

## Prestazioni del Test di Screening Prenatale per Sindrome di Down e altre cromosomopatie nelle gestanti di età superiore a 35 anni: una strategia alternativa alla Diagnosi Prenatale Invasiva di routine

Silvia Corezzi\*, Verena Gentili\*\*, Marta Paggini\*

\*U.O. Biochimica Clinica Ospedale di Arezzo

\*\*S.S. Citogenetica Ospedale di Arezzo

### ABSTRACT

#### Performances of Prenatal Screening Test for Down's Syndrome and other chromosomal abnormalities in pregnant women older than 35: an alternative strategy to routine Invasive Prenatal Diagnosis

536 samples from pregnant women older than 35 at their expected date of delivery were tested in order to know the performances of the Screening Test for Down's Syndrome and other chromosomal abnormalities (Triple Test), as an alternative strategy to routine Invasive Prenatal Diagnosis (Amniocentesis). The test results, the amniocentesis reports and the outcomes of the pregnancies were collected. The performances were evaluated according to Bayes Theorem. The resulting 100% Sensitivity and 28% False Positive Rate in the group examined, show that the test could be successfully taken into consideration as an alternative strategy to amniocentesis by all pregnant women older than 35. As a consequence of the lower number of Amniocentesis, there would be fewer fetal losses and a lower expense for the Regional Health Systems.

### RIASSUNTO

Sono stati esaminati 536 casi di donne in gravidanza, con età al parto superiore o uguale a 35 anni, allo scopo di valutare le prestazioni del Test di Screening Prenatale per Sindrome di Down ed altre cromosomopatie (Triplo Test). Sono stati raccolti gli esiti dei test, gli esiti delle successive Diagnosi Prenatali Invasive (Amniocentesi) e gli esiti delle gravidanze. Infine i dati sono stati processati secondo il Teorema di Bayes. Le risultanti Sensibilità del 100% e False Positive Rate del 28% nel campione esaminato, indicano che il test potrebbe costituire una valida alternativa alla Diagnosi Prenatale Invasiva per tutte le gestanti di età più avanzata, con un importante risparmio di perdite fetali e di spesa per i Servizi Regionali.

### INTRODUZIONE

Il Test di Screening Prenatale per Sindrome di Down ed altre cromosomopatie viene capillarmente eseguito in tutta la Provincia di Arezzo fino dal 1994, grazie alla collaborazione fra i Medici Ostetrici della Provincia e il personale dei Laboratori Analisi delle 5 zone e dei loro punti di prelievo. Tutti i campioni prelevati nel territorio vengono inviati alla U.O. Biochimica Clinica di Arezzo e processati.

Il Test di Screening eseguito è il "Triplo Test", o Test di Wald, che consiste nella determinazione di Alfafetoproteina, Estriolo non coniugato e HCG nel sangue materno, dalla 15° alla 19° settimana di gravidanza e nel successivo calcolo del rischio di avere una gravidanza affetta, mediante analisi multivariata (1).

Il Test di Screening Prenatale è tradizionalmente utilizzato per selezionare, tra le gestanti al di sotto di una età soglia, quelle a rischio maggiore di avere una gravidanza affetta e per indirizzarle alla Diagnosi Prenatale gratuita.

L'utilizzo della età materna come variabile primaria per l'accesso alla Amniocentesi gratuita è previsto da tempo in tutte le legislazioni europee. In Italia il DM 10/9/1998

stabilisce la gratuità della prestazione per le gestanti di età superiore o uguale a 35 anni; la delibera n. 569 del 4/6/2001 della Regione Toscana interpreta la soglia di età come 35 anni "al parto", per cui anche donne di 34 anni accedono oggi alla amniocentesi gratuita.

Data l'elevazione della età media delle gestanti rispetto agli anni passati, ciò comporta attualmente l'esecuzione di un elevato numero di amniocentesi, con conseguente onere di spesa per i Servizi Sanitari Regionali e relative perdite fetali. Secondo dati reperibili in letteratura, infatti, l'amniocentesi è accompagnata da un rischio di abortività: 1% secondo Tabor (2) e 0.89% secondo Muller e coll. (3).

Il diffondersi delle informazioni relative alle prestazioni del Test di Screening ha spontaneamente generato nel nostro territorio, col tempo, una richiesta di utilizzo da parte di gestanti di età più avanzata, con lo scopo di NON eseguire la Diagnosi Prenatale Invasiva in caso di test negativo, cioè con un rischio inferiore al valore soglia.

L'idea della Diagnosi Prenatale Invasiva, infatti, con il rischio di perdite fetali associato ed i lunghi tempi di attesa di risposta, provoca nelle gestanti reazioni contrastanti, talvolta anche di netto rifiuto.

E' inoltre da segnalare la delicatezza della decisione

di sottoporsi a Diagnosi Prenatale Invasiva per quelle donne che sono riuscite ad avere una gravidanza in età più avanzata e dopo un lungo periodo di tentativi, per le quali quella gravidanza diventa particolarmente preziosa.

