



A.G.E.O. E GLI ESPERTI
le nostre domande e le
loro risposte

P
R
O
G
R
A
M
M
A



FIRENZE
25 - 26 OTTOBRE 2019

IL LABORATORIO DI GENETICA

Alice Bruson



Personal Genomics

Allegato A

LINEE-GUIDA PER LE ATTIVITA' DI GENETICA MEDICA

I laboratori di genetica medica (citogenetica, genetica molecolare, genetica biochimica, immunogenetica, citogenetica e genetica oncologica ed altri) sono le strutture specializzate competenti nello svolgimento di indagini specifiche (test genetici), ad elevato contenuto tecnologico e professionale, per l'identificazione delle malattie genetiche.

Luglio 2004



OMIM Morbid Map Scorecard (Updated October 24th, 2019) :

Total number of phenotypes* for which the molecular basis is known	6,517
Total number of genes with phenotype-causing mutation	4,164

* Phenotypes include (1) single-gene mendelian disorders and traits; (2) susceptibilities to cancer and complex disease (e.g., BRCA1 and familial breast-ovarian cancer susceptibility, [113705.0001](#), and CFH and macular degeneration, [134370.0008](#)); (3) variations that lead to abnormal but benign laboratory test values ("nondiseases") and blood groups (e.g., lactate dehydrogenase B deficiency, [150100.0001](#) and ABO blood group system, [110300.0001](#)); and (4) select somatic cell genetic disease (e.g., GNAS and McCune-Albright syndrome, [139320.0008](#) and IDH1 and glioblastoma multiforme, [147700.0001](#).)

Test genetici

Per test genetici s'intendono comunemente le analisi di specifici geni, del loro prodotto o della loro funzione, nonché ogni altro tipo d'indagine del DNA, dell'RNA o dei cromosomi, finalizzata ad individuare o ad escludere mutazioni associate a patologie genetiche.



Tipologie di Test genetici

Diagnostici	effettuare una diagnosi o confermare un sospetto clinico in un soggetto affetto
Identificazione portatori sani	individuare mutazioni in soggetti non affetti che hanno il rischio di avere figli affetti
Preclinici o presintomatici	individuare il gene responsabile di malattie genetiche i cui sintomi non sono presenti alla nascita, ma compaiono successivamente, anche in età avanzata
Suscettibilità	individuare i genotipi che di per sé non causano malattia, ma comportano un aumento del rischio di svilupparla
Studio della variabilità individuale	definire un rapporto di parentela/consanguineità o attribuire una traccia biologica ad una specifica persona
Farmacogenetici	identificare variazioni di sequenza nel DNA in grado di predire la risposta «individuale» ai farmaci
Finalizzati alla ricerca	comprendere le basi biologiche di una malattia o sviluppare nuovi test genetici

Vantaggi



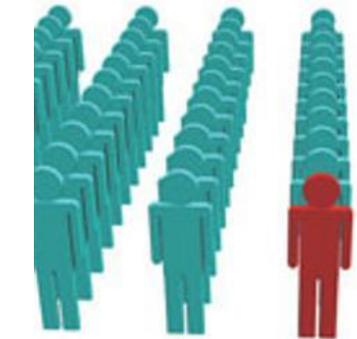
- può aiutare a diagnosticare una malattia e/o fornire informazioni aggiuntive sulla malattia stessa
- può aiutare ad applicare una migliore terapia o misure preventive
- può fornire informazioni utili per future gravidanze
- può fornire informazioni utili per altri membri della famiglia



Limiti



- non sempre è possibile identificare la causa genetica di una malattia
- la conferma di una diagnosi, in alcuni casi, non consente di prevederne la gravità o non permette interventi o cure

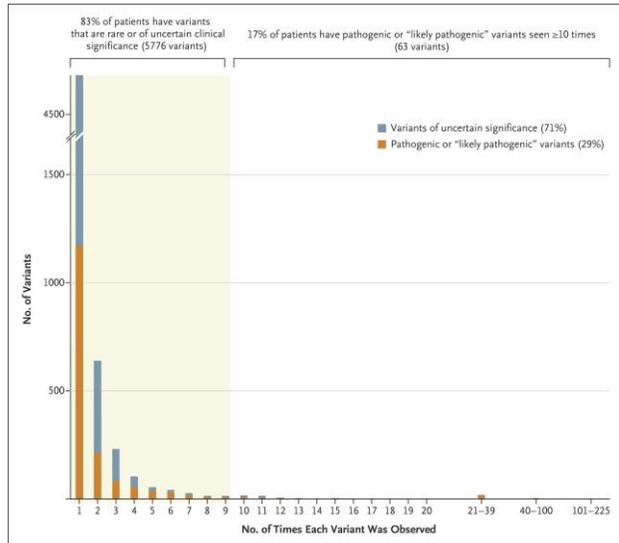


Difficoltà



- può rilevare informazioni familiari inaspettate
- l'interpretazione e la gestione del risultato può essere complicata

