



UNIVERSITÀ  
DI TORINO

barbara.pasini@unito.it  
Dipartimento di Scienze Mediche

10° Corso A.O.G.O.I.  
9° Turin IAN DONALD Course

TEST DI SCREENING  
E DI DIAGNOSI PRENATALE  
FRA PASSATO E FUTURO

*PRENATAL SCREENING  
AND DIAGNOSTIC TESTS BETWEEN  
THE PAST AND THE FUTURE*

Torino, 15-16 marzo 2024  
Hotel NH S. Stefano



DIRETTORE DEL CORSO  
Elsa Viora - Torino

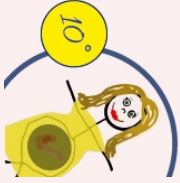
# NIPT

## metodiche di laboratorio e strategie di screening



AZIENDA OSPEDALIERO - UNIVERSITARIA  
Città della Salute e della Scienza di Torino

SC Genetica Medica U  
AOU Città della Salute e della Scienza



## NIPT - *Non Invasive Prenatal Test* **definizione**

### Test di **screening**

eseguito su **DNA** di origine **feto-placentare**

**disperso** nel sangue materno

insieme al **DNA libero circolante** della gestante

grazie a **calcoli statistici**, consente di

stimare il **rischio** di **sindrome di Down**

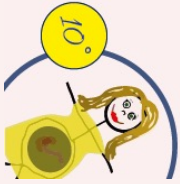
e di altre **condizioni più rare**

con **livelli diversi di affidabilità**

a seconda delle **anomalie indagate**

e delle **caratteristiche della gestante** e della **gravidanza**

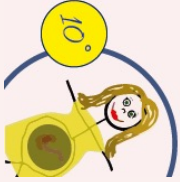
- non è un test diagnostico
  - l'anomalia può essere confinata alla placenta
  - occorre un prelievo adeguato
  - prevalente su quello fetale e indistinguibile
  - la stima del rischio deriva da un sistema di calcolo e non da una evidenza diretta
  - malattie più o meno rare, di gravità diversa e condizioni non necessariamente patologiche
  - massima per le trisomie dei cromosomi 21, 18 e 13
- varianti genetiche materne, obesità, gemellarità, stato della placenta, ecc.



## NIPT- *Non Invasive Prenatal Test* test disponibili

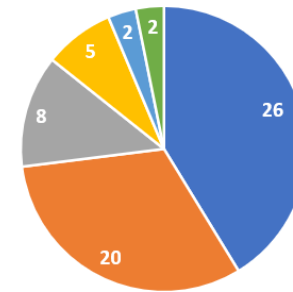
- **trisomie 21, 18, 13**
- **aneuploidie dei cromosomi sessuali**
  - ✓ 45,X
  - ✓ 47,XXY
  - ✓ 47,XYY
  - ✓ 47,XXX
- **aneuploidie dei restanti autosomi**
- **delezioni / duplicazioni > 7 Mb**
- **pannelli di micro-delezioni**
  - ✓ 1p36 (disabilità intellettiva sindromica)
  - ✓ 2q37 (disabilità intellettiva sindromica)
  - ✓ 22q11.2 (Di George/VCF)
  - ✓ 15q11.2 (Prader-Willi/Angelman)
  - ✓ 4p16.3 (Wolf-Hirschhorn)
  - ✓ 5p15.3 (Cri du Chat)
  - ✓ 11q24-24.3 (Jacobsen)
  - ✓ 8q24.11-24.13 (Langer-Giedion)
  - ✓ 17p11.2 (Smith-Magenis)
- **varianti puntiformi** (pannelli di geni)

nelle gestanti senza fattori di rischio  
la positività è ~ **1-1,5%**  
**un risultato negativo è  
rassicurante !!!!**



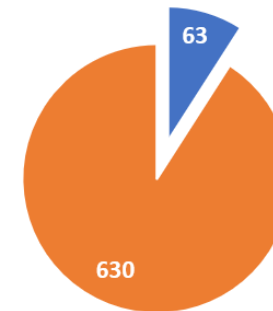
## NIPT- Non Invasive Prenatal Test test disponibili

- **trisomie 21, 18, 13**
- **aneuploidie dei cromosomi sessuali**
  - ✓ 45,X
  - ✓ 47,XXY
  - ✓ 47,XYY
  - ✓ 47,XXX
- **aneuploidie dei restanti autosomi**
- **delezioni / duplicazioni > 7 Mb**
- **pannelli di micro-delezioni**
  - ✓ 1p36 (disabilità intellettiva sindromica)
  - ✓ 2q37 (disabilità intellettiva sindromica)
  - ✓ 22q11.2 (Di George/VCF)
  - ✓ 15q11.2 (Prader-Willi/Angelman)
  - ✓ 4p16.3 (Wolf-Hirschhorn)
  - ✓ 5p15.3 (Cri du Chat)
  - ✓ 11q24-24.3 (Jacobsen)
  - ✓ 8q24.11-24.13 (Langer-Giedion)
  - ✓ 17p11.2 (Smith-Magenis)
- **varianti puntiformi** (pannelli di geni)



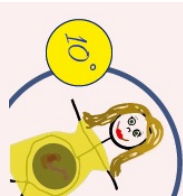
10% delle CGPN  
per riscontri NIPT  
≠ da T21, 18, 13

- NIPT aneuploidie rare
- NIPT aneuploidie cr. sessuali
- NIPT varianti puntiformi
- discordanza sesso ecografico NIPT
- cromosomi sessuali non conclusivi

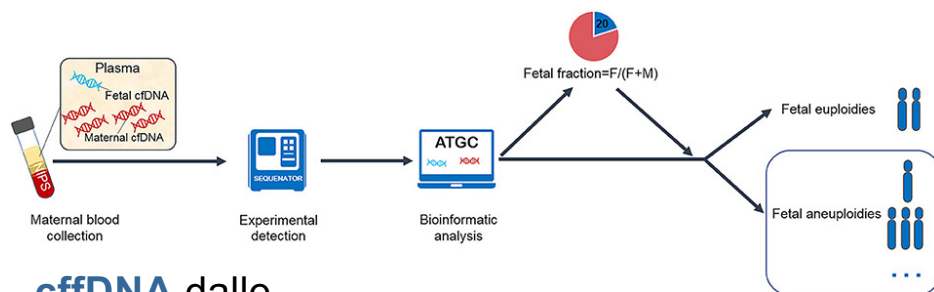


SC Genetica Medica U  
anno 2023 (n° 693)

- CGPN per esiti NIPT diversi dalle aneuploidie maggiori
- CGPN per altre indicazioni



# NIPT - Non Invasive Prenatal Test metodi analitici



sistema estremamente versatile  
ma costoso

**cffDNA** dalle  
cellule in apoptosi  
del trofoblasto

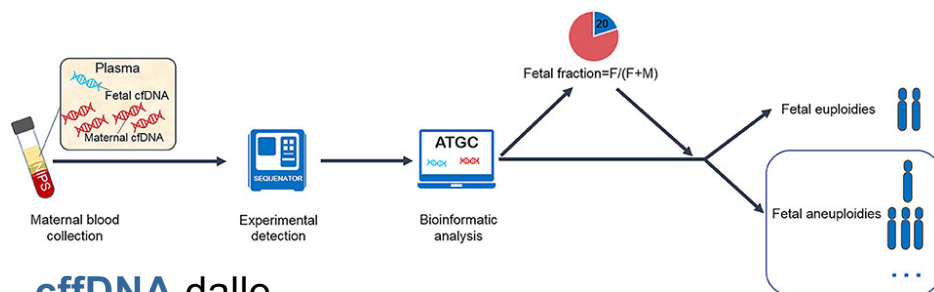
## sequenziamento massivo parallelo *shotgun*