L'utilizzo del Test in età più avanzata è stato già descritto in letteratura (4), in considerazione del fatto che l'età combinata con i tre markers permetterebbe, con buone prestazioni, di evitare una parte delle perdite fetali indotte dalla amniocentesi. Di conseguenza si avrebbe anche una riduzione della spesa.

E' insito nel funzionamento del test l'aumento di sensibilità in funzione dell'età materna. Ciò è dovuto al fatto che una donna con un rischio per età più alto avrà, a parità di valori ematici, un più alto rischio finale di avere un feto affetto. Di conseguenza nella fascia di età sopra 35 anni, è più alta la quota dei test positivi, ma è parallelamente più alta la sensibilità (5).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di raccogliere dati per fornire una consulenza più accurata alle gestanti di età più avanzata, che chiedono di eseguire il Test di Screening prima di sottoporsi alla Diagnosi Prenatale Invasiva.

## MATERIALI E METODI

In un arco di tempo di 30 mesi (dal 1/4/99 al 30/9/2001), sono stati raccolti e analizzati 536 campioni di sangue da donne che avevano una età al parto superiore a 35 anni.

Di queste donne, 249 avevano spontaneamente chiesto l'esecuzione del Test di Screening dopo consultazione col proprio Medico di fiducia, con lo scopo di rinunciare alla Diagnosi Prenatale Invasiva in caso di basso rischio.

I restanti 287 campioni sono stati raccolti grazie alla collaborazione del personale infermieristico dell'Ambulatorio Ostetrico dell'Ospedale di Arezzo ed appartengono a donne in procinto di effettuare la Diagnosi Prenatale per età materna avanzata (che hanno acconsentito ad offrire un campione di sangue dopo adeguate spiegazioni).

Il campione di sangue è stato prelevato subito prima della esecuzione della amniocentesi e l'età gestazionale ecografica è stata misurata subito dopo il prelievo di liquido amniotico. I campioni di questo gruppo sono stati processati nei giorni immediatamente successivi al prelievo.

La distribuzione della età al parto nelle 536 donne in esame è riportata nella tabella 1. Al fine di ottimizzare le prestazioni del test è stata sempre utilizzata solo l'età gestazionale ecografica, tutti i dosaggi e le relative calibrature sono stati eseguiti in duplicato ed è stato inserito nel calcolo del rischio il peso della donna come fattore di correzione (5). Inoltre il nostro laboratorio ha regolarmente partecipato a programmi di controllo di qualità internazio-

nali (nel periodo in esame il controllo inglese NEQAS e il controllo del SSN francese). Si è inoltre eseguito il controllo di qualità epidemiologico, con monitoraggio continuo delle mediane complessive dei MoM e della quota dei positivi.

I metodi analitici in uso sono variati durante il periodo, perché i reattivi RIA Amerlex utilizzati dal 1993, non sono stati ad un certo momento più disponibili. Come alternativa sono stati scelti il sistema Delfia manuale della Ditta Wallac per HCG ed Alfetoproteina e il metodo RIA della ditta Biochem per l'Estriolo non coniugato. Le mediane di riferimento sono state sostituite con quelle specifiche, fornite dal Laboratorio dell'Ospedale S. Anna di Torino, per quanto riguarda il metodo Delfia, e dalla ditta Biochem, per quanto riguarda l'Estriolo.

Il software in uso è sempre stato Alpha, della ditta Logical Medical Systems di Londra.

Il cut off di positività per l'indice di rischio nel periodo considerato è stato 1:250 a termine, come indicato nel DM 10/9/98 per l'accesso alla Diagnosi Prenatale gratuita per le gestanti di età inferiore a 35 anni.

I prelievi di Liquido Amniotico sono stati eseguiti nei Presidi Ospedalieri di Arezzo e di Montevarchi (AR) e poi inviati alla Sezione di Citogenetica dell'Ospedale di Arezzo.

Per ogni liquido amniotico sono state allestite 4 colture primarie con 2 diversi tipi di terreno di coltura, onde evitare rischi di contaminazione e/o scarsa crescita cellulare.

Lo studio del cariotipo è stato eseguito su cellule provenienti da almeno 2 colture cellulari primarie. Sono state ricostruite almeno 4 metafasi provenienti sia da cellule cresciute con la tecnica in fiasca che da quelle cresciute con la tecnica in situ.

Il metodo di bandeggio utilizzato di routine è stato il GTG, con un livello di risoluzione non inferiore a 350 bande per set aploide.

Gli esiti delle Diagnosi Prenatali eseguite sono stati raccolti dalla Sezione di Citogenetica dell'Ospedale di Arezzo e, per le diagnosi mancanti, sono stati contattati direttamente i Medici di riferimento. Si sono raccolti in questo modo sia i dati di Diagnosi Prenatali eseguite altrove che gli esiti delle gravidanze proseguite in assenza di Diagnosi Prenatale.

