

# INFORMATIVA ALL'ESECUZIONE DEL TEST GENETICO PREIMPIANTO

## Definizione e finalità della Diagnosi Genetica Preimpianto (PGT)

La Diagnosi Genetica Preimpianto (PGT) è un'indagine genetica finalizzata all'identificazione della presenza di malattie genetiche o di alterazioni cromosomiche in embrioni prodotti con tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) da coppie ad elevato rischio riproduttivo. Le coppie candidate all'esecuzione della PGT accederanno in primo luogo ad un percorso di PMA nel quale verranno collezionati i gameti femminili e maschili (rispettivamente ovociti e spermatozoi) e fertilizzati in vitro. Successivamente alla fecondazione, il DNA dell'embrione (mediante la biopsia dei blastomeri allo stadio di segmentazione o di blastocisti) verrà analizzato secondo un protocollo specifico che differirà in relazione alla tipologia di anomalia da ricercare (cromosomica, genomica o genetica) e in relazione alla specifica patologia. La PGT viene eseguita sul DNA embrionario prima del trasferimento in utero dell'embrione.

Si distinguono tre principali tipologie di PGT:

PGT-A: test genetico preimpianto per aneuploidie cromosomiche

PGT-M: test genetico preimpianto per malattie monogeniche;

PGT-SR: test genetico preimpianto per anomalie cromosomiche e riarrangiamenti strutturali

## Tecniche e tipologie di prelievo per praticare la Diagnosi Genetica Preimpianto (PGT)

La diagnosi genetica preimpianto può essere eseguita su diversi campioni prelevati in diversi momenti dello sviluppo embrionario. In relazione alla tipologia di campione analizzato si possono ottenere informazioni distinte con performance diverse (ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group et al. 2020). Nello specifico, le cellule da sottoporre ad analisi genetica possono essere ottenute attraverso il prelievo dall'embrione allo stadio di segmentazione (terzo giorno dopo la fecondazione) o di blastocisti (giorni 5-6-7 dalla fecondazione).

Ad oggi la tecnica maggiormente utilizzata è la biopsia embrionaria allo stadio di blastocisti, ossia lo stadio raggiunto a partire dal 5° giorno di sviluppo embrionario dopo la fecondazione. Ogni blastocisti è formata da diverse decine di cellule (da 100 a 300 o anche più) suddivise in due zone: il trofoectoderma, ossia la porzione di cellule più periferica che andrà a formare gli annessi (placenta e membrana amniotica) e la *inner cell mass* (ICM) ossia la porzione più interna di cellule che andrà a formare le strutture embrionarie propriamente dette. La biopsia di blastocisti viene eseguita a carico del

trofoectoderma, senza toccare la ICM, e permette di raccogliere un congruo numero di cellule per la successiva analisi (circa 5-10 cellule).

Più raramente le cellule da analizzare vengono prelevate al terzo giorno (day 3) dopo la fecondazione, quando l'embrione, definito *Cleavage Stage Embryo*, è formato da circa 6 – 8 cellule. In questa fase le cellule sono totipotenti, non compattate ed è possibile prelevare 1-2 blastomeri (cellule) per l'analisi genetica.

Ulteriori dettagli in merito alle tecniche di biopsia embrionaria possono essere ottenuti in sede di colloquio con il personale del centro di PMA di riferimento.

## Diagnosi Genetica Preimpianto per Aneuploidie (PGT-A)

### Scopo e vantaggi del test PGT-A

La Diagnosi Genetica Preimpianto per Aneuploidie (PGT-A) è finalizzata alla valutazione dell'assetto cromosomico embrionario prima del trasferimento (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group et al. 2020). 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 di questi cromosomi possono avere ripercussioni immediate sugli embrioni determinandone l'arresto dello sviluppo o il mancato impianto. Talvolta l'embrione portatore di gravi anomalie cromosomiche è in grado di impiantarsi in utero e dare luogo a gravidanza che si interrompe successivamente (aborto spontaneo). Alcune anomalie cromosomiche invece, possono essere compatibili con lo sviluppo fetale e portare alla nascita di un individuo in cui possono essere presenti manifestazioni cliniche di grado variabile (es. quadri malformativi e/o deficit cognitivo).

La finalità della PGT-A è quella di identificare gli embrioni che, in quanto euploidi hanno le maggiori probabilità di esitare in una gravidanza a termine e con minori rischi di manifestazioni cliniche in gravidanza o alla nascita una volta trasferiti.

Il trasferimento di embrioni euploidi definiti mediante PGT-A aumenta la probabilità di impianto, ma non è in grado di garantire che questo vada a buon fine. Inoltre, l'esecuzione della PGT-A può diminuire il tempo necessario per ottenere una gravidanza, pur non aumentando complessivamente le probabilità che questa si verifichi.

### Scopo e vantaggi del "Pannello per la Ploidia"

Le anomalie cromosomiche di numero (aneuploidie) più comuni sono rappresentate dalle alterazioni (monosomie e trisomie) di un singolo cromosoma (aneuploidia semplice) o di più di un cromosoma

(aneuploidia complessa). Talvolta un embrione può presentare anomalie a carico di tutti i cromosomi: quando tutti i cromosomi sono presenti in singola copia si parla di aploidia, mentre quando sono presenti più copie si parla di poliploidia (es. tre copie=triploidia, quattro copie=tetraploidia).

Negli embrioni aploidi il corredo cromosomico presente è quello di un unico genitore, mentre nelle poliploidie sono presenti più corredi cromosomi di (almeno) un genitore.

Le anomalie di ploidia hanno un grave impatto sullo sviluppo embrionofetale che è impedito (aploidia) o fortemente compromesso (poliploidia) e per tale ragione è importante poter verificare se un embrione presenti una di queste alterazioni.

