

G.Miazzi¹, M.Pellegrino¹, G.Bragagnolo¹, F.Balducci¹, D.Bettio¹, C. Orsini², S.Tempesta³, F.Fiorentino³, S.Seraceni¹, M.Valisi⁴, L.Cardarelli¹
¹Cerba HealthCare Italia - RDI, Limena, Padova ; ²Centro Medico Santagostino, Milano; ³ Cerba HealthCare Lombardia, Milano; ⁴ Cerba HealthCare Italia

Introduzione

Il Non-Invasive Prenatal Test (NIPT) rappresenta il test di screening prenatale più accurato per l'identificazione delle principali aneuploidie fetali; tuttavia, l'interpretazione del risultato può diventare complessa in presenza di mosaicismismo fetale o placentare. Poiché il cfDNA analizzato deriva prevalentemente dal trofoblasto placentare, il segnale osservato può non riflettere fedelmente il cariotipo fetale, determinando falsi positivi, falsi negativi o profili borderline. Numerosi studi hanno evidenziato come il mosaicismismo rappresenti una delle principali cause biologiche di discordanza tra NIPT e diagnostica invasiva. In particolare, valori prossimi alle soglie decisionali possono identificare una "grey zone" nella quale la classificazione automatica del test non è sufficiente a descrivere la reale complessità biologica sottostante. Presentiamo un caso di trisomia 21 a mosaico nel quale l'interpretazione critica delle metriche bioinformatiche del NIPT ha consentito di sospettare precocemente un quadro biologico compatibile con mosaicismismo, successivamente confermato mediante diagnostica invasiva.

Presentazione del Caso

Descriviamo il caso di una donna di 37 anni (para 1011), che ha eseguito prelievo per NIPT alla 12a settimana di gestazione. L'ecografia fetale risultava nella norma e test combinato con esito di basso rischio. L'algoritmo di analisi del NIPT ha rilevato esito di basso rischio, ma con valori di LLR per trisomia 21 prossimi al cut-off e metriche complessive borderline per T21. Il referto è stato emesso come non conclusivo proponendo la ripetizione del test su nuovo prelievo eseguito a distanza di due settimane. L'analisi è stata eseguita in doppio ottenendo due esiti contrastanti: una sola delle due repliche ha evidenziato un risultato ad alto rischio per trisomia 21, con valori solo lievemente superiori al cut-off. Alla luce di tali evidenze, l'esame è stato refertato indicando aumentato rischio di T21, è stata effettuata consulenza genetica e proposto approfondimento diagnostico invasivo. La coppia ha optato per villocentesi, pur consapevole dei limiti legati alla rappresentatività del tessuto stesso. L'analisi del cariotipo (presso altro laboratorio) ha evidenziato la presenza di trisomia del cromosoma 21 a mosaico (circa 40%), confermata anche mediante array-CGH. La coppia ha optato per ITG.

Materiali e Metodi

Isolamento del plasma materno, estrazione cfDNA, preparazione delle librerie, sequenziamento ed analisi dei risultati. Metodo VeriSeq NIPT Solution V2, piattaforma Illumina, certificato CE-IVD. Sequenziamento Whole-Genome Assay mediante NextSeq 550Dx System e analisi bioinformatica dei dati. Cariotipo su villi coriali, 400 bande ISCN. Array-CGH 60K Agilent Technologies.

Risultati

Il **primo campione** è stato classificato come **"No Anomaly Detected"**, ma presentava **parametri non pienamente compatibili con un profilo euploide**.

Pur risultando formalmente negativo, il profilo mostrava infatti una deviazione verso un segnale trisomico che ha portato alla ripetizione dell'analisi.

Run

- risultato: No Anomaly
- LLR T21 = 0,54
- T-statistic = 3,20
- mosaic ratio = 14,6%
- mosaic LLRT = 7,71
- FF = 9,1%

region	metric_name	I prelievo
NA	frag_size_dist	0.005443674958915119
NA	fetal_fraction	0.09065568876318081
NA	NCV_X	-8.21285837603271
NA	NCV_Y	198.3535411196315
NA	number_of_cnv_events	0
NA	non_excluded_sites	20366624
chr21	region_classification	NO ANOMALY DETECTED
chr21	chromosome	chr21
chr21	region_llr_trisomy	0.543659451619801
chr21	region_t_stat_long_reads	3.20496487934155
chr21	region_mosaic_ratio	0.14631939474612538
chr21	region_mosaic_llr_trisomy	7.713761346442266

