



Il sequenziamento del DNA di nuova generazione: indicazioni per l'impiego clinico

A cura della commissione SIGU-NGS

Alessandra Ferlini (GdL Genetica Molecolare)

Massimo Gennarelli (GdL Farmacogenetica)

Maurizio Genuardi (GdL Genetica Oncologica)

Paola Grammatico (GdL Genetica Forense)

Marco Seri (Membro Consiglio Direttivo SIGU)

Francesca Torricelli (GdL SIGU-Sanità)

Marcella Zollino (GdL Genetica Clinica)

Orsetta Zuffardi (GdL Citogenetica)

e con il contributo di

Vincenzo Nigro (TIGEM, Napoli) e Marco Tartaglia (Ospedale Bambin Gesù, Roma)

Contenuti

1. <i>Introduzione</i>	<i>pag. 03</i>
2. <i>Definizioni delle varianti di sequenza del DNA</i>	<i>pag. 04</i>
3. <i>Tipologie di test NGS</i>	<i>pag. 04</i>
4. <i>Comparazione tra Targeted Resequencing e Targeted Data Analysis</i>	<i>pag. 05</i>
5. <i>Raccomandazioni operative per i test NGS</i>	<i>pag. 06</i>
6. <i>Peculiarità della consulenza genetica nei test NGS</i>	<i>pag. 07</i>
7. <i>Contenuti specifici della consulenza genetica per test NGS</i>	<i>pag. 09</i>
8. <i>Figure professionali coinvolte nella consulenza per test NGS</i>	<i>pag. 10</i>
9. <i>Test somatici e consulenza genetica</i>	<i>pag. 10</i>
10. <i>Comunicazione dei risultati (consulenza post-test)</i>	<i>pag. 11</i>
11. <i>Analisi dei dati NGS e requisiti di qualità</i>	<i>pag. 12</i>
12. <i>Conservazione dei dati NGS</i>	<i>pag. 13</i>
13. <i>Bibliografia</i>	<i>pag. 16</i>

Allegati

1. <i>Indicazioni operative per la consulenza genetica associata a test NGS</i>	<i>pag. 18</i>
2. <i>Informativa al consenso. Test genetico: “sequenziamento dell’esoma”</i>	<i>pag. 20</i>
3. <i>Consenso Informato per Analisi di “sequenziamento dell’esoma”</i>	<i>pag. 24</i>
4. <i>Foglio Informativo per l’analisi di regioni selezionate</i>	<i>pag. 27</i>
5. <i>Consenso Informato per Analisi di regioni selezionate</i>	<i>pag. 29</i>
6. <i>Schema risposta indagine NGS</i>	<i>pag. 31</i>

1. Introduzione.

Grazie alle nuove tecnologie di analisi genomica oggi è possibile ottenere un'enorme quantità di informazioni sul patrimonio genetico individuale. Questo comporta notevoli vantaggi sia sul piano della ricerca, rendendo più facile l'individuazione di nuovi geni responsabili di tratti fenotipici, sia sul piano clinico, aumentando considerevolmente le potenzialità dei test genetici di raggiungere la diagnosi causale di malattia. In particolare, con i test di nuova generazione è possibile analizzare l'intero genoma/esoma anziché limitare l'indagine ai geni più frequentemente mutati nella patologia in esame.

Tuttavia negli anni il *next generation sequencing (NGS)*, che era stato accolto con altissime aspettative anche diagnostiche, ha mostrato alcuni limiti sia interpretativi sia tecnici. In un lavoro su 250 soggetti con differenti patologie (prevalentemente neurologiche) a base genetica, la *detection rate* dell'*exome sequencing* applicato in un setting diagnostico è stata del 25% (Yang et al., 2013), ridimensionata rispetto alle più ottimistiche stime iniziali, ma comunque più elevata rispetto a quella delle metodiche tradizionali. Questo dato è stato recentemente confermato da due ulteriori lavori (Lee et al., 2014; Yang et al., 2014). Tale *rate* può inoltre variare in base al tipo di patologia in esame ed al disegno dell'esperimento; ad esempio, è risultata del 52% in uno screening di 164 geni associati a patologie oculari e solo del 16% per patologie mitocondriali causate da geni nucleari (Neveling et al., 2013).

L'esperienza con l'analisi dell'intero esoma o anche semplicemente di pannelli contenenti più geni-malattia ha dimostrato come sia difficile interpretare un numero elevato di varianti non riportate nei database genomici e che la complessità dell'interpretazione è molto più elevata che con l'analisi di array genomici, che pure per molti anni è stata oggetto di accesi dibattiti. Tra le questioni emerse dalle analisi di NGS vi è l'identificazione di variazioni di sequenza a carico di geni implicati in patologie non correlate con il quadro clinico che ha suggerito l'accertamento. Tale problematica, già insita nell'applicazione dell'analisi SNP-array o CGH-array (Adams et al. 2009; Pichert et al., 2011) si è complicata per il maggior potere risolutivo dell'NGS e per l'attuale scarsa conoscenza sulla ricaduta fenotipica della maggior parte delle varianti genetiche.

2. Definizioni delle varianti di sequenza del DNA.

Le varianti di sequenza osservate con analisi NGS possono sollevare diversi problemi, sia nell'ambito della gestione clinica del paziente, sia nella strutturazione della consulenza genetica.

In generale si possono riconoscere tre categorie principali di varianti:

a) **Varianti causative.** Sono quelle varianti alle quali è possibile attribuire con certezza un ruolo patogenetico. Si tratta di varianti note in geni già associati a fenotipo-malattia, oppure varianti non descritte che, ad esempio, determinano una chiara perdita di funzione di un gene noto che si associa a malattia con meccanismo di aploinsufficienza.

b) **Varianti responsabili di fenotipi non collegati al quesito clinico.** La definizione più usata per designare questa classe di varianti è "risultati incidentali" (*incidental findings; IF*). In realtà il loro riscontro non può essere considerato inatteso, poiché è ben noto che ogni individuo ha una discreta probabilità di essere portatore di un numero non trascurabile di varianti genetiche associate a potenziali conseguenze cliniche con meccanismo sia mendeliano che non. Diversi altri termini sono stati proposti, tra cui "risultati inattesi" o "risultati secondari" (Christenhusz et al. 2013, Presidential Commission for the study of Bioethical Issues). Poiché la scelta della definizione più corretta esula dallo scopo di questo documento, sarà adottato il termine "Risultati Incidentali", e l'acronimo della versione inglese IF, ampiamente diffuso, che allo stato attuale risulta essere quello maggiormente usato nella letteratura scientifica.

c) **Varianti di sequenza con effetti funzionali e clinici non definiti** (*varianti di significato incerto; variants of uncertain significance, VUS*). Tali varianti possono essere identificate in geni noti già implicati nel fenotipo per cui è stata richiesta l'indagine, oppure in altre regioni geniche non correlate ad esso. Il primo sottotipo di queste varianti (localizzate in geni responsabili della condizione clinica per cui è stato richiesto l'esame) è comune alle tecniche di sequenziamento tradizionale.

3. Tipologie di test NGS.

I test genetici basati sull'NGS possono essere suddivisi in base all'ampiezza della porzione di genoma analizzata.

Le principali categorie sono:

- Sequenziamento dell'intero esoma (*Whole exome sequencing; WES*)
- Sequenziamento dell'intero genoma (*Whole genome sequencing; WGS*)
- Sequenziamento mirato di pannelli di geni (*Targeted NGS testing o Panel NGS testing*)

Per la scelta dell'approccio si tiene conto di diversi fattori:

- a) **Costi:** fin dall'introduzione dell'NGS nella pratica clinica, l'uso di pannelli è stato privilegiato per motivazioni economiche. Il divario dei costi si è progressivamente assottigliato, tanto che oggi questo aspetto non rappresenta, nella maggior parte dei casi, un elemento di scelta primario. Il sequenziamento di un esoma può essere infatti meno dispendioso del sequenziamento di un pannello di geni e, analogamente, il costo di un intero genoma si sta avvicinando a quello dell'esoma.
- b) **Finalità:** in generale, le tecniche NGS trovano applicazione nel caso di malattie ad alta eterogeneità genetica oppure per patologie genetiche su base mendeliana (o sospette tali) con gene non ancora

identificato. Le malattie a causa genetica nota possono essere indagate sia mediante pannelli disegnati *ad hoc*, sia mediante WES (o WGS). In questo secondo caso i dati prodotti sono ridondanti rispetto all'obiettivo del test, ma è possibile limitarsi ad esaminare solamente le sequenze di interesse per il quesito clinico. WES e WGS sono utilizzati anche per individuare la mutazione o le mutazioni responsabili di una malattia che, per caratteristiche fenotipiche e per frequenza, è ritenuta essere una patologia rara su base mendeliana, ma di cui non è conosciuto il gene responsabile. Questa finalità d'uso s'intreccia con quella di ricerca, che mira a individuare nuovi geni implicati in patologie mendeliane, i cui risultati possono essere poi trasferiti sul piano clinico e diagnostico. L'applicazione clinica diretta è sempre più frequente, soprattutto per patologie congenite o ad esordio nell'infanzia (*clinical WES o WGS*); l'identificazione della base genetica può infatti essere utile ai fini riproduttivi (ad es., per una successiva diagnosi prenatale), ed eventualmente per scopi terapeutici (ad es., se la mutazione o le mutazioni individuate determinassero un difetto metabolico, correggibile con modificazioni della dieta o terapia sostitutiva).