Variant Histogram from Mendelian Disease Testing of 15,000 Probands



Rischi



- Test DTC (direct-to-consumer)



Genetic Home DNA Test Kit, Superhero

\$29⁰⁰

✓prime ★★★★★ 138

ADD TO CART

Ecco come ti predico il talento del tuo bambino

TEST DEL DNA PER LA CURA DELLA PELLE

Certificazioni e controlli

- I test genetici, per le loro peculiarità e implicazioni, devono essere effettuati presso strutture di genetica **autorizzate e/o accreditate**
- I laboratori di genetica medica devono utilizzare **criteri di qualità**, riconosciuti a livello nazionale e internazionale, per garantirne l'appropriatezza e l'uniformità sul territorio nazionale.



Presa in carico

- L'**appropriatezza delle prestazioni** deve essere garantita da chi prescrive il test (medici specialisti in Genetica Medica o specialisti di branca). Devono essere considerati parti integranti di un test genetico la **consulenza genetica pre-test e post-test** e **l'interpretazione del risultato** e la consulenza relativa alle sue possibili implicazioni



Validità del test

- Ogni nuovo test genetico, prima di essere utilizzato, deve essere **validato a livello analitico e clinico** e il protocollo esecutivo deve essere standardizzato

- **Sensibilità analitica** = la capacità del test di identificare una variazione quando presente nel campione esaminato

-> Falsi negativi = $1 - \text{sensibilità}$

- **Specificità analitica** = la capacità del test di confermare l'assenza di una variazione quando non presente nel campione esaminato

-> Falsi positivi = $1 - \text{specificità}$

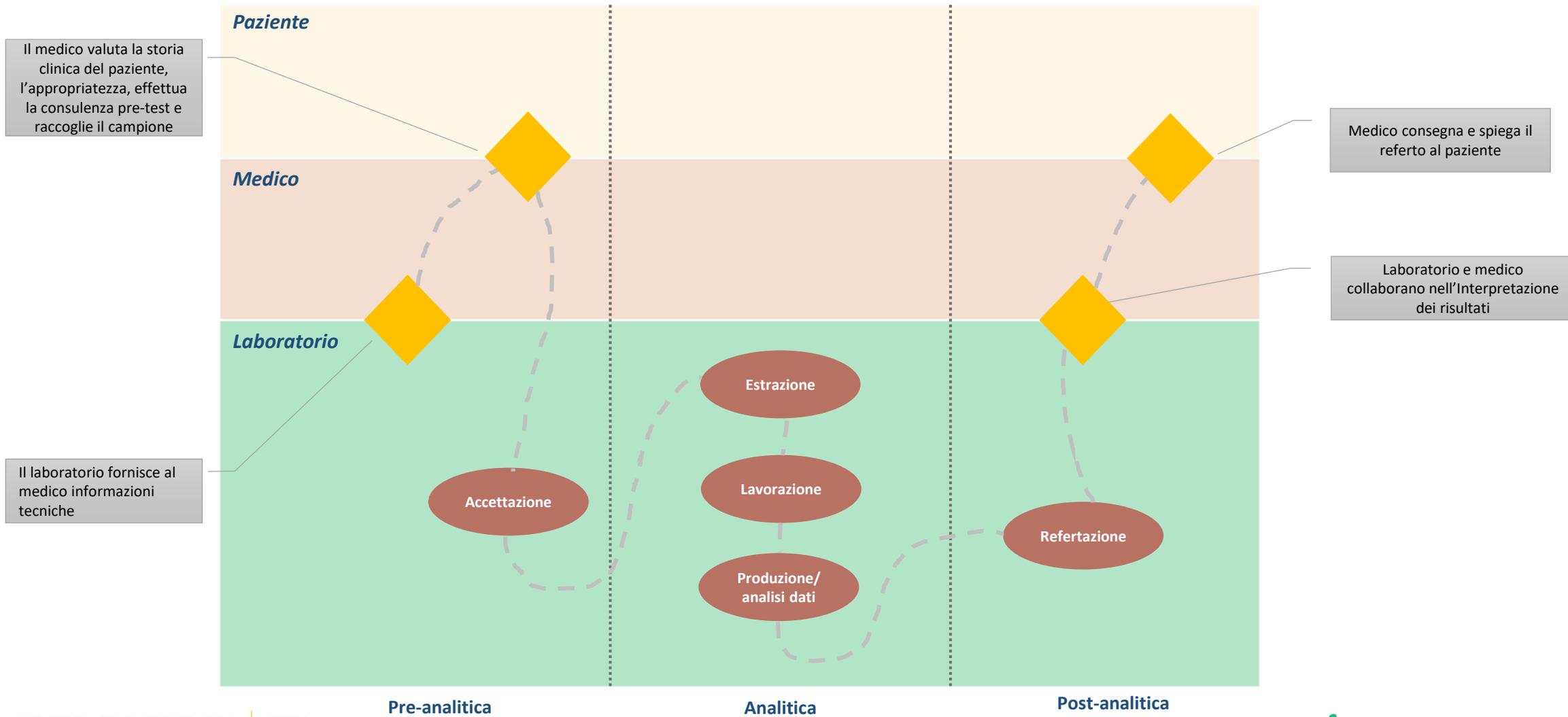
È strettamente dipendente dalla tecnologia utilizzata (NGS, MLPA, Sanger, qPCR, ecc) e dal disegno del protocollo

