



**Società Italiana di Genetica Umana**  
**Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU**

**LINEE GUIDA PER LA DIAGNOSI CITOGNETICA**  
**Sezione**  
**NOTE OPERATIVE CITOGNETICA COSTITUZIONALE 2013**  
**a cura del Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU**

**Coordinatore: Antonio Novelli**

**Hanno preso parte alla stesura:**

***Franca Dagna Bricarelli, Lamberto Camurri, Simona Cavani, Daniela Giardino, Francesca Romana Grati, Fortunato Lonardo, Lorenzo Sinibaldi, Barbara Torres***

***con la partecipazione di:***

***Adriano Angioni, Paola Battaglia, Laura Bernardini, Rita Calzone, Anna Capalbo, Laura Cardarelli, Massimo Carella, Sebastiano Caruso, Pietro Cavalli, Alessandro Civolani, Leda Dalprà, Domenico Dell'Edera, Francesca Forzano, Gianfranco Gelli, Mattia Gentile, Irene Giotti, Silvia Guarducci, , Michela Malacarne, Francesca Malvestiti, Giuseppina Marseglia, Barbara Minuti, Anna Montaldi, Anna Maria Nardone, Lucia Nutini, Daniela Orteschi, Vanna Pecile, Chiara Pescucci, Maria Carla Pittalis, Alessandra Renieri, Elisa Savin, Romano Tenconi, Annalisa Vetro, Sara Zanchetti, Orsetta Zuffardi, Antonio Novelli***

***Si ringraziano i soci aderenti al Gruppo di Lavoro:***

Viola Alesi, Carmen Ardisia, Veronica Barbieri, Giuseppe Barrano, Marta Bertoli, Veronica Bizzarri, Domenico Bizzoco, Romina Bonora, Rosa Busuito, Rosario Casalone, Rossella Caselli, Mina Casile, Luciana Chessa, Maurizio Clementi, Isabella Colapietro, Fiorenza Colloridi, Domenico Coviello, Gianfranco Croci, Elvira D'alessandro, Giovanna De Feo, Monia Di Maria, Anna Maria Di Meglio, Manuela Di Natale, Cristiana Di Rosa, Maurizio Ferrari, Sergio Fini, Giovanna Floridia, Alessandra Friso, Fabrizia Franchi, Alessio Fronduti, Sara Ghezze, Barbara Grammatico, Paola Grammatico, Silvana Guernerì, Nadia Iacobelli, Luigi Laino, Salvina Lauricella, Rossella Lecce, Elisabetta Lenzini, Anna Leszl, Elisabetta Lippi, Ermanna Lisi, Brunella Mancuso, Maria Marinelli, Mafalda Mucciolo, Roberta Murru, Maria Cristina Muzi, Daniela Parrini, Antonio Pedicini, Giuseppe Piombo, Barbara Pivetta, Gisa Police, Monica Poscente, Diana Postorivo, Lucia Prima, Orsola Privitera, Barbara Raso, Guglielmo Sabbadini, Sandra Santucci, Iolanda Spasari, Antonella Tanzariello, Luigia Varriale, Daniela Zuccarello.

***Questo lavoro è dedicato alla memoria di Lucia Ballarati, socia SIGU e partecipante all'attività del gruppo di lavoro in citogenetica, prematuramente scomparsa nel corso dell'anno 2013***



Società Italiana di Genetica Umana  
*Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU*

**LINEE GUIDA PER LA DIAGNOSI CITOGENETICA**  
**Sezione**  
**NOTE OPERATIVE CITOGENETICA COSTITUZIONALE 2013**  
*a cura del Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU*

**Sommario**

1.	ASPETTI TECNICI GENERALI DELL'ANALISI CROMOSOMICA.....	5
1.1	Colture cellulari .....	5
1.2	Bandeggio cromosomico.....	5
1.3	Analisi dei cromosomi .....	6
1.4	Ibridazione in situ fluorescente (FISH).....	6
1.4.1	Sonde locus specifiche su metafasi.....	7
1.4.2	FISH interfásica .....	7
1.5	ESACs (Extra Structurally Abnormal Chromosomes) .....	8
2.	DIAGNOSI PRENATALE.....	9
2.1	Mosaicismo in diagnosi prenatale.....	9
2.1.1	Pseudomosaicismo .....	9
2.1.2	Approfondimenti per conferma di mosaicismo in villi coriali e liquido amniotico .....	10
2.1.3	Approfondimenti per conferma di mosaicismo su sangue fetale .....	12
2.1.4	Refertazione dei mosaicismi .....	12
2.2	Identificazione rapida di aneuploidie .....	12
2.2.1	FISH interfásica per l'analisi delle aneuploidie 13, 18, 21, X, Y .....	12
2.2.2	PCR Quantitativa fluorescente (QF-PCR) .....	12
2.2.3	BACs on Beads™ (BoBs™) .....	12
2.3	Disomia uniparentale in diagnosi prenatale (UPD).....	12
2.4	Contaminazione materna (MCC) in citogenetica .....	13
2.4.1	Liquido amniotico.....	13
2.4.2	Villi coriali .....	13
2.4.3	Sangue fetale .....	13
2.4.4	Materiale abortivo.....	13
2.4.5	Analisi di colture con MCC noto o sospetto .....	13
2.5	Studi di follow-up .....	13
3.	DIAGNOSI POSTNATALE .....	14
3.1	Mosaicismo in diagnosi postnatale .....	14
4.	SINDROMI MENDELIANE CON INSTABILITÀ CROMOSOMICA.....	14
4.1	Anemia di Fanconi (FA)(OMIM: 607139, 300514, 227645, 605724, 227646, 600901, 603467, 602956, 608111, 609053, 609054) .....	14
4.2	Sindrome di Bloom (BS)(OMIM: 210900).....	14
4.3	Atassia-telangiectasia (AT) (OMIM: 208900).....	14
4.4	Sindrome di Nijmegen (NBS) (OMIM: 602667) .....	15
4.5	Sindrome di Werner (WS) (OMIM 277700).....	15
4.6	Sindrome da Instabilità centromerica e anomalie facciali (ICF) (OMIM: 242860).....	15
4.7	Sindrome di Roberts (RS) (OMIM: 268300) .....	15
4.8	Sindrome da Aneuploidia variegata a mosaico (MVA) (OMIM: 257300).....	16



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

5.	REFERTAZIONE .....	16
5.1	Varianti cromosomiche .....	16
6.	QF-PCR (PCR Quantitativa Fluorescente) .....	16
6.1	Liquido amniotico (LA) .....	16
6.2	Villi coriali (CVS) .....	16
6.3	Campione materno .....	16
6.4	Materiale abortivo .....	16
6.5	Estrazione del DNA e amplificazione .....	16
6.6	Disegno della QF-PCR .....	16
6.7	Interpretazione .....	17
6.7.1	Valori dei rapporti allelici .....	17
6.7.2	Range normale .....	18
6.7.3	Range trisomico .....	18
6.7.4	Range intermedio .....	18
6.7.5	Range per il cromosoma X .....	18
6.7.6	Rapporti normali/anormali per uno stesso cromosoma .....	18
6.8	Risultati .....	18
6.9	Contaminazione materna .....	19
6.9.1	Liquido amniotico .....	19
6.9.2	Villi Coriali .....	19
6.9.3	Materiale abortivo .....	20
6.10	Mosaicismo .....	20
6.11	Referto .....	20
7.	BACs-on-Beads <sup>TM</sup> (BoBs <sup>TM</sup> ) .....	21
8.	CGH/SNP Array Genomico .....	22
8.1	Risoluzione .....	22
8.2	Estrazione DNA .....	22
8.3	DNA di riferimento .....	22
8.4	Amplificazione .....	23
8.5	Marcatura e ibridazione .....	23
8.6	Scansione e estrazione dei dati .....	23
8.7	Analisi .....	23
8.8	Interpretazione .....	23
8.9	Mosaicismo .....	24
8.10	Database delle varianti genomiche .....	24
8.11	Validazione delle CNV .....	24
8.12	Referto .....	25
8.12.1	Refertazione di regioni di omozigotità .....	26
9.	Tempi di refertazione .....	27
9.1	Referto definitivo .....	27
9.2	Referto preliminare .....	27
10.	Sitografia .....	27
11.	Bibliografia .....	28
11.1	Testi consigliati .....	28
11.2	Citogenetica prenatale .....	28



# Società Italiana di Genetica Umana

## *Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU*

11.3	Citogenetica postnatale .....	30
11.4	CGH/SNP array .....	30
11.5	Generale .....	32

***La sezione “Note Operative Citogenetica Costituzionale” delle Linee Guida per la diagnosi Citogenetica 2013, sono state approvate dal Consiglio Direttivo SIGU il 21 febbraio 2014. Si ringraziano il Presidente Antonio Amoroso ed i consiglieri: Luciana Chessa, Domenico Coviello, Daniela Giardino, Elisabetta Lenzini, Giocchino Scarano e Marco Seri, per la immediata valutazione ed approvazione.***



## 1. ASPETTI TECNICI GENERALI DELL'ANALISI CROMOSOMICA

### 1.1 Colture cellulari

Si consiglia di conservare una coltura, nei casi prenatali, fino all'emissione del referto definitivo. E' opportuno evitare di processare insieme tutte le colture cellulari provenienti da uno stesso campione di partenza.

### 1.2 Bandeggio cromosomico

Esistono diversi metodi per definire il grado di risoluzione di una metafase. Per valutare il livello di bandeggio di un preparato, è opportuno utilizzare un metodo oggettivo e riproducibile, che deve formalmente essere riportato nella documentazione del SGQ del laboratorio.

In Tabella 1 sono riportati alcuni cromosomi il cui bandeggio si differenzia a diversi gradi di risoluzione.

**Tabella 1 – Livelli di bandeggio**

<b>LIVELLO BANDEGGIO</b>	<b>Visibili:</b>
<b>&lt;300 bande</b>	identificazione inequivocabile dei cromosomi tramite morfologia e caratteristiche maggiori
<b>300 bande</b>	2 bande scure in 8p (8p12 e 8p22) 3 bande scure in 10q (10q21, 10q23, 10q25) 20p12 visibile 22q12 distinta
<b>400 bande</b>	3 bande scure a metà 4q (4q22-q28) 3 bande scure a metà 5q (5q14, 5q21, 5q23) 2 bande scure in 9p (9p21 e 9p23) 13q33 distinta
<b>500 bande</b>	7q33 e 7q35 distinte 3 bande scure in 11p (11p12, 11p14, 11p15.4) 14q32.2 distinta 4 bande scure in 18q (18q12.1, 18q12.3, 18q21.2, 18q22)
<b>550 bande</b>	5q31.2 distinta 8p21.2 visibile 2 bande scure in 11pter (11p15.2 e 11p15.4) 22q13.2 distinta
<b>700 bande</b>	2p25.2 distinta 2q37.2 distinta 10q21.1 e 10q21.3 separate 17q22-q24 separato in 3 bande scure
<b>850 bande</b>	4p15.31 e 4p15.33 distinte 5p15.32 distinta 11q24.1 e 11q24.3 distinte 19p13.12 e 19p13.2 distinte
<b>900 bande</b>	11p14.1 visibile 20p12.1 e 20p12.3 distinte 22q11.22 distinta 22q13.32 distinta

La tabella 2 riporta, a seconda dell'indicazione, i livelli minimi di bandeggio che si raccomanda di utilizzare.



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

**Tabella 2 – Livelli di bandeggio minimi richiesti a seconda dell'indicazione**

Indicazione	LIVELLO MINIMO di bandeggio (bphs)
Conferma di un'aneuploidia nota	300
Esclusione di un riarrangiamento strutturale noto di grandi dimensioni	300
Identificazione o esclusione di un piccolo riarrangiamento strutturale noto	400

bphs= bands per haploid set

In generale, per campioni di liquido amniotico, villi coriali dopo coltura e linfociti l'analisi dovrebbe essere eseguita con un livello di risoluzione di almeno 400 bphs

### 1.3 Analisi dei cromosomi

La SIGU ritiene che il numero di metafasi da esaminare debba essere correlato alla specifica indicazione clinica ed alle esigenze emerse nel corso dell'analisi, in particolare, nei casi in cui si sospetta la presenza di un mosaicismo (vedi paragrafi specifici per diagnosi pre- e postnatale). Per tutte le metafasi contate o analizzate è opportuno riportare sul foglio di lavoro il/i vetrino/vetrini analizzato/i.

