

SCREENING BIOCHIMICI PRENATALI: L'ESPERIENZA DEL TRI-TEST IN 17.869 GRAVIDANZE DELLA REGIONE ABRUZZO

Paolo Guanciali Franchi, Irene Iezzi, Claudio Celentano, Chiara Palka,
Jafar Ghahvehchi Khalig, Giuseppe Calabrese

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Genetica Medica, Università "G. D'Annunzio", Chieti; Servizio di Genetica Medica, Ospedale Spirito Santo, Pescara

Indirizzo per corrispondenza: Prof. Paolo Guanciali Franchi

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Genetica Medica, Università "G. D'Annunzio", Chieti; Servizio di Genetica Medica, Ospedale Spirito Santo, Pescara

Via dei Vestini snc, 66100 Chieti (CH) Italia

tel: +39 0854 252332; fax: +39 0854252643; e-mail: paolo.guanciali@tin.it

ABSTRACT

Methods. A screening study performed on 17869 pregnant women using the triple test is presented. Results. Among the screened population, 1.274 women (7%) had a positive test at risk higher than 1:250 and underwent amniocentesis. The detection rate (DR) for all chromosomal abnormalities was 88%, while for Down's syndrome (DS) the DR was 80%. Chromosomal abnormalities were detected in 63 fetuses (1:20 positive tests), while 1211 were false positive cases (6,7%). False negative were observed in 8 cases (0.04%; 1:2233 test). Positive tests for neural tube defects (NT) was 211 with a DR of 100%. **Conclusions:** The high DR is probably related to the determination of gestational age by sonographic scan and to the homogeneity of screened population. Moreover, such high DR is also related to the association of elevated hCG levels, sonographic markers and high incidence of chromosomal anomalies that permitted the identification of 9 fetuses with chromosomal abnormalities in negative triple screens.

Key words: triple test; prenatal diagnosis; chromosomal abnormalities

RIASSUNTO

Metodi. Gli autori riportano uno studio condotto su 17869 gestanti impiegando il triplo test come metodo di screening per l'individuazione delle aneuploidie fetali. **Risultati.** 1274 donne della popolazione sottoposta allo studio (7%) sono risultate avere un test positivo con un rischio superiore al cut-off di 1:250 e sono state sottoposte ad amniocentesi. La detection rate (DR) per tutte le anomalie cromosomiche è stata dell'88%, mentre quella per la sola sindrome di Down (DS) è stata dell'80%. Sono stati individuati 63 feti con anomalie cromosomiche (1:20 test positivi), mentre il numero dei falsi positivi è stato di 1211 casi (6,7%). I falsi negativi sono stati 8 (0.04%; 1:2233 test). I test risultati positivi per i difetti del tubo neurale (NT) sono risultati essere 211 con una DR del 100%. **Conclusioni:** L'elevata DR ottenuta è da imputarsi alla determinazione dell'età gestazionale mediante ultrasonografia e all'omogeneità della popolazione esaminata. Inoltre l'associazione di elevati livelli di hCG con markers ultrasonografici e anomalie cromosomiche ha permesso l'individuazione di 9 feti con anomalie cromosomiche tra i test risultati negativi.

Parole chiave: diagnosi prenatale; anomalie cromosomiche

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni lo screening biochimico su sangue materno, per selezionare le gestanti con un rischio aumentato di avere un feto affetto da sindrome di Down (SD) o comunque da una patologia cromosomica, ha avuto un notevole impulso con la messa a punto di diversi test, quali il bitem, il tritem, il quadritest, e il test integrato (1-3).

Il tritem, che si basa sul dosaggio nel siero materno, tra la 15^a e la 19^a settimana di gestazione dell'alfa-fetoproteina (AFP), della gonadotropina corionica (hCG) e dell'estriolo libero (uE₃) quali marcatori nelle gravidanze con feti affetti da SD, è il test che è stato ed è ancora il più largamente impiegato.