- c) Sensibilità: questa è in funzione soprattutto del *coverage* delle sequenze indagate, ovvero del numero di "letture" (*reads*) dei singoli tratti di DNA esaminati e del grado di sovrapposizione tra queste. Quanto più elevato è il numero di *reads* di una specifica regione, tanto maggiore sarà la sensibilità per quel particolare tratto di DNA. In linea di massima, nell'analisi con pannelli, più piccola è la porzione di genoma analizzata, maggiore sarà la copertura e quindi la sensibilità. Questa è la ragione per cui, quando si sospetta che la patologia in studio sia causata da un'alterazione genomica a mosaico, l'analisi di NGS su pannelli di geni noti ha una sensibilità maggiore rispetto all'analisi WES (vedi sotto).
- d) Probabilità di ottenere Risultati Incidental e Varianti di Significato Incerto: dipendono dall'ampiezza della porzione di genoma analizzata e interrogata. L'analisi basata su pannelli è difficilmente associata a IF, poiché le sequenze analizzate sono per definizione implicate nella condizione clinica presentata dal probando. In generale, quanto più è ampia la sequenza analizzata, tanto maggiore è il numero di IF e VUS. A differenza dei primi, le seconde sono riscontrate anche quando si effettuano analisi mirate di pannelli di geni candidati.
- e) Archiviazione dei dati: quanto più ampia la porzione di genoma analizzata, tanto maggiore è il volume di dati prodotti. E' necessario quindi che siano disponibili o accessibili adeguate piattaforme per l'archiviazione, soprattutto per analisi che producono una grande quantità di dati, come WES e, ancor più, WGS. Questo aspetto è trattato in dettaglio in seguito.

4. Comparazione tra Targeted Resequencing e Targeted Data Analysis.

Al momento attuale non viene considerata in questo contesto l'analisi WGS in quanto ancora non praticabile a livello diagnostico per il costo e la difficoltà interpretativa.

L'analisi di patologie ad elevata eterogeneità genetica ma per le quali la maggior parte dei geni causativi sia nota può essere effettuata mediante l'utilizzo di specifici pannelli.

I pannelli possono essere:

- **Pannelli “pre-sequenziamento” (Targeted Resequencing):** permettono l’arricchimento di specifiche regioni genomiche prima del sequenziamento, così da analizzare un certo numero di pazienti in contemporanea ed abbattere i costi.
- **Pannelli “in silico” (Targeted Data Analysis):** si effettua un WES e successivamente si vanno ad analizzare solo quei geni già noti per essere associati alla patologia in esame. In questo caso è possibile analizzare solo pochi campioni per corsa, a seconda del tipo di strumentazione di cui si dispone, ed i costi sono maggiori.

Il vantaggio dei primi è chiaramente quello di permettere di mantenere costi più bassi ed utilizzare apparecchiature (*desktop sequencers*) meno dispendiose. Una volta disegnato, il pannello va poi testato per verificarne la resa sperimentale in termini di copertura ed accuratezza del dato ottenuto. Questo approccio, come già riportato, ha inoltre il vantaggio di garantire una copertura elevata nelle regioni di interesse implementando così la probabilità di rilevare eventuali mosaicismi. Lo svantaggio di questa opzione consiste nella necessità di aggiornamento continuo laddove nuovi geni vengono progressivamente associati ad una patologia di interesse. I pazienti che rimangono privi di diagnosi molecolare potranno successivamente essere rianalizzati mediante analisi dell’esoma/genoma. Al momento questo tipo di approccio è più appropriato nell’analisi di quelle patologie per le quali mutazioni in geni già noti coprono la maggior parte dei casi (es., Telangectasia Emorragica Ereditaria, associata a mutazioni dei geni *ENG*, *ALK1* e *SMAD4* nell’80%-87% dei pazienti).

Il pannello *in silico* viceversa ha costi maggiori, poiché il WES che viene effettuato preliminarmente non prevede la corsa simultanea di numeri alti di pazienti. Per ottenere un *coverage* sufficiente mediante WES possono essere analizzati su desktop sequencers (es. MiSeq) solo uno o due pazienti per volta. Il pannello *in silico* richiede inoltre una buona pipeline di analisi che permetta, di volta in volta, di analizzare subset diversi di geni. Il vantaggio ovvio di questo approccio è che l’aggiornamento non richiede alcuna modifica al disegno ed alla piattaforma di arricchimento e permette, senza ulteriori costi, di analizzare “nuovi” geni malattia in pazienti già sequenziati. Inoltre, nel momento in cui una rivalutazione clinica del paziente facesse emergere un sospetto differente da quello iniziale, può essere sufficiente cambiare il “target” dell’analisi.

Per condizioni geneticamente eterogenee le cui basi genetiche siano ancora in larga parte sconosciute, l’uso di pannelli *in silico* può essere preferibile, in quanto permette di estendere l’analisi al resto dell’esoma in un contesto di ricerca, che può anche avere importanti ricadute cliniche; infatti ciò consente potenzialmente di riconoscere il coinvolgimento di geni malattia già noti in fenotipi “atipici” o di identificare nuovi geni malattia.

L’analisi mediante pannelli, sia *in silico* che non, deve comunque prevedere dei tempi ben definiti e la consegna di un referto scritto.

E’ importante pianificare la rivalutazione nel tempo dei pazienti risultati negativi ad un’analisi NGS per l’aggiornamento dei dati clinici e genetici. Questo richiede un’organizzazione complessa che prevede, tra l’altro, un lavoro di archiviazione dei campioni e di rianalisi dei dati. Non sono ancora disponibili linee guida al riguardo di questo argomento (Biesecker and Green, 2014).

5. Raccomandazioni operative per i test NGS.

1) La caratterizzazione fenotipica è fondamentale per la scelta della tecnica di diagnosi molecolare (sequenziamento Sanger, Targeted resequencing, WES) e per la successiva analisi delle varianti identificate.

2) Nel caso di fenotipi specifici, caratterizzati da bassa eterogeneità genetica e coinvolgenti geni di piccole dimensioni, può essere opportuno ricorrere ad analisi con metodiche molecolari convenzionali (ad esempio: sequenziamento Sanger, PCR mirata per mutazioni dinamiche). Anche la lunghezza del gene può influenzare la scelta della tecnica analitica da utilizzare. In generale, è auspicabile che l'analisi molecolare di geni molto grandi (numerosi esoni; per esempio NF1, CFTR, etc.) sia trasferita su piattaforme NGS per l'abbattimento dei costi e dei tempi di refertazione.

3) Nel caso di condizioni con elevata eterogeneità genetica nelle quali mutazioni in un numero ridotto di geni sono responsabili della maggioranza dei casi è auspicabile l'uso di un targeted resequencing (pannelli di geni noti). Tale strategia è indicata anche in caso di sospetto mosaicismo.

4) Nel caso di condizioni con eterogeneità genetica particolarmente marcata dove è coinvolto un numero sempre crescente di geni, ognuno dei quali è responsabile di una bassa percentuale di casi (per esempio paraparesi spastiche ereditarie, retiniti pigmentose, etc.) è indicata l'esecuzione di un WES con un filtro limitato all'analisi di un pannello di geni noti (pannello "in silico"). In caso di negatività dell'analisi di un pannello di geni, i dati esomici restano quindi a disposizione per le eventuali indagini successive indirizzate alla ricerca di nuovi geni candidati o per l'analisi di geni causativi identificati in un secondo tempo.

5) Infine in tutti i casi in cui non può essere formulata un'ipotesi diagnostica su base clinica è preferibile l'analisi dell'intero esoma per l'individuazione del difetto genetico responsabile, che può riguardare mutazioni/geni già noti (ambito diagnostico) o nuovi geni candidati (ambito di ricerca) che necessitano di ulteriori conferme. E' auspicabile che tali indagini siano eseguite in centri con comprovata esperienza nell'ambito dell'analisi di dati esomici per garantire la più alta probabilità di successo, che al momento, secondo la letteratura medica, si attesta attorno al 25% (Yang et al, 2013; Lee et al, 2014; Yang et al, 2014).

NB: E' utile confermare sempre la mutazione identificata tramite metodica NGS con sequenziamento Sanger e stabilirne la segregazione nella famiglia quando possibile.

6. Peculiarità della consulenza genetica nei test NGS.

L'approccio generale e lo svolgimento della consulenza genetica per i test NGS non differiscono sostanzialmente rispetto ai test eseguiti con metodiche tradizionali. Anche in questo caso devono essere previste una fase pre- e una post-test (riferimento linee guida del garante), ed è necessario provvedere alla sottoscrizione di un apposito consenso informato da parte del probando.

Rispetto alle analisi molecolari tradizionali, le tecnologie NGS presentano notevoli differenze riguardo al contenuto informativo, soprattutto in caso di analisi non limitate a pannelli di geni candidati. Di seguito sono illustrate alcune caratteristiche e problematiche associate ai test NGS. Nell'**allegato 1** è illustrato uno schema di indicazioni operative

Le differenze rispetto ai test tradizionali riguardano, in particolare, gli IF (caratteristica intrinseca agli esami NGS non mirati a singole patologie), il grande numero potenziale di VUS, eventuali informazioni socialmente rilevanti su legami biologici di parentela, e la possibilità di effettuare nel tempo più interrogazioni geniche, relative anche a problematiche non attinenti la motivazione clinica originale, sui dati archiviati.

Per i pannelli patologia-specifici, l'interrogazione dei dati può essere effettuata in più stadi, iniziando dai geni più frequentemente coinvolti nella condizione in esame; quindi, se questi risultassero negativi, si procede ad indagare geni meno frequentemente coinvolti e/o per i quali siano disponibili evidenze meno chiare di nesso causale con il fenotipo.