- sequenziamento di tutti i frammenti di cfDNA (materno e fetale)
- **single-end** ~ 50 bp
- **paired-end** ~ 36 bp (misura dei frammenti sequenziati: Mat > Fet)
- con o senza **amplificazione** del cfDNA
- determinazione della **FF** in base alle:
  - ✓ dimensioni dei frammenti
  - ✓ differenze di metilazione
- la **profondità di sequenziamento** incide su:
  - ✓ costi
  - ✓ capacità di rilevare aneuploidie di minori dimensioni

	s-MPS
Earliest gestational age for testing (wk)	10
Testing for CATs	Yes
Fetal sex determined	Yes
Testing for SCAs	Yes
Published validation studies	29
Published clinical experience studies	55
Genome-wide NIPT available	Some labs
Mosaicism reported	Some labs
Triploidy detected	No
Testing in twin pregnancies (CATs)	Yes
Zygosity testing	No
Fetal Fraction measured and reported	Yes
Testing at low Fetal Fraction	Some labs



## NIPT - Non Invasive Prenatal Test metodi analitici



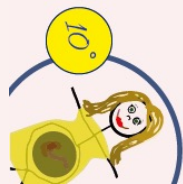
**cffDNA** dalle  
cellule in apoptosi  
del trofoblasto

sistema sensibile  
ma richiede l'ottimizzazione del metodo per  
ogni singolo cromosoma o regione target

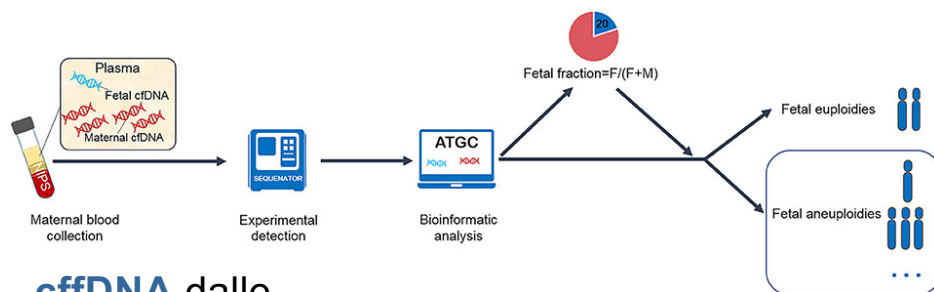
### analisi digitale di regioni selezionate

- tutto il cfDNA (materno e fetale) viene biotinilato e ancorato a biglie magnetiche ricoperte di strepto-avidina
- le **regioni dei cromosomi di interesse vengono amplificate**
- con un magnete si immobilizza il cfDNA di partenza
- i prodotti di amplificazione vengono eluiti e quantificati con:
  - ✓ sequenziamento NGS
  - ✓ tecnologia micro-array

	DANSR
Earliest gestational age for testing (wk)	10
Testing for CATs	Yes
Fetal sex determined	Yes
Testing for SCAs	Yes
Published validation studies	13
Published clinical experience studies	12
Genome-wide NIPT available	No
Mosaicism reported	May be
Triploidy detected	No
Testing in twin pregnancies (CATs)	Yes
Zygoty testing	No
Fetal Fraction measured and reported	Yes
Testing at low Fetal Fraction	No



## NIPT - Non Invasive Prenatal Test metodi analitici



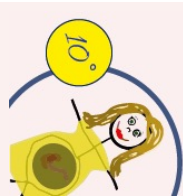
**cffDNA** dalle  
cellule in apoptosi  
del trofoblasto

sistema versatile e sensibile  
anche rispetto alla zigosità  
(triploidie, moli, UPD)  
limite dei target analizzabili

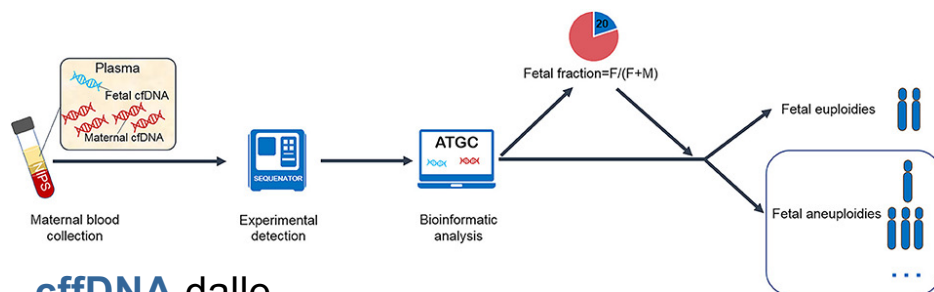
### analisi di **Single Nucleotide Polymorphisms**

- dal cfDNA vengono **amplificate** migliaia di regioni genomiche dei **cromosomi di interesse** contenenti SNPs ad alta eterozigosità
- i prodotti di amplificazione vengono analizzati con:
  - ✓ sequenziamento NGS
  - ✓ tecnologia micro-array
- la componente fetale del cfDNA viene identificata e dosata in base alle differenze alleliche
- implementazioni grazie al *machine-learning*
- algoritmi ad hoc per la bassa FF

	SNP-based
Earliest gestational age for testing (wk)	9
Testing for CATs	Yes
Fetal sex determined	Yes
Testing for SCAs	Yes
Published validation studies	6
Published clinical experience studies	12
Genome-wide NIPT available	No
Mosaicism reported	May be (as "atypical")
Triploidy detected	Yes
Testing in twin pregnancies (CATs)	Yes
Zygoty testing	Yes
Fetal Fraction measured and reported	Yes
Testing at low Fetal Fraction	Yes (separate algorithm)



## NIPT - Non Invasive Prenatal Test metodi analitici



**cffDNA** dalle  
cellule in apoptosi  
del trofoblasto

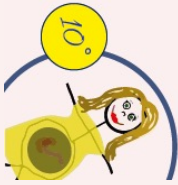
sistema sensibile e semplice  
apparecchiatura dedicata di grandi  
dimensioni (back-up, disaster recovery)  
limitate prospettive di sviluppo

	RCA
Earliest gestational age for testing (wk)	10
Testing for CATs	Yes
Fetal sex determined	Yes
Testing for SCAs	No
Published validation studies	6
Published clinical experience studies	0
Genome-wide NIPT available	No
Mosaicism reported	No
Triploidy detected	No
Testing in twin pregnancies (CATs)	Yes
Zygosity testing	No
Fetal Fraction measured and reported	No
Testing at low Fetal Fraction	Yes

### amplificazione *rolling circle*

- le regioni dei cromosomi di interesse vengono **catturate con sonde** che portano un marcatore fluorescente diverso per ciascun cromosoma
- la sintesi del DNA innescata dalle sonde produce micro-molecole con segnale fluorescente
- i prodotti vengono quantificati in base alla fluorescenza emessa



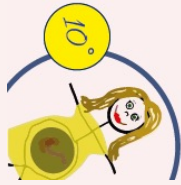


## NIPT - Non Invasive Prenatal Test trisomie 21, 18, 13 (CATs)

Authors and Year	Subject	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive Value	False Positives
Norton ME et al., 2015 [93]	15,841 pregnant women that underwent standard screening of nuchal translucency measurement with biochemical tests and NIPT to detect T21, T18, and T13	T13: 100% T18: 90% T21: 100%	T13: 100% T18: 100% T21: 99.9%	T13: 50% T18: 90% T21: 80.9%	T13: 2 out of 15,841 pregnancies T18: 1 out of 15,841 pregnancies T21: 9 out of 15,841 pregnancies
Gil MM et al., 2015 [89]	Meta-analysis of 37 studies comparing traditional screening methods with NIPT ~ 22,690	Singleton pregnancies T13: 90.3% T18: 91.0% T21: 96.3% Twin pregnancies T21: 97.3%	Not reported	Not reported	Singleton pregnancies T13: 0.23% T18: 0.13% T21: 0.13% Twin pregnancies T21: 0.23%
Lu W et al., 2020 [92]	36,913 women with singleton pregnancies assigned to NIPT	T13: 100% T18: 100% T21: 100%	T13: 99.95% T18: 99.95% T21: 99.94%	T13: 41.94% T18: 58.70% T21: 84.67%	18 false positives for T13 19 false positives for T18 21 false positives for T21
Dai R et al., 2021 [94]	17,428 pregnant women that underwent NIPT	Not reported	Not reported	PPV of 75% for T13, T18, and T21 T21: 84.38%; T18: 61.54%; T13: 33.33%	2 false positives for T13 5 false positives for T18 5 false positives for T21
Chen Y et al., 2022 [99]	14,574 women with singleton pregnancies and 6471 women with twins that underwent NIPT screening	Sensitivity for T13, T18, and T21 was 100%	Specificity for T13, T18, and T21 was over 99%	T13: 100% T18: 75.00% T21: 93.75%	2 false positives for T13 3 false positives for T18 2 false positives for T21

