



Società Italiana
di Genetica Umana

LINEE GUIDA PER LA DIAGNOSI CITOGENETICA CONSENSUS 2007

INDICE

PARTE I

Aspetti generali

1. Premessa
2. Riferimenti normativi e definizioni
3. Laboratorio di Citogenetica
 - 3.1 Attività
 - 3.2 Requisiti strutturali
 - 3.3. Requisiti tecnici e impiantistici
 - 3.4 Personale e carichi di lavoro
 - 3.5 Procedure organizzative
 - 3.6 Rapporti con gli utenti
 - 3.7 Collaborazioni
 - 3.8 Criteri per gli standard di qualità e indicatori

PARTE II

Aspetti specifici delle indagini citogenetiche

4. Peculiarità
5. Aspetti tecnici dell'analisi cromosomica
 - 5.1 Colture cellulari
 - 5.2 Bandeggio cromosomico
 - 5.3 Analisi dei cromosomi
 - 5.4 Ibridazione in situ fluorescente (FISH)
 - 5.5 Array-Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)
 - 5.6 Introduzione di nuove tecniche
6. Diagnosi prenatale
 - 6.1 Indagine su cellule di villo coriale
 - 6.1.1 Metodi "diretto" e "coltura"
 - 6.1.2 Combinazione dei metodi "diretto" e "coltura"
 - 6.1.3 Modalità di analisi dopo applicazione di un unico metodo
 - 6.2 Indagine su cellule da liquido amniotico
 - 6.2.1 Metodi "in fiasca" ed "in situ"
 - 6.3 Indagine su linfociti fetali
 - 6.4 Mosaicismo in diagnosi prenatale
 - 6.5 Disomia uniparentale in diagnosi prenatale
 - 6.6 Identificazione rapida di aneuploidie

- 6.6.1 FISH interfascia per l'analisi delle aneuploidie
- 6.6.2 PCR Quantitativa Fluorescente (QF-PCR)
- 6.6.3 Multiple Ligation Probe-dependent Assay (MLPA)

7. Diagnosi postnatale

- 7.1 Allestimento delle colture e analisi del cariotipo costituzionale su sangue periferico
- 7.2 Allestimento delle colture e analisi del cariotipo costituzionale su biopsia cutanea
- 7.3 Allestimento delle colture e analisi del cariotipo costituzionale su materiale abortivo
- 7.4 Bandeggio ad alta risoluzione
- 7.5 Mosaicismo in diagnosi postnatale

8. Sindromi mendeliane con instabilità cromosomica

9. Diagnosi di disordini genomici

10. Diagnosi oncologica

- 10.1 Analisi cromosomica su campioni oncoematologici
- 10.2 Analisi cromosomica su tumori solidi

11. Refertazione

12. Tempi di refertazione

- 12.1 Referto definitivo
- 12.2 Referto preliminare

13. Indice di successo delle indagini

14. Conservazione dei dati clinici e di laboratorio

PARTE III

Indicazioni cliniche alle indagini citogenetiche

15. Indicazioni

- 15.1 Indicazioni alla indagine citogenetica costituzionale prenatale
- 15.2 Indicazioni alla indagine citogenetica costituzionale postnatale
- 15.3 Indicazioni alla indagine citogenetica su tessuto tumorale

PARTE IV

Bibliografia e documenti di riferimento

PARTE I

Aspetti generali

1. Premessa

La Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) ha elaborato queste Linee Guida per fornire ai Laboratori di Citogenetica che operano in Italia un manuale di riferimento per gli standard minimi di qualità delle indagini cromosomiche.

La prima edizione delle Linee Guida per la Diagnostica Citogenetica era stata redatta dalla Associazione Italiana di Citogenetica Medica nel 1995. Questo aggiornamento è stato elaborato dai gruppi di lavoro SIGU e facendo riferimento ai documenti internazionali, in particolare "Cytogenetic Guideline and Quality Assurance" a cura della European Cytogeneticists Association (2006).

2. Riferimenti normativi e definizioni

La Conferenza Stato Regioni ha emanato nel 2004 (GU n.224 del 23-9-2004) le "Linee Guida per le Attività di Genetica Medica" finalizzate a definire le caratteristiche e le peculiarità delle strutture e delle prestazioni di Genetica Medica.

I **Laboratori di Genetica Medica** (citogenetica, genetica molecolare, genetica biochimica, immunogenetica, genetica oncologica, genetica forense, farmacogenetica e altri) sono le Strutture specialistiche competenti nella esecuzione dei test genetici.

Per **test genetici** si intendono comunemente le analisi di specifici geni, del loro prodotto o della loro funzione, nonché ogni altro tipo di indagine del DNA, dell'RNA o dei cromosomi, finalizzata ad individuare o a escludere mutazioni associate a patologie genetiche. I test possono anche essere utilizzati per definire la variabilità genetica interindividuale, per risolvere quesiti medico legali e per valutare la suscettibilità o la resistenza genetica individuale alle malattie. In sintesi viene definito test genetico qualunque indagine che produca dati genetici.

E' parte integrante di un test la **consulenza genetica**. Infatti, rispetto agli altri esami di laboratorio, i test genetici presentano alcune peculiarità, in quanto i risultati coinvolgono l'identità biologica non solo della singola persona ma anche della sua famiglia in tutte le sue generazioni. Per questo il test genetico deve essere preceduto e seguito da una informazione specifica e deve essere eseguito solo dopo aver ottenuto il **consenso informato**, scritto in conformità alle normative vigenti.

I test genetici sono classificati, in rapporto alla loro finalità, in test diagnostici, di identificazione dei portatori, preclinici o presintomatici, di suscettibilità, di variabilità individuale, di farmacogenetica, di indirizzo terapeutico (es. test amplificazione di HER2 per carcinoma della mammella).

In base alla specifica organizzazione regionale, i Laboratori di Genetica Medica devono essere funzionalmente collegati alle Strutture Cliniche di Genetica Medica, al fine di attuare in modo integrato i programmi operativi.

I Laboratori di Genetica Medica devono essere autonomi, organizzati in Strutture Complesse o Semplici, come previsto dalle vigenti normative ed essere dotati di una pianta organica dedicata.

Per quanto riguarda tutte le attività di gestione dei dati, i Laboratori di Citogenetica devono operare secondo quanto previsto dalle normative vigenti: "Codice in materia di protezione dei dati personali" (D.L. n. 196 del 30-6-2003) e

"Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici" (G.U. n. 65 del 19 marzo 2007).

3. Laboratori di Citogenetica

3.1 Attività

I Laboratori di Citogenetica eseguono specifici test finalizzati allo studio del cariotipo. Viene definito cariotipo l'insieme di cromosomi caratteristico per numero e struttura del genoma di una specie.

L'analisi citogenetica permette di identificare anomalie cromosomiche costituzionali o acquisite, di numero o di struttura, omogenee o a mosaico.

3.2 Requisiti strutturali

I Laboratori di Genetica Medica, compresi quelli di Citogenetica, devono possedere i requisiti minimi strutturali stabiliti dal D.P.R. 14/1/1997 (Suppl.Ord. alla G.U.n. 42 del 20/02/1997) per i servizi di medicina di laboratorio.

Inoltre devono possedere aree idonee a:

- accettazione dell'utenza e dei campioni;
- svolgimento, con garanzie di riservatezza e tranquillità, della consulenza collegata ai test genetici (eventualmente anche in condivisione con la Struttura Clinica di Genetica Medica, se presente nello stessa Azienda o Ente o Struttura convenzionata);
- conservazione dei risultati dei test genetici, in accordo con le norme vigenti per la protezione dei dati personali
- consultazione di banche dati e di bibliografia computerizzata
- studio e discussioni di lavoro;

Le funzioni amministrative e di archivio devono essere svolte in locali separati e accessibili solamente a personale autorizzato.

Per l'esecuzione dei test di citogenetica i laboratori devono essere dotati di aree idonee per:

- l'allestimento delle colture cellulari in condizioni di sterilità;
- l'allestimento e la colorazione dei preparati citogenetici;
- l'acquisizione e l'elaborazione delle immagini.
- l'immagazzinamento delle scorte dei materiali di consumo, con monitoraggio costante delle temperature di conservazione dei reagenti.
- l'immagazzinamento delle bombole, che devono essere fissate .
- l'immagazzinamento di sostanze pericolose (reagenti chimici/infiammabili, radioattivi)
- l'immagazzinamento dei rifiuti secondo le normative vigenti.

I laboratori devono inoltre essere dotati di:

- procedure per la gestione dei rifiuti .
- segnaletica appropriata (livello di Biosicurezza);
- apposite linee guida di Biosicurezza ;
- dispositivi individuali per la protezione del personale
- programma nazionale antincendio
- programma di sicurezza adeguato ai rischi della specifica struttura.

Il numero e le dimensioni dei locali devono essere proporzionati alla tipologia delle attività svolte e al volume delle prestazioni erogate.

L'applicazione di tutto quanto sopra elencato deve essere documentata.

