

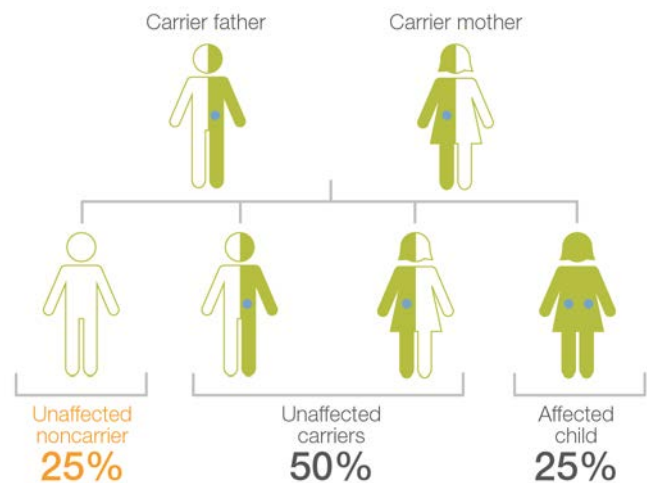


La genomica di nuova generazione

Negli ultimi anni, gli straordinari progressi conseguiti nel settore della genomica e delle biotecnologie hanno posto le basi per leggere e comprendere le informazioni contenute nel nostro DNA, il **genoma**. In particolare **le nuove tecnologie di sequenziamento, Next Generation Sequencing (NGS)**, ci permettono oggi di accedere alla sequenza del nostro DNA in modo più facile ed efficace, fornendo una valutazione approfondita dell'informazione genetica di ogni singolo individuo.

Ogni persona nasce, infatti, con caratteristiche genetiche che la differenziano dagli altri e che la rendono unica. Mentre la maggior parte delle differenze nella sequenza del DNA tra persone diverse è innocua, alcuni cambiamenti, definiti **mutazioni genetiche**, possono alterare la funzionalità genomica e rendere quella persona portatrice di una specifica malattia genetica trasmissibile ai propri figli.

I portatori di malattie genetiche sono tipicamente individui sani, completamente privi di sintomi ed inconsapevoli di essere a rischio di trasmettere tale "errore" del DNA ai figli.



Il test GeneScreen® Focus

GeneScreen® Focus è un test diagnostico, sviluppato da GENOMA Group, che permette di eseguire un'analisi multipla di **31 malattie genetiche ereditarie**, tra cui quelle più frequenti nella popolazione italiana, come la Fibrosi Cistica, l'Anemia Falciforme, la Talassemia, la Sordità Ereditaria.

GeneScreen® Focus consente alla coppia di conoscere, attraverso l'analisi del loro DNA, se si è portatori di gravi malattie genetiche. Il test, quindi, permette di identificare le coppie a rischio di trasmettere ai loro figli una specifica malattia genetica.

Indicazioni al test GeneScreen® Focus

GeneScreen® Focus è indicato:

- Per le coppie che progettano di diventare genitori, sia tramite concepimento naturale che mediante l'accesso a tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA);

Pag. 1 di 6

- Per le coppie che sono in attesa di un figlio, e che desiderano ridurre il rischio di trasmettere a quest'ultimo una malattia genetica ereditaria;
- Per le coppie che fanno ricorso a tecniche di fecondazione eterologa, al fine di individuare un donatore di gameti che non sia portatore di mutazioni nei medesimi geni riscontrate in uno dei partners della coppia.

L'esame può essere effettuato su un singolo individuo o, preferibilmente, su **entrambi i partners** della coppia.

Come viene effettuato il test **GeneScreen® Focus**?

