

INFORMATIVA RELATIVA ALL'ESECUZIONE DEL TEST GENETICO PREIMPIANTO NON-INVASIVO PER LO SCREENING DELLE ANEUPLOIDIE CROMOSOMICHE (niPGT-A)

1. Definizione e finalità del Test Genetico Preimpianto non invasivo (niPGT-A)

Il test Genetico Preimpianto non invasivo per Aneuploidie (niPGT-A) è finalizzato alla valutazione dell'assetto cromosomico embrionario prima del trasferimento, senza la necessità di una biopsia embrionale. Il corredo cromosomico negli esseri umani è normalmente costituito da 46 cromosomi suddivisi in 23 coppie: 22 coppie sono rappresentate dagli autosomi (cromosomi non sessuali uguali tra maschi e femmine) e una coppia di cromosomi sessuali formata da due cromosomi XX negli individui di sesso femminile e un cromosoma X e un cromosoma Y negli individui di sesso maschile. Alterazioni del numero e della struttura dei cromosomi possono avere ripercussioni immediate sugli embrioni determinandone il mancato impianto o l'arresto dello sviluppo. Talvolta tuttavia l'embrione portatore di gravi anomalie cromosomiche è in grado di impiantarsi in utero e dare luogo ad una gravidanza che successivamente si interrompe (aborto spontaneo). Lo screening di anomalie cromosomiche embrionarie ha quindi come finalità l'aumento della efficacia del percorso di procreazione medicalmente assistita e la riduzione del rischio di patologia cromosomica nelle gravidanze e dopo la nascita.

Il test Genetico Preimpianto non invasivo per Aneuploidie (niPGT-A), recentemente introdotto nella pratica della fecondazione *in vitro*, si esegue attraverso l'analisi dei frammenti di DNA libero embrionale (cfeDNA) rilasciati nel terreno di coltura nelle fasi di clivaggio e blastocisti (Hammond et. al. 2016, Kuznyetsov et. al. 2020, Rubio et al 2019). Tale indagine si pone quindi in alternativa ai classici metodi di PGT standard (invasiva) eseguiti su DNA embrionario ottenuto attraverso biopsia allo stadio di clivaggio (day 3) o allo stadio di blastocisti (day 5).

Le coppie candidate all'esecuzione del niPGT-A accederanno in primo luogo ad un percorso PMA in cui i gameti femminili e maschili (rispettivamente ovociti e spermatozoi) saranno raccolti e fecondati *in vitro* dove avverranno le prime fasi di sviluppo embrionario. Il test viene eseguito prelevando il terreno di coltura dell'embrione allo stadio di blastocisti (il giorno 5, 6 o 7 dopo la fecondazione) e successivamente il cfDNA contenuto all'interno viene analizzato secondo un protocollo specifico allo scopo di determinare la presenza di eventuali aneuploidie.

La finalità di niPGT-A è di valutare l'assetto cromosomico identificando gli embrioni che hanno maggiori probabilità di essere euploidi e quelli che hanno maggiore probabilità di essere aneuploidi. I dati di letteratura indicano che il trasferimento di embrioni euploidi può ridurre il tempo necessario per ottenere una gravidanza, pur non aumentando complessivamente le probabilità che questa si verifichi.

2. Indicazioni

Il test niPGT-A può essere eseguito in ogni ciclo di PMA senza specifica indicazione medica e al fine di ottimizzare il percorso di PMA stesso.

In alcune circostanze l'applicazione della niPGT-A trova indicazione in particolare nei seguenti casi:

1. Età materna avanzata (*advanced maternal age* – AMA): coppie nelle quali la partner femminile ha un'età convenzionalmente superiore ai 35 anni. Questa specifica indicazione è suggerita dai numerosi studi effettuati sulle blastocisti analizzate in gruppi di donne di età differente sottoposte a ciclo di PMA con PGT-A, in cui è stata dimostrata la correlazione tra aumento dell'età materna e numero di embrioni aneuploidi (Franasiak et al. 2014; Munné et al. 2017).
2. Ripetuti fallimenti di impianto (RFI): coppie che hanno eseguito il transfer di 3 o più embrioni morfologicamente di buona qualità senza ottenere impianto (assenza di sacco gestazionale ecografico a 5 o più settimane dopo il trasferimento embrionario).
3. Aborti ricorrenti: coppie che hanno sperimentato ripetute (3 o più) interruzioni di gravidanza del primo trimestre in presenza di cariotipo normale e in assenza di cause “meccaniche” quali patologie dell'utero o altri fattori causativi riconosciuti.
4. Anomalie dello spermiogramma: coppie nelle quali il partner maschile presenta grave oligoastenoteratospermia, criptospermia o azoospermia non ostruttiva, fattori che comportano il ricorso a tecniche microchirurgiche di MESA (*Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration*) e TESE (*TEsticular Sperm Extraction*) per il prelievo di spermatozoi dalle vie seminali.
5. I pazienti che tentano il primo ciclo PMA possono utilizzare il test niPGT-A per aumentare la probabilità di impianto e ridurre il tempo di gravidanza.

3. Metodologia diagnostica

Raccolta del terreno di coltura

Il test niPGT-A, a differenza della procedura PGT standard, non richiede alcuna manipolazione dell'embrione, mentre utilizza il terreno di coltura in cui cresce l'embrione nelle fasi di sviluppo *in vitro* e all'interno del quale rilascia frammenti di DNA. Il terreno viene raccolto nel laboratorio di embriologia del centro di PMA nella quinta, sesta o settima giornata di sviluppo.

Whole Genome Amplification (WGA)

Le applicazioni di niPGT richiedono l'amplificazione totale del cfeDNA (nota come whole genome amplification - WGA) che permette di amplificare il genoma embrionario milioni di volte al fine di ottenere una quantità di DNA idonea per le analisi successive. Per le applicazioni di PGT la WGA viene eseguita mediante **Ion SingleSeq Kit (Thermo Fisher Scientific)**.

Massive Parallele sequencing

L'analisi dell'intero assetto cromosomico dell'embrione viene eseguita mediante sequenziamento massivo parallelo (MPS) utilizzando la piattaforma strumentale Ion GeneStudio S5 Plus (Thermo Fisher Scientific) con il protocollo Ion Reproseq (Thermo Fisher Scientific). Le sequenze cromosomiche ottenute mediante MPS vengono quindi quantificate attraverso un'analisi bioinformatica che permette lo screening delle aneuploidie su tutti i 24 cromosomi e i dati ottenuti vengono analizzati mediante piattaforma Ion Reporter Software (Thermo Fisher Scientific)..

La validazione clinica del metodo niPGT-A

Il test niPGT-A è stato sviluppato all'interno del laboratorio Eurofins Genoma e la validazione clinica del metodo è stata condotta su più di 500 embrioni confrontando per ogni embrione i risultati ottenuti su campioni di cfeDNA embrionario con i risultati ottenuti dalla biopsia del trofoectoderma (TE). Come risultato del confronto, è emersa una concordanza fino all'86,1% tra il metodo classico PGT-A e il metodo niPGT-A (*Tabella 1*).

Tabella 1: PERFORMANCE DELL'ANALISI NIPGTA VS PGT-A CON CONFRONTO DI BIOPSIA DEL TROFECTODERMA DELL'EMBRIONALE

Tempi di coltura per il rilascio del cfeDNA nel terreno	Day3-5	Day3-6	Day4-6,7
Terreni analizzati (Numero di campioni)	154	180	185
Concordanza* di ploidia del cfeDNA con biopsia TE (%)	72,6%	84,8%	86,1%
Sensibilità	83,61%	90,91%	93,04%
Specificità	52,94%	65,71%	63,89%

*CONCORDANZA: La concordanza è semplicemente la frazione di coppie di dati che si comportano come previsto (assumendo che non ci siano legami nei valori di rischio relativo tra coppie di osservazioni).
Si tratta di uno dei valori di concordanza più elevati ottenuti rispetto ai tassi di concordanza finora pubblicati in letteratura (Rubio et. al. 2020).