3.3 Requisiti tecnici e impiantistici

- I Laboratori di Citogenetica devono essere dotati di attrezzature di laboratorio adeguatamente etichettate per tipologie di rischio (a rischio biologico, radioattivo, tossico, ecc.), idonee per effettuare i test genetici in numero adeguato al carico di lavoro, in particolare:
 - cappe a flusso laminare per le colture cellulari;
 - centrifughe con diverse caratteristiche, a seconda delle necessità (refrigerata, a basso numero di giri, ecc.);
 - incubatori;
 - incubatori a CO²;
 - microscopi “rovesciati”;
 - microscopi in campo chiaro e a fluorescenza;
 - sistemi automatici per l’esecuzione del cariotipo; i relativi *softwares* devono essere costantemente aggiornati;
 - supporti informatici per la gestione dei dati e per gli opportuni collegamenti in rete.
- adeguati controlli periodici degli impianti elettrici e attrezzature.

Tutti gli strumenti considerati “critici” (ad es. termostati per le colture cellulari e congelatori) devono essere previsti in doppio, dotati di sistemi di allarme e collegati a gruppi di continuità.

Tutti gli strumenti utilizzati nei Laboratori di Citogenetica devono rispondere agli standard della Comunità Europea (Council Directive 93/68 EEC:1993), la loro gestione deve possedere i requisiti richiesti dai criteri di standardizzazione internazionale (ad es. ISO 9000, ISO 15189; ISO17025) e dimostrare di operare secondo sistemi di qualità validati, con competenza tecnica.

La documentazione relativa alla manutenzione ordinaria, preventiva e straordinaria deve essere conservata.

I laboratori devono attivare sistemi in grado di garantire la qualità e di assicurare la protezione dei dati e la loro corretta conservazione (es: backup periodici eseguiti da personale autorizzato).

Inoltre, va assicurata la corretta archiviazione e rintracciabilità dei campioni e dei processi.

Relativamente agli strumenti informatici utilizzati dai laboratori, è indispensabile allestire e mantenere un sistema di qualità, in grado di assicurarne la protezione da intrusioni e danni.

3.4 Personale e carichi di lavoro

Il personale in organico deve essere istruito ed esclusivamente dedicato alle competenze specifiche

La Struttura deve prevedere figure professionali differenziate, in numero adeguato alla tipologia e al volume delle prestazioni erogate:

- dirigenti sanitari con specializzazione in Genetica Medica o requisiti equipollenti ai sensi di legge. Presso ogni laboratorio diagnostico è necessario che siano strutturati almeno due dirigenti sanitari (escluso il direttore della struttura complessa o il responsabile della struttura semplice), per garantire continuità del servizio (validazione dei risultati);
- tecnici di laboratorio biomedico (con un rapporto tecnico/dirigente di almeno 2/1 escluso il direttore/il responsabile della struttura);
- personale addetto al lavaggio e alla sterilizzazione del materiale di laboratorio;
- personale amministrativo.

Il direttore del laboratorio è responsabile della attività svol-

ta presso la struttura, della preparazione e dell’aggiornamento professionale del personale e della applicazione delle normative vigenti.

I carichi di lavoro devono essere stabiliti secondo metodologie validate *ad hoc* e non devono raggiungere livelli troppo elevati, tali da indurre pressioni che possano essere causa di errore. Deve essere considerato inoltre che il volume di attività può essere influenzato dall’esperienza professionale dei singoli operatori, dal livello organizzativo, dal grado di automazione delle dotazioni strumentali del laboratorio e dalla complessità delle indagini eseguite.

Per la valutazione dei carichi di lavoro su media annuale si considera ogni operatore dedicato all’esecuzione delle indagini (dirigenti sanitari e personale tecnico), mentre vengono esclusi il direttore/responsabile della struttura e il personale amministrativo e ausiliario.

Di seguito è indicato il numero medio standard di indagini/anno/operatore, in riferimento alla tipologia dei test citogenetici, che riprendono i parametri riportati dalla European Cytogeneticists Association (ECA):

- 250-350 analisi del cariotipo da linfociti, oppure
- 250-350 analisi del carotipo da cellule fetali, oppure
- 250-350 analisi del cariotipo da colture di tessuti solidi, oppure
- 150-250 analisi del cariotipo su campioni onco-ematologici, oppure
- 100-200 analisi del cariotipo da tumori solidi, oppure
- 400-500 test su metafasi/interfasi FISH, oppure
- 150-220 test di citogenetica molecolare ad alta specializzazione (es. FISH per regioni subtelomeriche).

Per mantenere un adeguato livello di competenza e di qualità delle analisi è necessario che un laboratorio esegua, per ciascuna tipologia di diagnosi citogenetica offerta, almeno 100 casi/anno e, complessivamente, non meno di 1000 casi/anno.

3.5 Procedure Organizzative e Istruzioni Operative (PO e IO)

I Laboratori di Citogenetica devono disporre di procedure documentate per:

- la gestione dei documenti e degli archivi.
- la standardizzazione dei requisiti minimi delle prestazioni;
- la prenotazione dei test;
- la gestione delle liste d’attesa;
- la definizione dei programmi annuali di attività;
- l’aggiornamento professionale del personale secondo le norme dell’Educazione Continua in Medicina (ECM);
- le procedure idonee per l’inserimento operativo del personale di nuova acquisizione;
- procedure di monitoraggio della qualità dei fornitori (compresi i fornitori di servizi di laboratorio sulla base di apposite convenzioni);
- gestione del materiale biologico da analizzare (prelievo, rintracciabilità, trattamento, conservazione, eliminazione);
- processo di analisi;
- gestione delle apparecchiature e strumenti;
- gestione delle non conformità, azioni correttive e preventive;
- verifiche interne e monitoraggio dei processi/attività.

La strategia della qualità deve essere articolata come segue:

- i Laboratori di Citogenetica devono effettuare controlli di

- qualità interni ed esterni, secondo le procedure stabilite; i controlli esterni devono essere svolti prevalentemente a livello nazionale o Europeo;
- l'archiviazione dei dati deve rispondere a criteri di logica e chiarezza e seguire quanto previsto dalle vigenti norme sulla tutela della privacy. Analoghe procedure devono essere previste per la compilazione del referto e l'archiviazione dei dati;
 - i risultati devono essere verificati attraverso vari indicatori (ad es., tempi di consegna del referto, percentuale di insuccesso, ecc.).

3.6 Rapporti con gli utenti

Ai Laboratori di Citogenetica, attraverso la Carta dei servizi, si raccomanda di fornire alle persone informazioni su:

- descrizione struttura;
- modalità di accesso;
- recapiti telefonici e altre informazioni utili a favorire le persone che si rivolgono alla struttura.
- nominativi dei responsabili (o referenti) dei diversi settori;
- tipologia dei test citogenetici eseguiti;
- procedure adottate per la consulenza collegata all'esecuzione dei test
- tempi di attesa e possibilità di eseguire prestazioni che rivestano carattere d'urgenza;
- modalità di consegna dei risultati;
- procedure adottate per il trattamento dei dati nel rispetto della *privacy*;
- qualità dei processi e delle prestazioni (es: conformità a standard di qualità nazionali e/o internazionali; applicazione di linee guida);
- diritti tutelati (es. informativa sul consenso informato, modalità per fare elogi/reclami).

In accordo con le linee guida nazionali e internazionali, i test citogenetici devono essere preceduti dalla consulenza collegata al test, finalizzata a:

- chiarire il significato, i limiti, l'attendibilità, la specificità del test;
- acquisire e/o integrare dati relativi all'albero genealogico, quando questi non siano già stati forniti;
- ottenere il consenso all'esecuzione del test.

La Struttura deve conservare, a norma di legge, i consensi informati all'esecuzione dei test citogenetici, sottoscritti dagli interessati, allegati alle informazioni anagrafiche della persona che si sottopone al test e alla documentazione delle prestazioni erogate, in una scheda informativa nella quale viene riportata anche l'indicazione al test da parte del medico inviante.

I referti dei test citogenetici devono essere comprensibili, anche ai non addetti ai lavori, e devono uniformarsi alle raccomandazioni delle Società Scientifiche nazionali e internazionali.

L'informazione relativa al risultato del test deve essere gestita d'intesa con il medico indicato dal paziente al fine di offrire l'eventuale consulenza genetica presso la Struttura Clinica di Genetica Medica di riferimento.

3.7 Collaborazioni

I Laboratori di Citogenetica dovrebbero:

- prevedere collaborazioni con altre strutture, per garantire le indagini complementari necessarie alla definizione diagnostica (ad es. disomia uniparentale [UPD], FISH,

test al diepossibutano [DEB], ecc.), nei casi in cui non vengano eseguite dal laboratorio stesso;

- operare in stretta collaborazione con i genetisti clinici, anche attraverso un eventuale collegamento in rete con le Strutture Cliniche di Genetica Medica di riferimento, stabilendo procedure condivise per la gestione dei test e per i percorsi diagnostici.
- collaborare con le Associazioni delle Famiglie/Persone affette da patologie cromosomiche, fornendo aiuto umano e professionale per il raggiungimento di obiettivi comuni.

