

ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA



**INDICAZIONI PER LA DIAGNOSI GENETICA PREIMPIANTO (PGT)
CON PARTICOLARE RIFERIMENTO ALL'EMOFILIA**



A CURA DI

**MIMOSA MORTARINO E ISABELLA GARAGIOLA
PER IL GRUPPO DI LAVORO GENETICA DELL'AICE**

EDIZIONE MAGGIO 2021

Sviluppo e cronologia del documento

La prima stesura del documento è stata redatta da Mimosa Mortarino e Isabella Garagiola (Centro Emofilia e Trombosi Angelo Bianchi Bonomi, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano). Tale versione è stata sottoposta al Gruppo di Lavoro Genetica dell'AICE, presieduto da Angiola Rocino, Presidente AICE, coordinato da Lucia D. Notarangelo e Francesco Bernardi e costituito, oltre dalle due autrici, da Donata Belvini, Maurizio Margaglione, Massimo Morfini, Federica Riccardi, Roberta Salviato, Rosa Santacroce, Annarita Tagliaferri, Federica Zarrilli.

La versione risultante dalle revisioni del GdL Genetica, con il contributo di Antonio Coppola, Segretario AICE, è stata approvata dal Consiglio Direttivo AICE (Presidente: A. Rocino; Vice-Presidente: R.C. Santoro; Consiglieri: A.C. Molinari, C. Santoro, E. Zanon; Rappresentante ISS: A. Giampaolo) e dal Comitato Scientifico AICE (Presidente: A. Tripodi; Componenti: R. De Cristofaro, G. Di Minno, F. Peyvandi, M. Pinotti, P. Simioni), e inviata, quindi, ai Soci AICE via e-mail il 07/06/2021.

A seguito dei commenti e/o proposte di revisione pervenuti dai Soci D. Cultrera e E. Grandone, è stata redatta la versione finale del documento, approvata dal Consiglio Direttivo e dal Comitato Scientifico AICE, che ha ottenuto il parere favorevole dei Soci mediante consultazione online attraverso il sito ufficiale AICE (www.aiceonline.org), indetta il 15.06.2021 e conclusasi il 25.06.2021. Il documento è stato pubblicato sul sito AICE in data 28.06.2021.

Indice	<i>pag.</i>
Premessa	4
Introduzione	5
Indicazioni generali	5
Criteri specifici per malattie monogeniche (PGT-M)	6
Percorso PGT-M per coppie a rischio di emofilia	6
Consulenza multidisciplinare: indicazioni generali	6
Fattibilità dell'analisi genetica	7
Ciclo PMA e biopsia dell'embrione	10
Analisi genetica degli embrioni e consulenza genetica post-test	10
Scongelamento e trasferimento dell'embrione	10
Allegato A: Strutture, personale e tracciabilità del campione	12
Allegato B: Approfondimenti relativi alla consulenza multidisciplinare	14
Riferimenti bibliografici	17

Premessa

Scopo di questo documento è la diffusione delle indicazioni ad oggi riconosciute, sulla base delle evidenze scientifiche, riguardo al percorso di diagnosi genetica pre-impianto (PGT, Preimplantation Genetic Testing), con particolare riferimento all'emofilia. L'obiettivo è di incrementare le conoscenze e la consapevolezza di questa opzione riproduttiva nella comunità specialistica italiana. La formulazione di queste indicazioni si basa su documenti già pubblicati da Società Scientifiche italiane ed europee focalizzandosi, in modo particolare, sulle malattie legate al cromosoma X di cui l'emofilia fa parte:

- **Raccomandazioni della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) 2017 per la pratica clinica. Diagnosi Genetica Preimpianto – PGT (approvate dal Consiglio Direttivo SIGU il 9 agosto 2017) [1];**
- **European Society of Human Reproduction and Embriology (ESHRE) PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT (ESHRE PGT Consortium Steering Committee; Carvalho F et al. Hum Reprod Open 2020) [2];**
- **ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders (ESHRE PGT-M Working Group; Carvalho F et al. Hum Reprod Open 2020) [3].**

Introduzione

La PGT permette di individuare la presenza di varianti genetiche e/o di alterazioni cromosomiche in embrioni ottenuti da procedure di procreazione medicalmente assistita (PMA) in fasi molto precoci di sviluppo, prima del loro trasferimento in utero.