### 1.4 Ibridazione in situ fluorescente (FISH)

Non è necessario confermare con la FISH tutte le anomalie osservate al cariotipo, ma è opportuno utilizzarla per caratterizzare riarrangiamenti che possono avere un significato diagnostico o prognostico. Può essere appropriata la FISH per la caratterizzazione di anomalie cromosomiche classiche, qualora queste si presentino in un contesto atipico.

L'intensità del segnale fluorescente è variabile e dipende da diversi fattori, come il polimorfismo delle sequenze ripetute (es.: sequenze alfoidi), la qualità o l'invecchiamento del preparato. Se si analizza una delezione o un riarrangiamento, il migliore controllo dell'avvenuta ibridazione è il cromosoma omologo normale. Un ulteriore controllo può essere offerto co-ibridando una sonda per un locus diverso sullo stesso cromosoma.

Sarebbe opportuno predisporre nel laboratorio un'area riservata alla strumentazione e all'allestimento della FISH.

Quando si utilizzano sonde non commerciali, è necessario adottare i criteri necessari a prevenire la contaminazione da DNA. Ogni nuovo lotto di sonde FISH marchiate da utilizzare a scopo diagnostico deve essere sottoposto a validazione. Questa comporta il controllo di:

- i) Specificità del target: consiste nel verificare che la sonda mappi all'interno della regione critica che si intende indagare,
- ii) Sensibilità analitica (% di metafasi o nuclei interfascici con il pattern di ibridazione atteso),
- iii) Specificità analitica (% di segnali che ibrida con il locus corretto).

Nel caso di sonde commerciali i requisiti sono garantiti dalla ditta produttrice/fornitrice. La maggior parte delle sonde commerciali possiede il marchio CE-IVD. Anche per queste sonde è comunque consigliabile effettuare una verifica dei parametri sopra citati.

Il personale che si occupa delle analisi FISH deve avere una competenza specifica. Si consiglia di fissare degli standard per la classificazione delle osservazioni e per l'interpretazione dei risultati. Quando l'ibridazione non è ottimale, si consiglia di ripetere l'esame. Il numero di cellule da analizzare dipende dalla sensibilità e specificità della sonda e dalla possibilità che siano presenti mosaici. In Tabella 3 è riportato il numero minimo di cellule che è opportuno analizzare a seconda del tipo di sonda.



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

**Tabella 3 – Numero minimo di cellule da analizzare per analisi FISH.**

Sonda	Analisi	Note
Sonde locus-specifiche	5 metafasi	Da analizzare sia per escludere che per confermare una anomalia
Pannelli di sonde (es.:sonde per analisi regioni subtelomeriche)	3 metafasi 5 metafasi	Per ogni sonda, se segnale normale. Analizzare 5 metafasi in caso di risultato anomalo
FISH interfase per ricerca mosaicismo	100 nuclei	Per ogni sonda/set di sonde
FISH interfase per la ricerca di aneuploidie in diagnosi prenatale	50 nuclei	Per ogni sonda/set di sonde

A scopo diagnostico vengono utilizzati diversi tipi di sonde:

- Sonde alfoidi, per caratterizzare gli *Extra Structural Abnormal Chromosomes* (ESACs), per valutare mosaicismi cromosomici e l'eventuale spostamento dei centromeri canonici e/o in sovrannumero.
- Sonde *painting* cromosoma-specifiche, per caratterizzare ESACs, anomalie strutturali bilanciate/sbilanciate. Queste sonde, che non sempre coprono in maniera uniforme il cromosoma bersaglio, possono non essere idonee ad identificare piccoli riarrangiamenti.
- Sonde a singola copia, per la diagnosi di patologie associate a micro-delezioni/-duplicazioni. Il segnale bersaglio sul cromosoma normale viene utilizzato come controllo dell'efficienza dell'ibridazione. Per la corretta identificazione della coppia di cromosomi in esame è preferibile usare la contro-colorazione con DAPI e/o abbinare una sonda di controllo, come di solito previsto dalle sonde attualmente in commercio
- Sonde subtelomeriche cromosoma-specifiche, per la diagnosi di riarrangiamenti coinvolgenti le regioni subtelomeriche dei cromosomi. Sono stati descritti casi di mancata ibridazione di una sonda non imputabile alla delezione ma alla presenza di polimorfismi della regione bersaglio (es. 2q). In questi casi l'analisi dei genitori e l'impiego di sonde subtelomeriche più prossimali possono chiarire eventuali dubbi interpretativi.

### 1.4.1 Sonde locus specifiche su metafasi

Il numero di metafasi da osservare è legato alla sensibilità e specificità dei segnali della sonda in un dato esperimento, considerato che l'intensità del segnale fluorescente è variabile, dipende da vari fattori (es.: qualità o l'invecchiamento del preparato) e può essere diversa sia tra i vetrini sia all'interno dello stesso vetrino. In generale è necessario analizzare almeno 5 metafasi per la presenza/assenza del segnale su entrambi i cromosomi omologhi. Il numero di metafasi analizzate deve essere aumentato in caso vi sia il sospetto di un mosaicismo. In caso si evidenzino inaspettatamente la probabile presenza di una microduplicazione, si consiglia di estendere l'analisi ai nuclei in interfase (vd. Paragrafo 1.4.2) e nei casi dubbi di confermare i risultati con un'altra metodica (es.: microarray, Q-PCR).

Se si utilizza una sonda che non ha un segnale di controllo interno, si consiglia di analizzare in parallelo un campione noto normale per la regione indagata.

### 1.4.2 FISH interfase

Nella citogenetica postnatale viene considerata la tecnica di elezione per la ricerca di duplicazioni e inversioni che coinvolgono regioni inferiori a 4 Mb.

Se il sospetto diagnostico riguarda una patologia da microduplicazione (es. malattia di Charcot-Marie-Tooth, tipo 1A - CMT1A), sarebbe necessario eseguire lo studio su almeno 100 nuclei in interfase. E' consigliato co-ibridare la sonda specifica con una sonda di



## Società Italiana di Genetica Umana

### *Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU*

controllo, per evitare che il doppio segnale caratteristico di una cellula in fase G2 possa essere interpretato come duplicazione.

La FISH interfaseica può essere utilizzata per l'identificazione di mosaicismi a bassa frequenza.

Per l'identificazione delle aneuploidie in diagnosi prenatale è necessario analizzare almeno 50 nuclei in interfase per ogni set di sonde.

Prima di applicare la FISH interfaseica in diagnostica, devono essere stabiliti i criteri per l'osservazione dei campioni e l'interpretazione dei risultati, in particolare la soglia di efficienza di ibridazione sotto la quale è necessario ripetere il test.

#### **1.5 ESACs (Extra Structurally Abnormal Chromosomes)**

Nel caso di riscontro di ESACs occorre:

1. definirne morfologia e struttura con tecniche di bandeggio e colorazioni differenziali che indirizzino i successivi studi in FISH. Assicurarsi che rimangano disponibili vetrini/sospensioni cellulari per eventuali analisi FISH. In diagnosi prenatale, assicurarsi di mantenere le rimanenti colture cellulari per FISH ed estrazione del DNA per evitare la ripetizione del prelievo e richiedere campione di sangue dei genitori, in eparina per verificare l'eventuale origine familiare, in EDTA per estrazione del DNA per eventuali studi di UPD (Disomia Uniparentale).
2. identificarne l'origine cromosomica con FISH. Si suggerisce di seguire lo schema riportato nella Fig. 1.
3. identificarne l'origine cromosomica con analisi microarray se è presente in almeno il 30% delle cellule e le dimensioni sono tali da sospettare la presenza di eucromatina non solo pericentromerica.
4. valutare la presenza di UPD se l'ESAC deriva dai cromosomi 7, 11, 14, 15. In diagnosi postnatale le indagini UPD sono suggerite dal quadro clinico/fenotipico.



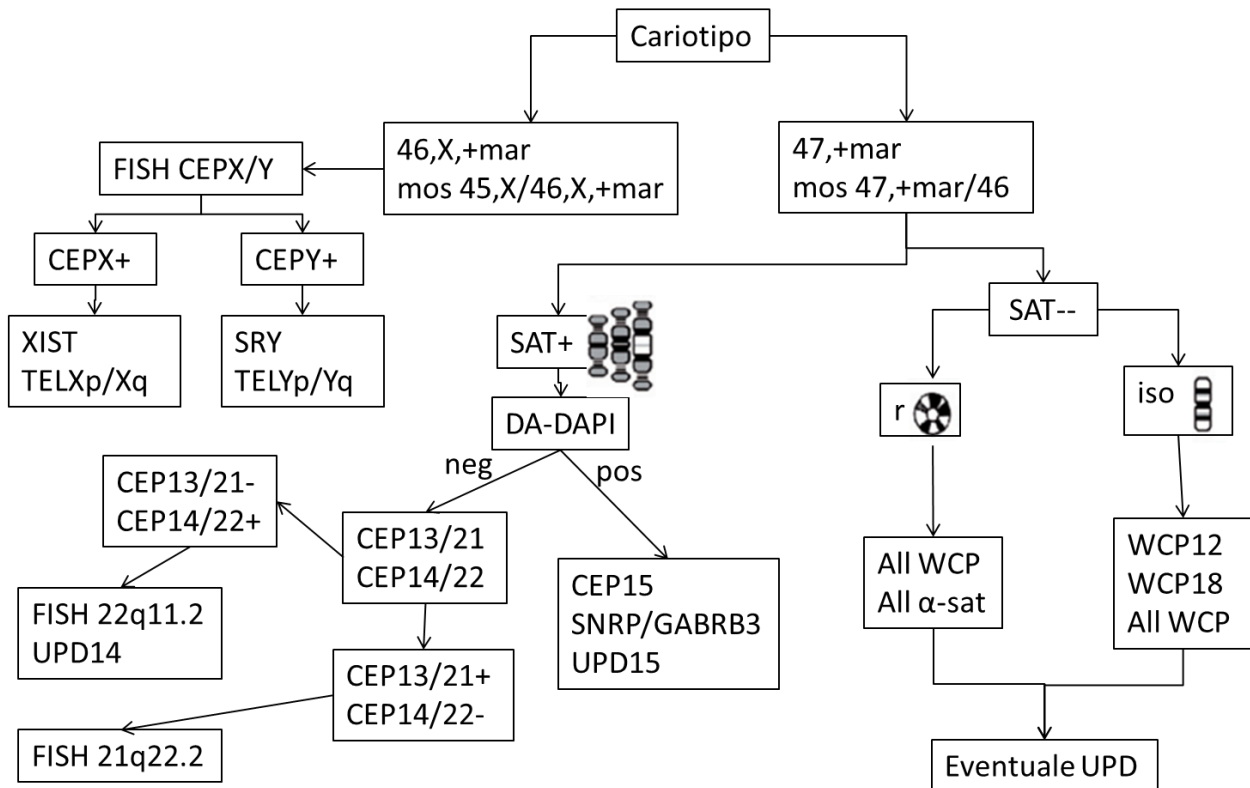


Figura 1. Schema riassuntivo per una corretta caratterizzazione di un ESAC

## 2. DIAGNOSI PRENATALE

**Le note operative generali per la diagnosi citogenetica prenatale sono contenute nelle Linee Guida.**

### 2.1 Mosaicismo in diagnosi prenatale

Il riscontro di mosaicismo cromosomico in epoca prenatale rappresenta uno dei più complessi problemi diagnostici. Il mosaicismo vero, il mosaicismo confinato alla placenta (CPM) e lo pseudomosaicismo sono classificati in base a specifici criteri. Si raccomanda di far uso dei criteri raccolti in: Gardner, Sutherland and Shaffer, *Chromosome abnormalities and genetic counselling*, Oxford 2012.