3.8 Criteri per gli standard di qualità e gli indicatori

Una Struttura, al fine di poter operare in ambito sanitario, deve possedere i requisiti minimi stabiliti da norme nazionali (D.P.R. 14/1/1997) ed ottenere una autorizzazione. Per erogare prestazioni al Servizio Sanitario Nazionale (SSN) viene richiesto un "Accreditamento Istituzionale", rilasciato dalla Regione di competenza che verifica il rispetto di specifici requisiti organizzativi, strutturali e impiantistici. Per Certificazione si intende la procedura e le attività attraverso le quali un soggetto autorizzato (Ente di Certificazione) valuta e certifica che un'organizzazione soddisfa requisiti come ad esempio standard di qualità (es. Norma UNI EN ISO 9001:2000 "Sistemi di Gestione per la Qualità"). La Certificazione è un atto riconosciuto quale presupposto indispensabile per assicurare la qualità del prodotto/servizio erogato.

I Laboratori di Citogenetica devono operare secondo quanto previsto dai sistemi di riferimento per la qualità, utilizzando Procedure Operative Standard (SOP), vedi cap. 3.5. Le procedure devono essere documentate e citate nel Manuale di Qualità del laboratorio, aggiornate ad ogni modifica operativa e revisionate periodicamente.

Il Manuale della Qualità deve inoltre includere:

- il preciso campo di applicazione del sistema di gestione per la qualità;
- una descrizione delle interazioni tra i processi del sistema di gestione per la qualità.

Per la verifica della qualità, il Laboratorio deve utilizzare indicatori in grado di valutare:

- le modalità di gestione del percorso di accesso al test citogenetico;
- l'applicazione di protocolli per l'esecuzione dei test (cariotipo prenatale e postatale, FISH, ecc.);
- il numero e la tipologia delle prestazioni eseguite, in rapporto al numero e alle professionalità del personale;
- le tecniche utilizzate per l'esecuzione dei diversi test;
- la percentuale di insuccessi (ad es. delle colture cellulari);
- le modalità di acquisizione del consenso informato e la sua formulazione;
- la tipologia del referto dei diversi test;
- i tempi di prenotazione;
- i tempi di consegna del referto;
- le eventuali modalità di invio e di trasporto dei campioni presso altre strutture e/o laboratori;
- il numero e la tipologia degli errori evidenziati dai controlli di qualità;
- il rispetto dei requisiti minimi per i diversi test;
- le modalità di gestione dei sistemi informatici, con particolare attenzione ai livelli di accesso e conservazione dei dati raccolti (ad es. *backup*);
- il numero e la tipologia dei reclami.

PARTE II

Aspetti specifici delle indagini citogenetiche

4. Peculiarità

L'indagine citogenetica si configura come un *test diagnostico*, in quanto consente di confermare un sospetto clinico in una persona o di effettuare una diagnosi in epoca prenatale e postnatale.

In accordo con quanto previsto dalle Linee Guida nazionali e internazionali, la Consulenza Genetica deve costituire parte integrante dell'indagine cromosomica. Durante la consulenza, il Genetista fornisce, in maniera esauriente e chiara, informazioni sul significato, i limiti, la specificità del test e le eventuali implicazioni dei risultati, acquisisce informazioni sulla storia familiare (albero genealogico) e il consenso scritto alla esecuzione del test.

La Consulenza Genetica deve essere effettuata garantendo il rispetto dei valori dell'individuo e della coppia.

Tutti i dati acquisiti durante la consulenza e i risultati delle indagini citogenetiche sono vincolati alle norme relative alla **tutela della riservatezza** dei dati sensibili, secondo quanto previsto dal D. Lgs. 30-6-2003 – n. 196 (G.U. n. 174 s.o. del 29 luglio 2003) e trattati in conformità con quanto previsto dal Provvedimento del Garante della Privacy "Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici" del 22 febbraio 2007 (G.U. n. 65 del 19-03-2007).

5. Aspetti tecnici dell'analisi cromosomica

5.1 Colture cellulari

Le indagini citogenetiche possono essere eseguite su diversi tessuti, sia mediante lo studio delle mitosi spontanee (ad es. midollo osseo, citotrofoblasto), sia mediante colture cellulari a breve/medio/lungo termine (ad es. sangue periferico, liquido amniotico). Per ridurre al minimo il rischio di insuccesso, per qualunque tipo di tessuto, si raccomanda di allestire le colture cellulari in duplicato.

5.2 Bandeggio cromosomico

Il cariotipo deve essere analizzato usando una tecnica di bandeggio, fatta eccezione per la valutazione delle lesioni cromosomiche in specifiche sindromi da instabilità cromosomica (ad es. anemia di Fanconi) o per esposizione ad agenti clastogeni.

È opportuno che il laboratorio sia in grado di eseguire tecniche di colorazione differenziale per specifiche regioni cromosomiche (C, Ag-Nor, Da-DAPI), oltre a utilizzare routinariamente il bandeggio (G e/o R e/o Q).

L'*International System for Chromosome Nomenclature* (ISCN, 2005) definisce 5 livelli di bandeggio, che possono essere usati come parametri di riferimento per definire il grado di risoluzione dei cromosomi, da riportare nel referto.

Il livello di risoluzione deve essere correlato al quesito diagnostico e al tipo di tessuto studiato: il numero di 300 bande rappresenta il livello minimo che si raccomanda di utilizzare per l'analisi su villi coriali con il metodo diretto; 400 bande possono rappresentare il livello minimo per l'analisi prenatale su villo coriale o liquido amniotico dopo coltura e per quella postnatale; 550 bande è il livello standard per l'identificazione delle anomalie strutturali nei casi di ritar-

do mentale, difetti congeniti, dismorfismi, poliabortività. Quando non è possibile ottenere la risoluzione standard, in rapporto al quesito diagnostico, in assenza di anomalie cromosomiche, è indicato ripetere l'esame *solo* dopo aver accertato la sussistenza di una chiara indicazione clinica.

5.3 Analisi dei cromosomi

Le Linee Guida Europee, a cui si riferiscono le Linee Guida della SIGU, fissano come criteri minimi di base, per la definizione del cariotipo costituzionale, l'analisi completa di 5 metafasi, e l'analisi di 10 metafasi per le indagini oncematologiche. Tre metafasi devono essere analizzate mediante l'appaiamento dei cromosomi bandeggiati, ricostruendone il cariotipo. In realtà questa indicazione è generale e, di fatto, il numero delle metafasi da esaminare deve essere correlato alla specifica indicazione clinica.

Nel manuale di laboratorio devono essere riportati i protocolli e i criteri di analisi.

Devono essere conservate le immagini di tutti i casi esaminati, per procedere ad eventuali verifiche successive, se necessarie.

Tutti i casi, prima della refertazione, devono essere controllati da due dirigenti del Laboratorio.

La descrizione e la refertazione del cariotipo e delle diverse anomalie cromosomiche deve fare riferimento all'ultima edizione della nomenclatura internazionale.

5.4 Ibridazione in situ fluorescente (FISH)

La Ibridazione in situ fluorescente (FISH) permette di identificare i riarrangiamenti submicroscopici, non visibili con le normali tecniche di citogenetica (inferiori a circa 4 Mb).

Questa tecnica non viene applicata routinariamente nell'analisi del cariotipo, ma solo in casi selezionati, in base a specifici sospetti diagnostici o per la caratterizzazione di anomalie cromosomiche.

Le tecniche di ibridazione in situ a scopo diagnostico utilizzano generalmente diversi tipi di sonde.

Sonde alfoidi, per caratterizzare gli Extra Structural Abnormal Chromosomes (ESACs), per valutare mosaicismi cromosomici a bassa frequenza, per valutare l'eventuale spostamento dei centromeri canonici e/o in soprannumero. Sonde painting cromosoma-specifiche, per caratterizzare ESACs, traslocazioni bilanciate/sbilanciate. Queste sonde, non sempre disperse uniformemente lungo la lunghezza del cromosoma bersaglio, possono non essere idonee ad identificare i piccoli riarrangiamenti.

Sonde a singola copia, per diagnosticare patologie da microriarrangiamenti (microdelezioni/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. Se il sospetto diagnostico riguarda una patologia da microdelezione è necessario analizzare 10-15 metafasi per la presenza/assenza del segnale su entrambi i cromosomi omologhi. Se il sospetto diagnostico riguarda una patologia da microduplicazione (ad es. malattia di Charcot-Marie-Tooth, tipo 1A - CMT1A), è necessario eseguire lo studio su almeno 100 nuclei in interfase. È necessario co-ibridare la sonda specifica con una sonda di controllo, per evitare che il doppio segnale presente su una cellula in G2 possa essere interpretato come duplicazione.

Sonde subtelomeriche cromosoma-specifiche. Sono disponibili kit per la rilevazione delle regioni subtelomeriche. E' opportuno analizzare almeno 4 cellule per ogni singolo cromosoma. 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 dirimere eventuali dubbi interpretativi.

