

**CORRETTO UTILIZZO
DEL TEST GENETICO “CGH/SNP ARRAY”
IN DIAGNOSI POSTNATALE SU DNA COSTITUZIONALE
2010**

**Gruppo di Lavoro di Citogenetica SIGU
Tavolo di lavoro CGH/SNP-array**

hanno contribuito alla stesura del documento i soci:

Lucia Ballarati¹, Laura Bernardini², Laura Cardarelli³, Massimo Carella⁴, Rosario Casalone⁵, Rossella Caselli¹, Roberto Ciccone⁶, Maurizio Clementi⁷, Leda Dalprà⁸, Annamaria Di Meglio⁹, Marco Fichera¹⁰, Monica Forzan⁷, Sabrina Giglio¹¹, Francesca R. Grati¹², Michela Malacarne¹³, Giuseppina Marseglia¹⁴, Marilena Pantaleo⁷, Vanna Pecile¹⁵, Chiara Pescucci¹⁴, Alessandra Renieri¹⁶, Marcella Zollino¹⁷, Orsetta Zuffardi⁶, Daniela Giardino¹, Antonio Novelli²

¹ Lab Citogenetica Medica, IRCCS-Istituto Auxologico Italiano, Milano

² Istituto CSS Mendel Roma, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, S. Giovanni Rotondo (FG)

³ Laboratorio Citotest, Consorzio GENiMED, Sarreola di Rubano (PD)

⁴ Servizio di Genetica Medica IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, S. Giovanni Rotondo (FG)

⁵ SS Dipartimentale Genetica Azienda Osp. Universitaria Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

⁶ Dipartimento di Patologia Umana ed Ereditaria Sezione di Biologia Generale e Genetica Medica Università di Pavia

⁷ U.O. Complessa di Genetica Clinica, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova

⁸ Dipartimento di Neuroscienze e Biotecnologie Mediche, Università di Milano-Bicocca, Monza

⁹ SSD Ematologia, Clinica-Sperimentale, Dipartimento di Pediatria, Azienda Ospedaliera - Università di Padova

¹⁰ Laboratorio di Diagnosi Genetica, IRCCS Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

¹¹ Unità di Genetica Medica, Ospedale Universitario Pediatrico Meyer, Firenze

¹² TOMA Advanced Biomedical Assays S.p.A., Busto Arsizio (VA)

¹³ Laboratorio di Genetica, Ospedale Galliera, Genova

¹⁴ SOD Diagnostica Genetica Piastra dei servizi AOU Careggi, Firenze

¹⁵ S.C. Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS “Burlo Garofolo”, Trieste

¹⁶ Dipartimento di Biologia Molecolare, Genetica Medica, Università degli Studi di Siena, Siena

¹⁷ Istituto di Genetica Medica, Università Cattolica Sacro Cuore, Policlinico “A. Gemelli”, Roma

Indice	pag 2
1. Finalità del documento	pag 3
2. Premessa. Principali tipologie di piattaforme array genomici	pag 3
3. Raccomandazioni tecniche	pag 4
3.1 Risoluzione e disegno della piattaforma array-CGH	pag 4
3.1.1 Disegno: Targeted array vs. genome-wide array	pag 4
3.1.2 Risoluzione	pag 4
3.2 Qualità dell'analisi array-CGH e criteri di identificazione delle CNVs	pag 5
3.3 DNA reference	pag 6
3.4 CNVs benigne e database delle varianti genomiche	pag 6
3.5 Validazione delle CNVs	pag 7
4. Raccomandazioni sull'accettazione del campione	pag 7
5. Raccomandazioni sulla divulgazione dell'informazione all'utente	pag 8
6. Raccomandazioni sulla scrittura del referto	pag. 8
Bibliografia	pag 9

1. Finalità del documento

Il presente documento fornisce una serie di raccomandazioni che il gruppo di lavoro Citogenetica SIGU ha predisposto, attraverso uno specifico tavolo di lavoro CGH/SNP-array, con riferimento all'impiego di tale test genetico a fini diagnostici in diagnosi postnatale sul DNA costituzionale. Queste linee guida fanno riferimento a documenti e lavori recentemente pubblicati comprese le linee guida Europee “Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis” (Vermeesch et al. (2007) *EJHG*, 1–10), le linee Guida dell’American College of Medical Genetics – Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories (Ed 2008), e il Final Report of Pilot External Quality Assessment scheme for the Constitutional Molecular Karyotyping (Microarray/ArrayCGH) (dicembre 2009).

