



**L'INTERPRETAZIONE DELLE VARIANTI DI SEQUENZA IN GENI DI PREDISPOSIZIONE A  
TUMORI: INDICAZIONI OPERATIVE PER IL LABORATORIO DIAGNOSTICO**

*Maurizio Genuardi, Liliana Varesco per il Gruppo di Lavoro SIGU Genetica Oncologica  
Alessandra Ferlini, Marina Grasso, Marcella Neri per il Gruppo di Lavoro SIGU Genetica  
Molecolare*

## Premessa

L'interpretazione a scopo clinico delle varianti genetiche identificabili dai test attuali di predisposizione a tumori avviene ancora in assenza di criteri standardizzati riconosciuti a livello internazionale. Ciò rende il processo di interpretazione ancora molto complesso e potenzialmente soggetto ad errori, in parte "inevitabili" (i.e. legati ai limiti delle conoscenze) ma in parte "evitabili" (i.e. legati alla mancata corretta applicazione delle conoscenze).

Il laboratorio diagnostico che vuole contenere gli errori "evitabili" deve riconoscere i limiti dello stato dell'arte e del proprio expertise, individuare le soluzioni ritenute più idonee ad affrontare le criticità individuate ed esplicitare le motivazioni delle scelte operative compiute.

Il presente documento vuole fornire indicazioni operative utili nell'ottica di un sistema di gestione della qualità (vedi SIGUCERT Standard Laboratori Genetica Medica Rev.: 30.04.2014 e il documento 2013 "Consulenza genetica e test genetici in oncologia: aspetti critici e proposte di AIOM - SIGU").

## 1. Finalità del processo interpretativo

Scopo del processo è ottenere una classificazione delle varianti di sequenza del DNA individuate dal laboratorio utilizzabile per la gestione clinica del probando e dei suoi familiari.

Il laboratorio deve avere una **procedura operativa standard scritta** per ogni gene esaminato che illustri i singoli snodi decisionali del processo, espliciti le motivazioni delle scelte effettuate e definisca le responsabilità.

## 2. Definizione della variante

La definizione della variante osservata deve essere effettuata secondo standard internazionali (nomenclatura HGVS; conseguenza prevista a livello trascrizione/traduzione: missense, stop, frameshift, etc). Una corretta definizione della variante costituisce la base di partenza per il processo di classificazione clinica.

Per ogni variante identificata, il laboratorio deve allestire una "**scheda variante**" **ad uso interno** (es. allegato 1) per tenere traccia degli elementi utilizzati nel processo di interpretazione e rendere possibile il controllo interno prima della refertazione (doppia lettura) o dopo (es. audit interno periodico).

## 3. Schema di classificazione (Tabella 1)

E' possibile utilizzare un **sistema a 3 categorie** o un **sistema a 5 categorie** come proposto dal gruppo IARC (Plon et al. Hum. Mutat. 2008. 29:1282-1291) e ACMGG-AMP, American College of Medical Genetics and Genomics in collaborazione con la Association for Molecular Pathology (Richards et al. Genet. Med. 2015. 17:405-424).

### **Schema a 3 categorie:**

- Sicuramente o probabilmente patogenetica (o causativa)

- Sicuramente o probabilmente benigna (o di scarso o nullo significato clinico)
- Di incerto significato clinico ("Variant of uncertain significance" - "VUS")

**Schema IARC/ACMG-AMP a 5 categorie (classi):**

- Patogenetica (causativa; classe 5)
- Probabilmente patogenetica (classe 4)
- Di incerto significato clinico ("VUS"; classe 3)
- Probabilmente benigna (classe 2)
- Benigna (classe 1)

#### 4. Implicazioni cliniche della classificazione

Per "**Patogenetica**" si intende una variante associata ad un alto rischio di cancro, ovvero ad un rischio di cancro diverse volte superiore rispetto a quello della popolazione generale, descritto per i singoli geni dalla letteratura internazionale specifica di riferimento, tale da modificare in maniera significativa i percorsi di prevenzione primaria e secondaria per i soggetti geneticamente predisposti allo sviluppo di tumori.

Vengono pertanto al momento escluse da tale classificazione le cosiddette varianti "a rischio intermedio", cioè quelle varianti che conferiscono un rischio aumentato rispetto a quello della popolazione generale ma più basso rispetto alle precedenti, e comunque non tale da modificare sostanzialmente le indicazioni cliniche per la prevenzione. In ogni caso esistono attualmente solo pochi esempi effettivamente documentati di varianti a rischio intermedio.