FISH interfascia. Nella citogenetica postnatale viene considerata la tecnica di elezione per la ricerca di duplicazioni e inversioni che coinvolgono regioni inferiori a 4 Mb. Viene inoltre utilizzata nel *follow-up* successivo a trapianto di midollo, nella identificazione di mosaicismi a bassa frequenza e come tecnica per la identificazione rapida delle aneuploidie in diagnosi prenatale.

Prima di applicare la tecnica FISH interfascia nella diagnosi, è necessario che gli operatori siano preparati adeguatamente e siano identificati gli standard per l'osservazione dei campioni e l'interpretazione dei risultati, in particolare sia identificata una soglia di efficienza di ibridazione, sotto la quale è necessario ripetere il test.

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 della avvenuta ibridazione è il cromosoma omologo normale. Un ulteriore controllo può essere offerto da una sonda per un locus diverso, sullo stesso cromosoma.

E' opportuno predisporre nel laboratorio un'area riservata alle tecniche e ai protocolli per la FISH, all'interno della quale devono essere disponibili le attrezzature necessarie alla incubazione delle provette a temperature diverse e una microcentrifuga.

Quando si utilizzano sonde non commerciali, è necessario adottare i criteri necessari a prevenire la contaminazione da DNA; pertanto ogni nuovo lotto di sonde marcate deve essere testato prima di essere utilizzato ai fini diagnostici. Questo controllo consente di verificare che la sonda ibridizzi nel locus corretto e di valutare la sensibilità e la specificità della sonda.

Multiplex-FISH (M-FISH) e Spectral Karyotyping (SKY) sono tecnologie basate sull'analisi in FISH computerizzata. Esse prevedono la simultanea identificazione di ciascuna coppia di cromosomi in metafase grazie ad una specifica combinazione di fluorocromi utilizzata per la marcatura delle differenti sonde painting. Sono utilizzabili per la rapida caratterizzazione, con un singolo esperimento di FISH, di cromosomi marker, traslocazioni e riarrangiamenti cromosomici complessi. I risultati vanno confermati con sonde specifiche per i cromosomi riarrangiati.

5.5 Array-Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)

La tecnica Array-CGH si basa sulla coibridazione del DNA in esame con un DNA di controllo, marcati con fluorocromi diversi, su un microarray dove sono adese sonde che coprono l'intero genoma; la fluorescenza viene letta attraverso l'uso di uno scanner e rielaborata da un software dedicato. Il potere risolutivo della piattaforma utilizzata può variare in funzione della densità e della tipologia delle sonde utilizzate; attualmente per scopi diagnostici vengono impiegati

array tra 1 Mb e 100 kb.

Questa tecnica viene prevalentemente utilizzata per la diagnosi di fenotipi complessi associati a ritardo mentale di grado variabile.

E' necessario che questa tecnica, quando viene impiegata nella diagnosi, sia utilizzata da laboratori dotati di provata competenza, sia nelle tecniche di ibridazione in situ, sia in quelle di genetica molecolare, nonché di esperienza nella interpretazione dei risultati prodotti dalla *array-CGH* in particolare per ciò che riguarda la valutazione dei polimorfismi genomici.

La identificazione di uno sbilanciamento genomico richiede la conferma attraverso altre tecniche quali la ibridazione in situ, la "multiple ligation probe-dependent assay" (MLPA) o la PCR quantitativa e la estensione delle indagini ai genitori.

La Array-CGH ad oggi non trova impiego come tecnica di routine nella diagnosi prenatale in relazione ai problemi posti dall'elevato numero di polimorfismi genomici e dalla difficoltà di correlare il fenotipo all'eventuale riarrangiamento riscontrato.

Limiti di tale tecnica sono l'impossibilità di identificare riarrangiamenti cromosomici bilanciati e mosaicismi con una linea cellulare scarsamente rappresentata.

5.6 Introduzione di nuove tecniche

La rapida evoluzione tecnologica e delle conoscenze potrebbe rendere disponibili nuovi test diagnostici; in questi casi si raccomanda di utilizzare il metodo più sensibile, purchè correttamente validato in tutti gli aspetti tecnici e applicativi.

Conseguentemente il laboratorio dovrà mettere a punto la metodica, redigere le istruzioni operative ed il piano di formazione del personale e, qualora non sia in grado di offrire il test più sensibile, dovrà rifiutare il campione o inviarlo ad un altro laboratorio di riferimento.

6. Diagnosi prenatale

6.1 Indagine sulle cellule dei villi coriali (trofoblasto)

6.1.1 Metodi "diretto" e "coltura"

L'analisi citogenetica dei villi coriali può essere eseguita sia con metodo "diretto" sia dopo "coltura".

Quando si utilizza il metodo "diretto", le cellule del citotrofoblasto, che si dividono spontaneamente, possono essere analizzate dopo un breve periodo di incubazione.

Per eseguire l'analisi dopo "coltura", il villo viene disgregato con tecniche meccaniche e enzimatiche che consentono di liberare le cellule presenti nel mesenchima e in grado di proliferare in coltura. Per definire il cariotipo fetale è necessario utilizzare entrambe le metodiche. Infatti è stato dimostrato che si possono verificare discrepanze tra il cariotipo ottenuto con metodo diretto e quello ottenuto dopo coltura.

Se il campione di trofoblasto non è sufficiente ad eseguire entrambe le metodiche, si raccomanda di utilizzare il metodo che garantisce al laboratorio, sulla base della propria esperienza, la maggiore possibilità di successo diagnostico.

6.1.2 Combinazione dei metodi "diretta" e "coltura"

Per definire il cariotipo, è necessario contare almeno 16

metafasi sui preparati ottenuti con entrambe le metodiche: 6 metafasi devono essere analizzate mediante riconoscimento degli omologhi; ad un livello di risoluzione non inferiore alle 300 bande per il metodo diretto e di 400 dopo coltura, 3 ulteriori metafasi sono utilizzate per ricostruire il cariotipo.

In presenza di un mosaico è necessario eseguire almeno un cariotipo per linea cellulare e confrontare i risultati ottenuti con le due metodiche. Ogni mosaicismo richiede inoltre un'attenta valutazione della eventuale necessità di ripetere l'analisi nel II trimestre di gravidanza.

Si raccomanda di non processare tutte le colture allestite e di trattenere una piccola aliquota di cellule in coltura, che potrebbero essere utilizzate per ulteriori indagini. Questa precauzione evita la ripetizione del prelievo di cellule fetali.

6.1.3 Modalità di analisi quando viene applicata una sola tecnica

Quando è possibile utilizzare solo una delle due tecniche, l'analisi cromosomica viene eseguita contando almeno 16 metafasi delle quali 6 attraverso il riconoscimento degli omologhi e 3 mediante la ricostruzione del cariotipo.

In presenza di un mosaico si raccomanda di esaminare almeno un cariotipo per linea cellulare. Quando viene applicato solo il metodo della coltura, è opportuno analizzare le metafasi che provengono da almeno due colture indipendenti.

6.2 Indagine sulle cellule del liquido amniotico

6.2.1 Metodi "in fiasca" e "in situ"

Per ogni campione di liquido amniotico si raccomanda di allestire non meno di 3 colture primarie, utilizzando due diversi incubatori. E' buona norma usare due tipi di terreno o due lotti diversi, per limitare i rischi di contaminazione delle colture e/o la scarsa crescita cellulare.

Lo studio del cariotipo deve essere eseguito sulle cellule ottenute da 2 colture primarie. Sui preparati ottenuti con il metodo "in fiasca" si devono esaminare almeno 16 cellule da 2 colture indipendenti, nelle quali siano cresciute complessivamente non meno di 10 colonie. Sui preparati ottenuti con il metodo "in situ" si devono esaminare 10 metafasi, una per colonia, ottenute da 2 o più colture.

Indipendentemente dal metodo di coltura utilizzato, si raccomanda di analizzare: 6 metafasi riconoscendo gli omologhi, ad un livello di risoluzione non inferiore alle 400 bande e 3 cellule mediante la ricostruzione del cariotipo.

In caso di mosaicismo, è necessario analizzare un numero maggiore di metafasi/colonie, esaminando altre colture ed allestendo il cariotipo di ogni linea cellulare identificata.

Quando la qualità del preparato è bassa e la crescita cellulare non idonea ad eseguire l'analisi secondo il protocollo raccomandato, è necessario segnalare sul referto la opportunità di una consulenza genetica per informare sui limiti dell'indagine.

Si raccomanda di non processare tutte le colture allestite e di conservarne una piccola aliquota da utilizzare, se necessario, per ulteriori indagini, al fine di evitare la ripetizione del prelievo di cellule fetali.

6.3 Indagine su linfociti fetali

L'analisi citogenetica prenatale sui campioni di sangue fetale si esegue solo in presenza di particolari indicazioni:

- riscontro tardivo di una condizione di rischio di patologia cromosomica;
- controllo di un mosaicismo cromosomico diagnosticato sul trofoblasto o sugli amniociti.

