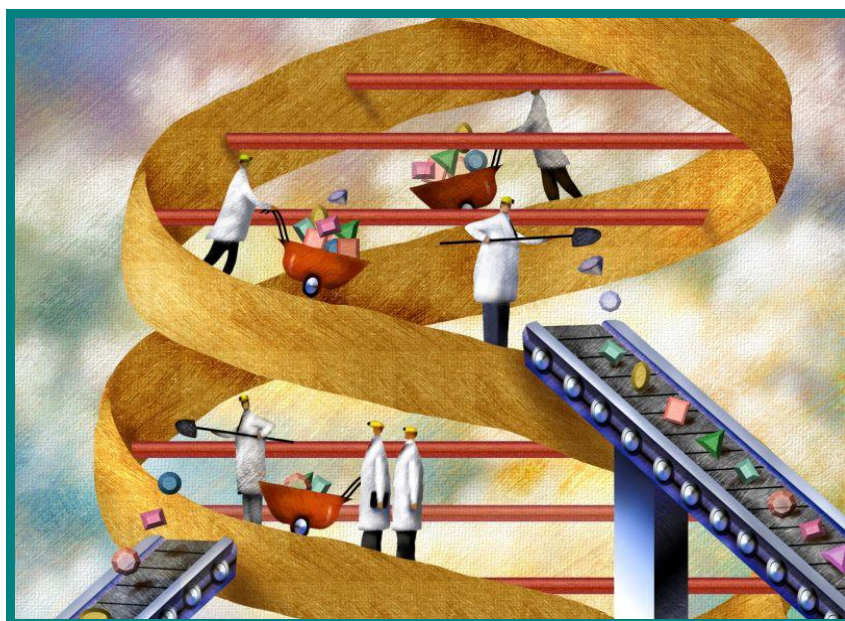


U.O.S.D. GENETICA MEDICA
GRANDE OSPEDALE METROPOLITANO
BIANCHI MELACRINO MORELLI
REGGIO CALABRIA



CARTA DEI SERVIZI
2023

www.geneticamedica@ospedalerco.it

**“è più importante sapere che tipo di persona abbia una malattia,
che sapere che tipo di malattia abbia una persona”.**

Ippocrate (IV secolo a.C.)

Dopo il sequenziamento del genoma umano, la genetica molecolare e l'analisi genomica hanno acquisito un ruolo specifico per il progresso della medicina e dell'assistenza sanitaria e sono diventate una forza trainante nella ricerca e nella pratica medica. I costanti progressi che si registrano, oggi, in campo biomedico, farmaceutico e in quello della genetica stanno ponendo le basi per una rivoluzione scientifica: la **medicina personalizzata o nano-medicina**. Fonte di grandi speranze, essa si propone di trattare ogni paziente in base alle sue proprie specificità genetiche e ambientali, al fine di personalizzare la cura in base all'individuo, secondo un approccio predittivo, preventivo e partecipativo. Tutto ciò è da considerarsi un vero e proprio salto di paradigma della medicina transitando da un approccio reattivo, con una diagnostica basata sugli organi e un sistema orientato alla gestione della malattia, a una medicina proattiva, con un approccio molecolare e sistemico.

Questi fondamenti teorici prendono origine da una nuova materia in rapido sviluppo: la **biologia dei sistemi**, che studia gli esseri viventi in quanto strutture in evoluzione, la cui natura è definita dall'interazione dinamica delle parti di cui sono composte. Questo approccio integra le conoscenze di genomica, proteomica, trascrittomica e di teoria dei sistemi dinamici con la super-convergenza delle discipline biomolecolari, identificate col neologismo “omica”, che raggruppa tutte le dottrine che hanno questo suffisso

Leroy Hood, esperto di biotecnologie, uno dei principali protagonisti, di questa trasformazione e convinto assertore del passaggio culturale dalla “cura delle malattie” alla “gestione complessiva del benessere degli individui” ha coniato il termine **4P Medicine**. Le 4P di Hood si riferiscono a quattro aspetti che caratterizzeranno la medicina del futuro:

- **Preventiva:** fra qualche anno le informazioni che riguardano il genoma faranno parte della cartella clinica di ciascun individuo. Sarà possibile individuare subito le patologie a rischio per quella specifica persona e pianificare le contromisure più adatte per cercare di evitarle o allontanarne l'insorgere.
- **Predittiva:** ci sarà una forte rifocalizzazione di prospettiva, dall'essere concentrati all'agire sul “presente” all'obiettivo d'influire sulla situazione “futura”, ovvero, mantenere lo stato di benessere piuttosto che dover curare le malattie una volta che esse si siano già manifestate.
- **Personalizzata:** gli individui sono geneticamente differenti o meglio “geneticamente unici”: non saranno più considerati degli elementi rappresentativi di gruppi di popolazioni “standard”.
- **Partecipata:** con un alto grado di cooperazione da parte degli individui sia sani che malati, considerando l'infinità di informazioni fornite più o meno volontariamente, attraverso dispositivi, sensori, social net-work, al termine Big Data, ormai onnipresente, si aggiungerà quello di Long Data (i dati che riguardano l'arco temporale della vita di un individuo). Tutto questo, oltre che definire nuove modalità di esercizio della pratica medica, produrrà anche un paziente più autonomo e competente, o “Empowered”, cioè titolato a possedere e gestire i propri dati clinici.

Inoltre, la possibilità di adattare le terapie mediche ai profili genetici dei pazienti dovrebbe contribuire alla risoluzione di alcuni dei più frequenti problemi che affliggono i sistemi sanitari, tra cui l'invecchiamento della popolazione, il costo di gestione delle malattie croniche, i costi per lo sviluppo di nuovi farmaci,

l'inefficacia di buona parte dei trattamenti su un numero molto elevato di pazienti ed un numero significativo di reazioni avverse ai farmaci. Ma la sfida reale della medicina personalizzata sarà studiare la malattia sul piano molecolare, dove essa si scompone e la sua eziologia si perde in innumerevoli varianti. La cancerologia illustra bene questa situazione, poiché il gene tumorale è instabile e resistente, studiato come fosse un processo darwiniano che moltiplica le sue variazioni accrescendo l'adattabilità e dunque la resistenza ai farmaci.

Per quanto riguarda il nostro Servizio Sanitario Nazionale (SSN), le iniziative di pianificazione sulla genomica si sono sviluppate a partire dal **Piano nazionale della prevenzione 2010-2012** che ha identificato la "medicina predittiva" come una delle macroaree di intervento, fornendo indicazioni per realizzare un nuovo approccio alla prevenzione attraverso l'utilizzo appropriato, etico ed efficace dei test genetici. Inoltre nell'Intesa Stato-Regioni del 29 aprile 2010 è stata identificata, tra le azioni da realizzare, la predisposizione di un Protocollo di utilizzo della Public health genomics predisposto dal Ministero della salute e rispetto al quale è stata sancita l'Intesa del 13 marzo 2013 su "**Linee di indirizzo sulla genomica in sanità pubblica**". Successivamente, in Gazzetta Ufficiale del 17 gennaio 2018 è stato pubblicato il documento "**Piano per l'innovazione del sistema sanitario basata sulle scienze omiche**", frutto dell'[Intesa del 26 ottobre 2017](#). Nel mese di luglio 2018 si è infine, insediato, presso la Direzione generale della prevenzione sanitaria, del Ministero della Salute, il Coordinamento Inter-Istituzionale che ha il compito di attuare tale piano. Tutto ciò costituisce un punto di svolta nella pianificazione riguardante l'utilizzo della genomica e delle scienze omiche in generale nel nostro sistema sanitario nazionale.

Tuttavia, discutere di genomica e medicina personalizzata significa anche riflettere su nuovi modelli diagnostici e riaffermare il carattere umano della medicina. Rispetto al concetto tradizionale di persona, bisognerà distinguere la **personalized medicine** dal **personalized care**, là dove la prima si occupa dell'individualità biologica e la seconda della persona morale (Raiser, 1981). Profetico, in tal senso, è stato il filosofo Karl Jaspers, il quale affermava che il malato è riconosciuto in modo impersonale laddove la medicina immagina di essere indirizzata a una personalità libera dal proprio corpo (Jaspers, 1964).

A tal proposito Xavier Guchet in la "**Médecine Personnalisée: Un Essai Philosophique (2016)**" sottolinea un ulteriore pericolo: l'individualizzazione della relazione salute-malattia rischia di tradursi in una negazione della sofferenza dei singoli e della loro soggettività, contrariamente allo scopo della medicina personalizzata. È alla collettività che spetta il compito di tutelare il paziente e la sua sofferenza nei confronti della nuova medicina. E la filosofa Laura Palazzani, membro del Comitato internazionale di bioetica (Ibc) dell'Unesco nel suo recente volume "Dalla bio-etica alla tecno-etica: nuove sfide al diritto" (Giappichelli, 2017)), afferma che "l'orizzonte di riferimento entro il quale si sta costruendo il dialogo internazionale è la dottrina dei diritti dell'uomo e il principio condiviso della priorità dell'uomo sul progresso della scienza e della tecnica: un principio che può essere declinato in modi diversi, ma che ha comunque assunto una centralità essenziale nella coscienza collettiva. La discussione, che continua sui "tradizionali" temi bioetici di inizio e fine vita, cura e sperimentazione, si sta quindi aprendo a questioni nuove, che includono le neuroscienze, la genomica, la biometria, i big data, il potenziamento, la roboetica e le tecnologie convergenti".

In conclusione, la genomica e la medicina personalizzata impongono una nuova riflessione sull'importanza del rapporto medico-paziente e sull'essere umano non come mera entità biologica ma in quanto persona dotata di una propria storia genetica, sociale e ambientale ed apre anche nuovi orizzonti di un'etica scientifica improntata alla tutela del concetto di "persona" così come definita dal filosofo francese Emmanuel Mounier: *«La mia persona non coincide con la mia personalità. Essa è al di là del tempo, è un'unità data, non costruita, più vasta delle visioni che io ne ho, più intima delle ricostruzioni da me tentate. Essa è una presenza in me»*.

Corrado Mammi

L'ORGANIZZAZIONE

Nel suo complesso l'U.O.S.D. di Genetica Medica si articola su diversi laboratori specialistici:

- laboratorio di Citogenetica Prenatale
- laboratorio di Citogenetica Postnatale
- laboratorio di Citogenetica Onco-Ematologica
- laboratorio di Citogenomica
- laboratorio di Genetica Molecolare Oncoematologica
- laboratorio di Genetica Medica Molecolare
- laboratorio di Genomica Next generation Sequencing (NGS)
 - Piattforma Illumina
 - Piattaforma Ion Torrent

ed un:

- **Servizio di Genetica Clinica e Malattie Rare**

Dott. Corrado Mammi	Dirigente medico	Responsabile U.O.S.D Genetica Medica
Dott.ssa Manuela Priolo	Dirigente medico	
Dott.ssa Irene Eliana Bova	Dirigente biologo	
Dott.ssa Maria Concetta Cannatà	Dirigente biologo	
Dott.ssa Girolama Casile	Dirigente biologo	
Dott.ssa Maria Grazia D'Errigo	Dirigente biologo	
Dott.ssa Marianna Covello	Dirigente biologo	
Dott.ssa Rossana Bumbaca		Tec. Sanitario di Laboratorio Biomedico
Dott. Giuseppe Repaci Cosoleto		Tec. Sanitario di Laboratorio Biomedico
Dott.ssa Maria Lucia Fiorentino		Tec. Sanitario di Laboratorio Biomedico
Infermiera Ada Bianca		Infermiera
Sig.ra Antonella Muscatello		Coadiutrice amministrativa

LA MISSION



L'Unità Operativa di Genetica Medica del Grande Ospedale Metropolitano Bianchi Melacrino Morelli offre ai pazienti e alle loro famiglie la consulenza genetica ed i test genetici finalizzati ad individuare o escludere alterazioni associate a patologie genetiche, in epoca prenatale e postnatale. Le finalità perseguite dalla Unità Operativa di Genetica Medica, consistono in:

✓ **L'attenzione alla qualità**

La principale finalità è quella della qualità delle prestazioni erogate, avendo da sempre

posto "il paziente" al centro del progetto organizzativo. Qualità delle prestazioni è infatti sinonimo di cura migliore e vantaggio clinico assistenziale del soggetto affetto e dei suoi familiari.

A tal fine, questa U.O. è inserita in diversi sistemi di controllo-qualità nazionali ed internazionali, quali:

- **Sistema di qualità** per Citogenetica prenatale e postnatale, Fibrosi Cistica, coordinato a livello nazionale dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS)
- **Sistema di qualità** per la Genetica Molecolare della Leucemia Mieloide Cronica, delle Malattie mieloproliferative croniche a livello nazionale ed internazionale (Rete Labnet e Rete JAKnet)
- **Controlli di qualità** internazionali UK NEQAS per chimerismo molecolare post trapianto ematologico e per diagnostica Leucemia mieloide acuta in Next Generation Sequencing
- **Sistema di qualità** per la determinazione di HER2 su carcinoma mammario con tecniche FISH nazionale
- **Adesione alle Linee guida** proposte dalla **Società Italiana di Genetica Umana (SIGU)** e da altre società scientifiche, in specifici settori di diagnostica citogenetica e molecolare.

La qualità è inoltre garantita dalla continua partecipazione del personale a corsi di formazione e di aggiornamento culturale e scientifico, organizzati sul territorio nazionale ed internazionale.

✓ **La sostenibilità economica**

Qualità e sostenibilità economica sono le principali esigenze alle quali cerca di rispondere l'afferenza delle attività assistenziali nei centri di alta specialità. Obiettivo fondamentale è quello di accentrare in specifici centri, differenziati per specialità, il maggior numero di prestazioni diagnostiche, mediante l'organizzazione di una rete funzionale e di qualità. La concentrazione della casistica presso strutture che garantiscano un adeguato volume di attività associato ad un costante aggiornamento delle conoscenze e delle tecnologie garantisce, infatti, la qualità dell'assistenza e la riduzione dei costi unitari di produzione. In questa ottica la U.O. è fortemente impegnata ad una migliore utilizzazione delle risorse umane ed economiche messe a disposizione della Regione Calabria, per lo studio delle malattie genetiche

✓ **Le relazioni con le altre specialità e l'appropriatezza delle prestazioni**

Il successo dell'integrazione della genetica medica negli altri settori della medicina e la sua trasversalità nei confronti delle altre specializzazioni, si basa sulla condivisione di percorsi assistenziali e nella definizione dei ruoli (concetto di "best practice"). L'adozione di percorsi diagnostico-assistenziali assicura, infatti, la completezza dell'offerta e l'omogeneità di comportamenti, in grado di **garantire la soddisfazione del paziente e l'ottimizzazione dei costi**.

Inoltre, le forti connotazioni psicologiche ed etiche correlate alla valenza dei temi trattati dalla genetica medica (salute, malattia, procreazione, qualità e aspettative di vita) che coinvolgono non solo il consultando ma anche i familiari rendono ragione della necessità di organizzare le attività di genetica in maniera strutturata e di definire ruoli e responsabilità in percorsi multidisciplinari condivisi.

Questa U.O., grazie alla sua struttura organizzativa ottimale, comprendente la componente clinica e di laboratorio con la presenza di diverse figure professionali (medici, biologi, tecnici di laboratorio, infermieri e amministrativi), opera efficacemente con tutte le altre discipline (ginecologia, pediatria, ematologia, oncologia ed altre) migliorando l'efficienza e l'appropriatezza delle prestazioni e rendendo più facile e funzionale la gestione della domanda e dell'offerta. Particolare attenzione è da sempre posta al coinvolgimento dei medici di medicina generale e dei pediatri di libera scelta. Il loro ruolo è infatti rilevante nell'identificazione dei soggetti/famiglie che possono giovare dei servizi di genetica medica. Rilevante è anche il contributo di questi professionisti nel follow-up dei pazienti. La U.O. è, altresì, impegnata nella formazione di giovani medici e biologi attraverso le convenzioni stipulate con varie Istituzioni Scolastiche ed Universitarie.

✓ **I collegamenti con le associazioni**

Il coinvolgimento delle associazioni delle famiglie dei pazienti assicura che vengano tenute in considerazione le loro esigenze e che vengano verificati i percorsi diagnostico assistenziali.



Indispensabile è l'apporto di questi gruppi per la diffusione delle informazioni sulle malattie genetiche, comprese quelle rare, anche attraverso la produzione di materiale divulgativo e nella organizzazione di eventi informativi per la formazione degli operatori sanitari di altre discipline. Da molto tempo questa U.O. collabora

attivamente con numerose associazioni di familiari di pazienti affetti da malattie rare. In particolare è intensa la collaborazione con la Federazione UNIAMO (Unione Italiana Associazione Malattie Orfane)(www.uniamo.org) che confedera quasi 100 singole Associazioni, dislocate su tutto il territorio nazionale. All'interno di tale federazione grande importanza assume per il nostro territorio la presenza della Associazione AIFP (Associazione Italiana Febbre Periodiche) che si è fatta carico di associare i numerosi pazienti affetti da Febbre mediterranea, che risulta essere particolarmente frequente nella nostra provincia.

La nostra collaborazione si esplica sia nella produzione di materiale informativo e di sensibilizzazione sulle malattie rare, sia nel supporto del singolo paziente nel suo faticoso cammino di diagnosi e cura, che nella presa in carico dell'intero nucleo familiare ai fini assistenziali e psicologici.

IL RUOLO NELLA FORMAZIONE UNIVERSITARIA



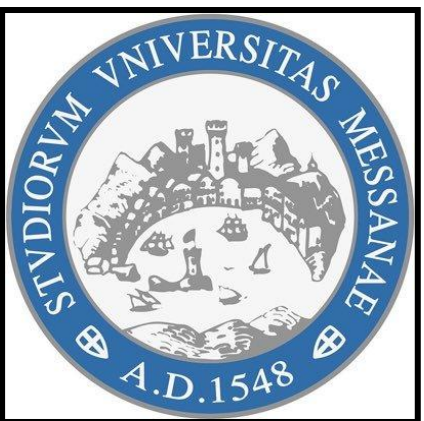
Il Responsabile di questa UOSD di Genetica Medica ha ricevuto per gli anni accademici 2020-2021, 2021-2022 e 2022-2023 l'incarico di **Professore a contratto presso l'Università Mediterranea di Reggio Calabria**, Dipartimento di Agraria, Corso di laurea magistrale in tecnologie alimentari, corso di "**Scienze e tecnologie dietetiche /MED49**", per 6 CFU, anno 2020-2021, all'interno del quale sono state approfondite le tematiche relative alla Nutrigenetica e Nutrigenomica e alle basi genetiche delle malattie dismetaboliche e digestive (diabete, celiachia) e del tumore del colon retto, nonché i rapporti tra integratori alimentari e modificazioni epigenetiche del DNA, compresa l'influenza della Dieta Mediterranea sullo stato di salute e la longevità.



La UOSD di Genetica Medica è stata inserita con decreto rettorale nel 2019 nella **rete formativa della Scuola di Specializzazione in Genetica Medica** della Università Magna Graecia di Catanzaro. Gli specializzandi, sia medici che biologi, frequentano questa UOSD a fini formativi e per lo svolgimento dei tirocini obbligatori. Il responsabile di questa UOD ha ricevuto per gli anni accademici 2021-2022 e 2022-2023 l'incarico di professore a contratto per la disciplina di Bioscienze, corso di Genetica medica, corso di laurea in scienze infermieristiche

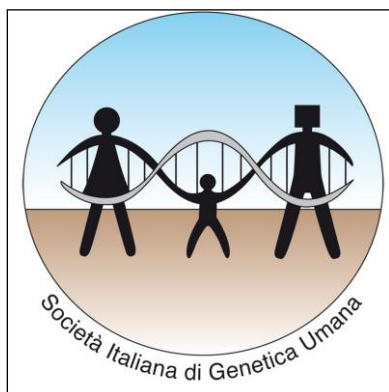


Il Responsabile di questa UOSD di Genetica Medica è da diversi anni docente presso il master di II livello "Nutrizione e integrazione nutraceutica", promosso dal **Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione della UNIVERSITA' DELLA CALABRIA**. Il master si propone di approfondire lo studio di alimenti ed il loro rapporto con la salute fornendo a Farmacisti, Medici, Biologi e Nutrizionisti conoscenze specifiche relative ad una corretta alimentazione e ad un corretto impiego di nutraceutici nel trattamento di stati fisiopatologici e di malnutrizione con particolare riferimento alla Nutrigenetica e Nutrigenomica.



La UOSD di Genetica Medica collabora attivamente con il **Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali "ChiBioFarAm" dell'Università di Messina** per la formazione degli studenti iscritti ai diversi corsi di laurea, con lo svolgimento di tesi sperimentali nell'ambito della citogenetica e genetica molecolare. La stessa UOSD collabora attivamente con il Prof. Orazio Romeo dello stesso Dipartimento per gli approfondimenti relativi all'analisi bioinformatica in Next generation Sequencing (NGS) con la realizzazione di seminari e workshop inerenti la **BIOINFORMATICA IN MEDICINA**

AFFILIAZIONE A SOCIETA' SCIENTIFICHE



La **Società Italiana di Genetica Umana (SIGU)** si propone come struttura di riferimento per la la Genetica Umana, in particolare elaborando criteri di qualità per i laboratori di Genetica Medica, contribuendo alla elaborazione di linee guida e promuovendo la pubblica consapevolezza sulle funzioni, le potenzialità ed i limiti delle tecniche diagnostiche di Genetica Umana. I diversi dirigenti medici e biologi di questa UOSD sono iscritti da anni alla SIGU ed operano attivamente all'interno dei rispettivi gruppi di lavoro contribuendo alla stesura di linee guida

Dirigenti	Ruolo nella Società Italiana di Genetica Umana (SIGU)
Dott. Corrado Mammi (Responsabile UOSD Genetica Medica)	Coordinatore Regionale
Dott.ssa Manuela Priolo	Socio
Dott.ssa Maria Concetta Cannatà	Socio

LOCALIZZAZIONE



Presidio Morelli

Viale Europa

89132 Reggio Calabria

In auto: Per recarsi al Presidio Ospedaliero Riuniti, si può utilizzare la Tangenziale che collega l'autostrada A3 (Salerno-Reggio Calabria) e la Superstrada Jonica 106, uscita "Reggio Modena", in entrambe le direzioni di marcia.

In treno: Dal piazzale della Stazione centrale si può arrivare mediante l'uso di mezzi pubblici per Ospedale Morelli

CONTATTI

ORARI APERTURA

Apertura laboratorio: ore 8.00 – 14.00

Apertura al pubblico

Ambulatori: Lunedì-Venerdì (ore 9.00-12.00)

Ritiro referti: Lunedì-Venerdì (ore 9.00-10.30); Lunedì- Mercoledì (ore 14.00-15.00)

PRENOTAZIONE ESAMI

Per usufruire delle prestazioni erogate in regime di accreditamento con il Sistema Sanitario Regionale (SSR), è necessario prenotarsi direttamente presso il CUP con una delle seguenti impegnative:

- **Per consulenze genetiche in età adulta (>16aa) un'impegnativa con codice 89.01**
- **Per consulenze genetiche in età pediatrica (<16aa) un'impegnativa con codice 89.7**

Nel corso della consulenza saranno prescritti i relativi test genetici su ricettario SSR

CONTATTI TELEFONICI SEGRETERIA

Sig.ra Antonella Muscatello

Telefono: 0965.393766

FAX: 0965.393835

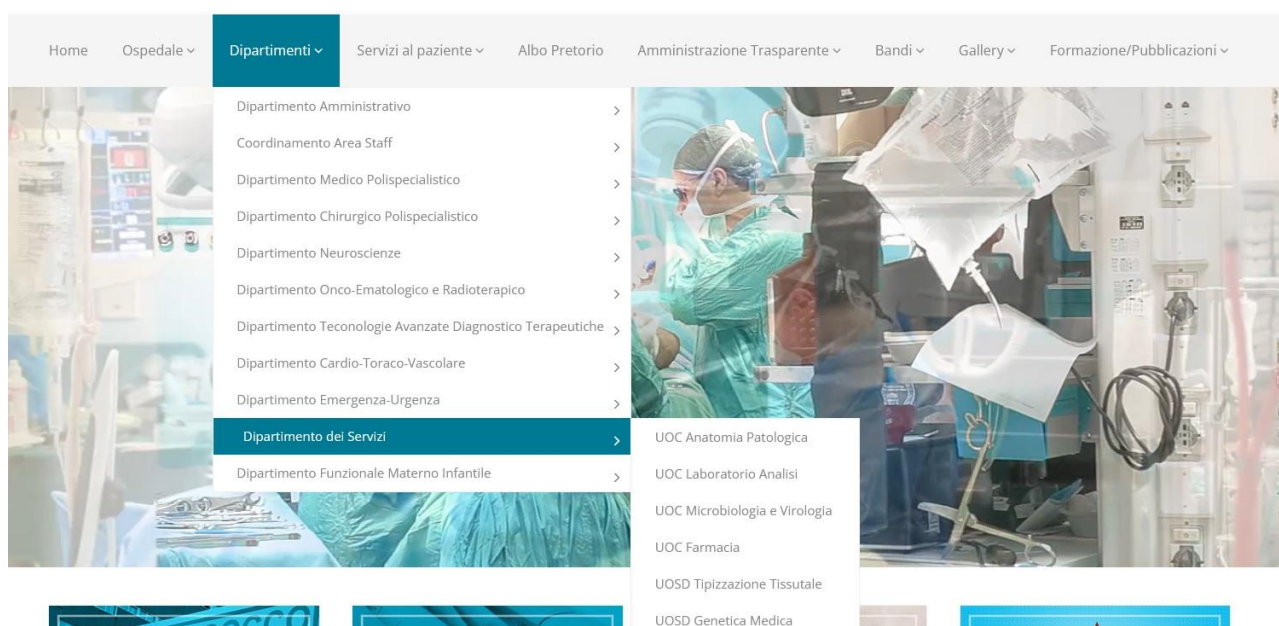
e-mail : geneticamedica@ospedaleri.it

SITO WEB AZIENDA OSPEDALIERA

www.ospedaler.it

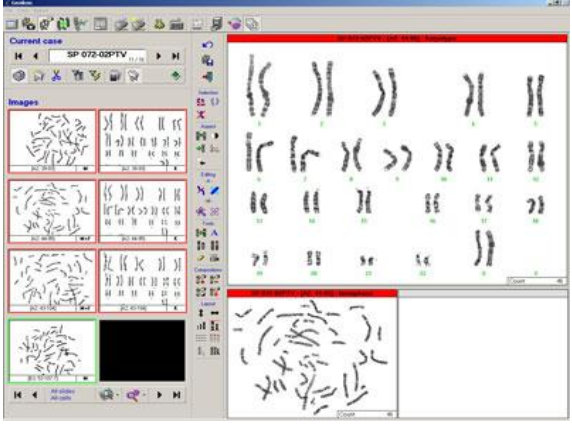


Per ottenere informazioni relativamente alla UOSD di Genetica Medica attraverso il sito web aziendale è necessario cliccare sulla voce “Dipartimenti” e scegliere “Dipartimento dei Servizi”, quindi “UOSD di Genetica Medica”



LA STRUMENTAZIONE DELLA U.O.S.D.