Anche se le anomalie di ploidia rappresentano una piccola percentuale delle aneuploidie complessive osservate durante il concepimento, la loro rilevazione è importante per aumentare il successo della fecondazione in vitro. Ad esempio, le triploidie rappresentano circa il 2% delle gravidanze naturali e la triploidia è riscontrabile in circa il 15% delle interruzioni spontanee di gravidanza con anomalia cromosomica (Marin D et. al). Inoltre, talvolta gli ovociti presentano una “fecondazione anomala” (abnormally fertilized oocyte - AFO) definita dalla presenza di un numero anomalo di pronuclei, ossia diverso da 2. Gli embrioni derivanti da AFO vengono generalmente esclusi dal successivo utilizzo in quanto presentano un aumentato rischio di triploidia; tuttavia, in letteratura sono riportati casi di bambini nati vivi a seguito del trasferimento di embrioni derivanti da AFO (Bredbacka et al.). Pertanto, la valutazione della ploidia è uno strumento utile nel valutare l’effettivo numero di nuclei dell’ovocita e può aumentare il numero di embrioni disponibili per il trasferimento.

Il Pannello per la Ploidia infine può eseguire una valutazione della contaminazione, ossia verificare che il DNA analizzato sia di completa pertinenza dell’embrione e non sia stato contaminato da cellule materne.

Il Pannello per la Ploidia è un test supplementare alla PGT-A e PGT-SR e non richiede una seconda biopsia embrionale in quanto eseguito sullo stesso DNA utilizzato per le altre tecniche.

### Impronta digitale del DNA (QC fratellanza)

Il Pannello per la Ploidia può anche confrontare le varianti geniche del DNA dei diversi embrioni per valutare la “fratellanza” ossia l’appartenenza alla stessa coppia parentale. Questo approccio aumenta le garanzie di attendibilità sulla tracciabilità degli embrioni sottoposti ad analisi.

### Indicazioni alla PGT-A

La PGT-A può essere presa in considerazione per tutti i pazienti che si sottopongono ad un ciclo di PMA. In alcune circostanze l’applicazione della PGT-A trova indicazione elettiva, in particolare:

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 su blastocisti analizzate in gruppi di donne di differente età 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; Rubio 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 di coppia 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.

La PGT-A può essere eseguita solo su biopsia di embrione allo stadio di clivaggio (day 3) e di blastocisti (day 5,6 e 7).

#### Indicazioni al Pannello per la Ploidia

- 1- Coppie in cui si verificano aborti spontanei a causa di gravidanze triploidi.
- 2- Embrioni derivanti da ovociti con fecondazione anomala (1PN, 2,1PN e 3PN).
- 3- Storia delle gravidanze molari.

#### Esiti della PGT-A

La PGT-A può dare luogo ai seguenti esiti:

- Embrioni con assetto cromosomico normale o **euploide**: l'analisi ha evidenziato un assetto cromosomico euploide (normale). Si tratta di embrioni candidabili al trasferimento senza ulteriori valutazioni specialistiche. La probabilità di ottenere un embrione euploide varia in relazione all'età della partner femminile e di altri specifici fattori di rischio.
- Embrioni con assetto cromosomico alterato o **aneuploide**: l'analisi ha evidenziato un assetto cromosomico aneuploide/anomalo, per la presenza di una o più anomalie coinvolgenti uno o più cromosomi in maniera totale (aneuploidia propriamente detta) o parziale (anomalia cromosomica segmentale). Qualora sia stato eseguito il pannello per poliploidie, tale risultato includerà anche l'eventuale esito di aploidia o poliploidia (es. triploidia). Il trasferimento di questi embrioni è fortemente sconsigliato in quanto sarebbe causa di mancato impianto o aborto precoce, ma potrebbe altresì determinare lo sviluppo di una gravidanza con patologia cromosomica.

- Embrioni **“a mosaico”**: La condizione di embrione a mosaico indica la contemporanea presenza di cellule euploidi (con corretto numero di cromosomi) e di cellule con alterato numero di cromosomi all'interno del campione (biopsia embrionaria) analizzato. Il riscontro di mosaicismo può significare che l'embrione stia andando incontro ad un fenomeno noto come *chromosomal rescue* in conseguenza del quale il feto potrebbe avere un assetto cromosomico normale. A conferma di ciò è stato dimostrato che il trasferimento embrioni con anomalie cromosomiche a mosaico può dar luogo ad un feto con assetto cromosomico corretto (Greco, Minasi, e Fiorentino 2015; Viotti 2020) . Il trasferimento di tali embrioni è possibile previa consulenza genetica (Leigh et al. 2022).
- **Nessuna diagnosi**: tale risultato viene ottenuto in caso di fallimento della reazione di *Whole Genome Amplification* (si veda oltre). Nel caso di una mancata diagnosi è indicato eseguire una nuova biopsia embrionale.
- **Diagnosi non conclusiva**: tale risultato si ottiene quando il procedimento di laboratorio ha portato a dei risultati di dubbia interpretazione. Nel caso di una diagnosi non conclusiva è indicato eseguire una nuova biopsia embrionale.

Qualora sia stato eseguito il pannello per poliploidia, ai risultati sopra indicati sarà aggiunto l'esito della valutazione della “fratellanza” tra embrioni:

- Valore QC fratellanza **Attribuito**: Tutti gli embrioni della stessa coppia sono geneticamente imparentati tra loro.
- Valore QC fratellanza **Escluso**: Uno o più embrioni della stessa coppia hanno caratteristiche genetiche che si discostano dagli altri embrioni della coppia

Non è possibile definire a priori quali esiti saranno ottenuti dalla PGT-A e dal Pannello per la Ploidia, nello specifico l'esecuzione di questi test non assicura di avere embrioni trasferibili e, in caso siano presenti più embrioni candidati per il trasferimento, questo potrà avvenire in diversi momenti per i diversi embrioni.

La PGT-A non esclude l'esecuzione di accertamenti genetici in corso di gravidanza che andranno discussi in sede di consulenza genetica prenatale dedicata.

### Tempi di refertazione

I risultati dell'esame saranno disponibili entro 7-10 giorni lavorativi dall'accettazione del campione. Tali termini, tuttavia, non sono perentori e potrebbero prolungarsi in caso di ripetizione dell'esame, risultati non ottimali o non conclusivi, approfondimenti diagnostici o dubbi interpretativi. Per l'esecuzione dell'analisi PGT-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.

## Diagnosi Genetica Preimpianto per riarrangiamenti strutturali dei cromosomi (PGT-SR)

La Diagnosi Genetica Preimpianto per Aneuploidie (PGT-SR) è finalizzata alla valutazione dell'assetto cromosomico embrionario prima del trasferimento nei casi in cui uno o, più raramente, entrambi i partner siano portatori di un riarrangiamento cromosomico che espone al rischio di anomalia cromosomica nei concepimenti (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group et al. 2020).