2. Premessa

Principali tipologie di piattaforme array genomiche

Gli array sono matrici di sonde fissate su supporti solidi; sono impiegati in diverse applicazioni della genetica moderna come l’analisi di espressione genica, l’analisi di metilazione del DNA e l’analisi del genoma per la determinazione delle variazioni del numero di copie (CNVs, *Copy Number Variations*). Quest’ultima applicazione sta avendo un notevole impatto nella genetica clinica, in quanto permette di evidenziare variazioni del numero di copie, cioè delezioni e amplificazioni, non evidenziabili con le tecniche citogenetiche convenzionali nei soggetti affetti da sindromi genetiche a eziologia ignota.

Sono disponibili diverse piattaforme per l’analisi del genoma basate sugli array, che possono essere raggruppate in alcune principali categorie. Una prima importante distinzione può essere fatta in base al principio analitico adottato. Questa categoria comprende gli array basati sulla CGH (array-CGH oppure aCGH) e gli array basati sui polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP-array). La tecnica array-CGH, sviluppata a partire dalla CGH convenzionale, prevede l’ibridazione, su un array, di un campione di DNA del soggetto da analizzare e di un DNA di controllo o “di riferimento”. I due DNA sono marcati con fluorocromi diversi e la misurazione del rapporto delle intensità di fluorescenza emessa da ogni sonda permette di identificare le variazioni del numero di copie del DNA in esame, rispetto al DNA di riferimento. Nel caso della tecnica SNP-array viene marcato e ibridato sull’array solo il DNA in esame e i cambiamenti del numero delle copie vengono identificati confrontando le intensità di fluorescenza emessa da ogni SNP con quelle misurate in un set di esperimenti analoghi su DNA di riferimento.

Le definizioni di queste due metodiche fanno emergere due aspetti fondamentali: i) entrambe le tecniche non consentono di determinare il numero assoluto di copie, che piuttosto è relativo al DNA di riferimento; ii) la tecnica array-CGH consente di confrontare direttamente i due DNA, mentre la tecnica SNP-array confronta i dati ottenuti in esperimenti diversi, con DNA diversi. Gli arrays basati sulla CGH si differenziano ulteriormente a seconda della tipologia delle sonde fissate sul supporto solido. I BAC/PAC array contengono sonde del tipo BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) e PAC (*P1 derived Artificial Chromosome*), ottenute per clonaggio, che hanno una dimensione variabile da 100-150 Kb (Vermeesch et al, 2007; aCGH Guidelines). Gli oligo-array contengono invece sonde oligomeriche di solito ottenute per sintesi o per PCR e con dimensioni variabili da 20 a 60 nucleotidi.

Gli arrays possono essere ulteriormente classificati in base all’oggetto dell’analisi. Alcune piattaforme consentono di analizzare l’intero genoma, ad eccezione delle regioni contenenti DNA altamente ripetitivo (regioni eterocromatiniche, telomeri, satelliti e bracci corti dei cromosomi acrocentrici). Per questo vengono definite “*whole genome*” o “*genome-wide*”. Altre piattaforme vengono disegnate in maniera mirata, per analizzare specifiche regioni del genoma. Per questo sono definite “*targeted*” (mirate). Gli array *targeted* sono di solito utilizzati per analizzare segmenti di

DNA all'interno dei quali le variazioni del numero delle copie si associano a patologie (ad esempio le regioni subtelomeriche e le regioni critiche di alcune sindromi ricorrenti).