Tab.1 – Metriche relative al primo campione

Run 1

- risultato: Detected +21
- LLR T21 = 3,53
- T-statistic = 3,69
- mosaic ratio = 23,8%
- mosaic LLR = 7,18
- FF = 7,1%

Run 2

- risultato: No Anomaly
- LLR T21 = -0,44
- T-statistic = 2,91
- mosaic ratio = 21,1%
- mosaic LLRT = -0,44
- FF = 7,3%

region	metric_name	II prelievo run1	II prelievo run2
NA	frag_size_dist	0.0092680493593644	0.008142791542390798
NA	fetal_fraction	0.07176345365307042	0.073777076364598534
NA	NCV_X	-7.448373796860997	-7.21820373998425379
NA	NCV_Y	168.29632806551973	167.194427602299
NA	number_of_cnv_events	0	0
NA	non_excluded_sites	16040993	14021531
chr21	region_classification	DETECTED: +21	NO ANOMALY DETECTED
chr21	chromosome	chr21	chr21
chr21	region_llr_trisomy	3.528877484079543	0.44451946623157035
chr21	region_t_stat_long_reads	3.687515474748664	2.9164158291354396
chr21	region_mosaic_ratio	0.238439006715574	0.21139101179648107
chr21	region_mosaic_llr_trisomy	7.17658847297918	-0.44451946623157035

Tab.2 – Metriche relative al secondo campione

L'approfondimento diagnostico su villi coriali ha evidenziato trisomia 21 a mosaico (~40%), che è stata confermata anche mediante array-CGH.

Discussione e Conclusioni

Il mosaicismismo cromosomico rappresenta una delle principali cause di NIPT borderline e di variabilità del segnale cfDNA.

Questo caso ribadisce che:

- un risultato formalmente negativo non è necessariamente rassicurante quando le metriche quantitative risultano prossime alle soglie decisionali;
- valori borderline di LLR, T-statistic e mosaic ratio possono costituire indicatori precoci di mosaicismismo;
- la ripetizione dell'analisi e la valutazione della riproducibilità del segnale possono fornire informazioni clinicamente rilevanti;
- la consulenza genetica e la diagnostica invasiva restano fondamentali nei casi dubbi;
- l'interpretazione esperta delle metriche bioinformatiche consente di migliorare il riconoscimento delle condizioni biologiche complesse che sfuggono ai modelli classificativi standard.

Nei risultati prossimi al cut-off, il segnale quantitativo può essere più informativo dell'esito della classificazione finale generata dall'algoritmo. L'analisi critica delle metriche di mosaicismismo rappresenta uno strumento fondamentale per identificare aneuploidie fetali complesse e guidare correttamente il percorso diagnostico prenatale.

Il caso presenta numerose analogie con quanto riportato da Kang et al., che hanno descritto un mosaicismismo fetale per trisomia 21 caratterizzato da valori di Z-score compresi tra 2,5 e 3,5, cioè in una fascia intermedia di difficile interpretazione. Gli autori dimostrano come queste configurazioni analitiche siano frequentemente associate a mosaicismismi e possano sfuggire ai modelli decisionali binari utilizzati nei workflow standard del NIPT. Analogamente, Mu et al. hanno mostrato come i mosaicismismi per trisomia 21 e le discordanze fetoplacentari possano determinare risultati apparentemente rassicuranti nonostante la presenza di una reale aneuploidia fetale.

Per la presente analisi, il dato maggiormente informativo non è stato rappresentato dalla classificazione finale del test, bensì dalla combinazione di valori LLR prossimi al cut-off, indici suggestivi di mosaicismismo, variabilità tra repliche analitiche, persistenza del segnale borderline/trisomico in campioni successivi.

L'insieme di questi elementi ha consentito di riconoscere un pattern compatibile con mosaicismismo prima della conferma citogenetica. Questo risultato supporta l'opportunità di integrare le metriche quantitative avanzate nella valutazione clinica del NIPT, superando una lettura esclusivamente dicotomica del risultato.

Bibliografia

- Kang et al., Front Med, 2022
- Mu et al., Int J Womens Health, 2026
- Gosavi et al., Ann Acad Med Singap, 2023
- Huijsdens-van Amsterdam et al., Eur J Hum Genet, 2018
- Hartwig et al., Prenat Diagn, 2017
- Rosenblum et al., Placenta, 2024