È possibile, in base alla finalità, distinguere 3 tipi di PGT:

- PGT-M (monogenic; PGT per malattie monogeniche);
- PGT-SR (structural rearrangements; PGT per anomalie cromosomiche strutturali);
- PGT-A (aneuploidies; PGT per aneuploidie, cioè anomalie numeriche dei cromosomi).

Le indicazioni per PGT sono sovrapponibili a quelle della diagnosi prenatale (DPN) invasiva e cioè sono finalizzate alla diagnosi di una specifica grave malattia geneticamente trasmissibile, causata da varianti del DNA, o da una anomalia cromosomica numerica o strutturale, come chiarito dalla sentenza 229/2015¹ e riportato nelle Raccomandazioni SIGU del 2017 per la pratica clinica [1].

La PGT-M può essere offerta, come opzione riproduttiva, a tutte le coppie a rischio di avere un figlio affetto da una grave malattia genetica causata da varianti di un singolo gene, in seguito a certificazione della rilevanza della malattia genetica, rilasciata dal medico specialista nello specifico settore rappresentato, per ciò che attiene all'emofilia, dallo specialista del Centro Emofilia.

È tecnicamente possibile effettuare la PGT-M per malattie autosomiche recessive, autosomiche dominanti o legate al cromosoma X, come ad esempio l'emofilia A e B, in cui sia noto il gene e la variante patogenetica causa della malattia rispetto alla quale la coppia ha un rischio aumentato di avere un figlio affetto.

Indicazioni generali

L'inclusione o esclusione di una coppia dal percorso PGT dovrebbe essere valutata da un team multispecialistico costituito da: medico genetista, biologo/citogenetista molecolare, specialista del Centro emofilia, psicologo, ginecologo ed embriologo sulla base di criteri ben definiti.

Secondo le indicazioni in letteratura, la PGT può essere applicata solo nel caso in cui la diagnosi genetica sia tecnicamente fattibile e l'affidabilità della diagnosi sia elevata. Le procedure attuali, nella maggior parte dei centri PMA-PGT, comportano un tasso di errore complessivo (con conseguente errore di diagnosi) compreso tra l'1 e il 3% [4]. Ogni centro dovrebbe includere queste informazioni nei propri consensi informati.

Possibili criteri di esclusione dal percorso PGT comprendono: aspetti legati alla sicurezza della procedura per la specifica coppia, l'età della donna, un elevato indice di massa corporea (BMI), pro-

¹ Sentenza della Corte Costituzionale n. 229, 6 ottobre - 21 ottobre 2015 pubblicata su G.U. n. 46 del 18 novembre 2015.

blematiche di recupero dei gameti maschili o femminili, altre condizioni cliniche che rendano controindicato il percorso. Inoltre, l'esclusione dalla PGT deve essere considerata se la donna presenta sintomi gravi della malattia genetica, per la quale è richiesta la PGT, e che potrebbero indurre complicazioni durante la stimolazione ovarica, il recupero degli ovociti, la gravidanza o il parto, o aumentare i rischi per il nascituro.

Importante è la valutazione di eventuali problemi psicologici della coppia, legati alla patologia genetica per cui la PGT è richiesta o dovuti ad altre condizioni.

Criteri specifici per malattie monogeniche (PGT-M)

Come già accennato, la PGT-M può essere effettuata quando la variante genica, causa della malattia, è considerata patogenetica [5] ed è associata ad una malattia con gravi effetti sulla salute che possono manifestarsi alla nascita, nell'infanzia o in età adulta.

L'esecuzione della PGT-M è inappropriata nel caso di varianti geniche di significato patogenetico sconosciuto, incerto o non noto, che non siano predittive di un fenotipo malattia.

È, inoltre, possibile offrire la PGT-M per malattie recessive note, legate al cromosoma X e causate da un singolo gene, con una diagnosi clinica chiara e inequivocabile in cui non sia nota la variante patogenetica presente nel probando, ma è possibile identificare gli aplotipi a basso e ad alto rischio, sulla base della storia familiare.