Nel caso di esami WES è possibile scegliere diverse strategie analitiche. Un'opzione è quella di limitare l'analisi dei dati (e, di conseguenza, la refertazione) ai tratti di sequenza corrispondenti a geni noti come responsabili della condizione clinica per cui è stato richiesto il test, procedendo poi eventualmente per gradi, per esempio analizzando geni candidati in base alla loro funzione/espressione/segregazione familiare, mai precedentemente associati alla patologia in esame. Questo approccio sconfina nella ricerca perché comunque per validare la causalità del gene mutato occorrono ulteriori indagini e soprattutto la dimostrazione del suo coinvolgimento in almeno un secondo caso con analogo fenotipo (MacArthur et al. 2014).

In alternativa è possibile fornire informazioni sui risultati riguardanti le parti di genoma non associate al quesito clinico. Anche in questo caso sono state proposte e adottate diverse strategie, che tengono conto delle implicazioni cliniche delle varianti individuate e della loro utilità clinica, in particolare di:

- a) associazione con un determinato fenotipo mediante meccanismo mendeliano;
- b) livello di conoscenza dei rischi associati alla presenza di varianti genetiche;
- c) disponibilità di mezzi di prevenzione o terapeutici;
- d) importanza ai fini riproduttivi (es, per varianti di riscontro casuale associate a patologie recessive, e/o per possibile utilizzo in diagnosi prenatale).

L'American College of Medical Genetics (ACMG) raccomanda di estendere, in tutti i casi, l'analisi a un set di 57 geni responsabili di 24 patologie per le quali si ravvisa un'utilità clinica certa, in quanto associate alla disponibilità di terapie e mezzi di prevenzione efficaci (Green et al. 2013). Questa posizione è stata oggetto di intenso dibattito, e non è condivisa da diversi esperti, soprattutto a livello europeo (van El et al., 2013). Inoltre, alcune informazioni derivate dai test NGS genome-wide possono riguardare patologie per le quali, non esistendo trattamenti validi (es. condizioni neurodegenerative), la loro comunicazione è di dubbia utilità, se non addirittura potenzialmente dannosa. Infine, escludendo rare eccezioni, non sono clinicamente utili, ad oggi, le informazioni relative a varianti polimorfiche di suscettibilità a malattie complesse multifattoriali. Un'importante eccezione è rappresentata dalle informazioni di interesse farmacogenetico, che riguardano varianti polimorfiche predittive dell'efficacia terapeutica o di effetti avversi di specifici farmaci. In questo caso, le informazioni potrebbero essere utili dal punto di vista clinico qualora risultasse necessaria la terapia con uno specifico farmaco. Gli enti regolatori FDA e EMA hanno

definito una lista di test genetici, indicati nei foglietti illustrativi dei farmaci, che si differenziano in quattro livelli a seconda della loro utilità clinica: a) obbligatori, b) consigliati, c) di qualche utilità o d) meramente informativi (Whirl-Carrillo et al. 2012).

7. Contenuti specifici della consulenza genetica per test NGS.

Tenendo conto delle alternative diagnostiche sopra illustrate, **l'atteggiamento corretto consiste nel fornire adeguate informazioni preliminari ai consultandi in modo che questi possano operare una scelta autonoma sul livello di analisi da effettuare e sulla relativa tempistica.** Il problema principale è rappresentato dalla quantità di informazioni da trasmettere. Ovviamente non è possibile fornire informazioni specifiche su tutte le patologie, e neanche su gruppi di patologie. Può essere sufficiente menzionare e discutere le implicazioni di esempi rappresentativi di alcune classi di condizioni per le quali è più probabile riscontrare IF.

Una distinzione importante va comunque fatta tra i diversi tipi di IF in base alla loro utilità e validità clinica (Tab. 1) (Berg et al., 2011) come già precedentemente discusso.

Tabella 1. Classificazione degli IF in rapporto all'utilità e alla validità clinica.

Utilità clinica	Sì	No	No
Validità clinica	Sì	Sì	No
Comunicazione al paziente	Sì (se dato consenso)	No (sì su consenso specifico dopo adeguata consulenza)	No
Esempi di geni e condizioni cliniche	- <i>BRCA1/BRCA1</i> (carcinoma mammario/ovarico ereditario) - <i>MSH2/MLH1/MSH6</i> (sindrome di Lynch) - <i>KCNQ1, KCNH2, SCN5A</i> (sindrome del QT lungo) - <i>OTC</i> (deficit di ornitina transcarbamilasi) -Condizione di eterozigosi per patologie autosomiche recessive relativamente frequenti - <i>rs4149056</i> genotipo a bassa attività (CC) → rischio elevato di miopatia indotta da statine (dose inferiore o farmaco alternativo) - <i>CYP2D6 poor metabolizers</i> (*4/*4) → evitare uso di codeina	- <i>APOE</i> (malattia di Alzheimer) -Otosclerosi -Deficit alfa1-antitripsina	-VUS in regioni non comprese nei target specifici del test -Varianti polimorfiche di suscettibilità associate a rischi di patologia <2X rispetto alla popolazione generale

Riassumendo, è opportuno che l'informazione e la comunicazione dei Risultati Incidentali, sia nella fase pre- sia in quella post-test, avvenga tenendo conto dell'esistenza di almeno 3 classi principali di IF, possibilmente utilizzando esempi pratici, come quelli illustrati nella Tabella 1:

- 1) *IF clinicamente utili*
- 2) *IF clinicamente validi ma non utili*
- 3) *IF clinicamente non utili e non validi.*

Il consultando dovrà poi essere supportato nella decisione autonoma di ricevere o meno informazioni per ciascuna categoria. Alcuni potranno scegliere di non avere informazioni su nessun tipo di IF, altri potranno accettare IF relativi a patologie prevenibili o curabili e/o a stato di portatore sano, altri ancora potranno desiderare di avere un riscontro anche di dati riguardanti patologie attualmente incurabili per fini di pianificazione familiare. Gli IF appartenenti alla classe 3 non dovrebbero invece essere oggetto di comunicazione né di refertazione; di questo va comunque data comunicazione esplicita nell'incontro informativo pre-test.

Gli **allegati 2-5** contengono modelli di fogli informativi e consensi informati per i diversi test genetici basati su NGS. L'**allegato 6** propone uno schema di risposta dell'indagine NGS.

8. Figure professionali coinvolte nella consulenza per test NGS.

Ancor più di quanto dovrebbe avvenire per i test genetici tradizionali, i test basati su NGS richiedono uno stretto contatto tra **genetista clinico e di laboratorio**. Questa interazione è essenziale al fine di definire l'ambito dell'indagine e le sue finalità, per mantenere il fuoco sull'obiettivo clinico, e per riconoscere di volta in volta ciò che è necessario approfondire (IF, VUS).

Le "modalità migliori" di approfondimento variano da caso a caso ed il laboratorio, in funzione delle tecnologie disponibili, deve possedere le competenze, incluse quelle bioinformatiche, necessarie per la caratterizzazione delle varianti di potenziale rilevanza clinica identificate, in particolare attraverso l'uso dei database e di strumenti informatici aggiornati.

L'interlocuzione deve prevedere lo scambio reciproco di informazioni cliniche e di laboratorio tenendo sempre presenti gli obiettivi sopra delineati. Considerata la complessità del procedimento interpretativo delle varianti genomiche e la grande varietà di scenari possibili, è fondamentale il **ruolo del genetista clinico** oltre che nella fase pre-test, anche nella fase post-refertazione come raccordo con gli altri specialisti che hanno in carico il paziente per la condizione clinica che ha motivato il test NGS, oppure che potranno essere coinvolti nella fase post-test, in rapporto alle varianti individuate ed alle patologie a queste associate.

La comunicazione di IF può riguardare condizioni del tutto inattese e sconosciute (o poco conosciute) dai pazienti, soprattutto se la storia familiare è negativa. **E' quindi importante offrire inoltre ai pazienti la possibilità di usufruire di un percorso psicologico** per far fronte a situazioni così complesse per impatto emotivo e socio-familiare.

9. Test somatici e consulenza genetica

Le tecnologie NGS possono essere applicate in diversi ambiti della medicina, per finalità diverse dall'identificazione di varianti genetiche costituzionali responsabili di patologie. In particolare, l'uso di

pannelli NGS trova impiego crescente in campo oncologico, per l'individuazione di potenziali bersagli molecolari di terapia su campioni istologici di neoplasie. Alcune varianti in geni oggetto di indagine nei pannelli usati per test somatici possono essere in realtà costituzionali, ed essere quindi associate ad elevati rischi di neoplasie nello stesso paziente su cui è stata effettuata l'indagine o nei suoi familiari (es., varianti di *TP53*, *BRCA1* e *BRCA2*). Ai fini di una corretta gestione del paziente e dei suoi familiari, è essenziale che informazioni di questo tipo non vengano trascurate. **La possibilità di riscontro di varianti associate a predisposizione a tumori deve essere discussa in ambito di una consulenza genetica pre-test quando sono analizzati su campioni tumorali pannelli multigenici che includono geni noti per essere responsabili di malattie tumorali ereditarie, ed è necessario ottenere specifico consenso informato dal paziente.**

10. Comunicazione dei risultati (consulenza post-test).

In linea di massima, la comunicazione dei risultati inerenti il motivo della richiesta del test segue lo stesso percorso della consulenza per i test tradizionali; tuttavia, data l'elevata probabilità di individuare VUS nei geni bersaglio dell'indagine, è appropriato proporre ulteriori accertamenti (es., studio di segregazione, con coinvolgimento di altri familiari) al fine di migliorare la classificazione clinica delle varianti osservate, o almeno di quelle che, a giudizio del genetista di laboratorio e clinico, hanno maggiori probabilità di essere patogenetiche. Questo percorso necessita, oltre che del consenso dei familiari interessati, di risorse che esulano apparentemente dal test eseguito. In realtà, poiché la definizione della patogenicità delle VUS ha ricadute cliniche importanti per i probandi e per le loro famiglie, gli ulteriori accertamenti ritenuti utili a questo scopo dovrebbero essere riconosciuti come parte integrante del percorso del test NGS.