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 di questi cromosomi possono avere ripercussioni immediate sugli embrioni determinandone l'arresto dello sviluppo o il mancato impianto. Talvolta l'embrione portatore di gravi anomalie cromosomiche è in grado di impiantarsi in utero e dare luogo a gravidanza che si interrompe successivamente (aborto spontaneo). Infine, alcune anomalie cromosomiche possono essere compatibili con lo sviluppo fetale e portare alla nascita di un individuo in cui possono essere presenti manifestazioni cliniche di grado variabile (es. quadri malformativi e/o deficit cognitivo).

È noto, tuttavia, che molti individui presentano alterazioni del cariotipo che possono avere minimo o nessun effetto sul loro stato di salute, ad esempio le anomalie cromosomiche bilanciate o le anomalie cromosomiche a mosaico. Tali anomalie possono tuttavia possono essere trasmesse nei concepimenti dando luogo a manifestazioni variabili.

La finalità della PGT-SR è quella di identificare gli embrioni che, in quanto euploidi hanno le maggiori probabilità di esitare in una gravidanza a termine e con minori rischi di manifestazioni cliniche in gravidanza o alla nascita una volta trasferiti. La PGT-SR potrà valutare sia la presenza di un eventuale anomalia cromosomica conseguente all'anomalia cromosomica parentale, sia la presenza di anomalie cromosomiche indipendenti che possono essere presenti anche in concepimenti di coppie con cariotipo normale.

Il trasferimento di embrioni euploidi definiti mediante PGT-SR aumenta la probabilità di impianto per transfer, ma non è in grado di garantire che l'impianto vada a buon fine. L'esecuzione della PGT-SR diminuisce il tempo necessario per ottenere una gravidanza, ma non aumenta complessivamente le probabilità di ottenere una gravidanza.

All'analisi PGT-SR è possibile associare il Pannello per Ploidia per i dettagli della quale si rimanda ai paragrafi dedicati nella sezione precedente del presente documento.

### Indicazioni alla PGT-SR

La PGT-SR è indicata quando uno o entrambi presentano:

- Un'anomalia cromosomica bilanciata (o apparentemente bilanciata): sono esempi le traslocazioni reciproche tra cromosomi non omologhi, le traslocazioni robertsoniane, le inversioni peri e paracentriche, le traslocazioni complesse.
- Un'anomalia cromosomica sbilanciata con perdita/acquisizione di materiale genetico: sono esempi le delezioni ed inserzioni cromosomiche di dimensioni nel range di risoluzione della citogenetica classica, mosaicismi dei cromosomi sessuali, marcatori cromosomici soprannumerari composti di eucromatina.

In considerazione del fatto che mediante la PGT-SR è possibile identificare anche le anomalie cromosomiche identificabili mediante la PGT-A, ogni indicazione alla PGT-A potrà rappresentare un'indicazione secondaria della PGT-SR.

La PGT-SR può essere eseguita solo su biopsia di embrione allo stadio di clivaggio (day 3) e di blastocisti (day 5,6 e 7).

### Consulenza genetica e valutazione della fattibilità tecnica

È opportuno che ogni coppia candidata all'esecuzione della PGT-SR esegua una consulenza genetica che avrà le seguenti finalità: a) informare la coppia sulla condizione genetica in esame (storia naturale, possibilità terapeutiche) e sulle percentuali di rischio di ricorrenza; b) verificare la possibilità di diagnosticare il difetto genetico in questione mediante PGT (fattibilità tecnica); c) discutere le metodologie e gli approcci disponibili per la diagnosi genetica con relativi livelli di accuratezza; e d) illustrare i risultati della casistica del centro ottenuti in relazione all'indicazione ed alla metodologia diagnostica utilizzata.

### Esiti della PGT-SR

La PGT-SR può dare luogo ai seguenti esiti:

- Embrioni con assetto cromosomico **normale o bilanciato**: l'analisi ha evidenziato un assetto cromosomico euploide (normale) o bilanciato. Non sono state identificate anomalie cromosomiche riconducibili all'anomalia cromosomica parentale né altre anomalie indipendenti da questa. Nel caso in cui l'anomalia cromosomica parentale sia bilanciata non è possibile definire se un embrione sia o meno portatore della stessa anomalia bilanciata.

- Embrioni con assetto cromosomico alterato o **sbilanciato**: l'analisi ha evidenziato un assetto cromosomico aneuploide/anomalo, per la presenza di una o più anomalie coinvolgenti uno o più cromosomi in maniera totale (aneuploidia propriamente detta) o parziale (anomalia cromosomica strutturale). Qualora sia stato eseguito il pannello per poliploidie, tale risultato includerà anche l'eventuale esito di aploidia o poliploidia (es. triploidia). Le anomalie cromosomiche riscontrate potranno essere la conseguenza dello sbilanciamento o della trasmissione dell'anomalia cromosomica parentale o potranno essere anomalie casuali. Il trasferimento di questi embrioni è fortemente sconsigliato in quanto sarebbe causa di mancato impianto o aborto precoce, ma potrebbe altresì determinare lo sviluppo di una gravidanza con patologia cromosomica
- Embrioni **"a mosaico"**: La condizione di embrione a mosaico indica la contemporanea presenza di cellule euploidi (con corretto numero di cromosomi) e di cellule con alterato numero di cromosomi all'interno del campione (biopsia embrionaria) analizzato. Il riscontro di mosaicismo può significare che l'embrione stia andando incontro ad un fenomeno noto come *chromosomal rescue* in conseguenza del quale il feto potrebbe avere un assetto cromosomico normale. A conferma di ciò è stato dimostrato che il trasferimento embrioni con anomalie cromosomiche a mosaico può dar luogo ad un feto con assetto cromosomico corretto (Greco, Minasi, e Fiorentino 2015; Viotti 2020) . Il trasferimento di tali embrioni è possibile previa consulenza genetica (Leigh et al. 2022).
- **Nessuna diagnosi**: tale risultato viene ottenuto in caso di fallimento della reazione di *Whole Genome Amplification* (si veda oltre). Nel caso di una mancata diagnosi è indicato eseguire una nuova biopsia embrionale.
- **Diagnosi non conclusiva**: tale risultato si ottiene quando il procedimento di laboratorio ha portato a dei risultati di dubbia interpretazione. Nel caso di una diagnosi non conclusiva è indicato eseguire una nuova biopsia embrionale.

