



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA

REGIONE AUTONOMA DELLA
SARDEGNA

ASSESSORADU DE SA PROGRAMMATZIONE, BILANTZU, CRÈDITU E ASSENTU DE SU
TERRITORIU

ASSESSORATO DELLA PROGRAMMAZIONE, BILANCIO, CREDITO E ASSETTO DEL
TERRITORIO

CENTRO REGIONALE DI PROGRAMMAZIONE

**LEGGE REGIONALE 7 AGOSTO 2007, N. 7
PROMOZIONE DELLA RICERCA SCIENTIFICA E
DELL'INNOVAZIONE TECNOLOGICA IN SARDEGNA"**

**MODELLO PER LA PROPOSTA DI TEMATICHE DI RICERCA DI
CARATTERE SPECIFICO E DI STRETTO INTERESSE REGIONALE (TENDER)**

TITOLO DEL TENDER

La diagnosi prenatale non invasiva (NIPD): sviluppo di nuove tecnologie e loro applicazione alle più frequenti malattie genetiche in Sardegna

DESCRIZIONE

La diagnosi prenatale delle malattie monogeniche e delle aneuploidie viene attualmente eseguita nei primi mesi di gravidanza attraverso procedure diagnostiche invasive (villocentesi e amniocentesi) che sono associate a un rischio di perdita fetale dello 0,5-1%. Negli ultimi 20 anni, in alternativa a tali procedure, sono state sviluppate alcune metodologie diagnostiche non invasive finalizzate alla riduzione del rischio di complicanza e all'anticipazione dell'epoca del prelievo. Alcuni di questi approcci si basano sull'analisi del DNA fetale libero (cffDNA, cell free fetal DNA), presente nel circolo periferico materno sin dalle prime settimane di gravidanza.

Diversi studi descritti in letteratura hanno dimostrato l'elevata sensibilità e specificità di alcune applicazioni diagnostiche eseguite sul cffDNA. Ne sono un esempio la determinazione del sesso fetale per la diagnosi di patologie X-linked, del fattore Rh⁺ fetale in donne Rh⁻, l'esclusione della presenza di mutazioni ereditate per via paterna nelle malattie autosomiche dominanti o recessive e, infine, la diagnosi delle più comuni aneuploidie fetali come le trisomie dei cromosomi 21, 13 e 18.

Il nostro Istituto è da anni impegnato nello svolgimento di attività di ricerca finalizzate allo sviluppo di protocolli per la diagnosi prenatale non invasiva di Beta Talassemia e per la determinazione del sesso fetale, nelle malattie legate al sesso, attraverso lo studio delle cellule fetali isolate dal circolo periferico materno e dal DNA fetale libero estratto dal plasma di donne in epoca gestazionale precoce (8°-11° settimana).

Nell'ambito di questo progetto intendiamo applicare le tecnologie di Next Generation Sequencing allo sviluppo di protocolli di diagnosi prenatale non invasiva di Beta Talassemia e delle più comuni anomalie cromosomiche di numero (Trisomie dei cromosomi 21, 13 e 18) attraverso lo studio del cffDNA.

OBIETTIVI GENERALI

Lo sviluppo di protocolli di diagnosi prenatale non invasiva potrebbe semplificare l'iter diagnostico a cui si sottopongono le donne a rischio per patologie genetiche o cromosomiche. In particolare, il prelievo di villi coriali o di liquido amniotico attualmente eseguito per via transaddominale, ecoguidato, in ambiente sterile e in regime di day hospital, verrebbe sostituito da un semplice prelievo venoso eseguito in regime ambulatoriale. La procedura diagnostica non invasiva potrebbe così essere estesa al monitoraggio della gravidanza fisiologica diventando un approccio di screening per tutte le donne in gravidanza. Infine, l'applicazione su larga scala di queste tecnologie avrebbe un impatto significativo sull'economia aziendale e la natura non invasiva dell'approccio diagnostico eliminerebbe totalmente il rischio di perdita fetale che è invece correlato alle tradizionali procedure invasive di prelievo, aumentando l'accettabilità della coppia verso la diagnosi prenatale.

OBIETTIVI SPECIFICI

- Sviluppare un protocollo per la diagnosi prenatale non invasiva di Beta Talassemia e di aneuploidie fetali attraverso l'uso del DNA fetale libero presente nel plasma materno;
- Anticipare i tempi della diagnosi prenatale, dalla 11^a-16^a settimana, epoca in cui vengono eseguite rispettivamente la villocentesi e l'amniocentesi, alla 8^a-9^a settimana di gravidanza;
- Annullare il rischio di perdita fetale correlato alle attuali procedure diagnostiche invasive;
- Aumentare l'accettabilità della coppia alla diagnosi prenatale;
- Ridurre la complessità e i costi delle procedure diagnostiche.