Al contrario, la comunicazione degli IF è peculiare dei test NGS. Questa può essere effettuata contestualmente a quella dei risultati specifici per il quadro clinico, oppure, come suggerito da alcuni esperti, in una successiva seduta separata (Berg et al., 2011). **La comunicazione degli IF deve ovviamente tener conto delle indicazioni ottenute in sede di consulenza pre-test e fornite dal paziente nel consenso. Tuttavia, vi possono essere situazioni in cui il diritto all'autonomia decisionale del paziente non coincida con i principi della deontologia medica.** Questo può avvenire in particolare in caso di riscontro di IF che svelano malattie o rischi di sviluppare malattie per le quali è necessario mettere in atto rapidamente misure terapeutiche o preventive. Anche se questa valutazione può in alcuni casi apparire in antitesi con i desideri espressi dal probando, la contraddizione si può risolvere considerando che il contenuto del consenso e dell'informazione fornita è comunque generico. Analoghe considerazioni vanno fatte quando il rischio riguarda i parenti del probando, o probandi sotto tutela, in relazione al loro diritto di essere informati. In particolare, per i minori si pone il dilemma di stabilire il momento più opportuno per la comunicazione di risultati che prevedono un aumento di rischio di patologie ad esordio in età adulta. Al fine di supportare il medico nelle decisioni da prendere in situazioni di questo tipo, alcuni centri hanno istituito un Comitato Consultivo indipendente, che valuta il caso e formula un proprio parere (Rigter et al., 2013), anche se la responsabilità finale spetta comunque al medico che ha seguito il paziente.

Un'altra caratteristica dei test NGS allo stato attuale è rappresentata dalla natura provvisoria dei risultati, legata all'evoluzione delle conoscenze scientifiche. E' possibile che nel tempo la rivalutazione dei dati di un test NGS che inizialmente non ha dato luogo ad informazioni di rilievo clinico mostri invece la presenza di varianti patogenetiche prima non identificate perché la regione genomica coinvolta non era ancora implicata in patologie, per cui non era stata considerata per l'analisi. Questo scenario si associa a diverse problematiche, a partire dalla conservazione dei dati. Poi, chi deve decidere quando e come rianalizzare i dati NGS? Il laboratorio, il medico curante o il paziente stesso? E' opportuno che la

problematica venga discussa nel corso della consulenza genetica e che venga richiesto al paziente un consenso specifico ad essere ricontattato successivamente. Infine si deve considerare che la conservazione e soprattutto l'analisi successiva dei dati richiedono risorse a lungo termine che devono essere garantite nel caso in cui questa possibilità sia offerta. Un'eventuale opzione potrebbe essere quella di consegnare al paziente i dati NGS, lasciando a questi la possibilità di richiedere una eventuale ulteriore consulenza a distanza sul dato ottenuto anche presso un centro diverso da quello che ha prodotto il dato; è necessario però che la competenza dei centri che effettuano analisi dei dati NGS sia assicurata attraverso un processo di accreditamento e valutazione della qualità.

11. Analisi dei dati NGS e requisiti di qualità.

L'analisi NGS ha spostato in buona parte il carico di lavoro dal bancone al cosiddetto "dry laboratory", cioè alla parte di analisi computazionale e di interpretazione dei dati di sequenziamento alla luce del fenotipo. Le difficoltà di interpretazione della mole di dati prodotta da questa tecnologia hanno messo in luce alcune problematiche:

- come già detto, un grosso sforzo va fatto nella caratterizzazione del fenotipo del paziente che si intende analizzare e nella raccolta della sua storia familiare e dei campioni biologici di tutti quei membri della famiglia che possono agevolare lo studio della segregazione delle varianti geniche identificate;
- è importante che si utilizzi una terminologia quanto più possibile standardizzata ed in questo senso è da incoraggiare l'uso di sistemi come HPO (*Human Phenotype Ontology*; www.human-phenotype-ontology.org/) che permettono di condividere le informazioni in modo preciso e senza libertà di interpretazione. Questo a sua volta è essenziale per un corretto utilizzo dei diversi database clinici, alcuni dei quali permettono di condividere anche a livello internazionale le informazioni su genotipo e fenotipo dei pazienti, in modo del tutto anonimizzato;
- sarebbe auspicabile standardizzare il più possibile tra i diversi laboratori parametri e "requisiti minimi" dell'analisi, sforzandosi di renderli chiari anche in fase di consenso informato/refertazione, onde evitare che un paziente possa ricevere risultati diversi e contrastanti in merito ad una stessa indagine effettuata in due laboratori diversi. Il referto, ad esempio, dovrebbe essere contenuto al massimo in una pagina e chiaro, con aggiunta degli allegati "tecnici".

Se si analizza un subset di geni (pannello "in silico") legati ad uno specifico sospetto clinico, questo dovrebbe essere possibilmente riportato in un allegato al referto, idealmente includendo la copertura media per ciascun gene.

E' possibile che per alcune regioni, anche esoniche, la copertura ottenuta sia bassa nonostante la presenza di sufficienti *probes* nel kit di arricchimento/di uniformità di copertura con ampliconi o di un numero sufficiente di *reads* complessive per l'esperimento. Questo può accadere, ad esempio, per la presenza di regioni ricche in GC e pone il problema di possibili falsi negativi dovuti a mancanza di copertura. E' possibile inoltre che in alcune regioni, ricche di sequenze ripetute, l'allineamento non sia perfettamente affidabile e durante l'analisi non si riesca a discriminare tra le chiamate reali ed i falsi positivi. Dovrebbe essere quindi specificato se i limiti di un pannello siano stati o meno integrati, utilizzando altre metodiche complementari (ad esempio il risequenziamento di singoli esoni mediante Sanger), per evitare la sottovalutazione di possibili falsi negativi (<http://www.ukneqas-molgen.org.uk/next-generation-sequencing>) (Matthijs, comunicazione all'ESHG Conference 2014).

E' importante specificare quali sono i limiti dei propri pannelli/esomi e delle proprie pipeline di analisi, determinati sperimentalmente in termini di identificazione di Indels, di CNVs e di mosaicismi. Occorre inoltre specificare al paziente ed al clinico inviante quali tipi di varianti del DNA non siano ben identificabili o addirittura non identificabili (per esempio ripetizioni trinucleotidiche, ecc.) (Biesecker and Green, 2014).

Allo stato attuale, i risultati "positivi" devono essere confermati mediante altra metodica (Sanger sequencing), considerando che essi incidono sul successivo management del paziente (Biesecker and Green, 2014; eurogentest EQA)

Una revisione manuale delle *reads* mediante specifici browser (es. IGV Browser, Broad Institute) è necessaria per verificare la qualità dell'allineamento e la copertura omogenea della regione in esame. Regioni con sequenze ripetute, inserzioni e delezioni, possono essere sottovalutate nell'analisi finale se non si considera questo step e si analizzano solamente i file contenenti le varianti chiamate (.vcf).

Potrebbe essere opportuno refertare quali regioni geniche/esoni siano stati considerati per l'annotazione e quale sistema è stato utilizzato per la chiamata delle varianti (allegato tecnico), considerando che differenti sistemi possono produrre *output* diversi (O'Rawe et al., 2013).

Infine è opportuno definire i parametri minimi di copertura. Per esempio se consideriamo un *coverage* 50X, è necessario specificare la % di target coperto a meno di 50X (solitamente intorno al 10-15%). In generale, sarebbe auspicabile che il *coverage* medio fosse almeno di 100X per WES. Questo grado di copertura è richiesto soprattutto per identificare mutazioni allo stato eterozigote, che possono essere soggette a fenomeni di amplificazione preferenziale di uno dei due alleli.

12. Conservazione dei dati NGS.

Si tratta di un problema ancora aperto, per la cui soluzione non è possibile rifarsi all'esperienza di altri paesi, fino a quando la nostra normativa prevedrà la conservazione per decenni dei dati genetici. Sarà pertanto importante portare le valutazioni oggetto di questo documento sui tavoli istituzionali in modo che possano essere modificati i termini di legge. In linea teorica la conservazione per un periodo lungo dei dati di un'analisi esomica potrebbe risultare utile al paziente che desidera venire a conoscenza, in un secondo momento, anche di informazioni genetiche che non erano rilevanti per l'originario quesito diagnostico. Tuttavia, considerati da una parte i costi elevati che si possono ipotizzare per l'immagazzinamento a lungo termine di una ingente mole di dati, e l'abbattimento dei costi del sequenziamento e il continuo sviluppo di tecnologie con maggior potere risolutivo dall'altra, è stato suggerito che la conservazione dei dati NGS potrebbe dimostrarsi inutile (Clarke comunicazione all'ESHG Conference 2014; Hastings et al., EJHG 2012; Gullapalli et al., Journal of Pathology Informatics 2012).

Ciò nonostante, almeno fintanto che sarà in effetto la normativa vigente, la discussione si deve per forza di cose concentrare sui tempi e le modalità di conservazione dei dati e sulle tipologie di file da conservare.