Non è possibile definire a priori quali esiti saranno ottenuti dalla PGT-SR, nello specifico l'esecuzione della PGT-SR non assicura di avere embrioni trasferibili e, in caso siano presenti più embrioni candidati per il trasferimento, questo potrà avvenire in diversi momenti per i diversi embrioni.

La PGT-SR non esclude l'esecuzione di accertamenti genetici in corso di gravidanza che andranno discussi in sede di consulenza genetica prenatale dedicata.

### Tempi di refertazione

I risultati dell'esame saranno disponibili entro 7-10 giorni lavorativi dall'accettazione del campione. Tali termini, tuttavia, non sono perentori e potrebbero prolungarsi in caso di ripetizione dell'esame, risultati non ottimali o non conclusivi, approfondimenti diagnostici o dubbi interpretativi. Per l'esecuzione



dell'analisi PGT-SR 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.

## Diagnosi Genetica Preimpianto per patologie monogeniche (PGT-M)

La Diagnosi Genetica Preimpianto per patologia Monogenica (PGT-M) ha lo scopo di verificare la trasmissione agli embrioni di una o più patologie genetiche familiari (ESHRE PGT-M Working Group et al. 2020). Tale indagine ha lo scopo di indagare esclusivamente le patologie genetiche note nel nucleo familiare, ma può essere associata all'analisi PGT-A e/o PGT-SR per la valutazione dell'assetto cromosomico embrionario prima del trasferimento (si veda paragrafo dedicato).

### Indicazioni alla PGT-M

La PGT-M può essere proposta come opzione riproduttiva a tutte le coppie a rischio di avere un figlio affetto da malattia monogenica. La PGT-M può essere eseguita indipendentemente dalla modalità di trasmissione della patologia (autosomico dominante, autosomico recessivo e legato al cromosoma X) quando è noto il gene malattia e la variante patogenetica causativa.

Per le malattie ad insorgenza tardiva e penetranza variabile (es. Malattia di Huntington, Malattie da Prioni), quando l'individuo a rischio della coppia non voglia conoscere il suo status genetico, è possibile procedere a diagnosi genetica preimpianto con due diverse modalità come previsto dalla Linee Guida della Società Italiana di Genetica Umana (*"Diagnosi Genetica Preimpianto (PGT) - Raccomandazioni SIGU per la pratica clinica"* del 9 agosto 2017):

#### 1) "Non disclosure test":

L'analisi *"Non disclosure"* prevede l'accertamento della segregazione della patologia familiare nell'individuo a rischio della coppia, senza che il risultato venga comunicato (*non disclosure*) nel rispetto della scelta personale, e il parallelo accertamento della segregazione negli embrioni (PGT-M propriamente detta). Il non disclosure test si avvale sia della tecnica diretta sia di quella indiretta (si veda oltre).

L'analisi PGT-M con modalità *non disclosure* dovrà essere necessariamente associata ad analisi PGT-A ossia la diagnosi genetica preimpianto per la valutazione di anomalie cromosomiche embrionarie. Nel caso specifico di un'analisi *"non disclosure"* gli esiti delle analisi PGT-M e PGT-A verranno sinteticamente espressi nei termini di "trasferibilità" o "non trasferibilità": saranno ritenuti trasferibili tutti gli embrioni nei quali la PGT-M non ha rilevato la segregazione della patologia familiare e la PGT-A non ha rilevato anomalie cromosomiche. Saranno definiti "non trasferibili" gli embrioni nei quali la PGT-M ha rilevato la segregazione della patologia familiare E/O la PGT-A ha rilevato un'anomalia cromosomica, tuttavia non verrà specificata la ragione per la quale gli embrioni non saranno trasferibili.

## 2) Analisi di esclusione “exclusion test”:

L’analisi di esclusione prevede l’esecuzione di un’analisi di linkage finalizzata però al solo accertamento della trasmissione dell’aplotipo ereditato dal soggetto affetto della famiglia, senza sapere se tale aplotipo sia di fatto associato alla patologia. Tale indagine è applicabile solo nei casi in cui il nucleo familiare sia risultato informativo e il risultato viene espresso nei termini di “a rischio” e “non a rischio”. L’approccio di esclusione può essere associato, a scelta della coppia, ad analisi PGT-A già descritta sopra generalmente sui soli embrioni non a rischio.

In caso di malattie *X-linked* dominanti paterne o malattie *X-linked* di cui è nota la modalità di trasmissione, ma non la specifica variante patogenetica familiare, è possibile la sola determinazione del sesso cromosomico embrionario.

In caso di malattia genetica da mutazione “de novo” è possibile eseguire l’esame PGT-M attraverso analisi diretta; tuttavia, questa può essere proposta solo per alcune tipologie di alterazioni genetiche. In caso di mutazione “de novo” è sempre opportuno contattare il laboratorio per verificare la fattibilità tecnica dell’analisi.

La PGT-M può essere eseguita su biopsia di embrione allo stadio di clivaggio (day 3) e di blastocisti (day 5,6 e 7).

## Consulenza genetica, valutazione della fattibilità tecnica e set-up preclinico

È opportuno che ogni coppia candidata all’esecuzione della PGT-M esegua una consulenza genetica che avrà le seguenti finalità: a) informare la coppia sulla condizione genetica in esame (storia naturale, possibilità terapeutiche) e sulle percentuali di rischio di ricorrenza; b) verificare la possibilità di diagnosticare il difetto genetico in questione mediante PGT (fattibilità tecnica); c) discutere le metodologie e gli approcci disponibili per la diagnosi genetica con relativi livelli di accuratezza; e d) illustrare i risultati della casistica del centro ottenuti in relazione all’indicazione ed alla metodologia diagnostica utilizzata.

Al termine della consulenza il genetista avvierà la fase di set-up preclinico che prevede il disegno e l’ottimizzazione del protocollo diagnostico di analisi genetica da singola o poche cellule, adattato alla specifica malattia genetica e alle relative varianti genetiche familiari. L’attività di set-up viene eseguita sul DNA genomico dei due partner ottenibile da prelievo ematico o da tampone buccale. Talvolta potrà essere necessario ottenere il DNA di altri soggetti del nucleo familiare di uno o di entrambi i partner. Quando i risultati prodotti saranno in linea con i parametri suggeriti delle linee guida internazionali (ESHRE PGT-M Working Group , 2020), il protocollo potrà essere applicato a livello clinico.