Per l'analisi del cariotipo fetale si raccomanda di contare almeno 16 metafasi, 6 delle quali devono essere analizzate mediante riconoscimento degli omologhi e 3 con la ricostruzione del cariotipo.

Quando viene controllato sul sangue fetale un mosaicismo riscontrato in precedenza sul trofoblasto o sugli amniociti, è opportuno estendere l'analisi fino a 100 metafasi e valutare l'opportunità di eseguire un'indagine in FISH con sonda cromosoma specifica.

Qualora l'indagine citogenetica su linfociti fetali sia stata effettuata per la verifica della presenza di un mosaicismo cromosomico riscontrato su trofoblasto o su liquido amniotico, e il cariotipo sia risultato normale, è opportuno segnalare sul referto la probabilità di esclusione del mosaicismo in base al numero delle metafasi analizzate facendo riferimento alla tabella di Hook (1977).

Si raccomanda di utilizzare preparati ad una risoluzione di 550 bande, quando l'analisi citogenetica sul sangue fetale viene eseguita dopo l'accertamento ecografico di una malformazione o di un ritardo di crescita del feto.

6.4 Mosaicismo in diagnosi prenatale

Il mosaicismo cromosomico rappresenta uno dei più complessi problemi diagnostici nell'analisi del cariotipo fetale, sia sul trofoblasto sia sugli amniociti. Il mosaicismo vero, il mosaicismo confinato alla placenta (CPM) e lo pseudomosaicismo nelle colture di amniociti sono classificati in base a specifiche situazioni che si osservano nella pratica di laboratorio.

6.5 Disomia uniparentale in diagnosi prenatale

Il termine disomia uniparentale (UPD) definisce l'eredità di due cromosomi omologhi da un solo genitore. E' causata soprattutto da eventi di non-disgiunzione/*lag* anafasici, attraverso i quali vengono corrette trisomie o monosomie. Costituiscono una indicazione allo studio della UPD: mosaicismi, traslocazioni reciproche e robertsoniane, marcatori soprannumerari (ESACs) che coinvolgono cromosomi nei quali è stata dimostrata la presenza di regioni soggette a *imprinting*.

6.6 Identificazione rapida di aneuploidie

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

La FISH sulle cellule non coltivate del liquido amniotico può essere utilizzata per la ricerca rapida delle principali aneuploidie (cromosomi 13, 18, 21, X, Y). Il risultato diventa tecnicamente disponibile entro 24/48 ore e richiede mediamente dai 2 ai 4 ml di liquido amniotico. Inoltre può essere utilizzata sul trofoblasto nel caso in cui siano assenti metafasi o per estendere l'analisi in caso di mosaicismo.

Questa indagine non costituisce un'alternativa all'analisi completa del cariotipo, ma è un test integrativo, preliminare e parziale che può essere utile quando viene richiesta una diagnosi specifica urgente.

6.6.2 PCR Quantitativa fluorescente (QF-PCR)

La QF-PCR è un altro metodo che consente di identificare

in circa 24 ore le più comuni aneuploidie cromosomiche (13, 18, 21). Tuttavia si deve sottolineare che la QF-PCR fornisce informazioni limitate ai "Sequence Tagged Site" (STS) utilizzati e che, per la definizione dell'assetto cromosomico fetale deve essere associata alla citogenetica convenzionale.

Per eseguire la QF-PCR è necessaria una quantità di liquido amniotico compresa tra 0,5 e 4 ml, mentre, nel trofoblasto si raccomanda di eseguire l'estrazione del DNA da almeno due frammenti di villi coriali, per limitare il rischio di errori diagnostici correlati ai mosaicismi confinati alla placenta.

Il riscontro di una trisomia è considerato attendibile quando almeno due marcatori mostrano un genotipo triallelico o bialelico con rapporto $\frac{1}{2}$ mentre non è significativa la presenza di un solo marcatore informativo.

6.6.3 Multiple Ligation Probe-dependent Assay (MLPA)

La MLPA è una tecnica, rapida e relativamente economica, che permette di quantificare il numero di copie di oltre 45 sequenze di DNA in una unica reazione di PCR. Per eseguire la reazione di amplificazione sono sufficienti 20 ng di DNA; i prodotti di amplificazione vengono poi separati con un sequenziatore e il risultato viene confrontato con un campione normale di controllo. Questa tecnica è in grado di discriminare la differenza anche di una singola copia di DNA; per questo è stata recentemente introdotta nella diagnosi rapida delle aneuploidie e/o specifici microriarrangiamenti (es. Sindromi di Prader Willi/Angelman, Smith Magenis, ecc)

Nella diagnosi prenatale, questa tecnica può fornire una rapida diagnosi delle aneuploidie, ma deve essere sempre associata alla analisi citogenetica tradizionale.

7. Diagnosi postnatale

7.1 Allestimento delle colture e analisi del cariotipo costituzionale su sangue periferico

Per ogni paziente si raccomanda di allestire 2 colture linfocitarie indipendenti; qualora si utilizzi una sola coltura il campione deve essere conservato in condizioni idonee a garantire, se necessario, l'allestimento di una successiva coltura.

Per la determinazione del cariotipo si raccomanda di analizzare 16 metafasi delle quali 6 con il riconoscimento dei cromosomi omologhi e 3 mediante la ricostruzione del cariotipo (almeno 2 per linea cellulare in caso di mosaicismo). Qualora sulla base della indicazione alla indagine cromosomica non si ritenga utile la individuazione di una eventuale linea a mosaico (es. ricerca di una traslocazione parentale) l'analisi può essere effettuata su 5 metafasi, delle quali 3 mediante la ricostruzione del cariotipo.

7.2 Allestimento delle colture di fibroblasti e analisi del cariotipo costituzionale su biopsia cutanea

L'utilizzo della indagine citogenetica su biopsia cutanea trova indicazioni in specifiche condizioni quali ad esempio la necessità di:

- verificare la presenza di una condizione di mosaico riscontrata su altro tessuto (es. sangue periferico);
- diagnosi di specifiche sindromi nelle quali l'anomalia cromosomica non si riscontra su sangue periferico (es. Pallister-Killian);

- eseguire il cariotipo in un soggetto con aplasia midollare o altre condizioni che non consentono l'utilizzo del sangue periferico;
- eseguire il cariotipo su nati o neonati morti.

Per ogni paziente, quando possibile, si raccomanda di allestire 2 colture indipendenti; per la determinazione del cariotipo si raccomanda di analizzare 16 metafasi delle quali 6 con il riconoscimento dei cromosomi omologhi e 3 mediante la ricostruzione del cariotipo (almeno 2 per linea cellulare in caso di mosaicismo). Tale indicazione può variare nei casi di ricerca del mosaicismo (v. 7.5).

7.3 Allestimento delle colture e analisi del cariotipo costituzionale su materiale abortivo

La coltura per l'esecuzione della indagine citogenetica su materiale abortivo può essere gravata da un elevato livello di insuccessi (30-40%) in relazione alla qualità del campione inviato, in particolare se l'interruzione di gravidanza è avvenuta nel primo trimestre.

Per ottenere il miglior risultato possibile si raccomanda di:

- utilizzare villi coriali solo con metodo diretto in quanto la coltura a lungo termine comporta un aumento della contaminazione da tessuto materno;
- effettuare se possibile colture di altri tessuti quali ad esempio: sacco amniotico, cordone ombelicale o cute fetale.

Per la determinazione del cariotipo si raccomanda di analizzare 16 metafasi delle quali 6 con il riconoscimento dei cromosomi omologhi e 3 mediante la ricostruzione del cariotipo (almeno 2 per linea cellulare in caso di mosaicismo).

7.4 Bandeggio ad alta risoluzione

Nei casi in cui la presenza di un quadro sindromico sia suggestiva di un possibile riarrangiamento cromosomico è opportuno eseguire l'analisi con una risoluzione di circa 550 bande. Le tecniche di citogenetica molecolare possono essere utilizzate per confermare il sospetto emerso dalla analisi citogenetica.

7.5 Mosaicismo in diagnosi postnatale

La raccomandazione di esaminare 16 metafasi si basa sulla possibilità di individuare un mosaicismo con una linea cellulare al 14% (con limite di confidenza del 90%) o al 26% (con limite di confidenza del 99%) (Hook, 1997). Qualora vi sia il sospetto clinico di un possibile mosaicismo oppure dall'analisi delle prime 16 cellule venga rilevata una aneuploidia (esclusa la monosomia di un autosoma) o un riarrangiamento di struttura, è opportuno estendere il conteggio a 30 cellule. Il riscontro di una seconda cellula con la stessa anomalia consiglia di analizzare almeno 50 cellule. Si ritiene opportuno ricordare il fisiologico incremento di aneuploidia dei cromosomi sessuali, in particolare la monosomia del cromosoma X, correlata all'età avanzata (Gardner and Sutherland, 2004). Conseguentemente una linea con monosomia X al 5% può essere considerata priva di significato in una donna fenotipicamente normale.