Dal punto di vista clinico (indicazioni di prevenzione primaria e secondaria per probandi e familiari) le varianti *Patogenetiche* e *Probabilmente patogenetiche* vengono trattate allo stesso modo, così come le varianti *Probabilmente benigne* sono assimilate a quelle *Benigne*.

La differenza principale tra il sistema a 3 categorie ed il sistema a 5 categorie risiede nella possibilità di riclassificazione delle varianti "**Probabilmente patogenetiche**" e "**Probabilmente benigne**" (in particolare delle prime), sulla base di nuove evidenze.

La soglia di probabilità per definire una variante probabilmente patogenetica è stata arbitrariamente stabilita (es. 90% per ACMGG-AMP, 95% per ENIGMA per geni BRCA, 95% per InSiGHT per geni MMR) e analogamente è stata definita una soglia per probabile benignità. Questa soglia è stata ritenuta un compromesso accettabile; tuttavia, tali probabilità sottendono la possibilità concreta che nuove evidenze inducano a modificare la classificazione. Pertanto, chi osserva la variante **deve cercare di contribuire alla raccolta di ulteriori evidenze scientifiche**: per tale motivo, l'utilizzo della classificazione IARC/ACMG-AMP è attualmente preferibile rispetto alla classificazione a 3 categorie.

Generalmente, il miglioramento della classificazione di una variante dipende dalla generazione di nuove evidenze di vario tipo attraverso sforzi di ricerca collaborativa nazionale ed internazionale. Qualora invece esistano ulteriori accertamenti di comprovata utilità per una migliore classificazione della variante, questi devono essere indicati nel referto come test di approfondimento.

## 5. Tipi e fonti di evidenza per la classificazione

Il processo di classificazione è complesso ed è basato su **diversi tipi di evidenze**, che includono:

1. Caratteristiche molecolari delle varianti (nonsense, frameshift, missenso, silente, ecc.)
2. Insorgenza *de novo* o presunta tale
3. Test su RNA per documentare anomalie di splicing o quantitative di espressione
4. Test funzionali sui prodotti proteici
5. Frequenza nella popolazione generale (consultando anche database di riferimento)
6. Co-occorrenza *in trans* di varianti sicuramente patogenetiche nello stesso gene
7. Analisi di segregazione
8. Test molecolari su tessuto tumorale
9. Spettro mutazionale
10. Programmi di predizione *in silico*
11. Presenza di varianti patogenetiche in altri geni implicati nella patologia in esame
12. Caratteristiche fenotipiche del paziente

Questi dati possono essere ricavati da **diverse fonti**: web, letteratura scientifica, comunicazioni personali di fonti attendibili e verificate, e/o dallo stesso laboratorio che ha eseguito l'analisi.

Poiché la disponibilità di dati clinici, molecolari e funzionali è l'elemento principale per ottenere classificazioni clinicamente utili delle varianti, sia nel percorso di interpretazione iniziale sia nelle revisioni periodiche (vedi punti successivi), deve essere prevista la **consultazione di specifici database**. Questa può essere facilitata dalla condivisione delle informazioni nell'ambito di una rete di centri clinici e diagnostici, nella quale il flusso di dati è alimentato dai singoli gruppi partecipanti, nel rispetto delle normative sulla privacy.

Le evidenze disponibili, per tipo e fonte, potranno avere un "peso" diverso durante il processo di interpretazione.

## 6. Processo di classificazione (Figura 1)

L'impiego delle evidenze disponibili deve essere effettuato secondo **criteri condivisi a livello scientifico internazionale**, graduando i livelli di evidenza (es. *molto forte; forte; di supporto*).

Per alcuni geni esistono consorzi internazionali multidisciplinari impegnati nel processo di classificazione. In particolare:

- ENIGMA ( <http://enigmaconsortium.org/> ) per i geni *BRCA1* e *BRCA2*;
- InSiGHT ( [www.insight.org/](http://www.insight.org/) ) per i geni *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*.

Tali gruppi stabiliscono criteri di classificazione gene-specifici e classificano le varianti presenti nei database.

Per varianti già prese in considerazione da questi consorzi è opportuno utilizzare e riportare nel referto la classificazione da questi attribuita.

