



## PATERNITYSAFE

Non-Invasive Prenatal Paternity Test

### Cos'è PaternitySafe™?

È un test di paternità prenatale non invasivo di ultima generazione che permette di determinare il profilo del DNA del feto e di confrontarlo con quello del presunto padre al fine di accertare la paternità biologica. Il test viene eseguito analizzando il DNA fetale libero da un campione di sangue della gestante, a partire dalla 9<sup>a</sup> settimana di gravidanza.

L'analisi del DNA per l'esecuzione del test **PaternitySafe™** si basa sul rilevamento di normali variazioni a singolo nucleotide che sono presenti a livello di molte regioni (loci) del DNA di ogni individuo (polimorfismo SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*). La determinazione contemporanea di questi polimorfismi del DNA permette di derivare un profilo genetico. Ad eccezione dei gemelli monozigoti che risultano perfettamente uguali, il profilo genetico di ogni individuo è praticamente unico, come le impronte digitali. Questa caratteristica è alla base della metodologia utilizzata per determinare se due persone sono correlate geneticamente. Il profilo genetico del feto sarà costituito da metà del profilo genetico materno e metà del profilo genetico paterno. Quindi, il presunto padre per essere considerato padre biologico dovrà possedere metà del profilo genetico presente nel feto. La paternità viene definita **ESCLUSA** nel caso in cui le caratteristiche genetiche del presunto padre discordino con quelle del feto. La paternità viene, invece, definita **ATTRIBUITA** qualora le caratteristiche genetiche del padre e del feto concordino. In quest'ultimo caso, viene effettuata un'analisi statistica dei risultati ed infine viene fornita una **percentuale di attribuzione** che sarà tanto più prossima al 100% quanto maggiore sarà il numero di regioni polimorfiche del DNA analizzate, e quanto meno frequenti sono le caratteristiche genetiche riscontrate. Queste regioni polimorfiche del DNA investigate sono ereditate in maniera tra loro indipendente, e per la loro straordinaria variabilità interindividuale determinano la formazione di un numero molto elevato di combinazioni genotipiche. La distribuzione di tale variabilità biologica nella popolazione fa sì che solo pochissimi individui presi a caso possiedano caratteristiche genetiche identiche, e tale identità, se presente, è limitata solamente ad alcune regioni polimorfiche investigate. Ciò rende possibile sia l'Esclusione di Paternità, sia un giudizio dapprima di Compatibilità, e successivamente, dopo valutazione statistica dei risultati, di Probabilità di Paternità.

### Come viene effettuato il test PaternitySafe™?

Durante la gravidanza la placenta, attraverso un processo fisiologico chiamato apoptosi, rilascia frammenti di DNA nel sangue materno a partire dalla 5<sup>a</sup> settimana di gestazione. Tale DNA, denominato anche DNA fetale, aumenta con l'avanzare dell'età gestazionale e, alla 9<sup>a</sup> settimana, raggiunge quantità sufficienti per essere analizzato in maniera affidabile e fornire preziose informazioni sul profilo del DNA del feto.

Il test viene eseguito mediante il prelievo di un campione ematico della gestante con un'età gestazionale di almeno 9 settimane. Tramite un'analisi complessa di laboratorio, il DNA fetale libero circolante è isolato dalla componente plasmatica del sangue materno. Contestualmente, anche il DNA del presunto padre viene isolato da un suo campione di cellule buccali, raccolto tramite tampone dalla mucosa buccale.

Successivamente, il DNA fetale e quello del presunto padre sono sottoposti ad amplificazione genica (PCR) targettata di un pannello di >500 loci polimorfici SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ed i relativi prodotti di amplificazione sono sequenziati attraverso un processo tecnologico avanzato, denominato *Next Generation Sequencing* (NGS). Il sequenziamento viene eseguito ad alta risoluzione (profondità di sequenziamento >1000X, media 4000X). Una *pipeline* di analisi che incorpora uno strumento bioinformatico proprietario viene utilizzata per genotipizzare i loci SNP e determinare la parentela, confrontando il profilo del DNA del feto con quello del presunto padre. Successivamente viene generata una probabilità di paternità. I calcoli per la probabilità di paternità vengono eseguiti utilizzando un algoritmo proprietario. Il risultato del test non prevede l'emissione dei profili genetici con il referto.