ATTI PROGRAMMATICI E RIFERIMENTI LEGISLATIVI COMUNITARI E NAZIONALI CHE IDENTIFICANO LA TEMATICA TRA LE PRIORITA' IN AMBITO REGIONALE E RELATIVE

MOTIVAZIONE CHE SOTTENDONO ALLE PRIORITA' DELLA STESSA.

Carta di Tallin 2008 dell'OMS

PSN 2011-2013 Ambiti prevenzione e Malattie rare

PSR 2008-2010

STATO DELL'ARTE

Le attuali procedure di diagnosi prenatale (PD) non invasive sono associate ad un rischio di mortalità fetale pari allo 0,5-1%. La scoperta che il DNA fetale libero (cffDNA) è presente nel sangue periferico materno, ha aperto nuovi orizzonti per lo sviluppo di protocolli di diagnosi prenatale non invasiva (NIPD).

Una delle principali difficoltà legate a questo tipo di studio è rappresentata dalla dispersione della quota fetale in quella materna, che costituisce la quasi totalità del DNA libero nel plasma (circa il 90%). Nonostante questo limite, numerosi studi hanno dimostrato la fattibilità della diagnosi non invasiva partendo dal cffDNA per la determinazione del sesso fetale in patologie X-linked, del fattore Rh⁺ fetale in donne Rh⁻, per l'esclusione della presenza di mutazioni ereditate per via paterna nelle malattie autosomiche dominanti o recessive.

Infine, l'utilizzo di tecnologie di Next Generation Sequencing e lo sviluppo di algoritmi dedicati, ha dimostrato la fattibilità della NIPD, in studi multicentrici su larga scala, per la rilevazione delle aneuploidie più comuni in gravidanze ad alto rischio (ref?).

Attualmente in diversi paesi Europei è possibile eseguire, attraverso il Servizio Sanitario Nazionale, alcuni test di NIPD come la determinazione del fattore Rh e del sesso fetale (ref?), ed è prevedibile che nel prossimo futuro potranno essere introdotti nella pratica clinica altri test non invasivi per la diagnosi delle più comuni malattie monogeniche e aneuploidie.

IMPATTO SUL TERRITORIO E RISULTATI ATTESI NEL BREVE PERIODO

L'applicazione su larga scala di questo nuovo approccio di diagnosi prenatale non invasiva avrebbe un impatto molto importante sul sistema sanitario pubblico in quanto determinerebbe una semplificazione delle procedure di diagnosi prenatale, una riduzione del rischio di perdita fetale e delle complicanze legate all'utilizzo di procedure invasive e, infine, una riduzione drastica dei costi.

Queste procedure diagnostiche innovative, opportunamente validate, potrebbero in futuro essere estese al monitoraggio della gravidanza fisiologica diventando un approccio di screening per tutte le donne in gravidanza.

MODALITA' DI SVOLGIMENTO DELLA RICERCA

Le coppie a rischio per β talassemia e per le aneuploidie fetali, che giungono presso il nostro Centro per sottoporsi a diagnosi prenatale invasiva, saranno informate del progetto e, in caso di adesione, saranno sottoposte al prelievo di 20 ml di sangue periferico, dopo la firma di un consenso informato.

Dopo la separazione del plasma, il cffDNA verrà estratto con l'utilizzo di kit commerciali.

Successivamente, i campioni di cffDNA e dei DNA parentali verranno sottoposti al sequenziamento del gene beta globinico o dei cromosomi implicati nelle più comuni aneuploidie utilizzando un approccio di amplicon-sequencing e la piattaforma PGM Ion Torrent.

La valutazione qualitativa e quantitativa dei dati ottenuti con il sequenziamento saranno infine sottoposti ad analisi bioinformatica attraverso l'utilizzo di specifici algoritmi.

LOCALIZZAZIONE SUL TERRITORIO DELLA SARDEGNA

Le attività di ricerca verranno svolte presso il laboratorio di Genetica Molecolare dell'Ospedale Microcitemico di Cagliari in collaborazione con il Servizio di screening e di consulenza genetica dello stesso Presidio e sarà rivolta in via preliminare alle donne che si riferiscono alla nostra struttura per diagnosi prenatale di talassemia e altre malattie genetiche nonché alle donne che presentano un alto rischio di anomalie cromosomiche fetali. In seguito potrà essere rivolta a tutte le donne a rischio in ambito regionale e sovra regionale,

SCADENZE E TEMPISTICHE DA RISPETTARE

Durata complessiva del progetto: 36 mesi

3-12 mesi: Set up dei protocolli con piattaforma PGM Ion Torrent

3-30 mesi: Raccolta dei campioni di plasma

6-32 mesi: Sequenziamento dei campioni con piattaforma PGM Ion Torrent

8-36 mesi: Analisi bioinformatica e statistica dei dati di sequenziamento

12-36 mesi: Comparazione dei risultati del sequenziamento con i dati di follow-up e, quando disponibili, con le indagini citogenetiche