Per i tempi di conservazione occorre ragionare sul rapporto costi/benefici, sugli investimenti a disposizione dei vari centri per l'acquisizione di macchine potenti e per lo sviluppo di sistemi di qualità e sicurezza, tutto sulla base della normativa vigente. Eliminare i dati prima che tutte queste situazioni siano state chiarite e prima di aver definito un tempo minimo potrebbe esporre i centri che hanno prodotto il dato a dei contenziosi legali. Una soluzione potrebbe essere quella di decidere tempi di archiviazione diversi per esperimenti diversi, per esempio stabilendo un tempo di archiviazione fisso per milioni di basi sequenziate. La scelta di questa opzione è basata sulla considerazione che esperimenti connotati da minore complessità (pannelli, per esempio) sono anche caratterizzati da dimensioni inferiori. Esperimenti quali

l'esoma, cui è più probabile il ricorso in un tempo successivo all'esame diagnostico per quesiti relativi a VUS o IF, possiedono dimensioni maggiori. Ovvio è però che la conservazione di file di dimensioni modeste comporta disagi limitati, per cui l'opzione di parametrizzare la conservazione proporzionalmente alle megabasi probabilmente non risolve la problematica principale.

In tutti i casi, andrà redatto un piano, per capire in anticipo quali saranno le richieste di conservazione nell'arco di 2/3 anni. Una possibilità interessante potrebbe essere quella di istituire a livello di regione o di macroarea un centro unico di conservazione dati che abbatterebbe i costi di manutenzione e ne faciliterebbe la gestione aumentando la qualità e la sicurezza del sistema. Tali centri potrebbero poi essere collegati in rete tra loro in un database nazionale. Questa strategia avrebbe anche l'eventuale vantaggio di incrementare le capacità interpretative delle varianti di incerto significato, con una potenziale ricaduta sull'accuratezza delle diagnosi cliniche. A questo proposito però va anche precisato che è necessaria un'attenta valutazione. Infatti, una importante frazione delle varianti riscontrate in esomi o genomi è "privata", ovvero è presente nel singolo soggetto esaminato, e tale rimarrebbe anche sequenziando un elevatissimo numero di individui.

In questa fase, in cui le regole per la conservazione dei dati non sono ancora stabilite in modo definitivo a causa dei punti discussi, è auspicabile che ogni centro che produce dati NGS conservi per un lungo periodo di tempo almeno alcune delle tipologie di file che contengono il risultato dei passaggi cruciali di un workflow NGS: le sequenze stesse prodotte dal sequenziatore (file fastq), preferibilmente compresse (fastq.gz), le sequenze allineate al genoma di riferimento (file bam), le varianti rispetto alla sequenza di riferimento (file vcf). Relativamente al file bam, piuttosto che il file bam nativo, potrebbe essere opportuno conservarne una versione "processata" attraverso comprovate strategie computazionali che ne aumentano l'accuratezza (riallineamento attorno alle microinserzioni/delezioni, rimozione delle reads duplicate, ricalibrazione della base quality) e che solitamente sono la reale sorgente utilizzata per la chiamata delle varianti.

Va precisato che i file maggiormente problematici ai fini della presente discussione sono i file fastq e i file bam, i quali, prendendo in esempio un esoma, si attestano su dimensioni di alcuni gigabyte i primi e di decine di gigabyte i secondi.

I file vcf non pongono particolari problemi di storage per effetto delle loro modeste o moderate dimensioni, a seconda della tipologia di esperimento NGS effettuato. La conservazione dei file vcf, che possono essere considerati l'end point dell'analisi NGS oltre il quale viene di solito effettuata soltanto l'annotazione delle varianti stesse, dovrebbe pertanto non costituire un rilevante problema per ogni tipo di laboratorio. Questo insieme di considerazioni, ovviamente, va sempre rapportato al livello di attività nella produzione dei dati di ciascun laboratorio. Le dimensioni dei file vcf potrebbero essere addirittura drasticamente ridotte qualora si decidesse di conservare solo l'informazione relativa alle posizioni genomiche in cui sono presenti varianti che non siano chiaramente polimorfismi senza rilevanza clinica, neppure potenziale.

Un simile "restringimento" dell'informazione destinata ad essere conservata potrebbe essere operato anche sui file bam, con metodiche computazionali quali "Reduce Reads" di GATK (Genome Analysis ToolKit) (DePristo et al., NatGenet 2011) che permette di "svuotare" il bam file dell'informazione ridondante (ovvero coincidente con la sequenza di riferimento). Va altresì considerato che probabilmente una pratica bioinformatica del genere non può considerarsi routinaria, e pertanto potrebbe non essere accessibile a ogni laboratorio.

Indubbiamente la conservazione dei file bam, che per tanti versi può essere considerata superflua rispetto a quella di fastq e vcf, avrebbe la proprietà di permettere in qualsiasi momento la visualizzazione diretta dell'allineamento intorno a regioni di interesse.

I file fastq costituiscono senz'altro la sorgente primaria di informazione del dato NGS, riutilizzabile in ogni momento per produrre nuovi allineamenti facendo uso di una nuova release del genoma di riferimento, oppure di nuovi allineatori, etc. Pertanto, questi file sono probabilmente da considerarsi come i file essenziali nell'ottica della conservazione dei dati invece che della ripetizione del sequenziamento.

Stante la normativa vigente, è pensabile che il legislatore identifichi nel file fastq il prodotto originario, non manipolato e meno tecnologicamente alterato del dato genetico (alla stregua della sequenza Sanger), motivo per cui è consigliabile la conservazione, quanto meno, di questi file. D'altra parte, la conservazione dei soli file fastq, o più realisticamente dei fastq unitamente ai file vcf, implica che per analizzare un allineamento in maniera diversa (per esempio, analizzando i dati con uno strumento bioinformatico innovativo che interroghi i file bam), si debba riapplicare una pipeline di analisi ex novo. In questo senso è prerogativa di ciascun laboratorio valutare la fattibilità di questo processo, soprattutto in base alle risorse computazionali che ha in dote.

Un ultimo accenno è necessario riguardo alla possibilità, al fine di eludere le difficoltà per l'immagazzinamento in loco dei dati, di ricorrere alle risorse "virtuali" di cloudcomputing, che consentono di delocalizzare il dato su risorse messe a disposizione da grandi compagnie informatiche. Benché allettante come alternativa, questa scelta comporterebbe ulteriori complicazioni sul piano normativo. Anzitutto solleverebbe questioni relative alla privacy, perché trattandosi di risorse "in rete" l'accesso non autorizzato ai dati potrebbe risultare più semplice e comunque le attività di controllo e sicurezza verrebbero delegate a un ente terzo. Inoltre, dal momento che in questo caso la delocalizzazione dei dati sarebbe fisica (cioè i dati potrebbero essere trasferiti su server oltre il confine nazionale), e non virtuale, le problematiche inerenti potrebbero ricadere sotto legislazioni di paesi esteri, complicando ulteriormente il quadro.

Infine, ai fini di una rapida ricognizione della qualità generale di un esperimento, che si potrebbe rendere necessaria in qualsiasi momento, potrebbe essere consigliabile conservare anche dei file contenenti le statistiche relative all'allineamento e al coverage dell'esperimento, i quali sono comunque di dimensioni modeste e possono essere immagazzinati in una qualsiasi forma di database e quindi esulano dall'argomento centrale di questo paragrafo.

13. Bibliografia

Adams SA, Coppinger J, Saitta SC, Stroud T, Kandamurugu M, Fan Z, Ballif BC, Shaffer LG, Bejjani BA. Impact of genotype-first diagnosis: the detection of microdeletion and microduplication syndromes with cancer predisposition by aCGH. *Genet Med* 2009;11:314e22.

Berg et al. Deploying whole genome sequencing in clinical practice and public health: Meeting the challenge one bin at a time. *Genet Med*. 201; 13:499-504.

Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med*. 2014; 370:2418-25.

Christenhusz GM, Devriendt K, Dierickx K. Secondary variants – in defense of a more fitting term in the incidental findings debate. *Eur J Hum Genet* 2013; 21: 1331–1334.

Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for codeine therapy in the context of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) genotype. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;91(2):321-326.

DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernytsky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011;43(5): 491-8.

Green RC et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med* 2013;15:565–574.

(http://www.acmg.net/docs/ACMG_Releases_Recommendations_on_Incidental_Findings_in_Clinical_Exome_and_Genome_Sequencing.pdf)

Gullapalli RR, Desai KV, Santana-Santos L, Kant JA, Becich MJ. Next generation sequencing in clinical medicine: Challenges and lessons for pathology and biomedical informatics. *J Pathol Inform*. 2012; 3:40.

Hastings R, de Wert G, Fowler B, Krawczak M, Vermeulen E, Bakker E, Borry P, Dondorp W, Nijssingh N, Barton D, Schmidtke J, van El CG, Vermeesch J, Stol Y, Carmen Howard H, Cornel MC. The changing landscape of genetic testing and its impact on clinical and laboratory services and research in Europe. *Eur J Hum Genet*. 2012; 20(9):911-6.

Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, Das K, Toy T, Harry B, Yourshaw M, Fox M, Fogel BL, Martinez-Agosto JA, Wong DA, Chang VY, Shieh PB, Palmer CG, Dipple KM, Grody WW, Vilain E, Nelson SF. Clinical Exome Sequencing for Genetic Identification of Rare Mendelian Disorders. *JAMA*. 2014 Oct 18. [Epub ahead of print]

MacArthur DG et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*. 2014 Apr 24;508(7497):469-76.

Neveling K, den Hollander AI, Cremers FP, Collin RW. Identification and analysis of inherited retinal disease genes. *Methods Mol Biol*. 2013;935:3-23.

O'Rawe J, Jiang T, Sun G, Wu Y, Wang W, Hu J, Bodily P, Tian L, Hakonarson H, Johnson WE, Wei Z, Wang K, Lyon GJ. Low concordance of multiple variant-calling pipelines: practical implications for exome and genome sequencing. *Genome Med.* 2013; 5:28.