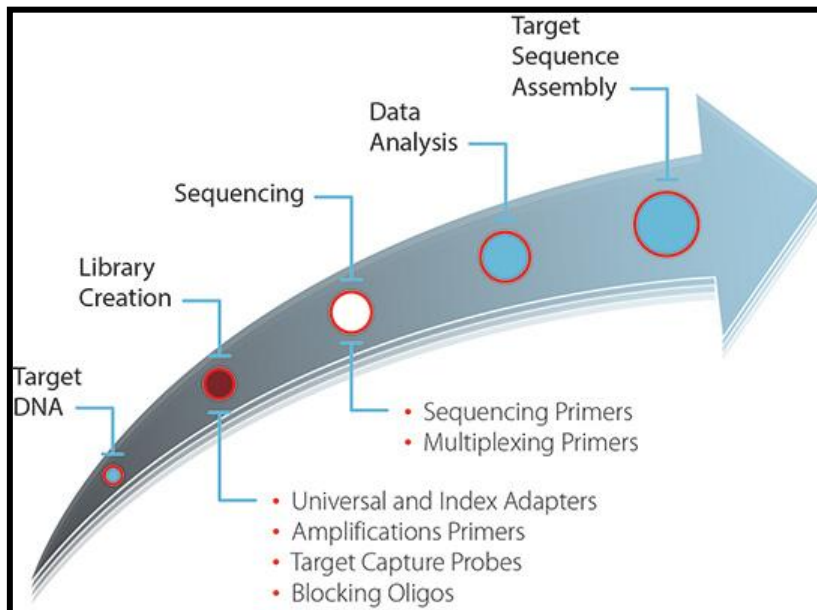
La U.O. è dotata di strumentazioni di alta tecnologia, per diagnosi e ricerche ad alta specializzazione dedicate alle malattie genetiche. La strumentazione più rappresentativa è la seguente:

Citogenetica Convenzionale e Citogenomica	
N° 5 “Workstation” operative con microscopio e telecamera per analisi citogenetica.	
N° 1 Analizzatore automatico per esami FISH, con carrello traslatore motorizzato	
Genetica Molecolare	
N° 1 Estrattore automatico DNA/RNA	

N° 1 Estrattore automatico di DNA/RNA/ Qiacube Qiagen	 The image shows a Qiacube automatic extraction machine. It is a compact, white and blue device with a top-loading lid and a small control panel on the front. The brand name 'Qiacube' is visible on the front panel.
N° 7 Amplificatori PCR con possibilità di gradiente di temperatura	 The image shows a PCR amplification machine with a large, colorful touchscreen display on top. The machine is white and blue, with a series of ventilation grilles on the front. The brand name 'Bio-Rad' is visible on the front panel.
N°1 Strumentazione PCR Real time a 4 colori	 The image shows a QuantStudio 1 real-time PCR machine. It is a white, compact device with a small touchscreen display on top. The brand name 'Applied Biosystems' is visible on the front panel.
N° 1 Sequenziatore automatico Sanger del DNA a 4 capillari SeqStudio/Life technologies	 The image shows a SeqStudio automatic Sanger sequencing machine. It is a white and blue device with a large touchscreen display on top. The brand name 'Applied Biosystems' is visible on the front panel.

N° 1 Preparatore automatico library/template per Next generation sequencing (NGS) Ion Torrent Chef	
N° 1 Strumentazione di Next generation sequencing (NGS) ION S5/Life Technologies	
N° 1 Strumentazione di Next generation sequencing (NGS) NEXTseq550DX/Illumina	

PIATTAFORME DI GENOMICA AVANZATA



I grandi progressi tecnologici nell'ambito della genomica, oltre ad avere un forte impatto su quella che è la ricerca scientifica, stanno sempre di più promuovendo lo sviluppo di nuove opzioni diagnostico-terapeutiche con importanti risvolti per quel che concerne il miglioramento dell'assistenza medica, delle cure e dei servizi. In questi ultimi anni si sta osservando una rivoluzione nella genetica medica sia dal punto di vista diagnostico che di ricerca scientifica applicata

all'identificazione di nuovi geni-malattia, grazie alla scoperta di strumenti ad elevata efficienza, rapidità, affidabilità e costi limitati. Negli ultimi anni, le acquisizioni scientifiche nel campo della genetica hanno, infatti, visto l'introduzione sul mercato e lo sviluppo rapido di nuovi sistemi per lo studio del genoma umano quali i sequenziatori **Next Generation Sequencing (NGS)**. Nonostante nei decenni precedenti lo sviluppo della metodica Sanger abbia portato miglioramenti nella chimica, nell'automazione e nella miniaturizzazione del processo, non è stato e non sarà possibile un abbassamento dei costi e un aumento della produzione di dati di sequenziamento, per cui l'innovazione legata all'avvento delle tecnologie NGS ha offerto notevoli vantaggi. L'incremento di volume di dati prodotti e la riduzione dei costi associati alle piattaforme NGS è la conseguenza di tre fattori:

- Molte migliaia/milioni di reazioni di sequenza possono essere condotte in parallelo superando il limite delle 1-96 reazioni possibili con i tradizionali macchinari di sequenziamento.
- Il clonaggio o l'amplificazione del frammento di DNA risultano, nelle nuove tecnologie, non necessari o completamente automatizzati all'interno delle piattaforme
- Un altro vantaggio del sequenziamento massivo in parallelo è la capacità di rilevare con alta accuratezza l'allele minore, che si riflette nell'identificazione di una variazione anche in campioni a mosaico o di delezioni in eterozigosi. Infatti il numero di volte in cui un frammento di DNA viene amplificato e sequenziato è proporzionale all'abbondanza di tale segmento nel campione originale, per cui l'utilizzo di specifici algoritmi nell'analisi dei dati può portare all'identificazione anche di variazioni del numero di copie.

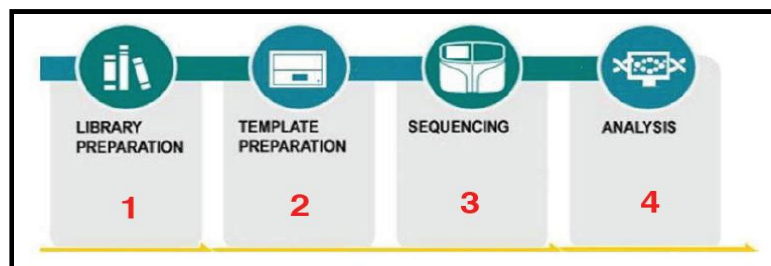
Oggi appare certo che questi progressi porteranno insieme ad una conoscenza più approfondita dell'origine ed evoluzione delle malattie ad un cambiamento radicale della medicina e faciliteranno indagini più approfondite e efficienti. Negli ultimi due decenni, l'uso delle parole che terminano con "-omic" si è esteso, dall'iniziale "Genomica", ad una vasta gamma di discipline biomolecolari indirizzate allo studio di aspetti specifici, studiando pool di molecole (es. ioni, acidi

nucleici, proteine, enzimi) con varie funzioni all'interno degli organismi viventi e pertanto parole quali genomica, metabolomica, trascrittomica, proteomica sono oggi di uso corrente. La diffusione delle discipline omiche è stata possibile principalmente attraverso lo sviluppo di queste tecnologie high-throughput in grado di generare un grande quantità di dati relativi ai diversi livelli di complessità biologica contribuendo a rivoluzionare l'approccio allo studio degli organismi viventi.

Le due tecnologie più diffuse (Illumina e IonTorrent) prevedono due differenti modalità di generazione del ssDNA:

- **Illumina:** la libreria è dispensata su un supporto solido (Flow Cell) sul quale sono stati sintetizzati e ibridati primers complementari agli adattatori; tramite PCR vengono creati gruppi (clusters) di ssDNA monoclonali per il successivo sequenziamento
- **IonTorrent:** la libreria è sottoposta ad un processo di PCR ad emulsione, nella quale piccole gocce di soluzione oleosacraano un insieme di micro-reattori di PCR: ogni singola molecola di libreria entra in contatto con una biglia magneticaricoperta di primers complementari agli adattatori e, al termine della PCR, le biglie saranno ricoperte di ssDNA monoclonali pronti per il sequenziamento

Per entrambe le metodiche, il processo di analisi dei dati generali segue un rigoroso flusso di lavoro bioinformatico.



- ✓ **Analisi primaria:** le reads prodotte vengono generate dai dati grezzi di sequenziamento ed a ciascuna base sequenziata è associato un punteggio di qualità (Phred score), le reads devono superare una serie di controlli di qualità per poter essere utilizzate (uBAM o FASTQ)
- ✓ **Analisi secondaria:** le reads vengono allineate contro il genoma di riferimento (hg19) e ricostruita la sequenza completa (BAM) e l'identificazione delle varianti (VCF). La sensibilità e la specificità del sequenziamento dipenderanno da parametri di analisi scelti precedentemente in base alla letteratura ed alla natura del sequenziamento
- ✓ **Analisi terziaria:** il file generato verrà sottoposto ad un'analisi di annotazione utilizzando come riferimento i principali database internazionali (dbSNPs, ClinVar, Exac, GnomeAD) per associare a ciascuna variante genica identificata un significato di patogenicità o di benignità. Nel caso in cui non esistano dati certi per l'attribuzione ad una di queste due classi, la variante genetica è classificata come VUS, cioè di incerto significato.

Presso la U.O.S.D di Genetica Medica sono state già implementate entrambe le piattaforme di sequenziamentoo massivo in NGS:

- **Piattaforma Ion Torrent S5/CHEF** in grado di sequenziare **pannelli target** di centinaia di geni (target resequencing panel) per la diagnostica delle principali malattie genetiche e per l'analisi delle mutazioni somatiche in ambito oncoematologico
- **Piattaforma Illumina** con una strumentazione certificata a livello diagnostico (NEXTSEQ550DX, in grado di sequenziare genomi virali, batterici fino all'esoma umano (tutta la regione codificante del genoma umano) o lo stesso intero genoma umano (whole genome)

LA BIOINFORMATICA

Il **base calling** è un processo del sequenziamento genico NGS, che associa ad ogni nucleotide letto un valore di probabilità per ogni base azotata. Spesso la stessa sequenza viene letta più volte per ovviare all'inaccuratezza delle letture e a valori di probabilità non soddisfacenti. Il formato dei dati di output più diffuso tra le piattaforme NGS è il **FASTQ**, un formato testuale che contiene il valore della qualità delle basi identificate. Tale **quality score** è indicato con la sigla Q₂₀ o Q₃₀ dove il pedice sta a significare la percentuale di errore nella chiamata della base, con 30 pari ad un errore su 1000 e con 20 pari ad un errore su 100.

Il primo processo bioinformatico nell'analisi delle sequenze di DNA è quello di **allineamento**. L'allineamento è il processo di mappatura tra le sequenze lette e la sequenza di un genoma di riferimento. Una **read** è una **piccola sequenza di DNA di sintesi** che si ottiene da una reazione di sequenziamento. Il numero di reads (letture) può essere settato all'inizio. In un sequenziamento NGS di buon livello si producono almeno **30 reads** per ogni frammento. In altre parole è un po' come se ogni frammento della sequencing library fosse letto e riletto 30 volte. In gergo si dice **coverage 30x**. Non di rado si arriva a **80x** o **100x**. Ottenere tutte queste reads è necessario per coprire errori del sequenziamento NGS. Quando si rende necessario rilevare mutazioni somatiche, ad esempio nel DNA delle cellule tumorali, il livello di coverage arriva a **500x** o **1000x**. Le reads successivamente subiscono un processo di **allineamento (alignment)** con le **sequenze di riferimento (reference sequences)** del genoma umano mediante softwares, quale ad esempio il Burrows-Wheeler Aligner (**BWA**) che consente di ricostruire interamente le sequenze geniche del paziente.

La sequenza allineata viene quindi memorizzata in formato **SAM** (Sequence Alignment Map). Al termine il SAM viene convertito in **BAM** (SAM binario), un formato molto più compresso. Una volta completato l'allineamento si rende necessario individuare le varianti di sequenza, ossia tutte le deviazioni del paziente rispetto alle reference sequence. È questa quella che si chiama operazione di **variant calling**, che nelle analisi NGS viene fatta in modo del tutto automatizzata. Il tool più utilizzato al momento per l'identificazione e l'analisi delle varianti è fornito dal software **GATK** (Genome Analysis Toolkit), utilizzato anche nel progetto 1000 Genome Project. Il formato di file per la memorizzazione delle varianti è il variant call format (**VCF**), un formato testuale che può memorizzare SNP, InDel e varianti strutturali più lunghe. Il formato prevede anche uno standard

per l'annotazione di informazioni come genotipo, allele ancestrale, profondità di lettura, qualità della mappatura. L'ultima fase del sequenziamento NGS consiste nell'**annotazione delle varianti**, cioè nell'attribuire a ciascuna variante identificata un significato clinico di benignità o di patogenicità mediante il confronto con database internazionali (ClinVar, dbSNPs, GnomeAD) o mediante analisi in silico con softwares in grado di predire il contributo della variante identificata in funzione del cambiamento della struttura proteica corrispondente.



LA GENOMICA NELLA LEGISLAZIONE NAZIONALE E REGIONALE

Con la pubblicazione in Gazzetta Ufficiale del 17 gennaio 2018 dell'[Intesa Stato Regioni del 26 ottobre 2017](#) sul documento "[Piano per l'innovazione del sistema sanitario basata sulle scienze omiche](#)", dopo l'[intesa del 13 marzo 2013](#) su "Linee di indirizzo sulla genomica in sanità pubblica", e con il recepimento dalla Regione Calabria di tale normativa ([DCA Regione Calabria n° 134 del 16/10/2020](#)) è oggi disponibile per gli addetti ai lavori un importantissimo strumento finalizzato a sostenere l'implementazione e l'uso intelligente della nuova genomica e dei Big Data nel settore



sanitario per il raggiungimento di benefici significativi per la salute della popolazione. Il piano si impegna anche a implementare le recenti Conclusioni del Consiglio dell'Unione europea sulla [medicina personalizzata](#) e delinea i modi in cui l'innovazione delle conoscenze nel campo biologico dovrebbe riformare il sistema sanitario nazionale nelle aree di prevenzione, diagnosi e cura, tenendo conto dell'efficacia

(basata sull'evidenza) e della sostenibilità (costo-efficacia) per migliorare la salute dell'individuo e della popolazione.

Il Decreto del Ministro della Salute del 18 maggio 2021, pubblicato sulla G.U. Serie Generale, n. 161 del 07 luglio 2021, recante "Modalità di riparto e requisiti di utilizzo del fondo per i test genomici ormonoresponsivo per il carcinoma mammario in stadio precoce" è stato poi recepito a livello regionale con il DCA n. 127/2021 stabilendo che la prescrizione dei test venga indicata nell'ambito delle Breast Unit delle 4 Aziende Ospedaliere della Regione, individuate con il DCA n. 100/2020, che hanno in carico la paziente per il percorso terapeutico e il follow-up e che eseguiranno la valutazione multidisciplinare e l'eventuale richiesta del test, secondo i criteri e le modalità definiti nel D.M. 18 maggio 2021.

Il laboratorio di Genetica Medica è il laboratorio di riferimento per l'esecuzione del test genomico per la Breast Unit del GOM di Reggio Calabria in collaborazione con la UOC di Anatomia Patologica

Con il DCA n° 48 del 09/02/2023 la Regione Calabria ha istituito il **Molecular tumor board** della Regione Calabria (MTBR-CAL) al fine di fornire ai pazienti oncologici delle terapie personalizzate basate sull'analisi molecolare che permette l'uso di farmaci innovativi target che colpiscono specifici pathways molecolari del tumore e ha individuato tra gli altri quale **laboratorio accreditato per la esecuzione di test di profilazione genomica estesa in Next Generation Sequencing (NGS)** il **laboratorio di Genetica Medica del GOM di Reggio Calabria**

Con successivo D.G. n°2469 del 21/02/2023 il Direttore generale del Dipartimento Salute e Servizi socio sanitari ha nominato quale **componente del Molecular tumor board** il Responsabile della UOSD di Genetica Medica del GOM di Reggio Calabria

PANNELLI GENOMICI di TARGET RESEQUENCING in uso presso questa U.O.S.D. di Genetica Medica

PANNELLO GENOMICO ONCOLOGICO (NGS)	
Pannello di 245 geni coperti per l'intera lunghezza codificante	Geni di predisposizione genetica ai tumori Geni con mutazioni somatiche in tumori solidi Geni con mutazioni somatiche in tumori oncoematologici Geni relativi alle RASopatie Geni relativi alla Neurofibromatosi ed alla Sclerosi tuberosa
PANNELLO CARDIO-NEURO-METABOLICO (NGS)	
Pannello di 450 geni coperti per l'intera lunghezza codificante	Geni relativi a diabete monogenico (MODY) Geni relativi a malattie autoinfiammatorie Geni relativi a cardiomiopatie ereditarie e canalopatie Geni relativi ad obesità monogenica Geni relativi a dislipidemie familiari Geni relativi ad aortopatie toraciche Geni relativi a demenze senili Geni relativi a malattie cardiovascolari Geni relativi ad Epilessia familiare Geni relativi a Trombofilia genetica Geni relativi a Disordini del metabolismo del ferro Geni relativi a Pancreatiti ricorrenti compresa la Fibrosi cistica
PANNELLO ESOMA CLINICO MENDELIOMA (NGS)	
Pannello di 5576 geni coperti per l'intera lunghezza codificante	Geni associati a malattie a trasmissione mendeliana di maggiore rilevanza clinica ed annotate in OMIM

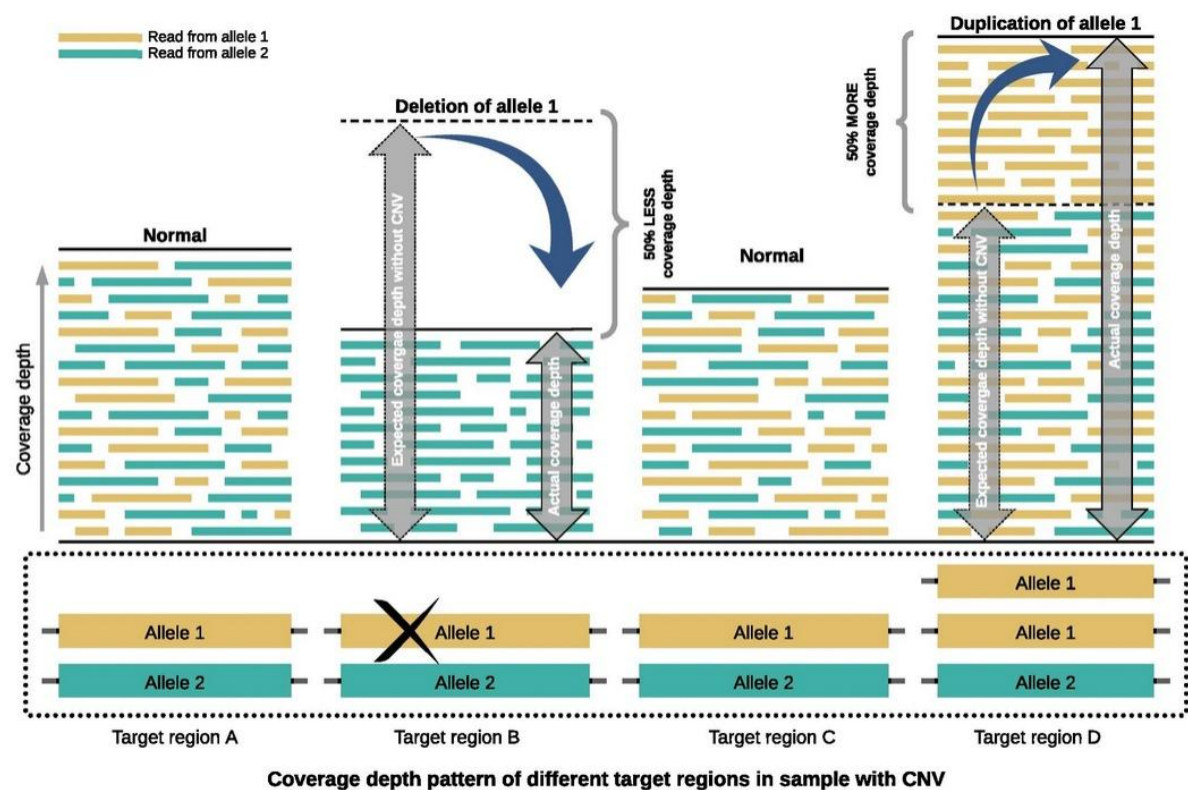
Esame	Esecuzione	Impegnative
Pannello NGS	dopo consulenza genetica Tempo di consegna: 90-120 gg	Impegnativa interna

COPY NUMBER VARIATION (CNV)

Le copy number variations (CNVs) sono una classe di sequenze che variano nel numero di copie. Si tratta di sequenze genomiche ripetute, il cui numero di ripetizioni è diverso tra individui diversi della stessa specie. Si stima che le CNVs rappresentino tra il 4.8% e il 9.5% del genoma.

Nello specifico, questi riarrangiamenti strutturali del genoma possono presentarsi sotto forma di delezioni o di duplicazioni e, sebbene sia dibattuto in letteratura se debba o meno essere fatta una distinzione tra le piccole indels e le CNVs in base alle loro dimensioni, attualmente quest'ultime sono definite come varianti che spaziano da 50 bp a diverse Mb.

Le tecniche di NGS sono oggi in grado mediante specifici algoritmi bioinformatici ad identificare le CNVs comparando la cosiddetta profondità di lettura (coverage) nel paziente in esame rispetto ad un gruppo di controllo relativamente a specifiche regioni del genoma.



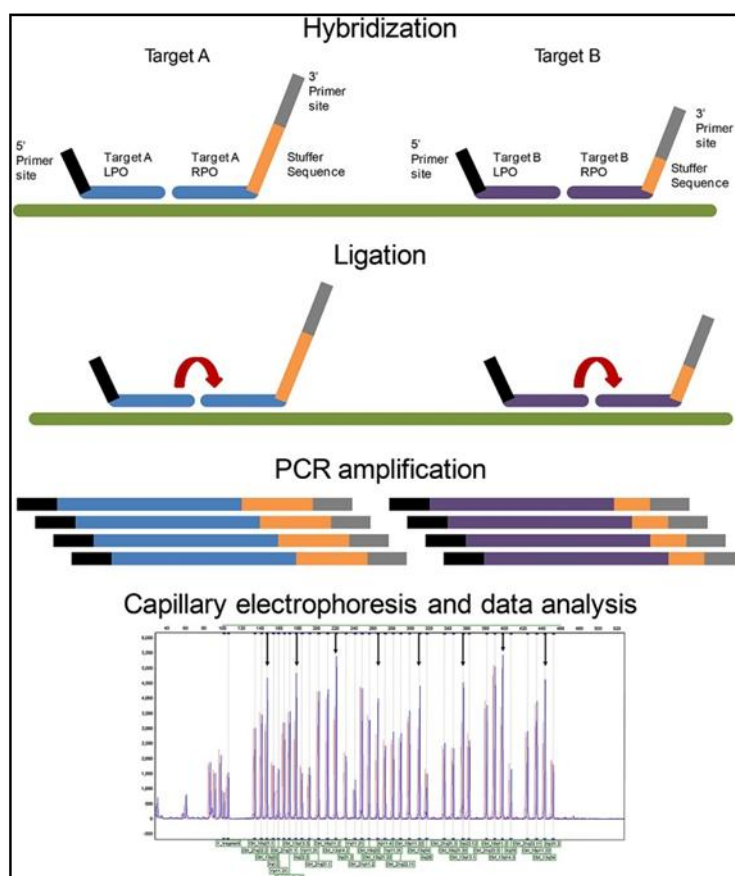
Le CNVs contribuiscono alla variabilità genetica tra gli individui, a quel tipo di variabilità che coinvolge cambiamenti nel numero di copie di una sequenza di DNA. Non di meno, esse possono anche avere un ruolo importante nello sviluppo di malattie qualora vadano a coinvolgere geni sensibili al dosaggio. Nello specifico, a seconda delle dimensioni del segmento genomico coinvolto, della sua posizione e del contesto genomico, nonché del numero di geni sensibili al dosaggio all'interno del segmento riarrangiato, insieme ad altri fattori di rischio, le CNVs si possono riscontrare in disordini con ereditarietà mendeliana, sindromi da geni contigui, disordini cromosomici, o altri tratti sporadici o complessi.

SBILANCIAMENTI GENOMICI (MLPA)

La **MLPA** (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) è l'esame di riferimento per lo studio delle **variazioni del numero di copie dei geni (CNV)** associati a malattia.

La MLPA è una tecnica di PCR multiplex che utilizza una singola coppia di primer per amplificare fino a 60 sonde, ciascuna con un target genomico unico. Tale metodica possiede le caratteristiche adatte ad ampi screening essendo una tecnica sensibile, accurata, economica e di semplice utilizzo. Essa è utilizzata per la ricerca di riarrangiamenti, delezioni o duplicazioni, per l'analisi delle regioni introniche o regolatorie per i difetti di splicing di un gene. La tipologia di analisi molecolare eseguita può essere diversa rispetto a quelle sopraindicate a seconda dei dati emersi dalla consulenza genetica.

