

Informativa per il test GeneSAFE®

Che cos'è GeneSAFE®

GeneSAFE® è un test di **screening non invasivo** che ha come finalità la valutazione del rischio che il feto sia affetto da alcune **patologie monogeniche**. Il test **non è diagnostico**: non fornisce una certezza assoluta, ma indica la possibilità che il feto presenti determinate condizioni genetiche.

L'esame viene eseguito a partire dalla **10ª settimana di gravidanza** mediante un **prelievo di sangue materno**, dal quale si analizzano piccoli frammenti di DNA libero circolante (cell-free DNA, cfDNA), derivati dalla placenta e dal feto attraverso la placenta. Il test non comporta rischi diretti per la madre o per il feto.

In alcuni casi, per una corretta interpretazione del risultato, potrà essere necessario eseguire **accertamenti** ulteriori su un **campione biologico paterno**. È pertanto **raccomandato** che tale campione sia reso disponibile **contestualmente al prelievo di sangue materno** per l'analisi **GeneSAFE®**. Nel caso di gravidanza ottenuta mediante **fecondazione eterologa**, potrà inoltre rendersi necessario acquisire **documentazione relativa a eventuali test genetici** eseguiti sui donatori, che potrà essere richiesta contestualmente al prelievo materno o in una fase successiva.

A chi è rivolto GeneSAFE® e quando eseguirlo

GeneSAFE® può essere eseguito a partire dalla 10ª settimana di gravidanza in:

- gravidanze singole, sia spontanee sia ottenute mediante tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA);
- gravidanze gemellari bicoriali e monocoriali.

Il test **non è validato** per gravidanze nelle quali è stata riscontrata ecograficamente la presenza di più di due placente.

GeneSAFE® è un test di screening e dovrebbe essere proposto in **gravidanza a basso rischio** per patologia genetica; tuttavia, può essere considerato come primo approccio non invasivo quando:

- nella famiglia sono note malattie genetiche o varianti già identificate in parenti;
- in gravidanza ci sono segnali clinici/ecografici che fanno pensare a una condizione genetica tra quelle indagate;
- la coppia desidera un approccio non invasivo come primo passo, sapendo che un esito "ad alto rischio" va confermato.

Quali condizioni può identificare GeneSAFE®

GeneSAFE® può identificare diverse tipologie di **patologie monogeniche fetali**, cioè condizioni genetiche causate da alterazioni in un singolo gene.

Tra queste rientrano, da un lato, alcune **malattie ereditarie a trasmissione autosomica recessiva**, nelle quali il rischio per il feto si manifesta quando vengono ereditate **due varianti patogenetiche nello stesso gene**, una da ciascun genitore. In questi casi i genitori possono essere **portatori sani**, cioè non avere manifestazioni cliniche pur essendo portatori di una singola variante.

Dall'altro lato, GeneSAFE® può identificare alcune **malattie genetiche de novo**, dovute a varianti che possono comparire **per la prima volta nel feto al momento del concepimento** e che quindi non sono necessariamente presenti nei genitori. Queste condizioni possono essere associate, ad esempio, a **displasie scheletriche, difetti cardiaci, anomalie congenite multiple e/o deficit dello sviluppo neurologico o cognitivo**. Molte di esse non sono identificabili con gli screening preconcezionali eseguiti sui genitori e alcune possono non essere evidenziabili ecograficamente nel primo trimestre. Alcune di queste condizioni possono inoltre essere associate a **età paterna avanzata**.

Livelli di GeneSAFE® disponibili

GeneSAFE® è disponibile in **tre diversi livelli**, che si differenziano per il tipo di condizioni genetiche investigate:

- **GeneSAFE® Inherited**: indaga alcune **malattie genetiche ereditarie autosomiche recessive** frequenti nella popolazione.
- **GeneSAFE® De Novo**: dedicato ad alcune **malattie genetiche non ereditarie**, dovute a varianti che insorgono **de novo** nel feto.
- **GeneSAFE® Complete**: comprende sia il pannello **Inherited** sia il pannello **De Novo**, offrendo quindi la valutazione più ampia tra i tre livelli del test.

Per ciascun livello del test, i geni analizzati e le relative patologie associate sono riportati nelle tabelle seguenti.