Prima di illustrare il percorso specifico di PGT, con riferimenti specifici all'emofilia, si sottolinea l'importanza di accertarsi che la procedura di PGT venga eseguita in centri PMA e laboratori di genetica con comprovata esperienza nel settore in grado di assicurare elevata qualità delle procedure richieste, nel rispetto delle normative vigenti.²

Percorso PGT per coppie a rischio di Emofilia

Il percorso comprende diverse fasi (Figura 1):

1) Consulenza multidisciplinare: indicazioni generali

Prima di iniziare il percorso, la coppia dovrà ricevere una consulenza multidisciplinare relativa al ciclo di PMA e una consulenza genetica relativa a tutti gli aspetti della PGT da parte di un team multispecialistico (ginecologo, genetista, psicologo).

Dovrà, inoltre essere raccolta la seguente documentazione:

- **referto genetico relativo alla malattia monogenica, analisi del cariotipo o altri particolari esami relativi alla coppia e/o alla famiglia e al probando;**

² Per maggiori dettagli consultare l'allegato A "Strutture, personale e tracciabilità del campione"

- **storia riproduttiva della donna, valutazione ginecologica e dello stato di fertilità;**
- **storia riproduttiva del partner, valutazione andrologica e dello stato di fertilità, analisi dello sperma;**
- **altre valutazioni relative allo stato di salute della coppia che potrebbero incidere sul risultato della PGT.**

Nel caso dell'emofilia, la coppia dovrà ricevere anche una consulenza da parte dello specialista del Centro Emofilia, in cui verranno affrontate le tematiche relative alla malattia, quali: tipo di emofilia, gravità, manifestazioni cliniche, possibilità terapeutiche attualmente disponibili. Inoltre, la donna portatrice verrà attentamente valutata dal punto di vista fenotipico, mediante dosaggio del fattore carente e raccolta dell'anamnesi circa un'eventuale sintomatologia emorragica.

La consulenza multidisciplinare non deve essere direttiva ma deve fornire le informazioni riguardo tutte le possibili opzioni riproduttive disponibili per la coppia, in modo che sia la coppia stessa a valutare vantaggi e svantaggi del percorso e decidere con serenità, e in modo consapevole e motivato, quale possa essere il percorso più adeguato alle proprie aspettative. È necessario discutere con la coppia le alternative alla PGT-M, in particolare le possibilità di accesso a una diagnosi prenatale invasiva o non invasiva³.