- **Sensibilità diagnostica** = la capacità del test di identificare un caso positivo in soggetti con la malattia in esame

- **Specificità diagnostica** = la capacità del test di confermare un caso negativo in individui senza la malattia in esame

È strettamente dipendente dal sospetto diagnostico e dalle conoscenze scientifiche disponibili

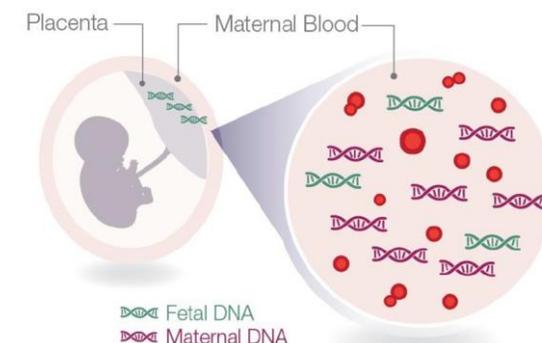
Percorso clinico di qualità



***NIPT:** test di screening prenatale che valuta il rischio delle principali aneuploidie (T21, T18, T13) e alcune microdelezioni cromosomiche fetali*

Il DNA libero di origine fetale (cffDNA):

- origina principalmente dalle cellule del citotrofoblasto placentare in apoptosi
- frazione variabile tra il 3 e il 20% del DNA totale estratto dal plasma
- la concentrazione che tende ad aumentare progressivamente nel corso della gravidanza
- viene completamente rimosso dalla circolazione materna entro poche ore dal parto



Approcci tecnologici:

1. TARGETED ANALYSIS (NGS, NGS SNP-based, DANSR, DEA):

- elevata profondità di analisi su cromosomi / regioni di interesse;
- con i metodi NGS, NGS SNP-based, DANSR è possibile misurare la frazione fetale con SNP genotyping;
- NGS SNP-based fornisce un'analisi qualitativa

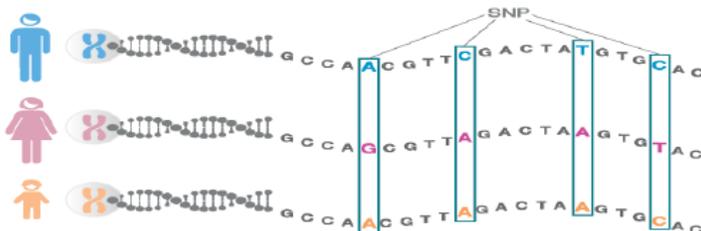
2. GENOME-WIDE (MPSS):

- bassa profondità di analisi ma su tutti i cromosomi;
- risente dello sbilanciamento tra cromosomi materni e fetali;
- minore affidabilità nel rilevare microdelezioni / duplicazioni

NIPT NGS SNP-based

Tecnica

SNP = single nucleotide polymorphism



A DNA sequence variation occurring when a single base pair (nucleotide) - A, T, C, or G - is changed. These are normal genetic changes that occur in every person.