Tabella 1 Geni e patologie analizzate da **GeneSAFE® Inherited**

| Patologie autosomica recessive | |
|--------------------------------|---|
| Gene | Patologie associate |
| CFTR | Fibrosi cistica |
| HBB | Beta-talassemia |
| | Anemia falciforme |
| GJB2 (CX26) | Sordità ereditaria autosomica recessiva tipo 1A |
| GJB6 (CX30) | Sordità ereditaria autosomica recessiva tipo 1B |

Tabella 2 Geni e patologie analizzate da **GeneSAFE® De Novo**: Le condizioni incluse nel pannello **GeneSAFE® De Novo** possono essere raggruppate in grandi categorie cliniche. Nelle tabelle seguenti sono riportati i geni analizzati e le principali patologie associate.

| Gene | Patologia/e associate |
|--|--|
| Spettro Noonan / RASopatie | |
| BRAF | Sindrome cardio-facio-cutanea tipo 1 |
| CBL | Sindrome di Noonan-simile con o senza leucemia mielomonocitica giovanile |
| KRAS | Sindrome di Noonan / cancers |
| MAP2K1 | Sindrome cardio-facio-cutanea tipo 3 |
| MAP2K2 | Sindrome cardio-facio-cutanea tipo 4 |
| NRAS | Sindrome di Noonan 6 |
| PTPN11 | Sindrome di Noonan 1 |
| | Sindrome di LEOPARD |
| RAF1 | Sindrome di Noonan 5 |
| | Sindrome di LEOPARD 2 |
| RIT1 | Sindrome di Noonan 8 |
| SHOC2 | Sindrome Noonan-simile con capelli caduchi in fase anagen |
| SOS1 | Sindrome di Noonan 4 |
| Craniosinostosi e sindromi correlate | |
| FGFR2 | Sindrome di Antley-Bixler senza anomalie genitali o disordini della steroidogenesi |
| | Sindrome di Apert |
| | Sindrome di Crouzon |
| | Sindrome di Jackson-Weiss |
| | Sindrome di Pfeiffer tipo 1, 2 e 3 |
| | Sindrome di Crouzon con acanthosis nigricans |
| FGFR3 | Sindrome di Muenke |
| Patologie scheletriche e del connettivo | |
| COL2A1 | Acondrogenesi tipo 2 |
| FGFR3 | Acondroplasia |
| | Sindrome CATSHL |
| | Ipocondroplasia |
| | Displasia tanatofora tipo I e II |
| COL1A1 | Sindrome di Ehlers-Danlos classica |
| | Sindrome di Ehlers-Danlos tipo VIIA |
| | Osteogenesi imperfetta tipo I, II, III, IV |
| COL1A2 | Sindrome di Ehlers-Danlos forma cardiaco-valvolare |
| | Sindrome di Ehlers-Danlos tipo VIIB |
| | Osteogenesi imperfetta tipo II, III, IV |
| Malattie sindromiche | |
| JAG1 | Sindrome di Alagille |
| CHD7 | Sindrome di CHARGE |
| NIPBL | Sindrome di Cornelia de Lange tipo 1 |
| SMC1A | Sindrome di Cornelia de Lange tipo 2 |
| SMC3 | Sindrome di Cornelia de Lange tipo 3 |
| RAD21 | Sindrome di Cornelia de Lange tipo 4 |
| HDAC8 | Sindrome di Cornelia de Lange tipo 5 |
| MECP2 | Sindrome di Rett |
| SETBP1 | Sindrome di Schinzel-Giedion |
| SIX3 | Oloprosencefalia |

Test eseguibili in associazione a GeneSAFE®

In alcuni casi, **GeneSAFE®** può essere integrato con ulteriori test, allo scopo di ampliare le informazioni ottenibili durante la gravidanza.

PrenatalSAFE® è un test prenatale non invasivo che valuta il rischio di alcune **anomalie cromosomiche fetali**, tra cui le trisomie più comuni, le aneuploidie dei cromosomi sessuali e, nei livelli più estesi, anche alterazioni cromosomiche rare, alterazioni strutturali e microdelezioni. L'associazione di **GeneSAFE®** con **PrenatalSAFE®** consente quindi di ottenere informazioni sia sul rischio di **patologie monogeniche fetali**, sia sul rischio di **anomalie cromosomiche fetali**.

