



Società Italiana di Genetica Umana  
Italian Society of Human Genetic

# Indicazioni per la refertazione di analisi genetiche eseguite mediante metodica Next-Generation-Sequencing (NGS).

**Redatto da:** Gruppo di Lavoro SIGU, GdL di Genetica Molecolare (due mandati)

**Coordinatore:** Enrico Tagliafico (per la prima stesura), Silvia Russo (stesura definitiva)

**Estensori:** Maria Iascone, Annalisa Botta, Domenico Coviello, Elena Tenedini, Paola Carrera, Francesca Cogliati, Maria Rosaria D'Apice, Marina Grasso, Lorenza Pastorino, Manuela Seia

**Revisionato da:**

Vincenzo Nigro e Marco Montagna

## Indice

<b>Introduzione</b>	2
<b>Scopo del documento</b>	3
<b>Organizzazione e contenuti del referto</b>	4
1. Titolo	4
2. Anagrafica e tracciabilità del campione	4
3. Indicazione al test.....	5
4. Descrizione del test eseguito	5
5. Risultati	8
6. Rivalutazione delle VUS nel tempo	10
7. Conclusioni diagnostiche	11
8. Note	11
9. Firme.....	11
<b>Bibliografia</b>	11
<b>Allegato 1: <u>Templato esemplificativo del referto</u></b>	14



## Introduzione

La diffusione delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) nei Laboratori di Genetica Medica ha portato alla necessità di standardizzare ed armonizzare la refertazione di tali analisi in un contesto clinico-diagnostico.

La stesura di un referto di NGS segue le indicazioni valide in generale per qualsiasi tipo di referto di laboratorio (es. anagrafica, tracciabilità del campione, etc.) o specifiche per i referti di genetica medica (es. quesito clinico, descrizione del metodo, interpretazione, implicazioni per i familiari, etc.) includendo alcuni aspetti peculiari, insiti nell'applicazione delle tecnologie NGS.

Il referto deve essere *completo* per fornire agli esperti i dettagli tecnici necessari per una valutazione di ciò che è stato eseguito, *comprensibile* per i professionisti non specialisti del settore e per i pazienti, *non troppo lungo* per evitare una sovrabbondanza di informazioni che ne rendono pesante la lettura e la comprensione (1).

Le tecnologie NGS sono attualmente utilizzate in diagnostica per analizzare soprattutto pannelli di geni (fisici o virtuali) o in maniera "wide" l'insieme dei geni connessi a malattie nell'uomo (Esoma clinico o Mendelioma, ES), l'intero esoma (WES, Whole Exome Sequencing) o il genoma (WGS, Whole Genome Sequencing). L'utilizzo di un pannello fisico di geni, di un pannello virtuale o di un metodo "wide" ha una ricaduta sulla sensibilità e specificità analitica così come sulla resa diagnostica, piuttosto che sulla affidabilità con cui una variante viene rilevata (*read depth*) e/o sulla completezza con cui viene esaustivamente coperta ogni regione target (*coverage*), in altri termini, come tutte le tecniche di laboratorio ogni approccio ha dei vantaggi e limiti che devono essere considerati per un utilizzo a fini diagnostici.

Per esempio, qualsiasi metodo mirato deve garantire la copertura totale della regione di interesse (ROI), specificata nel referto e la completezza di rilevazione di varianti (SNV, CNV, mosaicismi). Tale accuratezza di rilevazione è più difficilmente realizzabile con ES, con WES o con WGS, che compensano con l'ampiezza del numero di geni, un approccio agnostico e una più alta resa diagnostica. D'altra parte, il risultato negativo di un pannello fisico/virtuale o di un approccio wide deve prevedere la possibilità di una rivalutazione o revisione periodica dei dati di sequenziamento.

Nel caso dei pannelli (fisici e virtuali) la scelta dei geni da analizzare e da includere nel referto deve tener conto delle evidenze scientifiche che supportano il ruolo causativo degli stessi ed i geni devono essere attentamente selezionati sulla base del quesito diagnostico nonché della loro utilità clinica, per evitare di produrre referti contenenti lunghi elenchi di varianti non relate all'indicazione clinica. Esistono numerose iniziative in diversi Paesi (es. Panel App: <https://panelapp.genomicsengland.co.uk/>) e collaborazioni internazionali (es. ClinGen: <https://clinicalgenome.org/> e GenCC:



<https://search.thegencc.org/> e <https://webgate.ec.europa.eu/ern/>) che aiutano e supportano i laboratori nella scelta dei geni-malattia da includere nei pannelli a fini diagnostici.

Le varianti da riportare nel referto devono rispondere al quesito clinico (motivazione all'esecuzione del test), tenendo conto delle caratteristiche della malattia (es. incidenza della stessa, modalità di trasmissione, etc.), dei meccanismi eziopatogenetici (es. varianti che causano aploinsufficienza, perdita o guadagno di funzione, etc.), di considerazioni epidemiologiche (es. frequenza della variante nella popolazione generale) e classificate sulla base delle linee guida ACMG (2,3).

La classificazione delle varianti o interpretazione delle stesse va oltre lo scopo di questo documento, si ricorda che tale compito deve essere effettuato da professionisti con comprovate competenze di genetica molecolare, come lo specialista di genetica medica e che per quanto siano stati sviluppati svariati strumenti bioinformatici (es. Varsome, Intervar, etc.) per supportare il genetista in tale compito, nessuno strumento può o deve sostituirsi al giudizio esperto finale del genetista che firma il referto.