**alta DR, basso FPR per tutti i metodi  
senza differenze significative  
cause di FP:**

- mosaicismi placentari
- gemelli riassorbiti
- aneuploidie materne (somatiche o germinali)



## NIPT - Non Invasive Prenatal Test trisomie 21, 18, 13 (CATs)

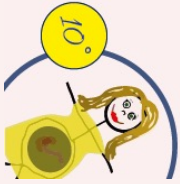
	Validation studies				Clinical experience studies		
	DR	FPR	PPV	Std PPV†	FPR	PPV	Std PPV†
<b>Trisomy 21</b>							
s-MPS	99.7 [99.2, 99.9]	0.12 [0.08-0.17]	97.9 [96.9, 98.5]	70.0 [67.5, 72.6]	0.06 [0.05, 0.06]	97.4 [94.1, 98.9]	91.4 [88.1, 94.7]
DANSR	99.2 [98.0, 99.7]	0.04 [0.02, 0.08]	97.8 [96.2, 98.8]	86.4 [83.4, 89.4]	0.03 [0.01, 0.06]	94.4 [93.0, 95.5]	86.4 [85.6, 87.1]
SNP	99.3 [97.9, 99.8]	0.03 [0.01, 0.06]	98.8 [97.3, 99.5]	91.4 [88.7, 94.0]	0.04 [0.04, 0.05]	97.4 [94.1, 98.9]	91.4 [88.1, 94.7]
<b>Trisomy 18</b>							
s-MPS	95.7 [93.3, 97.2]	0.11 [0.07, 0.16]	94.1 [91.4, 96.0]	42.3 [37.6, 47.0]	0.06 [0.05, 0.06]	75.4 [73.4, 77.2]	49.0 [47.2, 50.9]
DANSR	97.7 [94.1, 99.1]	0.04 [0.02, 0.07]	94.4 [89.9, 96.9]	67.3 [60.4, 74.2]	0.04 [0.02, 0.07]	79.6 [65.5, 88.8]	66.6 [54.8, 78.3]
SNP	98.1 [93.4, 99.5]	0.04 [0.02, 0.07]	93.7 [87.6, 96.9]	69.6 [61.0, 78.2]	0.02 [0.02, 0.02]	91.8 [88.7, 94.0]	80.8 [79.2, 82.4]
<b>Trisomy 13</b>							
s-MPS	96.5 [92.5, 98.4]	0.12 [0.08, 0.17]	85.4 [79.7, 89.7]	17.7 [12.3, 23.0]	0.06 [0.06, 0.06]	43.7 [40.5, 46.9]	22.4 [20.2, 24.7]
DANSR	96.1 [86.8, 98.9]	0.03 [0.01, 0.07]	90.7 [80.1, 96.0]	47.4 [34.1, 60.8]	0.08 [0.05, 0.13]	54.2 [35.1, 72.1]	22.2 [9.0, 35.4]
SNP	100 [94.0, 100]	0.03 [0.01, 0.06]	92.3 [83.2, 96.7]	51.4 [39.2, 63.5]	0.04 [0.04, 0.04]	64.1 [57.0, 70.7]	40.2 [37.6, 42.9]
<b>Monosomy X</b>							
s-MPS	94.6 [88.7, 97.5]	0.60 [0.47, 0.77]	62.5 [55.0, 69.5]	10.8 [6.1, 15.5]	0.16 [0.15, 0.17]	25.9 [23.7, 28.3]	18.7 [16.9, 20.5]
DANSR	100 [94.7, 100]	0.37 [0.20, 0.71]	88.5 [79.5, 93.8]	17.2 [8.8, 25.6]	0.07 [0.06, 0.09]	31.4 [21.8, 43.0]	51.9 [40.9, 62.9]
SNP	90.9 [72.2, 97.5]	0.05 [0, 0.28]	95.2 [77.3, 99.7]	58.8 [37.7, 79.8]	0.04 [0.04, 0.05]	74.7 [67.6, 80.1]	50.7 [48.6, 52.8]

RCA Study	Trisomy 21		Trisomy 18		Trisomy 13	
	DR	FPR	DR	FPR	DR	FPR
Dahl et al <sup>31</sup>	30/30	0/256	—	—	—	—
Ericsson et al <sup>32</sup>	112/112	0/1083	32/36	5/1159	10/10	1/1185
Pooh et al <sup>42*</sup>	56/57	4/1119	44/44	6/1132	12/12	0/1164
Gormus et al <sup>43†</sup>	10/10	2/829	3/3	4/837	1/1	2/839
Pavenello et al <sup>44‡</sup>	44/44	1/714	24/25	6/733	2/3	2/755
Palomaki et al <sup>45§</sup>	84/85	5/2255	28/29	16/2311	5/8	4/2332
Total	336/338	12/6256	150/156	37/6172	30/34	9/6275
Pooled Rate %	99.4	0.19	96.2	0.60	88.2	0.14
[95% CI]	[97.9-99.9]	[0.10-0.33]	[91.8-98.6]	[0.41-0.79]	[72.6-96.7]	[0.05-0.24]
Modeled Rate % ¶	99.5	0.16	96.2	0.59	89.5	0.13
[95% CI]	[98.2-100]	[0.03-0.37]	[89.0-99.6]	[0.26-1.12]	[61.0-99.8]	[0.02-0.35]