### Risultati del test PaternitySafe™

I risultati del test di paternità vengono valutati attraverso il confronto tra gli assetti dei singoli polimorfismi nel trio presunto padre, feto, madre. Normalmente, il classico test di paternità consiste inizialmente nella valutazione dell'insieme delle caratteristiche che costituiscono il profilo genetico del figlio e della madre. Tutte le caratteristiche genetiche del figlio che non sono presenti nella madre devono essere state obbligatoriamente ereditate dal padre biologico.

**“COMPATIBILITÀ GENETICA o ATTRIBUZIONE”**: Il presunto padre possiede nel suo profilo genetico delle caratteristiche genetiche condivise con il feto. In caso, si effettua un'analisi statistica dei risultati ed infine viene fornita una percentuale di attribuzione che sarà tanto più prossima al 100% quanto maggiore sarà il numero di regioni del DNA analizzate. L'esame delle regioni polimorfiche investigate nel test **PaternitySafe™** generalmente consente di raggiungere una percentuale di attribuzione (probabilità di paternità) **superiore al 99,9%**. Questo valore probabilistico è compatibile con un risultato di paternità biologica.

**“NON COMPATIBILITÀ GENETICA o ESCLUSIONE”**: il feto possiede nel suo profilo genetico delle caratteristiche genetiche non presenti nel profilo del presunto padre. In pratica, se il profilo genetico del figlio e del padre presunto differiscono per tre o più caratteristiche genetiche, questo risultato è compatibile con un **ESCLUSIONE** della paternità biologica (**0% di probabilità di essere il padre biologico**).

### Calcolo biostatistico

#### Premessa

Al fine di stabilire l'Esclusione o l'Attribuzione della paternità in esame, i polimorfismi del DNA del campione biologico del presunto padre vengono comparati con quelli del feto. La prima fase dell'analisi consiste nel verificare che il presunto padre possieda o meno, in ciascuna regione polimorfica del DNA esaminata, almeno un carattere genetico compatibile con il feto. In caso di compatibilità, si passa alla successiva analisi statistica per calcolare la probabilità di paternità.

#### Analisi Statistica

Dopo la constatazione di compatibilità, si è passati al calcolo della probabilità di paternità (P) nei confronti del presunto padre. La probabilità di paternità è un valore numerico che esprime la probabilità del padre putativo di essere il padre biologico di un figlio oggetto di accertamento di paternità. A tal fine, è stata calcolata la probabilità della ipotesi (H1) che il soggetto PADRE sia il padre biologico del campione FIGLIO in esame  $p(G/H1)$  rispetto alla probabilità dell'ipotesi (Ho) che il padre presunto non sia il padre biologico, e che quindi detta compatibilità sia solo casuale

$p(G/H_0)$ . Il rapporto tra i due termini sopra detti,  $p(G/H_1) / p(G/H_0)$ , rappresenta il rapporto di verosimiglianza o Likelihood Ratio (LR), il cui valore sarà tanto più elevato quanto più probabile è l'ipotesi  $H_1$ , cioè che il soggetto PADRE sia davvero il padre biologico del campione FIGLIO. La verifica dell'ipotesi  $H_1$  è stata effettuata mediante l'applicazione del Teorema di Bayes, come modificato da Essen-Moeller, che attualmente rappresenta la formula più in uso per il calcolo di un rapporto di parentela di un individuo. La formula di Essen-Moeller ha la caratteristica di esprimere in percentuale la probabilità di paternità (P) che risulta dall'analisi dei polimorfismi considerati, ed è espressa nel modo seguente:  $p(G/H_1) = X$  = rappresenta la probabilità complessiva che il presunto padre abbia fornito l'allele non materno al figlio oggetto di indagine di paternità. Tale probabilità si ottiene confrontando i genotipi del presunto padre e del figlio per la serie di sistemi polimorfici analizzati, ed assume un valore uguale ad 1 nel caso in cui il padre presenta l'allele paterno (cioè l'allele che è stato riscontrato nel figlio) in stato di omozigosità, mentre è uguale a 0.5 nel caso detto allele è presentato in stato di eterozigosità. Il prodotto di queste probabilità fornisce la probabilità totale che il figlio abbia potuto ricevere gli alleli in questione dalla persona oggetto di indagine di paternità.  $p(G/H_0) = Y$  = rappresenta la probabilità di compatibilità casuale tra il fenotipo del presunto padre biologico ed il figlio. Tale probabilità Y va calcolata considerando la frequenza del fenotipo riscontrato nel presunto padre nella popolazione italiana.