Questa U.O.S.D. offre la possibilità di analisi molecolare per la ricerca di microriarrangiamenti sbilanciati a carico di differenti regioni cromosomiche attraverso la metodica MLPA. Essa è indicata per l'inquadramento diagnostico di pazienti affetti da complessi sindromici polimalformativi associati o meno a ritardo mentale nei quali si sospetta una cromosomopatia.



CONDIZIONI ANALIZZABILI CON METODICA MLPA PRESSO QUESTA U.O.	
Sindrome di Sotos	NSD1 5q35; NFIX 19p13
Disordini subtelomerici	Tutti i subtelomeri
Sindrome di Williams-Beuren (WBS)	Regione critica 7q11.23
Disordini subtelomerici	Tutti i subtelomeri
Sindrome di DiGeorge	22q11.2; 22q13; 17p; 10p; 9q; 8p; 4q
Sindrome di Smith-Magenis	17p11.2
Sindrome di Prader-Willi (PWS); Sindrome di Angelman syndrome (AS)	PWS/AS region (15q11-13), MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, UBE3A, ATP10A, GABRB3, OCA2
Sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS); Sindrome di Russell-Silver (RSS)	11p15 region, H19, IGF2, CDKN1C, KCNQ1
Disomia Uniparentale 7 (UPD7); Disomia Uniparentale 14 (UPD14); Sindrome di Temple (TS); Sindrome di Kagami-Ogata (KOS)	Chr. 6q24; 7p12; 7q32; 14q32
Ritardo mentale	MEF2C 5q14.3, FOXP1 14q12
Sindrome di RETT classica e atipica	MECP2 Xq28; CDKL5 Xp22.13; ARX Xp21.3; NTNG1 1p13.3
Sindrome di Simpson-Golabi-Behmel di tipo 1 (SGBS1)	GPC3 Xq26.2; GPC4 Xq26
Discondrosteosi di Leri-Weill (LWD); Bassa statura idiopatica (ISS)	SHOX Xp22.33/Yp11.32
Neuropatia di Charcot-Marie-Tooth (CMT)	CMT/HNPP region 17p12; KIF1b 1p36
Atrofia Muscolare Spinale (SMA)	SMN1 5q13.2; SMN2 5q13.2
Distrofia muscolare di Duchenne (DMD); Distrofia muscolare di Becker (BMD)	DMD Xp21.1-p21.2
Alpha-talassemia	HBA 16p13.3
Beta-talassemia	HBB 11p15.4
Microdelezioni del cromosoma Y	Chr. Y
Tumore ereditario mammella/ovaio (HBOC)	BRCA1 17q21.31, BRCA2 13q13.1; CHEK2 22q12.1
Geni del mismatch repair	MLH1 3p22.2; MSH2 2p21; MSH6 2p16.3; PMS2 7p22.1; EPCAM 2p21; BRAF V600E
Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1)	NF1 17q11.2
Neurofibromatosi di tipo 2 (NF2)	NF2 22q12.2
Sindrome di predisposizione ai tumori rhabdoidi	SMARCB1 22q11.23
Sindrome di Lynch	MLH1 3p22.2; MSH2 2p21, MSH6 2p16.3; MUTYH 1p34.1; EPCAM 2p21
Gliomi	MGMT, IDH1, IDH2, p, 19q, IDH1 (2q33.3), IDH2 (15q26.1) and CDKN2A/2B 9p21.3

PROGETTI NAZIONALI AFFERENTI ALLA UOSD GENETICA MEDICA

GRUPPI DI LAVORO COLLABORATIVI

- 1) PROGETTO NAZIONALE DEL GRUPPO DI LAVORO OBESITA' GENETICE DELLA SIEDP (SOCIETÀ ITALIANA DI ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA) (LABORATORIO DI RIFERIMENTO PER ANALISI GENOMICHE)**
- 2) PROGETTO NAZIONALE PER LO STUDIO CLINICO-MOLECOLARE DELLE SINDROMI DA IPERACCRESIMENTO (LABORATORIO DI RIFERIMENTO PER ANALISI GENOMICHE)**
- 3) PROGETTO NAZIONALE PER LO STUDIO CLINICO-MOLECOLARE DEL DIABETE NEONATALE TRANSITORIO (LABORATORIO DI RIFERIMENTO PER ANALISI GENOMICHE)**

TRIALS CLINICI

- **Eltrombopag for the treatment of thrombocytopenia due to low- and intermediate risk myelodysplastic syndromes. (EQol-MDS)**
- **Biological safety of Eltrombopag for the treatment of thrombocytopenia due to low- and intermediate risk myelodysplastic syndromes: ancillary study of EQOL-MDS trial**
- **A Randomized Study to Evaluate the Efficacy of 5-Aza for Post-Remission Therapy of Acute Myeloid Leukemia in Elderly Patients (QoLESS AZA-AMLE)**
- **Translational research on Azacitidine Post-Remission Therapy of Acute Myeloid Leukemia in Elderly Patients (QOL-ONE Trans-2)**
- **Accuracy of alternative TP53 somatic mutational and expression analyses for the prognostication of myelodysplastic syndrome (QOL-ONE Trans-1)**

PROGETTI MINISTERIALI

- **PIANO OPERATIVO SALUTE – MINISTERO DELLA SALUTE – TRAIETTORIA 3 -MEDICINA RIGENERATIVA – PREDITTIVA – PERSONALIZZATA : SVILUPPO DI UNA PIATTAFORMA PER LA IMPLEMENTAZIONE CLINICA DELLA ONCOLOGIA DI PRECISIONE NELLE REGIONI DEL CENTRO SUD**
- **PIANO OPERATIVO SALUTE – MINISTERO DELLA SALUTE – TRAIETTORIA 5 - NUTRACEUTICA, NUTRIGENOMICA ED ALIMENTI FUNZIONALI: CREAZIONE DI UN PROGRAMMA DI AZIONE PER LA LOTTA ALLA MALNUTRIZIONE IN TUTTE LE SUE FORME E PER LA DIFFUSIONE DEI PRINCIPI DELLA DIETA MEDITERRANEA**

PROGETTO NAZIONALE OBESITA' MONOGENICA

In Europa l'obesità infantile è aumentata di 10 volte dagli anni '70 ed in Italia si stima che il 12,3 per cento dei bambini siano obesi. L'obesità infantile non rappresenta solo un quadro clinico che potrebbe dare problemi in età adulta, ma un'entità correlata a una morbidità importante già in età pediatrica. Nella maggior parte dei casi tale obesità è causata da un'alimentazione sbilanciata e da stili di vita sedentari, tuttavia in una percentuale piccola ma significativa di casi, la causa è nei geni. **In una percentuale che può essere compresa tra il 3 e il 5 per cento è infatti la manifestazione primaria di malattie a trasmissione familiare: le obesità genetiche non sindromiche ad eredità mendeliana.**

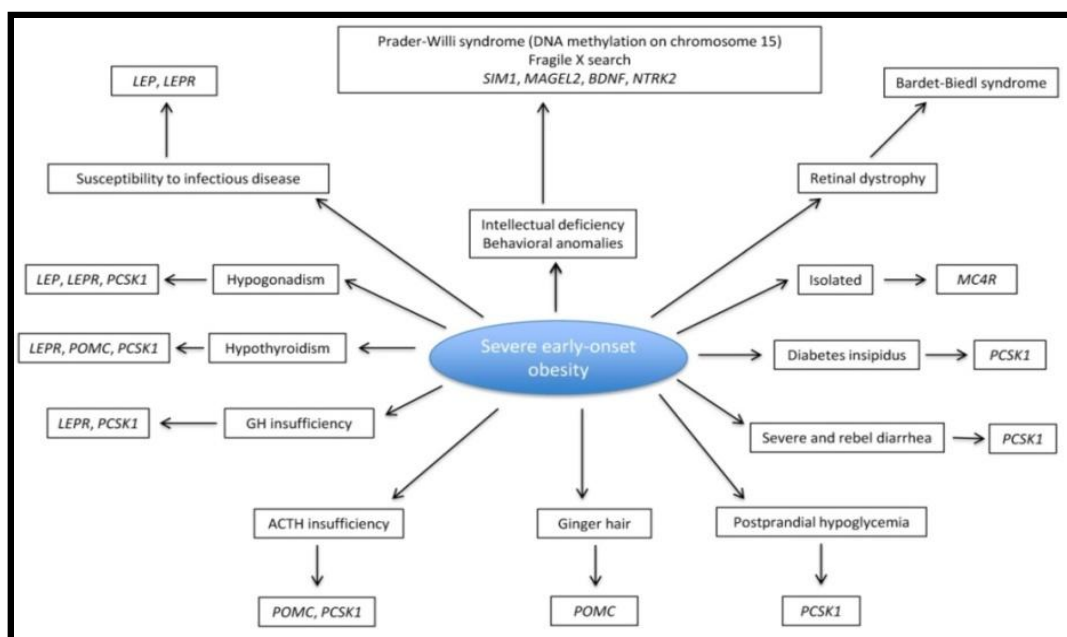
Le **forme primitive o essenziali di obesità** costituiscono circa il 95% dei casi di obesità comparsa prima dei 10 anni di età. L'alterazione del percorso del segnale ipotalamico della leptina-melanocortina che regola l'assunzione del cibo o dei pathways relativi al controllo del bilancio energetico (dovuta ad una singola mutazione genica), sono responsabili di alcune forme di obesità monogeniche e risultano essere importanti target farmacologici per il trattamento della obesità. A differenza delle sindromi genetiche classiche, in queste forme l'obesità, di tipo severo e ad insorgenza precoce, costituisce il sintomo principale.

L'obesità è il risultato di un prolungato squilibrio nel bilancio energetico tra la quantità di calorie assunte e quelle consumate o dalla combinazione di entrambe. L'organismo umano è caratterizzato da un "set point" che è in grado di riconoscere la quantità dei depositi adipocitari e conseguentemente di regolare il consumo calorico al fine di evitarne l'"accumulo". Questo sistema è caratterizzato da stimoli afferenti ed efferenti; i primi arrivano all'ipotalamo mentre i secondi attivano un processo omeostatico che permette di bilanciare i depositi adipocitari. Numerosi neurotrasmettitori e neuropeptidi interagiscono tra loro creando una rete complessa di segnali, afferenti ed efferenti, che regolano tale equilibrio energetico. Principali elementi di questo sistema di controllo sono i neuroni peptidergici dell'ipotalamo.

Nell'**ipotalamo** è localizzato il circuito della melanocortina regolato principalmente dalla leptina, prodotta dal tessuto adiposo, che regola il senso di sazietà e da altri ormoni periferici (grelina, insulina). La leptina è un ormone prodotto dalle cellule adipose e la cui concentrazione in circolo è proporzionale al contenuto di grasso corporeo. La leptina oltrepassa la barriera emato-encefalica legandosi al suo recettore ipotalamico (LEPR), presente a livello del SNC in particolare nel nucleo arcuato dell'ipotalamo, attivando così dei segnali che inibiscono l'introduzione di cibo.

A livello ipotalamico, nel nucleo arcuato (ARC) è presente una popolazione di neuroni che esprime i neuropeptidi orezzizzanti cioè stimolanti l'appetito: il Neuropeptide Y (NPY) ed Agouti Related Protein (AgRP), la cui espressione è ridotta dalla leptina. Un'altra popolazione di neuroni presente nello stesso nucleo ipotalamico esprime i neuropeptidi anoressizzanti, che sopprimono l'appetito: Cocaine and Amphetamine Related Transcript (CART) ed il peptide α -Melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), derivato dal processo proteolitico, operato dagli enzimi proconvertasi (PC1 e PC2) sul prodotto del gene della proopiomelanocortina (POMC). AgRP e α -MSH competono, a livello ipotalamico, principalmente nel nucleo paraventricolare (PVN) per il legame ai recettori della melanocortina (MC-Rs), in particolare per il sottotipo 4 (MC4R).

L'attivazione di MC4R da parte di α -MSH riduce la quantità di cibo assunta, mentre l'inibizione dello stesso da parte di AgRP aumenta il food-intake. È ampiamente dimostrato che l'interazione tra AgRP ed α -MSH con i recettori MC4R sia critica per il mantenimento dell'omeostasi energetica. I bersagli "downstream" di questo pathway non sono ancora del tutto chiari. Il prodotto del gene SIM, a livello del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo svolgerebbe un ruolo importante nel "signalling" a valle del recettore MC4R, mentre il "neurotrophic factor" (BDNF), a livello del nucleo ventro-mediale dell'ipotalamo, svolgerebbe il suo ruolo legandosi al recettore TrkB, codificato dal gene NTRK2



Questa U.O.S.D. si è fatta promotrice, all'interno del Gruppo di studio delle Obesità Genetiche della SIEDP (Società Italiana di Endocrinologia Pediatrica) dello studio clinico nazionale che ha già reclutato circa 80 pazienti, dal titolo:

PROGETTO NAZIONALE DEL GRUPPO DI LAVORO OBESITA' GENETICHE DELLA SIED (SOCIETÀ ITALIANA DI ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA): IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI MONOGENICHE NELL' OBESITÀ SEVERA AD INSORGENZA PRECOCE (EARLY CHILDHOOD OBESITY; ECO). Studio osservazionale retrospettivo e prospettico. **Laboratorio di riferimento :** U.O.S.D. Genetica Medica - Azienda Ospedaliera BMM - Reggio Calabria

Obiettivo primario dello studio: Identificazione di mutazioni genetiche in 13 geni coinvolti nelle forme di obesità monogenica facenti parte del pathway della leptina-melanocortina (**LEP, LEPR, POMC, PCSK1, MC4R, SIM1, MC3R, MAGEL2, MRAP2, NTRK2, CART, BDNF**) e del pathway del dispendio energetico (KSR2) e per i quali esiste documentata evidenza scientifica di un loro coinvolgimento nella ECO pediatrica. Le regioni geniche analizzate saranno quelle esoniche e le giunzioni introni/esoni mediante un pannello di target resequencing in Next Generation sequencing.

PROGETTO NAZIONALE SINDROMI DA IPERACCRESIMENTO



Le sindromi da iper-accrescimento sono un gruppo eterogeneo di condizioni caratterizzate da eccessiva crescita spesso associate ad altre malformazioni, ritardo mentale ed un aumentato rischio oncologico. La classificazione di questo gruppo di disordini è complessa, sia per l'estesa sovrapposizione delle loro caratteristiche cliniche, sia per il fatto che le anomalie molecolari causative sono molteplici. Al gruppo appartengono la Sindrome di Beckwith-Wiedemann, dovuta ad alterazione dell'imprinting, la sindrome di Sotos, la Sindrome di Weaver e la sindrome di Marshall-Smith.

La **sindrome di SOTOS** è caratterizzata da facies tipica e allungata, macrocefalia, convulsioni, anomalie morfologiche dell'encefalo e ritardo dello sviluppo neuropsicomotorio. La circonferenza cranica e l'altezza si assestano oltre il 97°

percentile per l'età. E' presente inoltre una età ossea aumentata rispetto a quella cronologica. La sindrome di Sotos è causata da perdita di funzione del gene **NSD1** (delezioni o mutazioni del gene).

La **sindrome di Weaver** è caratterizzata da età ossea marcatamente avanzata, macrocefalia spiccata, camptodattilia, lieve ritardo dello sviluppo neuropsicomotorio, principalmente con compromissione della sfera dell'espressione verbale. La sovrapposizione fenotipica con la sindrome di Sotos è marcata. Essa è causata da mutazioni a carico del gene **EZH2**.

La **sindrome di Marshall-Smith** è una rara sindrome genetica, caratterizzata da alta statura e età ossea avanzata. Nei pazienti si osservano spesso alcuni segni tipici come le bozze frontali, gli occhi prominenti, le sclere blu, le narici anteverse, la micrognazia. La sintomatologia clinica è grave, ma si possono osservare forme meno gravi, a evoluzione protratta. Essa è causata da mutazioni a carico del gene **NFIX**.

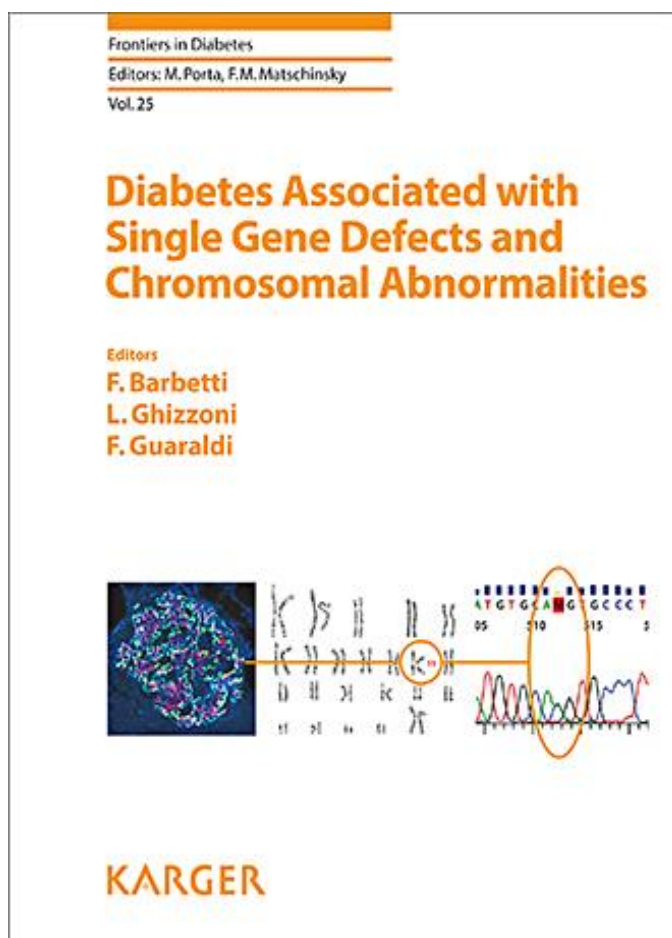
Questa U.O.S.D. è centro di riferimento nazionale per lo studio clinico e molecolare delle sindromi di iperaccrescimento ed ha collaborato come capofila alla delineazione clinico molecolare della Sindrome di Malan nonché alla stesura del relativo capitolo del libro internazionale: **"Overgrowth Syndromes" a clinical Guide. Oxford University Press, 2019.**

PROGETTO NAZIONALE DIABETE NEONATALE TRANSITORIO

Il diabete mellito neonatale transitorio è una rara forma di diabete caratterizzata dalla comparsa di iperglicemia sin dalla nascita. Il neonato si presenta con basso peso alla nascita e possono essere presenti delle malformazioni (ernia ombelicale, macroglossia). Esso richiede trattamento insulinico e di solito va in remissione dopo circa 12 settimane, ma in quasi il 50% dei pazienti, nel corso dell'adolescenza compare un diabete di tipo 2.

La patogenesi della malattia è legata ad alterazioni di una regione cromosomica nel braccio lungo del cromosoma 6 (6q24), normalmente sottoposta ad imprinting genetico (duplicazioni paterne, disomia uni parentale, difetto di metilazione). I geni coinvolti sono il gene ZAC codificante per una proteina coinvolta nella proliferazione cellulare ed il gene HYAMI che codifica per un lungo RNA non codificante, che svolge un ruolo regolatorio.

Questa U.O.S.D. è **centro di riferimento nazionale** per lo studio clinico e molecolare del diabete neonatale transitorio ed ha collaborato come capofila alla diagnostica molecolare del Diabete neonatale transitorio nonché alla stesura del relativo capitolo del libro internazionale:



Neonatal Diabetes: Permanent Neonatal Diabetes and Transient Neonatal Diabetes

Barbetti F.^{a-c} · Mammì C.^d · Liu M.^e · Grasso V.^b ·
Arvan P.^f · Remedi M.^g · Nichols C.G.^h

[Author affiliations](#)

^aDepartment of Experimental Medicine and Surgery, University of Rome Tor Vergata, Rome,

^bBambino Gesù Children's Hospital, Rome, ^cS. Pietro Hospital - Fatebenefratelli, Rome, and ^dMedical Genetics Unit, BMM Great Metropolitan Hospital, Reggio Calabria, Italy; ^eDivision of Endocrinology and Metabolism, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin, China; ^fDivision of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, University of Michigan, Ann Arbor, MI, and Departments of ^gMedicine and ^hCell Biology and Physiology, Washington University School of Medicine, St.

PIANO OPERATIVO SALUTE – MINISTERO DELLA SALUTE

Il Grande Ospedale Metropolitano "Bianchi Melacrino Morelli" di Reggio Calabria è risultato vincitore di due traiettorie nell'ambito dei progetti di ricerca sanitaria del Ministero della Salute relativi al "Piano Operativo Salute" (POS) - Fondo Sviluppo e Coesione 2014-2020. I bandi ministeriali erano finalizzati alla selezione di progetti da finanziare con duecento milioni di euro complessivi, derivanti dalle politiche europee di sviluppo della coesione economica, sociale e territoriale e rimozione degli squilibri economici e sociali.

I due progetti cui il G.O.M. di Reggio Calabria ha partecipato (assieme a enti Universitari, Aziende Ospedaliere, IRCCS e Istituti di Ricerca) risultati vincitori in seguito a valutazione tecnico-scientifica e finanziaria delle proposte affidata ad una Commissione composta da personalità presenti nell'elenco dei ricercatori italiani residenti all'estero, riguardano:

- Lo **"Sviluppo di una Piattaforma per l'Implementazione Clinica della Oncologia di Precisione nelle Regioni del Centro-Sud"** all'interno della Traiettoria 3 "Medicina rigenerativa, predittiva e personalizzata"; Azione 3.1. "Creazione di un programma di medicina di precisione per la mappatura del genoma umano su scala nazionale" con la UOSD di Genetica Medica del GOM all'interno del gruppo collaborativo che vede come capofila l'Istituto Nazionale Tumori - IRCCS Fondazione G. Pascale di Napoli, classificatosi in quarta posizione nazionale con il punteggio di 84,5, per un finanziamento totale di 5.411.038,00 di euro. Il gruppo vincitore è inoltre costituito dalla Fondazione IRCCS Policlinico Universitario Agostino Gemelli di Roma, l'IRCCS Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione - ISMETT di Palermo, l'Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori "Dino Amadori" IRCCS, l'IRCCS Istituto Tumori Giovanni Paolo II di Bari e l'IRCCS CROB Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata;
- La **"Creazione di un programma di azione per la lotta alla malnutrizione in tutte le sue forme e per la diffusione dei principi della Dieta mediterranea"** all'interno della Traiettoria 5 "Nutraceutica, Nutrigenomica ed Alimenti funzionali" con la UOSD di Genetica Medica del GOM all'interno del gruppo collaborativo che vede come capofila l'Università Magna Graecia di Catanzaro insieme alla Università della Calabria, la Biobanca del Piemonte ed altre istituzioni nazionali. Il progetto prevede la istituzione nell'HUB del Grande Ospedale Metropolitano di Reggio Calabria (GOM), presso la UOSD di Genetica Medica, di una biobanca genetica che raccolga campioni di DNA provenienti da pazienti affetti da malattie cardiovascolari che accedono ai diversi reparti di ricovero ospedaliero. Sui campioni di DNA presenti nella Biobanca sarà possibile eseguire l'analisi di SNPs per la creazione di un genetic risk score personalizzato

LA RETE DIABETOLOGICA PEDIATRICA CALABRESE

Nell'ottobre 2007, la sezione Calabria della Società Italiana di Pediatria (SIP), con il sostegno del gruppo di studio italiano della Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica (SIEDP), ha promosso la costituzione di una rete di assistenza per la cura del diabete in età pediatrica. La rete, denominata "Rete diabetologica pediatrica calabrese", è costituita da tredici centri ospedalieri, riconosciuti come centri di riferimento per la diagnosi e il trattamento del diabete in età pediatrica e situati su tutto il territorio della Calabria, in modo da garantire una copertura assistenziale quasi completa dell'intera regione. Quattro centri (Castrovillari, Cetraro-Paola, Corigliano-Rossano, Cosenza) nell'ASP (Azienda Sanitaria Provinciale) di Cosenza (733.508 abitanti), quattro centri (Catanzaro, Lamezia, Soverato, Soveria Mannelli) nell'ASP di Catanzaro (367.990 abitanti), tre centri (Locri, Polistena, Reggio Calabria) nell'ASP di Reggio Calabria (566.507 abitanti), un centro (Crotone) nell'ASP di Crotone (173.370 abitanti) e un centro (Vibo) nell'ASP di Vibo Valentia (167.334 abitanti).



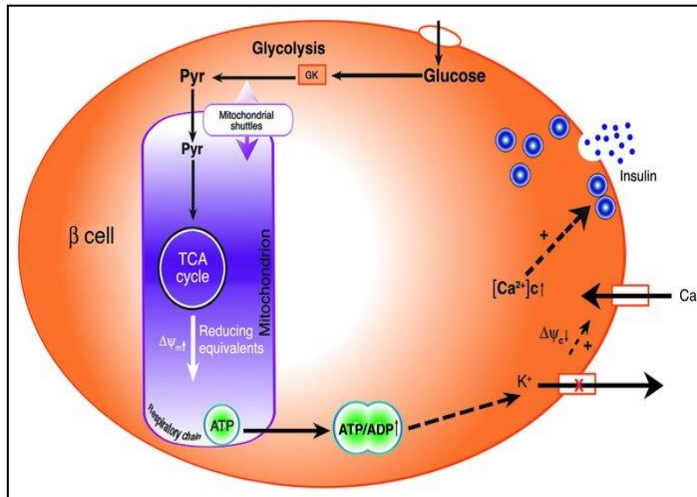
Oltre all'omogeneità delle diagnosi, del follow-up e della terapia della patologia, questa Rete ha ottenuto importanti risultati epidemiologici per la definizione esatta dell'incidenza del diabete di tipo 1 nella regione, risultata la più alta dell'Italia peninsulare. Risultati interessanti, in ambito regionale, sono stati ottenuti in relazione alla possibilità di studiare, presso questa U.O. di Genetica Medica, che fa parte del Consorzio di Genetica del Diabete Non Autoimmune in età Pediatrica (CO.GE.DI.N.A.P.) Nazionale, la biologia molecolare del diabete monogenico in tutti i pazienti senza anticorpi contro le cellule beta e con familiarità positiva. Dopo due anni, la Regione Calabria, con atto deliberativo, ha ratificato la costituzione della "Rete" e confermato il modello organizzativo come il solo possibile per garantire l'assistenza ai pazienti pediatrici affetti da diabete in tutto il territorio.