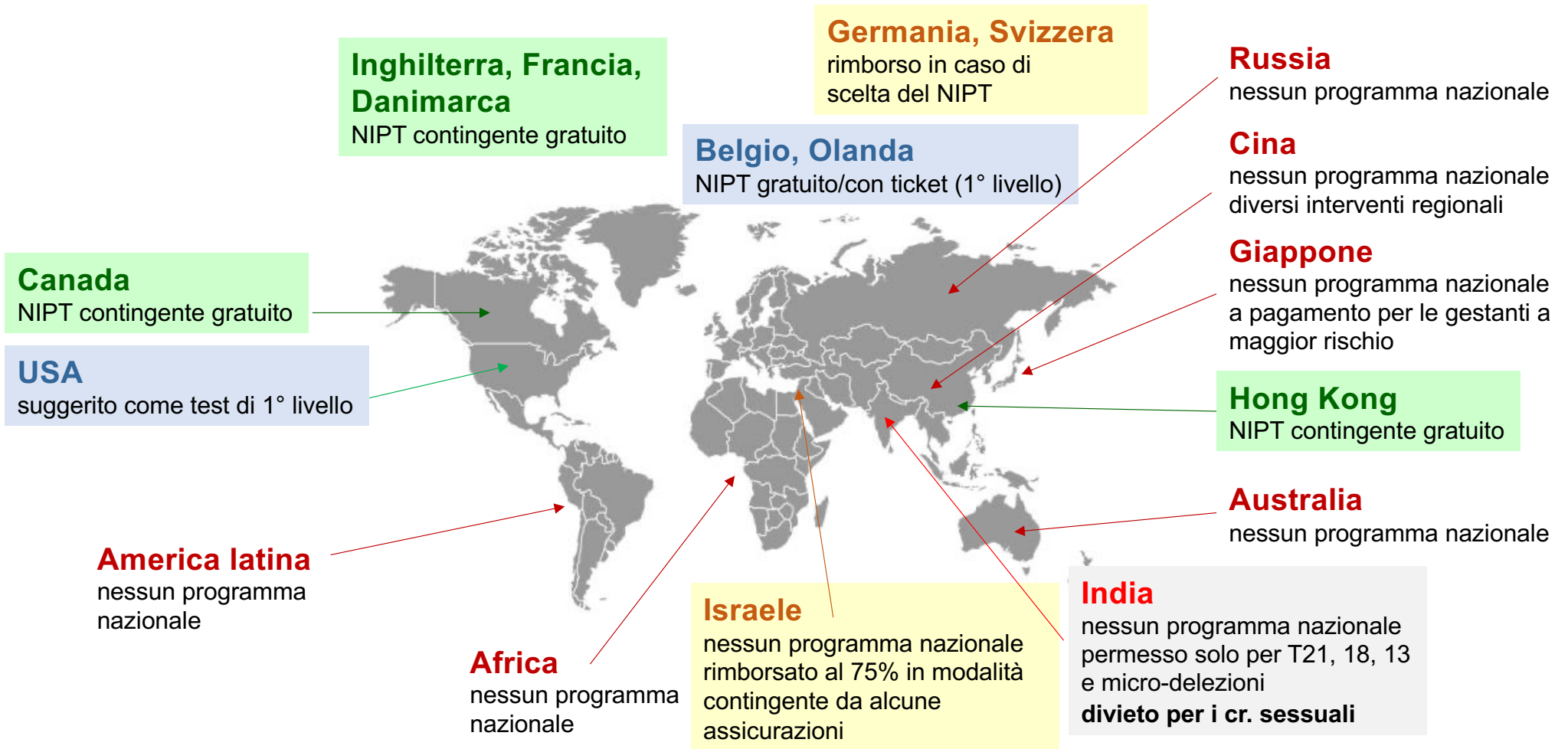
**alta DR, basso FPR per tutti i metodi  
senza differenze significative  
cause di FP:**

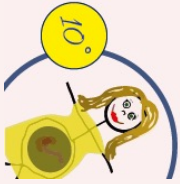
- mosaicismi placentari
- gemelli riassorbiti
- aneuploidie materne (somatiche o germinali)

Demko Z et al., *J Clin Med.*, 2022 - Benn P. et al. *Clin Obstet Gynecol.*, 2023



# NIPT - *Non Invasive Prenatal Test* nel mondo





## NIPT - Non Invasive Prenatal Test modelli di utilizzo: contingente

### Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test

M. M. GIL\*, R. REVELLO\*, L. C. POON\*, R. AKOLEKAR\*† and K. H. NICOLAIDES\*

**Ultrasound Obstet Gynecol (2016)**

### Contingent first-trimester screening for aneuploidies with cell-free DNA in a Danish clinical setting

C. B. MILTOFT<sup>1,2</sup>✉, L. RODE<sup>3</sup>, C. K. EKELUND<sup>1</sup>, K. SUNDBERG<sup>1</sup>, S. KJÆRGAARD<sup>4</sup>, H. ZINGENBERG<sup>5</sup> and A. TABOR<sup>1,2</sup>

**Ultrasound Obstet Gynecol (2018)**

### Trial by Dutch laboratories for evaluation of non-invasive prenatal testing. Part I—clinical impact

Dick Oepkes<sup>1</sup>, G. C. (Lieve) Page-Christiaens<sup>2</sup>, Caroline J. Bax<sup>3</sup>, Mireille N. Bekker<sup>2,4</sup>, Catia M. Bilardo<sup>5</sup>, Elles M. J. Boon<sup>6</sup>, G. Heleen Schuring-Blom<sup>7</sup>, Audrey B. C. Coumans<sup>8</sup>, Brigitte H. Faas<sup>9</sup>, Robert-Jan H. Galjaard<sup>10</sup>, Attie T. Go<sup>11</sup>, Lidewij Henneman<sup>12</sup>, Meryn V. E. Macville<sup>13</sup>, Eva Pajkrt<sup>14</sup>, Ron F. Suijkerbuijk<sup>15</sup>, Karin Huijsdens-van Amsterdam<sup>16</sup>, Diane Van Opstal<sup>10</sup>, E. J. (Joanne) Verweij<sup>1</sup>, Marjan M. Weiss<sup>12</sup>, Erik A. Sistermans<sup>12\*</sup> and for the Dutch NIPT Consortium

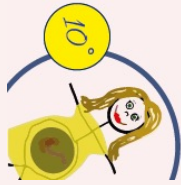
**Prenatal Diagnosis (2016)**

### Clinical application of a contingent screening strategy for trisomies with cell-free DNA: a pilot study

María Ángeles Sánchez-Durán<sup>1,2</sup>, Andrea Bernabeu García<sup>1,2</sup>, Inés Calero<sup>1,2</sup>, Jordi Ramis Fossas<sup>2,3</sup>, Tamara Illescas<sup>1,2</sup>, María Teresa Avilés<sup>1,2</sup>, Nerea Maiz<sup>1,2\*</sup> and Elena Carreras<sup>1,2</sup>

**BMC Pregnancy and Childbirth (2019)**

- **Inghilterra**: CT con R 1:150 – 1.1.000 (2013 – 2015)
- **Danimarca**: CT con R 1:100 – 1.1.000 (2014 - 2015)
- **Olanda** (TRIDENT 1): CT con R  $\geq$  1:200 (2014 - 2017)
- **Spagna**: CT con R 1:11 – 1.1500 (2016 - 2017)



# NIPT - Non Invasive Prenatal Test

## modelli di utilizzo: universale

### Outcome of publicly funded nationwide first-tier noninvasive prenatal screening

Kris Van Den Bogaert<sup>1</sup>, Lore Lannoo<sup>2</sup>, Nathalie Brison<sup>1</sup>, Vincent Gatinois<sup>1</sup>, Machteld Baetens<sup>3</sup>, Bettina Blaumeiser<sup>4,5</sup>, François Boemer<sup>6</sup>, Laura Bourlard<sup>7</sup>, Vincent Bours<sup>6</sup>, Anne De Leener<sup>8</sup>, Marjan De Rademaeker<sup>5</sup>, Julie Désir<sup>7,9</sup>, Annelies Dheedene<sup>3</sup>, Armelle Duquenne<sup>8</sup>, Nathalie Fieremans<sup>10</sup>, Annelies Fieuw<sup>10</sup>, Jean-Stéphane Gatot<sup>6</sup>, Bernard Grisart<sup>9</sup>, Katrien Janssens<sup>4</sup>, Sandra Janssens<sup>3</sup>, Damien Lederer<sup>9</sup>, Axel Marichal<sup>9</sup>, Björn Menten<sup>3</sup>, Colombine Meunier<sup>9</sup>, Leonor Palmeira<sup>6</sup>, Bruno Pichon<sup>7</sup>, Eva Sammels<sup>10</sup>, Guillaume Smits<sup>7</sup>, Yves Sznajder<sup>8</sup>, Elise Vantroy<sup>10</sup>, Koenraad Devriendt<sup>1</sup> and Joris Robert Vermeesch<sup>1,8</sup>