3. Raccomandazioni tecniche

3.1 Risoluzione e disegno della piattaforma array-CGH

3.1.1 Disegno: *targeted array* e *genome-wide array*

Questi due tipi di array offrono all'utilizzatore vantaggi e svantaggi. Il vantaggio dei *targeted array* è che si analizzano solo regioni note, associate quasi sempre a patologie, quando il numero di copie presenti è diverso da due. Ciò rende l'interpretazione dei dati semplice e in genere non equivoca. Al contrario, l'interpretazione di un profilo *whole-genome* può essere complicata dalla presenza di sbilanciamenti non ancora descritti o il cui significato biologico può essere di difficile interpretazione. Tuttavia, i dati disponibili in letteratura hanno dimostrato che la maggior parte delle anomalie genomiche patogenetiche sono sporadiche e si localizzano nelle regioni non considerate "ricorrenti". Utilizzando il *targeted-array* sui pazienti con sindromi genetiche a cariotipo normale si è evidenziato che queste piattaforme hanno una capacità diagnostica inferiore al 6% (Lu et al, 2007; Sharp et al, 2005) rispetto al 10-15% delle piattaforme *genome-wide*. **Per questo, si raccomanda l'uso dall'analisi *genome-wide* nelle analisi di *array-CGH*.**

3.1.2 Risoluzione

La capacità di una piattaforma *array* di identificare sbilanciamenti genomici dipende essenzialmente dalla risoluzione della piattaforma, che a sua volta dipende dalla distanza media delle sonde rispetto al genoma standard di riferimento (*spacing*) e dalla lunghezza delle sonde. È ovvio che tanto maggiore è il numero delle sonde presenti nell'*array*, tanto più piccole sono le dimensioni delle anomalie che possono essere identificate. Come anticipato, le sonde BAC sono più grandi rispetto alle sonde oligonucleotidiche. Questo implica che un *BAC-array* è meno accurato nella definizione, sia per quanto attiene alle dimensioni che alla localizzazione dei punti di rottura di un riarrangiamento. Tuttavia, la risoluzione effettiva di un *microarray* può essere diversa rispetto a quella teorica, in quanto dipende anche dall'intensità del segnale e dal rumore di fondo che caratterizza ogni piattaforma, nonché dall'algoritmo utilizzato per analizzare i risultati (vedi paragrafo 3.2).

Gli studi di *array-CGH* nei pazienti con ritardo mentale costituiscono la fonte principale di informazioni sull'efficienza della tecnica nell'identificare le anomalie genomiche. I *BAC-array* con una spaziatura media di 1Mb hanno dimostrato una *detection rate* (percentuale dei pazienti nei quali viene identificata un'anomalia rispetto a tutti i pazienti analizzati) pari a circa 8-10% (Menten et al. 2005). Gli *array* a maggiore risoluzione, come i *tiling-path BAC-array* o altre piattaforme con una distanza media di 20-100 Kb si sono dimostrati più sensibili, aumentando la *detection rate* al 10-15% dei soggetti esaminati. **In base a questi risultati, si raccomanda, al fine di ottimizzare la resa diagnostica, di utilizzare per l'analisi *array-CGH* piattaforme che garantiscano una risoluzione minima effettiva di almeno 250 Kb.**

3.2 Qualità dell'analisi *array-CGH* e criteri di identificazione delle CNVs

Le regioni genomiche con variazioni del numero di copie vengono di solito identificate con specifici *software* e algoritmi di analisi dei valori misurati sperimentalmente. L'efficienza di questi algoritmi dipende da alcuni parametri sperimentali, come l'intensità di fluorescenza emessa dalle sonde e il rapporto tra l'intensità di fluorescenza delle sonde e il rumore di fondo. Questi valori dipendono inoltre dalla qualità del DNA di partenza e dal protocollo sperimentale (amplificazione, digestione, marcatura e ibridazione). La definizione dei parametri di qualità può variare, a seconda del tipo di piattaforma utilizzata (es.: *array* a oligomeri o *array* a BAC; *array* commerciali o *array* costruiti in casa) e del protocollo sperimentale utilizzato. Per questo è difficile fissare parametri comuni a tutti i laboratori.