Presso questa U.O. è possibile eseguire:

- **Consulenza genetica clinica** per diabete gestazionale, diabete di tipo 1 e 2 e diabete monogenico familiare.
- **Analisi mutazionale per MODY2 , MODY3, MODY 5** con sequenziamento diretto dei relativi geni
- **Analisi Riarrangiamenti geni MODY** con metodica MLPA
- **Studio molecolare diabete neonatale transitorio (DNT)**

DIABETE MODY

Il *MODY* (*maturity onset diabetes young*), una forma di diabete monogenico, costituisce una delle forme più importanti di diabete da causa genetica nota. Questa forma di diabete, insorge di solito prima dei 25 anni, ed ha le caratteristiche del diabete di tipo 2 dell'adulto. In genere la malattia è presente in uno dei genitori .



La sua prevalenza nell'ambito di tutte le forme di diabete è stimata essere intorno al 5%, rappresentando quindi una parte importante dei pazienti diabetici. Sono attualmente conosciute 6 forme di *MODY* causate da mutazioni di geni differenti, che sono espressi tutti nelle β -cellule pancreatiche (*MODY* 1, *MODY* 2, *MODY* 3, *MODY* 4, *MODY* 5, *MODY* 6), ma il maggior numero di pazienti descritti (75-90%) appartiene alle classi *MODY* 2 e *MODY* 3, clinicamente differenti tra loro. Tutti i geni responsabili del *MODY* determinano una riduzione della secrezione di insulina da

parte del pancreas, con conseguente peggioramento del controllo della glicemia.

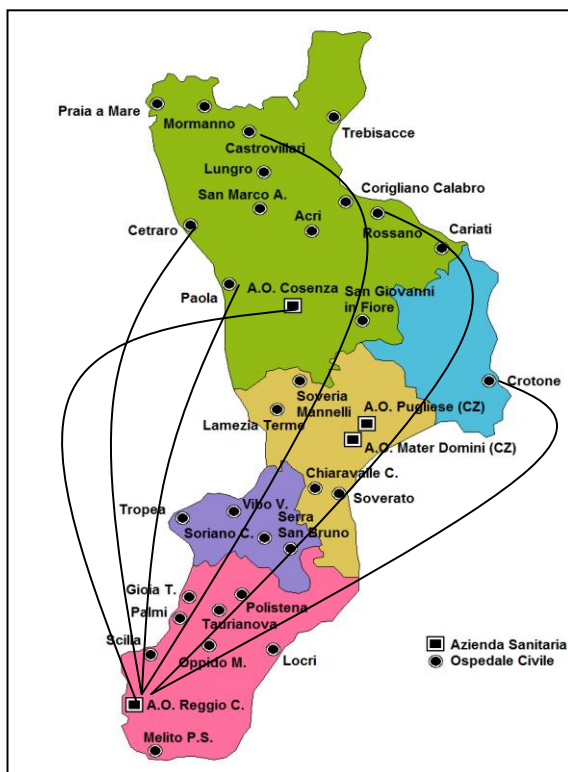
In Italia il *MODY* 2 ha una frequenza del 35-40% ed è caratterizzato da alterazioni del gene della glucocinasi (GCK), che esitano dal punto di vista clinico in una riduzione del 60% della secrezione insulinica indotta dal glucosio. I pazienti con *MODY* 2 hanno una forma lieve di diabete mellito, controllabile con dieta ed esercizio fisico o con l'aggiunta di anti-diabetici orali. I pazienti con *MODY* 2 sono asintomatici per lunghi periodi di tempo, sebbene alterazioni glicemiche siano evidenziabili già in età pediatrica. Spesso la diagnosi viene eseguita in gravidanza.

Le caratteristiche cliniche che possono suggerire di considerare una diagnosi genetica di *MODY* 2 sono:

- Modesta iperglicemia (5.5–8.5 mmol/l) persistente e stabile nel tempo
- Emoglobina glicosilata quasi sopra i valori normali massimi(5.5–5.7%)
- Incremento in un OGTT a 2h piccolo (< 3.5 mmol/l)
- Assenza di autoanticorpi
- Familiari di I grado (genitori, fratelli, sorelle) con iperglicemia o con madre che ha sviluppato diabete gestazionale nel corso della gravidanza.

La diagnosi differenziale del *MODY* 2 rispetto alle altre forme di diabete (sia di tipo 1 che di tipo 2) è di grande aiuto per la scelta terapeutica (trattamento esclusivamente dietetico) che per la prognosi (raramente questo tipo di diabete presenta le classiche complicanze cardiovascolari).

LA RETE REGIONALE DI DIAGNOSI PRENATALE CITOGENETICA



Da molti anni, questa UOSD di Genetica Medica è il laboratorio di riferimento regionale per la Diagnosi prenatale citogenetica su liquido amniotico. I rapporti di collaborazione che intercorrono con le diverse UOC di Ginecologia ed Ostetricia della Regione Calabria, rende possibile l'esecuzione dell'amniocentesi nella sede più vicina alla residenza della gestante, con la formazione di una vera e propria rete regionale della diagnosi prenatale.

La rete è, quindi, in grado di fornire un servizio efficace e di grande utilità per le gestanti che devono eseguire la diagnosi prenatale citogenetica in quanto non sono obbligate a spostarsi all'interno della regione per l'esecuzione dell'esame. La centralizzazione dell'esame ha, inoltre, permesso a questa U.O.S.D. di accumulare un livello di esperienza di altissimo livello grazie all'elevato numero degli esami eseguiti che sono pari a circa 500/anno. Nel corso dell'attività ultraventennale ad oggi il numero totale delle

diagnosi citogenetiche prenatali eseguite è superiore ai 40.000 casi.

Le Aziende Sanitarie Provinciali e le Aziende Ospedaliere della Regione Calabria che sono collegate in rete con questa U.O.S.D. per la esecuzione della diagnosi prenatale citogenetica sono le seguenti:

<i>U.O. di Ginecologia ed Ostetricia regionali collegate in rete per la Diagnosi Prenatale Citogenetica</i>
Azienda Ospedaliera di Cosenza
Presidio ospedaliero di Corigliano ASP CS
Presidio ospedaliero di Castrovillari ASP CS
Presidio ospedaliero di Cetraro Paola ASP CS
Presidio ospedaliero di Lametia Terme ASP CZ
Presidio ospedaliero di Crotona ASP KR

DIAGNOSI PRENATALE ED AMNIOCENTESI



L'amniocentesi è un esame diagnostico che si effettua tra la 15a e la 18a settimana di gravidanza, finalizzato alla diagnosi di anomalie cromosomiche del feto, ma anche alla ricerca di infezioni fetali e di patologie geniche qualora la donna o il marito ne siano portatori. Si effettua dalla 15a settimana perché questo è il periodo ottimale per ottenere cellule fetali in grado di moltiplicarsi e con ciò rendere possibile l'esame citogenetico e perché in questo momento della gravidanza esiste una adeguata quantità di liquido amniotico. Si effettua fino a 18 settimane perché, anche se tecnicamente possibile farlo oltre la 18ª settimana, il referto arriverebbe così tardi da precludere alcune scelte da parte della coppia. L'amniocentesi si effettua introducendo un ago attraverso la cute dell'addome materno, attraversando la parete dell'utero e la

membrana amniotica fino a giungere nel sacco amniotico da dove vengono prelevati circa 20 cc di liquido amniotico. Naturalmente, come tutti gli esami diagnostici, l'amniocentesi non è obbligatoria. Usualmente il motivo che induce una donna a sottoporsi all'amniocentesi è l'età avanzata in cui la donna si trova al momento della gravidanza. Infatti il rischio che il feto possa essere portatore di patologie cromosomiche (la più conosciuta delle quali è la sindrome di Down) aumenta con l'aumentare dell'età materna e a 35 anni il rischio che il bambino possa nascere con una patologia cromosomica è sufficientemente alto da giustificare il rischio che comporta l'effettuazione dell'amniocentesi. Oltre che per l'età materna uguale o superiore a 35 anni, l'amniocentesi può essere proposta per altri motivi:

- **precedente gravidanza con anomalia cromosomica fetale**
- **genitore portatore di una anomalia cromosomica strutturale bilanciata o di un marcatore cromosomico soprannumerario**
- **genitore con mosaicismo cromosomico**
- **anomalie fetali eco-evidenziate, compresi i Difetti del tubo neurale e segni ecografici predittivi di patologia cromosomica, quale la Translucenza nucale (NT) aumentata**
- **indagini biochimiche sul siero materno suggestive di un aumento del rischio di patologia cromosomica fetale (Duo Test e Tri Test positivo)**
- **altre condizioni, da valutare in sede di consulenza genetica.**

Alle donne con indicazione all'amniocentesi "*Età materna maggiore o uguale ai 35 anni*" che si rivolgono a questa U.O., viene effettuata, prima dell'esame, una consulenza genetica per delucidare le modalità di esecuzione del prelievo e dell'esame di laboratorio. Essa è di fondamentale importanza per la comprensione del consenso informato.

La consulenza genetica che precede la diagnosi prenatale è, infatti, uno dei momenti più importanti del processo diagnostico poiché è l'unico in cui viene dato all'utente la possibilità di conoscere i vantaggi e i limiti dell'intervento al quale si sottoporrà. Si tratta di un momento di particolare fragilità della gestante e della coppia, in generale, che realizza di essere potenzialmente a rischio per una scelta molto coraggiosa relativa al futuro del proprio figlio. Il "Counselling prenatale", pertanto, deve necessariamente comprendere le giuste informazioni mediche insieme ad un adeguato supporto di tipo psicologico di cui deve farsi carico il genetista. Questa consapevolezza ha dato spunto, pressola U.O., ad una esperienza di **Medicina Narrativa** nella quale alcune gestanti si sono offerte di raccontare mediante interviste e fotografie la propria esperienza di amniocentesi. Il risultato è stato quello di una maggiore fiducia da parte delle gestanti nei confronti di questa U.O. ed una maggiore consapevolezza da parte degli operatori sanitari che la diagnosi prenatale, pur essendo un atto medico, non può prescindere dalla umanizzazione dell'intervento stesso.

Per avere la risposta dell'amniocentesi bisogna attendere circa 15-18 giorni. In alcuni casi è necessario la ripetizione del prelievo. E' possibile, infatti, che le cellule amniotiche prelevate, non si moltiplichino in coltura. E' una evenienza piuttosto rara, ma che costringe a ripetere il prelievo. Un altro motivo di ripetizione del prelievo è il riscontro di mosaicismi. Cioè la presenza contemporanea di cellule normali e di cellule con anomalie cromosomiche. Il citogenetista per avere una idea più precisa sullo stato delle cose potrebbe richiedere di avere a disposizione altro liquido amniotico.

Il problema più significativo che comporta l'amniocentesi e che è all'origine dei dubbi se farla o meno è il rischio di aborto. Questo, infatti, si verifica in circa una volta ogni trecento amniocentesi. In ragione di questa percentuale di rischio, si sceglie di effettuare l'esame solo quando il rischio personale di avere un figlio portatore di una anomalia cromosomica è maggiore di uno a trecento (1:250) (ad esempio 1:200; 1:100 ecc). Sul liquido amniotico e sulle cellule fetali prelevate possono essere effettuate le seguenti indagini:

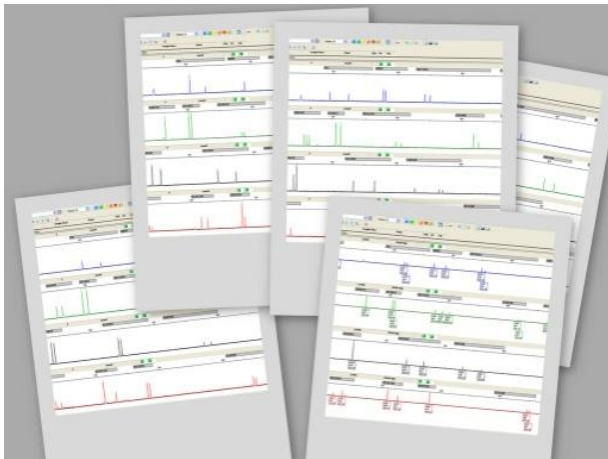
- indagini citogenetiche per la diagnosi di anomalie cromosomiche
- il dosaggio dell'alfa-fetoproteina per la diagnosi dei difetti del tubo neurale (attualmente la diagnosi si esegue con l'esame ecografico assieme alla determinazione del livello di alfa-fetoproteina sierica materna a 15-18 settimane di gestazione)
- indagini biochimiche per la diagnosi degli errori congeniti del metabolismo
- analisi del DNA per la diagnosi delle malattie ereditarie monogeniche (per questo tipo di indagine si preferisce ricorrere al prelievo dei villi coriali CVS)

Di routine, però, l'amniocentesi è eseguita esclusivamente per la determinazione del cariotipo fetale e per il dosaggio dell'Alfa-fetoproteina, mentre per patologie geniche che necessitano di metodiche biochimiche o di biologia molecolare è necessaria una precisa indicazione clinica.

Esame	Esecuzione	Impegnative
Amniocentesi	Martedì di ogni settimana, mediante prenotazione in reparto dopo consulenza genetica Tempo di consegna: 21gg	Impegnativa interna

LA QF-PCR

La QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di biologia molecolare che è stata introdotta di recente quale metodo rapido e sensibile per evidenziare le più comuni anomalie cromosomiche del feto. Essa viene applicata principalmente su prelievi di liquido amniotico e permette di ottenere, nell'arco di 24-48 ore, il risultato riguardante possibili aneuploidie dei cromosomi 21,18,13, X ed Y che rappresentano l'80-95% delle possibili anomalie cromosomiche rilevabili tramite la determinazione del cariotipo fetale.

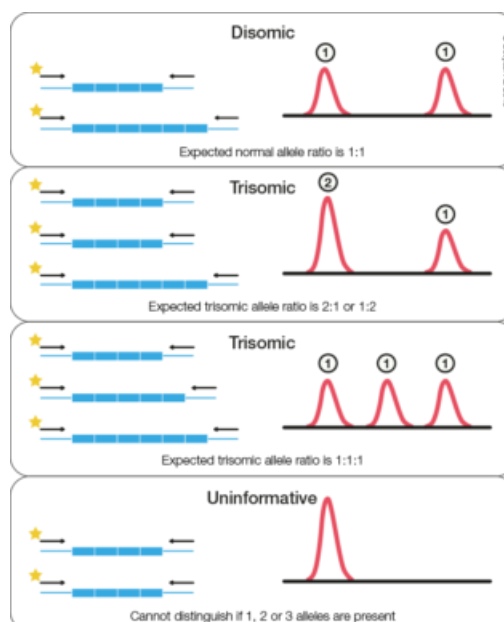


L'analisi affianca l'indagine di citogenetica tradizionale tramite coltura di amniociti e determinazione del cariotipo, ma non richiede ulteriori quantità di materiale in quanto è applicata direttamente su una piccola aliquota (2-3 ml) del prelievo ottenuto tramite amniocentesi. **La rapidità di esecuzione della QF-PCR (24-48 h)** permette di ridurre al minimo i tempi di attesa del referto: la possibilità di escludere una patologia cromosomica in poche ore dal prelievo contribuisce alla eliminazione dell'ansia materna, mentre in casi positivi permette al citogenetista di velocizzare il più possibile l'esame

citogenetico classico per confermare il dato diagnostico.

La metodica si basa sulla PCR e sulla amplificazione di sequenze ripetitive del DNA chiamate microsatelliti o STR (Short tandem repeats) localizzate sui cromosomi oggetto di studio. In caso di trisomia si può verificare o la presenza di tre picchi (trisomia triallelica) o di due picchi con rapporto di area di 2:1 (trisomia diallelica). Di solito l'esame viene eseguito su più STRs, con l'analisi quindi in contemporanea di più marcatori. Essa inoltre è in grado di discriminare una eventuale contaminazione con cellule materne, specie quando il prelievo è ematico.

Presso questa UO la QF-PCR viene eseguita nelle situazioni di gravidanze ad alto rischio genetico al fine di poter anticipare nel più breve tempo possibile la diagnostica prenatale.

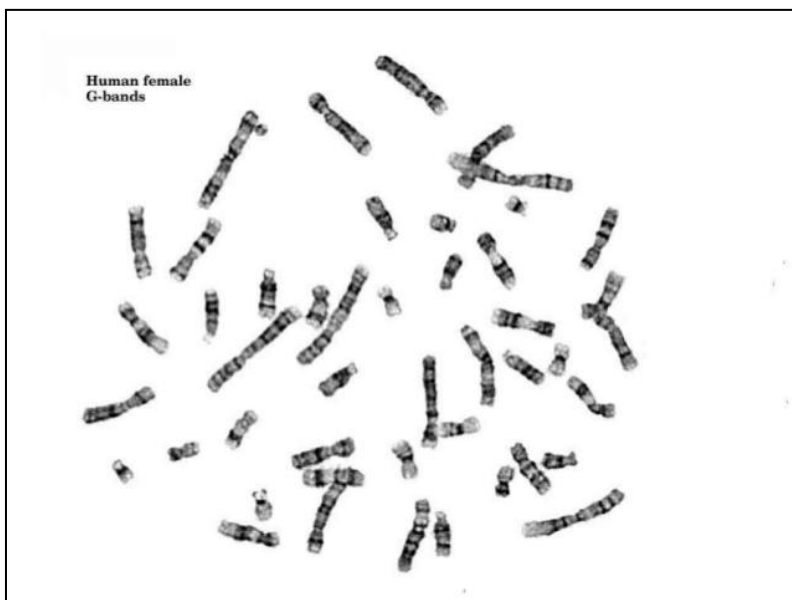


LA CITOGENETICA POST-NATALE

CARIOTIPO SU SANGUE VENOSO

L'indagine citogenetica postnatale ha lo scopo di accertare la presenza di anomalie cromosomiche numeriche e/o strutturali che possono essere associate ad una condizione di patologia genetica, ad una riduzione della fertilità o ad una maggiore probabilità di generare figli affetti da patologia genetica. La determinazione di una diagnosi genetica precisa può contribuire alla formulazione di una prognosi più precisa e indicare specifici provvedimenti di gestione clinica.

L'analisi dei cromosomi o cariotipo, è una indagine di primo livello in genetica, raccomandata in tutti i pazienti che presentano anomalie congenite e ritardo mentale. Nei soggetti normali esso è 46,XY nei maschi e 46,XX nelle femmine. Le anomalie cromosomiche nel loro insieme (anomalie di numero: *trisomie e monosomie* ed anomalie di struttura: *delezioni, duplicazioni, traslocazioni*) sono responsabili di circa il 6-7% di tutte le patologie genetiche caratterizzate da malformazioni multiple, dismorfismi e ritardo mentale osservate sui nati vivi.



Le anomalie cromosomiche citogeneticamente visibili sono presenti nello 0,5 per cento dei neonati e identificano diverse condizioni cliniche, tra cui la Sindrome di Down (trisomia 21), di Edwards (trisomia 18), di Patau (trisomia 13), di Klinefelter (47,XXY), e di Turner (45,X).

Altre sindromi cromosomiche più rare, ma caratterizzate da anomalie cromosomiche caratteristiche sono la sindrome 4p- (sindrome Wolff-Hirschhorn), la sindrome 5p-

(sindrome cri du chat) la sindrome 18q- (sindrome De Grouchy), la sindrome 13q-. In questi casi si osserva una delezione parziale a carico di un autosoma. Dal punto di vista clinico, sono caratterizzate da un fenotipo specifico e facilmente individuabili da uno specialista.

L'indagine citogenetica di laboratorio rappresenta solo una parte della valutazione genetica. Eventuali risultati diversi da cariotipo normale o in caso di persistente sospetto di anomalia genetica sarà indicata una specifica consulenza genetica.

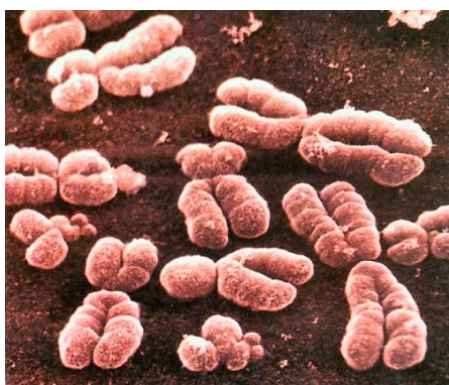
Alterazioni di numero o di struttura dei cromosomi sono presenti nel 14% degli uomini azoospermici (assenza completa degli spermatozoi) e nel 5% di quelli oligospermici (grave riduzione del numero degli spermatozoi). La maggior parte di esse coinvolgono i cromosomi sessuali e l'alterazione cromosomica più frequente è la Sindrome di Klinefelter, in cui il soggetto presenta un cariotipo 47,XXY (presenza di un cromosoma X soprannumerario) ed azoospermia.

L'analisi del cariotipo è eseguito sul sangue venoso ed è indicato in caso di:

- Sospetto clinico di patologia cromosomica
- Studio familiare in presenza di una anomalia cromosomica
- Malformazioni congenite
- Precedenti nati morti e/o malformati
- Ritardo di crescita
- Ritardo psico/motorio e mentale
- Anomalie dello sviluppo puberale
- Poliabortività
- Sterilità di coppia

Esame	Esecuzione	Impegnative
Cariotipo	Lunedì di ogni settimana, mediante prenotazione in reparto dopo consulenza genetica <i>Tempo di consegna: 21gg</i>	Impegnativa interna

CARIOTIPO SU PRODOTTO ABORTIVO



Le **anomalie cromosomiche rappresentano la causa più frequente di aborto spontaneo** e si ritrovano nel 50-70% degli aborti spontanei del primo trimestre e nel 5-10% di tutte le gravidanze. La diagnosi di queste anomalie viene richiesta per individuare la causa di aborto spontaneo e viene eseguita attraverso metodiche di citogenetica classica. Le anomalie cromosomiche più frequentemente ritrovate negli aborti spontanei sono le trisomie cromosomiche (16,21,13,18), la monosomia del cromosoma X (45,X) e la triploidia (69,XXX o 69,XYY).

In alcuni casi la citogenetica classica fallisce a causa del deterioramento del campione biologico o per la presenza di germi, in quanto spesso viene raccolto alcuni giorni dopo l'interruzione del battito cardiaco fetale ed in condizioni di possibile contaminazione microbiologica. Per questo motivo il materiale, deve pervenire in laboratorio il più presto possibile e deve essere contenuto in un contenitore sterile in presenza di soluzione fisiologica sterile. Il campione deve essere mantenuto a temperatura ambiente e non deve essere assolutamente fissato in formalina.

Esame	Esecuzione	Impegnative
Cariotipo su prodotto abortivo	Contattare direttamente la U.O.	Coltura di cellule da altri tessuti 91.33.5 + cariotipo da metafasi da altri tessuti 91.30.5

SERVIZIO DI GENETICA CLINICA E MALATTIE RARE



La **CONSULENZA GENETICA SPECIALISTICA** è un complesso atto medico che ha come finalità di informare un individuo o una famiglia a rischio di malattia genetica, sugli aspetti medici e genetici, sulla diagnosi, prognosi, terapia della condizione e sul rischio di ricorrenza della stessa. Le famiglie chiedono la

consulenza genetica su indicazione del medico di famiglia o dello specialista, ma possono accedere anche autonomamente per informazioni e chiarimenti su specifiche problematiche.

La Consulenza Genetica comprende aspetti medici, biologici e psicologici, ed ha come atto finale la trasmissione delle informazioni raccolte ed elaborate non al solo individuo ma, spesso, a tutta la sua famiglia. Un'attività così complessa richiede l'organizzazione di una equipe, una specifica preparazione e la disponibilità di tempo. Vi sono infatti da un lato situazioni di semplice inquadramento diagnostico per le quali la consulenza genetica può esaurirsi in un unico colloquio. D'altra parte vi sono invece condizioni molto complesse, che richiedono esperienza e specifica competenza, oppure che presentano caratteristiche tali da rendere difficile o delicata la comunicazione della diagnosi. Per tali condizioni molto spesso è necessaria una procedura articolata; in tali casi si rendono spesso necessari più incontri con i consultandi e l'intero procedimento della Consulenza Genetica può richiedere tempi lunghi, anche di alcuni mesi. Un particolare tipo di Consulenza Genetica è quella di tipo dismorfologico. Le sindromi d'origine genetica sono delle specifiche entità cliniche caratterizzate da dismorfismi, malformazioni congenite multiple e, nella maggior parte dei casi, ritardo mentale.

Circa l' 1% dei nati vivi presenta anomalie multiple riconducibili ad una patologia genetica complessa. Di questi, il 40% è affetto da un complesso malformativo o sindromico riconoscibile e noto. Il genetista clinico fornisce un valido e sostanziale aiuto inter-specialistico per un adeguato coordinamento di tutte le fasi necessarie per il corretto inquadramento del singolo paziente e può fornire un più ampio sostegno al nucleo familiare del probando tramite la formulazione di una prognosi specifica di sopravvivenza e qualità di vita e nella prevenzione primaria e secondaria attraverso un accurato "counselling". La capacità di un Genetista clinico dismorfologo di riconoscere un numero elevato di sindromi è direttamente proporzionale alla sua esperienza e alla sua sensibilità e capacità di riconoscere segni dismorfici chiave. Inoltre alcuni fenotipi sindromici variano con il tempo, pertanto una determinata diagnosi può risultare molto agevole in uno specifico momento e più difficile in altri.



Le malattie rare sono un cospicuo ed eterogeneo gruppo di patologie umane (circa 7.000-8.000) definite tali per la loro bassa diffusione nella popolazione (colpiscono non oltre 5 per 10.000 abitanti nell'Unione Europea). Nel loro insieme costituiscono un problema sanitario importante e coinvolgono milioni di persone in tutto il mondo.