Il CPM, lo pseudomosaicismo e il mosaicismo vero possono avere origine da:

- un errore mitotico postzigotico precoce in un embrione diploide normale,
- un fenomeno di ricostituzione della disomia da un concepimento trisomico (rescue)

#### 2.1.1 Pseudomosaicismo

Il riscontro di una o più colonie (metodo in situ) o di più cellule (metodo in fiasca) in una singola coltura di liquido amniotico con corredo cromosomico diverso da quello riscontrato nelle colonie/cellule delle altre colture corrisponde ad un mosaicismo di livello II (Gardner and Sutherland, 2012), più comunemente definito come pseudomosaicismo.



## Società Italiana di Genetica Umana

### **Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU**

La condizione di pseudomosaicismo non dovrebbe essere segnalata nel referto ma nella gestione complessiva del caso occorre ricordare che:

- ✓ i mosaicismi "a bassa percentuale" costituiscono uno dei limiti riconosciuti delle indagini citogenetiche prenatali
- ✓ è possibile che le singole colonie siano derivate da cellule della placenta e pertanto siano indice di CPM
- ✓ se è coinvolto un cromosoma soggetto ad *imprinting* e' necessario escludere la eventuale UPD.

#### **2.1.2 Approfondimenti per conferma di mosaicismo in villi coriali e liquido amniotico**

In caso di riscontro di una o più cellule/colonie anomale è buona pratica di laboratorio applicare i criteri di comportamento suggeriti da Hsu e Benn nel 1999 e Gardner, Sutherland and Shaffer, *Chromosome abnormalities and genetic counselling, Oxford 2012*.

Le tabelle che seguono, tratte da Prenatal Diagnosis Best Practice Guidelines (Association for Clinical Cytogenetics, 2009) costituiscono un buon riferimento.

<b>Suspension culture</b>	
a.	<p><b>Indications for extensive work-up</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Autosomal trisomy involving a chromosome 2, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21 or 22 (SC MC)</li> <li>• Unbalanced structural rearrangement (MC)</li> <li>• Marker chromosome (MC)</li> </ul>
b.	<p><b>Indications for moderate work-up</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extra sex chromosome (SC MC)</li> <li>• Autosomal trisomy involving a chromosome 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 17 or 19 (SC MC)</li> <li>• 45, X (MC)</li> <li>• Monosomy (other than 45,X) (MC)</li> <li>• Marker chromosome (SC)</li> <li>• Balanced structural rearrangement (MC)</li> </ul>
c.	<p><b>Indications for basic workup</b></p> <p>Single cell with:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 45,X</li> <li>• Unbalanced structural rearrangement</li> <li>• Balanced structural rearrangement</li> <li>• Break at centromere with loss of one arm</li> </ul>
<p><b>SC</b> single cell observation                      <b>MC</b> more than one cell observation (single flask)</p>	

- per un approfondimento "base" devono essere esaminate 20 cellule provenienti da due colture indipendenti, una delle quali può contenere la metafase/colonia anomala



# Società Italiana di Genetica Umana

## *Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU*

- quando è indicato approfondimento "moderato" devono essere esaminate 20 cellule da una coltura supplementare
- quando è indicato un ampio approfondimento, l'analisi deve essere condotta su 20 cellule da ciascuna di due ulteriori colture, escludendo la coltura con l'osservazione iniziale .

<b>In situ culture</b>	
<b>a.</b>	<p><b>Indications for <b>extensive work-up</b></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Autosomal trisomy involving a chromosome 2, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21 or 22 (SCo MCo)</li> <li>• Unbalanced structural rearrangement (MCo)</li> <li>• Marker chromosome (MCo)</li> </ul>
<b>b.</b>	<p><b>Indications for <b>moderate work-up</b></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extra sex chromosome (SCo MCo)</li> <li>• Autosomal trisomy involving a chromosome 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 17 or 19 (SCo MCo)</li> <li>• 45, X (SCo MCo)</li> <li>• Monosomy (other than 45,X) (SCo MCo)</li> <li>• Marker chromosome (SCo)</li> <li>• Balanced structural rearrangement (MCo)</li> <li>• Unbalanced structural rearrangement (SCo)</li> </ul>
<b>c.</b>	<p><b>Indications for <b>basic workup</b></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• All single cell abnormalities</li> </ul>
<b>SCo</b>	<b>Single Colony</b>
	<b>MCo</b> Multiple Colony (Single dish)

- per un approfondimento " base" devono essere esaminate almeno 10 colonie provenienti da due colture indipendenti, una delle quali può contenere la metafase/colonia anomala.
- quando è indicato un approfondimento "moderato" devono essere esaminate 12 colonie da una o più colture supplementari
- quando è indicato un ampio approfondimento, l'analisi deve essere condotta su 24 colonie da due ulteriori colture indipendenti e con l'esclusione della coltura con l'osservazione iniziale.

Quando non si riescono a completare gli approfondimenti diagnostici ivi previsti, le azioni da intraprendere dipendono dal/i cromosoma/i coinvolto/i, da criteri clinici e scientifici e dal giudizio professionale applicato a ciascun singolo caso.



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

### 2.1.3 Approfondimenti per conferma di mosaicismo su sangue fetale

L'analisi del cariotipo su sangue fetale da cordocentesi è solitamente utilizzato per verifica di una anomalia riscontrata a mosaico in precedente analisi su altro tessuto prenatale. L'analisi va condotta su almeno 100 metafasi secondo la tabella di Hook, 1977.

### 2.1.4 Refertazione dei mosaicismi

Pseudomosaicismi

Si consiglia di prestare particolare attenzione nell'interpretare i mosaicismi di livello II, quando interessino aneuploidie a carico di un cromosoma che si associa ad un fenotipo patologico alla nascita (ad es. 8, 9, 13, 15, 18, 21) o noto contenere geni sottoposti ad imprinting perché in caso di trisomia a mosaico con una linea normale potrebbe essere presente anche UPD.

Nei suddetti casi è appropriato segnalarne il riscontro nel referto, inviando la paziente in consulenza genetica, per valutare l'opportunità di eseguire ulteriori indagini.

#### Mosaicismi

Nei mosaicismi riscontrati in campioni di villi coriali (CVS) in cui sia presente una linea cellulare normale è opportuno suggerire un approfondimento su liquido amniotico oltre all'esecuzione di ecografia morfologica. E' infatti importante ricercare l'anomalia cromosomica nei tessuti fetali (che si conferma nel 33% dei casi con mosaicismo di III tipo).

## 2.2 Identificazione rapida di aneuploidie

### 2.2.1 FISH interfascica per l'analisi delle aneuploidie 13, 18, 21, X, Y

Prima di offrire questa tecnica in attività diagnostica, si ritiene utile che ciascun laboratorio si costruisca un proprio standard tramite una validazione sia per la classificazione delle osservazioni sia per l'interpretazione dei risultati. La ricerca di aneuploidie nei nuclei interfascici infatti comporta notevoli difficoltà nell'interpretazione dei risultati: il numero dei segnali nelle cellule interfasiche può variare e alcuni nuclei, anche se normali, potrebbero non presentare due segnali. E' opportuno che la validazione sia eseguita analizzando campioni positivi e negativi noti.

*Lettura ed interpretazione dei risultati:* si consiglia che ogni campione venga analizzato da due operatori in maniera indipendente e che ogni laboratorio definisca i parametri di lettura (inclusa la qualità dei segnali ed il numero dei nuclei marcati sul totale dei nuclei presenti). Devono essere seguiti i protocolli forniti dalle ditte per le sonde commerciali, oppure protocolli di validazione interna. Per le sonde non commerciali è necessario eseguire una validazione che verifichi i parametri di sensibilità e specificità analitica e del target (vedi 1.4 Ibridazione in situ fluorescente - FISH). E' tuttavia buona norma affiancare casi-controllo per tutte le sonde quando si utilizzino sonde non commerciali.

### 2.2.2 PCR Quantitativa fluorescente (QF-PCR)

Fare riferimento a capitolo specifico su "QF-PCR per la ricerca di aneuploidie".

### 2.2.3 BACs on Beads™ (BoBs™)

Fare riferimento a capitolo specifico su "BoBs™ per la ricerca di aneuploidie".

## 2.3 Disomia uniparentale in diagnosi prenatale (UPD)

Fare riferimento a capitolo specifico su "Disomia Uniparentale", Linee Guida per la Diagnosi Citogenetica 2013



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

### 2.4 Contaminazione materna (MCC) in citogenetica

Qualora si sospetti la presenza di massiva contaminazione da parte di cellule materne (es.: campioni ematici; morfologia non riconoscibile del villo coriale), è opportuno confermare l'origine fetale delle cellule del campione, in caso di cariotipo femminile, con una tecnica di genetica molecolare (es.: QF-PCR)

#### 2.4.1 Liquido amniotico

La frequenza stimata di MCC in colture di liquido amniotico è di circa 0,5%. La causa principale di contaminazione materna è il passaggio transplacentare dell'ago che spesso si rivela con la presenza di emazie nel campione.

#### 2.4.2 Villi coriali

La frequenza stimata di MCC in campioni di villi coriali è circa 1-2%. La contaminazione si rivela nelle colture a lungo termine. La rimozione di decidua, emazie, membrane e altro materiale contenuto nel campione pervenuto al laboratorio va eseguita all'invertoscopio o allo stereomicroscopio.

#### 2.4.3 Sangue fetale

Si raccomanda di escludere un'eventuale presenza di MCC prima di processare campioni di sangue fetale.

#### 2.4.4 Materiale abortivo

Considerate le modalità con cui vengono prelevati i campioni fetali da materiale abortivo, il rischio di MCC è significativamente elevato, particolarmente in aborti precoci. Si raccomanda di adottare tutti gli accorgimenti necessari per identificare in modo specifico i tessuti fetali e mettere in coltura solo questi ultimi.

#### 2.4.5 Analisi di colture con MCC noto o sospetto

La spiegazione più probabile dell'osservazione di cellule XX in un campione altrimenti XY è la presenza di contaminazione materna. Poiché si può ritenere che le cellule XY rappresentino le reali cellule fetali, l'analisi citogenetica completa deve essere eseguita su questo tipo di cellule. Occorre comunque considerare anche le cellule XX, per valutare il grado di MCC. Dato che, anche se raramente, la presenza di cellule XY/XX in uno stesso campione in diagnosi prenatale potrebbe essere indice di chimerismo o della presenza di una gravidanza gemellare con gemello riassorbito, nel refertare una MCC si raccomanda di suggerire l'esecuzione di un'ecografia per controllare il sesso del feto. Sarebbe opportuno, quando possibile, escludere la contaminazione materna, mediante l'analisi di marcatori genetici polimorfici STR (*Short Tandem Repeat*), confrontando il profilo genetico ottenuto dal DNA estratto dal materiale esaminato e quello ottenuto dal DNA estratto dal sangue periferico della gestante. In alcuni casi può essere utile un secondo prelievo di tessuti fetali.

### 2.5 Studi di follow-up

Spetta al genetista clinico o al medico referente decidere circa l'opportunità di richiedere l'analisi citogenetica per la conferma diagnostica.

Se in un campione di villi coriali è stato identificato un possibile CPM, si ritiene utile eseguire il controllo sia sulla placenta che sul feto.



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

### 3. DIAGNOSI POSTNATALE

#### 3.1 Mosaicismo in diagnosi postnatale

In generale si ritiene che l'estensione dell'analisi in caso di riscontro di singole cellule aneuploidi per la conferma o quantificazione del mosaicismo vada eseguita solo se l'aneuploidia è legata all'indicazione all'analisi o al fenotipo del probando.

I clinici referenti devono essere informati del fatto che un mosaico può essere diagnosticato, mentre può essere escluso solo in termini di probabilità (Hook, 1977).