Precisione

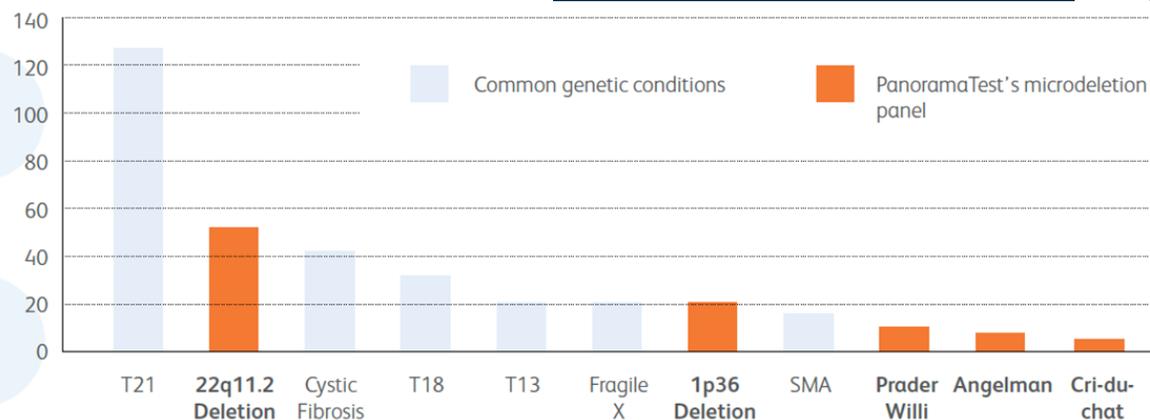
- ✓ è stato validato in gravidanze ad alto e basso rischio
- ✓ ha il più basso tasso di falsi negativi
- ✓ identifica i casi di vanishing twin (>15% dei falsi positivi)
- ✓ riduce al minimo la possibilità che un'anomalia materna determini un falso positivo
- ✓ rivela la presenza di triploidie

Precocità

Può essere fatto dalla 9^a settimana con una frazione fetale minima di 2.8%

INCIDENZA SU 100.000 NATI VIVI

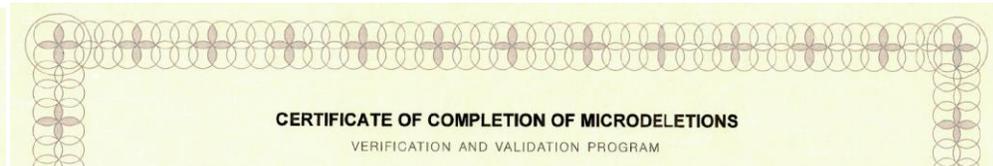
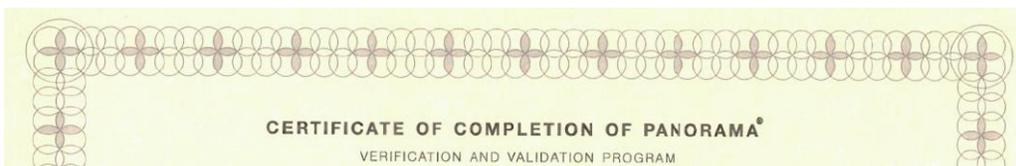
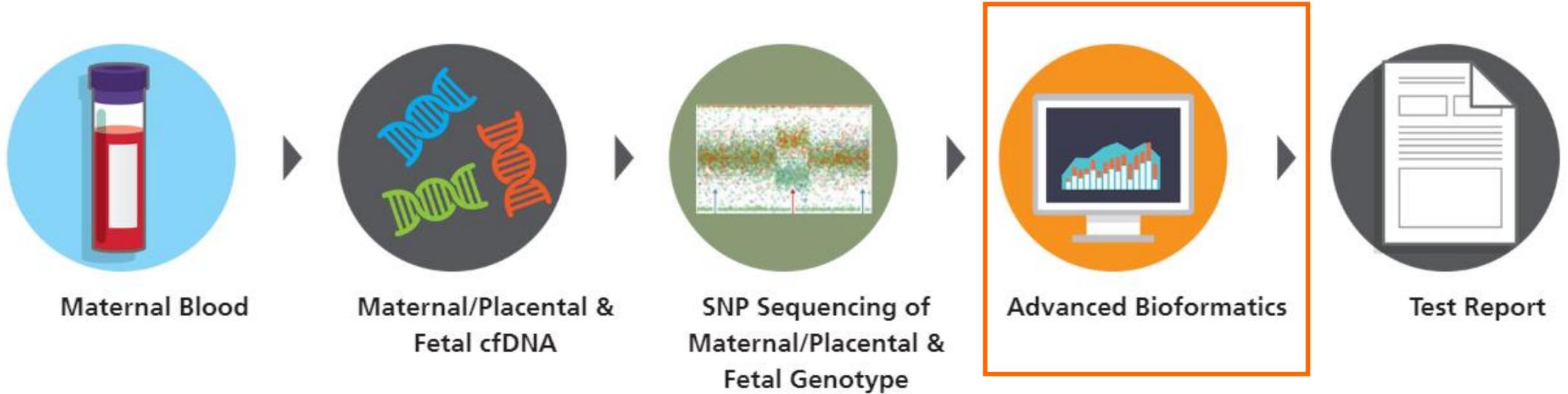
Pannello di microdelezioni