In base a quanto deliberato dalla Conferenza Stato-Regione nella seduta del 26/11/2009 (comma a,b,c,d), visto quanto stabilito come obiettivo 2 e 4 dalla Commissione Ministeriale per la Genetica nel Servizio Sanitario Nazionale e considerate le procedure di certificazione SIGU-Cert, che la Società Italiana di genetica Umana ha predisposto, al fine di garantire elevati standard di qualità, è indispensabile che ogni laboratorio esegua internamente una validazione del protocollo e della piattaforma *array* scelta. Questa validazione dovrebbe essere effettuata mediante l'analisi di almeno 5 campioni di controllo normali e con sbilanciamenti, provenienti possibilmente da un altro laboratorio che ha già una documentata esperienza in questo tipo di analisi (per i dettagli tecnici e le procedure si raccomanda di fare riferimento alle Linee Guida dell'American College of Medical Genetics – Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratorie-Ed 2008).

Si raccomanda che ogni laboratorio:

- 1) **stabilisca parametri minimi di qualità del DNA** prima di eseguire il test (paragrafi E13.3.2 e E13.3.3 delle linee guida dell'ACMG);
- 2) **stabilisca i criteri di esecuzione della *Whole Genome Amplification* e validi il protocollo** di amplificazione utilizzando campioni già caratterizzati (normali e sbilanciati) (paragrafo E13.3.3 delle linee guida dell'ACMG);
- 3) **stabilisca il metodo di normalizzazione:** per le piattaforme commerciali possono essere adottati i sistemi di controllo di qualità di solito inclusi nei *software* analitici, mentre per piattaforme costruite in casa il laboratorio deve fissare i parametri e i criteri qualitativi degli esperimenti [paragrafo E13.3.4 (E13.3.4.1, E13.3.4.2 e E13.3.4.3) delle linee guida dell'ACMG].
- 4) **stabilisca i criteri di utilizzazione del DNA di riferimento** (insieme di campioni o singolo campione; comparabile o non comparabile per sesso) [paragrafo E13.3.3 (E13.3.3.2, E13.3.3.3 e E13.3.3.4) delle linee guida dell'ACMG] (vedi paragrafo 3.3 dell'attuale documento);
- 5) **validi l'algoritmo scelto e stabilisca il numero minimo di sonde necessarie e i valori assoluti minimi di *log-ratio*** (logaritmo, di solito in base 2, del rapporto delle fluorescenze), per identificare le variazioni del numero delle copie [paragrafo E13.3.4 (E13.3.4.2 e E13.3.4.3) delle linee guida dell'ACMG];
- 7) **stabilisca il livello minimo di mosaicismi rilevabile con questo tipo di analisi in relazione alla dimensione di una CNV.** A tale scopo ogni laboratorio dovrebbe procedere all'analisi di campioni costituiti da concentrazioni decrescenti e note di una linea cellulare con una CNV già caratterizzata e stabilire la concentrazione minima alla quale la CNV sia identificabile.
- 8) **stabilisca i criteri di interpretazione delle variazioni del numero delle copie rilevate** [paragrafo E13.3.5 delle linee guida dell'ACMG] (vedi paragrafo 3.4 dell'attuale documento);
- 9) **definisca i metodi e i protocolli di validazione per confermare le CNV** [paragrafo E13.3.6.3 (E13.3.6.3.1 e E13.3.6.3.2) delle linee guida dell'ACMG] (vedi paragrafo 3.5 dell'attuale documento).

Durante l'attività diagnostica si raccomanda di partecipare annualmente, in analogia alle indicazioni proposte per la citogenetica convenzionale e i test di biologia molecolare, **a programmi di certificazione di qualità esterna (CEQ)** e, qualora non siano ancora disponibili, vengano

analizzati in cieco campioni (normali e patologici) provenienti da un altro laboratorio (*proficiency testing*) (paragrafo E13.2.5 delle linee guida dell'ACMG).

3.3 DNA di riferimento

Come anticipato, le tecniche di analisi genomica basate su *array* non sono in grado di definire il valore assoluto dei cambiamenti del numero delle copie, ma il dato ottenuto è relativo al DNA di riferimento. In teoria, un'anomalia identificata con un'analisi *array-CGH* potrebbe essere attribuita sia al campione che al DNA di riferimento. Per differenziare le CNVs associate all'uno o all'altro genoma, **ogni laboratorio dovrebbe avere due diversi DNA di riferimento** (oppure 2 *pools*), **uno di sesso maschile e uno di sesso femminile, caratterizzati mediante una serie di ibridazioni con altri DNA ottenuti da soggetti non affetti, evidenziando e annotando le CNVs che li caratterizzano**. Molto spesso i *pool* di DNA genomici disponibili in commercio variano a seconda del lotto. Per questo sarebbe necessario caratterizzare ogni nuovo lotto di DNA di riferimento utilizzato nell'analisi, confrontandolo con quello del lotto precedente. Esistono tuttavia in commercio DNA ottenuti da linee stabili, che permettono di eludere questo problema.