### 4. SINDROMI MENDELIANE CON INSTABILITÀ CROMOSOMICA

#### 4.1 Anemia di Fanconi (FA)(OMIM: 607139, 300514, 227645, 605724, 227646, 600901, 603467, 602956, 608111, 609053, 609054)

Le cellule dei pazienti affetti da FA presentano rotture cromatidiche e isocromatidiche, figure multiradiali di tipo asimmetrico fra cromosomi non omologhi. Si possono notare anche riarrangiamenti del tipo anelli e dicentrici, endoreduplicazioni e condensazione prematura dei cromosomi (PCC). L'instabilità cromosomica viene accentuata da alcuni agenti chimici alchilanti bifunzionali, come il diepossibutano (DEB) e la mitomicina C (MMC). Il numero delle cellule con aberrazioni spontanee o indotte dall'esposizione agli agenti alchilanti varia tra i diversi pazienti. La diagnosi si basa sul confronto tra l'instabilità spontanea e indotta dall'agente clastogeno in coltura nel campione in esame e in un controllo normale allestiti contemporaneamente. Ogni laboratorio deve verificare periodicamente le proprie frequenze di instabilità spontanea ed allestire protocolli statisticamente significativi; si consiglia la analisi di 50 metafasi per tipo di coltura. Vengono valutate la percentuale di cellule con rotture, numero medio di rotture per cellula, numero medio di rotture per cellula aberrante, percentuale di cellule con riarrangiamenti peculiari.

#### 4.2 Sindrome di Bloom (BS)(OMIM: 210900)

Le cellule dei pazienti affetti da BS presentano rotture isocromatidiche, frammenti acentrici, cromosomi isodicentrici e figure quadriradiali simmetriche, che coinvolgono cromosomi omologhi. La BS è l'unica sindrome con instabilità cromosomica che presenta un aumento del numero degli scambi tra cromatidi fratelli (SCE), rispetto ai controlli normali. Infatti il numero medio degli SCE per cellula, che è definito dagli standard di laboratorio e solitamente è inferiore a 12 nelle persone non affette, aumenta da 10 a 15 volte negli affetti. Ogni laboratorio deve definire i propri valori di riferimento per gli SCE, la cui ricerca è indispensabile per confermare la diagnosi di questa condizione. In circa il 20% di pazienti sono presenti due popolazioni di linfociti, rispettivamente con un numero normale di SCE e con un aumento degli SCE (low-SCE/high-SCE). Si devono analizzare almeno 50 metafasi per riscontrare eventuali cellule con "cromosomi arlecchino" nei soggetti a mosaico.

#### 4.3 Atassia-telangiectasia (AT) (OMIM: 208900)

Le cellule dei pazienti affetti da AT presentano rotture cromatidiche e cromosomiche, frammenti acentrici, figure multiradiali di tipo asimmetrico fra cromosomi non omologhi, riarrangiamenti del tipo traslocazioni e inversioni, sia sporadici che clonali, che coinvolgono preferenzialmente i cromosomi 7 e 14, con punti di rottura in 7p15, 7q35, 14q11-12, 14q32. La frequenza delle cellule con aberrazioni varia tra 10% e 50%. L'instabilità cromosomica può aumentare dopo esposizione delle cellule alle radiazioni ionizzanti e al radiomimetico bleomicina. Ogni laboratorio deve verificare periodicamente i propri standard di instabilità spontanea ed allestire



## Società Italiana di Genetica Umana

### Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

protocolli statisticamente significativi. Al fine di valutare l'instabilità cromosomica spontanea e indotta si deve eseguire il confronto tra il numero delle anomalie osservate nel campione in studio e quello di un controllo normale allestiti contemporaneamente, valutando 50-100 metafasi.

#### **4.4 Sindrome di Nijmegen (NBS) (OMIM: 602667)**

La "Nijmegen-breakage syndrome" presenta una instabilità cromosomica spontanea che interessa prevalentemente i cromosomi 7 e 14. Le cellule dei pazienti sono ipersensibili alle radiazioni ionizzanti e agli agenti clastogeni, come la mitomicina C (MMC) e il diepossibutano (DEB). La frequenza delle anomalie varia tra 5% e 22% delle metafasi. Si tratta di rotture cromatidiche e cromosomiche e di anomalie strutturali. Ogni laboratorio deve verificare periodicamente le proprie frequenze di instabilità spontanea ed allestire protocolli statisticamente significativi. Al fine di valutare l'instabilità cromosomica indotta, si raccomanda di allestire colture addizionate con bleomicina e confrontare il numero delle rotture spontanee e indotte osservate nel campione in esame e in un controllo normale allestiti contemporaneamente.

#### **4.5 Sindrome di Werner (WS) (OMIM: 277700)**

Le cellule dei pazienti affetti da WS presentano rotture cromatidiche e cromosomiche, frammenti e cloni con anomalie strutturali di vario tipo, ad esempio delezioni e traslocazioni multiple. Questo quadro citogenetico è stato designato come *variegated translocation mosaicism* (VTM). Le anomalie sono presenti soprattutto nei fibroblasti, ma sono state osservate anche nei linfociti, con una frequenza compresa tra l'11% e il 20% delle cellule. Ogni laboratorio deve verificare periodicamente i propri standard di instabilità spontanea ed allestire protocolli statisticamente significativi.

#### **4.6 Sindrome da Instabilità centromerica e anomalie facciali (ICF) (OMIM: 242860)**

L'instabilità cromosomica di questi pazienti coinvolge l'eterocromatina pericentromerica dei cromosomi 1, 9 e 16 e consiste in despiralizzazioni, delezioni, associazioni tra cromosomi omologhi e non omologhi e interscambi tra queste regioni, con la formazione di figure a bracci multipli (multibranching configurations). Queste anomalie, presenti preferenzialmente nei linfociti, ricorrono con frequenze variabili (16%-90% delle cellule) e interessano per lo più i cromosomi 1 e 16, singolarmente o in associazione, ma anche il cromosoma 9. I pazienti hanno inoltre la tendenza a formare micronuclei. Ogni laboratorio deve verificare periodicamente i propri standard di instabilità spontanea ed allestire protocolli statisticamente significativi. Per l'analisi dovrebbero essere analizzate 50 metafasi bandeggiate alla ricerca di anomalie dell'eterocromatina dei cromosomi 1, 9, 16 e di figure a bracci multipli.

#### **4.7 Sindrome di Roberts (RS) (OMIM: 268300)**

L'instabilità cromosomica spontanea di questi pazienti è caratterizzata dalla prematura separazione dei centromeri e repulsione delle regioni eterocromatidiche pericentromeriche (Heterochromatin repulsion, puffing), che presentano una distribuzione non casuale prevalentemente a carico dei cromosomi 1, 9, 16, Y e con un numero di puffing variabile da cellula a cellula. Ogni laboratorio deve verificare periodicamente i propri standard di instabilità spontanea ed allestire protocolli statisticamente significativi. Per l'analisi dovrebbero essere analizzate 50 metafasi in bande C o block-stained valutando la presenza di centromeri appaiati (segno di prematura separazione dei centromeri), puffing dei centromeri, cromosomi con bracci separati disposti in parallelo (tramline chromosomes) e 50 metafasi dovrebbero essere contate per la ricerca di aneuploidie.



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

### **4.8 Sindrome da Aneuploidia variegata a mosaico (MVA) (OMIM: 257300)**

Questa sindrome presenta un fenotipo cromosomico caratterizzato da diverse aneuploidie presenti in quasi tutte le cellule (trisomie, doppie trisomie e monosomie) dovute alla prematura separazione dei centromeri durante le divisioni cellulari. Ogni laboratorio deve verificare periodicamente i propri standard di instabilità spontanea ed allestire protocolli statisticamente significativi.

## **5. REFERTAZIONE**

### **5.1 Varianti cromosomiche**

Esistono specifiche situazioni cliniche che possono richiedere, a giudizio del professionista, l'esecuzione di ulteriori indagini o l'estensione dell'analisi ai familiari per chiarirne l'eredità e il significato. E' opportuno segnalare solo le varianti per la cui definizione sia stato necessario eseguire esami aggiuntivi e/o l'analisi familiare.

## **6. QF-PCR (PCR Quantitativa Fluorescente)**

### **6.1 Liquido amniotico (LA)**

Per eseguire la QF-PCR sugli amniociti occorre una quantità di liquido amniotico compreso tra 0,5 e 4 ml.

### **6.2 Villi coriali (CVS)**

Per eseguire la QF-PCR sui villi coriali si raccomanda di processare, se possibile, due frammenti diversi di tessuto, dopo disaggregazione meccanica. Nei casi in cui il feto sia di sesso femminile è necessario escludere la contaminazione materna.

### **6.3 Campione materno**

L'analisi con QF-PCR dei campioni di DNA materno è utile per confrontare i polimorfismi madre/feto nei casi di contaminazione materna o di scarsa qualità dei campioni fetali con complemento sessuale XX e per confermare l'identità di campioni con risultato patologico.

### **6.4 Materiale abortivo**

L'analisi con QF-PCR di materiale abortivo può essere eseguita su annessi embrionali o tessuti fetali. Nei casi in cui il feto sia di sesso femminile è necessario escludere la contaminazione materna.

Considerata la frequenza delle aneuploidie negli aborti spontanei si raccomanda, oltre ai cromosomi 13, 18, 21, X e Y, di estendere l'analisi QF-PCR ai cromosomi 15, 16 e 22.

### **6.5 Estrazione del DNA e amplificazione**

Si raccomandano sistemi di estrazione con pochi trasferimenti di campione tra le provette.

Se il kit della QF-PCR è CE-IVD è necessario e sufficiente inserire un bianco ad ogni cambio di lotto; se il kit è home-made è necessario inserire un bianco+patologico+normale ad ogni seduta.

### **6.6 Disegno della QF-PCR**

Devono essere inclusi nell'analisi almeno 4 sistemi di microsatelliti per ciascun autosoma e per il cromosoma X e almeno 2 sequenze specifiche per il cromosoma Y, per ridurre la possibilità di





# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

risultati non informativi. L'analisi dei cromosomi sessuali deve comprendere almeno un microsatellite per valutare il rapporto X/Y (ad es: AMEL) ed almeno un microsatellite per quantificare il numero dei cromosomi X presenti nel campione.

Per l'analisi si raccomanda di utilizzare microsatelliti tri/tetra/penta/esanucleotidici che hanno una minore possibilità di dare origine a picchi aspecifici detti "stutter". È accettabile l'utilizzo di microsatelliti dinucleotidici solo se nella regione da analizzare ve ne sono pochi adatti all'indagine.

Si raccomanda l'uso di microsatelliti che abbiano un'elevata eterozigotità nella popolazione.

Si raccomanda che l'introduzione di microsatelliti nuovi o di primo utilizzo per la diagnosi di aneuploidie mediante QF-PCR sia validata testando almeno 100 cromosomi e includendo almeno 5 campioni aneuploidi.

Si raccomanda che i cicli di PCR nella pratica standard siano compresi tra 24 e 26 perché la reazione rimanga in una fase semi-quantitativa. È accettabile l'utilizzo di un maggior numero di cicli nel caso di una bassa resa standard di amplificazione, ma con validazione della metodica (per cicli, rapporti allelici normali e aneuploidi). La temperatura di annealing deve essere la più bassa possibile, per ridurre l'effetto di eventuali polimorfismi nel sito di legame con il primer.

Si raccomanda che l'analizzatore di sequenze utilizzato per le misurazioni dei prodotti di PCR abbia una risoluzione allelica di 2 bp e sia in grado di quantificare l'altezza e l'area dei picchi.

### 6.7 Interpretazione

Per l'analisi dei risultati si raccomanda l'uso dell'elettroferogramma e la misurazione dei picchi, con la definizione dei valori minimi e massimi di altezza dei picchi. Devono essere esclusi dall'analisi i picchi che derivano da artefatti, come quelli causati da interazione tra i canali di emissione dei fluorocromi ("bleedthrough") e impulsi elettrici elettroforetici ("spikes").

Il calcolo dei rapporti allelici utilizza l'area, l'altezza dei picchi o entrambe le misure. Per i risultati ottenuti con sequenziatori automatici, si raccomanda di utilizzare l'area dei picchi, per ridurre l'effetto di distorsione dei picchi molto larghi.

Si raccomanda anche che il rapporto allelico sia calcolato dividendo l'area/altezza dell'allele di minore lunghezza per quella dell'allele maggiore.

