

Raccomandazioni sull'uso delle analisi di *Chromosomal Microarrays* (CGH/SNP-array) applicate alla diagnosi genetica del deficit intellettivo, dei disturbi comportamentali e dei difetti congeniti.

Documento del Gruppo di Lavoro di Genetica Clinica della Società Italiana di Genetica Umana

Data 8 Febbraio 2011

Hanno contribuito alla stesura del documento: Luciana Chessa, Francesca Forzano, Chiara Pantaleoni, Manuela Priolo, Marcella Zollino e Romano Tenconi

INDICE

- 1) Finalità del documento
- 2) Indicazioni cliniche
- 3) Difficoltà applicative
- 4) Individuazione di un percorso diagnostico:
 - consulenza genetica pre e post test
 - modalità e sedi di invio dei campioni
 - tempi di refertazione
- 5) Riferimenti bibliografici

FINALITA' DEL DOCUMENTO

L'applicazione delle tecniche di Chromosomal MicroArray (CMA) nella diagnosi del deficit intellettivo e dei difetti congeniti causati da anomalie cromosomiche quantitative è da ritenersi attualmente ineludibile (Stankiewicz P, 2010)(Miller DT, 2010).

Con il presente documento il gruppo di Lavoro di Genetica Clinica intende fornire dei suggerimenti riguardo il percorso applicativo di tali tecniche, cercando di coniugare i suggerimenti della comunità scientifica internazionale con la realtà italiana.

I punti di partenza del documento sono i seguenti:

- la resa diagnostica dell'esame cromosomico convenzionale è del 3%, escludendo la sindrome di Down. Con le tecniche CMA, anomalie cromosomiche quantitative si riscontrano in media nel 15% dei casi con cromosomi apparentemente normali;
- l'utilizzo delle metodiche CMA nella pratica clinica è raccomandato come test di prima scelta, in sostituzione dell'esame cromosomico standard sia per la capacità diagnostica significativamente più alta (Consensus Statement di International Standard Cytogenomic Array Consortium)(Miller DT, 2010), sia per un miglior rapporto costo-beneficio (Regier, DA, 2010).

Lo scopo del documento è quello di evitare che le analisi di CMA siano applicate acriticamente a qualunque caso di deficit intellettivo e di malformazione congenita ("genome first"), con conseguente inutile dispendio economico e mancata diagnosi di specifiche condizioni monogeniche.

Le raccomandazioni prodotte nel presente documento fanno riferimento a quanto suggerito dal Report of the UK Genetic Testing Network Working Party (Evaluation of the use of array comparative genomic hybridisation in the diagnosis of learning disability 2006; UK Genetic Testing Network arrayCGH Commissioning Workshop 2009), dall'Association for Clinical Cytogenetics in un documento di linea guida (Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics, Constitutional array-CGH best practice guidelines, 2009) e dal Consensus Statement internazionale sopra indicato.

LE TECNICHE CMA

La tecnica array-CGH prevede l'ibridazione su un microarray, costituito da un supporto di vetro la cui superficie è coperta di frammenti di DNA (sonde), di un campione di DNA del soggetto da analizzare e di un DNA di controllo o "di riferimento". I due DNA sono marcati con fluorocromi diversi e la misurazione del rapporto tra le intensità di fluorescenza emesse da ogni sonda permette di identificare le variazioni del numero di copie del DNA del campione in esame rispetto al DNA di riferimento.

Nella tecnica SNP-array viene marcato e ibridato sull'array solo il DNA in esame e i cambiamenti del numero delle copie vengono identificati confrontando l'intensità di fluorescenza emessa da ogni SNP con quelle misurate in un set di esperimenti analoghi su DNA di riferimento.

INDICAZIONI CLINICHE

Anche se le tecniche CMA possono trovare ampie applicazioni in ogni campo della patologia umana, oggetto del presente documento è la loro applicazione alla diagnosi del deficit intellettivo e difetti congeniti.

Formattato: Giustificato

Si intende per deficit intellettivo una diminuzione delle capacità cognitive ed adattative, ad insorgenza prima dei 18 anni. Si tratta di una condizione relativamente comune, che interessa il 2-3% della popolazione. La causa del deficit intellettivo viene identificata attualmente nel 40% dei pazienti; quando identificata essa è genetica nella quasi totalità dei casi, soprattutto se il deficit è grave.