Una volta conclusa la fase di set-up preclinico si potrà procedere all’analisi sugli embrioni.

## Analisi degli embrioni

L'analisi sugli embrioni per verificare la trasmissione della patologia monogenica per la quale la coppia è a rischio (PGT-M propriamente detta) si avvarrà di due diverse metodologie.

### *Analisi diretta:*

viene eseguita attraverso la ricerca diretta della o delle varianti geniche familiari. Tale indagine consente quindi di valutare la presenza/assenza della variante genica nel campione esaminato. Per ragioni tecniche la ricerca diretta potrebbe non essere applicabile per una specifica variante genica. Si procederà in tal caso alla sola analisi indiretta.

### *Analisi indiretta:*

anche definita analisi di *linkage* viene eseguita attraverso l'analisi di alcune sequenze ripetute del genoma note come STRs (short tandem repeats). Nella fase preliminare di set-up vengono identificati gli STR nella regione cromosomica nella quale è localizzato il gene di interesse e viene ricostruito l'aplotipo (combinazione di varianti) associato ad ogni specifica variante genica, nonché l'aplotipo selvatico (non associato a variante genica) qualora presente.

## Esiti della PGT-M

Gli esiti dell'analisi PGT-M saranno distinti in relazione alla modalità di trasmissione della condizione genetica in esame:

- **Affetto/ A rischio / Non trasferibile:** l'embrione è a rischio di sviluppare la malattia genetica indagata.
- **Non affetto/ Non a rischio / Trasferibile:** l'embrione non è a rischio di sviluppare la condizione né di trasmetterla nelle generazioni successive
- **Portatore:** l'embrione non è a rischio di sviluppare la malattia genetica indagata, ma è tuttavia a rischio di trasmetterla.
- **Nessuna diagnosi:** tale risultato viene ottenuto in caso di fallimento della reazione di Whole Genome Amplification (si veda oltre). Nel caso di una mancata diagnosi è indicato eseguire una nuova biopsia embrionale.
- **Diagnosi non conclusiva:** tale risultato si ottiene quando il procedimento di laboratorio ha portato a dei risultati di dubbia interpretazione. Nel caso di una diagnosi non conclusiva è indicato eseguire una nuova biopsia embrionale.

I diversi risultati dovranno essere interpretati nel contesto della specifica modalità di trasmissione della patologia indagata:

#### Patologie autosomico dominanti:

Il termine affetto si riferisce alla presenza della variante patogenetica familiare causativa della patologia e/o dell'aplotipo a rischio. Il termine non affetto si riferisce all'assenza della variante patogenetica familiare e/o dell'aplotipo a rischio.

#### Patologie autosomico recessive:

Il termine affetto si riferisce alla presenza in omozigosi o in eterozigosi composta della/e variante/i familiare/i e/o degli aplotipi a rischio. Il termine non affetto si riferisce all'assenza della/e variante/i familiare/i e/o degli aplotipi a rischio. Il termine portatore si riferisce alla presenza in eterozigosi semplice della variante familiare e/o di uno solo degli aplotipi a rischio.

#### Patologie legate al cromosoma X (X-linked) recessiva:

Il termine affetto si riferisce alla presenza della variante patogenetica familiare in emizigosi e/o dell'aplotipo a rischio in embrioni con complemento sessuale XY (maschi). Il termine non affetto si riferisce all'assenza della variante familiare e/o dell'aplotipo a rischio in embrioni indipendentemente dal complemento sessuale XX o XY. Il termine portatore si riferisce alla presenza in eterozigosi semplice della variante familiare e/o dell'aplotipo a rischio in embrioni con complemento sessuale XX (femmine).

#### Patologie legate al cromosoma X (X-linked) dominante:

Il termine affetto si riferisce alla presenza della variante patogenetica familiare in emizigosi o eterozigosi e/o dell'aplotipo a rischio in embrioni indipendentemente dal complemento sessuale XX o XY. Il termine non affetto si riferisce all'assenza della variante familiare e/o dell'aplotipo a rischio in embrioni indipendentemente dal complemento sessuale XX o XY.

### Tempi di refertazione

Il set-up preliminare alla PGT-M verrà concluso entro 30-40 giorni lavorativi a partire dall'accettazione dei campioni necessari a tale indagine. I risultati dell'esame PGT-M sugli embrioni saranno disponibili entro 7-10 giorni lavorativi dall'accettazione del campione. I termini definiti per la conclusione del set up preliminare e per la refertazione dell'analisi PGT-M, tuttavia, non sono perentori e potrebbero prolungarsi in caso di ripetizione dell'esame, risultati non ottimali o non conclusivi, approfondimenti diagnostici o dubbi interpretativi. Per l'esecuzione dell'analisi PGT-M 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.

## Metodologia diagnostica

### Whole Genome Amplification

Tutte le applicazioni di PGT richiedono la lisi delle cellule embrionarie biottizzate e l'isolamento del DNA nucleare (genomico). La fase successiva è costituita dal processo noto 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 successive analisi. Per le applicazioni di PGT la WGA viene eseguita mediante Ion SingleSeq Kit (Thermo Fisher Scientific).

### PGT-A e PGT-SR

#### *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 valutazione cromosomica mediante PGT-A/SR può essere applicata sia su singola cellula (biopsia del blastomero) sia su poche cellule (biopsia della blastocisti) di un embrione. La metodica ha una risoluzione pari ad 8 Mb, pertanto è in grado di identificare sbilanciamenti cromosomici di dimensioni superiori a 8 Mb ([validazione interna](#)).

Il sistema è in grado di rivelare l'eventuale presenza di mix di mosaicismo cromosomico, in particolare di evidenziare la presenza di un mosaicismo euploide-aneuploide per la convivenza di una linea cellulare euploide e una o più linee cellulari aneuploidi/alterate.