Belgio

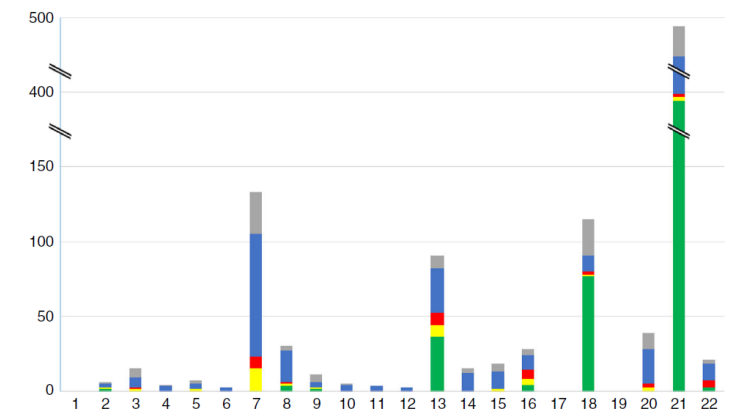
Genetics in Medicine (2021)

### Noninvasive prenatal screening (NIPS) by sequence analysis of cfDNA

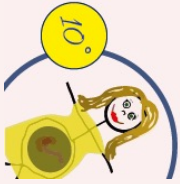
**153.575 genome-wide NIP tests (2017-2019): 78,7% di adesione CATs, RATs (0,23%), CNVs (0,07%), no SCAs**

- no call: 0,7%
- riduzione delle DPI del 52%
- riduzione dei nati T21 (da 0,07% a 0,04%)

	Incidence %	Sensitivity		Specificity		PPV	
		%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI
Trisomy 21	0.32	98.91	97.24–99.58	99.98	99.97–99.99	92.39	89.34–94.61
Trisomy 18	0.07	97.47	91.23–99.30	99.99	99.98–99.99	84.62	75.82–90.61
Trisomy 13	0.06	100.00	90.36–100.00	99.97	99.96–99.98	43.90	33.67–54.68



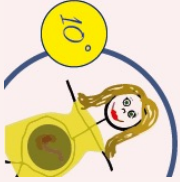
fetali (verde), CPM (giallo), neg (rosso CVS-LA /blu LA)



## NIPT - *Non Invasive Prenatal Test* cromosomi sessuali (SCAs)

### umentato rischio per:

- **45,X**      **1:2.500**, interruzione spontanea nel 99%, **sindrome di Turner**
  - aumento NT, bassa statura, disgenesia gonadica con infertilità
  - malformazioni cardiache e viscerali (rene a ferro di cavallo, doppio distretto ureterale)
  - aumento del rischio di disturbi dell'apprendimento (discalculia), del linguaggio, deficit di attenzione e problematiche del comportamento (30-40%)
  
- **47,XXY**      **1:700**, manifestazioni cliniche della **sindrome di Klinefelter** nel 10-15%
  - normale sviluppo puberale, ipogonadismo, ridotto volume testicolare, infertilità (PMA)
  - statura superiore al target
  - aumento del rischio di ritardo nell'acquisizione del linguaggio (40%) e, in misura inferiore, nell'apprendimento e difficoltà relazionali
  
- **47,XYY**      **1:1.000**, assenza di manifestazioni fenotipiche caratteristiche
  - statura superiore al target
  - aumento del rischio di ritardo nello sviluppo motorio, ritardo nel linguaggio (70%), disturbi del comportamento e difficoltà relazionali (20%)
  
- **47,XXX**      **1:1.000**, assenza di manifestazioni fenotipiche caratteristiche
  - statura superiore di qualche cm al target (armonica)
  - normale fertilità, possibili irregolarità mestruali e menopausa precoce
  - aumento del rischio di ritardo nell'apprendimento e difficoltà relazionali (30%)
  - aumento del rischio riproduttivo per 47,XXX e 47,XXY



## NIPT - *Non Invasive Prenatal Test* cromosomi sessuali (SCAs)

### aumentato rischio per:

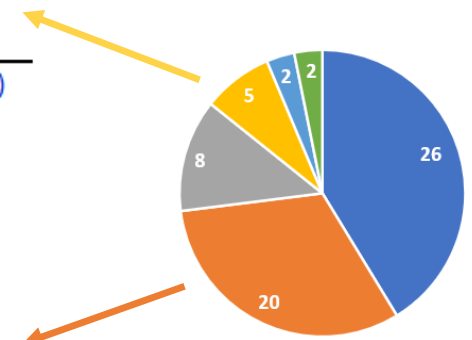
- ✓ 45,X
- ✓ 47,XXY
- ✓ 47,XYY
- ✓ 47,XXX
- condizioni per le quali le *policy* nazionali e le considerazioni sono molto eterogenee
- **contenuto della CGPN complesso**
- **tasso maggiore di FP** (metodi diversi da *SNPs-based*)
  - test diagnostico:**
    - QF-PCR
    - FISH su nuclei in interfase
    - cariotipo fetale
- **rischio di discordanza rispetto all'ecografia**
  - 0,007%**
    - 34% { - scambio di campioni
    - errata valutazione ecografica
    - errori di trascrizione
  - 36% { - anomalie cromosomiche
  - difetti del differenziamento sessuale

### NIPT 46,XY: sesso ecografico F

ripetizione NIPT: 2 casi 46,XX

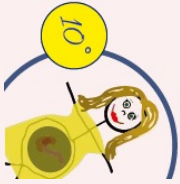
cariotipo fetale: 2 casi 46,XX

gravidanza gemellare: 1 caso (M e F)



	tot.	VP	FP	nn
45,X	6	1	4	1
47,XXY	5	4	1	
47,XYY	5	2	1	2
47,XXX	4	3		1
	20	10	6	4

- NIPT aneuploidie rare
- NIPT aneuploidie cr. sessuali
- NIPT varianti puntiformi
- discordanza sesso ecografico NIPT
- cromosomi sessuali non conclusivi

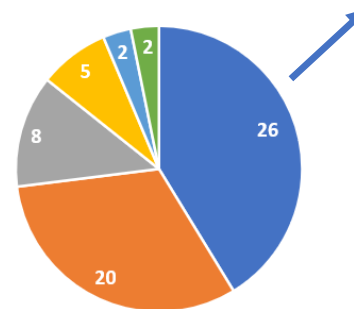


## NIPT - Non Invasive Prenatal Test altre aneuploidie, delezioni, duplicazioni

**0,36% delle gw-NIPT**

- aneuploidie dei restanti autosomi
- delezioni / duplicazioni > 7 Mb
- pannelli di micro-delezioni
  - ✓ 1p36 (disabilità intellettiva sindromica)
  - ✓ 2q37 (disabilità intellettiva sindromica)
  - ✓ 22q11.2 (Di George/VCF)
  - ✓ 15q11.2 (Prader-Willi/Angelman)
  - ✓ 4p16.3 (Wolf-Hirschhorn)
  - ✓ 5p15.3 (Cri du Chat)
  - ✓ 11q24-24.3 (Jacobsen)
  - ✓ 8q24.11-24.13 (Langer-Giedion)
  - ✓ 17p11.2 (Smith-Magenis)

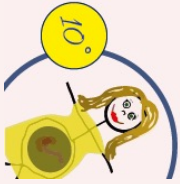
	tot.	VP	FP	nn
trisomie altri cromosomi	12	1	9	2
del / dup > 7 Mb	14	3	11	
	26	4	20	2



- NIPT aneuploidie rare
- NIPT aneuploidie cr. sessuali
- NIPT varianti puntiformi
- discordanza sesso ecografico NIPT
- cromosomi sessuali non conclusivi

**2 casi di pPROM**  
(cariotipo / arrayCGH neg.)





# NIPT - Non Invasive Prenatal Test

## NIPT genome wide

Clinical impact of additional findings detected by genome-wide non-invasive prenatal testing: Follow-up results of the TRIDENT-2 study

Am J Hum Genet. (2022)