Situazione analoga per le malformazioni congenite che hanno una prevalenza alla nascita del 2-3%, in cui la causa viene identificata nel 40% dei casi e, quando identificata, è cromosomica o monogenica in circa ¾ dei casi.

Si può stimare che in Italia ogni anno da 900 a 1350 persone con deficit intellettivo o difetti congeniti non avrebbero la diagnosi eziologica se CMA non venisse utilizzato come test diagnostico.

Il corretto inquadramento diagnostico è importante sia per il paziente che per la sua famiglia. La diagnosi contribuisce a identificare la causa del disturbo, a chiarirne la prognosi, e, a volte, a guidare il trattamento verso modelli terapeutici specifici e più adeguati in relazione al disturbo osservato. Aiuta poi, soprattutto nel caso di difetti congeniti, a ricercare possibili segni clinici specifici della condizione non rilevati alla valutazione medica che possono modificarne la prognosi.

La diagnosi stimola inoltre una più accurata anamnesi familiare prossima/remota che può portare all'identificazione di ulteriori casi in famiglia.

Il test eseguito in epoca pediatrica fornisce informazioni utili ai genitori per capire le future esigenze del bambino, per dare la possibilità di accedere a particolari servizi e gruppi associativi di supporto e per aiutarli nel futuro processo decisionale riproduttivo. In più, offre ai genitori la possibilità di uscire da un senso di frustrazione legato alla non conoscenza di tutti i punti esposti in precedenza.

PERCORSO APPLICATIVO E CRITERI DI INCLUSIONE DEI PAZIENTI

Riteniamo che nel percorso applicativo di tali tecniche il primo passo sia una valutazione clinica, critica, del paziente da parte di un medico specialista in genetica medica (Council of Europe, Committee of Ministers, Recommendation to member states 2010).

Formattato: Giustificato

Indicazioni: si suggerisce di procedere con l'analisi CMA, in presenza di segni e sintomi in verosimile associazione sindromica che siano evocativi di una patologia cromosomica.

Sono in generale categorie con:

1. ritardo psico-motorio/deficit intellettivo idiopatico

2. malattie dello spettro autistico idiopatico per la sensibile frequenza di CNV a ruolo francamente causativo o predisponente (R. Toro, 2010)
3. due o più malformazioni maggiori da causa non nota (Miller DT, 2010), soprattutto coinvolgenti mani e cuore (UK Genetic Testing Network, 2009)
4. riarrangiamenti cromosomici apparentemente bilanciati con anomalie fenotipiche
5. costituiscono una indicazione per l'analisi tramite CMA se si associano a ritardo psicomotorio o a anomalie fenotipiche maggiori o minori le seguenti patologie:
 - disturbi comportamentali,
 - deficit di attenzione-iperattività (N.M. Williams, 2010),
 - epilessia (E. Ezugha, 2010),
 - microcefalia,
 - malformazione maggiore,
 - anomalie di crescita (deficit o eccesso)

Esclusioni: non vi è indicazione all'analisi con CMA per infertilità o aborti ripetuti e per le trisomie 21, 13 e 18 il cui quadro clinico è ben noto. Per altre sindromi cromosomiche con clinica altrettanto nota come la s. Cri-du-chat (Ohnuki Y, 2010), la s. Wolf-Hirschhorn (Zollino M, 2008), la s. da microdelezione 1p36 (Rosenfeld JA, 2010) vi è invece indicazione all'analisi CGH per la grande variabilità di dimensioni della delezione da paziente a paziente. Per altre sindromi clinicamente riconoscibili, come la microdelezione 22q11(anche se eterogenea fenotipicamente), la s. Williams e la s. Prader-Willi, si ricorre, nel forte sospetto diagnostico, a altre tecniche diagnostiche (citogenetiche o molecolari) che hanno una detection rate quasi completa.