I picchi aspecifici "stutter" sono picchi extra con una lunghezza minore di una o più ripetizioni rispetto all'allele reale. L'area di questi picchi è in genere inferiore al 15% dell'area del picco reale. Per i marcatori tri/tetra/penta/esanucleotidici, l'area dei picchi "stutter" può essere inclusa nel calcolo del rapporto allelico. Anche se si utilizzano marcatori dinucleotidici e gli alleli sono separati da più di 2bp, è possibile includere le aree dei picchi "stutter" nel calcolo dei rapporti allelici. Gli alleli dei marcatori dinucleotidici separati da 2 bp vanno esclusi dall'analisi in quanto i picchi "stutter" possono essere incorporati nell'allele più corto ed alterare i rapporti allelici.

I picchi -A sono picchi extra, più corti di un paio di basi rispetto alla lunghezza dell'allele reale. L'area dei picchi -A può essere inclusa nel calcolo del rapporto allelico.

Nel caso degli elettroferogrammi di bassa qualità si raccomanda la ripetizione dell'analisi.

#### 6.7.1 Valori dei rapporti allelici

I valori di riferimento riportati nei paragrafi sottostanti tengono conto dell'amplificazione preferenziale degli alleli di lunghezza inferiore rispetto a quelli di lunghezza superiore, differenza che può essere ragguardevole se gli alleli sono di lunghezze molto diverse fra loro. Il riscontro di un solo picco può indicare la presenza di omozigosi o di monosomia per un determinato marcatore. I marcatori autosomici che mostrano un solo picco devono essere considerati non-informativi. Nei campioni con genotipo femminile, nella cui indagine non sia compresa l'analisi di almeno un microsatellite in grado di quantificare il numero di cromosomi X presenti, i marcatori del cromosoma X con un solo picco devono essere considerati non-informativi. Nei campioni a genotipo femminile in cui sia stata



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

determinata la presenza di due cromosomi X, i marcatori del cromosoma X con un solo picco devono essere interpretati come non-informativi.

### 6.7.2 Range normale

Il riscontro di due picchi di area/altezza in rapporto di 1:1 indica la presenza di due alleli di quel marcatore. I rapporti biallelici normali dovrebbero essere considerati quelli con valori compresi tra 0,8 e 1,4. Tuttavia, per gli alleli separati da più di 24 bp, possono essere considerati normali i rapporti allelici con valori fino a 1,5.

### 6.7.3 Range trisomico

La presenza di una regione trisomica può essere evidenziata da tre picchi con un rapporto allelico 1:1:1 o da due picchi con un rapporto 2:1 o 1:2. La presenza di due picchi con un rapporto compreso negli intervalli 0,45-0,65 o 1,8-2,4 è indicativa di un profilo triallelico in cui due alleli hanno la stessa dimensione.

### 6.7.4 Range intermedio

I rapporti allelici con valori intermedi (1,4-1,8 o 0,65-0,8) che cadono al di fuori del range normale e di quello triallelico devono essere considerati come risultati non conclusivi.

Per definire i marcatori risultati non conclusivi è necessario in primo luogo valutare tutti i marcatori dello stesso cromosoma, per verificare un eventuale mosaicismo; in secondo luogo è necessario valutare la presenza di marcatori non conclusivi in tutti i cromosomi per sospettare la contaminazione materna. In tali casi si rimanda al cariotipo.

### 6.7.5 Range per il cromosoma X

Relativamente al cromosoma X, i rapporti allelici con valori compresi tra 1,4-1,8 o 0,65-0,8 possono essere indicativi della presenza di mosaicismi per la monosomia X. I rapporti allelici con valori  $>2,4$  o  $<0,45$  possono indicare la presenza di più di 3 alleli e correlare quindi con rare aneuploidie del cromosoma X o mosaicismo X/XX.

### 6.7.6 Rapporti normali/anormali per uno stesso cromosoma

In alcuni casi si possono riscontrare rapporti allelici normali e aneuploidi per lo stesso cromosoma. Tali risultati possono essere indicativi di: anomalie cromosomiche parziali con possibili implicazioni cliniche, "copy number variants" (CNV), polimorfismi nei siti di attacco dei primer ("primer site polymorphism" o PSP), mutazioni somatiche dei microsatelliti ("somatic microsatellite mutation" o SMM).

## 6.8 Risultati

La QF-PCR non consente di rilevare la presenza di tetraploidie. La QF-PCR può non evidenziare la presenza di mosaicismi diluiti o riarrangiamenti strutturali.

Normale: per interpretare un risultato di QF-PCR come normale è necessario che ciascun cromosoma presenti almeno 2 microsatelliti informativi con un pattern biallelico, anche se tutti gli altri microsatelliti sono non-informativi. Se è presente un solo marcatore informativo normale si referta segnalando che il risultato è ottenuto da un solo microsatellite informativo.

Aneuploide: per interpretare un risultato di QF-PCR come aneuploide è necessario che siano presenti almeno 2 microsatelliti informativi compatibili con un genotipo aneuploide, anche con gli altri marcatori che risultano non-informativi. Non è possibile interpretare un risultato come aneuploide basandosi solo su un microsatellite.

La presenza di tre diversi alleli in uno o più marcatori è indicativa di non-disgiunzione meiotica all'origine della linea trisomica.



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

La conferma dell'identità di un campione con risultato patologico può essere effettuata in diversi modi inclusa la ripetizione dell'esame da una estrazione indipendente o mediante il confronto tra il DNA fetale e quello materno.

Triplioide: è suggestiva di triploidia la presenza nella QF-PCR di pattern trisomici per tutti gli autosomi analizzati, con rapporti allelici 1:1:1, 1:2 o 2:1, ed il riscontro di tre cromosomi X o 2 cromosomi X e un cromosoma Y o un cromosoma X e due cromosomi Y.

Risultati discrepanti: una discordanza dei risultati di QF-PCR (normale/aneuploide) nella regione prossimale o distale di un cromosoma potrebbe essere indicativa della presenza di un'anomalia cromosomica parziale. In tali casi è necessario seguire quanto descritto:

- i) si controlla la localizzazione del microsatellite e che esso sia presente nella lista aggiornata dei STRs mappati in CNV della popolazione generale/ereditate (*la lista aggiornata deve essere richiesta all'indirizzo di posta: [Kathy.Mann@gsts.com](mailto:Kathy.Mann@gsts.com)*);
- ii) nel caso in cui la CNV sia inclusa nella lista sopracitata si referta come normale;
- iii) nel caso la CNV sia presente nella lista sopracitata si analizzano i genitori per verificare l'ereditarietà;
- iv) nel caso lo sbilanciamento sia insorto de novo si rimanda ad approfondimenti con altre tecniche (cariotipo, FISH locus specifiche, CGH/SNP ).

### 6.9 Contaminazione materna

#### 6.9.1 Liquido amniotico

L'analisi QF-PCR può essere eseguita su campioni di liquido amniotico ematici. Se il genotipo è femminile si deve escludere la contaminazione materna mediante l'analisi di marcatori genetici polimorfici STR.

Se il campione materno non è disponibile, i risultati della QF-PCR non possono essere interpretati.

È necessario segnalare sul referto l'aspetto ematico del campione.

Il riscontro di 2 genotipi, di cui uno almeno femminile, nella QF-PCR da campioni ematici è compatibile con la contaminazione materna che va verificata con l'analisi dei polimorfismi STR materni e segnalata nel referto. Il risultato della QF-PCR può essere interpretato solo se il livello di contaminazione è basso e i rapporti allelici nei microsatelliti del genotipo fetale sono interpretabili (assenza di range intermedi). Ad ogni modo è sempre preferibile rimandare al cariotipo.

#### 6.9.2 Villi Coriali

I campioni di villi coriali di bassa qualità o nei quali la decidua sia stata rimossa in modo incompleto (si raccomanda la segnalazione sui fogli di lavoro) possono essere contaminati da tessuto materno. In tali casi si raccomanda di analizzare i polimorfismi STR materni per interpretare i risultati di QF-PCR in presenza di genotipi femminili.

Il riscontro di 2 genotipi, di cui uno almeno femminile nella QF-PCR è compatibile con la contaminazione materna che va verificata con l'analisi dei polimorfismi STR materni e segnalata nel referto. Il risultato della QF-PCR può essere interpretato solo se il livello di contaminazione è basso e i rapporti allelici nei microsatelliti del genotipo fetale sono interpretabili (assenza di range intermedi). Tale condizione può rendere inattendibile anche il cariotipo sulla coltura di mesoderma. Perciò è sempre preferibile rimandare al cariotipo ottenuto col metodo diretto.



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

### 6.9.3 Materiale abortivo

Il DNA estratto dagli annessi embrionali (ad es.: villi coriali, sacco amniotico) o dalle colture cellulari a lungo termine dei campioni di materiale abortivo può essere contaminato dal tessuto materno. In tali casi si raccomanda la verifica dei polimorfismi STR materni per interpretare i risultati della QF-PCR in presenza di un genotipo femminile.

Il riscontro di 2 genotipi, di cui uno almeno femminile nella QF-PCR è compatibile con la contaminazione materna che va confermata con l'analisi dei polimorfismi STR materni e segnalata sul referto. Il risultato della QF-PCR può essere interpretato solo se il livello di contaminazione è basso e i rapporti allelici nei microsatelliti del genotipo fetale sono interpretabili (assenza di range intermedi). Tale condizione può rendere inattendibile anche l'analisi del cariotipo sulle colture dei tessuti.

### 6.10 Mosaicismo

Nell'analisi QF-PCR possono essere rilevati mosaicismi in base alla presenza di picchi extra o di rapporti allelici anomali nei microsatelliti di un cromosoma. Per considerare mosaicismo il risultato di una QF-PCR occorre che i valori dei rapporti allelici siano interpretabili in modo affidabile come indicativi della presenza di un mosaico.

Questi risultati possono non essere facilmente evidenziabili in quanto i rapporti allelici possono rimanere nel range normale o aneuploide o avere valori intermedi borderline, soprattutto se il mosaico è diluito. In presenza di sospetto mosaicismo, si rimanda al cariotipo.

Anche se raramente, sui campioni di villi coriali si possono ottenere risultati completamente discrepanti tra la QF-PCR e il cariotipo, a causa di mosaicismi confinati alla placenta. In tali casi si raccomanda di rimandare all'amniocentesi.

### 6.11 Referto

In una nota sul referto deve essere segnalato che la QF-PCR non consente di rilevare le tetraploidie, i riarrangiamenti strutturali e può non evidenziare la presenza di mosaicismi a bassa frequenza. I risultati della QF-PCR devono essere scritti utilizzando la nomenclatura "rsa" ISCN2013.

Risultati normali. In un referto con esito normale è opportuno elencare in modo chiaro i microsatelliti analizzati.

Un risultato normale può essere esplicitato con frasi come ad esempio: "compatibile con un normale assetto disomico per i cromosomi 13, 18, 21", "è stato evidenziato un assetto normale per i cromosomi 13, 18, 21", "non sono state rilevate trisomie", "l'analisi dei marcatori dei cromosomi X e Y ha evidenziato la presenza di un genotipo femminile/maschile" Risultati aneuploidi. Nei referti con risultati indicativi di un'aneuploidia devono essere elencati i microsatelliti che presentano un pattern aneuploide, la loro localizzazione e se sono trisomici o non informativi e deve essere segnalato che il risultato "è indicativo della presenza di una trisomia/monosomia..."

Monosomia X. L'analisi QF-PCR per il cromosoma X può valutare la presenza di aneuploidie per il cromosoma X ma non ha valore diagnostico. quando i microsatelliti non comprendano almeno un marcatore per il calcolo del rapporto allelico X:autosoma (es: TAF9).

## 7. BACs-on-Beads™ (BoBs™)

I DNA dei campioni vengono marcati e analizzati in singolo; i DNA di riferimento sono invece processati in duplicato. Dopo l'ibridazione, l'intensità dei segnali viene rilevata con il sistema Luminex® 100/200™ provvisto di software IS 2.3 o xPONENT® 3.1. Il software di analisi BoBsoft™ confronta l'intensità del segnale dei campioni con quello dei controlli al fine di individuare le variazioni del numero di copie del DNA nelle regioni bersaglio (Figura 1). È essenziale seguire le istruzioni e il protocollo fornito dal produttore, anche per quel che concerne la preparazione dei campioni di DNA.