Scopo dello screening è quello di avviare all'amniocentesi solo le donne

con test positivo, senza aumentare in modo significativo il numero delle amniocentesi, coinvolgendo nello studio tutta la popolazione delle gestanti, con la speranza di diagnosticare più anomalie cromosomiche rispetto al criterio classico, che avvia all'amniocentesi solo le donne con età ≥ 35 anni.

Per il raggiungimento di questi obiettivi sono necessari un adeguato cut-off, cioè il limite oltre il quale la gravidanza è considerata a rischio, una corretta gestione delle mediane degli analiti su cui viene calcolato il rischio, l'esatta datazione della gravidanza e la correzione dei multipli del valore mediano (MoM) in base a diversi fattori, quali il peso materno, la razza, l'abitudine della gestante al fumo, il diabete insulino-dipendente e l'eventuale ricorso alla fecondazione assistita (4-9).

Gli studi riportati in letteratura indicano che l'applicazione del tritem

sulla popolazione di tutte le gestanti, a prescindere dall'età, consente l'individuazione di circa il 70% dei feti affetti da SD e di circa l'80% di tutte le aneuploidie nel secondo trimestre di gravidanza (10-12).

In questo lavoro riportiamo i risultati di uno screening mediante tritest eseguito su 17869 gravide della regione Abruzzo tra il 1995 e il 2005, nel quale abbiamo ottenuto l'88% di detection di tutte le patologie fetali e l'80% per la sola SD.

MATERIALI E METODI

Tra il 1/1/1995 e il 31/12/2005 sono state esaminate mediante tritest 17869 gravidanze presso il Servizio di Genetica Medica dell'Ospedale Civile di Pescara. I campioni di sangue sono stati raccolti preferenzialmente tra 15 e 16 settimane di gestazione, previa consulenza genetica per illustrare alle gestanti i criteri e le finalità dello screening. Le settimane di gestazione sono state calcolate mediante ecografia di primo livello, utilizzando le biometrie fetali come parametri di riferimento. I livelli di AFP, hCG ed uE_3 nel sangue materno sono stati analizzati dall'1/1/1995 al 31/12/2003 mediante metodo immunoenzimatico (Adaltis, Italia) e dall'1/1/2004 al 31/12/2005 mediante dosaggio immunometrico in chemiluminescenza (Medical Systems, Italia). I dosaggi dell'AFP, hCG ed uE_3 sono stati trasformati in multipli del valore mediano (MoM) usando software dedicati per il calcolo del rischio (Dermalog, Germania, dal 1/1/1995 al 31/12/2003 e Prisca, Typolog, Germania, dal 1/1/2004 al 31/12/2005) e corretti in base al peso della gestante, alla razza, all'abitudine al fumo, al diabete insulino-dipendente e ad una eventuale fecondazione in vitro (IVF) (4-9). I risultati sono stati riconsegnati entro 24 ore dal prelievo e le gestanti con un indice di rischio superiore al cut-off di 1:250 sono state sottoposte a nuova consulenza genetica per discutere la positività al test e concordare l'eventuale diagnosi prenatale. In alcuni casi, l'analisi citogenetica è stata implementata con un'analisi molecolare quale l'ibridazione in situ in fluorescenza (FISH) o lo Spectral Karyotyping (SKY), per la migliore caratterizzazione dell'anomalia cromosomica trovata (13). Lo screening è stato considerato positivo per trisomia 18 quando il valore di tutti e tre gli analiti è risultato inferiore a 0,50 MoM (14).

Le gestanti con un test negativo e valori normali di AFP (0,50-2,50 MoM) e uE_3 ($>0,50$ MoM), ma con valore di hCG $\geq 2,5$ MoM, sono state indirizzate ad una nuova ecografia da effettuarsi tra 16 e 18 settimane di gestazione, per la ricerca di eventuali segni ecografici maggiori o minori, quali ad esempio igroma cistico, pielectasia mono o bilaterale, cisti renali, atresia duodenale, difetto del setto atrio-ventricolare e difetto del setto inter-ventricolare, omero o femore corti, che possono essere associati ad aneuploidie, qualora nella precedente ecografia non fossero risultati presenti o evidenziabili. Nei casi di positività dell'ecografia di secondo livello, alla gestante è stata consigliata l'amniocentesi (15).