8. Sindromi mendeliane con instabilità cromosomica

Le sindromi con instabilità cromosomica sono un gruppo di malattie ereditarie rare caratterizzate da un aumento della frequenza, spontanea e/o indotta, di specifiche anomalie

cromosomiche. Le più note sono l'Anemia di Fanconi (FA), la Sindrome di Bloom (BS), l'Atassia-telangiectasia, la sindrome di Nijmegen (NBS), la sindrome di Werner (WS), la sindrome da Insatibilità centromerica e anomalie facciali (ICF), la sindrome di Roberts (RS) e la sindrome da aneuploidia variegata a mosaico (MVA). In tutte queste malattie mendeliane il quadro citogenetico presenta specifiche caratteristiche pertanto, sulla base dell'indicazione clinica, il citogenetista deve utilizzare il protocollo più adatto ad analizzare il fenotipo cellulare che deve essere valutato su almeno 50 metafasi per tipo di coltura. In ogni caso l'instabilità cromosomica spontanea deve essere definita su colture non sincronizzate, per evitare l'esposizione delle cellule a sostanze clastogene. Nella valutazione della instabilità cromosomica non devono essere presi in considerazione i siti fragili comuni.

In considerazione della loro rarità e della complessità della indagine citogenetica, finalizzata a identificare uno specifico e variabile fenotipo cellulare, si raccomanda che lo studio delle sindromi da instabilità cromosomica venga condotto esclusivamente da laboratori con adeguata esperienza che dispongano anche di linee cellulari di soggetti affetti da utilizzare come controlli positivi nel protocollo diagnostico.

In particolare questi riarrangiamenti cromosomici, associati a quadri sindromici per i quali spesso non è disponibile una indagine di mutazione sul gene-malattia, possono essere utilizzati anche per una diagnosi fetale. In questo caso si ritiene presupposto indispensabile alla esecuzione di una diagnosi prenatale conoscere la condizione di rischio a priori della coppia e aver caratterizzato citogeneticamente l'eventuale precedente figlio affetto.

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

Nelle cellule dei pazienti affetti da AF sono presenti rotture cromatidiche e isocromatidiche, figure multiradiali di tipo asimmetrico tra i 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. 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.

Sindrome di Bloom (BS)(OMIM: 210900)

Nelle cellule dei pazienti sono presenti rotture isocromatidiche, frammenti acentrici, cromosomi isodicentrici e figure quadriradiali simmetriche, che coinvolgono i 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 inferiore a 12 nelle persone non affette, aumenta da 10 a 15 volte negli affetti ("cromosomi arlecchino"). 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.

Atassia-telangiectasia (AT) (OMIM: 208900)

Nelle cellule dei pazienti sono presenti rotture cromatidiche e cromosomiche, frammenti acentrici, figure multiradiali di tipo asimmetrico tra 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. Questi cloni riarrangiati sono presenti nel 2-100% dei linfociti T di alcuni pazienti. 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. 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.

Sindrome di Nijmegen (NBS) (OMIM: 602667)

La Nijmegen-brakage 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. 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.

Sindrome di Werner (WS) (OMIM 277700)

Nelle cellule dei pazienti si osservano 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.

Sindrome da Insatibilità 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 (*multibranch 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.

Sindrome di Roberts (RS) (OMIM: 268300)

L'instabilità cromosomica spontanea di questi pazienti è caratterizzata dalla prematura separazione dei centromeri e repulsione delle regioni eterocromatiche 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.

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.

Inoltre esistono sindromi da instabilità cromosomica ancora più rare, segnalate anche in singole famiglie, che presentano rotture e riarrangiamenti cromosomici, ma anche endoreduplicazioni o prematura separazione dei centromeri (PCS). Pertanto è opportuno non sottovalutare l'eventuale instabilità cromosomica nei soggetti che non presentano i sintomi classici delle sindromi più note. Per questo, è importante che ogni laboratorio conosca la frequenza delle rotture nei propri preparati cromosomici e nelle diverse condizioni di coltura. Nel caso in cui si evidenziasse un numero di rotture significativamente superiore allo standard del laboratorio, si impone la consulenza genetica e la ripetizione dell'analisi citogenetica a distanza di alcuni mesi, utilizzando colture non sincronizzate. E' noto che alcuni riarrangiamenti cromosomici sporadici, come la traslocazione (7;14), ricorrono con una frequenza di circa 1 su 500 metafasi nella popolazione generale. In ogni caso, la diagnosi di sindrome da instabilità cromosomica deve essere posta dopo avere ottenuto un test citogenetico positivo su due campioni diversi del paziente e richiede una valutazione del genetista clinico.

9. Diagnosi di disordini genomici

Le tecniche molecolari applicate alla citogenetica consentono di identificare riarrangiamenti submicroscopici non visibili con le normali tecniche citogenetiche.

Queste tecniche non vengono applicate routinariamente ma solo in casi selezionati in base a precisi sospetti diagnostici o per la caratterizzazione di specifiche anomalie cromosomiche.

Sono noti da tempo quadri sindromici causati da microdelezione/microduplicazione di specifiche regioni cromosomiche per le quali sono in commercio sonde per ibridazione in situ utilizzabili per la diagnostica; le principali sono le seguenti:

- sindrome di Angelman (delezione 15q12-13)
- sindrome di Charcot-Marie-Tooth (duplicazione 17p12)
- malattia del Cri-du-chat (delezione 5p15)
- sindrome di Di George/Velocardiofaciale (delezione 22q11.2)
- sindrome della neuropatia ereditaria con paralisi da pressione (HNPP, delezione 17p12)
- sindrome di Miller-Dieker (delezione 17p13.3)
- lissencefalia isolata (delezione 17p13.3);
- sindrome di Nablus (delezione 8q21.3-q22.1)

- sindrome di Prader-Willi (delezione 15q12-q13);
- sindrome di Rubinstein-Taybi (delezione 16p13.3);
- sindrome di Smith-Magenis (delezione 17p12.2);
- sindrome di Sotos (delezione 5q35).
- sindrome Trico-Rino-Falangea (delezione 8q24.1);
- sindrome di Williams (delezione 7q11.23);
- sindrome di Wolf-Hirschhorn (delezione 4p16);

Recentemente, l'introduzione della tecnica Array-CGH ha permesso di evidenziare sbilanciamenti cromosomici criptici, presenti in tutto il genoma, responsabili di quadri sindromici generalmente associati a ritardo mentale di grado variabile. L'esperienza acquisita in questi ultimi anni ha permesso di riconoscere nuove condizioni sindromiche associate a microriarrangiamenti ricorrenti.

10. Diagnosi oncologica

Le indagini citogenetiche in oncologia utilizzano tecniche differenziate, in relazione al tessuto tumorale che viene analizzato (ad es. neoplasie ematologiche, tumori solidi). Queste analisi richiedono una stretta collaborazione con le Strutture di Ematologia, Oncologia e Anatomia Patologica.

10.1 Analisi cromosomica su campioni oncoematologici

Le indagini cromosomiche sui campioni oncoematologici (ad es. midollo osseo) possono essere eseguite sia con tecniche dirette, sia dopo coltura a breve termine, sia su colture sincronizzate, al fine di aumentare l'indice mitotico. Si deve evitare che la durata della coltura favorisca la formazione di anomalie clonali in vitro. In presenza di una malattia linfoproliferativa, che coinvolge linfociti B o T, è necessario aggiungere alla coltura l'agente mitotico appropriato.

Per identificare una anomalia cromosomica clonale è necessario analizzare un numero adeguato di cellule. La qualità delle metafasi ottenute da campioni di sangue non stimolati con mitogeni oppure da midollo osseo è di solito bassa, in particolare nel caso delle leucemie. Anche se è possibile che nel preparato siano presenti metafasi con una morfologia di buona qualità, è comunque indispensabile analizzare metafasi qualitativamente diverse, per aumentare la probabilità di identificare un clone patologico. Spesso le metafasi anomale sono quelle qualitativamente peggiori; è necessario perciò analizzare un numero di cellule sufficiente ad accertare l'eventuale clonalità della anomalia cromosomica riscontrata.

Quando l'indagine citogenetica viene effettuata all'esordio della malattia oppure in presenza di una recidiva o in fase di trasformazione è opportuno analizzare completamente almeno 10 metafasi con la ricostruzione del cariotipo ed altre 10 valutate per escludere la presenza di anomalie cromosomiche. Se non è stato possibile studiare almeno 10 metafasi, questo limite deve essere segnalato nel referto.

Nei casi in cui la diagnosi citogenetica sia richiesta per il *follow-up* successivo ad un trattamento/remissione, si raccomanda quanto segue:

- se alla diagnosi era stato identificato un cariotipo normale, non sono indicate altre indagini citogenetiche, ad eccezione dei casi in cui si verifichi una recidiva;
- se alla diagnosi si identificano anomalie cromosomiche, devono essere analizzate almeno 20 metafasi; per gli studi di *follow-up* può essere utile l'analisi mediante FISH;

- l'analisi dei campioni studiati dopo trapianto di midollo osseo deve essere estesa ad almeno 30 metafasi, per valutare attraverso l'uso di un marcatore in grado di differenziare le cellule del donatore da quelle dell'ospite (es. il cromosoma Y, nei trapianti tra soggetti di sesso diverso) la percentuale di attecchimento del trapianto; anche in questi casi la FISH può essere appropriata.