Circa l'80% dei casi è di origine genetica, per il restante 20% si tratta di malattie multifattoriali derivate, oltre che da una suscettibilità individuale, anche da altri fattori (ad esempio, alcuni fattori ambientali, alimentari) oppure dall'interazione tra cause genetiche e ambientali. Esiste una grande differenza rispetto all'età in cui compaiono, alcune possono manifestarsi in fase prenatale, altre alla

nascita o durante l'infanzia, altre ancora in età adulta. Nonostante la loro numerosità ed eterogeneità, le malattie rare sono accomunate da diversi aspetti che includono: la difficoltà per il malato a ottenere una diagnosi appropriata e rapida, la rara disponibilità di cure risolutive, l'andamento della malattia spesso cronico-invalidante, il peso individuale, familiare e sociale rilevante. Nonostante i numerosi progressi, la ricerca scientifica va ulteriormente incentivata per comprendere i meccanismi alla base delle malattie rare e sviluppare nuovi approcci diagnostici e terapeutici. In Italia, dal 2001 sono stati istituiti:

- Rete nazionale dedicata alla prevenzione, sorveglianza, diagnosi e terapia delle malattie rare
- Registro nazionale malattie rare presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS)
- Elenco di malattie rare per le quali è riconosciuto il diritto all'esenzione dalla partecipazione al costo delle prestazioni di assistenza sanitaria incluse nei Livelli essenziali di assistenza – LEA (DM 279/2001 e DPCM del 12 gennaio 2017)

Proprio in ragione della loro rarità le malattie rare rappresentano un problema molto rilevante per gli ammalati e i loro familiari. La scelta di dedicare una particolare attenzione, in termini di diagnosi e sorveglianza, all'intera categoria delle malattie rare dipende dal fatto che tali malattie, condividono comuni problematiche clinico-assistenziali e richiedono un'assistenza specialistica e continuativa. Sin dalla istituzione della rete regionale malattie rare da parte della regione Calabria inquadrata all'interno della più ampia rete Nazionale delle malattie rare e della nascita del Registro nazionale Malattie Rare coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità, questa U.O è uno dei centri di riferimento per la certificazione di diagnosi di malattia rara.

La nostra Unità Operativa fornisce un valido e sostanziale aiuto inter-specialistico per un adeguato coordinamento di tutte le fasi necessarie per il corretto inquadramento del singolo paziente e può fornire un più ampio sostegno al nucleo familiare del probando.

Esame	Esecuzione	Impegnative
Consulenza genetica II livello	Dal lunedì al venerdì, con prenotazione CUP	n° 1 Consulenza genetica (89.7) per i soggetti <16aa n° 1 Consulenza genetica (89.01) per i soggetti >16 aa

SINDROME DELL'X FRAGILE

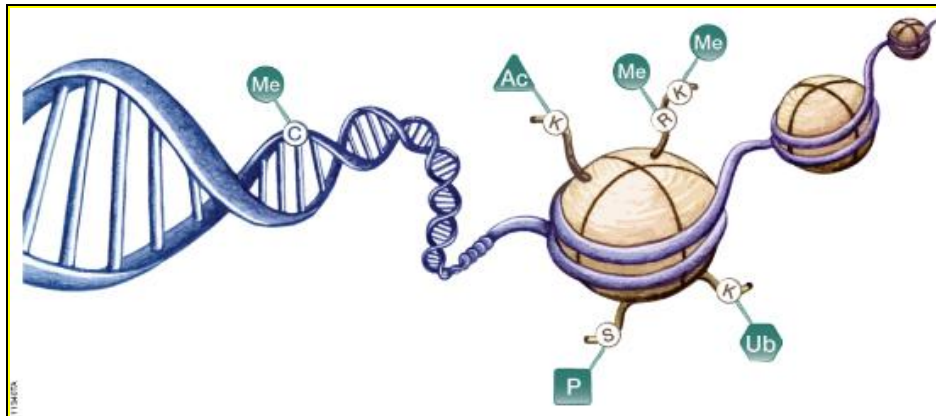
La sindrome dell'X fragile è una malattia genetica rara di ritardo mentale lieve-grave. Circa 1:4000 maschi nella popolazione generale sono affetti dalla sindrome. La malattia è dovuta all'alterazione (mutazione) di un gene situato sul cromosoma X. La patologia non compare alla nascita ma si manifesta progressivamente. I soggetti affetti presentano un **volto allungato, padiglioni auricolari a impianto basso, ampi e anteversti**. Possono essere presenti palato ogivale, mal occlusione dentale, strabismo, macrocefalia, iperlassità articolare, cifoscoliosi, piattismo plantare, prollasso della valvola mitrale. Il primo segno della malattia è il ritardo nello sviluppo psicomotorio, in particolare nell'apprendimento del linguaggio che spesso si associa ad anomalie comportamentali come irrequietezza, instabilità psicomotoria e iperattività con scarsa attenzione. A volte possono manifestarsi anche episodi convulsivi. L'alterazione molecolare responsabile della sindrome è l'espansione di una sequenza ripetuta di tre basi nucleotidiche (**Citosina Guanina Guanina : tripletta CGG**) a livello del gene FMR1. Nella **popolazione generale** essa è ripetuta un numero variabile di volte: da 6 a 55. Quando il numero di triplette CGG supera le 56 ripetizioni, la sequenza di DNA diventa instabile e nel passaggio alle generazioni successive si espande il numero di ripetizioni CGG. In particolare le persone che possiedono un numero di ripetizioni comprese tra 56 e 200 CGG vengono definite **portatori sani** della **premutazione**. In questo intervallo l'espansione CGG consente al gene FMR1 di funzionare ancora e quindi non provoca alcun sintomo clinico della malattia. Nelle **persone affette** il numero di ripetizioni CGG supera le 200 copie. L'espansione della tripletta CGG a cui si associa un'ulteriore modificazione del DNA, detta **metilazione**, provoca il mancato funzionamento del gene FMR1, e viene definita **mutazione completa**. I maschi con la **mutazione completa** presentano ritardo mentale di grado variabile (da lieve a grave) e tratti fisici caratteristici, mentre solo la metà delle femmine con la mutazione completa presenta sintomi più lievi della malattia.

Esistono altre due condizioni cliniche correlate:

- **Sindrome tremore/atassia FXTAS** : Si manifesta generalmente tra i 50 e gli 80 anni. La FXTAS è una condizione progressiva, caratterizzata da tremori intenzionali, atassia, addormentamento delle estremità (neuropatia periferica), cambiamenti d'umore, irritabilità ed altre alterazioni della personalità, perdita della memoria a breve termine e progressivo declino intellettuale. I portatori della premutazione del gene FMR1 oltre i 50 anni di età sono a rischio di FXTAS.
- **Insufficienza ovarica precoce FXPOI**: È una condizione che si manifesta con una ridotta o anomala attività ovarica. Dal punto di vista clinico si osserva infertilità o "subfertilità", cicli mestruali irregolari o assenti, "fallimento" ovarico prematuro (POF) con associata menopausa precoce prima dei 40 anni di età. Studi clinici hanno dimostrato che il 20-25% delle donne con una premutazione del gene FMR1 sviluppa la FXPOI.

MALATTIE DA IMPRINTING

Le malattie da difetti dell'Imprinting genetico sono un gruppo di patologie che influenzano la crescita umana, lo sviluppo neurologico e il metabolismo e sono causate da meccanismi molecolari unici che coinvolgono l'interazione di epigenetica e genetica.



L'imprinting genomico è, infatti, il meccanismo epigenetico mediante il quale il materiale genetico mantiene la memoria o impronta della sua origine gametica e si esprime in modo differenziale a seconda sia ereditato dal padre o dalla madre. L'imprinting genomico è un fenomeno epigenetico: l'allele viene segnato a seconda del genitore di provenienza con una marcatura la cui natura di solito è un particolare pattern di metilazione. La metilazione delle isole CpG al 5' dei geni è caratteristica delle regioni non espresse del DNA. La metilazione di un singolo allele parentale correla con la sua inattivazione trascrizionale. Nelle cellule della linea germinale la marcatura stabilita è trasmessa ad ogni divisione cellulare.

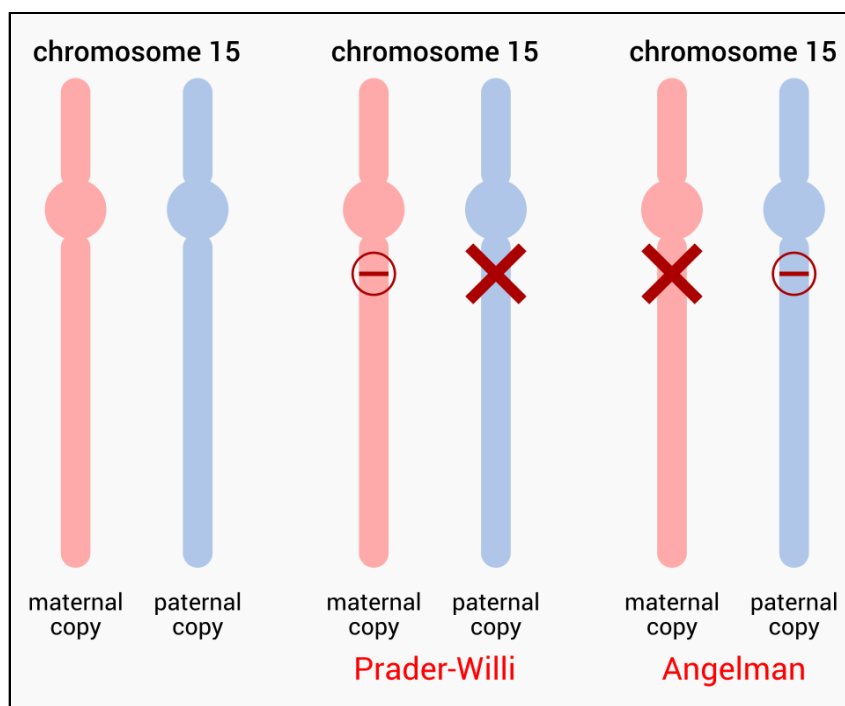
L'esistenza dell'imprinting genomico suggerisce che il genoma materno e quello paterno non sono funzionalmente equivalenti, ma hanno un ruolo complementare e non sostituibile nel determinare un corretto sviluppo embrionale. Non tutti i cromosomi sono soggetti a imprinting. Geni soggetti a imprinting svolgono un ruolo importante nella regolazione della crescita fetale e nello sviluppo dei mammiferi. L'importanza dell'imprinting risulta evidente dall'osservazione di alcune principali sindromi che hanno alla base l'alterazione di questo processo.

Alterazioni dell'imprinting sono alla base di malattie genetiche e ad oggi sono stati identificati 53 geni "imprinted" e sono note 8 patologie legate a difetti di imprinting. Queste sono: Pseudoipoparatiroidismo Ib, Sindrome di Angelman, Sindrome di Prader-Willi, Sindrome di Silver-Russell, Sindrome di Beckwith-Wiedeman, Sindrome di Temple, Sindrome di Wang ed il Diabete mellito neonatale transitorio (TNDM). Esempio classico è il gene SNRPN (small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N), implicato nella sindrome di Prader-Willi (PWS). Tale gene è espresso solamente a partire dall'allele paterno negli embrioni reimpianto e continua a essere espresso in questa maniera per tutta la gestazione e in tutti i tessuti principali fino all'età adulta.

Si indica con **Disomia Uniparentale** o **UPD** la situazione in cui entrambi i membri di una coppia dicromosomi o i segmenti di una coppia di cromosomi sono ereditati solamente da un genitore. Lo studio della UPD può essere rilevante nel corso di analisi del cariotipo costituzionale, in special modo in epoca prenatale. Indicazione allo studio di UPD, a livello di diagnosi prenatale, è rappresentata da:

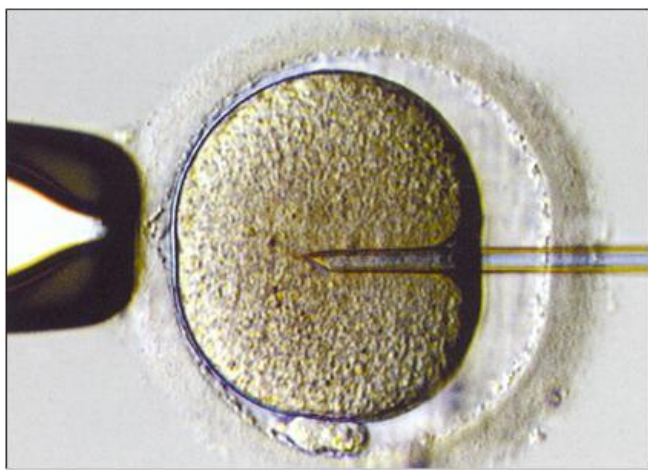
- presenza di trisomia a mosaico (specie se coinvolgente il cromosoma 15)
- presenza di traslocazioni Robertsoniane o reciproche. L'UPD si può verificare per i cromosomi acrocentrici implicati in traslocazioni robertsoniane sia che la traslocazione risulti de novo, sia che risulti ereditata. I portatori di traslocazione Robertsoniana sono considerati ad aumentato rischio di non disgiunzione e perciò va valutata un'eventuale trisomia o, in presenza di cariotipo normale, un'eventuale presenza di UPD per i cromosomi 14 o 15.
- presenza di markers cromosomici soprannumerari specie se si tratta di un marker costituito da inv dup(15). In questo caso il rischio di UPD è rilevante ed è stimato attorno al 3%.

ESAME	INDICAZIONE	IMPEGNATIVA
REGIONE CRITICA S. di PRADER WILLI/S. di ANGELMAN	Solo dopo consulenza genetica per verifica appropriatezza diagnostica Tempo di consegna: 21gg	Impegnativa interna
REGIONE CRITICA S. di BECKWITH-WIEDEMANN / S. SILVER-RUSSELL	Solo dopo consulenza genetica per verifica appropriatezza diagnostica Tempo di consegna: 21gg	Impegnativa interna



STERILITA' DÌ COPPIA

L'infertilità di coppia è diventata una condizione sempre più frequente nella realtà sanitaria nazionale interessando circa il 15% della popolazione generale. I fattori che causano tale condizione sono numerosi ed eterogenei. Fattori ambientali ed abitudini di vita giocano un ruolo sempre più predominante nella salute della coppia e l'innalzamento dell'età media alla quale si cerca la gravidanza è sicuramente uno dei principali motivi dell'aumento dell'incidenza di tale condizione. Le cause di sterilità sono innumerevoli e spesso rimangono sconosciute, solo negli ultimi anni si è portata l'attenzione sulle possibili cause genetiche e sui rischi di trasmissione alla prole di tali condizioni. Diversi studi hanno dimostrato un'aumentata incidenza di anomalie genetiche nelle coppie che vengono inviate a tecniche di procreazione medicalmente assistita, più scarsi sono invece i dati inerenti alla restante popolazione infertile.



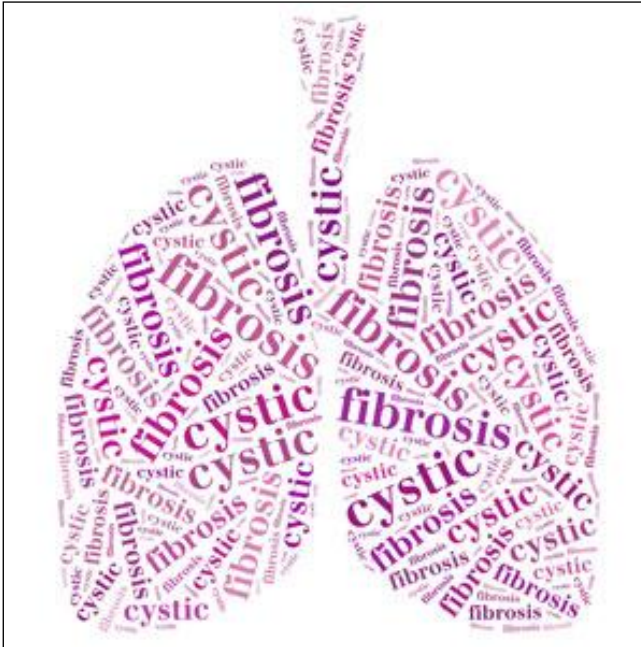
Recentemente è stata posta molta attenzione ai fattori genetici che causano infertilità, questi includono, sia alterazioni cromosomiche, sia difetti di singoli geni e sono presenti in circa il 10% delle donne e in circa il 15% dei maschi. Da tempo sono note sindromi cromosomiche associate ad infertilità diagnosticate tramite l'analisi del cariotipo (vedi di seguito), ma solo da pochi anni sono stati eseguiti studi su specifiche regioni cromosomiche ed identificati singoli geni collegati a problemi d'infertilità, diagnosticati tramite analisi del DNA dedicate. Va inoltre

sottolineato che la maggior frequenza nell'uso della tecnica ICSI (iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi) ha messo in ulteriore evidenza l'uso di una corretta analisi genetica della coppia, visto che tale tecnica elimina il normale processo fisiologico di selezione dei gameti portatori di mutazioni genetiche, cioè di alterazioni nella struttura dei geni. La complessità della materia, le novità delle indagini genetiche ha indotto i professionisti del settore ad individuare un percorso diagnostico comune dove comunque l'indagine genetica è solo una parte del percorso alla quale vanno aggiunti gli esami preliminari e di routine per escludere altre cause d'infertilità acquisita.

Nel 2002, un gruppo di specialisti italiani in medicina della riproduzione hanno pubblicato delle Linee Guida inerenti l'uso appropriato dei tests genetici nella coppia infertile. L'intento delle Linee Guida è quello di dare un supporto a tutti gli specialisti che operano nel settore della sterilità di coppia in modo da valutare in modo appropriato l'utilizzo dei test genetici oggi disponibili nelle diverse situazioni, ma, allo stesso tempo, l'utilizzo di tale strumento non deve prescindere da un'accurata consulenza genetica. Le linee guida non includono tuttavia tutte le possibili cause genetiche d'infertilità, ma segnalano solo quelle clinicamente rilevanti in termini di prevalenza e rischio di trasmissione. Attualmente in Italia, ai sensi delle linee guida della legge 40/2004, è obbligatorio lo screening genetico, inteso come cariotipo, e la ricerca delle microdelezioni del cromosoma Y in caso di grave oligospermia, cioè con un numero di spermatozoi per millilitro inferiore a 5 milioni, e lo screening per le mutazioni del gene della fibrosi cistica in agenesia bilaterale dei dotti deferenti (assenza in entrambi i lati dei suddetti dotti).

FIBROSI CISTICA

La fibrosi cistica è la più comune malattia genetica autosomica recessiva della popolazione caucasica con una incidenza di un soggetto affetto su 2500. Per il suo tipo di trasmissione genetica, entrambi i genitori di un soggetto ammalato risultano essere portatori sani del difetto genetico.



Nella popolazione generale i portatori sani sono molto frequenti, circa 1 su 25 ed il rischio di avere un figlio affetto da due portatori sani è pari a 1 su 4. La malattia, nella sua espressione più grave, coinvolge due importantissimi organi (il polmone ed il pancreas) a causa di secrezioni dense e vischiose. Ne derivano infezioni broncopolmonari ricorrenti ed insufficienza pancreatica grave.

Il gene responsabile (CFTR) codifica infatti per un recettore di membrana coinvolto nel trasporto del cloro nelle cellule epiteliali, la cui assenza o malfunzionamento, comporta un aumento della densità delle secrezioni e della concentrazione di sodio nel sudore (test al sudore). Ad oggi, sono state identificate più di

1300 mutazioni sul gene ed il loro effetto clinico può essere più o meno grave a seconda se l'effetto finale è l'assenza della proteina funzionale o la sua ridotta efficienza.

Esistono, inoltre, dei soggetti maschi, che non presentano i segni clinici principali della fibrosi cistica, ma che sono affetti da sola azoospermia, di tipo ostruttivo, per agenesia mono (CUAVD) o bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD). Essi costituiscono circa il 2% dei casi di infertilità maschile ed il 6-10% di tutti i casi di azoospermia di tipo ostruttivo. In questi soggetti è stata osservata una maggiore frequenza, rispetto alla popolazione generale, di mutazioni del gene CFTR, il particolare la variante polimorfica: allele 5T. In considerazione dell'alta frequenza dei portatori sani nella popolazione generale è ormai di routine nei protocolli di indagine genetica che precedono una procreazione assistita, eseguire il test per la fibrosi cistica, comprensivo del polimorfismo poliT, in entrambi i componenti della coppia.

È da tenere presente, che a causa dell'elevato numero delle mutazioni identificate sul gene CFTR e per la sua notevole lunghezza (27 esoni), i test molecolari, oggi utilizzati, per la identificazione dei portatori sani non sono capaci di identificare il 100% dei portatori. Infatti, soltanto le mutazioni più frequenti, a seconda della provenienza geografica ed etnica, sono normalmente analizzate ed un test negativo non esclude la possibilità che il soggetto possa essere portatore di una variante rara. In genere, il rischio residuo di essere portatore di una tale variante, dopo il test molecolare negativo, è pari a 1 su 100 (era di 1/25 prima della esecuzione del test).

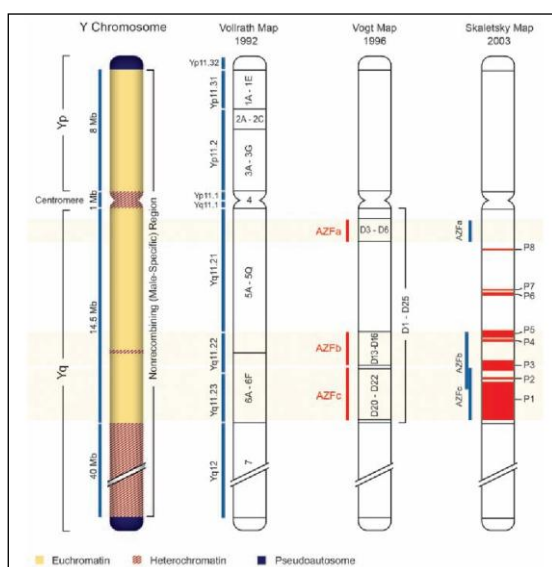
Presso questa U.O l'analisi molecolare per Fibrosi Cistica viene eseguita di routine in **“reverse dot blot”** per l'identificazione delle 80 mutazioni più frequenti nella popolazione europea.

E' anche possibile il **sequenziamento completo** del gene CFTR e l'analisi dei riarrangiamenti genomici in **MLPA** nei casi in cui la metodica di routine abbia evidenziato nessuna o una sola mutazione in soggetti con quadro clinico fortemente suggestivo di malattia.

Esame	Esecuzione	Impegnative
GENE CFTR	Dopo consulenza genetica il lunedì mattina Tempo di consegna : 21gg	Impegnativa interna

MICRODELEZIONE Y

L'indagine molecolare per la diagnosi di microdelezioni del cromosoma Y ha lo scopo di **identificare la perdita di piccole porzioni di DNA** a carico del braccio lungo del cromosoma Y che regolano la spermatogenesi. Le microdelezioni Y sono una importante causa di sterilità maschile.



Esse sono presenti con una frequenza compresa tra l'1-10%. Le frequenze più basse sono osservate in soggetti infertili non selezionati, quelle più alte sono invece presenti nei soggetti affetti da azoospermia (assenza completa di spermatozoi nel liquido seminale) di tipo non ostruttivo o da grave oligospermia (spermatozoi inferiori a $5 \times 10^6/\text{ml}$) ed in quelli che presentano all'esame istologico della biopsia testicolare una assenza completa delle cellule germinali (SCO). Le microdelezioni del cromosoma Y rappresentano **una delle cause più frequenti di infertilità maschile** e i geni interessati in questo meccanismo si trovano in una regione chiamata AZF (*azoospermia factor*) suddivisa in tre subregioni AZFa, AZFb, e AZFc.

- **Le delezioni di AZFa** danno invariabilmente **azoospermia**. La diagnosi di una delezione completa di questa regione implica l'impossibilità di recuperare spermatozoi dal tessuto testicolare.
- **Delezioni della regione AZFb e AZFb+c** sono associate a blocco della spermatogenesi con conseguente azoospermia. Come le delezioni complete della regione AZFa non sono riportati casi in cui sia stato possibile recuperare spermatozoi dal tessuto testicolare.
- **Le delezioni della regione AZFc** sono invece compatibili con una spermatogenesi residua e possono perciò essere ritrovate in uomini azoospermici od oligospermici. Negli uomini azoospermici con delezioni della regione AZFc vi sono buone probabilità di ritrovare spermatozoi nel tessuto testicolare

Esame	Esecuzione	Impegnative
MICRODELEZIONE Y REGIONI AZFa, AZFb, AZFc	Dopo consulenza genetica il lunedì mattina Tempo di consegna : 21gg	Impegnativa interna

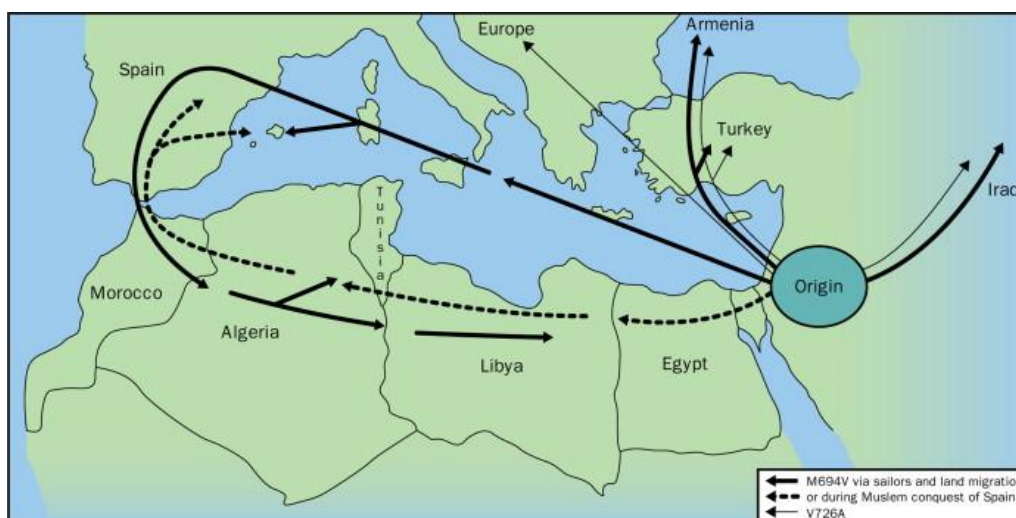
MALATTIE AUTOINFIAMMATORIE

Le **malattie autoinfiammatorie sistemiche** sono un gruppo di malattie di recente inquadramento caratterizzate da episodi di infiammazione recidivanti che insorgono senza alcuna causa apparente. Per questo vengono definite “auto-infiammatorie”. Il termine “sistemiche” fa riferimento alla circostanza che alcune volte questi episodi possono manifestarsi con febbre (ma non obbligatoriamente) o coinvolgere vari organi ed apparati (cuore, polmoni, intestino, occhi, ecc), in particolare cute ed articolazioni. Esse sono caratterizzate dalla presenza di infiammazione cronica o ricorrente secondaria ad una abnorme attivazione delle cellule dell’immunità innata (neutrofili, monociti/macrofagi). Al contrario delle più comuni malattie autoimmuni queste condizioni riconoscono un ruolo secondario dell’immunità adattativa (linfociti T e B). La maggior parte di queste patologie insorgono nell’infanzia e le manifestazioni più frequenti sono febbre solitamente molto elevata e ad andamento ricorrente, dolore addominale, artrite ed eruzioni cutanee..