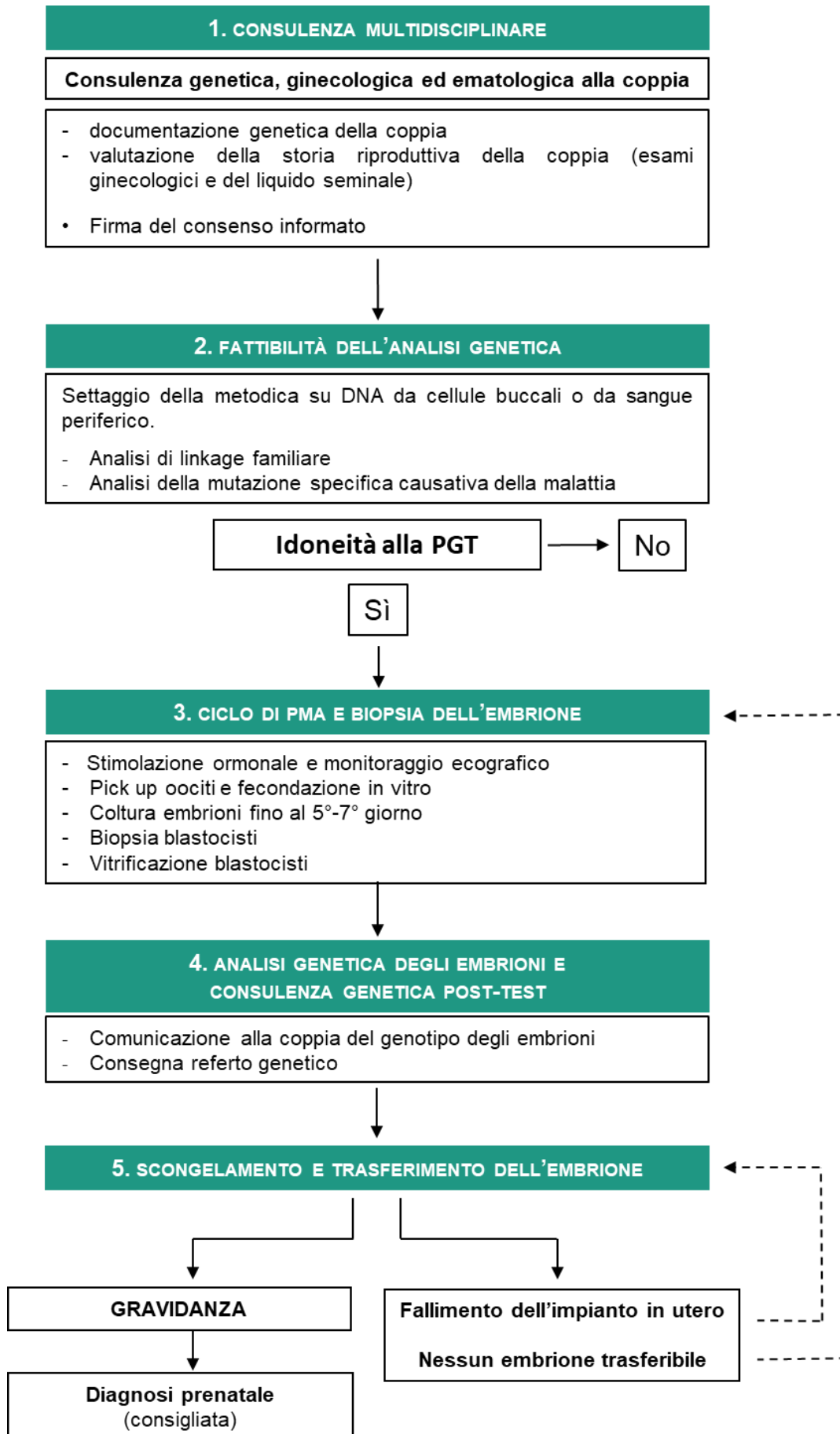
Il giudizio di idoneità al percorso dovrà essere unanime da parte degli specialisti coinvolti nel team multidisciplinare e dovrà tener conto dell'esito degli accertamenti richiesti nel corso della prima valutazione multispecialistica. Inoltre, dovrà essere fornito alla coppia un adeguato supporto psicologico durante l'intero percorso di PGT, includendo anche i cicli non andati a buon fine. In particolare, tale supporto dovrà essere fornito a coppie che hanno già vissuto esperienze traumatiche a causa di ripetuti fallimenti riproduttivi o con evidente stress legato a tematiche riproduttive, a coppie che hanno già avuto un figlio affetto da emofilia o a quelle che specificamente richiedano un supporto psicologico.

2) Fattibilità dell'analisi genetica

In caso la coppia decida di intraprendere il percorso, la fase successiva è rappresentata da un'analisi di fattibilità. Questa è di importanza fondamentale e consiste nello studio personalizzato e nell'ottimizzazione di una strategia diagnostica appropriata per effettuare la PGT della specifica malattia genetica per la quale la coppia è a rischio di trasmissione. Il protocollo diagnostico viene ottimizzato utilizzando campioni di DNA (sangue periferico, cellule buccali, ecc.) della famiglia ed è volta a confermare la presenza della variante genica causa della malattia, ove possibile, nonché per identificare i marcatori polimorfici informativi da utilizzare.

³ Ulteriori dettagli sono contenuti nell'allegato B "Approfondimenti consulenza multidisciplinare".

FIGURA 1. PERCORSO PGT-M PER COPPIE A RISCHIO DI EMOFILIA



Nel caso di PGT per emofilia, il genetista, dopo la consulenza genetica, dispone i prelievi da eseguire, oltre che alla coppia, anche all'eventuale probando. Nel caso il DNA del probando non sia disponibile, l'analisi va estesa ad altri membri della famiglia.

Il disegno della strategia diagnostica, l'efficienza e l'affidabilità dei test preimpianto dovrebbero essere in linea con i parametri stabiliti dalle linee guida internazionali ESHRE PGT Consortium [2,3], che prevedono per ciascun protocollo di PGT:

- efficienza di amplificazione per locus >95%;
- ADO (allele drop-out) rate (percentuale di mancata amplificazione di un allele) per locus <5%;
- contamination rate (percentuale di contaminazione) <5%.