10.2 Analisi cromosomica su tumori solidi

Le analisi citogenetiche sui tumori solidi richiedono l'allestimento di più colture, incubate per tempi relativamente lunghi (>72 ore).

E' importante analizzare il maggior numero possibile di metafasi, prima di redigere un referto di normalità, oppure di segnalare la presenza di un mosaicismo. Se l'analisi non consente di ottenere un numero di metafasi superiore a 10 ed il cariotipo risulta normale questo limite deve essere adeguatamente specificato nel referto.

11. Refertazione

Il referto deve essere scritto in modo chiaro, comprensibile anche ai non specialisti, e contenere le seguenti informazioni:

- identificazione dettagliata della Struttura;
- data del prelievo e data di ricezione del campione (se discordanti);
- data del referto, corrispondente alla conclusione dell'indagine;
- identificazione del medico o della Struttura che ha richiesto l'analisi;
- cognome e nome del paziente;
- data di nascita del paziente;
- codice identificativo del campione;
- indicazione all'indagine (opzionale);
- tessuto esaminato;
- tecnica/e utilizzate;
- tecnica/e di bandeggio;
- risoluzione del bandeggio;
- numero di colture analizzate;
- numero di metafasi/cloni/nuclei analizzati (nel caso del trofoblasto deve essere riportato il numero delle metafasi analizzate con il metodo diretto e su coltura);
- cariotipo definito secondo ISCN 2005;
- commento del risultato, scritto in forma comprensibile anche ai non specialisti;
- firma del Dirigente responsabile dell'indagine;
- firma del Direttore del Laboratorio.

Nel referto del cariotipo non devono essere indicati gli eteromorfismi o le varianti normali, riportate come tali nell'ISCN 2005. E' invece opportuno segnalare le varianti per la definizione delle quali è stato necessario eseguire colorazioni aggiuntive e/o l'analisi familiare.

Nel referto relativo ad una indagine con FISH devono essere indicati il nome commerciale della sonda, quando disponibile il nome del clone o, se non disponibile, il locus o ancora il gene (vedi ISCN 2005), oltre al numero delle cellule analizzate ed i risultati dell'ibridazione.

Per i referti di analisi condotte mediante Array-CGH il referto deve contenere:

- il tipo di array utilizzato e il nome della ditta se si usano

- array commerciali
- la risoluzione dell'array
- la regione di delezione/duplicazione, non solo come banda ma come paio di basi, specificando a quale assemblaggio genomico corrisponde
- il significato del riarrangiamento riscontrato.
- qualora l'anomalia riscontrata non sia mai stata riportata in letteratura, è opportuno segnalarlo nel referto.

Nella compilazione del referto deve essere previsto uno spazio per eventuali note (conclusioni o osservazioni sugli eventuali limiti dell'indagine) e commenti.

In alcuni casi è opportuno indicare sul referto l'utilità di estendere l'indagine ai familiari. Analogamente è opportuno segnalare la necessità di effettuare una consulenza genetica qualora venga riscontrata una anomalia del cariotipo.

12. Tempi di refertazione

12.1 Referto definitivo

Il tempo necessario alla conclusione dell'analisi da parte del laboratorio deve essere il più breve possibile e deve tenere conto dell'indicazione alla diagnosi e la sua eventuale urgenza. Il laboratorio deve dotarsi di un protocollo scritto, nel quale viene indicato il tempo necessario alla refertazione. Nella tabella seguente sono indicati i tempi entro i quali il 90% delle indagini dovrebbero essere refertate.

Indagine citogenetica	Tempo
Colture di amniociti e colture a lungo termine di trofoblasto	21 giorni
Colture di linfociti *	28 giorni
Colture di midollo osseo e di tumori	21 giorni
Colture di tessuti solidi o di tumori solidi	28 giorni
Coltura a breve termine di trofoblasto (tecnica diretta)	7 giorni
Analisi urgenti sui linfociti, midollo osseo, sangue fetale	7 giorni
FISH/QF-PCR/MLPA prenatale	4 giorni
Array-CGH postnatale	60 giorni

*I tempi di refertazione dovrebbero essere contenuti entro i 7 giorni quando l'analisi viene eseguita su neonati o coppie con gravidanza in corso e a rischio di patologie cromosomiche.

I tempi riportati in tabella si riferiscono ai giorni di calendario. La decisione di ripetere un prelievo relativo ad una diagnosi prenatale, a causa del fallimento della prima coltura, deve essere presa entro il 14° giorno dall'arrivo del campione in laboratorio.

12.2 Referto preliminare

Il risultato preliminare dovrebbe essere consegnato per iscritto e solo in casi particolari, al clinico e/o al paziente

dal Dirigente responsabile dell'analisi.

Copia di tale referto e dettagli delle informazioni fornite, devono essere incluse nella scheda di laboratorio del paziente.

13. Indice di successo delle indagini

L'indice di successo di una indagine dipende dalla qualità del campione pervenuto e dal protocollo utilizzato nel processamento dei campioni di qualità inferiore allo standard. E' opportuno monitorare la percentuale di successo in modo da identificare eventuali fattori esterni o interni che potrebbero influire negativamente e di conseguenza apportare le necessarie soluzioni.

In una proiezione annuale, si possono fornire, per i campioni di buona qualità, i valori di riferimento riportati nella seguente tabella.

Analisi citogenetica	% Successo
Coltura di sangue periferico postnatale	98
Indagine diretta su trofoblasto	98
Coltura di amniociti e di trofoblasto (lungo termine)	98
Coltura di sangue fetale	98
Coltura di materiale abortivo/tessuti fetali,	60/70
Biopsia cutanea	90
Leucemie (AML, ALL, CML, MDS, MPD)	90

Per le indagini sui tumori solidi, non è possibile definire un valore minimo standard, a causa della eterogeneità dei campioni.

Ogni laboratorio impegnato in un servizio diagnostico deve registrare l'indice di successo per ciascun tipo di tessuto.

14. Conservazione dei dati clinici e di laboratorio

I negativi, le stampe fotografiche e/o i *files* contenenti le metafasi e i cariotipi relativi a ciascun caso devono essere archiviati secondo le normative vigenti e la documentazione delle procedure di analisi, compreso il conteggio delle cellule e delle metafasi analizzate, deve essere conservata per un tempo indefinito.

Per la FISH devono essere conservate almeno 2 immagini fotografiche/digitalizzate per ogni caso e per ogni diverso esperimento. E' necessario archiviare anche la copia non elaborata di ciascuna immagine. Infatti l'elaborazione dell'immagine può permettere manipolazioni, che renderebbero difficile verificare a posteriori se le immagini fossero espressione del dato reale. Per la Array-CGH deve essere eseguito il backup dei file elaborati per l'esecuzione e l'interpretazione del test.

Il materiale biologico fissato e i vetrini dei preparati utilizzati per le indagini citogenetiche possono essere eliminati dopo la compilazione del referto.

PARTE III

Indicazioni alla diagnosi citogenetica

15. Indicazioni

15.1 Indicazioni alla indagine citogenetica costituzionale prenatale

L'indagine citogenetica prenatale è indicata nelle gravidanze che presentano un aumento del rischio di anomalie cromosomiche nel feto, rispetto alla popolazione generale. In particolare, i dati epidemiologici ampiamente consolidati raccomandano le seguenti indicazioni:

1. età materna ≥ 35 anni alla nascita;
2. precedente figlio affetto da una anomalia cromosomica;
3. genitore portatore di una anomalia cromosomica strutturale bilanciata;
4. genitore portatore di un marcatore cromosomico sovrannumerario;
5. genitore con mosaicismo cromosomico;
6. anomalie fetali e segni ecografici predittivi evidenziati ecograficamente;
7. indagini biochimiche sul siero materno suggestive di un aumento del rischio di patologia cromosomica nel feto;
8. rischio di malattie mendeliane da instabilità cromosomica;
9. altre condizioni, da valutare in sede di consulenza genetica.

15.2 Indicazioni alla indagine citogenetica costituzionale postnatale

La citogenetica costituzionale postnatale riguarda le analisi eseguite su soggetti nati vivi e nati morti (compresi gli aborti). Si considerano appropriate alla richiesta di un'analisi citogenetica le seguenti indicazioni cliniche:

1. fenotipo riconducibile ad una sindrome cromosomica nota;
2. genitori e familiari di soggetti con anomalie cromosomiche;
3. soggetti con difetti congeniti e/o ritardo mentale;
4. soggetti con ritardo di accrescimento;
5. nati morti e nati vivi deceduti in epoca neonatale, in particolare se presentano quadri dismorfici/malformativi;
6. aborti spontanei;
7. genitori di soggetti malformati o con sospetta sindrome cromosomica, deceduti senza diagnosi;
8. coppie con poliabortività (due o più aborti spontanei) o infertili;
9. maschi infertili;
10. femmine con amenorrea primaria, secondaria o menopausa precoce;
11. soggetti con sospetto clinico di sindrome genomica da microdelezione/microduplicazione;
12. soggetti con sospetto di sindrome da instabilità cromosomica;
13. soggetti con genitali ambigui;
14. coppie con diagnosi fetale di riarrangiamento cromosomico;
15. femmine con patologia recessiva legata all'X.