GeneScreen® è invece un test eseguito sui **genitori**, finalizzato a identificare l'eventuale **stato di portatore** per alcune malattie genetiche ereditarie. Non si tratta quindi di un test fetale, ma di un approfondimento utile per definire meglio il **rischio riproduttivo della coppia**.

RhSafe® è un test prenatale non invasivo che consente di determinare il **fattore Rh(D) fetale** mediante analisi del DNA circolante nel sangue materno. È un test opzionale, eseguibile solo in gravidanze con **gestante Rh(D) negativa** e **partner Rh(D) positivo**, ed è utile nella gestione delle gravidanze a rischio di **incompatibilità materno-fetale Rh**.

Per maggiori dettagli sui test integrativi si rimanda alle informative dedicate.

Tabella 3 Pannelli di Prenatalsafe che includono il GeneSafe

| Test | Indagini incluse | | | | | Casi particolari | |
|------------------------------------|------------------|------------|--------------------|-------------------|-----------|---------------------|------------------------|
| | Karyo | Karyo Plus | GeneSAFE® Complete | GeneScreen® Focus | RhSafe* | Gemellare bicoriale | Fecondazione eterologa |
| PrenatalSAFE® Complete | ✓ | X | ✓ | X | Opzionale | ✓ | ✓ |
| PrenatalSAFE® Complete Plus | X | ✓ | ✓ | X | Opzionale | X | ✓ |
| PrenatalSAFE® Full Risk | X | ✓ | ✓ | ✓ | Opzionale | ✓# | X |

* **RhSafe** è eseguibile solo in caso di **gestante Rh(D) negativa** e **partner Rh(D) positivo**. In gravidanza gemellare, un risultato positivo non consente di stabilire se uno o entrambi i feti siano RhD positivi.

PrenatalSAFE® Full Risk nelle gravidanze gemellari bicoriali prevede l'esecuzione dell'analisi **PrenatalSAFE® Karyo** e non dell'analisi **PrenatalSAFE® Karyo Plus**.

Le combinazioni **Complete** e **Complete Plus** sono definite come associazione rispettivamente di **PrenatalSAFE® Karyo + GeneSAFE® Complete** e **PrenatalSAFE® Karyo Plus + GeneSAFE® Complete**. Il pacchetto **Full Risk** comprende invece **PrenatalSAFE® Karyo Plus + GeneSAFE® Complete + GeneScreen® Focus donna + GeneScreen® Focus uomo**.

Quali risultati possono essere ottenuti con GeneSAFE®

GeneSAFE® può mettere in evidenza uno tra i seguenti risultati:

Basso rischio: Il risultato a basso rischio indica che non sono state identificate varianti patogenetiche nei geni analizzati. Un risultato a basso rischio riduce, ma non esclude completamente, la presenza di varianti nei geni analizzati né l'espressione di condizioni associate a tali geni.

Alto Rischio di essere AFFETTO: È stata identificata una variante in un gene autosomico dominante o due o più varianti nei geni autosomico-recessivi indagati ed è quindi presente un **rischio aumentato che si manifesti una patologia** correlata allo specifico gene, in altre parole significa che c'è un'alta probabilità che il feto sia affetto dalla condizione identificata dal test. Un risultato ad alto rischio **deve essere seguito da un test diagnostico**. Durante la gravidanza, questo è generalmente rappresentato da due analisi invasive che si eseguono in momenti diversi della gravidanza: **villocentesi** (11^a–13^a settimana) o **amniocentesi** (16^a–18^a settimana). Dopo la conclusione della gravidanza il test diagnostico viene generalmente eseguito su un campione ematico o altro campione (es. tampone buccale) sul neonato. Il percorso diagnostico più appropriato dovrà sempre essere discusso in consulenza genetica e/o con lo specialista in diagnosi prenatale alla luce del risultato ottenuto da GeneSAFE®.

Alta probabilità di essere PORTATORE: È stata identificata la presenza di una variante in un gene a trasmissione autosomico recessiva. Tale risultato indica che il feto ha una probabilità elevata di essere **portatore di una condizione autosomico-recessiva** e non indica un aumentato rischio di espressione della condizione. In caso di alta probabilità di essere portatore, sarà opportuno discutere il risultato in consulenza genetica per valutare il follow-up opportuno ed il rischio riproduttivo futuro (incluso l'eventuale screening del portatore nei genitori biologici).