PRINCIPALI FEBBRI PERIODICHE GENETICHE			
malattia	gene	comosoma	proteina
FMF	MEFV	16p 13	pirina
IPER IGD (HIDS)	MVK	12q 24	Mevalonato chinasi
TRAPS	TNFRSF 1A	12p 13	Recettore 1 del TNF
FCU/FCAS	CIAS1/NALP3/PYPAF1	1q 44	Criopirina
MWS	CIAS1/NALP3/PYPAF1	1q 44	Criopirina
CINCA/NOMID	CIAS1/NALP3/PYPAF1	1q 44	Criopirina

Attualmente le malattie autoinfiammatorie sistemiche si suddividono in due grandi categorie: monogeniche (dovute ad un singolo gene) e poligeniche (dovute a più geni, ma anche a fattori di altro tipo, soprattutto ambientali). L’esempio più eclatante è quello della Febbre Mediterranea Familiare (FMF), malattia non infrequente in Italia (si riscontra soprattutto al sud, in Calabria e Sicilia orientale), ma più frequente nelle etnie turca, armena, araba e negli israeliti. In chi ne soffre, la febbre si presenta per un massimo di tre giorni consecutivi e si ripete ogni uno-tre mesi.

La **Febbre mediterranea familiare (FMF)** è una malattia molto antica di origine genetica. Interessava le popolazioni delle regioni del bacino del Mediterraneo, fenicie, etrusche, greche, turche, arabe ed armene dalle quali si è poi trasmessa agli spagnoli, ai francesi ed agli italiani. La FMF è una malattia a trasmissione autosomica recessiva (genitori portatori sani). La manifestazione della malattia presenta una grande variabilità anche tra soggetti affetti appartenenti alla stessa famiglia. Si manifesta in età pediatrica con frequenti attacchi di febbre con temperature fino a 40 gradi, dura dai due a i tre giorni, è accompagnata da sintomi comuni ad altre malattie (lesioni della pelle, dolori addominali, dolori toracici) ed è caratterizzata da remissione spontanea. Probabilmente è collegata, come le altre malattie autoinfiammatorie da stati di stress. Gli attacchi dolorosi sono causati dalla infiammazione delle membrane di rivestimento degli organi interni con peritonite, sinovite, pleurite e più raramente pericardite e meningite. Una complicanza grave della malattia, ma per fortuna non sempre presente, è lo sviluppo nel tempo di un danno renale secondario ad accumulo (amiloidosi).



Il gene responsabile (MEFV) e' stato identificato sul braccio corto del cromosoma 16. La proteina codificata ha preso il nome di pirina o marenostina ed e' espressa esclusivamente nei granulociti. La mutazione M694V si associa ad una maggiore gravità della malattia mentre la E148Q si associa ad una forma meno grave. Il test genetico eseguito di routine, esamina le mutazioni più frequenti (12 mutazioni) con una capacità identificativa compresa tra 80-95% a seconda della popolazione di appartenenza. In casi particolari è possibile l'approfondimento con il sequenziamento degli esoni 2,3,5,10 più frequentemente coinvolti da mutazioni. La colchicina previene sia gli attacchi infiammatori che l'accumulo di amiloide a livello renale.

La febbre periodica o ricorrente è una delle tipiche modalità di presentazione delle malattie auto infiammatorie. Le malattie autoinfiammatorie che si manifestano con questo quadro clinico sono la Febbre Mediterranea Familiare (FMF), la sindrome **TRAPS** (Tumor necro-sis factor receptor associated periodic syndrome) e la sindrome da **Iper-IgD** (HIDS, o deficit parziale di mevalonato chinasi). Accanto a queste forme genetiche che si configurano senz'altro nel novero delle malattie rare, esiste una quarta condizione multifattoriale, sicuramente più frequente, nota come sindrome PFAPA(Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis).

Esame	Esecuzione	Impegnative
GENE MEFV (12 MUTAZIONI)	Dopo consulenza genetica Tempo di consegna : 21gg	Impegnativa interna
Pannello in NGS per Malattie autoinfiammatorie	Dopo consulenza genetica Tempo di consegna : 90gg	Impegnativa interna
Pannello in NGS per febbri periodiche	Dopo consulenza genetica Tempo di consegna : 90gg	Impegnativa interna

TROMBOFILIA GENETICA

La **Trombofilia genetica** è una malattia multifattoriale essendo il risultato di una **interazione geni-ambiente**. I geni, oggi noti, di suscettibilità alla trombosi sono delle **varianti geniche** (mutazioni puntiformi ad un singolo nucleotide o SNP) che presentano una frequenza nella popolazione superiore all'1%. La variante **FV Leiden** conferisce un rischio trombotico 4-7 volte aumentato nei soggetti portatori in eterozigosi e fino ad 80 volte superiore nei soggetti omozigoti, rispetto alla popolazione generale. La variante **Protrombina G20210A** si associa ad un rischio pari a 2-4 volte nel portatore in eterozigosi ed ad uno sicuramente maggiore per quello in omozigosi. La variante **MTHFR C677T**, si associa alla iperomocisteinemia che è oggi considerato un fattore di rischio indipendente cardiovascolare. La variante **PAI-1**, allele 4G, si associa ad alti livelli sierici di PAI-1 che comportano una riduzione delle fibrinolisi fisiologica. La variante **HPA-1**, allele b, si associa, invece, ad aumentata aggregabilità piastrinica. Queste varianti sono ereditarie, e possono essere trasmesse **dai genitori ai figli**. Il loro effetto risulta essere maggiore in caso di **omozigosi** (entrambe le due copie geniche, ciascuna derivata da un genitore, presentano la variante) e minore in **eterozigosi** (solo una copia genica presenta la variante). Il loro effetto risulta essere amplificato quando più varianti predisponenti coesistono nello stesso soggetto. La identificazione di una o più di queste varianti non significa che il soggetto portatore debba **necessariamente manifestare**, nel corso della sua vita, un evento trombotico, ma indica soltanto che è presente un **aumentato rischio** di sviluppare la malattia, rispetto alla popolazione generale, specie quando esposto a specifici fattori ambientali scatenanti. Lo studio delle varianti geniche di questi tre geni è indicata in:

Soggetti asintomatici:

- Soggetti con storia familiare positiva per eventi tromboembolici ricorrenti
- Donne che intendono assumere contraccettivi orali o terapia ormonale sostitutiva e con storia familiare di trombosi
- Donne in trattamento con tamoxifene o raloxifene
- Familiari di I grado di soggetti portatori di trombofilia genetica

Soggetti con precedente episodio trombotico:

- Evento trombotico in età giovanile (< 50 aa)
- Trombosi venosa in siti inusuali (cerebrale, portale, mesenterica)
- Tromboembolismo "sine causa" o per cause minime
- Trombosi venose idiopatiche ricorrenti
- Donne con precedenti episodi di trombosi in gravidanza o nel post-partum
- Donne con poliabortività
- Gestanti con IUGR
- Soggetti diabetici

Esame	Esecuzione	Impegnative
Trombofilia genetica FV, FII , MTHFR, HPA PAI-1	Dopo consulenza genetica Tempo di consegna : 21gg	<i>Estrazione del DNA 91.36.5 + n° 3 analisi di mutazione del DNA 91.29.4 per Trombofilia genetica</i>

HLA MALATTIE

Negli ultimi anni sono state individuate numerose associazioni fra antigeni HLA e malattie soprattutto a patogenesi immunitaria. Queste scoperte hanno contribuito a delucidare i meccanismi patogenetici di alcune patologie e a valutare l'utilità clinica della tipizzazione HLA. In particolare sono state fornite indicazioni chiare su quali loci e a quale risoluzione è corretto tipizzare tali malattie, in modo da favorire l'uso delle risorse dei laboratori nel modo più razionale possibile. Queste indagini non possono essere considerati né test di routine o di screening, ma possono solo fornire un supporto diagnostico al clinico. Il test di genotipizzazione Hla-malattie, presso questa U.O.S.D. , è eseguito in collaborazione con la U.O.S.D. Tipizzazione tissutale secondo i criteri di appropriatezza riportati nei nuovi LEA.

DECRETO 9 dicembre 2015.

Condizioni di erogabilità e indicazioni di appropriatezza prescrittiva delle prestazioni di assistenza ambulatoriale erogabili nell'ambito del Servizio sanitario nazionale.

20-1-2016

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

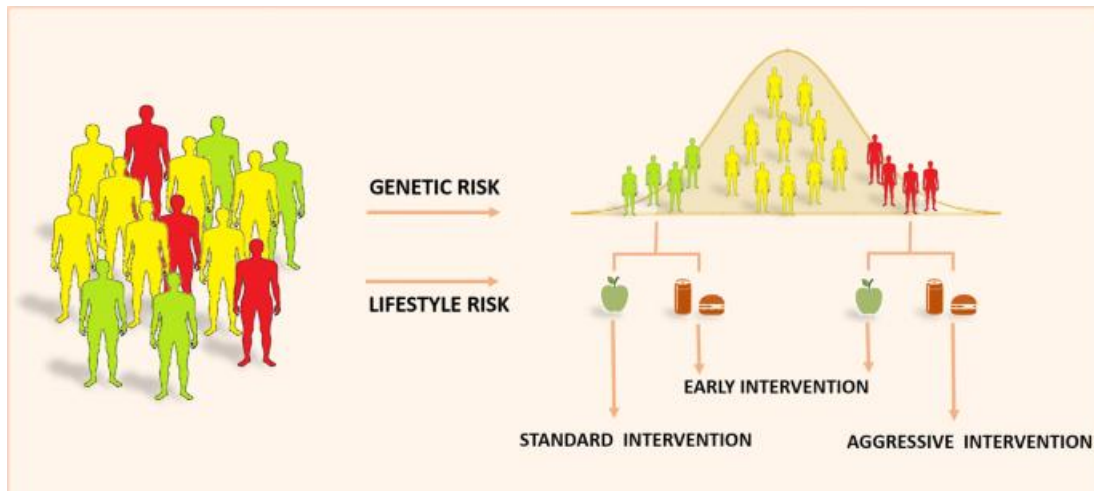
Serie generale - n. 15

ALLEGATO 2 - GENETICA COLONNA "D": IMMUNOGENETICA			
Patologie e condizioni per le quali è appropriata l'esecuzione di prestazioni di Immunogenetica, a seguito di indagini (biochimiche, ematologiche, morfologiche) e valutazioni specialistiche, su prescrizione specialistica			
CODICE	PATOLOGIA/CONDIZIONE	GENE DI RIFERIMENTO DA INDAGARE	CONDIZIONI DI EROGABILITA'
F001	Artrite Giovanile	B27	
F002	Artrite in corso di malattie croniche intestinali	B27	
F003	Artrite psoriasica	B27	
F004	Artrite reattiva	B27	
F005	Artrite Reumatoide	HLA-DRB1	Per l'accertamento della natura genetica della patologia nel soggetto affetto; eseguibile anche nei familiari di I grado
F006	Bechet, Malattia di	HLA-B51 e HLA-B27	
F007	Corioretinopatia tipo Birdshot	HLA-A29	
F008	Diabete Mellito Tipo 1	HLA-DRB1 e HLA-DQA1 e HLA-DQB1	Per l'accertamento della natura genetica della patologia nel soggetto affetto; eseguibile anche nei familiari di I grado
F009	Malattia Celiachia	HLA-DQA1 e HLA-DQB1	Previo visita specialistica in caso di elevato sospetto clinico con indagini sierologiche di I livello non dirimenti; eseguibile anche nei familiari di I grado di affetto
F010	Narcolessia	HLA-DQB1*06.02	
F011	Reiter, Sindrome di	B27	
F012	Sacroileite	B27	
F013	Sclerosi multipla	HLA-DRB1	Per l'accertamento della natura genetica della patologia nel soggetto affetto; eseguibile anche nei familiari di I grado
F014	Spondilite Anchilosante	HLA-B27	
F015	Uveite	B27	

Esame	Esecuzione	Impegnative
Consulenza genetica	Dal lunedì al venerdì, con prenotazione CUP	n° 1 Consulenza genetica (89.7) per soggetti <16aa n° 1 Consulenza genetica (89.01) per soggetti >16 aa

Rischio poligenico multifattoriale cardiovascolare (PRS27)

Le patologie cardiovascolari (CVD) comprendono un gruppo eterogeneo di condizioni cliniche, come le coronaropatie (*Coronary Artery Disease* o CAD), le cardiomiopatie, l'ictus.

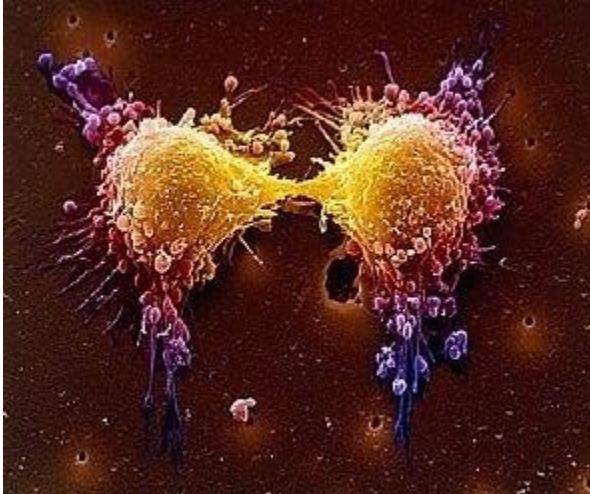


Negli anni, si è assistito allo sviluppo di strumenti pratici per la stima del rischio cardiovascolare, sotto forma di manuali, di carte del rischio e di software dedicati interattivi. L'identificazione degli individui ad elevato rischio cardiovascolare è considerato uno degli obiettivi principali della prevenzione primaria a livello individuale, con lo scopo di attivare una serie di azioni per ridurre i fattori di rischio modificabili, che vanno dallo stile di vita all'intervento farmacologico quando indicato. Per orientare queste azioni fin dai primi anni '90 sono divenute disponibili carte del rischio e punteggi individuali costruiti attraverso funzioni per la valutazione del rischio globale assoluto (le più utilizzate Framingham, SCORE, PROCAM, CUORE).

In ogni popolazione, l'insieme delle varianti genetiche associate alla malattia possono essere utilizzate per calcolare i PRS. Gli score poligenici sono basati sul contributo di centinaia di migliaia o addirittura milioni di variazioni genetiche comuni, ognuna con un piccolo effetto nell'aumento del rischio, ma che quando sono considerate nella loro totalità, riescono ad identificare persone con rischio superiore rispetto al resto della popolazione. Le variazioni genetiche presenti negli score vengono identificate grazie all'uso di sofisticati algoritmi di machine learning e l'analisi di studi caso-controllo chiamati genome-wide association study (GWAS). Negli ultimi anni la ricerca nel campo della genetica dell'infarto miocardico ha fatto dei progressi importantissimi, riuscendo a raggiungere valore clinico nell'identificare persone sane a rischio. Il valore è dato dalla possibilità di identificare persone con rischio equivalente ai portatori di ipercolesterolemia familiare, ma che, a differenza di questi, non hanno livelli di colesterolo LDL elevati o altri fattori di rischio, risultando quindi invisibili ai modelli di rischio tradizionale. È importante notare che i PRS spesso catturano un rischio che è sostanzialmente indipendente e quindi complementare ai tradizionali fattori di rischio o ai punteggi di rischio clinico.

Presso questa UOSD è possibile eseguire il test per il calcolo del PRS cardiovascolare basato sulla determinazione di 27 polimorfismi genetici (SNPs) detto GRS27

TUMORI EREDO-FAMILIARI



I **tumori eredo-familiari** sono tumori che in una piccola percentuale di casi (5-10%) si manifestano in alcune famiglie come effetto di una predisposizione genetica. Perché si sviluppi un tumore maligno è necessario che entrambe le copie di un gene abbiano subito una mutazione. Nei tumori ereditari, la mutazione che è presente nel genoma di un genitore viene trasmessa alla prole. Il soggetto che ha ereditato da uno dei genitori il gene alterato, acquisisce in tal modo la **predisposizione** a sviluppare alcune forme tumorali. E' necessario, però, che il soggetto acquisisca, nel corso della vita, un'altra mutazione nella seconda copia dello stesso gene, perché si verifichi lo sviluppo del tumore. Ne

deriva che il rischio di sviluppare il tumore dipende sia dal patrimonio genetico ereditato dal soggetto, ma anche dai fattori ambientali e comportamentali che influenzano la probabilità di acquisizione della seconda mutazione. La diagnosi precoce e la prevenzione del tumore maligno sono possibili grazie a programmi di screening sulla popolazione e alla sorveglianza di categorie ad alto rischio. La diagnosi di neoplasia ereditaria è importante non solo per la sorveglianza dei familiari dal punto di vista clinico e genetico, ma anche per l'approccio terapeutico nel soggetto clinicamente affetto che può essere modificato. Le sindromi neoplastiche ereditarie finora note, predispongono allo sviluppo di più neoplasie e/o associazione di diverse neoplasie nello stesso soggetto o nella stessa famiglia.

Generalmente è plausibile sospettare la presenza di un tumore a base ereditaria quando si osservano le seguenti caratteristiche:

- Età di insorgenza più precoce rispetto ai tumori della popolazione generale (ad esempio tumore della mammella diagnosticato prima dei 40-45 anni)
- Bilateralità per organi pari (mammella, ovaio)
- Sviluppo di tumori multipli nella stessa persona.

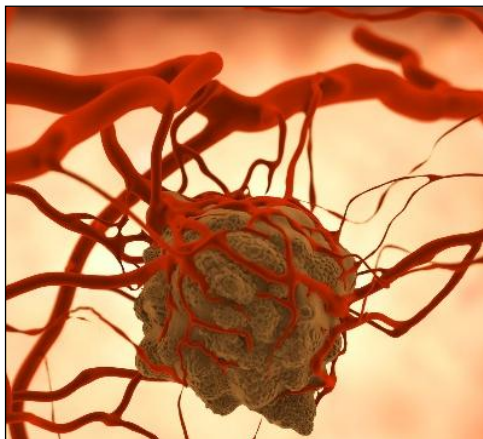
La comunicazione del rischio

Una comunicazione adeguata del rischio di sviluppare una patologia tumorale è uno degli obiettivi primari della nostra U.O. Qualora venga riconosciuta la presenza di una predisposizione ereditaria al cancro, la consulenza genetica post test deve aiutare il paziente a comprendere l'informazione relativa al rischio genetico per sé e i familiari e ad adottare la strategia di prevenzione che più riterrà adeguata.

La presenza dello psicologo all'interno dell'équipe multidisciplinare che prenderà in carico il paziente e la sua famiglia è utile non solo per gli stessi, ma anche per la supervisione interna ai membri dell'équipe e per la gestione degli aspetti psicosociali del "rischio genetico" da parte delle figure professionali che prendono in carico la famiglia sul territorio.

NEUROFIBROMATOSI TIPO 1

La neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) o malattia di von Recklinghausen è una delle più comuni patologie genetiche, con un'incidenza di un caso su 2500-3000 soggetti indipendentemente dalla etnia e dal sesso. Si trasmette in modo autosomico dominante e la sua penetranza è quasi



completa all'età di 5 anni. Il gene NF1, responsabile della malattia, è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17, in 17q11.2. E' un grande gene onco-soppressore (350 kb, 60 esoni), che codifica per una proteina citoplasmatica, la **neurofibromina**. La frequenza delle nuove mutazioni è particolarmente alta e circa la metà dei casi è sporadica. La NF1 è caratterizzata da una grande variabilità clinica, anche nell'ambito della stessa famiglia. nella maggioranza dei casi tutto si limita alle macchie caffè e latte (75% dei casi), ma nel 25% dei pazienti si sviluppano tumori che vanno dai neurofibromi cutanei ai tumori del sistema nervoso, ai feocromocitomi fino ai fibrosarcomi. L'ampia varietà

dell'espressione clinica, il rischio di tumori e la totale imprevedibilità dell'evoluzione della malattia impone un monitoraggio regolare dei pazienti con NF1. Presso questa UOSD è possibile eseguire l'analisi molecolare per la ricerca in NGS di mutazioni causative di malattia e ricerca di microdelezioni del gene NF1 (17q11.2) con metodica MLPA.

NEUROFIBROMATOSI TIPO 2

La neurofibromatosi 2 è una malattia genetica che appartiene al gruppo delle **sindromi tumorali ereditarie**, caratterizzate da una predisposizione ereditaria allo sviluppo di neoplasie. Essa è caratterizzata dalla predisposizione allo sviluppo di neoplasie multiple, prevalentemente a livello del sistema nervoso centrale (schwannomi, meningiomi, astrocitomi, ependimomi). La malattia ha una incidenza stimata a circa 1/25.000 nati vivi. La neurofibromatosi 2 è causata da mutazioni di nel gene *NF2* che è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 22 e codifica una proteina conosciuta con due diversi nomi: **merlina o schwannomina**. La malattia si trasmette in modo autosomico dominante e la sua penetranza è variabile, potendosi presentare con quadri differenti di gravità negli affetti anche all'interno della stessa famiglia. Presso questa UOSD è possibile eseguire l'analisi molecolare per ricerca di mutazioni causative di malattia in NGS e ricerca di microdelezioni del gene *NF2* con metodica MLPA.

Esame	Esecuzione	Impegnative
GENE NF1	Solo dopo consulenza genetica per verifica appropriatezza diagnostica Tempo di consegna : 90gg	Impegnativa interna
GENE NF2	Solo dopo consulenza genetica per verifica appropriatezza diagnostica Tempo di consegna : 90gg	Impegnativa interna

TUMORI EREDITARI E FAMILIARI DELLA MAMMELLA E DELL'OVAIO



In Italia, si registrano ogni anno circa 37000 nuovi casi di tumore della mammella nelle donne. Complessivamente, circa una donna su 14 si ammala di cancro al seno nel corso della propria vita. Tale tumore colpisce prevalentemente le donne tra i 50 ed i 70 anni. Il tumore dell'ovaio è invece una neoplasia meno frequente, che colpisce circa 5000 donne ogni anno; in molti casi si arriva alla diagnosi tardivamente e quindi con una minore possibilità di cura. Una percentuale variabile dal

5% al 30% dei tumori della mammella e dell'ovaio è a carattere eredo-familiare, mentre la maggior parte di questi tumori sono sporadici, ossia riconducibili a fattori di rischio personali ed ambientali.

Per il tumore della mammella e dell'ovaio ereditari, i geni che più spesso risultano alterati sono BRCA1 e BRCA2. In condizioni normali, questi geni svolgono un ruolo "protettivo" per l'organismo, in quanto sono implicati nel riparo dei danni a carico del DNA. Quando, invece, BRCA1 o BRCA2 vengono ereditati in forma alterata, l'individuo portatore della mutazione ha un **rischio aumentato** di sviluppare un tumore della mammella e/o dell'ovaio. Oltre a questi due geni, ne esistono altri che predispongono allo sviluppo del tumore della mammella se alterati.

Se una persona ha ereditato un gene BRCA1 o BRCA2 mutato **non necessariamente svilupperà il tumore** nell'arco della propria vita. Quindi, non si eredita mai il tumore ma una maggiore probabilità di sviluppare una malattia tumorale rispetto alla popolazione generale, perché i geni non sono gli unici fattori che possono aumentare il rischio di sviluppare il cancro. Altri fattori quali lo stile di vita (ad esempio obesità, attività fisica), fattori legati alla riproduzione (ormoni, contraccettivi orali), e l'ambiente possono influenzare il rischio di sviluppare un tumore. Oltre al rischio di tumore della mammella e dell'ovaio, una persona con un gene BRCA1/2 alterato ha un rischio aumentato di sviluppare tumori in altri organi.

Il tumore della mammella nel maschio è molto raro per il ridotto sviluppo della ghiandola mammaria e per la minore proliferazione delle cellule dovuta alla minima esposizione agli estrogeni. Tuttavia, un uomo con un gene BRCA1/2 alterato ha un più alto rischio di sviluppare il tumore della mammella rispetto ad un maschio che non ha un'alterazione in uno di questi geni. I soggetti maschi con una mutazione dei geni BRCA1/2 possono avere un rischio lievemente aumentato di sviluppare un tumore in altri organi (ad esempio prostata). Un uomo che ha un gene BRCA1 o BRCA2 alterato può trasmettere ai propri figli la mutazione genetica anche nel caso in cui egli non sviluppi un tumore nel corso della sua vita.

In presenza di un rischio di tumore ereditario della mammella e/o dell'ovaio, è possibile effettuare presso la nostra Unità Operativa l'analisi mutazionale a carico dei geni BRCA1 e BRCA2, che risultano essere i geni più frequentemente coinvolti nella sindrome ereditaria del carcinoma della mammella e/o dell'ovaio (HBOC). Il test genetico si effettua prelevando un campione di sangue e valutando la presenza di una mutazione a carico di uno dei due geni.

Il test viene proposto ad una persona che ha avuto un tumore mammario e/o ovarico e che appartenga ad una famiglia a rischio elevato, nella quale siano presenti:

- casi multipli di carcinoma mammario (≥ 3);
- casi di carcinomi mammari e di carcinomi dell'ovaio;
- tumori bilaterali (entrambe le mammelle o le ovaie) in uno o più membri della famiglia;
- insorgenza di tumore della mammella in età giovanile (<35 anni) a prescindere dalla familiarità;
- tumori multipli nello stesso soggetto a prescindere dalla familiarità;
- tumore della mammella maschile a prescindere dalla familiarità.