Il test viene eseguito mediante il prelievo di un campione ematico. Tramite un'analisi complessa di laboratorio, il DNA viene isolato dalle cellule nucleate ed **amplificato mediante tecnica PCR**. Successivamente, attraverso un processo tecnologico avanzato di **sequenziamento massivo parallelo (MPS)**, che impiega tecniche di *Next Generation Sequencing* (NGS) utilizzando sequenziatori **ILLUMINA**, si sequenziano completamente **30 geni** (esoni e regioni introniche adiacenti, ± 5 nucleotidi)(Tabella 1) ad elevata profondità di lettura. Le sequenze geniche ottenute vengono analizzate attraverso un'**avanzata analisi bioinformatica**, per determinare la presenza di eventuali mutazioni nei geni in esame.

L'analisi per individuare la delezione degli esoni 7 e 8 del gene SMN1 viene effettuata mediante tecnica MLPA e successiva elettroforesi capillare in sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente.

La valutazione dell'espansione delle triplette nucleotidiche ripetute nel sito fragile FRAXA viene eseguita mediante PCR fluorescente e successiva elettroforesi capillare in sequenziatore automatico. I geni elencati in Tabella 1, sono stati selezionati in base all'incidenza nella popolazione delle malattie causate da mutazioni in tali geni, alla gravità del fenotipo clinico alla nascita ed all'importanza del quadro patogenetico associato, seguendo le indicazioni dell'American College of Medical Genetics (ACMG)(Grody et al., Genet Med 2013;15:482–483).

Risultati ottenibili con il test **GeneScreen® Focus**

“POSITIVO“ – Presenza di una o più mutazioni: indica che il test ha rilevato una o più mutazioni a livello di uno (o più) geni. Il nostro genetista, in sede di consulenza genetica, spiegherà in maniera dettagliata il significato del risultato del test ed, eventualmente, prospetterà la necessità di estendere l'esame all'altro partner della coppia, al fine di verificare che quest'ultimo non sia portatore delle medesima malattia genetica, nel qual caso si ravviserebbe un rischio di trasmissione della patologia ai figli.

Le mutazioni riscontrabili tramite il test **GeneScreen® Focus** possono rientrare nelle seguenti categorie prognostiche:

- **con significato patologico noto;**
- **con significato incerto** in quanto non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica. Tali varianti verranno refertate solo nei test eseguiti su entrambi i partners della coppia, nel caso in cui in uno dei partners dovesse essere stata riscontrata una mutazione a significato patologico noto.

Se entrambi i partners della coppia dovessero risultare positivi per il test, portatori di una mutazione con significato patologico noto nel medesimo gene, il nostro genetista potrà fornire una panoramica sulle opzioni diagnostiche attualmente disponibili per verificare lo stato di salute del feto, in caso di futura gravidanza.

“**NEGATIVO**” - **Assenza di mutazioni**: indica che il test non ha rilevato la presenza di mutazioni nei geni esaminati.

Parametri utilizzati per la refertazione delle varianti genetiche

L'analisi è mirata esclusivamente ai geni elencati in Tabella 1. Verranno refertate solo le mutazioni classificate come a significato patogenetico noto o con significato incerto, sulla base dei dati della letteratura scientifica e la classificazione presente nel database di riferimento Human Gene Mutation Database (HGMD), NCBI Clinvar, aggiornati alla data del prelievo. Inoltre, seguendo le indicazioni dell'American College of Medical Genetics (ACMG), sono state considerate come patogenetiche o presunte patogenetiche solo le mutazioni con un valore di Minor Allele Frequency (MAF) <5% (1000 Genomes Project), riferibile come la frequenza di ricorrenza dell'allele meno comune all'interno della popolazione.

Target Coverage

Si intende per *Target Coverage*, il numero medio di letture (*reads*) ottenute dal sequenziamento per ciascuna base nucleotidica costituente il gene. Le varianti con una profondità di lettura (numero di reads) inferiore a 30X non vengono evidenziate dall'algoritmo di analisi bioinformatica.

Accuratezza del test GeneScreen® Focus

Le tecniche attuali di sequenziamento del DNA producono risultati con un'accuratezza superiore al 99%. Benché questo test sia molto accurato bisogna sempre considerare i limiti dell'esame, di seguito descritti.