Non conclusivo: il test non ha fornito un risultato interpretabile. Le cause più frequenti possono includere una **frazione fetale insufficiente**, una **copertura di sequenziamento inadeguata** o la presenza di **artefatti/rumore nelle regioni analizzate**.

- Se il risultato inconclusivo si verifica al **primo prelievo**, viene generalmente richiesto di ripetere l'analisi su un secondo campione di sangue.
- Se il risultato rimane **non conclusivo anche al secondo prelievo**, il test non viene ulteriormente ripetuto: in questi casi è indicata una **consulenza genetica** per discutere l'iter diagnostico prenatale più appropriato ed eventualmente le possibili opzioni di diagnosi prenatale invasiva.

Non conclusivo parziale: Raramente il test può risultare non conclusivo parziale: il test non ha fornito un risultato interpretabile in una o più specifiche regioni tra quelle indagate. Le restanti regioni indagate avranno prodotto uno degli esiti elencati sopra.

Qualora, ai fini dell'interpretazione del risultato, si rendano necessari **accertamenti aggiuntivi su campione biologico paterno**, questi verranno eseguiti dal laboratorio **esclusivamente come supporto all'analisi GeneSAFE®** e non costituiscono una prestazione diagnostica autonoma. **Non è prevista una refertazione separata** e i risultati ottenuti saranno utilizzati unicamente per la definizione del referto GeneSAFE®.

Metodo di analisi e performance di GeneSAFE®

GeneSAFE® è un test su DNA circolante (cfDNA) eseguito mediante Next- Generation Sequencing ad alta profondità su piattaforma Ion S5™ con pannello mirato ad alta profondità. A seconda del livello di indagine scelto il pannello è mirato all'analisi dei geni presenti in tabella 1 e 2 limitatamente a specifiche regioni genomiche disponibili su richiesta. La copertura media è elevata ($\geq 2000X$) con circa il 90% del target con copertura $\geq 500X$. Sono refertate esclusivamente varianti patogenetiche o probabilmente patogenetiche (Classe IV e V) secondo gli standard ACMG/AMP.

GeneSAFE® ha mostrato un'attendibilità $>99\%$ nel rilevare varianti con significato patologico nei geni investigati, con falsi positivi e falsi negativi $<1\%$. Come per tutti i test su cfDNA, il risultato è probabilistico e va interpretato nel contesto clinico: in caso di esito ad alto rischio è sempre indicata la conferma diagnostica (amniocentesi o villocentesi) prima di qualunque decisione.

Limiti di GeneSAFE®

GeneSAFE® è un **test di screening** e non un **test diagnostico**: i risultati indicano un **rischio**, non una certezza assoluta. Un risultato a **Basso rischio** riduce in modo significativo la probabilità che il feto presenti una delle condizioni genetiche investigate, ma **non esclude completamente**. Analogamente, un risultato **Alto Rischio di essere AFFETTO** o **Alta probabilità di essere PORTATORE** non costituisce una diagnosi e deve sempre essere interpretato nel contesto clinico e, quando indicato, confermato mediante **test diagnostico**.

GeneSAFE® è destinato a fornire informazioni **esclusivamente** sui **geni** inclusi nel livello di analisi scelto, limitatamente alle regioni analizzate e relativamente alle patologie esplicitamente riportate in tabella. Il test non rileva malattie genetiche diverse da quelle comprese nel pannello selezionato e non è in grado di evidenziare tutte le possibili alterazioni genetiche dei geni inclusi nell'analisi. In particolare, non rileva varianti localizzate nelle regioni introniche oltre ± 5 nucleotidi dai confini esone-introne, né delezioni, inversioni o duplicazioni di dimensioni superiori a 20 bp, né mosaicismi. Inoltre, alcune regioni del DNA possono non essere analizzabili o avere una copertura insufficiente per garantire un'interpretazione affidabile.