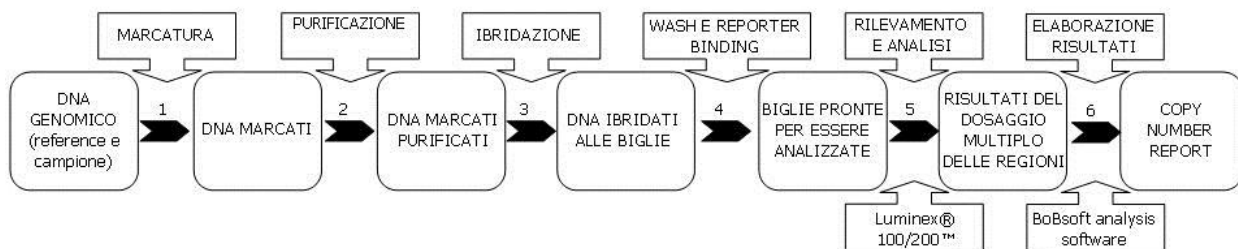


Figura 1: Schema delle diverse fasi del protocollo BoBs

È indispensabile che ogni laboratorio esegua internamente una validazione del protocollo (o la sua verifica se il Kit possiede marchio CE-IVD) mediante l'analisi di almeno 5 campioni con microdelezioni note indagate dal kit, 5 con aneuploidie e 5 di controllo normali.

È preferibile che in ogni seduta di analisi vengano inseriti 2 controlli femminili e 2 maschili. Se invece si utilizza la funzione "accumulated reference" durante l'analisi mediante BoBsoft è, in ogni caso, raccomandato analizzare in due sedute differenti almeno 2 controlli femminili e 2 maschili (totale 4 controlli femminili e 4 maschili) ad ogni cambio di lotto di biglie.

È possibile inserire un campione positivo ed uno negativo noto. Tuttavia, i campioni di riferimento maschili e femminili inclusi in tutte le sessioni fungono da controlli di qualità interni, oltre a essere utilizzati come controlli con cui vengono confrontati i dati dei pazienti.

I trasferimenti di campione da provetta a provetta devono essere tracciabili e controllati da un secondo operatore.

I risultati dei campioni dei pazienti dovrebbero essere refertati solo se i valori dei campioni dei pazienti e quelli dei controlli soddisfano i criteri di accettabilità del laboratorio. Questi sono i valori di riferimento proposti dal produttore:

Intensità media di fluorescenza (MFI) dei reference:	≥180
CV degli autosomi dei reference:	≤0.06 (6%)
Separazione totale del X dei reference:	≥0.6
CV degli autosomi del campione:	≤0.08 (8%)

Ogni eventuale risultato positivo deve essere confermato inequivocabilmente con una seconda metodica scelta in relazione al tipo di sbilanciamento e al tipo di campione analizzato. Nei soli casi in cui i tempi esecuzione del test di conferma fossero incompatibili con i tempi previsti per il termine della gravidanza è accettabile ripetere l'analisi partendo dall'estrazione di DNA da una seconda aliquota di campione.



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

Nel referto è essenziale specificare il nome del kit (Prenatal BoBs, KaryoLite BoBs) e i limiti del test. I risultati dei BoBs devono essere scritti utilizzando la nomenclatura "rsa" ISCN2013.

### 8. CGH/SNP Array Genomico

E' indispensabile che ogni laboratorio validi il protocollo e la piattaforma array scelta, mediante l'analisi di almeno 5 campioni di controllo normali e altrettanti con sbilanciamenti noti.

#### 8.1 Risoluzione

La capacità di risoluzione di una piattaforma array nell'identificare sbilanciamenti genomici dipende dal numero delle sonde utilizzate, dalla distanza media a cui sono localizzate le sonde (*spacing*), dalla lunghezza delle sonde stesse e dagli algoritmi utilizzati per l'analisi dei dati. E' ovvio che, a parità di numero di sonde consecutive sbilanciate per chiamata dell'algoritmo, tanto minore sarà la dimensione di ogni sonda e la distanza relativa, tanto maggiore sarà la risoluzione dell'array e tanto più piccole le dimensioni delle anomalie che possono essere identificate. Le sonde BAC sono più grandi rispetto alle sonde oligonucleotidiche (oligo). Questo implica che un BAC-array ha una risoluzione teorica inferiore rispetto agli oligo-array nella definizione sia delle dimensioni che della localizzazione dei punti di rottura di una Copy Number Variation (CNV). Tuttavia, la risoluzione effettiva di un array può essere diversa rispetto a quella teorica, poiché dipende anche dall'intensità del segnale e dal rumore di fondo che caratterizza ogni piattaforma (parametri strettamente connessi alla qualità del campione di partenza e/o alla qualità delle condizioni sperimentali in generale), nonché dall'algoritmo e dai filtri utilizzati per l'analisi dei risultati. Ogni laboratorio dovrebbe dichiarare, sull'informativa illustrata in sede di consulenza pre-test, la risoluzione teorica sia nelle regioni critiche sia nel backbone di ciascun tipo di array impiegato nella pratica clinica. La risoluzione effettiva deve essere sempre riportata sul referto.

#### 8.2 Estrazione DNA

I metodi applicati per l'estrazione del DNA devono assicurare una resa di qualità e quantità tale da consentirne un uso affidabile negli esami basati sugli array. Si devono preferire i sistemi di estrazione che richiedono il minor numero possibile di trasferimenti del campione da provetta a provetta.

Sono necessari criteri interni di giudizio di idoneità laddove non indicati dalla casa produttrice. In diagnosi prenatale è sempre opportuno processare un campione di DNA anche se ritenuto qualitativamente e/o quantitativamente non ottimale, quando non sia possibile ripetere l'estrazione dal campione di partenza o quando non sia possibile o opportuno richiedere un nuovo prelievo. In tali casi ogni eventuale risultato positivo deve essere confermato con una seconda metodica o un secondo esperimento (vedi paragrafo 8.11), al fine di minimizzare i risultati falsi positivi. Nella refertazione deve essere indicata la natura non ottimale del campione e segnalata la necessità della consulenza genetica per la spiegazione delle relative implicazioni.

#### 8.3 DNA di riferimento

Le tecniche di analisi genomica basate su array non sono in grado di definire in valore assoluto il numero di copie di DNA presenti in un campione. Il dato è relativo ad un DNA di riferimento. In teoria, un'anomalia identificata con un'analisi CGH-array potrebbe essere attribuita sia al campione sia al DNA di riferimento. Per differenziare le CNV associate all'uno o all'altro genoma, è opportuno che ogni laboratorio abbia due diversi DNA di riferimento (oppure 2 *pool* ottenuti miscelando DNA di diversi soggetti), uno di sesso maschile e uno di sesso femminile. I DNA di riferimento devono essere caratterizzati mediante una serie di ibridazioni con altri DNA ottenuti da soggetti normali, evidenziando e annotando le CNV che li caratterizzano. Molto



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

spesso i *pool* di DNA genomici disponibili in commercio variano a seconda del lotto. E' possibile utilizzare come DNA di riferimento anche DNA ottenuti da linee stabili, che possono essere caratterizzate una sola volta.

Nell'uso di SNP-array, per i quali l'analisi comparativa è di tipo informatico, si possono utilizzare sia set di dati di riferimento forniti dalle ditte commerciali (ad es.: 270 campioni Hapmap), sia campioni normali analizzati con la stessa piattaforma e la stessa tipologia di array (minimo 50 soggetti equamente distribuiti tra i due sessi).

Ogni laboratorio deve stabilire e documentare i criteri di utilizzo del DNA di riferimento (insieme di campioni o singolo campione; comparabile o non comparabile per sesso) e riportare sul referto il DNA di riferimento utilizzato.

### 8.4 Amplificazione

La *Whole Genome Amplification* deve avere criteri di esecuzione prestabiliti e il protocollo di amplificazione deve essere validato utilizzando campioni già caratterizzati (3 normali e 3 sbilanciati).

### 8.5 Marcatura e ibridazione

Sono necessari criteri interni che stabiliscano quando la marcatura di un DNA deve essere considerata qualitativamente e/o quantitativamente non idonea per potere procedere con l'ibridazione. Se non è possibile ripetere la marcatura sul DNA di partenza è possibile processare comunque il campione la cui marcatura sia risultata qualitativamente e/o quantitativamente non ottimale. E' possibile ibridare un campione marcato in modo non ottimale purché se ne tenga conto nell'interpretazione dei risultati e venga riportato nel referto.

### 8.6 Scansione e estrazione dei dati

L'hardware ed il software impiegati per la scansione e l'estrazione dei dati devono essere adatti al tipo di piattaforma utilizzata ed avere livelli di sensibilità e specificità tali da assicurare l'individuazione di sbilanciamenti di dimensioni uguali o maggiori a quelli dichiarati.

### 8.7 Analisi

E' opportuno che il software utilizzato per l'analisi sia in grado di produrre sia dati grafici che numerici.

I parametri del software di analisi devono essere fissati in modo da assicurare l'identificazione di sbilanciamenti di dimensioni uguali o maggiori a quelli specificati dal laboratorio per il tipo di piattaforma impiegata.

Ogni laboratorio stabilisce il metodo di normalizzazione utilizzato. Per le piattaforme commerciali si possono adottare sistemi di controllo di qualità inclusi di solito nei software analitici, mentre per le piattaforme *home-made* il laboratorio deve fissare i parametri e i criteri qualitativi degli esperimenti.

Ogni laboratorio valida l'algoritmo scelto per l'analisi e stabilisce il numero minimo di sonde necessarie e i valori di log-ratio (logaritmo, di solito in base 2, del rapporto delle fluorescenze) per l'identificazione delle CNV.

I parametri analitici vanno fissati in modo tale da garantire inequivocabilmente l'identificazione di CNV alla risoluzione riportata nel referto.

### 8.8 Interpretazione

Per interpretare il significato clinico di una CNV si valutano: le dimensioni, il contenuto genico, la posizione, l'origine *de novo* o ereditata, considerando in questo caso anche il fenotipo del genitore portatore, il fatto che sia stata o meno già descritta in altri soggetti ed il loro eventuale fenotipo.

Per la sua stessa natura, la tecnologia degli array produce un numero significativo di risultati di difficile interpretazione. I dati di letteratura e i database pubblici, come i "*Database of Genomic*



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

*Variants* (DGV), ENSEMBL, DECIPHER, UCSC, OMIM, DATABASE di TROINA, etc., dovrebbero essere consultati per interpretare il significato clinico delle CNV identificate. Occorre tenere presente che tutti questi database sono strumenti in continua evoluzione ed aggiornamento.

Si raccomanda di considerare come "benigna" una CNV che sia stata descritta, con lo stesso orientamento (delezione/duplicazione) e sovrapposizione pressoché completa (>50% nel caso di CNV inferiori alle 100 kb), in almeno 3 soggetti normali riportati in DGV analizzati mediante piattaforme con risoluzione uguale o superiore a quella in uso.

La documentazione delle CNV apparentemente "benigne" dovrebbe essere conservata per possibili future revisioni.

Le CNV "benigne" possono non essere riportate sul referto ed essere rese disponibili su richiesta.

### 8.9 Mosaicismo

Ogni laboratorio stabilisce il livello minimo di mosaicismo rilevabile con l'analisi array in relazione alla dimensione di una CNV. A tale scopo ogni laboratorio procede all'analisi dei campioni costituiti da concentrazioni decrescenti e note di una linea cellulare con una CNV già caratterizzata e stabilisce la concentrazione minima alla quale la CNV può essere identificata.

### 8.10 Database delle varianti genomiche

Al tempo di questa stesura si raccomanda la consultazione e l'inserimento dei dati sperimentali nel database di Troina (<http://gvarianti.homelinux.net/gvariantib37/index.php>), attualmente condiviso da parecchi laboratori Italiani. Il database consente di visualizzare, in un contesto "genome-browser", le CNV identificate nei pazienti italiani analizzati con array e di confrontare i propri dati con un campione "genomico" omogeneo, allo scopo di individuare le CNV benigne caratteristiche della popolazione Italiana. I dati fenotipici possono invece essere inseriti nel database di Siena (<http://www.biobank.unisi.it>), utilizzando lo stesso codice campione per l'inserimento nel database di Troina.