Gravidanze gemellari

- ✓ Informazioni sullo zigotismo
- ✓ Frazioni fetali individuali per i gemelli eterozigoti
- ✓ Sesso fetale per ciascun gemello
- ✓ Probabilità di monosomia X per gemelli monozigoti

NIPT NGS SNP-based in Personal Genomics



- tempistiche ridotte
- controllo del processo
- referto in italiano e secondo gli standard italiani / europei
- centralizzazione dell'algoritmo e della validazione

Test genetico: Tumore mammella e/o ovaio (geni BRCA1 e BRCA2)

Sede	Maschi	Femmine
Vie aerodigestive superiori*	7.400	2.300
Esofago	1.500	500
Stomaco	7.400	5.300
Colon-retto	28.800	22.500
Colon	19.700	16.200
Retto	9.000	6.300
Fegato	8.900	3.900
Colecisti e vie biliari	2.300	2.600
Pancreas	6.500	6.800
Polmone	27.900	13.600
Osso	400	300
Cute (melanomi)	7.200	6.500
Mesotelioma	1.300	500
Sarcoma di Kaposi	600	300
Tessuti molli	1.200	900
Mammella	500	52.300
Utero cervice		2.400
Utero corpo		8.400
Ovaio		5.200
Prostata	35.300	
Testicolo	2.400	
Rene, vie urinarie**	8.900	4.500
Parenchima	7.600	3.900
Pelvi e vie urinarie	1.300	600
Vescica***	21.500	5.600
Sistema nervoso centrale	3.300	2.800
Tiroide	3.800	10.400
Linfoma di Hodgkin	1.200	1.000
Linfoma non-Hodgkin	7.600	6.100
Mieloma	3.100	2.800
Leucemie	5.100	3.800
Tutti i tumori, esclusi carcinomi della cute	194.800	178.500

TABELLA 5. Numero di nuovi casi tumorali, totale e per alcune delle principali sedi, stimati per il 2018 (popolazione italiana residente da previsioni ISTAT - www.demo.istat.it)

* Comprende lingua, bocca, orofaringe, rinofaringe, ipofaringe, faringe NAS, laringe.

** Comprende rene, pelvi e uretere.

*** Comprende sia tumori infiltranti sia non infiltranti.

Test in NGS per la ricerca di variazioni causative nei geni *BRCA1* e *BRCA2*

Incidenza di tumore al seno è di circa 1/8 (12%), di carcinoma ovarico 1/75 (1,4%) e di cancro all'endometrio (cancro uterino) 1/36 (2,8%)

30-50% dei casi di tumore mammella e/o ovaio la causa è un'alterazione a carico di *BRCA1* e *BRCA2*

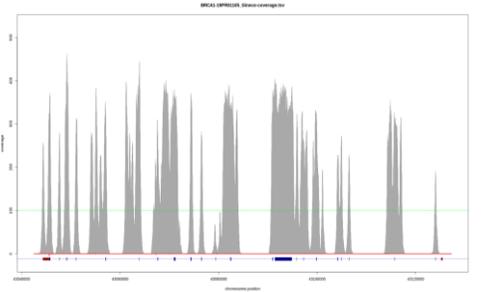
- identificare il difetto genico responsabile della patologia
- screening per identificare eventuali soggetti, e relativi familiari, a rischio

- ogni ditta ha sviluppato il suo kit per la detection di mutazioni a carico di *BRCA1* e *BRCA2*

