

## IL TEST SEQUENZIALE PER LO SCREENING DELLA SINDROME DI DOWN

Paolo Guanciali Franchi, Irene Iezzi, Claudio Celentano, Donatella Fantasia, Elisena Morizio, Giandomenico Palka

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  
Servizio di Genetica Medica, Ospedale Spirito Santo, Pescara  
Via dei Vestini sn, 66100 Chieti (CH) Italia  
tel: +39 085 4252332; fax: 085 4252643 e-mail: paolo.guanciali@tin.it

### ABSTRACT

**Methods.** A study performed on 8031 pregnant women to evaluate the effectiveness of sequential screening for fetal aneuploidy in respect of triple test is reported. **Results.** Among the 3859 pregnancies screened using the sequential screening, 147 women (3.8%) had a positive test and underwent amniocentesis. Down's syndrome (DS) was detected in 12 fetuses (1:12 positive tests) with a detection rate (DR) >99%, while 135 were false positive cases (FP)(3.4%). Among the 4172 pregnancies screened using the triple test, 319 women (7.6%) had a positive test and underwent amniocentesis. DS was detected in 9 fetuses (1:35 positive tests) with a DR 90%, while 310 were FP cases (7.4%). A false negative (FN) was observed in a 35 years old woman. **Conclusions.** Our data show that sequential screening is more advantageous in respect of triple test, is effective, and can reduce the number of invasive tests that are performed.

**Key words:** *prenatal screening; triple test; sequential screening; Down syndrome*

### RIASSUNTO

**Metodi.** Gli autori riportano uno studio condotto su 8031 gestanti per valutare l'efficacia del tritest e del test sequenziale nell'individuazione delle aneuploidie fetali, confrontando i risultati ottenuti impiegando le due metodiche di screening. **Risultati.** Tra le 3859 donne sottoposte a screening mediante test sequenziale, 147 hanno avuto un test positivo (3.8%) e sono state sottoposte ad amniocentesi. Dodici gravidanze sono risultate affette da sindrome di Down (SD) (1:12 test positivi), con una detection rate (DR) >99%. I rimanenti 135 test positivi (3.4%) erano falsi positivi (FP). Tra le 4172 gestanti sottoposte a tritest sono state evidenziate 319 donne con un test positivo (7.6%). Nove gravidanze sono risultate affette da SD (1:35 test positivi), con una DR del 90%. I restanti 310 test positivi (7.4%) erano FP, con un falso negativo (FN) per SD in una donna con età di 35 anni. **Conclusioni.** Questi risultati dimostrano che il test sequenziale è molto più efficiente del tritest: nell'individuazione delle gravidanze affette, riducendo contemporaneamente sia il numero delle amniocentesi che i costi legati all'identificazione dei feti con SD e diminuendo altresì il numero di feti sani abortiti a seguito di indagini invasive.

**Parole chiave:** *screening prenatali; tritest; test sequenziale; sindrome di Down*

### INTRODUZIONE

La diagnosi prenatale invasiva (DPI), nata all'inizio degli anni '70, è ancor oggi largamente impiegata per la diagnosi di aneuploidie fetali nei Paesi industrializzati. Il più usato criterio di eleggibilità è rappresentato dall'età materna, essendo noto che il rischio di aneuploidia fetale, ed in particolare di sindrome di Down (SD), aumenta all'aumentare dell'età della gestante, scegliendo come cut-off i 35 anni per discriminare la popolazione a basso rischio da quella a rischio più elevato (1). Tale criterio si è dimostrato utile fino alla metà degli anni '90, quando la realizzazione di ecografi a sempre maggior risoluzione e la messa a punto di test sierologici sul sangue materno con sensibilità superiore al 90% hanno reso il criterio di selezione

mediante la sola età materna del tutto anacronistico: infatti escludere dalla DPI tutte le gestanti con meno di 35 anni significa perdere a priori la possibilità di diagnosticare il 60-70% dei feti affetti da SD poiché, per effetto del minor numero di gravidanze nelle donne con età  $\geq 35$  anni, solo il 30-40% delle SD nasce da madri ultra-trentacinquenni (2). Il bitest, il tritest e il test integrato si sono dimostrate tecniche molto più efficienti e selettive nell'individuare le gravidanze a rischio da inviare alla DPI (3-5). Inoltre, anche le più recenti linee guida dell'American College of Obstetricians and Gynecologists raccomandano l'uso di test sierologici e di esami ecografici per l'individuazione delle gravidanze a rischio, al posto della sola età della madre (6). Oltre alla più elevata detection rate (DR) infatti, questi nuovi metodi di selezione sono privi del rischio

di abortività proprio delle tecniche invasive; l'amniocentesi, ad esempio, è gravata da un rischio di perdita fetale pari allo 0.5-1%: pertanto nell'anno 2007 in Italia, con l'esecuzione di 127.919 DPI, sono stati abortiti 600-1200 feti a seguito dell'invasività dell'indagine (7-8).