Si raccomanda di inserire i dati delle CNV, sia *de novo* sia ereditate, nei database internazionali (es: Decipher, ISCA, etc.). La raccolta di questi dati consente di ottenere dei riferimenti aggiornati sulla patogenicità delle CNV umane.

### 8.11 Validazione delle CNV

In un esperimento in cui vengono ibridate da alcune migliaia fino ad alcune centinaia di migliaia di sonde è estremamente probabile che alcune non ibridino correttamente, con il rischio di generare risultati falsi-positivi. La probabilità che si verifichino dei falsi-positivi dipende anche dalla qualità dell'analisi. Ogni laboratorio determina il tasso medio di risultati falsi-positivi per singolo esperimento. Questo parametro va determinato con una serie di ibridazioni self/self nella CGH-array (un esperimento di ibridazione nel quale si usa lo stesso DNA come campione e riferimento), con una replica tecnica dell'esperimento negli SNP-array. In un esperimento di CGH-array self/self non dovrebbe essere presente alcuna anomalia genomica, mentre nel caso degli SNP-array il profilo genomico dovrebbe essere identico nelle due repliche. Tuttavia, nella pratica, dato che alcune sonde non ibridano correttamente, si producono risultati falsi-positivi. Si raccomanda l'uso di test di conferma, soprattutto nei laboratori con un tasso di risultati falsi-positivi elevato (>1%) e nei casi in cui la CNV abbia una ridotta estensione (ai limiti del potere risolutivo della piattaforma utilizzata) e/o non si sovrapponga a una regione già descritta in un microriarrangiamento (del/dup). Oltre a confermare la presenza di una determinata CNV, le analisi estese ai genitori consentono di stabilire se lo sbilanciamento sia *de novo* o ereditato. La tecnica di validazione scelta per la conferma di una CNV va testata sul probando prima di essere utilizzata per una eventuale analisi dei genitori.

Ogni laboratorio definisce le tecniche e i protocolli di validazione per confermare le CNV. Possibili tecniche utili a confermare i risultati sono la FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), la MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), la PCR quantitativa (q-PCR), il





# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

cariotipo oppure la ripetizione del test di microarray con un altro DNA di riferimento o a maggiore risoluzione.

Le analisi quantitative (ad es: q-PCR) eseguite sui familiari non consentono di distinguere lo stato di portatore di riarrangiamento bilanciato da quello di normalità. Quando possibile si deve privilegiare l'analisi FISH nell'estendere l'indagine ad altri familiari del probando, dato che questo tipo di esame può identificare la localizzazione cromosomica di delezioni, duplicazioni ed eventuali riarrangiamenti bilanciati, consentendo di definire i meccanismi dello sbilanciamento e precisare i rischi di ricorrenza.

### 8.12 Referto

Per le informazioni generali da riportare sul referto vedi Capitolo 5 delle Linee-Guida SIGU 2013.

Il referto deve fornire una descrizione chiara e non ambigua degli sbilanciamenti identificati e, quando possibile, fornire una spiegazione delle implicazioni cliniche dei risultati ottenuti. Occorre tenere presente che il referto può entrare a fare parte della cartella clinica di un soggetto e che quindi potrebbe essere visto non solo dal medico referente ma anche da altri sanitari, non esperti di analisi con array, o dal soggetto stesso.

E' prevedibile che alcuni referti possano essere complessi; in tal caso devono includere la raccomandazione alla consulenza genetica.

Il referto dell'indagine array-CGH deve riportare le seguenti informazioni:

- dati anagrafici del paziente (nome, cognome e data di nascita); devono essere presenti almeno due identificativi del soggetto;
- numero di protocollo interno;
- ente/clinico inviante (se la struttura erogante il test genetico è diversa da quella erogante la consulenza genetica);
- indicazione sintetica all'analisi: ad esempio, palatoschisi e ritardo psicomotorio (termine riservato a pazienti inferiori a 6 anni) oppure difetto del setto interatriale, dismorfismi e deficit intellettivo, ecc. L'indicazione al test dovrebbe essere sempre riportata in forma sintetica anche se il referto è emesso come allegato.
- data di ricevimento;
- data di refertazione;
- tipologia del campione (DNA da sangue periferico, da fibroblasti, etc. - WGA/non WGA);
- descrizione dell'array: tipo di array, versione, produttore;
- risoluzione effettiva dell'array;
- dettagli tecnici dell'analisi: analisi/campione vs DNA di riferimento (specificare il DNA di riferimento utilizzato); *dye-swap/non dye swap*; *sex mismatch/match*;
- software utilizzato per l'analisi (versione) e algoritmo di analisi, compreso il numero minimo di sonde considerate per la "chiamata" di una CNV;
- qualità complessiva dell'esperimento (definita da parametro/i oggettivo/i definendo i limiti di riferimento);
- risultato dell'analisi secondo la formula indicata dalla versione corrente dell'ISCN
- localizzazione espressa in paia di basi (bp) dei punti di rottura delle CNV identificate, indicando: la posizione iniziale e finale delle sonde informative;
- assemblaggio genomico di riferimento (ad es.: hg18, hg19) ;
- descrizione scritta dei risultati;
- dimensione minima e massima degli sbilanciamenti identificati
- indicazione dei metodi di conferma dei risultati (se eseguite), specificando i cloni, i microsatelliti oppure il gene analizzato;
- limiti del test (ad es: livelli minimi identificabili di mosaicismo);
- indicazione degli eventuali riferimenti bibliografici/database utilizzati per l'interpretazione;



## Società Italiana di Genetica Umana

### Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

Commento ai risultati: se le raccomandazioni sull'accettazione del campione sono state seguite, al momento della scrittura del referto è in genere noto il risultato del DNA dei genitori.

- interpretazione clinica, includendo:

- a) il contenuto genico degli sbilanciamenti identificati. Con 'contenuto genico' si intende riferirsi all'indicazione di: specifici geni nel caso in cui questi abbiano un'ovvia rilevanza clinica; la lista completa dei geni presenti in una CNV, quando questi non siano troppo numerosi; nel caso in una CNV siano presenti numerosi geni e sia impossibile elencarli tutti, riportare una frase del tipo: "Nella regione sono contenuti N. geni"; nel caso una CNV sia priva di geni, riportare una frase del tipo: "In questa regione non vi sono geni";
- b) se possibile, indicare se il risultato è coerente con l'indicazione clinica e/o le conseguenze attese dalla presenza dello sbilanciamento;
- c) la raccomandazione ad eseguire una consulenza genetica, se il medico inviante non è un genetista clinico;
- d) l'eventuale indicazione ad estendere le indagini ad altri familiari a rischio;
- e) se precisabile, il rischio di ricorrenza e la raccomandazione ad eseguire una consulenza genetica

In base all'integrazione di questo dato con l'analisi dei database e della letteratura, si possono generare 5 differenti tipi di risultato:

- 1) risultato normale: la risposta non ha commenti particolari se non quelli legati alla parte tecnica. Si raccomanda di non refertare i polimorfismi noti ma di aggiungere una frase "i polimorfismi noti sono disponibili su richiesta" OPPURE "Non sono state considerate nell'interpretazione dei risultati le variazioni del numero di copie di quei loci noti come siti benigni considerate non patogenetiche alla data della refertazione".
- 2) risultato patologico: CNV *de novo* o ereditate, relative a sindromi note. La risposta non ha commenti particolari se non quelli legati alla parte tecnica e ai riferimenti ai database (OMIM...).
- 3) risultato con CNV "privata ereditata": si tratta di una CNV non riportata come polimorfismo e che sembra essere "privata" del paziente, ma ereditata da un genitore non affetto. In questi casi si raccomanda il seguente commento sul referto "l'analisi ha evidenziato la presenza di un'alterazione, ereditata da un genitore, specificare pat/mat, che ad oggi non assume un chiaro significato "patogenetico".
- 4) risultato con CNV "privata *de novo*": si tratta di una CNV non riportata come polimorfismo e che sembra essere "privata" del paziente e non ereditata da un genitore. In questi casi si raccomanda il seguente commento sul referto "l'analisi ha evidenziato la presenza di un'alterazione, non ereditata da un genitore, che ad oggi non assume un chiaro significato patogenetico. Tuttavia, non può essere escluso che il riarrangiamento della correli con la malattia."
- 5) risultato con CNV nota in letteratura (ereditata o no) come essere concausa di malattia. Si tratta dei cosiddetti sbilanciamenti a bassa penetranza. In questo caso si raccomanda il seguente commento sul referto "Secondo le conoscenze attuali il riarrangiamento può correlare con la malattia".

#### **8.12.1 Refertazione di regioni di omozigotità.**

Nel caso in cui sia stata utilizzata una piattaforma contenente SNP, nonostante l'indicazione all'analisi fosse la ricerca di CNV, si possono individuare incidentalmente regioni di omozigotità, suggestive di UPD o di consanguineità. In questo caso si raccomanda di refertare l'UPD, se coinvolge cromosomi o regioni cromosomiche sottoposte ad "imprinting", ma non la possibile consanguineità, secondo la nomenclatura indicata in ISCN 2013, ma di inserire nel commento che questa ipotesi deve essere confermata con tecniche alternative.



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

### 9. Tempi di refertazione

#### 9.1 Referto definitivo

Sono da considerarsi urgenti tutti i campioni di diagnosi prenatale.

La decisione di ripetere un prelievo relativo ad una diagnosi prenatale, a causa del fallimento della prima coltura, è opportuno che sia presa entro il 14° giorno dall'arrivo del campione in laboratorio.

Sono da considerare come indicazioni urgenti in diagnosi postnatale:

- coppie con gravidanza in corso;
- genitali ambigui alla nascita;
- neonati con sospetta anomalia cromosomica;
- richieste per specifiche necessità cliniche.

#### 9.2 Referto preliminare

In generale i risultati preliminari devono essere comunicati verbalmente dal dirigente/responsabile dell'analisi o suo delegato al clinico referente, con la chiara indicazione che i risultati dell'analisi sono provvisori e definendo quali analisi siano ancora in corso e quali eventuali anomalie debbano ancora essere indagate.

In caso di emissione di un referto preliminare deve essere chiaramente indicato che si tratta di un risultato provvisorio e che sono in corso o necessari ulteriori approfondimenti per l'emissione di un referto definitivo. Il referto preliminare deve essere emesso solo in casi particolari e consegnato al clinico e/o al paziente dal dirigente responsabile dell'analisi o da suo delegato. Copia di tale referto e dettagli delle informazioni fornite, anche se solo verbali, devono essere inclusi nella scheda di laboratorio del paziente.

Il campione di un probando può essere riferito singolarmente o accompagnato dal campione dei genitori a seconda della pratica in atto nei diversi laboratori. Qualora venga identificata una anomalia nel probando, può essere emesso un referto preliminare per richiedere l'estensione dell'analisi ai genitori.