Performance

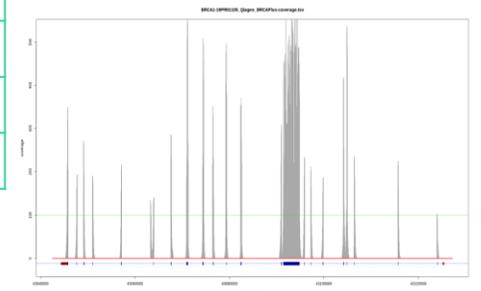
Personal Genomics Panel

sample	#mapped	%dedup	avg_cov	%1X	%5X	%10X	%PASS	%PASS_DP10
NA12878	398468	1.74	248.18	99.59	99.32	99.01	97.13	96.74
VEQ-1	432141	1.96	265.56	99.51	99.27	99.06	97.05	96.79
VEQ-2	440151	1.75	272.39	99.59	99.46	99.22	97.22	96.95



Commercial Panel

sample	#mapped	%dedup	avg_cov	%1X	%5X	%10X	%PASS	%PASS_DP10
NA12878	84728	14.38	397.24	100	100	100	99.42	99.42
VEQ-1	78696	13.7	368.57	100	100	100	99.42	99.42
VEQ-2	85923	15.69	401.79	100	100	99.92	99.42	99.42



Validazione

Familial breast and ovarian cancer (BRCA1 and BRCA2) EQA 2018



Validated Results

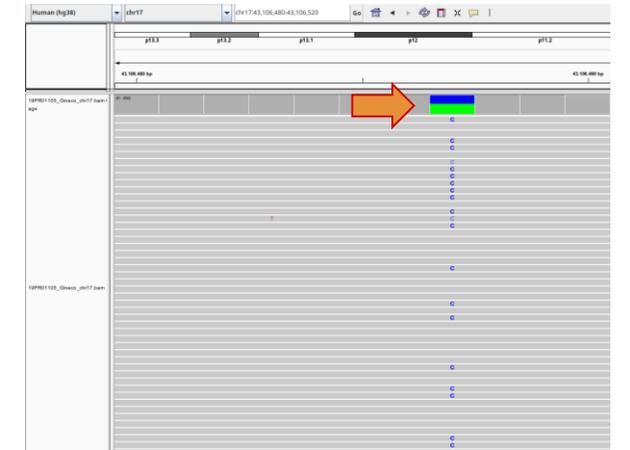
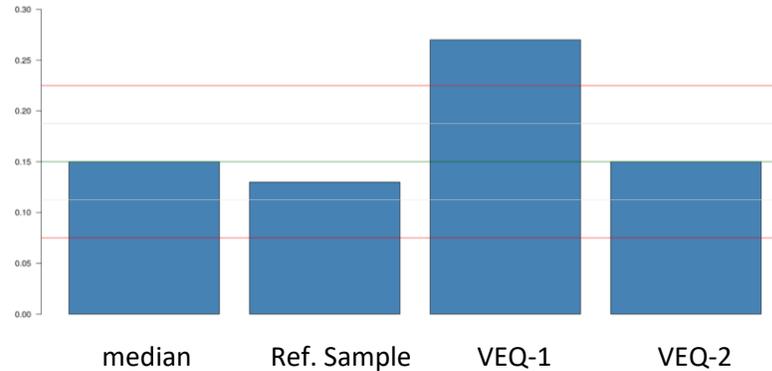
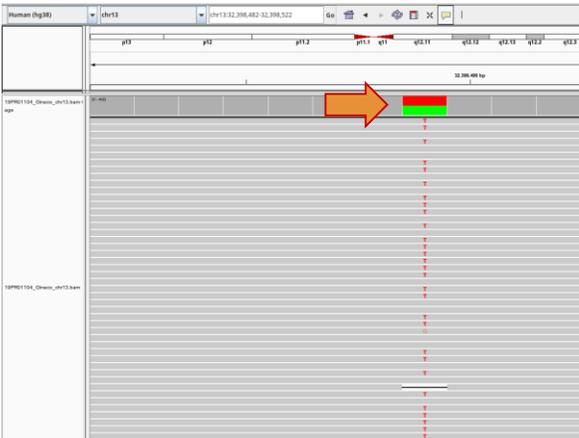
Case	Patient Name	Patient Date of Birth	Genotyping Results		
			Variant	Classification [#]	Status
1	VEQ-1	xx/xx/xxxx	BRCA2 c.9976A>T p.(Lys3326Ter) ¹ No pathogenic variant detected	Class 2	Heterozygous
			BRCA1 duplication of exon 12 (LRG2921) OR duplication of exon 13 (NM_007294.3 legacy / custom exon numbering)	Class 5	Heterozygous
2	VEQ-2	xx/xx/xxxx	BRCA1 c.181T>G p.(Cys61Gly)	Class 5	Heterozygous

NM_000059.3(BRCA2):c.9976A>T:p.(Lys3326*)

[#] Classification according to ACMG (2015). Genet. Med. May;17(5):405-24

¹ Local laboratory policy on reporting likely benign variants may indicate that this variant is not reported.