Olanda dal 2017

- **gw-NIPT** come test di 1° livello (12 sett., ticket di € 175): **149.318 (adesione del 43,2%)**
- **opzione gw** (tutti i cromosomi, del/dup > 10-15 MB): **74,2%**
- **opzione T21, T18, T13: 35,8%**
- **no SCA**

### anomalie fetali patogenetiche

- 8 trisomie a mosaico
- 1 UPD 15
- 52 delezioni / duplicazioni

**0,49%**

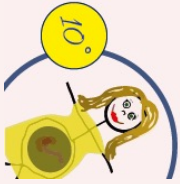
**0,36%**

Chromosomal aberration	Abnormal cases NIPT (N)	Pregnancies screened (N)	Abnormal cases/ 10,000 GW-NIPT (N) <sup>a</sup>	PPV/ Known origin <sup>b</sup> (%)	Confirmed cases/ 10,000 GW-NIPT (N)
Trisomy 21	503	149,318	34	96	33
Trisomy 18	118	149,318	8	98	8
Trisomy 13	109	149,318	7	53	4
<u>Additional finding</u>	402	110,739	36	89	32
Fetal pathogenic					5
Fetal VUS/benign					2
Confined placental mosaicism					17
Maternal malignancy					1
Maternal acquired (no malignancy)					2
Maternal constitutional pathogenic					3
Maternal VUS/benign					2

**0,0005%**

**0,0017%**

**0,0003%**



## NIPT - Non Invasive Prenatal Test trisomie rare (RATs)

- possono avere un'origine **meiotica** (cr. 14, 15, 16, 22) o **mitotica** (cr. 2, 7, 8)
- non sono compatibili con lo sviluppo fetale: **aborti spontanei**

➔ **frequenza:** 32% D3 (embrioblasti), 11% D5 (trofoblasto), 22% aborti precoci, 0,4% CVS, 0,3% NIPT

- mosaici placentari:** rischio di **complicanze della gravidanza** (es. T16)
- trisomia fetale a mosaico:** rischio in base al tipo di CPM

- ✓ CPM del citotrofoblasto (tipo I): **R 4%**
- ✓ CPM del mesenchima (tipo II): **R 12%**
- ✓ CPM di entrambe le componenti (tipo III): **R 35%**

- il **test diagnostico su LA** non da informazioni su CPM

➔ **stima generica dei rischi**

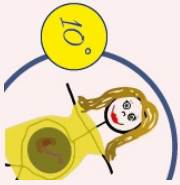
- disomia uniparentale** per *rescue* della trisomia

- ✓ UPD materne: 7, 11, 14, 15, 20
- ✓ UPD paterne: 6, 11, 14, 15, 20

➔ **comporta la verifica della genitorialità biologica**

Adverse outcome	Prevalence rate		Relative risk	
	RATs with assumed CPM	Unaffected	All	Excluding Trisomy 16
Pre-eclampsia	16/189 (8.5%)*	754/159,924 (0.5%)	18.5	12.7
Pre-term birth	22/177 (12.4%)†	8,784/150,471 (5.8%)	2.2	1.8
Birth weight <2.3rd centile	24/177 (13.6%)‡	3,892/155,491 (2.5%)	5.5	3.5
Birth weight 2.3rd -10th centile	23/177 (13.0%)§	11,500/155,491 (7.4%)	1.8	1.6
Induction of labor	54/177 (30.5%)	34,756/150,471 (23.1%)	1.3	1.1
Planned C-section	22/177 (12.4%)¶	11,713/150,471 (7.8%)	1.6	1.5
NICU admission	11/177 (6.2%)#	4,879/157,391 (3.1%)	2.1	1.6

*van Prooyen Schuurman L et al., Genetics 2022*  
*Benn P et al., Clin Obstet Gynecol., 2023*



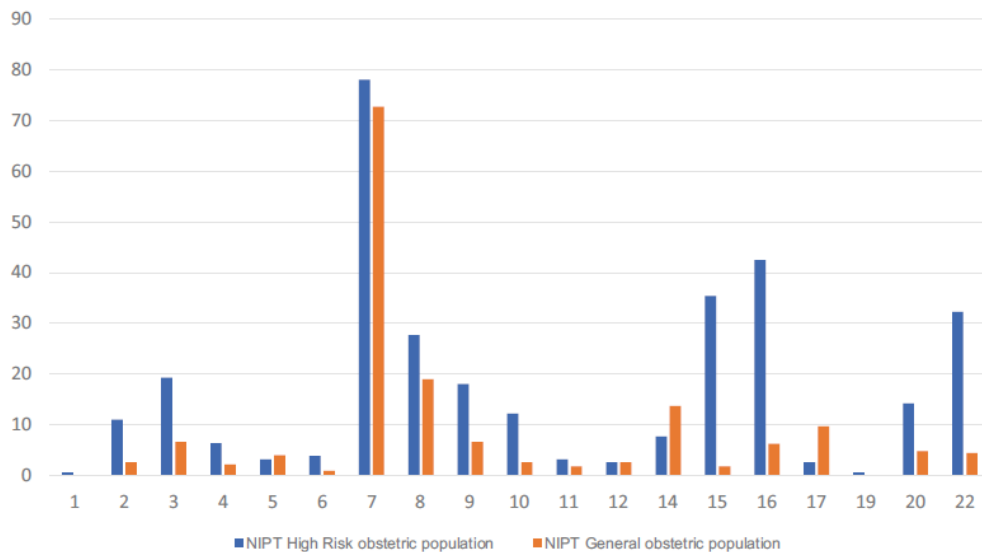
# NIPT - Non Invasive Prenatal Test aneuploidie rare (RATs)

REVIEW ARTICLE

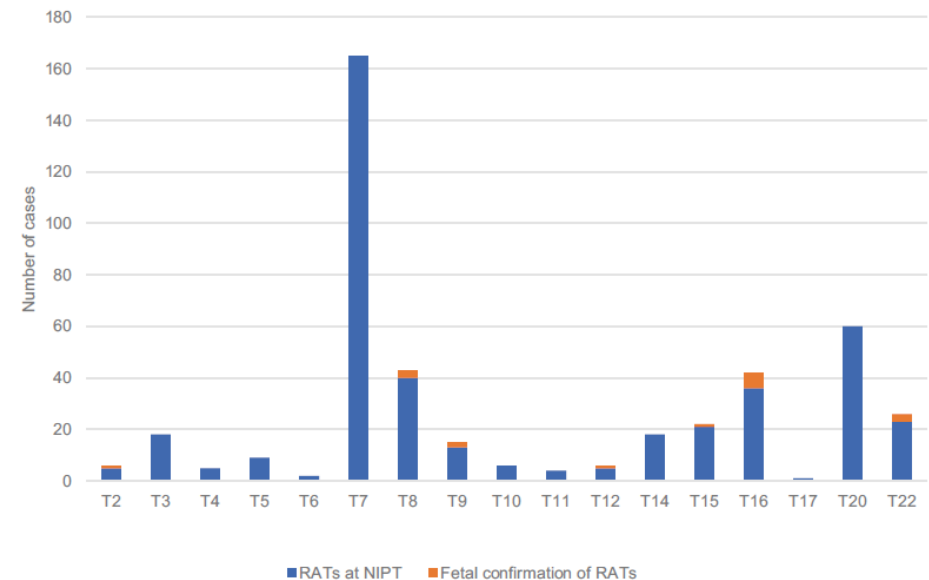
European Journal of Human Genetics (2022)