15.3 Indicazioni all'indagine citogenetica su un tessuto tumorale

1. Leucemia acuta, alla diagnosi. Se è presente una ano-

- malattia cromosomica è opportuno eseguire un *follow-up* citogenetico al termine della terapia o in presenza di una recidiva. Se alla diagnosi il cariotipo era normale, il *follow-up* citogenetico è indicato qualora si presenti una recidiva.
2. Mielodisplasia (MDS), al momento della diagnosi, in particolare nei pazienti candidati al trapianto di midollo osseo. Il *follow-up* citogenetico è indicato dopo terapia o in presenza di progressione.
 3. Leucemia mieloide cronica (CML), al momento della diagnosi. Il *follow-up* citogenetico è indicato per una migliore stadiazione delle malattia e per monitorare

l'efficacia della terapia.

4. Altre malattie mieloproliferative croniche (MPD), in alcuni casi selezionati al momento della diagnosi, per escludere una leucemia mieloide cronica e per valutare una possibile trasformazione in leucemia acuta.
5. Linfomi maligni o malattie linfoproliferative croniche (CLPD), in alcuni casi selezionati al momento della diagnosi.
6. Tumori solidi, in alcuni casi di neoplasia a piccole cellule in età pediatrica, alcuni sarcomi, tumori lipomatosi o altri tumori, dopo consulto con il patologo o il clinico.

Tabella di Hook (1977)

Table 6.15. The percentage of mosaicism excluded with 90, 95, and 99 percent confidence if a specified number of cells are evaluated and found to have identical karyotypes

No. of Cells Counted	Mosaicism Excluded at Confidence Level (%)			No. of Cells Counted	Mosaicism Excluded at Confidence Level (%)		
	90 (%)	95 (%)	99 (%)		90 (%)	95 (%)	99 (%)
<4	—	—	—	36	7	8	13
5	38	—	—	37	7	8	12
6	32	41	—	38	6	8	12
7	29	35	—	39	6	8	12
8	26	32	46	40	6	8	11
9	23	29	41	41	6	8	11
10	21	26	37	42	6	7	11
11	19	24	35	43	6	7	11
12	18	23	32	44	6	7	10
13	17	21	30	45	5	7	10
14	16	20	29	46	5	7	10
15	15	19	27	47	5	7	10
16	14	18	26	48	5	7	10
17	13	17	24	49	5	6	9
18	13	16	23	50-55	5	6	9
19	12	15	22	56	5	6	8
20	11	14	21	57-58	4	6	8
21	11	14	20	59-63	4	5	8
22	10	13	19	64-73	4	5	7
23	10	13	19	74	4	4	7
24	10	12	18	75	4	4	6
25	9	12	17	76-89	3	4	6
26	9	11	17	90-98	3	4	2
27	9	11	16	99-112	3	3	2
28	8	11	16	113	3	3	4
29	8	10	15	114-148	2	3	4
30	8	10	15	149-151	2	2	4
31	8	10	14	152-227	2	2	3
32	7	9	14	228-229	2	2	2
33	7	9	14	230-298	1	2	2
34	7	9	13	299-458	1	1	2
35	7	9	13	>459	1	1	1

Source: Hook. Table 1, 1977.176 Reproduced by permission from the University of Chicago Press. Note: The table provides the level of mosaicism (or greater) that is excluded with the given confidence level when N cells are counted. The population of cells is assumed to be a random sample. To determine the number of cells to count to exclude a specific level of mosaicism (X % or greater), choose the lowest value N for which X % appears in the appropriate column. For example, to exclude 10% mosaicism, with 90% confidence, 22 cells must be counted; for 95% confidence, 29 cells are needed; and for 99% confidence, 44 cells.

Siti web utili

- 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 Patology 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
- Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: <http://biologia.uniba.it/eca/NEWSLETTER/NS-17/Guidelines.pfd>
- Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

Tesi 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 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.
- 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

Bibliografia

Riferimenti normativi

- Linee guida per le attività di Genetica Medica (G.U. n. 224 del 23 settembre 2004)
- Codice in materia di protezione dei dati personali. D. Lgs.30-6-2003 – n. 196 (G.U. n. 174 s.o. del 29 luglio 2003).
- D.Lgs 30 dicembre 1992, n. 502 e succ. integrazioni e modificazioni “Riordino della disciplina in materia sanitaria”.
- D.Lgs 3 febbraio 1993, n. 29 e succ. integrazioni e modificazioni “Razionalizzazione dell’organizzazione delle amministrazioni pubbliche e revisione della disciplina in materia di pubblico impiego”.
- D.P.R. 14-1-1997 Approvazione dell’atto di indirizzo e coordinamento alle regioni e alle province autonome di Trento e di Bolzano, in materia di requisiti strutturali, tecnologici ed organizzativi minimi per l’esercizio delle attività sanitarie da parte delle strutture pubbliche e private. Pubblicato nella Gazz. Uff. 20 febbraio 1997, n. 42, S.O.
- D.P.R. 10 dicembre 1997, n. 483 “Regolamento recante la disciplina concorsuale per il personale dirigenziale del SSN”
- D.P.R. 10 dicembre 1997, n. 484 “Regolamento recante la determinazione dei requisiti per l’accesso alla Direzione Sanitaria Aziendale e dei requisiti e dei criteri per l’accesso al secondo livello dirigenziale per il personale del ruolo sanitario del SSN”
- “Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici” (G.U. n. 65 del 19 marzo 2007).
- **UNI EN ISO 9000:2005** Sistemi di gestione per la qualità - Fondamenti e vocabolario
- **UNI EN ISO 9001:2000** Sistemi di gestione per la qualità - Requisiti.
- **UNI EN ISO 15189:2005** Laboratori medici - Requisiti particolari riguardanti la qualità e la competenza
- **UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005** Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura

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
- 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
- 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. *Pren Diagn*, 19: 1081-1090, 1999
- 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 Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. *Am J Med Genet* 91: 39 – 45, 2000
- Kotzot D Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. *Am J Med Genet* 82: 265 – 274. 1999
- 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
- 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

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

Citogenetica oncologica

- Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 1996. Oxford University Press, New York Guttenbach M, Koschorz B, Bernthaler U, Grimm T, Schmid M. Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am J Hum Genet* 1995 57:1143-50
- Maraschio, P.; Spadoni, E.; Tanzarella, C.; Antoccia, A.; di Masi, A.; Maghnie, M.; Varon, R.; Demuth, I.; Tiepolo, L.; Danesino, C.: Genetic heterogeneity for a Nijmegen breakage-like syndrome. *Clin. Genet.* 63: 283-290, 2003.
- Mitelman F (ed.). ISCN 2005: An international system for human cytogenetic nomenclature.
- Karger, Basel Ritchie RJ, Mattei MG, Lalande M. A 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, McCaskill C, Hersh JH, Greenberg F, Lupski JR. A clinical and molecular study of mosaicism for trisomy 17. *Hum Genet*. 1996 97:69-72.
- Woods CG, Leversha M, Rogers JG. Severe intrauterine growth retardation with increased mitomycin C sensitivity: a further chromosome breakage syndrome. *J Med Genet*. 1995 Apr;32(4):301-5.

Gruppi di lavoro

Diagnosi prenatale

L. Dalprà (coordinatore)

Diagnosi postnatale

O. Zuffardi (coordinatore)

Citogenetica oncologica

L. Larizza (coordinatore)

Revisori

F. Dagna Bricarelli
B. Dallapiccola
D. Giardino
P. Grammatico
M.G. Tibiletti

Si ringraziano tutti i soci appartenenti ai gruppi di lavoro che hanno collaborato alla stesura delle linee guida.



Società Italiana di Genetica Umana
(SIGU)

www.sigu.net

CONSIGLIO DIRETTIVO ANNO 2007

Presidente

Franca Dagna Bricarelli (Genova)

Consiglio Direttivo

Elisa Calzolari (Ferrara)

Lidia Larizza (Milano)

Giandomenico Palka (Chieti)

Corrado Romano (Troina - EN)

Maria Cristina Rosatelli, Segretario (Cagliari)

Francesca Torricelli (Firenze)

Tesoriere

Paola Grammatico (Roma)

Gruppi di lavoro

Citogenetica	<i>referente</i>	Orsetta Zuffardi	(Pavia)
Diagnosi Prenatale	<i>referente</i>	Leda Dalprà	(Milano)
Genetica Clinica	<i>referente</i>	Romano Tenconi	(Padova)
Genetica Oncologica	<i>referente</i>	Maria Grazia Tibiletti	(Varese)
SIGU – Sanità	<i>referente</i>	Elisa Calzolari	(Ferrara)