La capacità del test di individuare una variante dipende anche da fattori tecnici e biologici, tra cui la **frazione fetale** e la qualità del DNA analizzato. In una piccola percentuale di casi, il test può risultare **Non conclusivo**, ad esempio per frazione fetale bassa, copertura insufficiente, artefatti tecnici o difficoltà interpretative. In tali casi può essere richiesto un **secondo prelievo**; se anche questo non consente di ottenere un risultato conclusivo, può essere indicata una **consulenza genetica** per discutere le possibili alternative diagnostiche.

Tra i principali fattori che possono influenzare l'attendibilità del risultato è importante ricordare:

- **bassa quantità di DNA fetale** nel sangue materno, più frequente in alcune condizioni come BMI elevato o epoca gestazionale precoce;
- **gravidezze gemellari**, nelle quali non è possibile distinguere con certezza la condizione del singolo feto;
- **vanishing twin** (gemello riassorbito), che può determinare risultati falsamente positivi o falsamente negativi;

- **condizioni tumorali materne**, che possono interferire con l'analisi per la presenza di DNA tumorale circolante, in particolare in geni coinvolti nel processo di cancerogenesi (ad es. BRAF, KRAS, NRAS);
- alcune condizioni di **procreazione medicalmente assistita**, in particolare con **donazione di gameti**, nelle quali può rendersi necessario acquisire informazioni aggiuntive sul donatore e/o sulla donatrice.

Limiti nelle gravidanze gemellari o con vanishing twin

Nelle **gravidanze gemellari** non è possibile distinguere la condizione del singolo feto; di conseguenza, un risultato ad alto rischio può riferirsi a **uno o a entrambi i feti**. In qualsiasi gravidanza gemellare con risultato ad alto rischio, l'eventuale conferma diagnostica prenatale o postnatale deve essere considerata per **entrambi i feti/neonati**. Il test non è validato per gravidanze con **più di due feti**.

La presenza di un **vanishing twin** può ridurre l'attendibilità dello screening, perché il DNA del gemello che ha interrotto il proprio sviluppo può rimanere nel sangue materno anche dopo l'evento. Questa situazione può determinare risultati **falsamente positivi** o **falsamente negativi**. In caso di vanishing twin, la tempistica ottimale per l'esecuzione di **GeneSAFE®** può variare in relazione ai dati ecografici e all'epoca gestazionale in cui si è verificata l'interruzione.

Limiti specifici del pannello Inherited

Per le malattie **autosomiche recessive**, l'analisi su cfDNA presenta un limite intrinseco: **non consente di definire la zigosità**, cioè di stabilire con certezza se una variante sia presente in una sola copia (eterozigosi) o in due copie nel feto (omozigosi). Per questo motivo, quando **entrambi i genitori** sono portatori della **stessa variante** o della stessa condizione genetica recessiva, può essere necessario ricorrere alla **diagnosi prenatale invasiva** per chiarire il rischio reale di manifestazione della specifica patologia nel feto. In assenza del campione del partner, inoltre, l'interpretazione può essere limitata e non si può escludere con certezza che il feto sia omozigote per la variante materna.

Alcune varianti note non sono coperte da **GeneSAFE®**. A titolo esemplificativo, ma non esaustivo:

- nel gene **CFTR** non vengono analizzati i tratti **poly-T/poly-TG**;
- per i geni **GJB2/GJB6** non vengono rilevate le **delezioni del locus DFNB1**;
- per il gene **HBB** non vengono rilevati i **grandi riarrangiamenti/delezioni**;

Limiti specifici del pannello De Novo

Il pannello **GeneSAFE® De Novo** identifica esclusivamente varianti con **significato patologico noto in relazione alle condizioni esplicitamente riportate nella tabella**. Non ricerca varianti benigne né varianti di significato clinico incerto. Come per ogni test genetico, anche l'interpretazione delle varianti si basa sulle conoscenze scientifiche disponibili al momento dell'analisi e potrebbe essere aggiornata in futuro sulla base di nuove evidenze.

Qualora una donna sia portatrice di una variante a carico di uno dei geni inclusi in GeneSAFE De Novo, non sarà possibile valutare se il feto abbia o meno la variante materna e il test restituirà un risultato non conclusivo parziale.