Le varianti riportate nel referto devono limitarsi a quelle *consistenti con il quesito clinico* ed essere classificate come patogenetiche (classe 5) o probabilmente patogenetiche (classe 4) e di significato sconosciuto (classe 3) (2,3,4). Tutte le varianti riportate devono essere state confermate con un metodo ortogonale e, possibilmente utilizzando un'aliquota indipendente di DNA. È indispensabile evitare che il referto sia costituito da un lungo elenco di varianti senza interpretazione e/o senza utilità clinica, per evitare fraintendimenti e difficoltà di gestione clinica.

## SCOPO DEL DOCUMENTO

L'obiettivo di questo documento è di fornire **indicazioni generali che siano adattabili nei contesti applicativi dei diversi laboratori diagnostici**, tenendo conto della continua evoluzione tecnologica, metodologica e di conoscenze del settore.

**Il referto è il documento finale di un lungo processo ed è ciò che resta al paziente ed al medico che si occupa di seguirlo. Per questo motivo, deve essere redatto con un linguaggio chiaro ed essere, per quanto possibile, conclusivo rispetto al quesito clinico; l'interpretazione della o delle varianti deve essere formulata in modo chiaro e deve essere chiara la sua pertinenza con i dati clinici del paziente, tenendo conto della ricaduta sul follow-up, sulla famiglia o sul trattamento qualora sia disponibile.**



Si ricorda, infine, che la firma del referto e la responsabilità di quanto eseguito e riportato, richiede competenze e qualifiche proprie dello specialista in genetica medica.

## Organizzazione e contenuti del referto

***Metodologia utilizzata:*** per la formulazione delle indicazioni riportate in questo documento si è tenuto conto degli esempi di referto proposti da ACMG (2) e da ACGS (4). Inoltre sono stati raccolti esempi di referto in uso nei laboratori italiani, membri del GdL di Genetica Molecolare.

Il referto deve riportare nell'intestazione: l'identificazione del laboratorio, l'Ospedale/Istituto; il Direttore; i recapiti e le eventuali certificazioni di qualità del laboratorio (es. UNI EN ISO 9001) e/o di accreditamento (es. UNI EN ISO 15189, UNI CEI EN ISO/IEC 17025).

Il referto è composto da varie sezioni (vedi layout allegato): 1) titolo, 2) anagrafica e tracciabilità del campione, 3) indicazione al test e descrizione sintetica, 4) risultato sintetico, 5) dettaglio dei risultati, 6) interpretazione, conclusioni e suggerimenti, 7) data e firma dei professionisti responsabili dell'analisi, e 8) dettagli tecnici e metodologici, limiti, etc.

Alcune di queste sezioni sono comuni a tutti i referti di medicina di laboratorio, altre sono specifiche dei referti di genetica medica, altre ancora sono peculiari dei referti basati su tecnologia NGS. L'ordine dei campi è indicativo e può essere modificato compatibilmente con il sistema gestionale della refertazione di ciascun laboratorio.

**1.Titolo:** deve contenere il tipo di malattia o spettro di disordini per cui è indicata quell'analisi molecolare o la metodologia

## 2.Anagrafica e tracciabilità del campione

Questa sezione è comune a tutti i referti di laboratorio e contiene indicazioni allo scopo di garantire l'identità e la tracciabilità del campione.

Il campo "etnia" è necessario per alcune patologie, dove l'incidenza della malattia e di conseguenza il rischio riproduttivo variano a seconda dell'origine etnica. Può essere importante anche nel valutare la patogenicità di una variante apparentemente rara, poiché etnie diverse possono avere frequenze differenti. Poiché è un requisito specifico per un certo tipo di analisi e/o contesto, può essere riportato nei dettagli oppure no.

a. **INTESTAZIONE:** identificazione laboratorio comprensiva dei contatti (ospedale/istituto; direttore; Indirizzo/telefono/ indirizzo e-mail; eventuali certificazioni di qualità del laboratorio (es. UNI EN ISO 9001) e/o di accreditamento (es. UNI EN ISO 15189, UNI CEI EN ISO/IEC 17025) .



- b. ANAGRAFICA: cognome, nome, data di nascita, sesso, etnia qualora sia appropriato (per le etnie miste si raccomanda di indicare l'origine geografica di genitori).
- c. Codice Identificativo univoco del campione biologico.
- d. Data di raccolta (prelievo) del campione biologico
- e. Data di accettazione amministrativa del campione
- f. Tipo di campione biologico (sangue, biopsia, liquido amniotico etc., materiale bioptico, -indicare se tessuto FFPE, congelato o fresco-plasma o altro fluido biologico per biopsia liquida)
- g. Data del referto, all'inizio o alla fine del documento, di modo che sia facilmente visibile
- h. Numero di pagina rispetto al numero di pagine complessivo, allegati inclusi
- i. Medico che ha posto il sospetto clinico: si intende che, seppure indicarlo sul referto sia facoltativo, è importante che il laboratorio abbia il riferimento del medico che pone il sospetto diagnostico, invia i dati clinici e commenterà il referto del test. Questo medico potrebbe coincidere con il medico che firma il consenso informato.

### 3. Indicazione al Test

a. **Indicazione clinica:** le informazioni cliniche sono un criterio chiave nell'interpretazione delle varianti. Esse riguardano non solo la sindrome sospettata, che potrebbe essere scritta nel titolo del referto, ma anche i segni clinici che hanno suggerito di eseguire l'analisi genetica. Molto utile a tal proposito è la compilazione di questionari *ad hoc* o l'invio di copia della lettera di dimissione. così come l'utilizzo di termini HPO (Human Phenotype Ontology) ed eventuale documentazione a seguito di esami strumentali o di laboratorio. Per il genetista che analizza ed interpreta le varianti identificate è di **FONDAMENTALE IMPORTANZA AVERE A DISPOSIZIONE INFORMAZIONI CLINICHE PRECISE**. Ad esempio di ciò, si tenga conto che una variante *de novo*, confermata sui genitori, può essere considerata PS2 (Strong) solo se il quadro clinico è compatibile con quelli riportati per varianti in quel gene. Lo stesso genetista deve essere preparato ed aggiornato sulla letteratura che riguarda i geni di cui si occupa, conoscere la struttura del gene, la funzione, il tipo di varianti identificate e le modalità di trasmissione di una certa malattia.

b. **Quesito diagnostico:** indicare se il test diagnostico è postnatale o prenatale ed il tipo di analisi che verrà effettuata. Nel quesito diagnostico si dovrebbe riaffermare esplicitamente il sospetto clinico posto, ad esempio: "Cardiomiopatia ipertrofica" indica che non vengono analizzati tutti i geni delle Cardiomiopatie.