Limiti del test GeneScreen® Focus

Questo esame valuta solo le malattie genetiche ed i geni elencati in Tabella 1. Il test non evidenzia altre malattie genetiche o geni non specificamente investigati.

L'esame inoltre non è in grado di evidenziare:

- mutazioni localizzate nelle regioni introniche oltre ± 5 nucleotidi dai breakpoints;
- delezioni, inversioni o duplicazioni maggiori di 20 bp;
- mosaicismi della linea germinale (cioè mutazioni presenti solo nei gameti).

Un risultato “**NEGATIVO**” - **Assenza di mutazioni** per i geni investigati non esclude la possibilità di essere portatori di una mutazione localizzata in una regione del genoma non investigata dall'esame.

E' possibile che alcune zone del proprio DNA non possano essere sequenziate o che abbiano una copertura inferiore ai limiti fissati dagli esperti di GENOMA Group per garantire un'analisi accurata delle varianti. Queste regioni non saranno quindi comprese nell'analisi qualora non superino gli standard qualitativi richiesti.

In alcuni casi, il risultato di un'analisi genomica può rivelare una variante o mutazione del DNA con un significato clinico non certo o determinabile in base alle attuali conoscenze medico-scientifiche.

L'interpretazione delle varianti genetiche si basa sulle più recenti conoscenze disponibili al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti.

Alcune patologie possono essere causate o regolate da più di una variante nel suo DNA in uno o più geni. Alcune di queste varianti possono non essere ancora state identificate o validate dalla comunità scientifica e quindi non essere riportate come patogenetiche al momento dell'analisi.

Limite intrinseco della metodologia NGS utilizzata è la mancanza di uniformità di coverage per ciascuna regione genica analizzata. Tale limite si traduce nella possibilità, insita nelle metodiche NGS, che specifiche mutazioni dei geni selezionati potrebbero non essere state rilevate dal test.

La valutazione dell'espansione delle triplette nucleotidiche ripetute nel sito fragile FRAXA mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), per i limiti intrinseci della metodica, potrebbe non evidenziare la presenza di espansioni di triplette di grosse dimensioni. Quindi, in caso pazienti di sesso femminile nelle quali viene evidenziato un genotipo omozigote, la PCR potrebbe non aver amplificato un allele con un espansione di grosse dimensioni, e quindi trattarsi di un falso omozigote. In quest'ultimo caso, il risultato dovrebbe essere confermato mediante esame di secondo livello.

Bibliografia

1. Blythe S, Farrell PM. Advances in the diagnosis and management of cystic fibrosis. Clin Biochem. 1984;17:277-283.
2. Haque IS, Lazarin GA, Kang HP, et al. Modeled Fetal Risk of Genetic Diseases Identified by Expanded Carrier Screening. JAMA. 2016;316(7):734-742.
3. de Graaf G, et al. Am J Med Genet 2015;167(4):756-767.
4. Cragan JD, et al. MMWR CDC Surveill Summ 1995 Aug 25;44(4):1-13.
5. Cystic Fibrosis Foundation Patient registry 2012 annual data report. Bethesda, Maryland. ©2013 Cystic Fibrosis Foundation.
6. Bell CJ, et al. (2011) Sci Transl Med.3(65):65ra4
7. Lazarin et al. (2013) Genet Med.15(3):178-86
8. Archibald et al. (2017) Genet Med. doi:10.1038/gim.2017.134
9. Committee Opinion No. 690. American College of Obstetricians and Gynecologists. (2017) Obstet Gynecol.129:e35-40
10. Henneman L, Borry P, Chokoslivi D, et al. Responsible implementation of expanded carrier screening. European Journal of Human Genetics. 2016;24,e1-e12.
11. Edwards JG, Feldman G, Goldberg J, et al. Expanded Carrier Screening in Reproductive Medicine-points to Consider. A Joint Statement of the American College of Medical Genetics and Genomics, American College of Obstetricians and Gynecologists, National Society of Genetic Counselors, Perinatal Quality Foundation, and Society for Maternal-Fetal Medicine. Obstet Gynecol 2015;125(3):653-662.
12. Richards S, Aziz N, Bale S, 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. Genetics in Medicine. 2015;17(5):405-423.