4. Esiti del test niPGT-A

Il test niPGT-A permette di classificare gli embrioni in modo tale da determinare la priorità di trasferimento nell'utero materno. La priorità è definita in base alla probabilità di avere un assetto cromosomico euploide dopo analisi del cfDNA embrionale nel terreno di coltura. Gli embrioni che hanno maggiori probabilità di essere euploidi avranno la priorità per il trasferimento. Il test niPGT-A può dare luogo ai seguenti esiti:

- **PRIORITÀ 1°:** Embrioni con alta probabilità di avere un assetto cromosomico normale o euploide, quindi con alta probabilità di impianto. Si tratta di embrioni candidabili primi per il trasferimento.

- **PRIORITÀ 2°:** Embrioni con alta probabilità di avere un assetto cromosomico alterato o **aneuploide parziale**, quindi con basso probabilità di impianto e elevato rischio di abortività. Si tratta di embrioni candidabili al secondo turno per il trasferimento.
- **PRIORITÀ 3°:** Embrioni con alta probabilità di avere un assetto cromosomico alterato o **singola monosomia**, quindi con basso probabilità di impianto e elevato rischio di abortività. Si tratta di embrioni candidabili al terzo turno per il trasferimento
- **PRIORITÀ 4°:** Embrioni con alta probabilità di avere un assetto cromosomico alterato o **Trisomia/aneuploidia complessa (aneuploidia di ≥ 3 cromosomi)**, quindi con basso probabilità di impianto e elevato rischio di abortività. Si tratta degli embrioni da prendere in considerazione per ultimi per il trasferimento.
- **Nessun Risultato o Risultato non conclusivo:** Tale risultato viene ottenuto in caso di quantità insufficiente del cfeDNA nel terreno di coltura o quando il procedimento di laboratorio ha portato dei risultati di dubbia interpretazione. Nel caso di una mancata diagnosi è indicato eseguire una biopsia embrionale, oppure valutare il trasferimento dell'embrione in base alla sua morfologia.

5. Tempi di refertazione

I risultati del test saranno disponibili entro 7-10 giorni lavorativi dall'accettazione del campione. Tali termini, tuttavia, non sono perentori e potrebbero prolungarsi in caso di approfondimenti diagnostici o dubbi interpretativi. Per l'esecuzione del test niPGT-A è necessario che siano correttamente compilati e firmati il foglio di richiesta analisi e il consenso informato. In caso alcune informazioni richieste siano mancanti il laboratorio contatterà il medico/centro inviante o i diretti interessati all'analisi per ottenere tali informazioni. Tale comunicazione potrebbe modificare i tempi di lavorazione del campione e di emissione del referto.

6. I vantaggi del test niPGT-A:

- Il test niPGT-A aiuta ad identificare gli embrioni che hanno maggiori probabilità di essere euploidi, e quindi avere una probabilità più alta di impianto con lo scopo di migliorare la percentuale di successo della fertilizzazione in vitro.
- Il metodo niPGT-A non richiede biopsie embrionali e potrebbe ridurre i costi della procedura di PMA migliorando i tempi dell'applicazione.
- È un metodo innocuo in quanto non richiede alcuna manipolazione embrionale.
- Offre un'ulteriore opportunità di classificare gli embrioni al di là della semplice valutazione morfologica.

7. I limiti della procedura:

- La percentuale di concordanza fra PGT-A e niPGT-A eseguita ai giorni 4/6 è dell' 86,1%. In letteratura internazionale è riportato un tasso di concordanza pari al 78,2% (Rubio et al 2020).

