

Genomica di nuova generazione e diagnosi prenatale

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 genoma fetale. In particolare **le nuove tecnologie di sequenziamento, Next Generation Sequencing (NGS)**, ci permettono oggi di accedere alla sequenza del DNA in modo più facile ed efficace, fornendo una valutazione approfondita dell'informazione genetica del feto.

Il test PrenatalScreen® Focus

PrenatalScreen® 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.

PrenatalScreen® Focus consente alla gestante di conoscere, attraverso l'analisi del DNA fetale, se il bambino è affetto da gravi malattie genetiche.

Finalità dell'esame

PrenatalScreen® Focus viene eseguito su DNA estratto da cellule fetali presenti nel liquido amniotico, e prelevate mediante amniocentesi, oppure nei villi coriali, prelevate mediante villocentesi. La sua finalità è lo studio nel feto di malattie genetiche gravi, tra cui quelle più frequenti nella popolazione italiana.

Indicazioni al test PrenatalScreen® Focus

PrenatalScreen® Focus è indicato nei seguenti casi:

- Anamnesi personale/familiare di malattie genetiche ereditarie;
- Per le gestanti che desiderano ridurre il rischio di una malattia genetica nel feto;
- Per gravidanze ottenute sia tramite concepimento naturale che mediante l'accesso a tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA);
- Per le coppie che hanno fatto ricorso a tecniche di fecondazione eterologa.

Come viene effettuato il test PrenatalScreen® Focus?

Il test **PrenatalScreen® Focus** su liquido amniotico viene effettuato mediante il prelievo di 15-20 ml di liquido amniotico per via trans-addominale, sotto controllo ecografico, tra la 15° e la 18° settimana di gestazione. Il liquido prelevato viene centrifugato per separare la parte liquida dalla frazione corpuscolata, costituita dalle cellule fetali che sono in sospensione nel liquido amniotico. Tali cellule, definite amniociti, sono sottoposte ad estrazione del DNA.

Il test **PrenatalScreen® Focus** su Villi Coriali viene effettuato mediante il prelievo di 20 mg circa di villi coriali per via trans-addominale sotto controllo ecografico, tra la 11° e la 13° settimana di

gestazione. Il materiale prelevato viene prima lavato ed osservato al microscopio per separare il tessuto materno dal tessuto fetale, e successivamente sottoposto ad estrazione del DNA.

Il DNA isolato dalle cellule fetali viene quindi **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 PrenatalScreen® 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 ai genitori, al fine di verificare la trasmissione ereditaria della variante riscontrata.

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

- o **con significato patologico noto;**

“NEGATIVO” - Assenza di mutazioni: indica che il test non ha rilevato la presenza di mutazioni nei geni esaminati. Tale risultato riduce notevolmente le possibilità che il feto abbia le malattie genetiche esaminate, ma non può garantire che il feto sia sano.

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, sulla base dei dati della letteratura scientifica e la classificazione presente nei database di riferimento interrogati: ClinVar (NCBI); Human Gene Mutation Database (HGMD), 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 sono evidenziate dall' algoritmo di analisi bioinformatica.

Accuratezza del test PrenatalScreen® 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 PrenatalScreen® 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 che nel feto siano presenti mutazioni localizzate 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 non determinabile in base alle attuali conoscenze medico-scientifiche. Inoltre identificare una variante genetica non permette sempre di predire con certezza se e quando una persona svilupperà una certa patologia o la severità dei sintomi correlati. Il valore di alcune delle varianti riscontrate con il test può quindi non essere determinabile in base alle conoscenze mediche attuali.

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.

Per un'interpretazione corretta dei risultati è importante avere informazioni accurate circa lo stato di salute ed eventuali patologie nella storia clinica dell'individuo e dei suoi familiari. Ciò permette una migliore interpretazione dei risultati genetici da parte dei nostri genetisti.

Limite intrinseco della metodologia NGS utilizzata è la mancanza di uniformità di coverage per ciascuna regione genica analizzata. La qualità e la quantità del DNA ottenuto da campioni biologici prenatali è una delle possibili cause di tale mancanza di uniformità, potenzialmente responsabile della mancata identificazione di mutazioni geniche. Tale limite si traduce nella possibilità, insita

nelle metodiche NGS, che specifiche mutazioni dei geni selezionati potrebbero non essere state rilevate dal test.

Tabella 1: PrenatalScreen® - Elenco dei geni analizzati e della 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