## 4. Descrizione del test eseguito

**Geni esaminati:** devono essere indicati in questo campo il tipo di pannello di geni se commerciale oppure **l'elenco dei geni** che verranno analizzati con le **isoforme studiate** (ad esempio pannello multigenico per sordità sindromica, oppure non sindromica, oppure X-linked) e **versione hg del genoma di riferimento**. I geni analizzati devono essere congruenti con l'indicazione al test.

I geni di un pannello sono spesso in numero troppo elevato per essere riportati in questa sezione; in questi casi è opportuno indicare "per l'elenco dei geni vedi foglio allegato" ed allegare un foglio separato ove riportare i geni esaminati. Se si esegue un ES, WES o WGS, ma si analizzano solo alcuni geni, indicare i geni analizzati (pannello virtuale).

È importante ricordare che in un pannello eseguito **per attività di diagnostica dovrebbero essere indagati i geni GAD (Gene Associated with Disease)** le cui varianti patogenetiche sono associate in maniera definitiva ad un preciso fenotipo oppure i geni per cui vi sono solide evidenze oppure geni che sono associati a diagnosi differenziali (quindi sempre compatibili con le indicazioni cliniche). I geni GUS (Genes of Uncertain Significance), ossia geni la cui associazione con il fenotipo non è stata validata, con penetranza variabile o di recente associazione ad un dato fenotipo, non devono essere inseriti in un pannello di diagnostica. Rispetto a questo tema rimandiamo agli standard tecnici di ACMG, Bean et al, 2020 (5). Esistono numerose iniziative in diversi Paesi (es. Panel App: <https://panelapp.genomicsengland.co.uk/>) e collaborazioni internazionali (es. ClinGen: <https://clinicalgenome.org/> e GenCC: <https://search.thegencc.org/>) che aiutano e supportano i laboratori nella scelta dei geni-malattia da includere nei pannelli multigenici da utilizzare a fini diagnostici.

### a. Metodi di indagine

In questo paragrafo **si riportano le informazioni essenziali sulle metodologie utilizzate**. Il paragrafo sui metodi può anche essere riportato alla fine del referto, in una seconda pagina -**TARGET**: indica le regioni genomiche che vengono effettivamente sequenziate ed il numero di basi garantite per le regioni non codificanti (UTR, giunzioni introne-esone). Secondo un aggiornamento di ACMG (1) un'analisi delle giunzioni esone-introne che garantisca la copertura fino alla posizione -16 al sito accettore e +5 al sito donatore rivelerebbe >97% delle varianti introniche patogenetiche e probabilmente patogenetiche (classi 4 e 5). Spesso queste regioni non vengono sequenziate e la raccomandazione di ACMG è quella che i laboratori di provvedano invece alla loro analisi. Infine, è opportuno indicare tutte le eventuali porzioni geniche non coperte.



**-SEQUENZIAMENTO NGS:** in questo paragrafo si riporta il metodo, il tipo di kit utilizzato per l'arricchimento dei target genici e la piattaforma NGS utilizzata; si riporta anche la metodica con cui si analizzano le regioni non coperte con NGS, con indicazione della loro percentuale. Nel caso di pannelli multigenici, è raccomandabile indicarla gene per gene. In questo paragrafo, inoltre, si indica il/i metodo/i con cui vengono confermate le varianti riportate.

**-GENOMA DI RIFERIMENTO:** GRCh37-hg19 o GRCh38

**-DATABASE E SOFTWARE USATI** (con indicazione della versione): es: HGMD – dbSNP – DGV – GnomAD - ClinVar- Varsome, etc.

**-SPECIFICITA' ANALITICA:** è opportuno indicare la proporzione di varianti correttamente identificate dal test come la stessa variante, qualora paragonata con la sequenza reference, in un particolare campione (2). I valori di specificità analitica possono anche essere calcolati per i vari pannelli all'interno dei programmi di VEQ. Per una variante germinale, il laboratorio deve definire i range di frequenza allelica, Variant Allele Frequency, che distingua le vere chiamate dalle false chiamate. Viene suggerito (2) di considerare eterozigote una chiamata presente con una VAF >25% ed omozigote una variante con una VAF>85%.

**-SENSIBILITÀ ANALITICA:** è opportuno indicare la proporzione di varianti correttamente identificate come varianti "diverse", qualora paragonate con la sequenza reference, in un particolare campione (2). Il falso negativo può essere calcolato come la sensibilità. La sensibilità analitica è descritta dal coverage e dalla profondità minima di lettura di ciascun target. In generale la sensibilità del saggio dovrebbe essere >98%. Se il laboratorio non ha misurato la sensibilità del proprio test, può essere inserita una frase che riporti i dati di letteratura: "è opportuno sottolineare che sia fattori sperimentali che genetici possono concorrere nel ridurre la sensibilità del test genetico NGS. I dati della letteratura suggeriscono che la sensibilità del metodo adottato per questa analisi sia superiore al 98% per le SNVs mentre si riduce restando superiore al 94% per le mutazioni indel".