Il ReproSeq PGS – Ion GeneStudio S5 Plus è in grado di determinare la presenza di mosaicismo in basse percentuali, in particolare la soglia minima di rilevamento è pari al 30% come suggerito dalle Linee Guida internazionali (ESHRE, 2022). La validazione per la determinazione della soglia del mosaicismo cromosomico è stata effettuata anche internamente al laboratorio PGT di Eurofins Genoma ed i risultati sono stati pubblicati nel 2021 (Biricik et al. 2021).

#### *Criteri di refertazione*

L'analisi è in grado di rilevare mosaicismi compresi tra il 30% e il 70%. Il mosaicismo cromosomico verrà riportato con valori incrementali del 10% oltre la soglia di detection del 30%. Il trasferimento di un embrione a mosaico deve essere preceduto da una consulenza genetica dedicata.

Qualora nello stesso embrione vengano identificate sia aneuploidie cromosomiche a mosaico sia aneuploidie in forma omogenea l'embrione verrà considerato in ogni caso aneuploide.

### *Limiti della procedura e rischio di errore diagnostico per PGT-A/PGT-SR*

La valutazione dell'assetto cromosomico embrionario mediante PGT-A/SR come descritto è in grado di produrre risultati nel 95% dei campioni analizzati. Nei casi restanti l'analisi potrebbe non dar luogo a risultati (nessun esito) a causa di un fallimento della WGA o dare luogo a risultati non conclusivi in caso di interpretazione dubbia dei risultati.

I motivi tecnico/biologici di una mancata diagnosi potrebbero essere:

1. Nessun Risultato:
  - a. Assenza dei nuclei delle cellule embrionali campionate
  - b. Materiale embrionale campionato insufficiente per l'analisi richiesta
  - c. Problemi tecnici durante la biopsia o la procedura di "tubing" (inserimento delle cellule embrionali all'interno della provetta) delle cellule embrionali campionate, risultando nella perdita del materiale biologico da analizzare.
2. Risultato non conclusivo:
  - a. Profilo genetico non interpretabile a causa della scarsa qualità dell'embrione e/o degradazione del DNA nelle cellule embrionali campionate
  - b. Presenza di una contaminazione esterna di DNA
  - c. Dubbio di un genotipo poliploide (PGT-A) o discordanza tra la mutazione ed i marcatori in *linkage* con essa (PGT-M).

Nel caso di una mancata diagnosi per i motivi sopra descritti, si consiglia una nuova biopsia embrionale.

La contaminazione del campione analizzato da parte del materiale non embrionale (di origine materna o esterna) potrebbe portare ad un fallimento dell'analisi nonché ad un errore diagnostico nel caso in cui tale contaminazione non fosse evidenziata. Per determinare potenziali contaminazioni delle cellule embrinarie biopsiate, verrà richiesto un campione di bianco costituito dall'ultima goccia del terreno in cui era contenuta la biopsia prima del trasferimento nella provetta destinata al laboratorio. I campioni "bianchi" verranno amplificati in parallelo con i campioni corrispondenti per escludere eventuale contaminazione.

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.

È possibile che l'analisi PGT-A/SR non identifichi alcun embrione euploide e/o bilanciato.

L'analisi non è in grado di evidenziare:

- riarrangiamenti cromosomici bilanciati.
- 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 di qualsiasi tipologia se di dimensioni inferiori alla risoluzione (8 Mb).
- Varianti di sequenza (puntiformi) del DNA.
- Difetti di metilazione.
- Alcuni tipi delle Poliploidie (esempio triploidie 69, XXX). Questo limite viene eliminato quando il pannello di poliploidia viene applicato ai campioni di biopsia del TE in analisi.
- Mosaicismi cromosomici inferiori al 30%.

L'errore diagnostico della PGT-A/PGT-SR è stimato inferiore all'1% (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group et al. 2020).

## Pannello per Ploidia

### *Pannello NGS basato sul polimorfismo a singolo nucleotide (SNP)*

Il pannello delle poliploidie è basato sulla rilevazione di varianti di singolo nucleotide (SNPs) mediante sequenziamento di nuova generazione (NGS) con Ion AmpliSeq Polyploidy Panel Kit (Thermo Fisher Scientific). Sono inclusi nel kit un totale di circa 360 ampliconi che coprono circa 590 SNPs comuni nella popolazione generale.

### *I limiti del Pannello per Ploidia:*

- Il **Pannello per Ploidia** non può essere applicato da solo, è un test supplementare per PGT-A e PGT-SR standard.
- Il **Pannello per Ploidia** richiede un protocollo di test aggiuntivo anche se verrà applicato sullo stesso campione di biopsia embrionale. Ciò potrebbe richiedere un tempo di refertazione più lungo rispetto allo standard PGT-A e PGT-SR.
- Il **Pannello per Ploidia** non può essere riportato se il PGT standard risulta non informativo per lo stesso embrione.
- Il **Pannello per Ploidia** può essere applicato solo sulle cellule embrionali prelevati al livello di blastocisti (giorni 5-6-7 dalla fecondazione), e non sulle cellule embrionali prelevati allo stadio di segmentazione (giorno 3 dalla fecondazione).
- La valutazione del DNA Fingerprinting (QC fratellanza) può essere eseguita solo per coorti di 2 o più embrioni diploidi.

## PGT-M

### *Analisi diretta ed analisi indiretta*

L'analisi diretta per la ricerca di varianti familiari viene eseguita attraverso diverse metodologie selezione in base alle caratteristiche della specifica variante genica da indagare. Le tecniche di

riferimento sono costituite dal Minisequencing, dalla PCR fluorescente e dal deep sequencing tramite NGS per le applicazioni di PGT set-up. Il test PGT-M sulle cellule embrionali verrà eseguito sia con analisi diretta della mutazione familiare tramite la metodologia Minisequencing e/o PCR fluorescente, sia con analisi indiretta (*linkage*) tramite marcatori STR (short tandem repeat). Entrambe le strategie sono state validate e pubblicate da Eurofins Genoma (F. Fiorentino et al. 2006; F. Fiorentino 2003) e sono state accettate come metodo di riferimento per la diagnosi preimpianto di malattie monogeniche da parte di enti internazionali quali l'ESHRE PGT Consortium e GenQA (Deans Z. et. al., 2022, ESHRE PGT-M Working Group 2020).