NM_007294.3(BRCA1):c.181T>G:p.(Cys61Gly)



Test genetico portatori

- verificare l'eventuale condizione di portatore sano e comprenderne le eventuali potenziali conseguenze dal punto di vista riproduttivo
 - Identificare eventuali familiari a rischio
- in commercio esistono innumerevoli soluzioni: da 1 gene fino >300 geni a trasmissione AR o XR

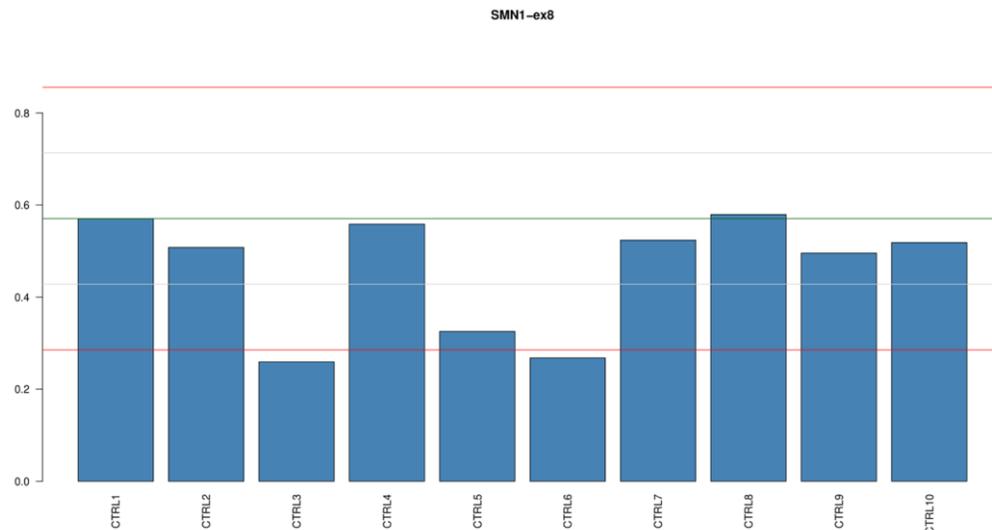
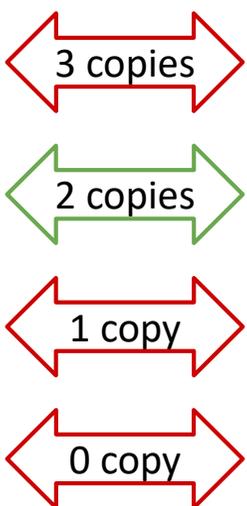
Condizione	Gene	Trasmissione	Rischio Portatore
Alfa talassemia	<i>HBA1, HBA2</i>	AR	1 su 25
Atrofia muscolare spinale (SMA)	<i>SMN1</i>	AR	1 su 35
Beta talassemia	<i>HBB</i>	AR	1 su 40
Fenilchetonuria	<i>PAH</i>	AR	1 su 50
Fibrosi cistica	<i>CFTR</i>	AR	1 su 25
Perdita dell'udito non sindromica	<i>GJB2</i>	AR	1 su 42
Distrofia muscolare di Duchenne e Becker	<i>DMD</i>	XLR	1 su 500
+ Sindrome dell'X fragile	<i>FMR1</i>	XLR	1 su 178