**-ANALISI DI DELEZIONI/DUPLICAZIONI, INSERZIONI, CNV:** indicare se il metodo utilizzato analizza queste tipologie. Le CNVs vengono identificate mediante algoritmi dedicati che richiedono profondità di lettura, coverage e validazione adeguate. Le CNVs non andrebbero riportate se non validate con metodica indipendente (array, MLPA, etc.). In questo paragrafo, inoltre, si indica il/i metodo/i utilizzato/i per confermare le eventuali DELEZIONI/DUPLICAZIONI, INSERZIONI, CNV riportate nel referto.

**Le seguenti informazioni metodologiche andranno inserite nelle note del metodo, alla fine del referto (vedi template)**



-PIPELINE: indicare se “in-house” o commerciale. Qualora si usino pipeline “in-house” è necessario che siano state validate nel laboratorio. La validazione può avere livelli diversi secondo il tipo di applicazione clinica che avrà il risultato del test. Una pipeline con lo stesso input standard dovrebbe produrre sempre lo stesso output (6).

-ANALISI dei DATI: indicare in questo campo gli strumenti con cui vengono analizzati i dati (per NGS: Sophia DDM, Agilent-Alissa, Illumina-Dragen, etc. o per il Sequenziamento Sanger: Sequencing Analysis, SeqScape, etc.)

- ACCURATEZZA: indicare l’accuratezza con cui viene identificata una variante, quella attesa è > 99% per le SNVs e nell’intervallo 95-98% per le altre varianti (2). Tuttavia, va tenuto presente che in alcune regioni del genoma, in particolare nelle regioni ricche in G/C, in regioni ripetute o in presenza di pseudogeni, l’accuratezza può diminuire e non essere omogenea.

-LIMITI DEL METODO: indicare ciò che il tipo di approccio non può rivelare, come varianti deep intronic, riarrangiamenti genomici, espansioni di triplette (questi difetti richiedono pipelines dedicate), alterazioni al di fuori delle regioni coperte dal test; indicare quale percentuale di mosaicismo si riesce a valutare. E’ importante ricordare che il mosaicismo e le varianti mitocondriali eteroplasmiche richiedono un coverage molto elevato. Talvolta la presenza di regioni omologhe o duplicate che vengono catturate può generare chiamate con falsi positivi o falsi negativi, specie se è stato effettuato un sequenziamento short reads.

-CONFERMA DELLE VARIANTI: tutte le varianti riportate sul referto devono essere confermate con metodi ortogonali su un campione indipendente (ad es. una nuova estrazione) oppure riportare la motivazione per cui non si ritiene indispensabile eseguire la validazione (ad es. tracciabilità completa del campione e un coverage delle varianti riportate >40x). La conferma su campione indipendente potrebbe essere omessa solo nel caso di esami in trio che si confermano a vicenda e qualora le varianti ereditate dal probando si ritengano confermate da un coverage adeguato.

-STUDIO DELLE REGIONI NON COPERTE: indicare le regioni non coperte che siano state indagate con altra metodica (o al contrario se non sono state indagate) per il raggiungimento della copertura indicata nella sensibilità analitica ed indicazione del metodo utilizzato (ad es. mediante Sanger/Nextera). Riportare, infine, eventuali statistiche non coincidenti con la sensibilità analitica dichiarata.

## 5. RISULTATI



In questo campo si riporta il GENOTIPO IDENTIFICATO con nomenclatura HGVS (<https://varnomen.hgvs.org>).

Per ogni variante devono essere indicati gene, isoforma, zigosità, secondo la nomenclatura HGVS (3). Si consiglia di consultare il sito HGVS periodicamente per verificare eventuali aggiornamenti e riportare la versione consultata; motivare l'interpretazione delle varianti come classe 4 e 5 ed indicare eventuali approfondimenti eseguiti, quali ad esempio studio dei genitori e dei familiari, analisi del trascritto nelle varianti di splicing, studi funzionali o altro.

Vanno segnalate nel risultato regioni o geni che non abbiano raggiunto la copertura dichiarata nei metodi.

#### Quali varianti DEVONO ESSERE RIPORTATE nel referto? (ACMG (2,3) e da ACGS (4))

Si consiglia di seguire le raccomandazioni ACMG e ACGS per la classificazione e la refertazione delle varianti al fine di evitare la scrittura di referti contenenti lunghi elenchi di varianti non relate all'indicazione clinica. Quando disponibili, privilegiare le linee guida gene-specifiche.

- a) Le varianti di classe 5 e 4, ossia varianti patogenetiche o probabilmente patogenetiche che confermano la diagnosi clinica o il sospetto di diagnosi clinica o una diagnosi differenziale;
- b) Varianti di significato incerto con un'alta probabilità di correlazione clinica per le quali successivi approfondimenti, suggeriti nel referto, permetteranno di aumentare/escludere la classe di patogenicità.

Si riportano alcuni ESEMPLI (non esaustivi): studio genitori in varianti supposte *de novo* pediatriche; analisi del trascritto in varianti di splicing; studio dei familiari per verificare la segregazione del fenotipo; studio dei genitori per verificare la condizione *in trans* delle varianti che hanno una modalità di trasmissione recessiva, test biochimici se disponibili (malattie metaboliche), epesignature per geni cromatinici.

Le varianti di classe 3 possono essere riportate in una tabella allegata, ma si ricorda che devono essere confermate.

Si riportano alcuni esempi che possono essere adattati a seconda del quesito clinico

**Caso 1):** NON si trovano varianti che possano spiegare il quadro clinico, si scriverà:  
"Non sono state identificate varianti di rilevanza patogenetica compatibili con l'indicazione clinica". A fronte di un quadro clinico preciso, un risultato come questo dovrebbe chiaramente non escludere una diagnosi, ma indirizzare ad altri meccanismi relati a quella patologia. Specificare nel testo cosa non viene riportato (ad es delezioni/duplicazioni intrageniche) e, ove possibile, la sensibilità diagnostica del test rispetto al quesito clinico allo stato attuale delle conoscenze.