La metodica da applicare può variare in base alla specifica variante genica causa della malattia:

– in caso l'emofilia sia causata da varianti puntiformi, delezioni o duplicazioni di piccole dimensioni, le metodiche utilizzate per l'analisi diretta della variante genica sono rappresentate da: sequenziamento automatico, tecnica di mini-sequencing e genotipizzazione mediante TaqMan-assays. Possono essere utilizzate anche altre tecniche, a seconda della specifica esperienza del laboratorio. Ciascuna tecnica va, comunque, opportunamente validata per l'applicazione a PGT;

– in caso l'emofilia sia causata da inversioni, delezioni o duplicazioni di grandi dimensioni, non amplificabili con metodica PCR tradizionale, la strategia da preferire è rappresentata da un'analisi indiretta o aplo-tipica. In questo caso è richiesto uno studio familiare utilizzando marcatori polimorfici del DNA (Short Tandem Repeat-STR o Single Nucleotide Polymorphism-SNP) intragenici o extragenici (a monte/valle del gene/locus), possibilmente distanti dal gene non più di 1 Mb (megabase), al fine di minimizzare il rischio di ricombinazione genetica; preferibilmente gli STR utilizzati dovrebbero essere ripetizioni di tri- tetra o penta-nucleotidi.

Possono essere utilizzati, come marcatori anche gli SNP, che sono più frequenti nel genoma rispetto agli STR ma, essendo meno informativi, è necessario analizzarne un maggior numero.

È raccomandato utilizzare l'analisi indiretta solo in caso sia disponibile un adeguato numero di familiari sani e affetti, in modo da poter stabilire con certezza l'aplotipo a rischio di trasmissione della malattia.

In linea generale, è preferibile ottimizzare protocolli diagnostici che prevedano l'analisi diretta della variante genica, unitamente all'analisi indiretta mediante l'amplificazione di una serie di marcatori polimorfici. Maggiore è il numero di marcatori polimorfici informativi maggiore è, infatti, l'affidabilità del protocollo diagnostico. Ciò permette, inoltre, di effettuare sia un controllo del risultato ottenuto con l'analisi diretta, sia di evidenziare eventuali fenomeni di ADO o ricombinazione. I

marcatori polimorfici possono anche fornire informazioni sulla ploidia dell'embrione e su eventuali contaminazioni cellulari esterne.

La coppia potrà intraprendere il percorso PGT solo nel caso in cui l'analisi di fattibilità rilevi la presenza di marcatori informativi sufficienti, almeno 2, secondo le linee guida SIGU [1] e ESHRE [2,3], uno localizzato all'estremità 5' e l'altro all'estremità 3' del gene in esame. L'affidabilità della tecnica deve, inoltre, essere elevata (>99%) con una possibilità di errore di 1% circa.

3) Ciclo PMA e biopsia dell'embrione

Il passo successivo è rappresentato dalla stimolazione ormonale della donna, seguita dal prelievo di ovociti, eseguito in regime di day-hospital. Gli ovociti ottenuti verranno fecondati [Fertilizzazione In Vitro ed Embryo Transfer (FIVET) o IntraCytoplasmic Sperm Injection (ICSI)] e posti in coltura fino al 5° o al 7° giorno, quando gli embrioni avranno raggiunto lo stadio di blastocisti. A questo stadio viene eseguita la biopsia della blastocisti per prelevare alcune cellule embrionarie che saranno analizzate per la ricerca della variante genica causa dell'emofilia, dei marcatori polimorfici informativi identificati dall'indagine genetica di fattibilità e dei marcatori per l'identificazione del sesso. Gli embrioni, da cui sono state prelevate le cellule, vengono crioconservati singolarmente, mediante tecnica di vitrificazione, in attesa del risultato dell'analisi genetica.