Pichert G et al. Unexpected findings in cancer predisposition genes detected by array comparative genomic hybridisation: what are the issues? *J Med Genet* 2011;48:535e539

Presidential Commission for the study of Bioethical Issues. Anticipate and Communicate: Ethical Management of Incidental and Secondary Findings in the Clinical, Research, and Direct-to-Consumer Contexts. Washington, D.C. December 2013 <http://www.bioethics.gov/>

Rigter T, Henneman L, Kristoffersson U, Hall A, Yntema HG, Borry P, Tönnies H, Waisfisz Q, Elting MW, Dondorp WJ, Cornel MC. Reflecting on earlier experiences with unsolicited findings: points to consider for next-generation sequencing and informed consent in diagnostics. *Hum Mutat.* 2013; 34:1322-8.

van El et al. Whole-genome sequencing in health care: Recommendations of the European Society of Human Genetics *Eur J Hum Genet.* 2013; 21:580-4.

Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(4):414-417.

Wilke RA, Ramsey LB, Johnson SG, et al; Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium (CPIC). The clinical pharmacogenomics implementation consortium: CPIC guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(1):112-117.

Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, Braxton A, Beuten J, Xia F, Niu Z, Hardison M, Person R, Bekheirnia MR, Leduc MS, Kirby A, Pham P, Scull J, Wang M, Ding Y, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Eng CM. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med.* 2013; 369:1502-11.

Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, Ward P, Braxton A, Wang M, Buhay C, Veeraraghavan N, Hawes A, Chiang T, Leduc M, Beuten J, Zhang J, He W, Scull J, Willis A, Landsverk M, Craigen WJ, Bekheirnia MR, Stray-Pedersen A, Liu P, Wen S, Alcaraz W, Cui H, Walkiewicz M, Reid J, Bainbridge M, Patel A, Boerwinkle E, Beaudet AL, Lupski JR, Plon SE, Gibbs RA, Eng CM. Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. *JAMA.* 2014 Oct 18.[Epub ahead of print]

ALLEGATO 1

INDICAZIONI OPERATIVE PER LA CONSULENZA GENETICA ASSOCIATA A TEST NGS

Per i test NGS, ancor più che per i test genetici convenzionali, risultano fondamentali un'accurata raccolta dell'anamnesi familiare ed una valutazione approfondita del fenotipo

La consulenza genetica dedicata all'applicazione delle tecniche di NGS va svolta dopo l'elaborazione di un percorso diagnostico specificamente dedicato ad ogni patologia oggetto di studio, disegnato con il simultaneo contributo del genetista di laboratorio, del genetista clinico e di altri clinici con comprovata esperienza nel settore.

Pertanto è indicato che venga svolta dal genetista clinico nei casi di condizioni multisistemiche per le quali sia stata già formulata o no un'ipotesi clinica, con lo scopo di orientare la scelta tra le varie tecniche NGS (pannello genico o analisi dell'esoma/genoma) o anche di riconsiderare il ricorso a tecniche analitiche tradizionali, operando a stretto contatto con il genetista di laboratorio.

La consulenza ha anche lo scopo di favorire la creazione di registri clinici, per i quali si incoraggia la partecipazione di una rete allargata di esperti¹.

La consulenza genetica pre-test propone e discute il consenso informato, che va specificamente dedicato alle tecniche NGS. Riguardo soprattutto all'analisi dell'esoma, le informazioni vanno dettagliate in rapporto al riscontro di A) varianti di sequenza in geni verosimilmente correlati al quesito clinico o di B) varianti in geni non correlati al quesito clinico (risultati incidentali).

- A) *Varianti in geni verosimilmente correlati al quesito clinico.* Le informazioni e la discussione si articola in rapporto alle seguenti categorie:
- varianti note a carico di geni-malattia noti. In questi casi la diagnosi genetica va considerata inequivocabile;
 - varianti non descritte a carico di geni-malattia noti. In questi casi la diagnosi genetica è possibile, ma può richiedere ulteriori approfondimenti;
 - varianti potenzialmente patogenetiche a carico di geni non descritti come associati al fenotipo ma a funzione nota. Tali geni vanno definiti come geni candidati, per questo la diagnosi genetica di certezza non può essere posta senza ulteriori approfondimenti, come il riscontro di varianti negli stessi geni in altri individui con presentazione clinica sovrapponibile;
 - varianti di significato incerto (VUS). Questa categoria di varianti non può essere trasferita nella pratica clinica, ma va limitata nell'ambito di ricerca.
- B) *Varianti in geni non correlati al quesito clinico.* Una discussione specifica va effettuata in base alle indicazioni contenute nel testo principale (vedi anche Tab. 1) e riservata alle seguenti categorie:
- varianti in geni noti, in base alle quali può essere predisposta una sorveglianza medica efficace ("*clinically actionable mutations*") (es. geni di predisposizione al cancro);
 - stato di portatore eterozigote per una condizione recessiva: vanno discusse le scelte riproduttive e la possibilità di arruolare nel test specifico altri familiari;
 - varianti geniche note per essere rilevanti nella farmacogenetica;

- varianti in geni di predisposizione (es. per malattie neurodegenerative) per le quali non è ancora disponibile una strategia preventiva di efficacia;
- varianti geniche di significato clinico sconosciuto (VUS).

La consulenza genetica pre-test articolata in rapporto a queste problematiche alle suddette categorie ed ha lo scopo di fornire elementi chiari per orientare la scelta del paziente. Deve anche informare che l'utente può recedere dal consenso in qualsiasi momento, anche dopo l'avvio del test genetico.

Consulenza genetica post-test.

La consulenza genetica post-test ha i seguenti scopi:

- accompagna la consegna del referto e l'interpretazione dei risultati,
- introduce la gestione clinica del paziente, pianificando il contatto con un gruppo interdisciplinare di esperti,
- pianifica la comunicazione del risultato al paziente e ai suoi famigliari, come specificato nel consenso,
- programma il ricontatto con il paziente e la famiglia, per il quale va chiesto il consenso, riguardo sia all'aggiornamento relativo alle categorie di varianti geniche non ancora trasferibili nella pratica clinica, sia all'estensione delle correlazioni genotipo-fenotipo di varianti patogenetiche.

Una consulenza post-test va incoraggiata anche in caso di risultati apparentemente normali.

Allegato 2
Informativa al consenso
Test genetico: “sequenziamento dell’esoma”

• **Introduzione**

Il sequenziamento dell’esoma è una nuova modalità di “test genetico”. Nella seguente informativa vengono spiegati in dettaglio i seguenti punti relativi a tale metodica:

- Cosa sono i cromosomi e i geni
- Perché viene eseguito il sequenziamento dell’esoma
- Quali geni vengono analizzati
- Quali sono i possibili risultati derivanti dal sequenziamento dell’esoma
- L’impatto del progresso delle conoscenze scientifiche sull’interpretazione dei risultati del sequenziamento dell’esoma
- Che cosa è necessario per eseguire il sequenziamento dell’esoma
- Utilizzo dei risultati del sequenziamento dell’esoma a scopo di ricerca
- Contatti per maggiori informazioni

• **Cosa sono i cromosomi e i geni**

Il nostro materiale genetico è costituito da circa 20.000 geni, impacchettati all’interno di ogni nostra cellula in strutture chiamate cromosomi. Queste informazioni genetiche determinano le nostre caratteristiche e lo sviluppo di tutti i nostri organi, come il cervello, il cuore, i reni. Le cellule del corpo normalmente contengono 46 cromosomi, raggruppati in 23 coppie. Ognuna di queste coppie è ereditata per metà dalla madre e per metà dal padre. Le prime 22 coppie di cromosomi sono analoghe nell’uomo e nella donna. La 23^{ma} coppia è denominata coppia dei cromosomi sessuali che sono rappresentati da due cromosomi X nella donna e da un cromosoma X ed un cromosoma Y nell’uomo.

Ogni gene ha una specifica funzione, sebbene al momento attuale non sia nota la funzione di tutti i geni. Una malattia genetica può insorgere se uno o più dei nostri geni non funziona correttamente. Può essere importante identificare un’alterazione genetica, generalmente chiamata “mutazione”, alla base di una determinata patologia, sia per chiarire i rischi di ricorrenza nella famiglia sia per aumentare le conoscenze relative alle patologie genetiche. Un’alterazione genetica può avvenire per la prima volta in una persona (essere cioè di “nuova insorgenza”, nuova mutazione), oppure può essere ereditata da uno o da entrambi i genitori.

In passato, poteva essere analizzato solo un gene alla volta, pertanto l’analisi di una patologia genetica che non fosse chiaramente causata da un gene specifico poteva richiedere anni di studio. Adesso è possibile, grazie a nuove tecniche di analisi, effettuare la sequenza di tutti i circa 20.000 geni noti in un singolo esperimento (“sequenziamento dell’esoma”). Tutto ciò si traduce in una notevole diminuzione dei tempi di diagnosi delle malattie genetiche.

• **Perché viene eseguito il sequenziamento dell’esoma**

Nella Sua famiglia è presente una patologia verosimilmente di origine genetica, per cui le tecniche d’indagine comunemente utilizzate non hanno permesso di identificare una specifica anomalia genetica causativa. Lo scopo di questo studio è l’identificazione della causa molecolare della patologia di cui soffre Lei e/o uno o più dei Suoi familiari, attraverso l’utilizzo delle nuove tecnologie di analisi del DNA (“sequenziamento dell’esoma”).

- **Quali geni vengono analizzati**

In prima battuta vengono analizzati solo i geni noti per essere associati a specifiche condizioni genetiche che presentano manifestazioni cliniche simili a quelle presenti nella sua famiglia. Successivamente, nel caso in cui non venga individuata alcuna alterazione, saranno testati tutti i rimanenti geni. Non è pertanto possibile definire a priori se e quando l'analisi permetterà di individuare il difetto genetico specifico responsabile della condizione. Tali implicazioni verranno ampiamente discusse con lei ed eventuali suoi familiari al fine di una scelta consapevole prima di procedere con l'analisi.