**Caso 2):** si identificano una/due (AD o AR) varianti di tipo 5 (patogenetica) o 4 (probabilmente patogenetica): si scriverà il genotipo identificato utilizzando la nomenclatura HGVS, la zigosità e la motivazione per cui viene attribuita alla/e variante/i tale classificazione. Si utilizzino a tale proposito le indicazioni ACMG. Ad esempio citare la letteratura se è già stata riportata, i database se la variante non ha frequenza allelica perché non è mai stata osservata nella popolazione generale, etc.

**Caso 3):** si identificano solo varianti VUS. Si descriveranno solo le VUS con un'alta probabilità di correlazione clinica, secondo quanto riportato sopra.

**IMPORTANTE: specificare nel referto che le varianti appartenenti a questa classe non devono essere utilizzate per decisioni di tipo clinico** fino a che non venga confermata la patogenicità in seguito ad approfondimenti.

**Caso 4):** lo studio di condizioni "complesse" in cui il contributo genetico non è necessariamente monogenico, ha evidenziato la necessità di identificare delle regole per l'eventuale refertazione di varianti a bassa penetranza più comunemente denominate "alleli di rischio". Poiché la letteratura scientifica a tal proposito è contraddittoria, si consiglia di limitare la refertazione a quegli alleli di rischio la cui validità clinica sia stata chiaramente definita e per i quali vi sia un'utilità clinica dimostrata da specifiche indicazioni e/o linee guida (7).

**ACMG (2; 8), evidenzia l'importanza che il clinico fornisca al laboratorio dettagli fenotipici e dati della storia familiare, ma anche caratteristiche del fenotipo apparentemente non collegate con il sospetto clinico.** Nella fase interpretativa è mandatoria un'interazione diretta tra clinici e laboratorio che può aiutare sia nella prioritizzazione delle varianti che nella loro interpretazione (8).

## RISULTATI SECONDARI

Soprattutto ES, WES e WGS possono generare dati inattesi, la cui comunicazione deve essere effettuata qualora sia menzionata tale possibilità nella spiegazione del consenso informato (colloquio pre-test) e se si ha la certezza della loro interpretazione (2, 8). E' condivisa l'idea di segnalare Risultati Secondari solo se il loro significato clinico sia chiaro, e se la conoscenza di questi risultati costituisca un beneficio per la salute del paziente in termini di prevenzione, gestione clinica e per il counselling. Anche in questo caso le varianti inserite nel referto devono essere state confermate.

Definizione di Risultati Secondari derivanti da analisi di sequenziamento in genomica clinica (9,10): **"i Risultati Secondari sono rappresentati da varianti patogenetiche o probabilmente patogenetiche in geni-malattia che non sono correlati all'indicazione al test genetico richiesto. Si raccomanda di seguire le indicazioni di ESHG su opportunistic screening"** (11)



## 6.RIVALUTAZIONE DELLE VUS NEL TEMPO

Nei referti negativi in cui siano riportate solo VUS, è raccomandato dichiarare che le varianti saranno riclassificate con l'aggiornamento della letteratura e comunicare l'eventuale disponibilità a rivalutarle su richiesta del clinico referente. Se il laboratorio "incidentalmente" ri-classifica a distanza di tempo la variante perchè identificata in un nuovo caso, il paziente verrà ricontattato. A questo proposito, ACMG e ACGS raccomandano di conservare i dati ed eventualmente eseguire una rianalisi utilizzando pipeline ottimizzate.

## 7.CONCLUSIONI DIAGNOSTICHE

In questa sezione **SI SPECIFICA L'INTERPRETAZIONE DELLE VARIANTI RIPORTATE IN RELAZIONE ALLA CONDIZIONE CLINICA**; dove possibile il referto dovrebbe essere conclusivo rispetto al quesito clinico.

In caso di riscontro di varianti patogenetiche o probabilmente patogenetiche, se possibile, indicare il rischio riproduttivo, la disponibilità della diagnosi prenatale o preimpianto, e se opportuno lo studio di familiari.

**Tuttavia per una più esaustiva interpretazione SI RACCOMANDA SEMPRE LA CONSULENZA GENETICA** e, se appropriato, il follow-up clinico.

Più in generale, indipendentemente dalla classificazione delle varianti riscontrate, è bene che il referto indichi in maniera esplicita e non fraintendibile se i dati molecolari evidenziati sono utilizzabili a scopo clinico.

## 8.NOTE

Note da dichiarare:

- devono essere riportate le tipologie di varianti non segnalate nel referto (ad es. le varianti di classe 1 e di classe 2, le varianti nelle regioni introniche più profonde, come riportato nelle specifiche e/o localizzate nelle regioni 5'/3' UTR, etc.)
- deve essere riportata chiara indicazione che il laboratorio ha superato i controlli esterni di qualità (con preciso riferimento al tipo e all'anno cui si riferiscono).

## 9.FIRME



Il referto deve essere firmato all'ultima pagina, in modo che sia chiaro che il Responsabile abbia verificato, validato e approvato l'intero contenuto dello stesso.