In alcuni nostri precedenti studi avevamo già evidenziato come fosse possibile, mediante l'impiego del tritest e del test sequenziale, ridurre il numero delle amniocentesi e, quindi, anche dei feti sani abortiti, aumentando nello stesso tempo il numero delle gravidanze affette individuate, realizzando altresì un risparmio considerevole per il Sistema Sanitario Nazionale (SSN) (4).

Lo scopo del presente lavoro è stato di valutare l'efficacia del tritest e del test sequenziale su di una popolazione più ampia, in termini di DR, false positive rate (FPR) e probabilità di avere un feto affetto da SD nel caso di positività (OAPR).

## MATERIALI E METODI

Tra il 1/1/2006 e il 31/12/2008 sono state esaminate presso il Servizio di Genetica Medica dell'Ospedale Civile di Pescara 3859 gravidanze mediante test sequenziale e 4172 gravidanze mediante tritest, per un totale di 8031 gestanti screenate. Per quanto riguarda il test sequenziale, le gestanti hanno eseguito una ecografia tra la 10<sup>ma</sup> e la 12<sup>ma</sup> settimana di gravidanza, con la misurazione della translucenza nucale (TN) e della lunghezza cervico-sacrale (CRL) per la determinazione dell'età gestazionale ecografica (EGE), cui ha fatto seguito tra la 11<sup>ma</sup> e la 13<sup>ma</sup> settimana il dosaggio della proteina placentare plasmatica A (PAPP-A) e della frazione beta libera della gonadotropina corionica ( $\beta$ -hCG). Tutte le gestanti sono state sottoposte ad una nuova valutazione ecografica tra la 14<sup>ma</sup> e la 15<sup>ma</sup> settimana per evidenziare eventuali malformazioni o ritardi di crescita e, successivamente, ad un secondo prelievo ematico tra la 15<sup>ma</sup> e la 16<sup>ma</sup> settimana per la valutazione degli analiti del secondo trimestre: gonadotropina corionica (hCG), alfa-fetoproteina (AFP) ed estriolo non coniugato (UE3). Per quanto riguarda il tritest, i campioni di sangue sono stati raccolti preferenzialmente tra la 15<sup>ma</sup> e la 16<sup>ma</sup> settimana di gestazione, calcolata mediante ecografia di primo livello, utilizzando le biometrie fetali come parametri di riferimento.

I livelli di PAPP-A,  $\beta$ -hCG, AFP, hCG ed uE3 nel sangue materno sono stati dosati mediante immunometria in chemiluminescenza (Medical Systems, Italia). I dosaggi degli analiti sono stati trasformati in multipli del valore mediano (MoM) 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). I rischi per il test sequenziale e per il tritest sono stati calcolati usando un software personalizzato per la combinazione del rischio del primo e del secondo trimestre (Prisca, Typolog, Germania) (9-13). 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 consulenza genetica per discutere la positività al test e concordare la diagnosi prenatale. 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 (Palomaky, 1995). Tutte le gestanti risultate positive al test sono state sottoposte a consulenza genetica e successivamente ad amniocentesi tra la 16<sup>ma</sup> e la 17<sup>ma</sup> settimana di gestazione.

## RISULTATI

La popolazione delle 8031 gestanti consisteva in 2409 gravide di età >35 anni (27%) e in 5622 con età <35 anni (73%). L'età media è risultata di 32.4 anni (range 17-46 anni).

Nella popolazione delle 3859 gravide sottoposte a test sequenziale sono state evidenziate 147 donne con un test positivo (3.8%). Dodici gravidanze sono risultate affette da SD con una DR >99% e un OAPR di 1 SD ogni 12 test positivi. I rimanenti 135 test positivi (3.4%) erano falsi positivi (FP), con una spesa di 40274 Euro per Down diagnosticato. Inoltre, il test sequenziale ha individuato 5 gravidanze affette da sindrome di Edwards. Non si sono verificati finora casi di falsi negativi (FN) o difetti del tubo neurale (DTN).

Tra le 4172 gestanti sottoposte a tritest sono state evidenziate 319 donne con un test positivo (7.6%). Nove gravidanze sono risultate affette da SD con una DR del 90% e un OAPR di 1 SD ogni 35 test positivi, con un costo di 46626 Euro per Down diagnosticato. Inoltre, sono state individuate 2 trisomie 18. I restanti 310 test positivi (7.4%) erano FP. In questo gruppo di gestanti si è verificato un FN per SD in una donna con età di 35 anni. I risultati sono riassunti in Tab. I e II.