- **Quali sono i possibili risultati derivanti dal sequenziamento dell'esoma**

Il sequenziamento dell'intero "esoma" produce un'enorme quantità di dati, che possono presentare problemi di interpretazione e di gestione. In generale è utile confermare sempre la mutazione identificata tramite metodica NGS con sequenziamento Sanger e stabilirne la segregazione nella famiglia quando sia disponibile.

In particolare l'analisi potrà avere tre esiti possibili:

1. Vengono identificate una o più alterazioni genetiche, interpretate come possibili cause della patologia presente nella Sua famiglia. I Genetisti Clinici che seguono il suo caso saranno disponibili per discutere approfonditamente con Lei e i Suoi familiari le implicazioni del risultato.
2. Vengono identificate una o più alterazioni genetiche, ma il loro ruolo in relazione alla problematica in esame non è chiaramente interpretabile. In questo caso, potrà essere necessario analizzare altre famiglie con lo stesso problema o effettuare ulteriori approfondimenti per chiarire il ruolo delle alterazioni identificate. Anche in questa eventualità, Lei sarà informato sui risultati ottenuti e sarà aggiornato nel tempo sui progressi relativi all'interpretazione delle indagini effettuate.
3. Non viene identificata alcuna alterazione genetica che possa spiegare la problematica oggetto della presente indagine. I risultati delle indagini potranno essere rielaborati in futuro alla luce di nuove informazioni riguardanti la patologia in esame ed i geni in questa implicati. Anche in questo caso, sarà informato qualora emergessero novità rilevanti.

Parallelamente a questi tre possibili esiti, rimane una certa probabilità di un "risultato inatteso", cioè che vengano casualmente identificate delle alterazioni genetiche che non hanno alcuna relazione con la patologia in esame, ma che potrebbero avere rilevanza per la salute Sua o di altri membri della Sua famiglia. Un esempio possono essere le alterazioni genetiche di predisposizione alle patologie oncologiche o neurologiche ad insorgenza in età avanzata, ma anche lo stato di portatore "sano" di patologie genetiche, che non determinerebbe problemi per la Sua salute, ma potrebbe essere rilevante in relazione a rischi riproduttivi (trasmissione di patologie alla prole).

Al momento della compilazione del consenso informato, Le sarà richiesto pertanto di decidere se vorrà essere informato o meno su eventuali risultati inattesi. In particolare potrà scegliere se desidera o non desidera ricevere comunicazione di alterazioni genetiche:

- potenzialmente rilevanti per decisioni di tipo riproduttivo, in quanto potrebbero determinare un rischio aumentato di patologia genetica nella prole;

- predisponenti a patologie ad insorgenza nell'adulto, per le quali la conoscenza del rischio può rappresentare un beneficio concreto in termini di terapia e/o prevenzione (ad es. per predisposizione ereditaria a tumori o aritmie cardiache);
- predisponenti a patologie ad insorgenza nell'adulto, per le quali però la conoscenza del rischio **non** rappresenterebbe ad oggi un beneficio concreto in termini di terapia e/o prevenzione (ad es. patologie neurodegenerative ereditarie).

Non le verranno invece comunicate tutte quelle varianti clinicamente non rilevanti in base alle conoscenze attuali, che non rientrano nelle categorie precedenti.

Se lo richiederà, l'eventuale riscontro incidentale di alterazioni genetiche potenzialmente rilevanti per la salute Le verrà comunicato nell'ambito di una Consulenza Genetica dove avrà ampia possibilità di porre domande specifiche sulle implicazioni dei risultati ottenuti.

Per quanto riguarda l'analisi dell'esoma su minori, i risultati inattesi **NON** verranno comunicati, fatto salvo per quelle rarissime condizioni la cui conoscenza può portare ad interventi efficaci nel prevenire l'insorgenza/evoluzione di patologie.

- **L'impatto del progredire delle conoscenze scientifiche sull'interpretazione dei risultati del sequenziamento dell'esoma**

Dobbiamo sottolineare che le conoscenze relative al genoma (ovvero l'intero patrimonio genetico) umano ed alla funzione dei geni in relazione alle patologie sta aumentando rapidamente. Dunque, se il sequenziamento dell'esoma non darà un risultato inequivocabile alla prima analisi, le varianti genetiche identificate potranno essere reinterpretate in futuro alla luce di nuove conoscenze ed una o più alterazioni potranno essere definite come causa della problematica in esame in un secondo tempo. In questo caso, sarà contattato per gli opportuni aggiornamenti; d'altra parte, Lei stesso è invitato a contattarci a distanza di tempo (2-3 anni), se il primo risultato dell'analisi proposta non sarà definitivo.

D'altro canto il test che Le viene proposto non esplora tutto il patrimonio genetico, ma solo una parte di questo, benché sia la più importante dal punto di vista delle implicazioni per malattie genetiche. E' comunque possibile che il quadro clinico presente nella Sua famiglia sia dovuto a mutazioni in parti del genoma che non sono esplorate con l'analisi esomica effettuata oppure che la mutazione non sia adeguatamente coperta dall'analisi eseguita e pertanto non rilevata.

- **Cosa è necessario per eseguire il sequenziamento dell'esoma**

La partecipazione a questa indagine è su base del tutto volontaria e, qualora decidesse di non volersi sottoporre all'indagine di approfondimento che Le proponiamo, non dovrà fornire alcuna spiegazione e non sarà in alcun modo compromessa la Sua futura assistenza medica. Nel caso in cui decidesse di eseguire il test, dovrà pertanto fornire il Suo consenso informato all'indagine di sequenziamento dell'esoma che Le viene proposta, mantenendo il diritto di revocarlo in qualsiasi momento. Sarà necessaria l'esecuzione di un prelievo ematico (5-10 ml) - e/o di altro tessuto in situazioni particolari - per l'estrazione del DNA. Talvolta è possibile che il campione venga processato presso un Laboratorio esterno, ma in questo caso il campione verrà codificato, nessuno potrà risalire al suo nominativo ma solo i responsabili dello studio potranno

associare il risultato alla Sua persona. Se Lei acconsente, il DNA non utilizzato verrà conservato presso la struttura..... per la durata di 15 anni dalla fine del test, dopodiché verrà distrutto.

- **Utilizzo dei risultati del sequenziamento dell'esoma a scopo di ricerca**

Le informazioni ottenute dal sequenziamento esomico hanno un rilievo scientifico oltre che diagnostico e potranno condurre ad una migliore comprensione delle cause delle malattie genetiche. I risultati dell'analisi effettuata saranno conservati presso la struttura..... Tali dati saranno conservati in forma anonima e solo il medico potrà avere accesso al codice identificativo del paziente. I risultati potrebbero inoltre essere condivisi in forma anonima con altri gruppi di ricerca accreditati ed eventualmente pubblicati in forma anonima.

- **Contatti per ulteriori informazioni:**

Per eventuali ulteriori informazioni o chiarimenti è possibile contattare il medico di riferimento o la struttura..... al n. di telefono

Allegato 3
CONSENSO INFORMATO

TITOLO: **Analisi di “sequenziamento dell’esoma”**

Il/la sottoscritto..... nato/a il.....

residente a..... CAP:..... in via..... n.....

Dopo aver preso visione dell’informativa, **dichiara** quanto segue:

- di aver letto e compreso il foglio informativo per l’analisi di sequenziamento dell’esoma e di aver avuto ampio tempo ed opportunità di porre domande ed ottenere risposte soddisfacenti dal personale medico che ha svolto la consulenza.
- di aver compreso che l’esecuzione di questo test è su base volontaria e che potrà ritirare questo consenso in qualsiasi momento, senza dover dare spiegazioni e senza influenzare in alcun modo la Sua futura assistenza medica.
- di aver compreso che i dati personali verranno trattati secondo le normative vigenti e che potrà esercitare i suoi diritti, rivolgendosi al Titolare del trattamento in ogni momento e con le modalità specificate ai sensi dell’art. 7, D. Lgs. 30/06/2003, n. 196 (c.d. Codice Privacy) e ai sensi della vigente Autorizzazione al trattamento dei dati genetici del garante Privacy.

Conseguentemente alle sue dichiarazioni:

Accetta liberamente di sottoporsi ad un prelievo di sangue per l’analisi di sequenziamento dell’esoma, avendo compreso i rischi ed i benefici che vi sono implicati.

SI NO

Autorizza l’acquisizione di documentazione clinica relativa al suo caso.

SI NO

Acconsente alla conservazione del suo campione biologico per eventuali future indagini riguardanti la patologia in oggetto

SI NO

Acconsente alla condivisione in forma anonima con altri gruppi di ricerca accreditati dei suoi dati clinici e genetici

SI NO

Il campione sarà conservato sotto la responsabilità di

presso la struttura.....

Desidera essere informato dei risultati dell’analisi.

SI NO

Autorizza la comunicazione dei risultati dell'indagine alle seguenti persone:

.....

Inoltre, in merito ad eventuali "risultati inattesi":

Desidera **Non desidera**

essere informato, se dovesse risultare portatore "sano" di patologie genetiche con prevalenza relativamente alta nella popolazione, tale da essere importante in relazione a decisioni riproduttive (trasmissione di patologie alla prole);

Desidera **Non desidera**

essere informato, se dovesse risultare portatore di un'alterazione genetica di predisposizione a patologie ad insorgenza nell'adulto, se questa conoscenza rappresentasse un beneficio concreto in termini di terapia e/o prevenzione.