Tabella 1: GeneScreen® Focus - Elenco dei geni analizzati e delle malattie genetiche investigate

GENE	#OMIM	PATOLOGIA	PheMIM	METODICA
ACADM	#607008	Deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena media	#201450	NGS
AGXT	#604285	Ossalosi o Iperossaluria primitiva	#259900	NGS
ARSA	#607574	Leucodistrofia metacromatica	#250100	NGS
ATP7B	#606882	Malattia di Wilson	#277900	NGS
BTD	#609019	Deficit di biotinidasi	#253260	NGS
CBS	#613381	Omocistinuria	#236200	NGS
CFTR	#602421	Fibrosi cistica	#219700	NGS
DHCR7	#602858	Sindrome di Smith-Lemli-Opitz	#270400	NGS
EMD	#300384	Distrofia muscolare Emery-Dreifuss	#310300	NGS
FMR1	#309550	Sindrome dell'X-fragile	#300624	CGG espansione triplette
GAA	#606800	Malattia da accumulo di Glicogeno di tipo 2	#232300	NGS
GALC	#606890	Malattia di Krabbe	#245200	NGS
GALT	#606999	Galattosemia	#230400	NGS
GBA	#606463	Malattia di Gaucher di tipo I-II-III-IIIC-fetale	#230800/ #230900/ #231000/ #231005/ #608013	NGS
GJB1	#304040	Neuropatia di Charcot-Marie-Tooth legata all'X (CMTX)	#302800	NGS
GJB2	#121011	Sordità neurosensoriale non sindromica recessiva di tipo 1A	#220290	NGS
GJB6	#604418	Sordità neurosensoriale non sindromica recessiva di tipo 1B	#612643	NGS
GLA	#300644	Malattia di Fabry	#301500	NGS
HADHA	#600890	Deficit di 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi a catena lunga	#609016	NGS
HBA1	#141800	Alfa talassemia (HBA1)	#604131	NGS
HBA2	#141850	Alfa Talassemia (HBA2)	#604131	NGS
HBB	#141900	Beta talassemia/Anemia falciforme	#613985/#603903	NGS
HEXA	#606869	Malattia di Tay-Sachs	#272800	NGS
MEFV	#608107	Febbre Mediterranea Familiare	#249100	NGS
MMACHC	#609831	Acidemia metilmalonica con omocistinuria	#277400	NGS
PAH	#612349	Fenilchetonuria	#261600	NGS
PMM2	#601785	Difetto congenito della glicosilazione tipo 1A	#212065	NGS

SERPINA1	#107400	Deficit di alfa-1-antitripsina	#613490	NGS
SLC26A2	#606718	Acondrogenesi di tipo 1B	#600972	NGS
SMN1	#600354	Atrofia muscolare spinale (SMA 1)	#253300	MLPA del ex 7-8

Eurofins Genoma Group S.r.l a socio unico

Sede legale
00138 Roma - Via di Castel Giubileo, 11
C.F. e P.Iva: 05402921000
REA: 883.955
Iscr. Reg. Impr. 369761/1997

Laboratori e Studi Medici Roma
00138 Roma - Via di Castel Giubileo, 11
Tel. +39 06 881 1270 - Fax +39 06 6449 2025
Web: www.laboratorioigenoma.eu
E-mail: info@laboratorioigenoma.eu

Laboratori e Studi Medici Milano
20161 Milano - Affori Centre, Via Enrico Cialdini, 18
Tel. : + 39 02 3929 7626 - Fax : + 39 02 3929 76261
Web: www.genomamilano.it
E-mail info@genomamilano.it