### ***Limiti della procedura e rischio di errore diagnostico per PGT-M***

La valutazione della presenza di una o più patologie monogeniche negli embrioni è in grado di produrre risultati nel 95% dei campioni analizzati. Nei casi restanti l'analisi potrebbe non dar luogo a risultati (nessun esito) a causa di un fallimento della WGA o dare luogo a risultati non conclusivi in caso di interpretazione dubbia dei risultati.

I motivi tecnico/biologici di una mancata diagnosi potrebbero essere:

1. Nessun Risultato:
  - a. Assenza dei nuclei delle cellule embrionali campionate
  - b. Materiale embrionale campionato insufficiente per l'analisi richiesta
  - c. Problemi tecnici durante la biopsia o la procedura di "tubing" (inserimento delle cellule embrionali all'interno della provetta) delle cellule embrionali campionate, risultando nella perdita del materiale biologico da analizzare.
2. Risultato non conclusivo:
  - a. Profilo genetico non interpretabile a causa della scarsa qualità dell'embrione e/o degradazione del DNA nelle cellule embrionali campionate
  - b. Presenza di una contaminazione esterna di DNA
  - c. Dubbio di un genotipo poliploide (PGT-A) o discordanza tra la mutazione ed i marcatori in *linkage* con essa (PGT-M).

Nel caso di una mancata diagnosi per i motivi sopra descritti, si consiglia una nuova biopsia embrionale

La contaminazione del campione analizzato da parte del materiale non embrionale (di origine materna o esterna) potrebbe portare ad un fallimento dell'analisi nonché ad un errore diagnostico nel caso in cui tale contaminazione non fosse evidenziata. Per determinare potenziali contaminazioni delle cellule embrinarie biopsiate, verrà richiesto un campione di bianco costituito dall'ultima goccia del terreno in cui era contenuta la biopsia prima del trasferimento nella provetta destinata al laboratorio. I campioni "bianchi" verranno amplificati in parallelo con i campioni corrispondenti per escludere eventuale contaminazione.

La PGT-M può essere soggetta, più frequentemente di altre analisi molecolari, ad Allele Drop Out (ADO) fenomeno consistente nella mancata amplificazione di uno dei due alleli, dovuta a motivi tecnici caratteristici della diagnosi genetica da singola cellula, la cui incidenza può variare per diversi fattori (es.



regione di analisi, campione di partenza mono o pluricellulare, etc.) e può raggiungere il 5%. A causa di tale fenomeno uno degli alleli ricercati (mutato o *wild type*) potrebbe non essere identificato dando luogo a risultati errati. In particolare, in caso di mancata amplificazione dell'allele normale l'embrione sarebbe classificato come affetto essendo invece non affetto (falso positivo), viceversa in caso di mancata amplificazione dell'allele alterato si avrebbe un'erronea attribuzione di embrione non affetto essendo invece affetto (falso negativo).

La ricombinazione è il meccanismo di scambio di materiale genetico proveniente dai due genitori. Questo meccanismo riguarda lo scambio di porzioni omologhe di materiale genetico, che avviene tra due cromatidi appartenenti a due cromosomi diversi di una coppia omologa. A seconda della sua posizione sul genoma, il gene in esame può essere interessato da un evento di ricombinazione tra i cromosomi omologhi, che può comportare la sostituzione degli alleli affetti e normali. Nell'analisi indiretta di PGT-M verranno utilizzati marcatori quanto più possibile vicini al gene-malattia familiare per ridurre il rischio di errore legato ad eventi di ricombinazione.

L'analisi diretta mediante sequenziamento e l'analisi di *linkage* non sono in grado di evidenziare:

- Riarrangiamenti cromosomici
- Varianti di sequenza (puntiformi) del DNA salvo quelle espressamente ricercate
- Difetti di metilazione
- Mosaicismi

L'errore diagnostico della PGT-M è stimato inferiore all'1% (ESHRE PGT-M Working Group et al. 2020).

## Conferma dei risultati della diagnosi preimpianto mediante diagnosi prenatale

La diagnosi genetica preimpianto è meritevole di conferma diagnostica in corso di gravidanza. In particolare nelle coppie che hanno eseguito PGT-M e/o PGT-A/SR le indagini invasive (amniocentesi e villocentesi) sono da considerarsi le opzioni di riferimento. Il test prenatale non invasivo (NIPT), eseguito sul DNA fetale circolante (cfDNA), può essere proposto per una rivalutazione del rischio di anomalie cromosomiche per i cromosomi oggetto della PGT-A/SR prima di una decisione definitiva inerente la possibilità di sottoporsi o meno alla diagnosi prenatale invasiva di conferma.

Le opzioni di diagnosi prenatale andranno in ogni caso discusse nel corso di una consulenza genetica dedicata nella quale la coppia dovrà ricevere le informazioni necessarie a comprendere le caratteristiche del test (fonti biologiche, frazione fetale) ed i suoi limiti (specificità e sensibilità, mosaicismi feto-placentari), anche in rapporto alle altre tecniche di diagnosi prenatale disponibili.

Qualora la coppia decida di non sottoporsi a diagnosi prenatale dovrà essere discussa la possibilità di confermare l'esito della PGT in epoca post-natale tramite analisi del DNA del nascituro.

La diagnosi preimpianto non evidenzia altre malformazioni o difetti non specificamente ricercati è pertanto opportuno che a seguito di PGT, indipendentemente dalla tipologia e dall'esito dell'esame, la gravidanza venga monitorata mediante ecografie e altri accertamenti che il ginecologo ostetrico curante riterrà opportune secondo la buona pratica clinica.