Nel campione in esame sono infatti da segnalare 4 donne che, pur avendo età superiore a 35 anni al parto e Test di Screening con rischio superiore a 1:250, NON hanno voluto eseguire la Diagnosi Prenatale. Tutte hanno avuto un bambino non affetto.

## RISULTATI

Tra i 536 Triplo Test eseguiti, 150 sono risultati "posi-

**Tabella 1**

*Età delle gestanti al parto nel campione esaminato*

Età	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
N°	180	133	72	63	32	22	16	5	7	3	2	1

**Tabella 2**  
Classificazione dei campioni

	Affetti	Non affetti	Totale
Positivi	8 (VP)	142 (FP)	150
Negativi	0 (FN)	386 (VN)	386
Totale	8	528	536

**Tabella 3**  
Prestazioni del Test

Sensibilità	VP / (VP+FN)	8 / 8	100%
Specificità	VN / (VN+FP)	386 / 528	73.1%
Accuratezza diagnostica	(VP+VN) / totale test	394 / 536	73.5%
Predittività del risultato positivo	VP / (VP+FP)	8 / 150	5.3%
Predittività del risultato negativo	VN / (VN+FN)	386 / 386	100%

tivi", cioè con indice di rischio superiore o uguale a 1:250. la quota dei positivi (Positive Rate) è stata pertanto:  $150/536 = 28.0\%$ . Tra i 150 positivi, 138 sono risultati ad alto rischio per Sindrome di Down, 12 per Trisomia 18 e 2 per entrambe le patologie. All'analisi citogenetica successiva dei relativi liquidi amniotici si sono avuti in questo gruppo 5 Down e 2 Triplo X.

Sempre tra i test positivi, sono state registrati 1 morte fetale senza apparenti malformazioni e 1 feto plurimalformato, entrambi con cariotipo apparentemente normale.

Tutte le gravidanze con rischio inferiore a 1:250 hanno avuto un esito normale, quindi il numero dei Falsi Negativi (FN) è risultato uguale a zero.

Considerando come Veri Positivi (VP) tutti i casi di aneuploidie e/o malformazioni riscontrate (8 casi), i campioni sono stati classificati nella tabella 2.

Infine, le prestazioni del Test di Screening secondo il Teorema di Bayes sono riportate nella tabella 3.

## DISCUSSIONE

Nonostante la modesta numerosità del campione esaminato, i risultati sono stati interessanti. Hanno anche parzialmente contraddetto le conclusioni a cui erano giunti lavori analoghi (7).

E' stata verificata, come atteso, la maggiore sensibilità del Test in età materna avanzata. Non avendo avuto alcun Falso Negativo, si è dimostrata plausibile la scelta delle gestanti che rinunciavano alla Diagnosi Prenatale Invasiva con Test a basso rischio.

In conclusione, questo lavoro è stato utile come supporto nella consulenza alle donne di età più avanzata che chiedono spontaneamente il Test di Screening. Questo gruppo di gestanti si è mantenuto costante nel tempo nella nostra provincia: il loro numero è stato di 110 nell'anno

2000, 91 nel 2001 e 105 nel 2002. Solo 84 di esse hanno avuto un test positivo (27% come nello studio), ma ancora di meno sono state quelle che hanno poi realmente eseguito la Amniocentesi.

Comunque, anche se tutte le gestanti risultate ad alto rischio avessero eseguito la Amniocentesi, la ASL di Arezzo avrebbe evitato 222 Diagnosi Prenatali Invasive in 3 anni, con il relativo risparmio in termini sia economici che di perdite fetali.

## BIBLIOGRAFIA

1. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Nanchahal K, Royston P, Chard I, Haddow JE, Knigh GJ, Palomaki GE, Canick JA: Maternal serum screening for Down's Syndrome in early pregnancies. *BMJ* 1988;297:883-7.
2. Tabor A, Philip J, Madsen M, Bang J, Obel EB, Norgaard-Pedersen: Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet* 1986;1:1287-93.
3. Muller F, Thibaud D, Poloce F, Gelineau MC, Bernard M, Brochet C, Millet C, Real JY, Dommergues W, "Risk of Amniocentesis in women screened positive for Down Syndrome with second trimester maternal serum markers" *Prenat Diagn* 2002;22:1036-9.
4. Mancini G, Perona M, Dall'Amico D, Bollati C, Albano F, Mazzone I, Rosso M, Carbonara AO: Screening for fetal Down's Syndrome with maternal serum markers - an experience in Italy. *Prenatal Diagnosis* 1991;11:45-52.
5. Kennard Anne: Practicalities of a screening programme: Intensive Course on Screening for Down's Syndrome, 1997.
6. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Kennard A, Smith D: Maternal serum screening for Down's Syndrome: the effect of routine ultrasound scan determination of gestational age and adjustment for maternal weight. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99:144-9
7. Wenstrom,, Desai, Owen, DuBard, Boots: Comparison of multiple-marker Screening with the amniocentesis for the detection of fetal aneuploidy in women > or = 35 year old. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1941-2.