## Rare autosomal trisomies detected by non-invasive prenatal testing: an overview of current knowledge

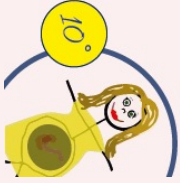
Lore Lannoo<sup>1</sup>, Khaila van Straaten<sup>2</sup>, Jeroen Breckpot<sup>3</sup>, Nathalie Brison<sup>3</sup>, Luc De Catte<sup>1</sup>, Eftychia Dimitriadou<sup>3</sup>, Eric Legius<sup>3</sup>, Hilde Peeters<sup>3</sup>, Ilse Parijs<sup>3</sup>, Olga Tsuiiko<sup>3</sup>, Leen Vancoillie<sup>3</sup>, Joris Robert Vermeesch<sup>3</sup>, Griet Van Buggenhout<sup>3</sup>, Kris Van Den Bogaert<sup>3</sup>, Kristel Van Calsteren<sup>1</sup> and Koenraad Devriendt<sup>1,3</sup>



frequenza dei RATs / 100.000 NIPT



n° NIPT positivi per RATs e conferme nel feto



## NIPT - *Non Invasive Prenatal Test* delezioni, duplicazioni, sindromi da MM

- **delezioni / duplicazioni > 7 Mb**

- **pannelli di micro-delezioni**

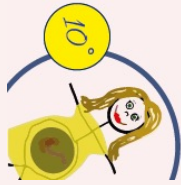
- ✓ 1p36 (disabilità intellettiva sindromica)
- ✓ 2q37 (disabilità intellettiva sindromica)
- ✓ 22q11.2 (Di George/VCF)
- ✓ 15q11.2 (Prader-Willi/Angelman)
- ✓ 4p16.3 (Wolf-Hirschhorn)
- ✓ 5p15.3 (Cri du Chat)
- ✓ 11q24-24.3 (Jacobsen)
- ✓ 8q24.11-24.13 (Langer-Giedion)
- ✓ 17p11.2 (Smith-Magenis)

- **e pannelli più ampi**

date le **dimensioni < 3 Mb** , rappresentano una "**applicazione estrema**" del metodo analitico che richiede:

- maggiore profondità di sequenziamento
- adeguata frazione fetale
- studi di validazione e clinici

data la **rarietà**, il test ha un **basso VPP**



## NIPT - Non Invasive Prenatal Test delezioni, duplicazioni, sindromi da MM

### NIPT-plus: s-MPS nel II° trimestre con maggiore profondità di sequenziamento

Chen Y et al., Am J Med Genet., 2022

	NIPT-plusa positive, n	True positive (karyotyping and SNPb array)			Pregnancy outcomes, n (%)		
		n (%)	Type	n	Termination	Live birth	
MMS <sup>e</sup>	72	30 (41.7)	CNVs <sup>f</sup> <5 Mb	15%	20	3 (15)	17 (85)
			CNVs 5–10 Mb	25%	8	2 (25)	6 (75)
			CNVs >10 Mb	50%	2	1 (50)	1 (50)

**39.580 casi**  
Shanghai, China

LI C. et al. Mol Diagn Ther., 2023

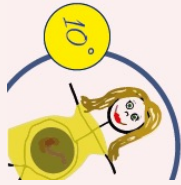
Abnormality	NIPT-Plus positive	Prenatal diagnosis	TP	FP/FPR	PPV	Sensitivity (95% CI)	TN	FN/FNR	NPV	Specificity (95% CI)
MMS	52	42	16	26/0.364%	38.10%	100% (23.99–54.35)	7112	0/0%	100%	99.636% (99.933–100)
DGS	6	5	3	2/0.028%	60%	100% (17.04–92.74)	7158	0/0%	100%	99.972% (99.933–100)
CDC	4	4	1	3/0.042%	25%	100% (1.32–78.06)	7160	0/0%	100%	99.958% (99.933–100)
22q11.2 microduplication	3	2	2	0/0%	100%	100% (19.79–100)	7161	0/0%	100%	100% (99.933–100)
< 5 Mb CNVs	11	10	2	8/0.11%	20%	100% (3.54–55.78)	7153	0/0%	100%	99.888% (99.933–100)
5–10 Mb CNVs	14	9	3	6/0.08%	33.33%	100% (9.04–69.08)	7150	0/0%	100%	99.916% (99.933–100)
> 10 Mb CNVs	14	12	5	7/0.098%	41.67%	100% (16.50–71.40)	7150	0/0%	100%	99.902% (99.933–100)

**7.177 casi**  
Shaanxi, China

Zou Y et al. Front Genet., 2023

Chromosome abnormalities	TP	FP	PPV	Sensitivity (95% CI)	TN	FN	NPV (%)	Specificity (95% CI)
CNVs	15	14	51.72	100% (74.65%–100%)	22,898	0	100	99.94% (99.89%–99.97%)
<10Mb	8	8	50.00	100% (59.77%–100%)	22,911	0	100	99.86% (99.93%–99.98%)
≥10Mb	7	6	53.85	100% (56.09%–100%)	22,914	0	100	99.97% (99.94%–99.99%)

**23.116 casi**  
Jiangxi, China



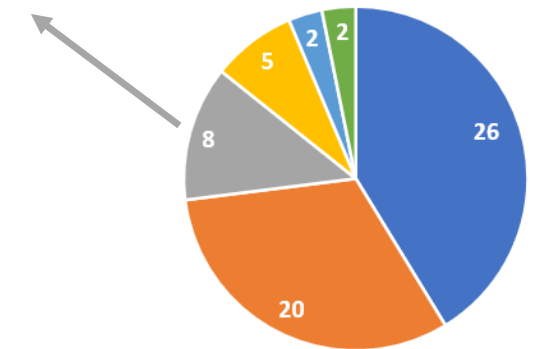
# NIPT - Non Invasive Prenatal Test varianti puntiformi

## sequenziamento massivo parallelo (NGS) di pannelli multi-gene

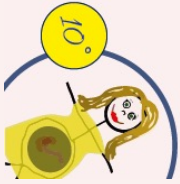
<b>recessive con alta freq. dei portatori</b>		<b>spettro Noonan (<i>de novo</i>)</b>	
Fibrosi Cistica	CFTR	Sindrome Cardio facio cutanea (CFS) tipo 1	BRAF
Sordità ereditaria tipo 1A	CX26 (GJB2)	Sindrome di Noonan - simile	CBL
Sordità ereditaria tipo 1B	CX30 (GJB6)	Sindrome di Noonan /cancers	KRAS
Beta Talassemia	HBB	Sindrome Cardio facio cutanea (CFS) tipo 4	MAP2K2
Anemia falciforme	HBB	Sindrome di Noonan 6/cancers	NRAS
Fenilchetonuria	PAH	Sindrome di Noonan 1/Sindrome di LEOPARD/cancers	PTPN11
		Sindrome Cardio facio cutanea (CFS) tipo e 3	MAP2K1
		Leucemia mielomonocitica giovanile (JMML)	PTPN11
		Sindrome di Noonan 8	RIT1
		Sindrome Noonan - simile	SHOC2
		Sindrome di Noonan 4	SOS11
<b>recessive rare o dominanti <i>de novo</i></b>		<b>displasie scheletriche</b>	
Sindrome di Gaucher	GBA	Sindrome di Ehlers - Danlos,	COL1A1
Sindrome Dubowitz	LIG4-NSUN2	Osteogenesi imperfetta	COL1A2
Sindrome di Richner-Hanhart	TAT	Acondrogenosi tipo 2	COL2A1
Sindrome di Sjögren-Larsson	ALDH3A2		
Sindrome di Costello	HRAS	Sindrome di Antley - Bixler	
Sindrome di Tay-Sachs	HEXA	Sindrome di Apert	
Sindrome di PKAN	PANK2	Sindrome di Crouzon	FGFR2
Sindrome della Tripla-H	SLC25A15	Sindromedi Jackson - Weiss	
Sindrome di Coffin-Lowry	RPS6KA3	Sindrome di Pfeiffer	
Sindrome di Alagille	JAG1		
Sindrome di CHARGE	CHD7	Acondroplasia	
Sindrome di Cornelia de Lange tipo 5 HDAC8		Sindrome CATSHL	
Sindrome di Cornelia de Lange tipo 1 NIPBL		Sindrome di Crouzon con acanthosis nigricans	FGFR3
Sindrome di Rett	MECP2	Ipocondroplasia	
Sindrome di Sotos tipo1	NSD1	Sindrome di Muenke	
Sindrome di Bohring - Opitz	ASXL1	Displasia tanatafora, tipo I	
Sindrome di Schinzel - Giedion	SETBP1	Displasia tanatafora, tipo II	
Oloprosencefalia	SIX3		
Niemann-Pick	SMPD1		