## Bibliografia

1. Farmer GD, Gray H, Chandratillake G, Raymond FL, Freeman ALJ. Recommendations for designing genetic test reports to be understood by patients and non-specialists. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(7):885-895. doi:10.1038/s41431-020-0579-y
2. Rehder C, Bean LJH, Bick D, Chao E, Chung W, Das S, O'Daniel J, Rehm H, Shashi V, Vincent LM; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Next-generation sequencing for constitutional variants in the clinical laboratory, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2021 Aug;23(8):1399-1415. doi: 10.1038/s41436-021-01139-4. Epub 2021 Apr 29. PMID: 33927380.
3. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
4. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease 2020 Sian Ellard, Emma L Baple, Alison Callaway, Ian Berry, Natalie Forrester, Clare Turnbull, Martina Owens, Diana M Eccles, Stephen Abbs, Richard Scott, Zandra C Deans, Tracy Lester, Jo Campbell, William G Newman, Simon Ramsden and Dominic J McMullan
5. Bean LJH, Funke B, Carlston CM, Gannon JL, Kantarci S, Krock BL, Zhang S, Bayrak-Toydemir P; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Diagnostic gene sequencing panels: from design to report-a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2020 Mar;22(3):453-461. doi: 10.1038/s41436-019-0666-z. Epub 2019 Nov 16. PMID: 31732716.
6. Monaghan, K. G. et al. ACMG policy statement. 2013. Risk categorization for oversight of laboratory-developed tests for inherited conditions. *Genet. Med.* 15, 314–315
7. Senol-Cosar O, Schmidt RJ, Qian E, Hoskinson D, Mason-Suares H, Funke B, Lebo MS. Considerations for clinical curation, classification, and reporting of low-penetrance and low effect size variants associated with disease risk. *Genet Med.* 2019 Dec;21(12):2765-2773. doi: 10.1038/s41436-019-0560-8. Epub 2019 May 31. PMID: 31147632. Bush LW, Beck AE, Biesecker LG, Evans JP, Hamosh A, Holm IA, Martin CL, Richards CS, Rehm HL. Professional



- responsibilities regarding the provision, publication, and dissemination of patient phenotypes in the context of clinical genetic and genomic testing: points to consider-a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2018 Feb;20(2):169-171. doi: 10.1038/gim.2017.242. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29323668; PMCID: PMC5931217.
8. Biesecker LG. Genomic screening and genomic diagnostic testing-two very different kettles of fish. *Genome Med.* 2019 Nov 27;11(1):75. doi: 10.1186/s13073-019-0696-9. PMID: 31775856; PMCID: PMC6882020.
  9. Ghazani AA, Gilmore MJ, Goddard KAB, Jarvik GP, Johnston JJ, Kauffman TL, Kelley WV, Krier JB, Lewis KL, McGuire AL, McMullen C, Ou J, Plon SE, Rehm HL, Richards CS, Romasko EJ, Miren Sagardia A, Spinner NB, Thompson ML, Turbitt E, Vassy JL, Wilfond BS, Veenstra DL, Berg JS, Green RC, Biesecker LG, Hindorff LA. Secondary findings from clinical genomic sequencing: prevalence, patient perspectives, family history assessment, and health-care costs from a multisite study. *Genet Med.* 2019 May;21(5):1100-1110. doi: 10.1038/s41436-018-0308-x. Epub 2018 Oct 5. Erratum in: *Genet Med.* 2019 Jan 22;; PMID: 30287922; PMCID: PMC6450774.
  10. Miller DT, Lee K, Chung WK, Gordon AS, Herman GE, Klein TE, Stewart DR, Amendola LM, Adelman K, Bale SJ, Gollob MH, Harrison SM, Hershberger RE, McKelvey K, Richards CS, Vlangos CN, Watson MS, Martin CL; ACMG Secondary Findings Working Group. ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2021 Aug;23(8):1381-1390. doi: 10.1038/s41436-021-01172-3. Epub 2021 May 20. Erratum in: *Genet Med.* 2021 Aug 3;; PMID: 34012068.
  11. de Wert G, Dondorp W, Clarke A, Dequeker EMC, Cordier C, Deans Z, van El CG, Fellmann F, Hastings R, Hentze S, Howard H, Macek M, Mendes A, Patch C, Rial-Sebbag E, Stefansdottir V, Cornel MC, Forzano F; European Society of Human Genetics. Opportunistic genomic screening. Recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet.* 2021 Mar;29(3):365-377. doi: 10.1038/s41431-020-00758-w. Epub 2020 Nov 22. PMID: 33223530; PMCID: PMC7940405.
  12. David KL, Best RG, Brenman LM, Bush L, Deignan JL, Flannery D, Hoffman JD, Holm I, Miller DT, O'Leary J, Pyeritz RE; ACMG Social Ethical Legal Issues Committee. Patient re-contact after revision of genomic test results: points to consider-a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2019 Apr;21(4):769-771. doi: 10.1038/s41436-018-0391-z. Epub 2018 Dec 22. PMID: 30578420



13. Deans ZC, Ahn JW, Carreira IM, Dequeker E, Henderson M, Lovrecic L, Öunap K, Tabiner M, Treacy R, van Asperen CJ. Recommendations for reporting results of diagnostic genomic testing. *Eur J Hum Genet.* 2022 Apr 1. doi: 10.1038/s41431-022-01091-0. Epub ahead of print. PMID: 35361922.
14. Claustres M, Kožich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K, Oosterwijk C, Peterlin B, van Ravenswaaij-Arts C, Zimmermann U, Zuffardi O, Hastings RJ, Barton DE; European Society of Human Genetics. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet.* 2014 Feb;22(2):160-70. doi: 10.1038/ejhg.2013.125. Epub 2013 Aug 14. PMID: 23942201; PMCID: PMC3895644.
15. Roy NBA, Da Costa L, Russo R, Bianchi P, Del Mar Mañú-Pereira M, Fermo E, Andolfo I, Clark B, Proven M, Sanchez M, van Wijk R, van der Zwaag B, Layton M, Rees D, Iolascon A. The Use of Next-generation Sequencing in the Diagnosis of Rare Inherited Anaemias: A Joint BSH/EHA Good Practice Paper. *Hemasphere.* 2022 Jun 6;6(6):e739. doi: 10.1097/HS9.0000000000000739. PMID: 35686139; PMCID: PMC9170004.
- 16 *Analisi Genetica in Fibrosi Cistica. Consensus 2019* A cura di: Società Italiana per lo Studio della Fibrosi Cistica (SIFC) Approvato da: Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità (SIAMS) Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) Società Italiana di Genetica Umana (SIGU)