**Tabella I:** Risultati tritest e test sequenziale: 8031 test.

TRITEST	SEQUENZIALE
N: 4172	N: 3859
Positivi DS: 319	Positivi DS: 147
FP: 310	FP: 135
FPR: 7.4%	FPR: 3.4%
VP DS: 9	VP DS: 12
VP +18: 2	VP +18: 5
VP +13: 1	VP +13: 0
FN: 1	FN: 0
DR 90%	DR >99%
OAPR: 1:35	OAPR: 1:12

**Tabella II:** Costi per Down diagnosticato mediante tritest e test sequenziale.

TRITEST	SEQUENZIALE
4172 test: 292040 €	3859 test: 424490 €
319 Amnio: 127.600 €	147 Amnio: 58800 €
FPR: 7.4%	FPR: 3.4%
OAPR: 1:35	OAPR: 1:12
Spesa x DS: 46626 €	Spesa x DS: 40.274 €

## DISCUSSIONE

Gli screening su sangue materno effettuati nel primo o nel secondo trimestre di gravidanza hanno una paritetica efficacia nella valutazione del rischio di SD, mentre un approccio che combini entrambi i test si è dimostrato essere più efficace del calcolo basato solo sul rischio del primo o del secondo trimestre (6).

Nel nostro studio, comparando i risultati ottenuti mediante tritest e test sequenziale si evince che il FPR del tritest risulta essere doppio rispetto a quello del test sequenziale: 7.4% vs 3.4%; mentre la DR per il tritest è risultata essere minore (90%) rispetto a quella del test sequenziale (>99%). L'elevata DR con un FPR del 3.4% da noi ottenuta, rispetto a quella del 90% con un FPR del 6.9% presente in letteratura (6), sembrerebbe essere legata ad una più precisa datazione ecografica della gravidanza, all'omogeneità della popolazione esaminata, per lo più di origine abruzzese, e all'accuratezza delle mediane impiegate per il calcolo del rischio (4). Un altro dato estremamente importante nel valutare l'efficacia dello screening risulta essere l'"odds of being affected having a positive result" (OAPR), ovvero la probabilità di risultare affetti con uno screening positivo. Per il test sequenziale l'OAPR è risultato essere di 1 gravidanza affetta ogni 12 test positivi, mentre per il tritest

l'OAPR è stato di 1 gravidanza affetta ogni 35 test positivi. Questo si traduce in un minor numero di amniocentesi necessarie per diagnosticare una SD (147 vs 319), riducendo il numero dei feti persi a seguito di amniocentesi di oltre il 50%. Inoltre, un minor numero di amniocentesi si traduce anche in un risparmio per il SSN in quanto la spesa per individuare una gravidanza affetta da SD è di 46000 € circa con il tritest rispetto ai 40.000 € circa con il test sequenziale.

In conclusione, questi risultati, se confermati da una casistica ancora più ampia, dimostrano che il test sequenziale è molto più efficiente del tritest: 1) nell'individuazione delle gravidanze affette; 2) nella riduzione sia del numero delle amniocentesi di più del 50% che dei costi legati all'identificazione dei feti con SD; 3) nella diminuzione del numero di feti sani abortiti a seguito di indagini invasive.

## BIBLIOGRAFIA

1. Morris J, Mutton D, Alberman E. Corrections to maternal age-specific live birth prevalence of Down's syndrome. *J Med Screen.* 2005; 12:202.
2. Palka G, Guanciali Franchi P, Iezzi I et al. I nuovi orizzonti della diagnosi prenatale. *Riv It Ost Gin* 2007; 16:733-5.
3. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ* 1988; 297:883-7.
4. Guanciali Franchi P, Iezzi I, Celentano C et al. Screening biochimici prenatali: l'esperienza del tri-test in 17.869 gravidanze della regione Abruzzo. *Riv It Ost Gin* 2007; 13:635-8.
5. 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.
6. Benn PA, Winston A, Campbell MD et al. Stepwise sequential screening for fetal aneuploidy. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:312.e1-312.e5.
7. SIGU: Censimento delle Strutture di Genetica Medica in Italia, anno 2007. [http://www.operapadrepio.it/contenuti/ricerca/pdf/relazione\\_dallapicola.pdf](http://www.operapadrepio.it/contenuti/ricerca/pdf/relazione_dallapicola.pdf)
8. Royal College of Obstetricians and Gynecologists. Amniocentesis: what you need to know. <http://www.rcog.org.uk/index.asp?PageID=1556#risk>
9. 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
10. 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; 99:144
11. 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
12. 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
13. 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.
14. Palomaki Ge, Haddow Je et al. Risk-based prenatal screening for trisomy 18 using alpha-fetoprotein, unconjugated oestriol and human chorionic gonadotropin. *Prenat Diagn* 1995; 15:713-23