4) Analisi genetica degli embrioni e consulenza genetica post-test

L'analisi genetica identifica gli embrioni trasferibili che, nel caso di malattie legate al cromosoma X, sono tutti quelli di sesso femminile e quelli maschili che hanno ereditato il gene wild type, e quelli non trasferibili, cioè gli embrioni di sesso maschile in cui è presente la variante genica causa della malattia e, quindi, affetti. E' da sottolineare che il processo decisionale riguardante quali embrioni siano trasferibili deve essere discusso con la coppia ancor prima dell'inizio del ciclo di PMA-PGT. In particolare, in caso di PGT-M, dovranno essere fornite alla coppia tutte le informazioni relative al genotipo degli embrioni.

La coppia viene informata dell'esito dell'analisi genetica durante un colloquio con i medici del centro PMA-PGT, nel corso del quale viene programmato il trasferimento in utero degli embrioni.

5) Scongelo e trasferimento dell'embrione

Il trasferimento non riguarda necessariamente i soli embrioni risultati trasferibili in quanto la coppia può esprimere la volontà di trasferire anche gli embrioni con risultato dubbio o affetti. Gli embrioni che non vengono trasferiti rimarranno crioconservati.

È anche opportuno informare la coppia della possibilità di ottenere una conferma diagnostica del risultato della PGT mediante diagnosi prenatale invasiva.

In aggiunta, qualora la donna non voglia sottoporsi a test invasivi, è indicato informare la coppia dell'importanza di verificare la diagnosi molecolare effettuata con PGT mediante analisi del livello di fattore carente alla nascita, eseguibile, nel caso di Emofilia A, oppure mediante prelievo di sangue dal cordone ombelicale o, ancora, del DNA del neonato.

Allegato A

Strutture, personale e tracciabilità del campione

È fondamentale eseguire la PGT in centri PMA e laboratori di genetica con comprovata esperienza nel settore, che operino in modo conforme alle normative vigenti, in grado di effettuare, per quanto riguarda la PMA, tecniche di coltura embrionaria a blastocisti, biopsia e vetrificazione degli embrioni e, per quanto riguarda il laboratorio di genetica, in grado di garantire l'uso di validati protocolli di analisi preimpianto.

È auspicabile che la PGT venga effettuata in laboratori che abbiano comprovata esperienza nel settore, che abbiano condotto un percorso adeguato di formazione e validazione dei test e delle procedure, che prevedano controlli di qualità interni (CQI) e partecipino a valutazioni esterne della qualità (VEQ) specifiche per PGT, e che rispettino le linee guida esistenti ed i relativi aggiornamenti.

I locali in cui si esegue la PGT devono essere isolati rispetto agli altri locali del laboratorio di genetica e avere caratteristiche strutturali adatte alla manipolazione di materiale biologico, scarso e irripetibile, nonché a rischio di contaminazione. In particolare, è necessario prevedere adeguate precauzioni al fine di prevenire la contaminazione dei campioni, sia mediante isolamento fisico (locali separati di pre- e post-PCR, cappe ad aria filtrata), sia mediante protocolli di rilevazione di eventuali contaminazioni (uso di marcatori materni e paterni).

Allo stesso modo, il personale responsabile deve essere competente, adeguatamente formato ed esclusivamente dedicato alle attività specifiche di genetica molecolare e, preferibilmente, essere in possesso della specializzazione in Genetica Medica. Inoltre, deve avere un'adeguata formazione documentata in centri specializzati in PGT e agire sotto la supervisione e il controllo (soprattutto nelle fasi critiche di trasferimento del campione) di genetisti molecolari competenti nello specifico settore. Tutto il personale deve dimostrare di essere competente prima di essere autorizzato a gestire campioni diagnostici. Una volta formato, il personale dovrebbe sottoporsi, almeno una volta all'anno, ad una rivalutazione delle competenze, riguardante tutti gli aspetti delle procedure che è autorizzato a svolgere. A questo scopo, devono essere stabiliti programmi di formazione interna continua e di rivalutazione delle competenze del personale.

Una volta che la biopsia delle blastocisti è stata eseguita, il campione cellulare può essere immediatamente analizzato nel laboratorio di genetica, attiguo al laboratorio di embriologia, oppure può essere congelato e inviato ad un laboratorio esterno per l'analisi. In questo ultimo caso, devono essere messe in atto le procedure per la catena di custodia. In entrambi i casi, il laboratorio deve essere dotato di sistemi adeguati di etichettatura per la precisa identificazione dei campioni, che devono avere un codice univoco di associazione biopsia/embrione. Il sistema di etichettatura è essenziale per abbinare correttamente il risultato diagnostico con l'embrione cui è stato effettuato il prelievo.