### 10. Sitografia

- Association for Clinical Cytogenetics (ACC) General Best Practice Guidelines Constitutional Postnatal Chromosomal Microarray Best Practice Guidelines (2011) v2.00  
[http://www.cytogenetics.org.uk/prof\\_standards/acc\\_general\\_bp\\_mar2007\\_1.04.pdf](http://www.cytogenetics.org.uk/prof_standards/acc_general_bp_mar2007_1.04.pdf)
- American College of Medical Genetics: linee guida <http://www.acmg.net/>
- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology:  
<http://atlasgeneticsoncology.org>
- Australian Government Department of Health and Ageing, 2003, Linee-guida del National Pathology Accreditation Advisory Council:  
<http://www.health.gov.au/npaac/docs/cytogen.htm>
- Canadian Cytogenetics Guidelines.: <http://www.hrsrh.on.ca/genetics>
- College of American Pathologists – Cytogenetics Checklist:  
[http://www.cap.org/html/checklist\\_html/cklst09p.html](http://www.cap.org/html/checklist_html/cklst09p.html)
- DATABASE OF GENOMIC VARIANTS: <http://projects.tcag.ca/variation/>
- DECIPHER: <http://decipher.sanger.ac.uk/>
- ECA - Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance:  
<http://www.eurogentest.org/web/info/public/unit1/guidelines/cytogenetics/index.xhtml>



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

- ENSEMBL: <http://www.ensembl.org/index.html>
- ISCA: <https://www.iscaconsortium.org/>
- OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
- SIENA DATABASE CLINICO: <http://www.biobank.unisi.it>
- TROINA DATABASE: <http://gvarianti.homelinux.net/gvariantib37/index.php>
- UCSC: <http://genome.ucsc.edu/>

## 11. Bibliografia

### 11.1 Testi consigliati

- AGT Cytogenetics Laboratory Technical Manual. Barch M, Kaback M, Spurbeck J. Lippincott Williams & Wilkins ed., 1997.
- Analysing chromosomes. Czepulkowski B. BIOS Scientific Publisher Limited, 2001.
- Cancer Cytogenetics. Heim S and Mitelman F . 2nd ed., Wiley-Liss, New York, 1995.
- Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling Third Edition Ed. R.J.M. Gardner-G.R. Sutherland, New York Oxford, OXFORD University Press 2004.
- Genetic Disorder and The Fetus V edition Ed. Aubrey Milunsky The Johns Hopkins University Press, Baltimore-London, 2004.
- In situ hybridization: a practical approach, DG Wilkinson ed., IRL press, Oxford, 1992.
- In situ hybridization – Principles and practice. JM Pollack, McGee JO'D eds. Oxford University Press, Oxford, 1990.
- International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2013). Lisa G Shaffer, Jean McGowan-Jordan, Michael Schmid . Ed. Karger 2013.
- International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2005). Lisa G Shaffer, Niels Tommerup. Ed. Karger 2005.
- ISCN (1991): Guidelines for Cancer Cytogenetics, supplement to An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, F Mitelman ed., S. Karger, Basel 1991.
- Practical Genetic Counselling, Sixth Edition, Peter Harper, Edward Arnold 2004.
- Testo-Atlante di Citogenetica Umana. Ventruto V, Sacco G., Lonardo F. Springer-Verlag Italia, Milano, 2001
- The chromosomes in Human Cancer and Leukemia. Sandberg AA:, 2nd edition. Elsevier, New York, 1990.
- The principles of Clinical Cytogenetics; Second Edition, eds Gersen SL, Keagle MB, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004
- Benign and Pathological Chromosomal Imbalances Microscopic and Submicroscopic Copy Number Variations (CNVs) in Genetics and Counseling THOMAS LIEHR Copyright \_ 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 11.2 Citogenetica prenatale

- Berend SA, Horwitz J, McCaskill C, Shaffer LG Identification of uniparental disomy following prenatal detection of Robertsonian translocations and isochromosomes. Am J Hum Genet 66: 1787 - 1793, 2000
- European Collaborative Research on Mosaicism in CVS (EUCROMIC)
- Trisomy 15 CPM: probable origins, pregnancy outcome and risk of fetal UPD. Pren Diagn, 19: 29-35, 1999
- George AM, P Oei, I Winship False-positive diagnosis of trisomy 21 using fluorescence in situ hybridisation (FISH) on uncultured amniotic fluid cells Prenat Diagn 2003; 23: 302–305
- Hahnemann JM, Vejerslev LO European collaborative research on mosaicism in CVS-fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. Am J Med Genet, 70: 179-187, 1997



## Società Italiana di Genetica Umana

### *Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU*

- Hahnemann JM, Vejerslev LO. Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS)-diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992. *Prenat Diagn*, 17: 801-820, 1997.
- Hook E.B. Exclusion of chromosome mosaicism: tables of 90 percent, 95 percent and 99 percent confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet* 1977, 29, 94.
- Hsu LYF, Kaffe S, Jenkins EC, et al Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. *Prenat Diagn*, 12: 555-573, 1992
- Hsu LYF, Yu M-T, Richkind KE, et al Incidence and significance of chromosome mosaicism involving an autosomal structural abnormality diagnosed prenatally through amniocentesis: a collaborative study. *Prenat Diagn*, 16: 1-28, 1996
- Hsu LYF, Yu M-T, Neu R, et al Rare trisomy mosaicism diagnosed in amniocytes involving an autosome other than chromosomes 13, 18, 20 and 21: karyotype/phenotype correlations. *Prenat Diagn*, 17: 201-242, 1997
- Hsu LYF, Benn PA Revised guidelines for the diagnosis of mosaicism in amniocytes. *Prenat Diagn*, 19: 1081-1090, 1999
- Hsu LYF and Benn PA (1999). Revised Guidelines for the Diagnosis of Mosaicism in Amniocytes. *Prenatal Diagnosis* 19 1081-82
- Ledbetter DH, Engel E Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum Mol Genet* 4: 1757 – 1764, 1995
- Kalousek DK and Vekemens M. Confined placental mosaicism and genomic imprinting. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaec* 2000 14(4) 723-30
- Kalousek DK Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. *Am J Med Genet* 91: 39 – 45, 2000
- Kotzot D (2002) Review and meta-analysis of systematic searches for UPD other than UPD15 *Am J Med Genet* p366-375 Smith K, Lowther G, et al The predictive value of findings of the common aneuploidies, trisomies 13, 18 and 21, and numerical sex chromosome abnormalities at CVS: experience from the ACC U.K. collaborative study. *Prenat Diagn*, 19, 817-826, 1999
- Tepperberg J, M.J Pettenati, PN Rao, CM Lese, D Rita, H Wyandt, S Gersen, B White, MM Schoonmaker Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature *Prenat Diagn* 2001; 21: 293-301.
- Yong PJ, Marion SA et al (2002) Evidence for imprinting on chromosome 16; the effect of uniparental disomy on the outcome of mosaic trisomy 16 pregnancies *Am J Med Genet* 112 123-32
- Yong PJ, Barrett IJ et al (2003) Clinical aspects, prenatal diagnosis and pathogenesis of trisomy 16 mosaicism *J Med Genet* 40 175-82
- Wallerstein R, Yu M-T, Neu R, et al Common trisomy mosaicism diagnosed in amniocytes involving chromosomes 13, 18, 20 and 21: karyotype/phenotype correlations. *Prenat Diagn*, 20: 103-122, 2000
- Weremowicz S, DJ Sandstrom, CC Morton, A Niedzwiecki, M McH Sandstrom, FR Bieber Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases *Prenat Diagn* 2001; 21: 262-269.
- Witters I, K Devriendt, E Legius, G Matthijs, D Van Schoubroeck, FA Van Assche, J-P Fryns Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridisation (FISH) *Prenat Diagn* 2002; 22: 29-33.
- Wolstenholme J, Emslie JB, Connors S. Association of Clinical Cytogeneticists, chorionic villus sampling database 1987-2000. *Prenatal diagnosis* 2006 26(5) 420-7



# Società Italiana di Genetica Umana

## Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU

### 11.3 Citogenetica postnatale

- Dufke A et al. Unusual chromosomal mosaicism as a cause of mental retardation and congenital malformations in a familial reciprocal translocation carrier, t(17;22)(q24.2;q11.23). *Cytogenet Cell Genet* 2001;93:168-70
- Guttenbach et al. Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am J Hum Genet* 1995 57:1143-50
- Hassold T and Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001 2:280-91
- Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism. Tables of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet.* 1977 29:94-97
- Hook EB. Chromosome abnormalities: prevalence, risks and recurrence. In *Prenatal diagnosis and screening.* (DJH Brock, CH Rodeck, MA Ferguson-Smith, eds). Churchill Livingstone, Edimburgh, pp351-392.
- Jacobs P et al. Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet.* 1997 61:471-83.
- Ritchie RJ et al. large polymorphic repeat in the pericentromeric region of human chromosome 15q contains three partial gene duplications. *Hum Mol Genet.* 1998 7:1253-60.
- Shaffer LG et al. A clinical and molecular study of mosaicism for trisomy 17. *Hum Genet.* 1996 97:69-72.
- Trimborn M et al. Mutations in Microcephalin Cause Aberrant Regulation of Chromosome Condensation *Am. J. Hum. Genet.* 75:261-266, 2004

### 11.4 CGH/SNP Array

- Agathokleous M, Chaveeva P, Poon LC, Kosinski P, Nicolaidis KH. Meta-analysis of second-trimester markers for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41: 247-261.
- Baptista J, Mercer C, Prigmore E, et al. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am J Hum Genet.* 2008; 82: 927-936
- Bui TH, Vetro A, Zuffardi O, Shaffer LG. Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post-array CGH era? *Prenat Diagn.* 2011; 31: 235-243
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011; 43: 838-846
- Coppinger J, Alliman S, Lamb AN, et al. Whole genome microarray analysis in prenatal specimens identifies clinically significant chromosome alterations without increase in results of unclear significance compared to targeted microarray. *Prenat Diagn.* 2009; 29: 1156-1166
- Dondorp W, Sikkema-Raddatz B, de Die-Smulders C, de Wert G. Arrays in postnatal and prenatal diagnosis: An exploration of the ethics of consent. *Hum Mutat.* 2012;33: 916-922
- Faas BH, van der Burgt I, Kooper AJ, et al. Identification of clinically significant, submicroscopic chromosome alterations and UPD in fetuses with ultrasound anomalies using genome-wide 250k SNP array analysis. *J Med Genet.* 2010; 47: 586-594
- De Gregori M, Ciccone R, Magini P, et al. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet.* 2007; 44: 750-762.
- De Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat.* 2012; 33: 930-940
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet.* 2005; 42: 8-16



## Società Italiana di Genetica Umana

### *Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU*

- Henrichsen CN, Chaignat E, Reymond A. Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet.* 2009; 8: R1-8
- Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy A, et al. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011; 37: 6-14
- Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, et al. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat.* 2009;30: 283-292
- Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, et al. Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One.* 2007; 28:e327
- Maya I, Davidov B, Gershovitz L, et al. Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in a prenatal setting. *Prenat Diagn.* 2010; 30: 1131-1137
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86: 749-764
- Miny Peter, et al. Chromosomal Microarrays in Prenatal Diagnosis: Time for a Change of Policy? *Microarrays* 2013, 2, 304-317; doi:10.3390/microarrays2040304
- Newman WG, Hamilton S, Ayres J, et al. Array comparative genomic hybridization for diagnosis of developmental delay: an exploratory cost-consequences analysis. *Clin Genet.* 2007; 71:254-259
- Novelli A, Grati FR, Ballarati L, et al. Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;39:384-388
- Nowakowska BA, de Leeuw N, Ruivenkamp CA, et al. Parental insertional balanced translocations are an important cause of apparently de novo CNVs in patients with developmental anomalies. *Eur J Hum Genet.* 2012;20:166-170
- Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, et al. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med.* 2009; 11: 139-146
- Shaffer LG, Rosenfeld JA. Microarray-based prenatal diagnosis for the identification of fetal chromosome abnormalities. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013; 13:601-611
- Shaffer LG, Coppinger J, Alliman S, et al. Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn.* 2008; 28: 789-795
- Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 78-88Sharp AJ. Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease. *Hum Mutat.* 2009; 30: 135-144
- Sund KL, Zimmerman SL, Thomas C, et al. Regions of homozygosity identified by SNP microarray analysis aid in the diagnosis of autosomal recessive disease and incidentally detect parental blood relationships. *Genet Med.* 2013;15:70-78
- Tsuchiya KD, Opheim K, Hannibal M, et al. Unexpected complexity of supernumerary marker chromosomes revealed by microarray comparative genomic hybridization. *Mol Cytogenet.* 2008; 1: 7
- Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, et al. Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat.* 2012; 33: 906-915
- Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15: 1105-1114
- Vetro A, Bouman K, Hastings R, et al. The introduction of arrays in prenatal diagnosis: a special challenge. *Hum Mutat.* 2012; 33:923-929



# Società Italiana di Genetica Umana

## *Gruppo di Lavoro in Citogenetica SIGU*

### **11.5 Generale**

- Claustres M, Kožich V, Dequeker E, et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet.* 2013; Aug 14.