Relativamente agli SNP-array, per i quali l'analisi comparativa è informatica, **si possono utilizzare sia set di riferimento forniti dalle ditte** (es. 270 campioni Hapmap analizzati), **sia campioni normali analizzati con la stessa piattaforma e la stessa tipologia di array** (minimo 50 soggetti equamente distribuiti tra i due sessi). L'uso di DNA di riferimento bene caratterizzati riduce la necessità di confermare le CNVs con tecniche indipendenti (vedere paragrafo 3.5).

3.4 CNVs 'benigne' e *database* delle varianti genomiche (*database of genomic variants*)

Sebbene il *database* delle varianti genomiche (<http://projects.tcag.ca/variation/>) sia uno strumento ancora in fase di sviluppo, rappresenta al momento il catalogo di riferimento per differenziare le CNVs 'benigne' (prive di significato patogenetico), da quelle patologiche. **Si raccomanda di considerare come 'benigna' una CNV presente in un campione in esame, che sia stata descritta in almeno 3 soggetti riportati nel *database* e con lo stesso orientamento (del/dup)** (Koolen et al., 2009).

Si raccomanda inoltre la consultazione e l'inserimento dei propri dati sperimentali nel *database* di Troina (<http://dbcnv.oasi.en.it/gvarianti/index.php>), attualmente condiviso da parecchi laboratori Italiani. Il *database* consente al momento la visualizzazione, in un contesto "*genome-browser*", le CNV identificate in oltre 2500 pazienti analizzati per *array* e permette di confrontare i propri dati con un campione "genomico" più omogeneo, utile soprattutto per individuare le CNVs benigne caratteristiche della popolazione Italiana. I dati fenotipici possono invece essere inseriti nel *database* di Siena (<http://www.biobank.unisi.it>), utilizzando lo stesso codice campione per l'inserimento nel *database* di Troina.

3.5 Validazione delle CNVs

Un aspetto dibattuto dell'analisi *array-CGH* è la validazione delle CNVs identificate sperimentalmente. In un esperimento in cui vengono ibridate alcune migliaia fino ad alcune centinaia di migliaia di sonde è estremamente probabile che alcune di esse non ibridino correttamente, con il rischio di generare risultati falsamente positivi. La probabilità che si verificano dei risultati falsamente positivi dipende anche dalla qualità dell'analisi. Ogni laboratorio dovrebbe determinare il tasso medio di risultati falsamente positivi per singolo esperimento. Questo parametro dovrebbe essere determinato con una serie di ibridazioni *self-self* nell'*array-CGH* (un esperimento di ibridazione nel quale si usa lo stesso DNA come campione e riferimento), con una

replica tecnica dell'esperimento negli *SNP-array*: teoricamente, in un esperimento di *array-CGH* non dovrebbe essere presente nessuna anomalia genomica, mentre nel caso degli *SNP-array* il profilo genomico dovrebbe essere identico nelle due repliche. Tuttavia, nella pratica, dato che alcune sonde non ibridano correttamente, si producono risultati falsamente-positivi.

Si raccomanda l'uso di test di conferma, soprattutto nei laboratori con un tasso di risultati falsamente-positivi elevato (> 1%) e nei casi in cui la CNV abbia una ridotta estensione (ai limiti del potere risolutivo della piattaforma utilizzata) e/o non si sovrapponga a una regione già descritta in un microriarrangiamento (del/dup). Ogni laboratorio dovrebbe specificare le tecniche che intende utilizzare per tali finalità e stabilirne i protocolli. Possibili tecniche utili a confermare i risultati sono la FISH, la MLPA, la PCR quantitativa oppure la ripetizione dell'*array CGH* con un altro DNA di riferimento. Quando possibile, il laboratorio dovrebbe privilegiare l'analisi FISH, per allargare l'indagine a altri familiari del soggetto in esame, dato che questo test di conferma può definire il meccanismo dello sbilanciamento e precisare il rischio di ricorrenza.