Il risultato della classificazione viene spesso riportato in database gene/malattia-specifici. Nel prendere in considerazione i dati riportati, vanno distinti i database che prevedono una revisione delle evidenze classificative da quelli che riportano semplicemente il dato di

sequenza interpretato da terzi. E' auspicabile, in ogni caso, una valutazione delle fonti e delle evidenze citate prima di riportare la classificazione del database nel referto.

Per le varianti non (ancora) analizzate dai consorzi e/o riportate nei database è indicato procedere ad analizzare le fonti di evidenza disponibili secondo i criteri riportati dai consorzi stessi (da utilizzare nella stesura delle procedure del laboratorio).

Per altri geni attualmente non esistono ancora criteri di classificazione specifici o consorzi operativi come quelli sopra riportati, anche se sono in corso alcune iniziative in questo ambito. In assenza di raccomandazioni gene-specifiche, si consiglia di utilizzare per la stesura delle procedure del laboratorio i **criteri proposti nel recente documento dell' ACMGG-AMP**, American College of Medical Genetics and Genomics in collaborazione con la Association for Molecular Pathology (Richards et al. Genet. Med. 2015. 17:405-424).

In particolare, si ricorda che i risultati di programmi di predizione *in silico* non devono essere utilizzati come evidenza principale per la classificazione, ma possono costituire un elemento a supporto di una classificazione già raggiunta utilizzando altri dati.

Nel rifarsi ai criteri generali ACMGG-AMP, **è opportuno tenere presenti le peculiarità dei singoli geni e patologie.**

Ad esempio:

- allo stato attuale non sono note varianti patogenetiche di tipo missenso del gene *APC*, salvo quelle che alterano lo splicing. Le varianti missenso p.I1307K, p.E1317Q e p.G2502S sono dei polimorfismi con frequenza allelica > 0.01 nella popolazione generale e pertanto vanno considerate come di scarso o nullo significato clinico;
- le varianti del gene *RET* associate a patologie oncologiche (carcinoma midollare tiroideo; MEN2; feocromocitoma/paraganglioma) sono di tipo missenso (gain of function). Pertanto eventuali mutazioni troncanti o delezioni più o meno ampie del gene non hanno effetti di rilievo sul piano clinico nei riguardi delle suddette patologie;
- per alcune patologie, la presenza di fenotipi molto specifici, come un quadro di sindrome di Gorlin rispondente ai criteri riconosciuti di diagnosi clinica, può essere considerata un elemento di supporto per la classificazione di una variante come *Patogenetica* o *Probabilmente patogenetica* qualora la sensibilità del test sia molto elevata (varianti patogenetiche del gene *PTCH*, l'unico finora associato a sindrome di Gorlin sono identificate in più del 90% dei casi), il gene mostri una scarsa variabilità nella popolazione generale (documentata dai database di esomi), e sia documentata co-segregazione con il fenotipo.

## 7. Revisione periodica delle varianti

Utilizzando lo schema IARC/ACMGG-AMP, la classificazione di una variante è considerabile come definitiva quando è sicuramente patogenetica (Classe 5) o sicuramente benigna (Classe 1). Si ritiene infatti che solo in pochissimi casi vi sarà un cambio di classificazione a seguito dell'accumularsi di nuove evidenze, anche se sono noti esempi di questo tipo di cambiamenti.

Un cambio di classificazione nel tempo è invece prevedibile (ed auspicabile) per le altre classi (classe 4=probabilmente patogenetica; classe 3= VUS; classe 2= probabilmente benigna).

Deve essere quindi **previsto nelle procedure operative del laboratorio un processo di revisione delle varianti** da effettuarsi in maniera sistematica a scadenza prefissata (es. ogni

anno o ogni 2 anni), al fine di verificare la disponibilità di nuovi elementi utili per la classificazione. La riclassificazione può anche essere richiesta dal medico impegnato nella consulenza genetica post-test o nel management del paziente.

## 8. L'interpretazione nel referto molecolare

Il referto molecolare deve contenere alcune informazioni standard (si veda il modello di referto di analisi molecolare proposto dal GdL Genetica Molecolare).

