioni di questi cromosomi sottoposte al fenomeno dell’imprinting correlata alla manifestazione di fenotipi patologici.

**Traslocazioni reciproche, Robertsoniane e cromosomi marcatori soprannumerari**

Diversi casi di UPD coinvolgenti cromosomi acrocentrici riguardano traslocazioni Robertsoniane, sia de novo che familiari, sia non-omologhe che omologhe. Poiché correzioni del cariotipo sbilanciato sono sempre possibili, soprattutto nei casi a maggior rischio di aneuploidia, come i portatori di riarrangiamenti cromosomici, l'esecuzione del test dovrebbe essere considerata nei casi in cui sia presente una traslocazione coinvolgente i cromosomi 14 e 15, per le ragioni sopra esposte, in presenza di un cariotipo fetale sia bilanciato che normale. Tale considerazione si deve applicare a maggior ragione nei casi in cui la traslocazione sia osservata de novo e specialmente nel caso di traslocazioni tra omologhi, che di fatto spesso sono isocromosomi.

Sporadici casi di UPD associata alla presenza di traslocazioni reciproche riportati in letteratura rendono tale indicazione puramente speculativa per l'esecuzione del test, almeno nei casi familiari.

In presenza di cromosomi marcatori soprannumerari, specialmente se identificati de novo in diagnosi prenatale, deve essere valutata l'esecuzione del test per la disomia uniparentale, soprattutto nei casi in cui si sospetta o si ha l'evidenza del coinvolgimento dei cromosomi 14 e 15.

#### Considerazioni conclusive

Per la corretta impostazione della necessità e della fattibilità dei test molecolari per la ricerca della disomia uniparentale, nel caso in cui siano coinvolti altri cromosomi oltre a quelli citati, si rimanda alla letteratura corrente, che continuamente segnala situazioni che riportano l'esistenza di tale fenomeno. Generalmente viene utilizzato un numero limitato di marcatori molecolari e ne consegue che

- l'omozigosi per mutazioni recessive non viene esclusa dalla eterodisomia dimostrata per pochi marcatori e che
- l'isodisomia di alcuni marcatori molecolari non prova necessariamente l'omozigosi .

#### BIBLIOGRAFIA

Berend SA, Horwitz J, McCaskill C, Shaffer LG Identification of uniparental disomy following prenatal detection of Robertsonian translocations and isochromosomes. *Am J Hum Genet* 66: 1787 - 1793, 2000

European Collaborative Research on Mosaicism in CVS (EUCROMIC)  
Trisomy 15 CPM: probable origins, pregnancy outcome and risk of fetal UPD.  
*Pren Diagn*, 19: 29-35, 1999

Hahnemann JM, Vejerslev LO

European collaborative research on mosaicism in CVS-fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy.  
*Am J Med Genet*, 70: 179-187, 1997

Hahnemann JM, Vejerslev LO

Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS)-diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992.



**Prenat Diagn, 17: 801-820, 1997**

**Hook E.B. Exclusion of chromosome mosaicism: tables of 90 percent, 95 percent and 99 percent confidence limits and comments on use. Am J Hum Genet 1977, 29, 94.**

**Hsu LYF, Kaffe S, Jenkins EC, et al**

**Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies.**

**Prenat Diagn, 12: 555-573, 1992**

**Hsu LYF, Yu M-T, Richkind KE, et al**

**Incidence and significance of chromosome mosaicism involving an autosomal structural abnormality diagnosed prenatally through amniocentesis: a collaborative study.**

**Prenat Diagn, 16: 1-28, 1996**

**Hsu LYF, Yu M-T, Neu R, et al**

**Rare trisomy mosaicism diagnosed in amniocytes involving an autosome other than chromosomes 13, 18, 20 and 21: karyotype/phenotype correlations.**

**Prenat Diagn, 17: 201-242, 1997**

**Hsu LYF, Benn PA**

**Revised guidelines for the diagnosis of mosaicism in amniocytes.**

**Pren Diagn, 19: 1081-1090, 1999**

**Ledbetter DH, Engel E Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. Hum Mol Genet 4: 1757 – 1764, 1995**

**Kalousek DK Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. Am J Med Genet 91: 39 – 45, 2000**

**Kotzot D Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. Am J Med Genet 82: 265 – 274. 1999**

**Smith K, Lowther G, et al**

**The predictive value of findings of the common aneuploidies, trisomies 13, 18 and 21, and numerical sex chromosome abnormalities at CVS: experience from the ACC U.K. collaborative study.**