La selezione pre-test ha lo scopo anche di escludere, su base fenotipica, condizioni sindromiche che, pur potendosi associare a microdelezione cromosomica, sono più spesso causate da mutazione monogenica, per cui il test di elezione è il sequenziamento genico e/o MLPA/FISH specifica per il gene causativo, come la del9q34, s. Pitt-Hopkins, s. Mowat-Wilson, la s. Rubinstein-Taybi, s. Smith-Magenis, s. Sotos.

DIFFICOLTÀ APPLICATIVE

Riteniamo che, dopo opportuna selezione basata sui criteri elencati sopra, l'analisi CMA possa essere utilizzata in completa sostituzione dell'esame cromosomico standard, al quale si può fare ricorso secondariamente, quando ritenuto opportuno, per un'eventuale verifica dell'anomalia osservata con CMA o per la ricerca di anomalie cromosomiche bilanciate non diagnosticabili mediante CMA.

In Italia alcuni aspetti rendono difficile questo percorso e consigliano quindi di effettuare un'accurata selezione clinica prima di applicare il test:

1. il numero relativamente esiguo di laboratori disposti ad accettare un campione biologico ai fini esclusivamente diagnostici e che rispondono ai criteri tecnici suggeriti dal documento del Gruppo di Lavoro di Citogenetica.

Formattato: Giustificato

2. la mancata definizione di alcuni punti relativi al test e alla richiesta del test, come:

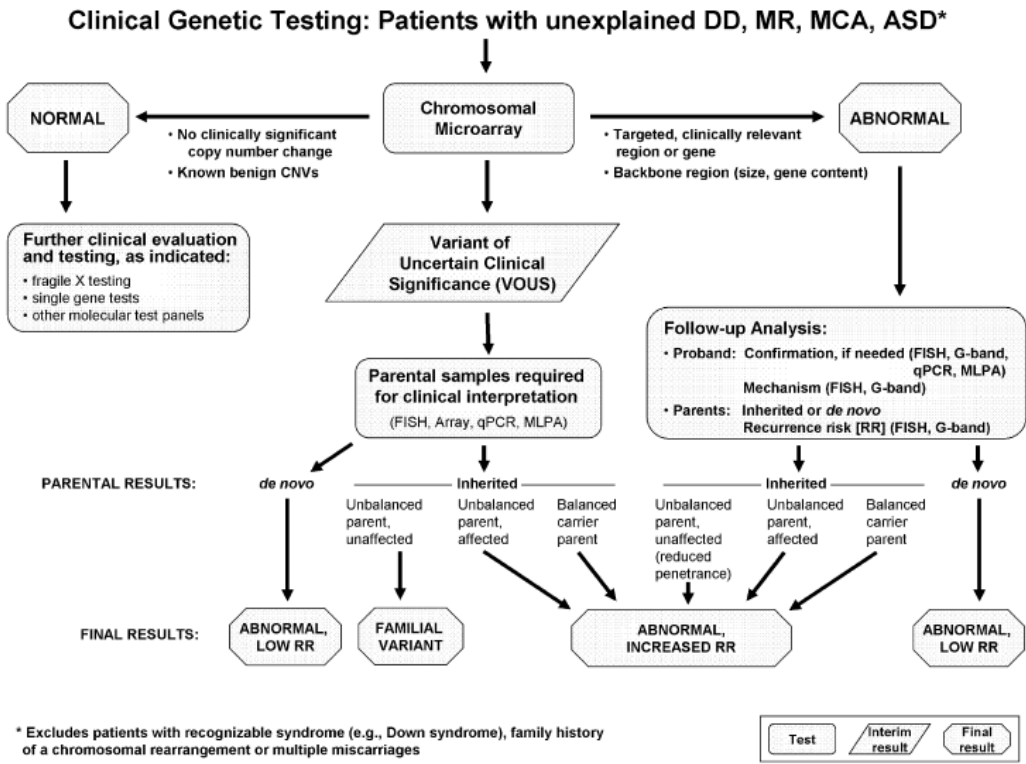
- l'esperienza del laboratorio;
- il consenso informato (che deve essere dedicato e non un consenso generico per test genetici);
- la voce del nomenclatore da riportare nella richiesta (la CMA non è prevista nel recente nomenclatore nazionale) e se la richiesta vada fatta solo per il paziente o anche per i suoi genitori ai quali viene esteso di routine il test;
- i tempi di attesa per l'esecuzione dell'esame e per la risposta;
- lo specialista preposto al rapporto con il paziente, e che fornisce la consulenza pre- e, soprattutto, post test;
- chi può richiedere tale test diagnostico;
- chi si fa carico di seguire nel tempo i pazienti falsi (dubbi) positivi e falsi negativi;
- l'inserimento dei dati clinico-anamnestici dei pazienti e di quelli puramente sperimentali presso banche dati telematiche, che dovrà essere di pertinenza congiunta del laboratorio che ha eseguito l'esame e dello specialista inviante;
- il rapporto tra laboratorio e clinici.