### 1. TITOLO DEL REFERTO

*es. Analisi NGS di geni associati a cardiomiopatie*

### 2. ANAGRAFICA E TRACCIABILITA' CAMPIONE

Cognome \_\_\_\_\_ Nome \_\_\_\_\_ Sesso: M /F  
Data Nascita \_\_\_\_\_ Luogo nascita \_\_\_\_\_  
Etnia (se opportuna) \_\_\_\_\_ Cod. Fiscale (opzionale) \_\_\_\_\_  
Data Prelievo e Data Accettazione (se non coincidono) \_\_\_\_\_  
Codice Identificativo Univoco del campione \_\_\_\_\_  
Medico Referente (il medico che ha richiesto il test) \_\_\_\_\_  
Ist./Osp.-Reparto (opzionale) \_\_\_\_\_ Indirizzo (opzionale) \_\_\_\_\_

### 3. INDICAZIONE AL TEST E DESCRIZIONE SINTETICA

**Indicazione Clinica al Test genetico/ Quesito diagnostico:**(indicare i dati clinici più suggestivi inerenti il sospetto clinico (HPO se disponibile), per il quale viene richiesta l'analisi.

**Materiale biologico esaminato/ricevuto:** Sangue periferico, tessuto, DNA genomico da coltura, etc.(*si può inserire anche nell'anagrafica*)

**Tipo di analisi richiesta/ eseguita:** pannello di geni (riportare se pannello fisico o virtuale, trio-WES, etc.).

### 4. RISULTATO RIASSUNTIVO

**Es 1** variante (con descrizione sintetica) patogenetica, consistente con il fenotipo clinico

**Es 2** non sono state identificate varianti cause certe o probabili compatibili con il quadro clinico

**Es 3** sono state identificate varianti con un possibile significato clinico associato ad una condizione compatibile con il quadro clinico del paziente; considera di proseguire con ulteriori indagini per confermare o escludere la patogenicità.

**Es 4** nessuna variante relata al quadro clinico è stata identificata.

E' stata evidenziata una variante con un impatto clinico certo, ma non relata all'indicazione (secondary finding)

### 5. DETTAGLIO DEI RISULTATI

#### Genotipo Identificato:

- NESSUNA VARIANTE di CLASSE 4°5 E' STATA IDENTIFICATA

- VARIANTI DI CLASSE 4 e 5 E CNV CON SIGNIFICATO CLINICO: riportare le varianti con i dettagli della nomenclatura (vedi spiegazioni nella sezione del documento)

- VUS con un punteggio più alto (sotto-classificazione delle VUS, hot VUS) è necessario commentarle tra i risultati indicando gli approfondimenti necessari per cambiare la classe da 3 a 4, purché pertinenti al quadro clinico, in ogni caso deve essere spiegata la motivazione dell'interpretazione

- EVENTUALI RISULTATI SECONDARI: es è stata evidenziata una variante con impatto clinico certo, ma non correlata all'indicazione clinica del paziente. **Da riportare previa firma del consenso informato e se la classificazione è certa**

### 6. INTERPRETAZIONE, CONCLUSIONI E SUGGERIMENTI

**Interpretazione e commento di quanto riportato nei risultati rispetto al quadro clinico cercando ove possibile di essere conclusivi.**

Le conclusioni devono essere supportate da riferimenti della letteratura e/o di database. Nel caso di VUS, classe 3, di particolare interesse, ovunque possano essere analizzati familiari o eseguiti ulteriori indagini per comprenderne il ruolo patogenetico, è bene segnalarlo in questo campo.

Nella conclusione va indicato lo studio di eventuali familiari a rischio, la possibilità di una diagnosi prenatale, etc. attenendosi alle linee guida della malattia qualora esistano. Sempre in questo campo è necessario riportare suggerimenti di trattamenti clinici o ulteriori esami anche non genetici necessari per la patologia identificata o per la specifica mutazione. (Quest'ultima affermazione non si adatta alla genetica oncologica).

La consulenza genetica va consigliata sempre (indipendentemente dall'esito del referto) e spiegate le motivazioni.

Il Laboratorio dovrebbe dichiarare di essere disponibile a rivalutare le VUS o l'intero dato nel caso di negatività di pannelli virtuali o analisi wide (WES, WGS) su richiesta del medico inviante o del medico che avrà in carico il paziente, e a ricontattare il medico o il paziente se avesse modo di verificare che per una VUS la classificazione è cambiata.



### 8. DESCRIZIONE DEL TEST/dettagli tecnici e metodologici

**Geni/regioni esaminate:** (Elencare geni con relativo LRG e/o NM\_) ES Gene 1 (NM\_.....), Gene 2 (NM\_.....), Gene 3 (NM\_.....); nel caso i geni siano molti o il formato del referto non lo consente, si consiglia di allegare un foglio a parte, menzionando nel testo (i geni analizzati sono riportati nello specifico allegato). Indicare il genoma di riferimento (ad es GRCh37. hg19). Nel caso del WES o del WGS, tipo di kit utilizzato per la preparazione, etc.