**Prenat Diagn, 19, 817-826, 1999**

**Wallerstein R, Yu M-T, Neu R, et al**

**Common trisomy mosaicism diagnosed in amniocytes involving chromosomes 13, 18, 20 and 21: karyotype/phenotype correlations.**

**Prenat Diagn, 20: 103-122, 2000**

**testi consigliati**

**Genetic Disorder and The Fetus IV edition Ed.A:Milunsky The Johns Hopkins University Press,Baltimore-London,1998**

**Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling Second Edition Ed. R.J.M. Gardner-  
G.R. Sutherland New York Oxford OXFORD University Press 1996**

**The principles of Clinical Cytogenetics; eds Gersen SL, Keagle MB, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999**

## **Refertazione dell'indagine citogenetica prenatale**

**Il referto deve presentarsi scritto nel modo più chiaro possibile e comprensibile ai non specialisti della materia. Le note esplicative di qualsiasi tipo devono essere contenute in una sezione apposita e non entrare nella formula del cariotipo fetale.**

**Si impongono alcune regole che sono qui di seguito elencate:**

**- L'intero referto deve essere scritto su carta intestata. L'intestazione deve presentare il nome del laboratorio in cui è stata eseguita l'analisi**

**- Devono essere presenti obbligatoriamente la data del prelievo e la data di arrivo del campione se discordanti.**

**- La data del referto deve corrispondere alla data in cui si chiude e si firma l'analisi; non consegnare un referto preliminare**

**- Gli elementi di identificazione della paziente sono costituiti da:**

**Cognome e Nome**

**Data di nascita**

**N. identificativo dell'analisi per il laboratorio**

**- Va indicato (evitando l'uso di sigle) il tipo di tessuto analizzato**

**- L'indicazione all'analisi può essere facoltativa**

**- Il cariotipo fetale deve essere scritto secondo ISCN 95 e sue successive modifiche**

**- La formula del cariotipo sia normale che patologico deve essere accompagnata da una descrizione in parole comprensibile anche ai non specialisti.**

**- Il referto deve contenere una descrizione dei metodi utilizzati. In particolare per l'analisi su villi coriali va chiaramente indicato se sono state utilizzate entrambe le metodiche (diretto e coltura)**

**- Va segnalato il numero di colonie/aree/metafasi e il numero di colture indipendenti analizzate. In particolare per i villi coriali si deve chiaramente evincere quale parte dell'analisi proviene dal preparato diretto e quale dalla coltura. Il numero delle metafasi totale è facoltativo.**

**- Ogni analisi deve essere firmata dallo specialista responsabile diretto dell'indagine con nome stampato.**

**Nota bene: non segnalare nel cariotipo le varianti normali (compreso il 9ph) La commissione ritiene inutile la segnalazione nella formula del cariotipo fetale di tutte le varianti normali, così come sono descritte nell' ISCN 95. Tuttavia la commissione pensa debbano essere segnalate**

**nelle osservazioni, e non nella formula del cariotipo, quelle varianti per le quali siano state eseguite colorazioni aggiuntive e/o l'analisi ai genitori per la definizione della variante stessa.**

**Qui di seguito vengono proposti tre modelli di consenso informato per le indagini citogenetiche prenatali su villi coriali , su liquido amniotico e sangue fetale.**

**La commissione ritiene variabile la forma ma irrinunciabili i contenuti.**

**Sono escluse le implicazioni cliniche legate al prelievo invasivo.**

## **CONSENSO ALLA DIAGNOSI CITOGENETICA PRENATALE SU VILLI CORIALI**

**L'indagine citogenetica prenatale ha lo scopo di accertare la presenza di anomalie cromosomiche numeriche e/o strutturali. (indicare uno o più esempi)**

**Esistono difetti congeniti che, non essendo associati ad anomalie cromosomiche, non possono essere diagnosticati mediante l'analisi citogenetica prenatale. (indicare uno o più esempi)**

**In rari casi non possono essere stabilite con certezza le conseguenze cliniche associate ad una anomalia cromosomica, i chiarimenti del caso saranno forniti in sede di consulenza.**

**Trattamento del campione:**

**Dopo valutazione del campione prelevato, si suddivide lo stesso in due aliquote al fine di ottenere un preparato diretto ed un preparato colturale.**

**Esiste una quantità minima di villi coriali necessaria per l'allestimento dei due preparati (è facoltativo indicare tale quantità).**

**Diagnosi:**

**1 - 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.**

**2 - L'analisi sia del preparato diretto che colturale ottimizza l'affidabilità della diagnosi. L'utilizzo di una sola delle due analisi porta ad una affidabilità pari al 99%, dato ottenuto dall'esperienza internazionale pubblicata.**