## Referenze

- Biricik, Anil, Ettore Cotroneo, Maria Giulia Minasi, Pier Francesco Greco, Sara Bono, Matteo Surdo, Federica Lecciso, et al. 2021. «Cross-Validation of Next-Generation Sequencing Technologies for Diagnosis of Chromosomal Mosaicism and Segmental Aneuploidies in Preimplantation Embryos Model». *Life* 11 (4): 340. <https://doi.org/10.3390/life11040340>.
- Bredbacka, Peter , Antonio Capalbo , Kirsi Kananen , Ludovica Picchetta , Candido Tomás; Healthy live birth following embryo transfer of a blastocyst of tetrapronuclear (4PN) origin: a case report; *Hum Reprod* 2023 Sep 5;38(9):1700-1704
- Deans, Zandra C., Anil Biricik, Martine De Rycke, Gary L. Harton, Miroslav Hornak, Farrah Khawaja, Céline Moutou, Jan Traeger-Synodinos, Pamela Renwick, "Twelve years of assessing the quality of preimplantation genetic testing for monogenic disorders"; *Prenatal Diagnosis*, November 2022, <https://doi.org/10.1002/pd.6263>.
- ESHRE Working Group on Chromosomal Mosaicism, Martine De Rycke , Antonio Capalbo , Edith Coonen, Giovanni Coticchio , Francesco Fiorentino , Veerle Goossens , Saria Mcheik , Carmen Rubio, Karen Sermon, Ioannis Sfontouris , Claudia Spits, Joris Robert Vermeesch , Nathalie Vermeulen , Dagan Wells , Filippo Zambelli and Georgia Kakourou; ESHRE survey results and good practice recommendations on managing chromosomal mosaicism; *Human Reproduction Open*, pp. 1–18, 2022.
- ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, Georgia Kokkali, Giovanni Coticchio, Fernando Bronet, Catherine Celebi, Danilo Cimadomo, Veerle Goossens, et al. 2020. «ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology Good Practice Recommendations for Polar Body and Embryo Biopsy for PGT+». *Human Reproduction Open* 2020 (3): hoaa020. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa020>.
- ESHRE PGT-M Working Group, Filipa Carvalho, Céline Moutou, Eftychia Dimitriadou, Jos Dreesen, Carles Giménez, Veerle Goossens, et al. 2020. «ESHRE PGT Consortium Good Practice Recommendations for the Detection of Monogenic Disorders+». *Human Reproduction Open* 2020 (3): hoaa018. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa018>.
- ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, Edith Coonen, Carmen Rubio, Dimitra Christopikou, Eftychia Dimitriadou, Julia Gontar, Veerle Goossens, et al. 2020. «ESHRE PGT Consortium Good Practice Recommendations for the Detection of Structural and Numerical Chromosomal Aberrations+». *Human Reproduction Open* 2020 (3): hoaa017. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa017>.
- Fiorentino, F. 2003. «The Minisequencing Method: An Alternative Strategy for Preimplantation Genetic Diagnosis of Single Gene Disorders». *Molecular Human Reproduction* 9 (7): 399–410. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag046>.
- Fiorentino, F., A. Biricik, A. Nuccitelli, R. De Palma, S. Kahraman, M. Iacobelli, V. Trengia, et al. 2006. «Strategies and Clinical Outcome of 250 Cycles of Preimplantation Genetic Diagnosis for Single Gene Disorders». *Human Reproduction* 21 (3): 670–84. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei382>.
- 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>.
- Greco, Ermanno, Maria Giulia Minasi, e Francesco Fiorentino. 2015. «Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts». *New England Journal of Medicine* 373 (21): 2089–90. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1500421>.
- Marin D, Zimmerman R, Tao X, Zhan Y, Scott RT Jr, Treff NR. Validation of a targeted next generation sequencing-based comprehensive chromosome screening platform for detection of triploidy in human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2018;36:388–95.

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. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex031>.

Rubio, Carmen, José Bellver, Lorena Rodrigo, Gema Castellón, Alfredo Guillén, Carmina Vidal, Juan Giles, et al. 2017. «In Vitro Fertilization with Preimplantation Genetic Diagnosis for Aneuploidies in Advanced Maternal Age: A Randomized, Controlled Study». *Fertility and Sterility* 107 (5): 1122–29. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.03.011>.

Viotti, Manuel. 2020. «Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements». *Genes* 11 (6): 602. <https://doi.org/10.3390/genes11060602>.

## CONSENSO ALL'ESECUZIONE DEL TEST GENETICO PREIMPIANTO

|                                      |                  |
|--------------------------------------|------------------|
| *Il sottoscritto (partner maschile)  |                  |
| *Luogo di nascita                    | *Data di nascita |
| *Codice Fiscale:                     |                  |
| *Residente a:                        | *Via:            |
| *Telefono:                           | e-mail:          |
| *Documento                           | *Nr.             |
| *Rilasciato il                       | *da              |
|                                      |                  |
| *Il sottoscritto (partner femminile) |                  |
| *Luogo di nascita                    | *Data di nascita |
| *Codice Fiscale                      |                  |
| *Residente a:                        | *Via:            |
| *Telefono:                           |                  |
| *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 biopsia ed analisi genetica di singola o poche cellule embrionarie, 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.

Dichiariamo altresì di essere stati informati dei seguenti aspetti:

**ACCONSENTO/IAMO** *(in caso di più indicazioni barrare più caselle):*

all'esecuzione della/e seguente/i analisi su biopsia embrionale:

- ☐ PGT-A
- ☐ PGT-M
- ☐ PGT-SR
- ☐ PGT-A + Pannello Ploidia
- ☐ PGT-SR + Pannello Ploidia

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 per lo 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 singola o poche cellule embrionali per la diagnosi di malattie genetiche ereditarie, al fine di fornire ai soggetti sopra generalizzati, su esplicita loro richiesta, informazioni sullo stato di salute degli embrioni prodotti e da trasferire in utero, ai sensi dell'Art. 14 comma 5 della Legge 40/2004.

*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 sulle cellule embrionarie, 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 diagnostica inerenti la PGT sono riportati nel preventivo consegnato ai pazienti dal personale di Eurofins Genoma o dal personale del Centro di Procreazione Medicalmente Assistita.


Il costo dell'attività diagnostica inerente la fase di set-up preliminare alla PGT-M, ossia l'ottimizzazione del protocollo diagnostico, è un importo forfettario che gli utenti si impegnano a corrispondere in solido anche se in seguito, per cause non dipendenti da dal laboratorio Eurofins Genoma, non si effettuerà l'analisi PGT-M.

Il costo dell'attività diagnostica PGT-M/SR/A verrà corrisposto per ogni caso di diagnosi preimpianto eseguito secondo le indicazioni contenute nel preventivo condiviso.

Il costo delle tecniche di procreazione medicalmente assistita (ciclo di PMA e biopsia embrionaria), sono d 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 e cognome) \_\_\_\_\_

Tel. \_\_\_\_\_ E-Mail \_\_\_\_\_

Firma e timbro dello Specialista: \_\_\_\_\_