CARRIER DONNA

CARRIER UOMO

Performance e validazione

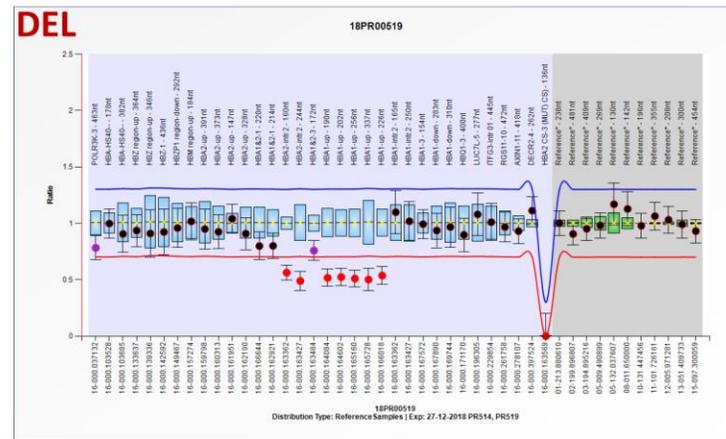
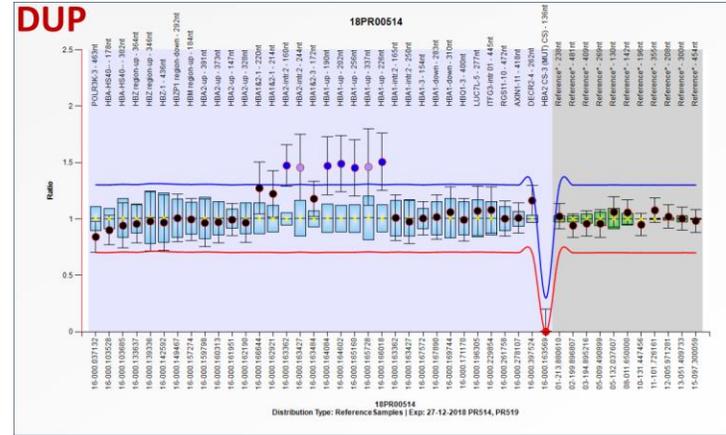
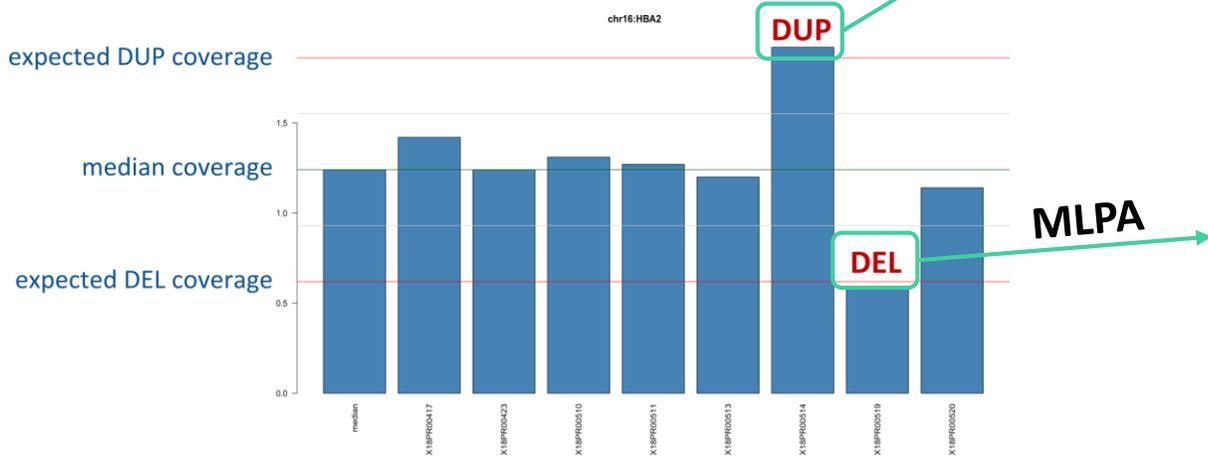
gene	gene length	% 1X	% 5X	% 10X	% PASS
HBB	626	100.00	100.00	100.00	100.00
PAH	2,692	100.00	100.00	100.00	100.00
GJB2	2,332	100.00	100.00	100.00	100.00
HBA1	842	100.00	100.00	100.00	42.85
HBA2	864	100.00	99.47	97.65	40.25
SMN1	1,624	100.00	100.00	100.00	N.A.
CFTR	6,131	100.00	100.00	100.00	99.76
DMD	15,708	100.00	100.00	100.00	100.00



SMN1

Validazione

Example of **HBA2** results confirmed by **MLPA**.



Take Home Message

Nuova era della
diagnostica
molecolare

- Considerare l'**utilità clinica** del test da proporre
- **adeguati percorsi** sia nell'offerta sia nella comunicazione dei risultati
- **esperienza e competenze** tecnico-scientifiche
- **Qualità e obiettivi definiti** in accordo con le linee guida, le buone pratiche e le raccomandazioni più aggiornate

Genet Med. 2019 Sep;21(9):1916-1926. doi: 10.1038/s41436-019-0450-0. Epub 2019 Mar 7.

The transformation of medical genetics by clinical genomics: hubris meets humility.

Grody WW¹.



Grazie per l'attenzione