GeneSAFE® nel percorso di diagnosi prenatale

GeneSAFE® si inserisce come parte di un percorso più ampio di diagnosi prenatale, che include strumenti ecografici, biochimici e, quando indicato, indagini invasive. L'**ecografia del primo trimestre** rimane fondamentale per confermare la vitalità della gravidanza, la corretta datazione, il numero di feti e la corionicità, nonché per evidenziare eventuali anomalie strutturali.

A differenza del **NIPT tradizionale**, che valuta principalmente il rischio di **anomalie cromosomiche**, **GeneSAFE®** è focalizzato sul rischio di alcune **malattie genetiche monogeniche fetali**. Per questo motivo, viene generalmente proposto in presenza di specifiche indicazioni, come **familiarità nota**, **sospetti ecografici**, **quesiti clinici mirati** o altre condizioni nelle quali possa essere utile un approfondimento genetico non invasivo.

GeneSAFE® non sostituisce la **diagnosi prenatale invasiva** (villocentesi o amniocentesi), che resta indicata in caso di **risultati ad alto rischio**, di **anomalie ecografiche** o quando la storia familiare e clinica renda necessaria una conferma diagnostica.

L'integrazione dei diversi strumenti diagnostici (**ecografia**, **screening biochimico**, **NIPT** per le anomalie cromosomiche, **GeneSAFE®** per alcune condizioni monogeniche e **diagnosi invasiva** quando indicata) consente un percorso di diagnosi prenatale più completo, che può essere adattato alle specifiche esigenze cliniche di ciascuna gestante.

Tempi di refertazione

Il risultato è generalmente disponibile entro 15 giorni lavorativi dalla ricezione del campione.

Per l'esecuzione dell'analisi **GeneSAFE®** è necessario che il foglio di richiesta sia correttamente compilato. Qualora alcune informazioni richieste siano mancanti il laboratorio richiederà tali informazioni e questo potrebbe modificare i tempi di lavorazione del campione ed emissione del referto.

È fortemente raccomandato che il **campione paterno** sia reso disponibile al momento del prelievo materno, in quanto può risultare necessario per ulteriori accertamenti genetici utili all'interpretazione del risultato.

Qualora il campione paterno non sia disponibile contestualmente al prelievo materno, il laboratorio potrà richiederlo in una fase successiva. In questi casi:

- l'esecuzione di accertamenti aggiuntivi su campione paterno può comportare un **posticipo dei tempi di refertazione fino a 10 giorni lavorativi**;
- qualora il campione paterno venga inviato in seconda battuta, tale posticipo decorrerà dalla **data di ricezione del campione presso il laboratorio**.

In assenza del campione paterno, l'interpretazione del risultato può risultare limitata. In tali circostanze, il test può restituire:

- un risultato di **alto rischio**, oppure
- un risultato **non conclusivo parziale**.

Tali risultati potranno essere **rivalutati** qualora il campione paterno venga successivamente reso disponibile, se ritenuto necessario.

Nel caso di gravidanze ottenute mediante tecniche di procreazione medicalmente assistita con **donazione di gameti**, può essere necessario acquisire informazioni relative al o ai donatori.

L'assenza di tali informazioni aggiuntive può limitare l'interpretazione del risultato e comportare l'emissione di:

- un risultato di **alto rischio**, oppure
- un risultato **non conclusivo parziale**.

Anche in questo caso, i risultati potranno essere **rivalutati** qualora le informazioni richieste vengano successivamente rese disponibili.

Gestione dei campioni

I campioni vengono identificati tramite un codice alfanumerico e conservati da un minimo di 3 ad un massimo di 6 mesi dopo la conclusione dell'analisi. Il campione residuo è disponibile per ulteriori accertamenti, previa valutazione dell'idoneità dello stesso ad essere utilizzato per lo specifico approfondimento richiesto.

Consenso informato

È consigliato che il test **GeneSAFE®** venga eseguito dopo una **consulenza pre-test** con uno specialista competente in **genetica medica** o in **medicina fetale**. Durante questo colloquio la gestante riceve informazioni chiare e complete riguardo alle **finalità del test**, ai suoi **benefici**, ai **limiti** e alle possibili implicazioni dei risultati, con la possibilità di porre domande e chiarire eventuali dubbi.

Sulla base di queste informazioni, la gestante può esprimere il proprio **consenso informato scritto**, che rappresenta una parte integrante del percorso di screening prenatale.