Se il test genetico evidenzia mutazioni nei geni indagati (test positivo), il soggetto può consapevolmente decidere di adottare stili di vita per ridurre il rischio di tumore, sottoporsi a controlli ed esami più frequenti per una diagnosi precoce dei tumori, prendere decisioni preventivo-terapeutiche per ridurre la probabilità di sviluppare il tumore negli organi a maggiore rischio.

Nelle persone portatrici di mutazioni di BRCA1 e 2, è possibile prendere in considerazione la chirurgia profilattica, L'asportazione chirurgica delle mammelle (mastectomia profilattica) riduce il rischio di tumore mammario del 90% circa. L'asportazione delle ovaie (ovariectomia profilattica) nelle donne portatrici di mutazione abbassa dell'80% circa il rischio di tumore ovarico. L'ovariectomia profilattica ha altresì dimostrato di ridurre il rischio di tumore mammario perché riduce drasticamente l'esposizione delle mammelle agli estrogeni.

In caso di test positivo, l'indagine può essere estesa ad altri membri della famiglia, per individuare i soggetti portatori della stessa mutazione e quelli negativi al test.

Se il test genetico non evidenzia mutazioni (test negativo), il soggetto può godere di un maggior senso di tranquillità per sé e per la propria famiglia.

Esame	Esecuzione	Impegnative
GENE BRCA1 – BRCA2	Solo dopo consulenza genetica per verifica appropriatezza diagnostica Tempo di consegna : 90gg	Impegnativa interna

TUMORI EREDITARI E FAMILIARI DEL COLON-RETTO

L'incidenza del cancro coloretale è in aumento, come conseguenza dell'invecchiamento della popolazione; altri fattori di rischio sono le diete "occidentalizzate", l'inattività fisica e il fumo. I fattori di rischio del cancro del colon retto sono da differenziare a seconda che si tratti della forma ereditaria (5 – 10 %) o della forma sporadica (88 – 94 %). Nella forma genetica l'alto rischio di sviluppare il cancro del colon retto è legato ad alcune mutazioni che si trasmettono con carattere ereditario. Nella forma sporadica, le mutazioni che conducono alla patologia sono favorite da una serie di fattori di rischio. La cancerogenesi è provocata da una serie di eventi molecolari per l'accumulo di alterazioni genetiche che interessano diverse funzioni cellulari essenziali.



Le neoplasie ereditarie coloretali si distinguono in due gruppi: sindromi poliposiche e sindromi non poliposiche. La **poliposi familiare del colon (F.A.P.)**, è una malattia a trasmissione autosomica dominante che determina la formazione di migliaia di polipi adenomatosi in tutto l'intestino crasso con una frequenza di progressione verso il carcinoma del 100%. È causa solo dell'1% dei carcinomi coloretali. È associata alla delezione sul cromosoma 5 della regione 5q21, dove è localizzato il gene APC.

La **Sindrome di Lynch** rientra invece nell'ambito delle forme da predisposizione genetica a cancro del colon di tipo non poliposico. Essa viene trasmessa con un'ereditarietà autosomica dominante e una penetranza del 80-90%. È caratterizzata da un elevato rischio (fino all'85%) di sviluppare tumori del colon-retto, nonché tumori in sedi extra-coliche, quali il cancro dell'endometrio (rischio fino al 60%), ovaio e stomaco (rischio fino al 12%), tumori cerebrali, sebacei, renali, uretere, vie biliari e piccolo intestino con un rischio complessivo di ~15%. Di solito i tumori del colon-retto tipici della sindrome di Lynch mostrano un esordio precoce (~42 anni) rispetto ai tumori coloretali sporadici (~69 anni). Per una corretta diagnosi vengono applicati i criteri di Amsterdam:

- Tre o più parenti con carcinoma coloretale o un carcinoma associato alla sindrome di Lynch;
- Carcinomi coloretali che coinvolgano almeno due generazioni;
- Almeno un caso di carcinoma coloretale prima dei 50 anni.

I trattamenti non differiscono solitamente da quelli standard per il cancro del colon retto sporadico nella popolazione generale. Una gestione clinica più efficace dei pazienti e dei familiari sani portatori della mutazione mira principalmente alla prevenzione. La sintomatologia è per la maggior parte silente fino alla comparsa del tumore maligno. Nella maggior parte dei casi si segnala: cambiamento delle abitudini intestinali, sanguinamento rettale, sangue nelle feci, dolori addominali, perdita di peso senza apparente motivo. La conferma diagnostica si basa sul test genetico per la ricerca di mutazione di uno tra i geni umani conosciuti con le sigle **MLH1**, **MSH2**, **MSH6**, **PMS2** e **EPCAM** che codificano per le proteine del complesso del **MisMatch Repair (MMR)** e l'anamnesi familiare. La presenza di una mutazione patogenetica in uno di questi geni MMR

determina il malfunzionamento del sistema di riparazione MMR del DNA. I microsatelliti, proprio per la loro natura ripetitiva, possono essere considerati un bersaglio di un sistema MMR deficiente. Infatti, **l'instabilità dei microsatelliti (MicroSatellite instability, MSI)** è riscontrata in ~90-95% dei tumori correlati alla sindrome di Lynch e può, quindi, essere considerata come un marcatore del mancato funzionamento del sistema di riparazione MMR.

Presso questa UOSD è possibile effettuare la **consulenza oncogenetica “pre e post-” test** dei tumori ereditari coloretali, associata alla possibilità di accesso al laboratorio di diagnostica molecolare della nostra stessa UOSD previa valutazione di appropriatezza all'esame. La diagnosi molecolare di Sindrome di Lynch e Sindrome di Lynch-Like può essere utilizzata per confermare un sospetto diagnostico e per effettuare la diagnosi presintomatica negli individui a rischio, che dovranno, essere sottoposti allo specifico programma di sorveglianza endoscopica previsto per i soggetti portatori di una mutazione patogenetica. Tale diagnosi viene eseguita mediante lo screening di 25 geni analizzati in Next generation sequencing (NGS) per la caratterizzazione di mutazioni puntiformi e mediante Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) dei geni MMR, per identificare ampi riarrangiamenti genici.

ANALISI SOMATICA MSI TUMORI COLON/OVAIO/UTERO

La “MSI” è presente anche nel 15% dei tumori colon-rettali sporadici (ed in minor misura anche in altri tumori come il carcinoma ovarico e uterino) e in questi casi non è dovuta a mutazioni germinali nei geni MMR ma alla perdita di funzione del gene MLH1 dovuta all'ipermetilazione del suo promotore; questa condizione è associata alla mutazione V600E del gene BRAF. Il test MSI e l'analisi della mutazione V600E del gene BRAF eseguito sul DNA estratto da tessuto tumorale, oltre al ruolo chiave che riveste nel porre il sospetto di sindrome di Lynch, ha anche una funzione molto importante nel suggerire l'eventuale approccio terapeutico a cui dovranno essere sottoposti i soggetti che presentano un tumore colon-rettale, ovarico o uterino (ereditario e/o sporadico) con alta Instabilità dei Microsatelliti.

Esame	Esecuzione	Impegnative
Sindrome di Lynch	Solo dopo consulenza genetica per verifica appropriatezza diagnostica Tempo di consegna : 90gg	Impegnativa interna
Analisi somatica Instabilità Microsatelliti	Solo dopo consulenza genetica per verifica appropriatezza diagnostica Tempo di consegna : 7-10 gg	Impegnativa interna

CITOGENETICA ONCO-EMATOLOGICA



L'indagine citogenetica onco-ematologica, ha lo scopo di individuare la presenza di anomalie cromosomiche numeriche e/o strutturali nelle cellule ematiche del sangue venoso periferico e/o nel sangue midollare.

Tale diagnostica è di grande ausilio per la formulazione di una diagnosi e/o prognosi più precisa e per indicare specifici provvedimenti di gestione clinica del paziente.

L'identificazione di un marcatore citogenetico, infatti, permette di valutare l'evoluzione della patologia, dà indicazioni prognostiche e modula la possibilità di creare strategie terapeutiche. Infatti, oltre che nella prima diagnosi delle patologie oncoematologiche, la citogenetica classica svolge un ruolo fondamentale nel follow-up delle stesse e nella valutazione della risposta alla terapia.

Studi di follow-up hanno infatti dimostrato che la comparsa di un clone cellulare anomalo, in pazienti con cariotipo in precedenza normale, o la presenza di alterazioni cromosomiche aggiuntive, sono indicative di evoluzione della malattia. Lo studio citogenetico in oncoematologia consente quindi di:

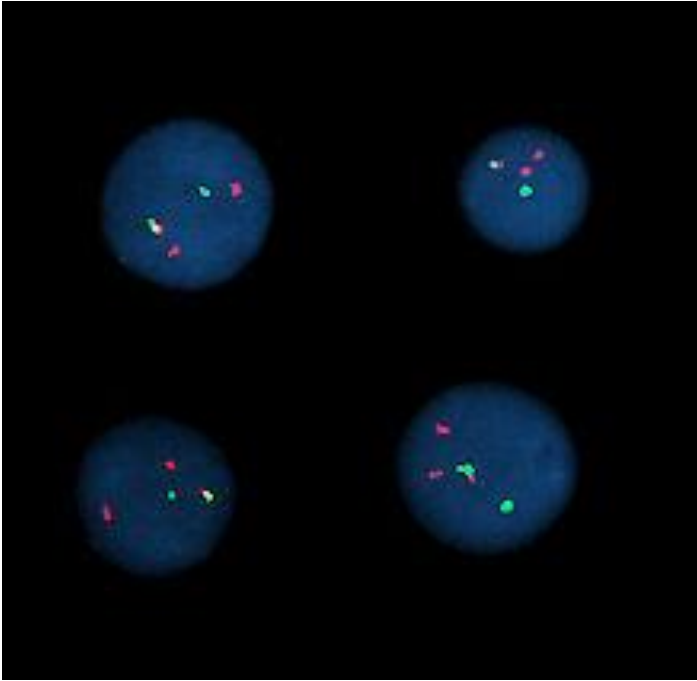
- precisare la diagnosi e/o consentire una diagnosi differenziale
- chiarire il meccanismo patogenetico della malattia
- individuare un fattore di rischio
- orientare le scelte terapeutiche
- identificare anomalie monitorabili dopo trattamento

L'analisi di laboratorio viene eseguita su un campione di sangue midollare ed eccezionalmente su sangue periferico e prevede l'allestimento di colture cellulari. In rari casi (meno del 2%) non è possibile determinare il cariotipo, a causa di una ridotta crescita delle cellule in coltura per cui può essere necessario ripetere il prelievo. L'analisi citogenetica non è però in grado di evidenziare alterazioni che riguardano segmenti cromosomici troppo piccoli. Infatti il potere risolutivo dell'analisi consente di identificare anomalie che coinvolgono segmenti cromosomici di almeno 9-10 Mb (megabasi) di lunghezza nel test standard e di almeno 5 Mb nell'analisi ad alta risoluzione. Raramente, inoltre, l'analisi può identificare anomalie cromosomiche costituzionali, cioè presenti fin dalla nascita in tutte le cellule del paziente. Tali anomalie sono generalmente incidentali, cioè nella grande maggioranza dei casi non hanno relazione con la patologia ematologica per la quale è stato eseguito l'esame. I criteri utilizzati per l'indagine citogenetica sono quelli raccomandati dalle linee guida SIGU ed ISCN 2016.

Esame	Esecuzione	Impegnative
Cariotipo Midollare	Solo su richiesta interna da parte di UOC di Ematologia/CTMO/Oncoematologia pediatrica Tempo di consegna:21gg	Coltura di cellule da altri tessuti 91.31.3 + cariotipo da metafasi da altri tessuti 91.33.5

LA FISH

La **FISH** (Fluorescence In Situ Hybriditation) è una metodica di citogenetica molecolare che sfrutta la capacità di un DNA a singola catena (**sonda**) di legarsi (**ibridizzazione**) ad un DNA complementare (**target**) sotto determinate condizioni di reazione. La capacità di leggere i segnali di ibridizzazione **direttamente sui nuclei** cellulari rende questa metodica molto sensibile, in quanto non dipende dal numero delle cellule in divisione attiva. L'analisi FISH in ambito oncoematologico prevede l'uso di sonde specifiche allo scopo di identificare anomalie cromosomiche nelle diverse neoplasie mielo-linfoproliferative.

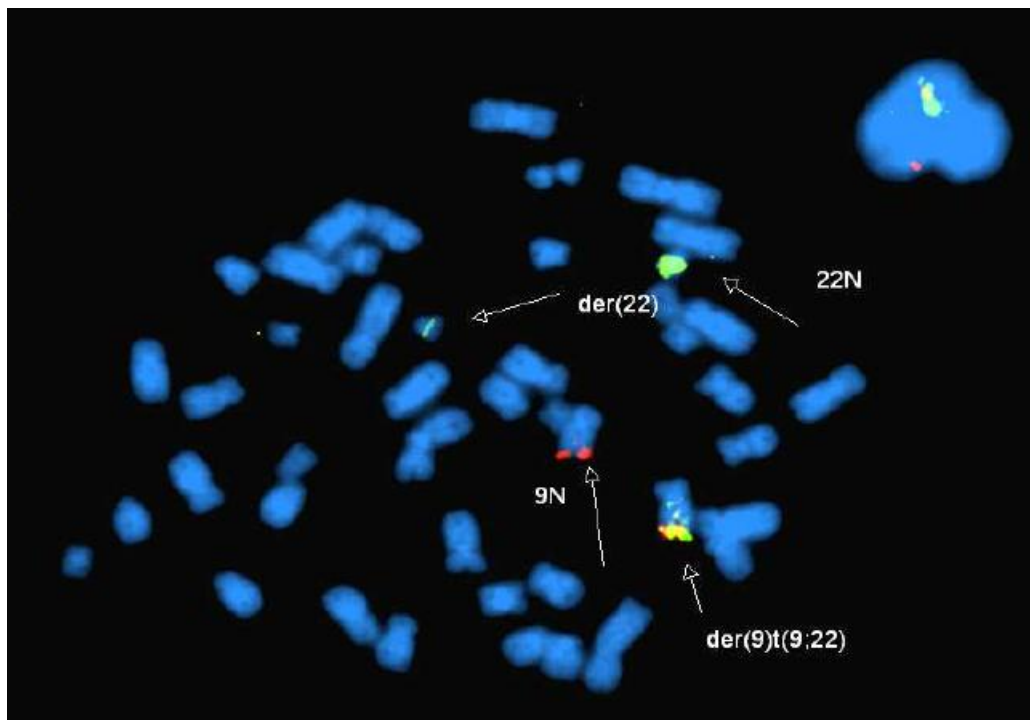


La FISH è una tecnica che ha permesso di aumentare sensibilmente l'accuratezza diagnostica: essa non sostituisce l'analisi convenzionale, ma aggiunge informazioni specifiche e complementari contribuendo sia a una più precisa definizione del cariotipo, sia all'identificazione di specifiche anomalie anche in assenza di metafasi. Questa tecnica è utilizzata frequentemente nei laboratori di diagnosi per la ricerca o conferma di traslocazioni ricorrenti, inversioni, delezioni, duplicazioni, caratterizzazione di cromosomi marcatori e di "breakpoint" cromosomici. La FISH si basa sulla capacità del DNA di denaturarsi in modo reversibile e prevede l'ibridazione tra una sonda di DNA marcata con un fluorocromo e la

sequenza "target" specifica complementare, che potrà essere così visualizzata come un segnale fluorescente direttamente su un cromosoma o su nuclei in interfase.

Per l'analisi citogenetica molecolare sono oggi disponibili molte sonde commerciali marcate: sonde centromeriche che si ibridano a sequenze α e β satellite, usate per evidenziare trisomie e monosomie e anomalie della ploidia, sonde locus specifiche usate per l'identificazione di delezioni, amplificazioni o riarrangiamenti di un gene, e sonde specifiche a due colori per la ricerca di riarrangiamenti. In quest'ultimo caso, le sonde possono essere di due tipi: "dual colour dual fusion" e "dual color break apart". Per lo studio delle traslocazioni ricorrenti di geni partner noti (ad es., BCR/ABL, PML/RARA) si utilizzano le sonde "dual colour dual fusion" di diverse centinaia di kilobasi, che si estendono a cavallo dei punti di rottura della traslocazione di entrambi i geni coinvolti, ciascuna marcata con un fluorocromo diverso. In una cellula positiva saranno visibili un segnale per ciascun allele "wild-type" e due segnali di fusione, uno per il gene di fusione e uno per il prodotto reciproco della traslocazione. Per lo studio dei riarrangiamenti che coinvolgono geni che hanno più partner di fusione (ad es., KMT2A, RARA, ETV6) si utilizzano sonde "dual color break apart" costituite da due sonde marcate con fluorocromi differenti che ibridano rispettivamente al 5' e al 3' del "breakpoint" di traslocazione del medesimo gene, la cui rottura sarà visibile come separazione dei due segnali. Inoltre, la presenza di anomalie aggiuntive o riarrangiamenti varianti, identificabili con l'analisi cromosomica o con la FISH, aggiunge spesso importanti informazioni all'analisi molecolare sia nella diagnosi che nel monitoraggio di alcune patologie.

E' possibile eseguire l'esame all'esordio della malattia e in corso di terapia, per valutare la persistenza di eventuali alterazioni citogenetiche. Per i marcatori specifici delle diverse patologie è possibile un monitoraggio del paziente. L'analisi si esegue su sangue midollare o su sangue periferico. Di seguito sono riportate le sonde ad oggi utilizzate, ma è possibile concordare le esecuzione di indagini specifiche previo accordo telefonico:



Esame	Esecuzione	Impegnative
FISH	Solo su richiesta interna da parte di UOC di Ematologia/CTMO/Oncoematologia pediatrica/Oncologia <i>Tempo di consegna: 14gg</i>	1Ibridazione in situ fluorescente (FISH) n° 1/2/3/4 di sonde molecolari 91.37.3

ONCOEMATOLOGIA MOLECOLARE

Il **Laboratorio di Oncoematologia della UOSD di Genetica Medica**, si occupa già da moltissimi anni della caratterizzazione e follow-up citogenetico e genetico-molecolare delle neoplasie ematologiche e del monitoraggio molecolare del chimerismo post trapianto midollo osseo.

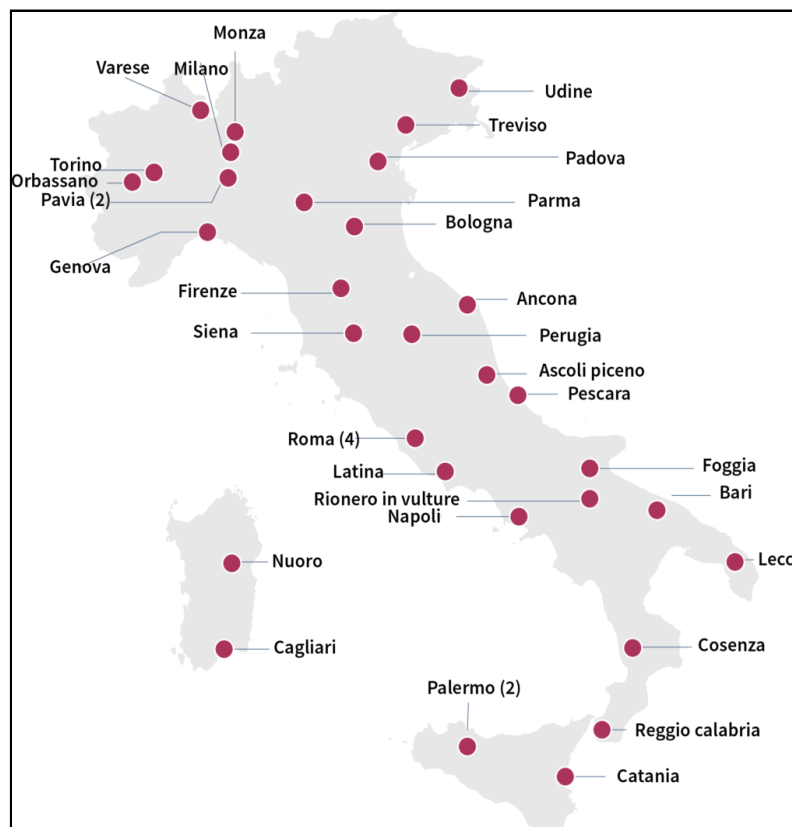
Le prestazioni erogate in tutti questi anni hanno permesso di ottenere una più accurata stratificazione del rischio clinico-prognostico, l'identificazione di target terapeutici personalizzati, il monitoraggio della malattia minima residua e dell'attecchimento del trapianto midollare. L'identificazione di biomarcatori delle neoplasie ematologiche è, infatti, oggi molto rilevante, dal punto di vista clinico, per la individuazione di potenziali bersagli terapeutici, per lo sviluppo di terapie mirate, per determinare fattori di rischio in base ai quali modulare la intensità delle terapie convenzionali (chemio, radioterapia, trapianto di cellule staminali etc.), e per stabilire opportune linee guida di trattamento.

Il **Laboratorio di Oncoematologia della UOSD di Genetica Medica** è inoltre certificato come centro di riferimento e consulenza a livello nazionale per la diagnostica delle leucemie acute mieloidi, delle sindromi mieloproliferative croniche e delle sindromi mielodisplastiche. Esso fa parte dei seguenti network nazionali ai quali è **ACCREDITATO**, gestiti dal **GIMEMA** (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto):

- **Rete CML LabNet**, per la diagnosi e follow-up della Leucemia Mieloide Cronica (**CML**). Il **CML LabNet** è una rete laboratoristica che mette in comunicazione i medici ematologi italiani che trattano la **Leucemia Mieloide Cronica (CML)** con laboratori dove si eseguono esami molto sofisticati di *biologia molecolare*. Al momento nella rete LabNet LMC operano 55 Laboratori, standardizzati e sottoposti a controlli di qualità; ciascuno di essi, grazie alla rete, funziona da riferimento per uno o più Centri di ematologia. A ciascun laboratorio, ogni anno, dopo l'esecuzione dei controlli di qualità, viene fornito un **fattore di conversione** in grado di rendere omogeneo e standardizzato il risultato dell'esame sia a livello nazionale che internazionale. **Tutto questo permette non solo di assicurare che gli esami di biologia molecolare diano risultati corretti e affidabili, ma consente anche di garantire a tutti i pazienti la stessa accuratezza negli esami di biologia molecolare, a prescindere dal Centro presso il quale vengono curati. Ad oggi vengono eseguiti circa 1200 test/anno per bcr/abl.**
- **Rete AML LabNet** per la diagnostica standardizzata delle leucemie mieloidi acute (**AML**). AML LabNet è una rete laboratoristica che mette in comunicazione i medici ematologi italiani che trattano la **Leucemia Mieloide Acuta (AML)** con i laboratori dove si eseguono esami di *citogenetica* e *biologia molecolare*, previsti dalla classificazione WHO e dall'European LeukemiaNet (ELN). Ad oggi, 11 laboratori italiani accreditati per lo studio genetico-molecolare delle AML, sono stati inseriti nella piattaforma LabNet. Nella prima fase del progetto viene offerto un pannello di esami genetici e molecolari di base, e in seguito si aggiungerà lo studio della malattia minima residua (MRD) e delle mutazioni somatiche che attualmente rivestono un significativo ruolo diagnostico e/o prognostico nelle leucemie mieloidi acute. Ad oggi si testano circa 100 casi di esordio per leucemia acuta/anno

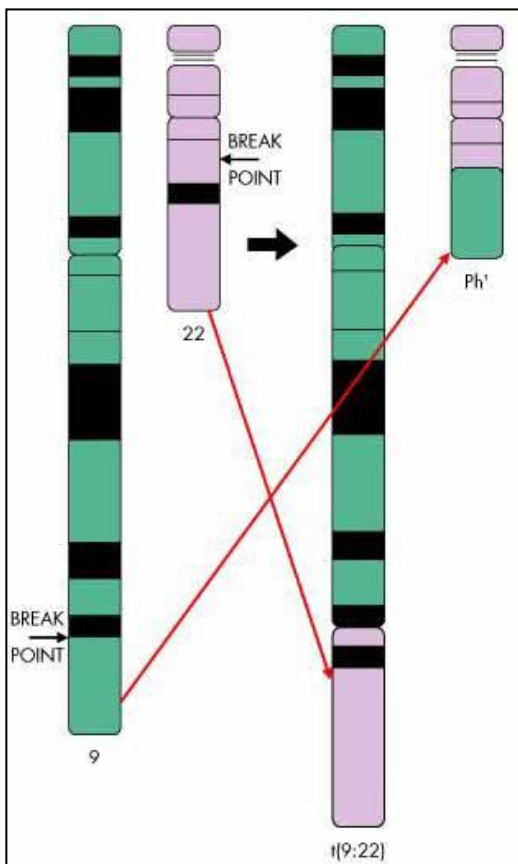
- Rete JakNet** per la diagnostica standardizzata delle malattie mieloproliferative croniche. Il progetto JakNet è un servizio aperto a tutti i Centri ematologici italiani gestito attraverso una piattaforma web, tramite la quale è possibile richiedere l'esecuzione di **analisi genetiche e anatomopatologiche da parte di medici ematologi italiani che si occupano di Neoplasie Mieloproliferative croniche Philadelphia-negative (MPN Ph-croniche)** con Laboratori che partecipano a programma di controllo qualità interni ed esterni, nei quali si eseguono esami di biologia molecolare e istopatologia sulla base della classificazione WHO e delle indicazioni dell'European Leukemia Net. **Ad oggi, sono 23 i Laboratori italiani di biologia molecolare** che hanno eseguito valutazioni inter e intra-laboratorio al fine di standardizzare le procedure laboratoristiche per la **valutazione di JAK2V617F**; Nella prima fase temporale è messo a disposizione un pannello di esami genetici e molecolari di base (JAK2, CALR, MPL), e successivamente, una volta completate le procedure di controllo di qualità, viene reso disponibile in casi selezionati lo studio delle mutazioni aggiuntive che ad oggi rivestono un significativo ruolo diagnostico e/o prognostico nelle MPN croniche Ph negative.