L'etichettatura e l'identificazione dei campioni sono tra le fasi critiche e a più alto rischio di errore. Si raccomanda che il numero di identificazione univoco del paziente ed il numero di identificazione univoco degli embrioni/biopsie siano controllati e approvati da due operatori indipendenti (di cui uno testimone e controllore delle procedure eseguite dall'altro) o mediante l'utilizzo di strumenti e tecnologie elettroniche per la tracciabilità.

In particolare, le fasi che richiedono obbligatoriamente un doppio controllo sono:

1. quelle immediatamente successive alla biopsia, per associare correttamente il numero dell'embrione con il campione di cellule prelevate;
2. il tubing, per confermare che l'identificativo delle cellule corrisponda con l'etichettatura sulla provetta in questione;
3. quelle in cui è previsto un cambio di provetta del campione o un passaggio da un contenitore ad un altro;
4. la refertazione, per garantire la precisa corrispondenza tra la biopsia e l'embrione corrispondente.

Allegato B

Approfondimenti relativi alla consulenza multidisciplinare

La consulenza dovrebbe svolgersi prendendo in considerazione i seguenti aspetti:

- **entrambi i membri della coppia devono partecipare alla consulenza;**
- **tutte le informazioni devono essere fornite in un linguaggio chiaro e comprensibile, evitando una terminologia troppo tecnica che potrebbe essere fraintesa; in caso di necessità, deve essere presente un interprete/mediatore culturale;**
- **la consulenza deve essere offerta sia prima che dopo ogni ciclo di PGT;**
- **un medico esperto in PMA fornirà le informazioni riguardanti la fecondazione in vitro;**
- **la consulenza genetica deve essere effettuata da un medico genetista o da un genetic counsellor;**
- **durante la consulenza, inoltre, la coppia verrà informata del ‘rischio genetico di specie’ cioè della possibilità di avere un figlio affetto da un qualsiasi difetto congenito, che è pari al 3%;**
- **devono essere fornite informazioni anche rispetto alle tempistiche della procedura e gli eventuali costi a carico della coppia;**
- **una consulenza aggiuntiva deve essere fornita anche alla fine dell’analisi di fattibilità;**
- **dopo la consulenza, deve essere rilasciato un referto scritto che comprenda tutte le informazioni fornite verbalmente;**
- **è possibile effettuare la PGT solo a seguito di consulenza genetica e firma di un consenso informato.**

Aspetti specifici relativi alla PMA:

Nel percorso PMA è necessario illustrare in dettaglio i seguenti aspetti:

- **descrizione dettagliata della procedura di PMA;**
- **rischi e complicanze associate alla stimolazione ovarica e/o al prelievo degli ovociti;**
- **numero di ovociti da prelevare e necessità di massimizzare questo numero entro i limiti di sicurezza della pratica medica;**
- **numero di embrioni attesi da sottoporre a biopsia, a quale stadio di sviluppo embrionale verranno prelevate le cellule, quante cellule saranno prelevate e la percentuale attesa di embrioni che sopravvivranno al ciclo di crioconservazione/scongelo;**
- **possibilità che alcuni embrioni rimangano non diagnosticati e relativa necessità di effettuare una nuova biopsia; in caso di impossibilità ad effettuare una diagnosi, il trasferi-**

mento non è attuabile. La scelta di trasferire gli embrioni non-diagnosticati è, anche in questo caso, demandata alla coppia;

- numero di embrioni da trasferire prediligendo il trasferimento di un singolo embrione;
- la possibilità di non avere embrioni qualora tutti risultassero morfologicamente e/o geneticamente inadatti;
- la probabilità di gravidanze per ciclo e per trasferimento embrionale, tenendo conto dell'età della madre e delle indicazioni alla PMA;
- rischio di aborto;
- rischio di complicanze correlate alle procedure di PMA o alla gravidanza in donne affette da specifiche malattie genetiche (es. rischio emorragico nelle portatrici di emofilia);
- crioconservazione degli embrioni e loro destino (sia sani che affetti), in osservanza alle leggi vigenti;
- uso di spermatozoi freschi o crioconservati;
- modifica delle percentuali di successo del ciclo di PMA dovuta all'aggiunta dell'analisi PGT e in relazione allo specifico rischio genetico della coppia;
- follow-up della gravidanza e dei bambini nati a seguito di PGT;
- possibilità di gravidanza spontanea durante il periodo di attesa o lo svolgimento del ciclo di PMA e considerazione della opportunità di attuare un'adeguata contraccezione.