- Il test niPGT-A è un test di screening, non è un test diagnostico. Perciò non esclude l'esecuzione di accertamenti genetici in corso di gravidanza che andranno discussi in sede di consulenza genetica prenatale dedicata.
- La procedura richiede il cambio della goccia del terreno (sia in forma sequenziale che con l'utilizzo di terreni a formulazione unica) nella 4° giornata e il periodo ideale di raccolta del mezzo di coltura è dalla 4° alla 6° giornata.
- Il test niPGT-a può essere eseguito solo nel caso di cicli di pma differiti, quindi con congelamento successivo alla raccolta del campione.
- Il test niPGT-A non è applicabile nel caso in cui ci siano indicazioni all'esecuzione della PGT-SR o della PGT-M.
- Se il laboratorio di PMA utilizza un sistema time-lapse, è necessario utilizzare pozzetti di piastre individuali per ciascuna coltura di embrioni.
- La contaminazione (origine materna o esterna) del terreno analizzato potrebbe portare ad un fallimento dell'analisi nonché ad un errore diagnostico nel caso in cui tale contaminazione non fosse evidenziata.
- A causa del fenomeno del mosaicismo, un embrione potrebbe presentare sia cellule cromosomicamente normali sia alterate. Come conseguenza di tale fenomeno il campione analizzato, e quindi l'embrione di appartenenza, potrebbe essere diagnosticato erroneamente come normale in caso di aneuploidia o come anormale in caso di euploidia.
- La niPGT-A potrebbe non fornire alcun risultato o un risultato non conclusivo nel caso in cui la quantità o la qualità del cfeDNA non raggiungano gli standard richiesti. Nel caso di mancata diagnosi può essere suggerita una PGT-A con metodo classico su biopsia embrionale. È possibile che l'analisi PGT-A/SR non identifichi alcun embrione euploide o/o bilanciato.
- L'analisi non è in grado di evidenziare un rischio aumentato di:
 - riarrangiamenti cromosomici bilanciati
 - disomie uniparentali
 - riarrangiamenti cromosomici sbilanciati qualora siano coinvolte le regioni pseudoautosomiche dei cromosomi X e Y o le regioni eterocromatiche (es. regioni pericentromeriche, braccio corto dei cromosomi acrocentrici, etc.)
 - regioni cromosomiche non rappresentate nella piattaforma
 - riarrangiamenti cromosomici (tranne i riarrangiamenti che coinvolgono un braccio intero [braccio lungo o braccio corto] di un cromosoma)
 - varianti di sequenza (puntiformi) del DNA
 - difetti di metilazione
 - poliploidie
- Il protocollo niPGT-A richiede l'utilizzo dell'intero campione del terreno. Perciò, nel caso di una mancata diagnosi il terreno non può essere sempre recuperabile ed è indicato eseguire una biopsia embrionale, oppure valutare il trasferimento dell'embrione in base alla sua morfologia.

8. Consulenza Genetica

Eurofins Genoma offre un servizio di consulenza genetica con il suo team di genetisti pre e post niPGT-A sia per i pazienti sia per i centri di PMA.

Referenze:

- Franasiak, Jason M., Eric J. Forman, Kathleen H. Hong, Marie D. Werner, Kathleen M. Upham, Nathan R. Treff, e Richard T. Scott. 2014. «The Nature of Aneuploidy with Increasing Age of the Female Partner: A Review of 15,169 Consecutive Trophectoderm Biopsies Evaluated with Comprehensive Chromosomal Screening». *Fertility and Sterility* 101 (3): 656-663.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.004>.
- Hammond, Elizabeth R. , Andrew N. Shelling, Lynsey M. Cree “Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use”; *Human Reproduction*, Volume 31, Issue 8, August 2016, Pages 1653–1661, <https://doi.org/10.1093/humrep/dew132>
- Kuznyetsov V, Madjunkova S, Abramov R, Antes R, Ibarrientos Z, Motamedi G, Zaman A, Kuznyetsova I, Librach CL. Minimally Invasive Cell-Free Human Embryo Aneuploidy Testing (miPGT-A) Utilizing Combined Spent Embryo Culture Medium and Blastocoele Fluid -Towards Development of a Clinical Assay. *Sci Rep.* 2020 Apr 29;10(1):7244. doi: 10.1038/s41598-020-64335-3. PMID: 32350403; PMCID: PMC7190856.
- Munné, S., M. Alikani, L. Ribustello, P. Colls, Pedro A. Martínez-Ortiz, Referring Physician Group, e D.H. McCulloh. 2017. «Euploidy Rates in Donor Egg Cycles Significantly Differ between Fertility Centers». *Human Reproduction* 32 (4): 743–49.
- Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, Cimadomo D, García-Pascual CM, Albricci L, Soscia D, Valbuena D, Capalbo A, Ubaldi F, Simón C. Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertil Steril.* 2019 Sep;112(3):510-519. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.04.038. Epub 2019 Jun 11. PMID: 31200971
- Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, Ocali O, Cimadomo D, Venier W, Barroso G, Kopcow L, Bahçeci M, Kulmann MIR, López L, De la Fuente E, Navarro R, Valbuena D, Sakkas D, Rienzi L, Simón C. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophoctoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol.* 2020 May 26:S0002-9378(20)30520- 2. doi: 10.1016/j.ajog.2020.04.035. Epub ahead of print. PMID: 32470458.