### nessun risultato utile per il feto

- 1: *de novo* non confermata
- 5: madre portatrice sana
- 2: padre portatore sano



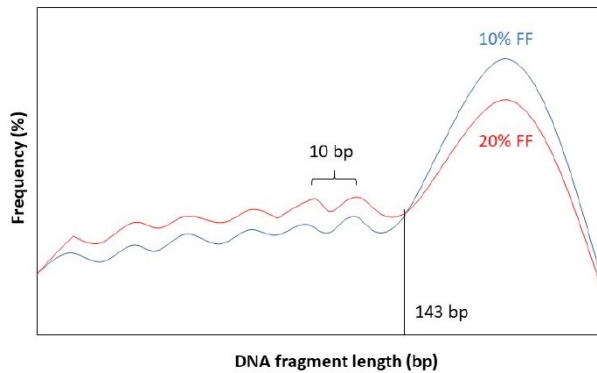
- NIPT aneuploidie rare
- NIPT aneuploidie cr. sessuali
- NIPT varianti puntiformi
- discordanza sesso ecografico NIPT
- cromosomi sessuali non conclusivi



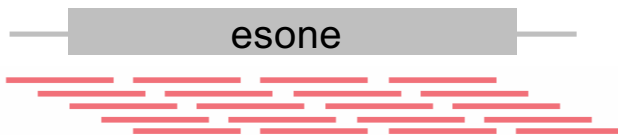
# NIPT - Non Invasive Prenatal Test varianti puntiformi

## principali criticità del sequenziamento del cfDNA

### frammentazione del DNA

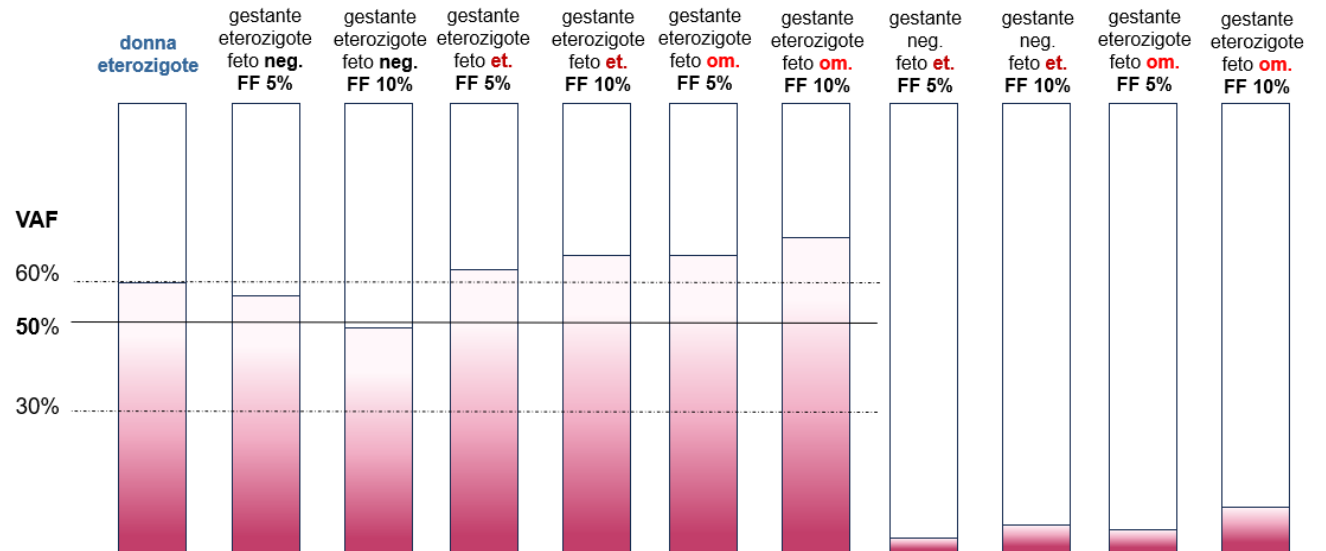


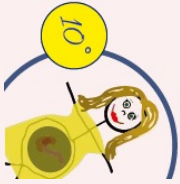
**copertura sufficiente** della regione codificante dei geni di interesse



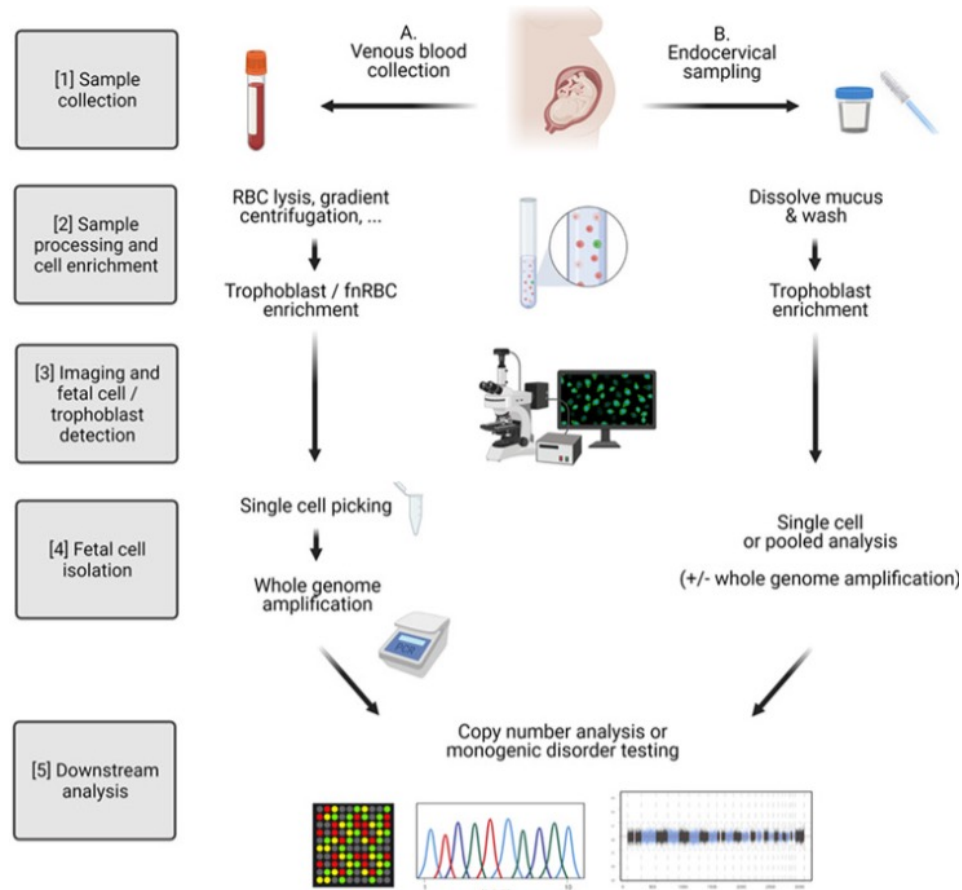
### rappresentazione della variante (VAF)

- di poco superiore all'atteso in caso di madre eterozigote
- di **1,5-6%** per F eterozigote, **5-10%** per F omozigote





# NIPT - *Non Invasive Prenatal Test* cosa ci aspetta



## sviluppo delle tecniche di arricchimento di cellule fetali circolanti / vaginali

- cellule del trofoblasto
- globuli rossi nucleati

**grazie per l'attenzione !**