**Target:** regioni genomiche codificanti e giunzioni esone-introne ( $\pm n$  bp, indicare il numero di bp di copertura delle giunzioni esone/introne. Per il n. minimo di bp da includere si veda il testo)

**Metodica utilizzata:** tipo di sequenziamento (es. pair-end 2x150), tipo di arricchimento (es. Nextera, Agilent, kit specifico) piattaforma usata (es: MiSeq, Ion Torrent) ed il metodo ortogonale utilizzato per la conferma delle varianti (es Sanger)

**Pipeline bioinformatica:** tipo di software, azienda produttrice, versione; nel caso di analisi in-house con versione delle componenti.

**Analisi CNV** (se l'algoritmo di calcolo NGS lo prevede); *indicare il metodo usato x le conferme* es: le CNV vengono confermate mediante MLPA e/o RealTime PCR

**Database di riferimento e software utilizzati come supporto all'interpretazione** (con versione): es: HGMD – dbSNP – DGV – GnomAD – ClinVar- Varsome, etc.

**Dati qualitativi:** sensibilità analitica: (indicare % Copertura target (valore medio) e Profondità lettura minima del target es: % al 30X); specificità analitica (riportare la Variant Fraction es. si considerano eterozigoti le varianti con un VF > 30% e omozigote una VF >85%).

**Limiti e specifiche del metodo:** per es: se l'algoritmo non consente l'identificazione di riarrangiamenti genomici o delezioni/duplicazioni, va segnalato; se non consente l'identificazione di mosaicismi somatici al di sotto di una data %, se non vede espansioni triplette, varianti introniche profonde, etc.

**Conferma delle varianti identificate:** indicare la classe delle varianti che viene confermata con metodi ortogonali: es. vengono confermate le varianti di classe 4 e 5 e tutte quelle riportate nel referto.

**Studio delle regioni non coperte da NGS** per il raggiungimento della copertura indicata nella sensibilità analitica (ad es. mediante Sanger/Nextera) ed eventuali statistiche di corsa non coincidenti con la sensibilità analitica dichiarata.

**Note aggiuntive/opzionali:** le varianti di classe 1 e 2 non vengono riportate nel referto; il laboratorio ha superato i controlli esterni di qualità (indicare quali) nell'anno.

**Riferimenti bibliografici:** es. Matthijs et al., Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. EJHG v.24 2016; Richards et al Genetics in Medicine 2015; etc.

---

#### EVENTUALE TABELLA Varianti classe 3-VUS

*E' necessario sottolineare ed evidenziare che le varianti VUS non devono guidare le decisioni cliniche o la valutazione del rischio nei membri della famiglia.*



#### 8. DESCRIZIONE DEL TEST/dettagli tecnici e metodologici

**Geni/regioni esaminate:** (Elencare geni con relativo LRG e/o NM\_) ES Gene 1 (NM\_.....), Gene 2 (NM\_....), Gene 3 (NM\_.....); nel caso i geni siano molti o il formato del referto non lo consente, si consiglia di allegare un foglio a parte, menzionando nel testo (i geni analizzati sono riportati nello specifico allegato). Indicare il genoma di riferimento (ad es GRCh37. hg19). Nel caso del WES o del WGS, tipo di kit utilizzato per la preparazione, etc.

**Target:** regioni genomiche codificanti e giunzioni esone-introne ( $\pm$  n bp, indicare il numero di bp di copertura delle giunzioni esone/introne. Per il n. minimo di bp da includere si veda il testo)

**Metodica utilizzata:** tipo di sequenziamento (es. pair-end 2x150), tipo di arricchimento (es. Nextera, Agilent, kit specifico) piattaforma usata (es: MiSeq, Ion Torrent) ed il metodo ortogonale utilizzato per la conferma delle varianti (es Sanger)

**Pipeline bioinformatica:** tipo di software, azienda produttrice, versione; nel caso di analisi in-house con versione delle componenti.

**Analisi CNV** (se l'algoritmo di calcolo NGS lo prevede); *indicare il metodo usato x le conferme* es: le CNV vengono confermate mediante MLPA e/o RealTime PCR

**Database di riferimento e software utilizzati come supporto all'interpretazione** (con versione): es: HGMD – dbSNP – DGV – GnomAD – ClinVar- Varsome, etc.

**Dati qualitativi:** sensibilità analitica: (indicare % Copertura target (valore medio) e Profondità lettura minima del target es: % al 30X); specificità analitica (riportare la Variant Fraction es. si considerano eterozigoti le varianti con un VF > 30% e omozigote una VF >85%).

**Limiti e specifiche del metodo:** per es: se l'algoritmo non consente l'identificazione di riarrangiamenti genomici o delezioni/duplicazioni, va segnalato; se non consente l'identificazione di mosaicismi somatici al di sotto di una data %, se non vede espansioni triplette, varianti introniche profonde, etc.

**Conferma delle varianti identificate:** indicare la classe delle varianti che viene confermata con metodi ortogonali: es. vengono confermate le varianti di classe 4 e 5 e tutte quelle riportate nel referto.

**Studio delle regioni non coperte da NGS** per il raggiungimento della copertura indicata nella sensibilità analitica (ad es. mediante Sanger/Nextera) ed eventuali statistiche di corsa non coincidenti con la sensibilità analitica dichiarata.

**Note aggiuntive/opzionali:** le varianti di classe 1 e 2 non vengono riportate nel referto; il laboratorio ha superato i controlli esterni di qualità (indicare quali) nell'anno.

**Riferimenti bibliografici:** es. Matthijs et al., Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. EJHG v.24 2016; Richards et al Genetics in Medicine 2015; etc.

#### EVENTUALE TABELLA Varianti classe 3-VUS

*E' necessario sottolineare ed evidenziare che le varianti VUS non devono guidare le decisioni cliniche o la valutazione del rischio nei membri della famiglia.*

#### 7. DATA E FIRME

Firma 1

Firma 2