Aspetti specifici relativi all'analisi genetica

La consulenza dovrà affrontare anche limiti e rischi specifici relativi alle tecniche di analisi genetica:

- informazioni sulla patologia genetica in esame (storia naturale, possibilità terapeutiche) e valutazione del rischio genetico. Nel caso specifico dell'emofilia, le informazioni dal punto di vista clinico verranno fornite dallo specialista del Centro Emofilia;
- possibilità di diagnosticare il difetto genetico in questione mediante analisi genetica e limiti dell'analisi genetica;
- ottimizzazione del protocollo di analisi genetica utilizzando campioni biologici della coppia e del probando della famiglia;
- valutazione delle metodologie diagnostiche e degli approcci disponibili per l'analisi genetica con relativi livelli di accuratezza;
- informazioni circa la casistica del centro, in relazione all'indicazione ed alla metodologia diagnostica utilizzata;

- **valutazione dell'aspetto decisionale riguardante la trasferibilità degli embrioni e discussione dei diversi aspetti con la coppia, da attuarsi prima dell'inizio del ciclo di PMA-PGT;**
- **possibilità di mosaicismo embrionale;**
- **informazioni circa i parametri qualitativi della diagnostica: amplification rate (percentuale di amplificazione), diagnosis rate (percentuale di diagnosi conclusiva), ADO (Allele Drop Out) rate (percentuale di mancata amplificazione di un allele), contamination rate (percentuale di contaminazione), misdiagnosis rate (percentuale di errata diagnosi);**
- **errore umano;**
- **la possibilità di effettuare, in caso di gravidanza, una diagnosi prenatale per confermare il risultato dell'analisi PGT;**
- **possibili effetti a lungo termine sulla salute del nascituro e alla nascita [6].**

In particolare, per le malattie legate al cromosoma X, come l'emofilia A e B:

- **valutare i pro e i contro di effettuare la sola determinazione del sesso dell'embrione;**
- **discutere della possibilità di trasferimento di embrioni femmina portatrice, secondo le leggi vigenti in materia;**
- **in caso di PGT-M associato a PGT-A, discutere quale è la modalità di classificazione degli embrioni e di trasferimento embrionario.**

Riferimenti bibliografici

1. Raccomandazioni SIGU 2017 per la pratica clinica. Diagnosi Genetica Preimpianto – PGT (Approvate dal Consiglio Direttivo SIGU il 9 agosto 2017). https://sigu.net/wp-content/uploads/2020/11/2043-2017_08_09_Raccomandazioni-PGT2017-ApprovatoCDSIGU.pdf
2. Carvalho F, Coonen E, Goossens V, Kokkali G, Rubio C, Meijer-Hoogeveen M, Moutou C, Vermeulen N, De Rycke M; ESHRE PGT Consortium Steering Committee. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. *Hum Reprod Open*. 2020:hoaa021.
3. Carvalho F, Moutou C, Dimitriadou E, Dreesen J, Giménez C, Goossens V, Kakourou G, Vermeulen N, Zuccarello D, De Rycke M; ESHRE PGT-M Working Group. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Hum Reprod Open* 2020:hoaa018.
4. De Rycke M, Goossens V, Kokkali G, Meijer-Hoogeveen M, Coonen E, Moutou C. ESHRE PGD Consortium data collection XIV-XV: cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013. *Hum Reprod* 2017;32:1974–1994.
5. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405–424.
6. Bay B, Ingerslev HJ, Lemmen JG, Degn B, Rasmussen IA, Kesmodel US. Preimplantation genetic diagnosis: a national multicenter obstetric and neonatal follow-up study. *Fertil Steril* 2016;106:1363-1369.