4. Raccomandazioni sull' accettazione del campione

L'*array-CGH* viene prevalentemente richiesta quando il genetista clinico non è in grado di identificare nel paziente una sindrome nota, ma le cui caratteristiche sono compatibili con uno sbilanciamento genomico. Quando viene identificata una delezione o una duplicazione, è necessario testare i genitori per verificarne l'origine de novo. Il test sul DNA dei genitori è pertanto parte integrante del test stesso. Si raccomanda di evitare di richiedere il DNA dei genitori solo nei casi positivi perché questo induce alla scrittura di un referto con scarsa possibilità di commento sul ruolo patogenetico. Si raccomanda di non comunicare oralmente il risultato al genetista clinico (affinché richiami il paziente per il prelievo) perché questo induce a una cattiva gestione della consulenza genetica, a poca chiarezza con il paziente e alla generazione di una stato di ansia nella famiglia. **Si raccomanda di accettare solo campioni trios ovvero di chiedere in vista del test, i campioni del probando e dei due genitori** (salvo casi di adozione o indisponibilità di un genitore all'analisi). Si raccomanda inoltre di chiedere al genetista clinico che richiede l'analisi di descrivere brevemente le caratteristiche cliniche del paziente, che dovrebbero essere sintetizzate sul modulo di invio che accompagna il campione.

5. Raccomandazioni sulla divulgazione dell' informazione all' utente

Il test deve essere eseguito previo consenso del paziente (o del tutore legale), che deve essere messo preventivamente a conoscenza, in maniera chiara e esaustiva delle caratteristiche dell'analisi, dei suoi potenziali benefici e limiti, anche mediante un testo scritto. L'informativa deve contenere informazioni su:

- caratteristiche della tecnica;
- modalità di utilizzo;
- risoluzione dell'analisi;
- limiti del test;
- risultati attesi e loro significato
- eventuale necessità di confermare i risultati, eventualmente con un successivo prelievo, utilizzando tecniche differenti.

In riferimento alla "Autorizzazione al trattamento dei dati genetici" del Garante per la protezione dei dati personali (22.02.2007) il foglio informativo può contenere, qualora non venga somministrato separatamente, il consenso al prelievo e all'esecuzione dell'analisi anche per i

genitori e l'eventuale consenso, a conclusione dell'indagine, ad utilizzare ai fini di ricerca, ovvero ad eliminare, il campione biologico (sangue, DNA, etc.) residuo.

6. Raccomandazioni sulla compilazione del referto

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

- Dati anagrafici del paziente (nome, cognome, data di nascita);
- Numero di protocollo interno;
- Ente/clinico inviante (se la struttura erogante il test genetico è diversa da quella erogante la consulenza genetica);
- Indicazione sintetica all'analisi: ad esempio, palatoschisi e ritardo psicomotorio (= termine riservato a pazienti inferiori a 6 anni) oppure difetto del setto interatriale, caratteristiche facciali peculiari (evitare la parola *dismorfismi*) e ritardo mentale, ecc. L'indicazione sintetica all'analisi deve essere scritta solo nel caso in cui la struttura erogante il test genetico sia diversa da quella erogante la consulenza genetica. Viceversa, nel caso in cui la struttura sia la stessa, il referto di *array-CGH* viene scritto come "allegato" al referto della consulenza genetica e non necessita di questi dettagli che sono estesamente descritti nel referto di consulenza;
- Data di ricevimento;
- Data di refertazione;
- Dettagli tecnici dell'analisi:
 - o tipologia del campione (DNA da sangue periferico, da fibroblasti, etc. - WGA/non WGA);
 - o impostazione esperimento: trio analisi/campione vs DNA di riferimento (specificare il DNA di riferimento utilizzato); Dye-swap/non dye Swap; Sex mismatch/match
 - o Risoluzione/disegno dell'array;
- *Software* utilizzato per l'analisi (versione) e algoritmo di analisi, compreso il numero minimo di sonde considerate per l'inclusione di una CNV;
- Risultato dell'analisi con formula ISCN 2009 con definizione dei punti di rottura e *assembly* di riferimento (hg18,19);
- Analisi di conferma dei risultati (se eseguite), specificando i cloni, i microsatelliti oppure il gene analizzato;
- Limiti del test, compresi i livelli bassi di mosaicismo (generico o stabilito in base al punto 3.2.7);
- Commento ai risultati: se le raccomandazioni sull'accettazione del campione (vedi punto 4) sono state seguite, al momento della scrittura del referto è in genere noto il dato sul DNA dei genitori. In base a questo dato e in base all'integrazione di questo dato con l'analisi dei database (paragrafo 3.4) e con l'analisi della letteratura, si possono generare 4 differenti tipi di risposte:

1) risposte negative. La risposta non ha commenti particolari se non quelli legati alla parte tecnica. **Si raccomanda di non refertare i polimorfismi noti ma di aggiungere una frase "i polimorfismi noti sono disponibili su richiesta" OPPURE "Non sono state considerate nell'interpretazione dei risultati le variazioni del numero di copie di quei loci noti come siti benigni considerate non patogenetiche alla data della refertazione".**

2) risposte positive: de novo o ereditate, relative a sindromi note. La risposta non ha commenti particolari se non quelli legati alla parte tecnica. La rilevanza clinica è in genere chiara, si deve aggiungere solamente: **Si consiglia consulenza genetica.**

3) risposte con riarrangiamento “privato de novo”. Si tratta di un riarrangiamento non riportato come polimorfismo e che sembra essere “privato” del paziente, de novo.

“L’analisi ha evidenziato la presenza di un’alterazione de novo che ad oggi non assume un chiaro significato patogenetico. Tuttavia, la presenza di geni suggerisce che lo sbilanciamento sia potenzialmente causativo della condizione clinica. Si consiglia consulenza genetica” oppure (per CNVs di estensione molto ridotta e/o con geni poco caratterizzati) “...Tuttavia, la presenza di geni non esclude che lo sbilanciamento sia potenzialmente causativo della condizione clinica. Si consiglia consulenza genetica”.

4) risposte con riarrangiamento “privato ereditato”. Si tratta di un riarrangiamento non riportato come polimorfismo e che sembra essere “privato” del paziente, ma ereditato da un genitore non affetto.

In questi casi si raccomanda il seguente commento sul referto “l’analisi ha evidenziato la presenza di un’alterazione, ereditata da un genitore, che ad oggi non assume un chiaro significato patogenetico. Tuttavia, il coinvolgimento del riarrangiamento come concausa della malattia non può essere escluso. Si consiglia consulenza genetica”

5) risposte con riarrangiamento noto in letteratura (ereditato o no) come concausa di malattia. Si tratta dei cosiddetti riarrangiamenti a bassa penetranza. **In questo caso si raccomanda il seguente commento sul referto “Secondo le conoscenze attuali il riarrangiamento può essere una concausa di malattia. Si consiglia consulenza genetica”.**

Bibliografia

Baptista J, Mercer C, Prigmore E, et al. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am J Hum Genet.* 2008 Apr;82(4):927-36

De Gregori M, Ciccone R, Magini P, et al. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet.* 2007 Dec;44(12):750-62.

Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet.* 2005 Jan;42(1):8-16.

Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, et al. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat.* 2009 Mar;30(3):283-92

Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, et al. Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One.* 2007 Mar 28;2(3):e327.

Menten B, Pattyn F, De Preter K, et al. arrayCGHbase: an analysis platform for comparative genomic hybridization microarrays. *BMC Bioinformatics.* 2005 May 23;6:124

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010 May 14;86(5):749-64.

Newman WG, Hamilton S, Ayres J, et al. Array comparative genomic hybridization for diagnosis of developmental delay: an exploratory cost-consequences analysis. *Clin Genet.* 2007 Mar;71(3):254-9

Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet.* 2005 Jul;77(1):78-88

Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007 Nov;15(11):1105-14. Epub 2007 Jul 18