RISULTATI

La popolazione delle 17.869 gestanti consisteva in 4060 gravide di età ≥ 35 anni (22%) e in 13809 con età < 35 anni (78%). L'età media è risultata di 30,6 anni (range 17-46 anni). Le gravidanze gemellari sono state 175 (0,97%). Al cut off di 1:250 sono risultati positivi allo screening 1.274 test (7%), di cui 611 in donne con età ≥ 35 anni (48%) e 663 in donne di età < 35 anni (52%).

I veri positivi per patologia cromosomica sono stati 63 (1:20 test positivi), con una detection rate (DR) totale dell'88%; di queste, 29 in donne con età < 35 anni (DR 85%) e 34 in donne con età ≥ 35 anni (DR 92%); in dettaglio, le cromosopatie riscontrate sono state: 32 trisomie 21 (sindrome di Down) (1:39 test positivi), per una detection rate dell'80%;

12 trisomie 18 (sindrome di Edwards), 8 sindromi di Turner (45,X), 4 sindromi di Klinefelter (47,XXY), 1 i(12p) sorannumerario (sindrome di Pallister-Killian), 1 del(18)(q21), 1 triploidia, 1 trisomia parziale del braccio corto del cromosoma 10 da sbilanciamento di una t(3;10)mat, 1 cromosoma sovranumerario risultato all'analisi in SKY un'i(18p), 1 cariotipo complesso con inversione del cromosoma 12 e traslocazione sbilanciata t(12;16) identificata mediante FISH ed, infine, 1 cariotipo 46,XX associato a fenotipo maschile, per traslocazione del gene SRY sul cromosoma X, come evidenziato dalla FISH (Tabella I).

Tabella I. Anomalie fetali riscontrate in gravidanze con tritest positivo per sindrome di Down, trisomia 18 e difetti del tubo neurale.

Patologia	n. casi
Trisomia 21	32
Trisomia 18	12
Sindrome di Turner	8
Sindrome di Klinefelter	4
Triploidia	1
46,XX,inv(12)der(16)t(12;16)	1
47,XY,+i(18p)	1
46,XX maschio	1
Sindrome di Pallister-Killian	1
del18q(2.1)	1
Trisomia parziale 10p	1
DTN	5
Difetto della parete addominale	1
Totale	69

Le medie dei MoM nei feti affetti da SD sono stati: 0,57 per la AFP, 2,95 per l'hCG e 0,65 per l' uE_3 .

I restanti 1211 (6,7%) test positivi erano falsi positivi (FP) e di questi 631 (53%) sono stati osservati in donne con età < 35 anni e 572 (47%) in donne con età ≥ 35 anni.

I falsi negativi (FN) sono stati 8 (0,04%; 1:2233 test) e consistevano tutti in SD; 5 erano presenti in donne di età < 35 anni e 3 in donne di età ≥ 35 anni (Tabella II).

In 562 gravide, tutte con età < 35 anni, lo screening è risultato negativo, ma il valore di hCG era $\geq 2,50$ MoM, mentre i valori di AFP erano compresi fra 0,50 e 2,50 MoM e quelli dell' uE_3 erano $> 0,50$ MoM; in 49 di queste gestanti, l'ecografia di II livello ha dimostrato la presenza di marker maggiori o minori, isolati o associati tra loro (Tabella III); l'amniocentesi è stata offerta a tutte le 49 gestanti e ha dimostrato in 9 casi (18%) la presenza di un'aneuploidia, consistente in 6 casi in una sindrome di Down e in 3 in una sindrome di Turner.

I test risultati positivi per difetti del tubo neurale (DTN) sono stati 211 (1,18%) e tutti sono stati sottoposti ad ecografia morfologica, che in 5 casi ha evidenziato un DTN e in 1 caso un difetto della parete addominale con una DR del 100% (Tabella I). Il valore medio di AFP nei feti affetti era $> 4,7$ MoM.