In particolare, i referti molecolari devono indicare:

- **quali varianti non vengono eventualmente riportate** nel referto (es. polimorfismi comuni, varianti benigne) e
- **l'interpretazione a scopo clinico** del risultato utilizzando le definizioni riportate al punto 3 del presente documento (patogenetica, etc). Oltre alla dicitura che definisce la classe della variante, vanno succintamente riportate le evidenze utilizzate, l'effetto previsto sulla proteina e l'eventuale nesso causale con il fenotipo del paziente. Le eventuali fonti di letteratura e web utilizzate per l'interpretazione possono anche essere riportate in una nota/commento.

Il referto deve anche contenere, nel campo interpretazione o in una nota di richiamo, **indicazioni per accertamenti ulteriori** ai fini della classificazione della variante (test funzionali su proteine o su RNA; analisi di segregazione, ecc.), qualora siano disponibili test validati a scopo clinico.

Non devono essere riportati i risultati complessivi di analisi di predizione *in silico*, in quanto essi possono essere di supporto alla classificazione ma non costituiscono attualmente un livello di evidenza molto forte/forte.

Tabella 1.

Schemi Classificazione e loro implicazioni cliniche			
3 categorie	5 categorie	Implicazioni cliniche	Ricerca
Sicuramente o Probabilmente patogenetica	patogenetica	Test sui famigliari	-
	Probabilmente patogenetica	Test sui famigliari	Sì, da perseguire
VUS	VUS	No test sui famigliari	Sì, da perseguire
Sicuramente o Probabilmente benigna	Probabilmente benigna	No test sui famigliari	Sì, da perseguire
	benigna	No test sui famigliari	-

## ALLEGATO 1

### Esempio di SCHEDA VARIANTE ad uso interno

Gene Trascritto	Ubicazione	Variante	Categoria	Zigosità	Classificazione	Patologia	Ereditarietà	Origine parentale
XX	Esone X/ Introne X/ Promotore/ UTR	c.XXX  (p.XXX)	Nonsense  Frameshift  Ampia delezione (esone/i/intero gene)  Sito canonico di splicing (AG/GT)  Missenso  Silente  Intronica (oltre siti di consenso)  Delezione di singolo/pochi aminocido/i  Ampia duplicazione	(Apparentemente) Omozigote/  Eterozigote/  Emizigote/  Mosaicismo/			Autosomica dominante  Autosomica recessiva  (X linked)	Paterna  Materna  Ignota



Fonti consultate	Riportata (Sì/No)	Classificazione	Frequenza	Note
BIC				
LOVD				
LOVD IARC (BRCA)				
IARC TP53				
InSIGHT (geni MMR)				
UMD				
ExAC				
Exome Variant Server				
1000 Genomes				
<i>Altri database ....</i>				
Letteratura scientifica 1				
Letteratura scientifica 2				
Letteratura scientifica ... n				

Tipo di evidenze	Fonte	Risultati	Note
Caratteristiche sequenza			
Segregazione			
Frequenza popolazione			
Studi caso-controllo			
Co-occorrenza altre varianti (stesso gene: <i>in cis</i> o <i>in trans</i> ; altro gene causativo)			
RNA			
Studi funzionali			
Test su tessuto tumorale			
Origine parentale			
Programmi software di predizione			

Altro			
-------	--	--	--

<b>Analisi <i>in silico</i></b>	<b>Risultato</b>	<b>Note</b>
<i>Proteina</i>		
SIFT		
Polyphen-2		
Align-GVGD		
MAPP		
MAPP-MMR		
PON-MMR		
PON-2		
Mutation Taster		
CADD		
Condel		
Altro		
<i>RNA</i>		
Genesplicer		
Human Splicing Finder		
MaxEntScan		
NNSplice		
FSplice		
NetGene2		

<b>Interpretazione (schema a 5 classi)</b>	
Patogenetica (Classe 5)	
Probabilmente patogenetica (Classe 4)	
Incerto significato (Classe 3)	
Probabilmente benigna (Classe 2)	
Benigna (Classe 1)	

**Giustificazione della classificazione:**

La variante XYZ è classificabile (o "è stata classificata") come... (*Patogenetica – Benigna – ecc.*) (Classe 1-5), in base a : 1) ...; 2) .....; n) ..... Tale classificazione è supportata da evidenze (*in silico*, letteratura, altro) .... \_\_\_\_\_

Firma /Sigla dell'operatore

.....

Data

.....

## Allegato 2.

### Processo di interpretazione