Desidera **Non desidera**

essere informato, se dovesse risultare portatore di un'alterazione genetica di predisposizione a patologie ad insorgenza nell'adulto, anche se questa conoscenza **non** rappresentasse allo stato attuale un beneficio concreto in termini di terapia e/o prevenzione.

Autorizza la comunicazione di eventuali "risultati inattesi" alle seguenti persone:

.....

Acconsente di essere contattato in futuro dal personale medico/infermieristico della UO di riferimento, per lettera, telefonicamente o via mail allo scopo di essere informato circa la disponibilità di nuovi test/indagini da eseguirsi ai fini della tutela della salute e/o per la raccolta di informazioni cliniche

SI NO

Acconsente all'utilizzo dei suoi dati genetici e dei suoi campioni biologici prelevati per scopi di ricerca futura che esulano dalla patologia in oggetto, per il quale verrà specificatamente ricontattato.

SI NO

Nome del Paziente..... Data Firma.....

Nome della persona che raccoglie il
consenso informato

..... Data..... Firma.....

Data,

Firma dell'interessato o avente diritto: _____

Confermo di avere spiegato scopi, procedure, limiti e vantaggi dell'indagine genetica proposta

Firma di chi ha raccolto il consenso:

Allegato 4

FOGLIO INFORMATIVO

(PROPOSTA PER L'ANALISI DI REGIONI SELEZIONATE CON QUALUNQUE METODICA)

INDAGINE MOLECOLARE PER

Questa informativa è rivolta ai pazienti con _____

Il Consenso Informato è composto da due parti: Foglio Informativo (che contiene una breve descrizione del test); Foglio di consenso (da firmare in caso di adesione al test).

Lei riceverà una copia completa del Consenso Informato.

Breve descrizione della patologia oggetto di indagine

La malattia può avere una base genetica, quindi i familiari di un paziente possono essere a loro volta a rischio di sviluppare la malattia. Nelle cellule del nostro organismo sono localizzati i cromosomi, che contengono l'informazione genetica. In ogni cellula ci sono 46 cromosomi, organizzati in 23 coppie: ogni coppia è formata da un cromosoma ereditato dal padre e da un cromosoma ereditato dalla madre. Le prime 22 coppie di cromosomi sono simili nell'uomo e nella donna (autosomi), mentre la coppia 23 è costituita dai cromosomi sessuali, XX nella donna e XY nell'uomo. Ogni cromosoma è formato da DNA, che costituisce i geni. Anche i geni sono solitamente presenti in coppie, uno di origine paterna ed uno di origine materna. Una malattia genetica si può verificare se uno o più geni non funzionano e può essere ereditaria, cioè trasmissibile di generazione in generazione. Le modalità con cui una malattia genetica si può trasmettere sono diverse e dipendono dal tipo di errore del DNA e dalla sua localizzazione (autosomica dominante, recessiva o legata al cromosoma X).

Note informative sull'esecuzione del test

Recentemente sono stati sviluppati metodi per l'analisi del DNA che permettono di analizzare contemporaneamente numerosi geni. Questi metodi possono essere utilizzati per effettuare la diagnosi molecolare di _____.

- Modalità di esecuzione del test: sequenziamento massivo in parallelo di un pannello di geni associati a _____. Per effettuare la diagnosi molecolare è di norma sufficiente un prelievo di sangue. In rarissimi casi è possibile dover ripetere il prelievo.
- Efficienza della tecnica: il test proposto è in grado di identificare il ... % circa delle varianti presenti nei geni analizzati.
- Possibili risultati del test:
 1. La variante causa della malattia viene identificata. In questo caso i risultati del test possono riguardare, oltre al soggetto che lo ha eseguito, anche gli altri componenti del nucleo biologico, in quanto le anomalie genetiche possono essere ereditabili e/o trasmissibili. L'identificazione della variante può in rari casi avere come conseguenza una ridefinizione della malattia.
 2. La variante causa della malattia non viene identificata. Questo non esclude che la patologia abbia una base genetica in quanto i geni analizzati sono responsabili di circa il% dei casi di..... In questo caso non è utile analizzare eventuali familiari.
 3. la variante identificata non è associabile con certezza alla malattia. In questo caso l'esecuzione del test nei genitori o in altri consanguinei potrebbe essere utile per chiarirne il ruolo.

Gestione dei risultati inattesi:

Dall'esecuzione del test da lei richiesto potrebbero essere ottenuti risultati inattesi (per es. informazioni su rapporti di consanguineità o relativi alla possibilità di sviluppare altre malattie su base genetica) che le saranno comunicati nel rispetto della sua dichiarazione di volontà di conoscere o meno tali eventi.

Tempi di risposta: mesi/giorni dal prelievo.

Allegato 5
DICHIARAZIONE DI CONSENSO/DISSENSO INFORMATO

Il/La sottoscritto/a _____

Nato/a a _____ (PROV) _____ il _____ Tel _____

Io sottoscritto/a dichiaro di aver ricevuto idonee informazioni relativamente alla seguente prestazione sanitaria: _____

Dichiaro dunque:

1. di aver ricevuto, letto e compreso la dettagliata scheda informativa della prestazione "....." allegata alla presente dichiarazione di consenso;
2. di essere stato/a adeguatamente informato/a relativamente a tipo, finalità, modalità di svolgimento della prestazione proposta;
3. di essere stato/a adeguatamente informato/a su vantaggi, limiti del test diagnostico e su tutto quello che il risultato può comportare;
4. di aver avuto la possibilità di discutere in dettaglio ogni particolare problema riguardante la prestazione e di avere avuto una risposta chiara e completa ad ogni mia domanda;
5. di avere ricevuto un'informazione comprensibile ed esauriente.
6. di aver avuto tutto il tempo necessario per decidere se eseguire o meno il test.

Io sottoscritto/a, liberamente, spontaneamente ed in piena coscienza, consapevole della possibilità di revocare, in qualsiasi momento prima dell'effettuazione della prestazione, il consenso ad essa eventualmente prestato:

PRESTO RIFIUTO

il mio consenso alla prestazione proposta

(firma del paziente o del legale rappresentante)

VOLERE NON VOLERE

essere informato/a anche di eventuali risultati inattesi di rilevanza clinica ottenuti dall'analisi

VOLERE NON VOLERE

rendere partecipi i miei familiari dei risultati dell'analisi qualora risultino indispensabili per la tutela della salute degli stessi

Inoltre indico di:

VOLERE NON VOLERE

che il materiale biologico prelevato dopo la conclusione dell'esame possa essere utilizzato per studi o ricerche in modo ANONIMO (in questa maniera non si potrà mai più risalire all'identità dell'individuo)

VOLERE NON VOLERE

che il materiale biologico prelevato dopo la conclusione dell'esame possa essere conservato all'interno di una Biobanca. (vedi foglio informativo e consenso informato della biobanca).

Il genetista che raccoglie la dichiarazione

..... (timbro e firma)

Il mediatore culturale (eventuale)

.....(nome/cognome in stampatello e firma)

Il/i testimone/i (eventuale/i)

..... (nome/cognome in stampatello e firma)

..... (nome/cognome in stampatello e firma)

Luogo, li

Indicare nello spazio sottostante le generalità di chi sottoscrive il consenso nel caso di pazienti minori, interdetti o sottoposti ad amministrazione di sostegno:

Sig. / ra

Nato /a a prov. (.....) il

in qualità di

Sig. / ra

Nato /a a prov. (.....) il

in qualità di

Allegato 6
Schema di risposta indagine NGS

Relazione finale sull'analisi dell'esoma nella famiglia (indicare nome della famiglia).

L'analisi è stata effettuata analizzando in parallelo il DNA estratto da sangue dei seguenti individui della famiglia (riportare tutti gli individui per i quali è stato eseguito l'esoma):

Caso n. (indicare codice)	Nome Cognome	Data di nascita	sexo	Stato
II-1				Affetto
II-2				Affetto
II-3				Non affetto
I-1				Genitore non affetto
I-2				Genitore non affetto

Campioni: (sangue EDTA, coltura di fibroblasti, DNA inviato da _____, etc)

Inviante: Dottore: _____

Struttura: _____ Recapiti: _____

Data di arrivo: (indicare la data di arrivo)

Data di uscita: (indicare data del referto)

Sospetto clinico/motivo dell'indagine: (indicare il sospetto di patologia e/o una breve descrizione clinica del caso, eventualmente con breve anamnesi)

Analisi eseguita: (indicare l'analisi eseguita WES - esoma, WGS - genoma, etc.).

Tecnica adottata: (indicare il metodo di arricchimento, eventuali kit del commercio, la macchina utilizzata)

Servizio erogatore: (indicare se in house o se è stato eseguito da laboratorio esterno)

Risultato dell'analisi: (descrizione delle varianti patologiche identificate secondo la nomenclatura standard. Occorre precisare: la loro presenza in banche dati internazionali o in banche dati "in house"; il cambiamento aminoacidico ed il loro possibile effetto; l'associazione del gene a quadri fenotipici noti, etc.

NB: E' utile confermare la mutazione con sequenziamento Sanger e stabilirne la segregazione nella famiglia, se eseguiti andrebbero indicati tra i risultati.

Si consiglia consulenza genetica (la risposta va sempre restituita nell'ambito di una consulenza genetica).

Note: Tra le note indicare

- a) l'analisi bioinformatica utilizzata: indicare gli strumenti bioinformatici utilizzati, la pipeline, la qualità dei dati (copertura, coverage medio, duplicati, etc).
- b) allegare eventuali tabelle con le varianti identificate.
- c) riportare la presenza di varianti inattese se tale richiesta viene esplicitata nel consenso informato

Il Genetista Responsabile

Indirizzo e recapiti