CONSENSO ALL'ESECUZIONE DEL TEST GENETICO PREIMPIANTO NON INVASIVO (niPGT-A)

*Il sottoscritto (partner maschile)	
*Luogo di nascita	*Data di nascita
*Codice Fiscale:	
*Residente a:	*Via:
*Telefono:	e-mail:
*Documento	*Nr.
*Rilasciato il	*da
*La sottoscritta (partner femminile)	
*Luogo di nascita	*Data di nascita
*Codice Fiscale	
*Residente a:	*Via:
*Telefono:	e-mail:
*Documento	*Nr.
*Rilasciato il	*da

*Le informazioni riportanti l'asterisco sono obbligatorie

In previsione di sottoporci presso il Centro di procreazione medicalmente assistita (PMA), ad un ciclo ICSI (fecondazione in vitro con iniezione intracitoplasmatica degli spermatozoi) con successiva raccolta del terreno di cultura per finalità dell'analisi del cfeDNA embrionale, Dichiariamo di aver letto il modulo di informativa allegato al presente consenso nella sua totalità di averne compreso completamente il contenuto, e di aver ricevuto tutte le informazioni in maniera dettagliata, sia sui metodi che sulle percentuali di successo e di errore diagnostico.

Dichiariamo di avere preliminarmente effettuato uno/più colloqui con personale del centro di PMA e/o del laboratorio Eurofins Genoma Group nel corso del/i quale/i ci sono stati illustrati tutti i punti della suddetta informativa ed abbiamo potuto porre le domande necessarie ed avuto le conseguenti risposte.

ACCONSENTO/IAMO (barrare la casella)

all'esecuzione della/e seguente/i analisi: ☐ **niPGT-A** su terreno di cultura in cui sono cresciuti i nostri embrioni.

Dichiariamo altresì di essere stati informati dei seguenti aspetti:

Definizione dei ruoli e oggetto della collaborazione

Il laboratorio Eurofins Genoma è un laboratorio specializzato di biologia e genetica molecolare, autorizzato dal Comune di Roma, prot. Nr. 14965 del 19.03.2003, all'esecuzione di diagnosi genetiche molecolari.

Il laboratorio Eurofins Genoma NON espleta tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita, regolamentate della legge 19 Febbraio 2004, n. 40.

Il laboratorio Eurofins Genoma è organizzato al fine dello svolgimento di esami specializzati di genetica per terze strutture, opera quindi in qualità di presidio di riferimento come "Service".

Il Centro di PMA ha richiesto il supporto specialistico del laboratorio Eurofins Genoma per l'ottimizzazione e l'espletamento di test genetici su terreno di cultura in cui sono cresciuti gli embrioni derivano dal ciclo di procreazione medicalmente assistita (PMA).

Limiti di responsabilità

Il laboratorio Eurofins Genoma non effettua la produzione di embrioni mediante tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita. Tale procedura sarà effettuata nei laboratori del Centro di Procreazione Medicalmente Assistita, ad opera di tecnici/biologi dipendenti dal suddetto centro.

Il laboratorio Eurofins Genoma è responsabile esclusivamente dei risultati del test genetico effettuato su terreno di cultura, e non ha alcuna responsabilità circa l'operato del Centro di Procreazione Medicalmente Assistita per l'operato di sua competenza.

Costi dell'attività espletata

Il costo dell'attività inerenti il test niPGT-A sono riportati nel preventivo consegnato ai pazienti dal personale di Eurofins Genoma o dal personale del Centro di Procreazione Medicalmente Assistita.

Il costo delle tecniche di procreazione medicalmente assistita (ciclo di PMA e raccolta del terreno), sono da concordare interamente con il Centro di Procreazione Medicalmente Assistita al quale si rimanda.

Luogo e data, _____

Nome della partner femminile _____

Firma _____



Nome del partner maschile _____

Firma _____



Lo Specialista che ha raccolto il consenso:

Nome: _____ Cognome: _____

Tel. _____ E-Mail _____

Firma e timbro dello Specialista: _____