Formattato: Giustificato

3. i costi attualmente relativamente elevati.

ALGORITMO DIAGNOSTICO

Come algoritmo diagnostico proponiamo tentativamente quello riportato da Miller DT (2010).



Se il test CMA risultasse normale (flusso sn) tra i test indicati va messo l'esame cromosomico per verifica strutturale in quanto vi può essere l'interruzione di un gene causa di malattia.

Formattato: Giustificato

Tuttavia va specificato che non è possibile considerare categorie chiuse, e ogni caso va valutato singolarmente.

RACCOMANDAZIONI SULL'INVIO E TEMPISTICA DI REFERTAZIONE

Riteniamo che il test CMA debba essere offerto ai pazienti in regime di convenzione.

Per questo sarebbe opportuno che venissero individuati centri di riferimento regionali di provata esperienza nell'uso di tali tecniche e che andrebbero supportati specificamente.

Formattato: Giustificato

Al fine di ridurre il disagio creato dall'attesa della refertazione, suggeriamo, in accordo con il documento del Gruppo di Lavoro di Citogenetica SIGU, punto 4 (Raccomandazioni sull'accettazione del campioni) di "inviare presso il Laboratorio che eseguirà l'indagine solo campioni trios ovvero campioni del probando e dei due genitori, poiché quando viene identificata una delezione o una

duplicazione è necessario testare i genitori per verificarne l'origine de novo. Il test sul DNA dei genitori è pertanto parte integrante del test stesso”.

Sulla base di tale raccomandazione, in considerazione di quanto riportato da Association for Clinical Cytogenetics (2009), e a condizione che le attuali difficoltà, legate soprattutto alla mancata chiarezza di poter continuare ad operare nell'ambito del regime sanitario nazionale, vengano superate, il tempo di refertazione raccomandato è di 8-12 settimane.

Raccomandiamo infine, nella scelta del laboratorio presso il quale inviare il campione del paziente, di essere certi che esso soddisfi in prima istanza le caratteristiche tecniche di qualità, risoluzione, capacità identificativa e di validazione delle CNV e di partecipazione e consultazione attiva ai più comuni database per CNV, ma di non escludere come criterio selettivo anche la capacità di produrre una refertazione entro i limiti di tempo suggeriti.

RACCOMANDAZIONI SULLA VALUTAZIONE E CONSULENZA PRE E POST TEST

Il paziente e la sua famiglia che ci chiedono consulenza hanno diritto ad una piena ed esaustiva valutazione che non si completa al momento della richiesta dell'indagine CMA.

Prima del test va eseguita una consulenza genetica che illustri il significato e i limiti della tecnica CMA, secondo quanto indicato nel consenso informato dedicato, con particolare riguardo alla possibilità di ottenere risultati di difficile interpretazione.

Dopo il test la comunicazione diagnostica deve essere effettuata da un medico che conosca la patologia e il significato dell'anomalia genomica e dei geni coinvolti e che sia preparato a comunicare queste informazioni al paziente e alla sua famiglia. Tale profilo corrisponde a quello del Genetista clinico specialista in Genetica Medica, cui si riconosce appunto competenza genetica e medica, in sede di consulenza genetica, che è un complesso atto medico in cui i dati anamnestici-clinico-strumentali, integrati con i dati di laboratorio, consentono di formulare una corretta diagnosi genetica all'intero nucleo familiare, di valutare il più verosimile rischio di ricorrenza e di pianificare un eventuale test genetico prenatale. La consulenza genetica non si esaurisce con la diagnosi genetica ma ha anche una fondamentale valenza di supporto e gestione dell'intero nucleo familiare in cui uno o più componenti sono affetti da patologia congenita.