DISCUSSIONE

Il primo dato rilevante di questo lavoro riguarda l'elevata detection rate sia per la SD che quella globale, risultate rispettivamente dell'80% e dell'88% con un cut-off di 1:250, con un tasso di FP del 6,7%, mentre

Tabella II. Risultati del tritest su 17.869 gestanti.

	n.	%
Età media gestanti	30,6	
Gestanti con età <35 aa	13809	78%
Gestanti con età ≥35 aa	4060	22%
Test positivi per DS	1274	7%
Test positivi per DTN	211	1,18%
Patologie cromosomiche	63	5% (1:20)
DTN/DPA	6	
Falsi positivi per DS	1211	6,7%
Falsi negativi	8	0,04% (1:2233)
DR per DS	80%	
DR totale	88%	
DR per DTN	100%	

DS= Sindrome di Down; DTN= difetti del tubo neurale; DPA= difetto parete addominale; DR= detection rate.

nella maggior parte degli studi pubblicati essa è risultata del 70% per la SD e dell'80% per tutte le anomalie cromosomiche (10-12). Uno dei fattori che hanno contribuito a realizzare questo risultato è stato la valutazione dell'età gestazionale mediante studio ecografico eseguito dopo la XII settimana di gestazione, con la valutazione di alcuni parametri fetali quali il diametro biparietale (DBP), la lunghezza cranio-caudale (LCC), la lunghezza dell'omero (LO) e del femore (LF), la circonferenza cranica (CC) e la circonferenza addominale (CA). Un altro fattore importante è stato senz'altro l'omogeneità della popolazione delle gestanti, per lo più di origine abruzzese, che ha consentito di elaborare mediane di riferimento che rispecchiano più fedelmente la distribuzione degli analiti. Infine, l'elevata DR è dovuta anche all'individuazione di 9 patologie cromosomiche in donne con tritest negativo sottoposte ad amniocentesi poiché con valori di hCG ≥2,50 MoM in presenza di un marcatore ecografico maggiore o minore (15); questo approccio ha anche ridotto i FN che in questo studio sono risultati 8 (0,04%), senza un aumento significativo delle amniocentesi che è risultato del 4,4%.

Il secondo punto importante riguarda il fatto che, in accordo con la legislazione italiana, 4060 gravide si sarebbero potute sottoporre gratuitamente ad amniocentesi, poiché di età ≥35 anni. Le amniocentesi eseguite sono state invece 1274, pari ai test risultati positivi. Questo ha consentito di effettuare 2786 amniocentesi in meno, evitando la perdita

Tabella III. Markers ecografici evidenziati nelle 49 gestanti con hCG ≥2,5 MoM.

AVSD, CF, pielectasia	1
AVSD, igroma cistico	1
AVSD, atresia duodenale	1
Igroma cistico	4
Pielectasia	14
Cisti dei plessi coirioidei	5
Foci ecogenici intracardiaci	12
Intestino iperecogeno	5
Femore/omero corto	5
Edema nucale	1

di 13-27 feti sani a seguito del prelievo, considerando il rischio di aborto per amniocentesi pari allo 0.5-1% (16-17), ed ottenendo un risparmio economico di oltre 690.000 euro, calcolando il costo di 250 euro per singola amniocentesi nel nostro Servizio Sanitario Nazionale.

Il terzo punto rilevante riguarda il numero di anomalie osservate, che è risultato di 63, di cui 34 nelle donne con età ≥35 anni (DR 92%) e 29 in gravide con età <35 anni (DR 85%). Queste ultime anomalie sarebbero state individuate solo alla nascita. In accordo poi con i dati della letteratura, anche nel presente studio il tritest si è dimostrato abile a segnalare la presenza di altre aneuploidie come la trisomia 18, la sindrome di Turner e di Klinefelter ed altre anomalie cromosomiche più rare (14,18). Un aspetto particolare che va sottolineato riguarda il fatto che solo 4 dei 12 casi di sindrome di Edwards avevano una positività dello screening per la trisomia 18 (14); la positività per SD al tritest della maggior parte delle trisomie 18 presenti in questo studio, come anche delle sindromi di Turner, va ricercata molto probabilmente nella presenza in questi feti di un igroma cistico (19).