Il rapporto tra queste due probabilità condizionali rappresenta la cosiddetta **PATERNITY RATIO (r)**:

$$r = p(G/H_1) / p(G/H_0) = X/Y$$

Applicando la formula di Essen-Moeller (basata sui principi della probabilità Bayesiana) al presente caso, si ottiene una Probabilità di paternità:  $P (\%) > 99,999$  Tale valore percentuale ha un altissimo significato statistico se rapportato al fatto che per valori di  $P > 99,72$  la parentela è praticamente provata. La formula di Essen-Moeller applicata è incorporata in un protocollo di analisi computerizzata, il cui algoritmo utilizza le frequenze geniche relative alla popolazione italiana.

### Limiti del test

L'esame ha dimostrato, in studi di validazione preclinica, un'attendibilità superiore al **99%**. Sebbene il rischio di errore del test sia basso (<1%), tuttavia non è escludibile.

Il test è eseguibile su gravidanze singole o gemellari monozigotiche, con almeno 9 settimane di gestazione. Per ragioni tecniche, il test non può essere eseguito se i presunti padri sono gemelli monozigoti.

Nelle gravidanze che sono iniziate come gemellari dizigotiche o plurime, seguite dall'aborto spontaneo di uno o più feti con riassorbimento della camera gestazionale (**vanishing twin**), potrebbe essere presente nel sangue materno anche il DNA fetale libero del feto abortito. Ciò potrebbe interferire nella qualità dei risultati.

Risultati del test discordanti potrebbero verificarsi a causa di uno o più dei seguenti rari eventi: fattori biologici, come una quantità di DNA fetale (Frazione Fetale) troppo bassa nel campione di sangue materno, **vanishing twin**, una gravidanza gemellare dizigotica non rilevata; precedente trapianto d'organo materno; trasfusioni di sangue, o altre cause. La capacità di refertare i risultati può essere influenzata dall'indice di massa corporea materna (BMI), dal peso materno e / o dal lupus eritematoso sistemico materno (LES).

Il plasma materno contiene percentuali variabili di FF (frazione fetale), che differiscono nei diversi campioni. Il LoD (*Limit of Detection*) cioè la percentuale di DNA fetale sotto la quale l'esame non può essere eseguito è il 2%. In alcuni casi, il campione analizzato potrebbe mostrare una scarsa frazione fetale (<2%) e di conseguenza il test potrebbe esitare in un risultato non conclusivo. In tali casi verrà richiesto un nuovo prelievo ematico al fine di ripetere l'esame in età gestazionale più avanzata. Anche in tale evenienza non si esclude che, anche dopo ripetizione dell'indagine, il test possa nuovamente esitare in un risultato non conclusivo. In questi casi, è consigliato di ricorrere a metodi di diagnosi prenatale alternativi, quali per esempio l'amniocentesi o la villocentesi.

#### NOTE

Il presente esame, condotto sui campioni biologici da Lei forniti, ha solo valore informativo e non può essere impiegato per fini legali. Per tal fine il prelievo dei campioni biologici deve essere effettuato direttamente da personale sanitario del Ns. laboratorio, previo accertamento dell'identità dei soggetti sottoposti ad indagine di paternità, e previa autorizzazione all'esecuzione del test ottenuta da entrambi i genitori o gli esercenti la patria potestà, e dal figlio oggetto di indagine (se maggiorenne).

#### Consulenza Genetica

Il nostro centro offre gratuitamente la **consulenza genetica**, sia pre-test che post test, al fine spiegare ai pazienti le finalità dell'analisi, i risultati ottenibili, ed i risultati emersi al completamento dell'esame.