Tale competenza diviene particolarmente rilevante per la valutazione e la comunicazione di una CNV familiare presente in un genitore apparentemente sano o con minimi segni clinici in quanto diverse variazioni quantitative svelabili con CMA hanno un già provato difetto di penetranza o una espressività variabile (Ann Rev Med 2010;61:437).

Formattato: Giustificato

Formattato: Giustificato

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- P. Stankiewicz and J.R. Lupski. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu. Rev. Med.* 2010. 61:437–55.
- D.T. Miller, M. P. Adam, S. Aradhya, L.G. Biesecker, A.R. Brothman, N.P. Carter, D.M. Church, J. A. Crolla et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am. J. Hum. Genetics* 2010;86, 749–764.
- D.A. Regier, J.M. Friedman, C.A. Marra. Value for money? Array genomic hybridization for diagnostic testing for genetic causes of intellectual disability. *Am. J. Hum. Genetics* 2010;86:765-772.
- Report of the UK Genetic Testing Network Working Party (Evaluation of the use of array comparative genomic hybridisation in the diagnosis of learning disability. August 2006) (<http://www.phgfoundation.org/reports/4969>).
- UK Genetic Testing Network arrayCGH Commissioning Workshop (11th November 2009) (http://www.ukgtn.nhs.uk/gtn/digitalAssets/0/931_UKGTNaCGHReport010210.pdf)
- Association for Clinical Cytogenetics. Constitutional array CGH best practice guidelines (2009) v1.00 (<http://www.cytogenetics.org.uk/>).
- Recommendation CM/Rec(2010)11 of the Committee of Ministers to member states on the impact of genetics on the organization of health care services and training of health professionals (<https://wcd.coe.int/wcd/ViewDoc.jsp?Ref=CM/Rec%282010%2911&Language=lanEnglish&Ver=original&Site=CM&BackColorInternet=C3C3C3&BackColorIntranet=EDB021&BackColorLogged=F5D383>)
- R. Toro, M. Konyukh, R. Delorme, C. Leblond, P. Chaste, F. Fauchereau, M. Coleman, M. Leboyer, C. Gillberg, T. Bourgeron. Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends in Genetics* 2010;26:363–372.
- H. Ezugha, C.E. Anderson, H. G. Marks, D. Khurana, A. Legido, I. Valencia. Microarray analysis in children with developmental disorder or epilepsy. *Pediatr Neurol* 2010;43:391.
- N. M. Williams, I. Zaharieva, A. Martin, K. Langley, K. Mantripragada, R. Fossdal, H. Stefansson, K. Stefansson, P. Magnusson, O.O. Gudmundsson, O. Gustafsson, P. Holmans, M.J. Owen, M. O'Donovan, A. Thapar. Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet* 2010;376:1401.
- Y. Ohnukib, C. Torii, R. Kosaki, T. Yagihashi, H. Sago, K. Hayashi, K. Yasukawa, T. Takahashi, K. Kosaki. Cri-du-Chat syndrome cytogenetically cryptic recombination aneusomy of chromosome 5: implications in recurrence risk estimation. *Mol Syndromol* 2010;1:95–98.
- M. Zollino, M. Murdolo, G. Marangi, V. Pecile, C. Galasso, L. Mazzanti, G. Neri. On the nosology and pathogenesis of Wolf–Hirschhorn syndrome: genotype–phenotype correlation. Analysis of 80 patients and literature review. *Am. J Med Genet* 2008;148C:257-269.
- J.A. Rosenfeld, J.A. Crolla, S. Tomkins, P. Bader, B. Morrow, J. Gorski, R. Troxell, C. Forster-Gibson, D. Cilliers, R.G. Hislop, A. Lamb, B. Torchia, B.C. Ballif, L.G. Shaffer. Refinement of causative genes in monosomy 1p36 through clinical and molecular cytogenetic characterization of small interstitial deletions. *Am J Med Genet* 152A:1951–1959.