In conclusione, anche i presenti risultati confermano l'importanza di monitorare la gravidanza nel primo o nel secondo trimestre di gestazione con un test sierologico, che rappresenta un metodo più efficace rispetto alla sola età materna ≥35 anni per l'individuazione delle aneuploidie fetali.

BIBLIOGRAFIA

1. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ* 1988; 297: 883-7
2. Wald NJ, Hackshaw AK. Advances in antenatal screening for Down syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 563-80
3. Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med* 1999; 341: 461-7
4. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, et al. Maternal serum screening for Down's syndrome: the effect of routine ultrasound scan determination of gestational age and adjustment for maternal weight. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 144-9
5. O'Brien JE, Dvorin E, Drugan A, et al. Race-ethnicity-specific variation in multiple-marker biochemical screening: alpha-fetoprotein, hCG, and estriol. *Obstet Gynecol* 1997; 89: 355-8
6. Rudnicka AR, Wald NJ, Huttly W, et al. Influence of maternal smoking on the birth prevalence of Down syndrome and on second trimester screening performance. *Prenat Diagn* 2002; 22: 893-7
7. Palomaki GE, Knight GJ, Haddow JE. Human chorionic gonadotropin and unconjugated oestriol measurements in insulin-dependent diabetic pregnant women being screened for fetal Down syndrome. *Prenat Diagn* 1994; 14: 65-8

8. Wald NJ, Leck I. *Tests using multiple markers in: Antenatal and neonatal screening*, Oxford University Press 2000.
9. Frishman GN, Canick JA, Hogan JW, et al. *Serum triple-marker screening in in vitro fertilization and naturally conceived pregnancies*. *Obstet Gynecol.* 1997; 90: 98-101.
10. Kellner LH, Weiner Z, Weiss RR, et al. *Triple marker (alpha-fetoprotein, unconjugated estriol, human chorionic gonadotropin) versus alpha-fetoprotein plus free-beta subunit in second-trimester maternal serum screening for fetal Down syndrome: a prospective comparison study*. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 173: 1306-9.
11. Kellner LH, Weiss RR, Weiner Z, et al. *The advantages of using triple-marker screening for chromosomal abnormalities*. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172: 831-6.
12. Muller F, Forestier F, Dineon B, ABA Study Group. *Second trimester trisomy 21 maternal serum markers screening. Results of a country wide study of 854,902 patients*. *Prenat Diagn.* 2002; 22: 925-9.
13. Guanciali Franchi P, Calabrese G, Morizio E, et al. *Identification of 14 rare marker chromosomes and derivatives by spectral karyotyping in prenatal and postnatal diagnosis*. *Am J Med Genet A.* 2004; 127: 144-8.
14. Palomaki GE, Haddow JE, Knight GJ, et al. *Risk-based prenatal screening for trisomy 18 using alpha-fetoprotein, unconjugated oestriol and human chorionic gonadotropin*. *Prenat Diagn.* 1995; 15: 713-23.
15. Celentano C, Guanciali Franchi PE, Liberati M, et al. *Lack of correlation between elevated maternal serum hCG during second-trimester biochemical screening and fetal congenital anomaly*. *Prenat Diagn.* 2005; 25: 220-4.
16. Seeds JW. *Diagnostic mid trimester amniocentesis: how safe?* *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 191: 607-15.
17. Dugoff L, Hobbins JC. *Invasive procedures to evaluate the fetus*. *Clin Obstet Gynecol.* 2002; 45: 1039-53.
18. Celentano C, Guanciali Franchi PE, Liberati M, et al. *Trisomy 18 fetuses with cystic hygroma linked to positive maternal serum Down's syndrome Triple test screening result*. *J Med Screen.* 2005; 12: 203.
19. Palka G, Guanciali Franchi P, Papponetti M, et al. *Prenatal diagnosis using the triple test*. *Minerva Ginecol.* 1998; 50: 411-5.