**3 - Non si possono escludere casi di differenza di risultato nei due preparati. In questa circostanza potrebbe rendersi necessario procedere ad ulteriori accertamenti, di cui la paziente verrà informata in sede di consulenza genetica.**

**4 - L'impossibilità di pervenire ad una diagnosi può verificarsi in rarissimi casi, per motivi generalmente correlati ad una ridotta crescita dei villi in coltura e ad assenza di cellule in divisione nel preparato diretto.**

**5 - E' possibile che il risultato richieda , per una sua più corretta interpretazione, l'estensione dell'esame citogenetico ai genitori o l'applicazione di indagini molcolari.**

**6 - La qualità dei preparati cromosomici non garantisce la possibilità di individuare anomalie strutturali di ridottissima dimensione.**

**7 - 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.**

**8 - La refertazione è prevista entro e non oltre 21 giorni dalla data dell'arrivo del campione in laboratorio.**

**La sottoscritta.....**

**informata di quanto sopra, esprime il consenso alla diagnosi citogenetica prenatale.**

**Data:**

**Firma:**

**Firma di chi ha raccolto e illustrato il consenso:**



## **CONSENSO ALLA DIAGNOSI CITOGENETICA PRENATALE SU CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO**

**L'indagine citogenetica prenatale ha lo scopo di accertare la presenza di anomalie cromosomiche numeriche e/o strutturali. (indicare uno o più esempi)**

**Esistono difetti congeniti che, non essendo associati ad anomalie cromosomiche, non possono essere diagnosticati mediante l'analisi citogenetica prenatale. (indicare uno o più esempi)**

**In rari casi non possono essere stabilite con certezza le conseguenze cliniche associate ad una anomalia cromosomica, i chiarimenti del caso saranno forniti in sede di consulenza.**

**Trattamento del campione:**

**La componente cellulare del liquido amniotico viene raccolta e suddivisa in più colture indipendenti.**

**La quantità minima di campione necessaria per l'allestimento delle colture è di 10 ml, quella ottimale è di 16-18 ml.**

**Il successo delle colture cellulari è in relazione al numero di cellule vitali presenti nel campione.**

**Diagnosi:**

**1 - 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.**

**2 - In caso di riscontro di due o più linee cellulari con diverso cariotipo (mosaico) può rendersi necessaria una ulteriore indagine citogenetica su altro campione. In questa circostanza la paziente viene informata, in sede di consulenza genetica, riguardo alle possibilità di approfondimento diagnostico.**

**3 - 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.**

**4 - 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.**

**5 - La qualità dei preparati cromosomici non garantisce la possibilità di individuare anomalie strutturali di ridottissima dimensione.**

**6 - 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.**

**7 - La refertazione è prevista entro e non oltre 21 giorni dalla data dell'arrivo del campione in laboratorio.**

**La sottoscritta.....**

**informata di quanto sopra, esprime il consenso alla diagnosi citogenetica prenatale.**

**Data:**

**Firma:**

**Firma di chi ha raccolto e illustrato il consenso:**

## **CONSENSO ALLA DIAGNOSI CITOGENETICA PRENATALE SU SANGUE FETALE**

**L'indagine citogenetica prenatale su sangue fetale viene eseguita solo se esistono condizioni ad alto rischio di anomalia cromosomica (es. malformazioni fetali evidenziate ecograficamente, verifica di un sospetto mosaicismismo cromosomico riscontrato in corso di diagnosi prenatale su villi coriali o su liquido amniotico).**

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

**In rari casi non possono essere stabilite con certezza le conseguenze cliniche associate ad una anomalia cromosomica; i chiarimenti del caso saranno forniti in sede di consulenza.**

### **Trattamento del campione**

**Il quantitativo di sangue prelevato dal funicolo non deve essere inferiore a 1-2 ml.**

**L'adeguatezza del campione viene stabilita mediante ...(indicare le metodiche locali)**

### **Diagnosi:**

**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 è limitata a rarissimi casi per motivi legati unicamente all'inadeguatezza del campione prelevato.**

**La possibilità di errore diagnostico è limitata ai rarissimi casi di anomalie cromosomiche di struttura di ridottissime dimensioni non rilevabili con le tecniche applicate.**

**La refertazione è prevista entro e non oltre 7-10 giorni dalla data di arrivo del campione in laboratorio. In casi particolari può essere richiesto un tempo superiore.**

**La sottoscritta.....**

**informata di quanto sopra, esprime il consenso alla diagnosi citogenetica prenatale.**

**Data:**

**Firma:**

**Firma di chi ha raccolto e illustrato il consenso:**