Inoltre il laboratorio è **CERTIFICATO** a livello internazionale da **UK NEQAS** per l'analisi del chimerismo post trapianto midollo osseo e per l'oncogenomica delle leucemie acute in **Next Generation Sequencing (NGS)**. Questo **ultimo** programma è diretto prevalentemente agli utilizzatori di pannelli in Next Generation Sequencing (NGS) per la diagnosi e la classificazione prognostica della AML. Ogni esercizio contiene un campione liofilizzato di AML o di una linea cellulare, nel quale i partecipanti dovranno valutare e riportare con i propri sistemi in-house ogni alterazione genica o regolatoria di significato patologico, come mutazioni puntiformi, micro-inserzioni, delezioni e duplicazioni.



BCR/ABL

La leucemia mieloide cronica (LMC), è una forma di leucemia che colpisce ogni anno da 1 a 2



persone ogni 100.000 abitanti. Costituisce il 15-20% circa di tutte le leucemie dell'adulto e può insorgere in entrambi i sessi, anche se è leggermente più frequente nell'uomo che nella donna. La malattia può manifestarsi a ogni età, ma è rara sotto i dieci anni. L'età media alla diagnosi è di 45-55 anni. La LMC origina nelle cellule mieloidi del midollo osseo, sede nella quale le cellule ematiche normalmente si formano a partire da elementi progenitori denominati blasti o cellule staminali. A causare la LMC è la moltiplicazione anomala di cellule staminali emopoietiche pluripotenti, cioè ancora in grado di proliferare e di differenziarsi; queste cellule, come indica l'aggettivo "mieloide", appartengono in primo luogo alla serie che porta alla formazione dei granulociti, un tipo di globuli bianchi. In conseguenza di questa eccessiva proliferazione si accumula un clone, cioè una popolazione omogenea, di granulociti immaturi nel midollo osseo e nel sangue.

Nella grande maggioranza dei casi la LMC è dovuta alla traslocazione reciproca di segmenti di DNA tra i cromosomi 9 e 22, con formazione del cosiddetto cromosoma Philadelphia (Ph), corrispondente ad un

cromosoma 22 in cui si è creato il gene di fusione BCR-ABL. Questo gene codifica per una proteina che rende "immortali" i blasti, ed è quindi importante sia nella patogenesi della LMC sia nella sua espressione clinica. Il ruolo della biologia molecolare nella gestione dei pazienti affetti da **Leucemia Mieloide Cronica (LMC)** ha acquistato sempre più importanza negli ultimi anni, in particolare da quando sono disponibili in commercio i cosiddetti "farmaci intelligenti" in grado di eliminare selettivamente le cellule malate, senza danneggiare quelle sane. Attualmente i farmaci che vengono impiegati nel trattamento dei soggetti con LMC sono i nuovi inibitori tirosinchinasici (TK-inibitori), che agiscono bloccando esclusivamente l'attività della proteina oncogenica BCR-ABL, senza interferire con le cellule normali.

L'avvento di questi farmaci ha notevolmente incrementato l'importanza della determinazione della risposta al trattamento. Per questa ragione, i pazienti vengono routinariamente sottoposti ad un esame specifico e sensibile, la PCR quantitativa, che permette di valutare le modificazioni dei livelli di RNA del gene BCR-ABL. Le linee guida ELN (European Leukemia Net) in questi pazienti prevedono infatti la determinazione quantitativa del trascritto BCR-ABL, su sangue periferico ogni 3 mesi.

Esame		Esecuzione	Impegnative
dosaggio dell'mRNA bcr/abl in RQ-PCR	quantitativo di fusione	Dal lunedì al venerdì, senza prenotazione Tempo di consegna : 21gg	n° 1 estrazione DNA 91.36.5 + n° 2 analisi di mutazione del DNA per BCR/ABL 91.29.4

JAK2/CALR/MPL

Le Neoplasie Mieloproliferative (MPN) costituiscono una delle cinque categorie delle neoplasie mieloidi secondo la classificazione WHO. Al loro interno vi è un sottogruppo costituito dalle MPN Philadelphia-negative, che include la **Policitemia Vera (PV)**, la **Trombocitemia Essenziale (TE)**, la **Mielofibrosi Primaria (PMF)** e la Mielofibrosi Primaria in fase prefibrotica. Tali disordini sono patologie neoplastiche, che colpiscono le cellule staminali emopoietiche. Si caratterizzano per una emopoiesi clonale, in quanto gli elementi delle tre serie maturative midollari (granulocitaria, eritrocitaria e megacariocitaria) derivano tutti da una stessa cellula progenitrice emopoietica, che ha acquisito una o più mutazioni genetiche che le conferiscono un vantaggio proliferativo, con un eccesso di produzione di elementi cellulari appartenenti a una o più linee fra le tre sopracitate.

Nel 2005 è stata identificata una mutazione con conseguente sostituzione di un residuo di valina con uno di fenilalanina in posizione 617 nell'esone 14 del gene JAK2, codificante per una tirosinchinasi (Janus Kinase 2) coinvolta nella via di segnalazione intracellulare JAK-STAT. Tale mutazione, **JAK2V617F**, è presente nella quasi totalità dei pazienti affetti da Policitemia Vera (95%) e in una proporzione significativa di pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale (55%) e Mielofibrosi Primaria (65%).

Poco dopo sono state identificate ulteriori mutazioni somatiche a carico del **gene MPL**, che codifica per il recettore della trombopoietina, coinvolto nella medesima via di segnalazione intracellulare mediata da JAK-STAT. Le mutazioni del gene MPL che si riscontrano nelle MPN si concentrano nell'esone 10, coinvolgendo in maniera precipua il codone W515 (MPLW515L e MPLW515K), e sono presenti in circa il 4-5% dei pazienti con Trombocitemia Essenziale e nel 7-10% dei pazienti con Mielofibrosi.

Nel 2013 grazie a tecniche di next generation sequencing, sono state identificate le mutazioni a carico del gene **CALR** (Calreticulina). Tutte le mutazioni identificate nei pazienti con MPN si concentrano nell'esone 9 e si caratterizzano per essere inserzioni o delezioni, che comportano uno slittamento della cornice di lettura di un singolo paio di basi. Nonostante se ne conoscano più di 50 sottotipi differenti, circa l'80% dei casi è costituito dalla mutazione di tipo 1 (delezione di 52 paia di basi) e dalla mutazione di tipo 2 (inserzione di 5 paia di basi). L'effetto complessivo di tutte queste mutazioni è la generazione di una differente regione C-terminale, ricca in aminoacidi neutri e carichi positivamente; vi è, inoltre, la perdita di una porzione proteica che agisce da segnale per la localizzazione a livello del reticolo endoplasmatico (sequenza KDEL). Studi funzionali suggeriscono che, in maniera ancora non del tutto delineata, anche le mutazioni di CALR possano agire attraverso la via di segnalazione JAK-STAT.

Le mutazioni di CALR si sono rivelate essere per la quasi totalità mutualmente esclusive con quelle a carico di JAK2 e MPL e solo rarissimi casi sono stati fino ad ora riportati di pazienti che presentano una doppia mutazione a carico di JAK2 e CALR.

Esame	Esecuzione	Impegnative
JAK2V617F dosaggio semiquantitativo degli alleli mutati	Dal lunedì al venerdì, senza prenotazione Tempo di consegna : 21gg	n° 1 estrazione DNA 91.36.5 + n° 3 analisi di mutazione del DNA per JAK2/CALR/MPL 91.29.4

LEUCEMIE ACUTE

La **Leucemia Acuta Mieloide (LAM)** è un disordine tumorale che origina frequentemente da una cellula staminale, pluripotente o multipotente, già differenziata per la mielopoiesi. Ne consegue un accumulo, primariamente nel midollo osseo e successivamente nel sangue periferico e in altri organi e tessuti emopoietici, di cellule blastiche che proliferano autonomamente. La LAM ha un'incidenza di circa 3-4 casi per 100.000 persone per anno ma, essendo una malattia tipica dell'età avanzata, può raggiungere un'incidenza di 10 casi per 100.000 persone per anno nella popolazione al di sopra dei 65 anni. La diagnosi viene effettuata da centri specializzati in grado di eseguire specifiche analisi immunofenotipiche e citogenetiche-molecolari.

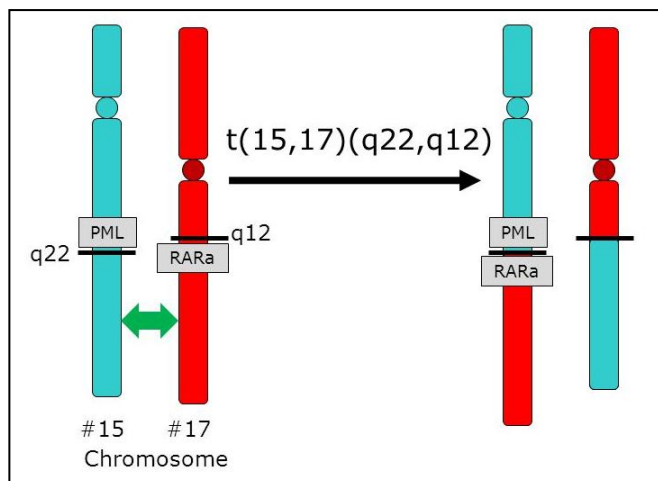
Circa il 60% delle LAM si caratterizzano per la presenza di specifiche alterazioni cromosomiche e/o geniche che possono essere identificate mediante l'applicazione di tecniche diagnostiche quali la citogenetica, ibridazione in situ (FISH), e PCR. Tuttavia, circa il 40% dei pazienti con LAM non presenta alterazioni citogenetiche; negli ultimi anni si sono rese disponibili piattaforme di sequenziamento di nuova generazione (next-generation sequencing -NGS) che hanno consentito di identificare in modo accurato, ampio e sensibile una varietà di alterazioni molecolari presenti in un campione ematico o midollare. La piattaforma NGS in uso presso questa U.O.S.D. permette di ottimizzare l'iter diagnostico e la classificazione prognostica delle LAM attraverso lo studio di numerosi geni all'interno di un pannello NGS: **ASXL1, CBL, CEBPA, CSF3R, DNMT3A, EZH2, FBXW7, FLT3, GATA1, GATA2, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, NRAS, PTPN11, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1, ZRSR2, WT1** con il quale partecipa al controllo di qualità internazionale UK NEQAS per l'analisi in NGS delle leucemie acute. La valutazione molecolare dei diversi pazienti permette la classificazione prognostica delle LAM e la loro suddivisione in "classi di rischio" bassi, medi o alti. Oggi, le mutazioni genetiche presenti nei diversi pazienti pongono le basi per una terapia personalizzata, essendo disponibili farmaci target per le diverse alterazioni genetiche. Altri farmaci target inibiscono le vie metaboliche della cellula leucemica, o ne inducono la differenziazione.

Inoltre, numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato che mutazioni geniche ereditarie, ovvero presenti dalla nascita, fino a poco tempo fa considerate estremamente rare nelle leucemie sono invece presenti fino al 10-15% dei casi (soprattutto in soggetti giovani, di età inferiore ai 50 anni). Questo ha portato l'Organizzazione Mondiale della Sanità a definire nel 2016 una nuova categoria clinica denominata "leucemie associate a predisposizione genetica ereditaria". L'identificazione di una mutazione ereditaria associata a predisposizione leucemica in un paziente affetto, ha un impatto importante nella scelta del donatore per il trapianto di cellule staminali poiché in questo caso un trapianto da donatore familiare è da escludersi e per le strategie di prevenzione nei famigliari degli affetti recanti la stessa mutazione predisponente.

Esame	Geni analizzati	Impegnative
Pannello NGS per leucemie acute	ASXL1, CBL, CEBPA, CSF3R, DNMT3A, EZH2, FLT3, GATA1, GATA2, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, NRAS, PTPN11, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1, ZRSR2, WT1	Impegnativa interna
Pannello NGS per leucemie ereditarie	TP53, DNAJC21, ANKRD26, DKC1, GATA1, PAX5, DDX41, GATA2, CEBPA, ETV6, RUNX1, TERT, TERC	Impegnativa interna

PML-RARA

La leucemia acuta promielocitica (LAP) è una forma particolare di leucemia mieloide acuta (LMA), caratterizzata dalla presenza nel sangue midollare ematopoietico di particolari elementi cellulari chiamati promielociti che costituiscono la maggioranza delle cellule presenti e sono caratterizzate



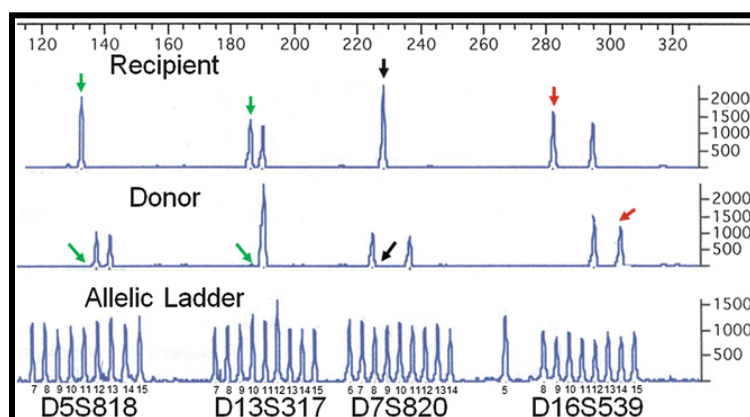
dalla presenza al loro interno di numerosissimi granuli che rendono queste cellule molto facilmente riconoscibili all'esame microscopico da parte di un ematologo esperto. Si tratta, come tutte le leucemie, di un **tumore del sangue** le cui cellule proliferano senza andare incontro a maturazione impedendo il normale sviluppo delle altre cellule del sangue. La causa di questo particolare tipo di leucemia è dovuta alla presenza di una **traslocazione cromosomica** tipica di questa malattia. La traslocazione cromosomica riguarda una

parte del cromosoma 17 ed una parte del cromosoma 15 che si scambiano di posto (traslocazione bilanciata) per cui una parte del cromosoma 15 si unisce alla parte restante del cromosoma 17 e una parte del cromosoma 17 si unisce alla parte restante del cromosoma 15. In questo modo si viene a formare la traslocazione bilanciata tra il cromosoma 15 ed il cromosoma 17 che è responsabile, a livello molecolare, della produzione del gene ibrido PML-RAR alfa. La presenza di questo gene ibrido causa la LAP in quanto blocca la maturazione delle cellule della serie mieloide a livello promielocitico. La maggior parte dei pazienti si presenta clinicamente con una **coagulopatia grave** che provoca una **sintomatologia emorragica**. Oltre a questa sintomatologia emorragica possono essere presenti tutti gli altri segni tipici di una leucemia mieloide acuta. La LPA secondo la OMS rientra nel gruppo delle LMA con anomalie molecolari ricorrenti. In questo modo è posta una relazione univoca fra la presenza del riarrangiamento pml-rar- α , comunque determinatosi, e la possibilità di porre una diagnosi di LPA. Ad oggi è possibile curare la malattia anche senza ricorrere alla chemioterapia, con un trattamento che prevede **acido retinoico** e **triossido di arsenico**. I tassi di risposta oscillano tra il 90-97% e la percentuale di recidive risulta estremamente contenuta, inferiore al 5%. Ne deriva che l'indagine di biologia molecolare per la ricerca del riarrangiamento pml-rar- α deve essere eseguita entro 24-48 ore, perché necessaria per iniziare la terapia di induzione;

Presso questa U.O. la diagnosi di leucemia acuta promielocitica è posta entro 6-8h dal sospetto diagnostico mediante esecuzione della ricerca in PCR real time del trascritto di fusione PML-RARA su campione di RNA estratto da sangue midollare

Esame	Esecuzione	Impegnative
PML-RARA	Dal lunedì al venerdì, senza prenotazione Tempo di consegna: 12 h per i casi acuti	n° 1 estrazione DNA 91.36.5 + n° 2 analisi di mutazione del DNA per PML- RARA 91.29.4

CHIMERISMO MOLECOLARE



Il trapianto allogenico di midollo osseo o cellule staminali è una procedura standard per il trattamento di diverse malattie ematologiche, sia di origine neoplastica che non, come l'anemia aplastica severa, le leucemia acute e croniche e i linfomi. Il trapianto di midollo osseo dovrebbe eradicare le cellule clonali maligne e, attraverso l'infusione di cellule di un donatore sano, ricostituire la funzionalità ematologica e immunitaria nel più

breve tempo possibile. Le maggiori cause di fallimento del trapianto sono: il rigetto del trapianto, la GvHD (Graft versus Host Disease) e la ricomparsa della malattia; questa può derivare dalla persistenza di cellule emopoietiche del ricevente insieme a cellule del donatore (chimerismo misto), situazione considerata fattore prognostico negativo perché si può verificare la riespansione del clone malato e quindi la recidiva della malattia di base. Il monitoraggio del chimerismo post-trapianto nel ricevente risulta fondamentale per valutare precocemente l'eventuale rigetto o i primi segni di ricaduta. Questo test permette di valutare la percentuale di cellule del donatore e del ricevente presenti nel paziente, così da verificare l'attecchimento del trapianto e l'eventuale presenza di cellule del ricevente che possono essere responsabili di una recidiva. Questo è possibile in quanto ogni individuo presenta nel proprio DNA (materiale genetico) uno specifico codice che definisce la propria identità genetica. Infatti, ad eccezione dei gemelli monozigoti, il cui DNA è perfettamente uguale, il profilo genetico di ogni individuo è unico, e proprio questa caratteristica è alla base della metodologia utilizzata per determinare la presenza di due genotipi diversi (donatore e ricevente) nella stessa persona e la loro percentuale. Per l'esecuzione dell'esame viene fatto un prelievo di sangue periferico del donatore e del ricevente prima del trapianto, da essi viene estratto il DNA che viene conservato per tutta la durata dei successivi prelievi di sangue midollare o sangue periferico del ricevente dopo il trapianto, a intervalli stabiliti dai clinici. La diagnosi molecolare del chimerismo si basa sul seguente metodo:

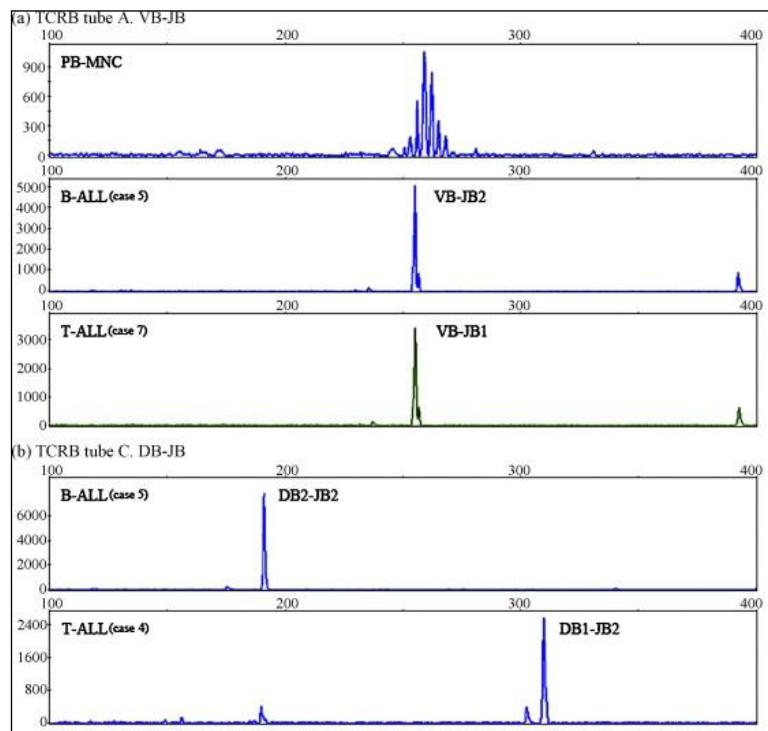
- amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) di particolari regioni del DNA chiamate microsatelliti o STR (Short Tandem Repeat)
- separazione elettroforetica degli alleli
- calcolo della percentuale del chimerismo

Il laboratorio è **CERTIFICATO** a livello internazionale da **UK NEQAS** per l'analisi del chimerismo post trapianto midollo osseo

Esame	Esecuzione	Impegnative
CHIMERISMO	Dal lunedì al venerdì, senza prenotazione Tempo di consegna: 14gg	Impegnativa interna

TEST CLONALITA'

Le malattie linfoproliferative costituiscono spesso un problema diagnostico, soprattutto nelle fasi iniziali del loro decorso, in quanto è difficile differenziare una proliferazione linfoide reattiva (policlonale) da una neoplastica (monoclonale). La valutazione e la dimostrazione della clonalità mediante analisi molecolare dei geni codificanti i recettori antigene-specifici risulta essere uno dei modi più accurati per prevedere la neoplasia linfoide. La tecnica utilizzata a questo scopo è la PCR



multiplex secondo il protocollo BIOMED-2 che permette di amplificare specifici segmenti genici a livello dei quali si possono o meno riscontrare riarrangiamenti clonali: per i linfociti T vengono presi in considerazione i segmenti V D e J del T cell receptor (TCR) mentre per i linfociti B i segmenti del gene dell'immunoglobulina (BCR). Il processo di riarrangiamento graduale in ciascun gene delle immunoglobuline (Ig) o dei recettori delle cellule T (TCR) durante la differenziazione linfoide precoce unisce i segmenti del gene V, D e J tra i numerosi segmenti disponibili. Durante il processo di riarrangiamento, i nucleotidi vengono eliminati e inseriti casualmente nei siti di giunzione, risultando in un'enorme diversità di recettori dell'antigene. Linfoproliferazioni reattive hanno quindi geni Ig o TCR riarrangiati policlionalmente, mentre le linfoproliferazioni maligne mostrano riarrangiamenti clonali. La sola clonalità tuttavia non implica necessariamente malignità: l'espansione clonale benigna di cellule T è stata per esempio descritta in pazienti, in associazione con alcune malattie infiammatorie, infezioni virali e invecchiamento. Per tale motivo è essenziale che i risultati di clonalità molecolare siano sempre interpretati nel contesto di diagnosi cliniche, morfologiche e immunofenotipiche in stretta collaborazione con patologi, ematologi e citologi. Sebbene i saggi in PCR multiplex siano sensibili e adatti all'analisi di piccole quantità di DNA, essi non permettono di differenziare rapidamente popolazioni clonali e riarrangiamenti multipli che

potrebbero nascondersi sotto un picco monodimensionale, e non sono progettati per identificare la sequenza specifica di DNA riarrangiato (V,D,J).

TEST MOLECOLARI IN EMATOLOGIA ED EMATO-ONCOLOGIA in uso presso questa U.O.S.D. di Genetica Medica	
Gene Fattore V	Analisi della mutazione FV leiden
Gene Protrombina	Analisi della mutazione FII G20210A
Gene MTHFR	Analisi della mutazione MTHFR C677T
Gene HPA-1	Analisi dei polimorfismi piastrinici HPA1- a/b
Gene PAI-1	Analisi dei polimorfismi del gene PAI-1: 4G/5G
Gene JAK2	Analisi quantitativa della mutazione V617F in PCR real time
Gene CALR	Analisi di inserzione/delezione in elettroforesi capillare
Gene MPL	Analisi in PCR primers specifica codoni 505 e 515
BCL1-IGH t(11;14)	Analisi in elettroforesi capillare
BCL2-IGH t(14;18)	Analisi in elettroforesi capillare
Gene BRAF	Analisi della mutazione V600E in PCR real time
Mutazione FLT3 ITD	Analisi della mutazione in elettroforesi capillare
Gene NPM1 - inserzione (4 bp)	Analisi qualitativa in elettroforesi capillare
IDH1 (R132)	Analisi qualitativa in PCR Real Time IDH1
IDH2 (R140 e R172)	Analisi qualitativa in PCR Real Time IDH2
Chimerismo Donatore	Analisi di STRs in elettroforesi capillare
Chimerismo post-trapianto	Analisi di STRs in elettroforesi capillare
Chimerismo pre-trapianto	Analisi di STRs in elettroforesi capillare
TIPIZZAZIONE gene di fusione BCR-ABL	Analisi in elettroforesi capillare
Gene di fusione BCR/ABL Maior t(9;22) -p210	Analisi quali/quantitativa in PCR-real time
Gene di fusione BCR/ABL Minor t(9;22) - p190	Analisi quali/quantitativa in PCR-real time

Gene di fusione BCR/ABL Micro t(9;22) - p230	Analisi qualitativa della mutazione in elettroforesi capillare
Gene di fusione CBFB /MYH t(16;16), inv (16)	Analisi quali/quantitativa in PCR-real time
Gene di fusione RUNX1/T1 t(8;21)	Analisi quali/quantitativa in PCR-real time
Gene di fusione PML/RARA t(15 ;17)	Analisi quali/quantitativa in PCR-real time
Gene di fusione ETV6 -RUNX1 t (12;21)	Analisi quali/quantitativa in PCR-real time
Gene di fusione FIP1L1/PDGFRA	Analisi qualitativa in PCR-real time
cKIT esone 8 ed esone 17	Analisi di mutazione in PCR Real Time
Gene WT1	Analisi della espressione del gene WT1
Pannello genico in NGS per Oncogenomica Linea Mieloide	ASXL1, CBL, CEBPA, CSF3R, DNMT3A, EZH2, FBXW7, FLT3, GATA1, GATA2, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, NRAS, PTPN11, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1, ZRSR2, WT1
Pannello Genico Sferocitosi in NGS	ANK1, SPTB, EPB42, SLC4A1, SPTA1, EPB41
Pannello genico Eritrocitosi in NGS	HIF2A, EGLN1, MPL, JAK2, WAS, THPO, EPOR, BPGM, VHL, GSN, SRC, RUNX1, GATA1, SH2B3
Pannello genico Leucemia Familiare in NGS(NEXT GENERATION SEQUENCING)	TP53, DNAJC21, ANKRD26, DKC1, GATA1, PAX5, DDX41, GATA2, CEBPA, ETV6, RUNX1, TERT ,TERC
Pannello Genico Linfatica Cronica (LLC) in NGS	TP53, MYD88, NOTCH1
Test di Clonalità B I livello	Analisi del riarrangiamento delle immunoglobuline in elettroforesi capillare
Test di Clonalità T I livello	Analisi del riarrangiamento del recettore dei linfociti T (TCR) in elettroforesi capillare
Test di persistenza molecolare delle CAR-T	Analisi in quantitativa relativa QPCR Real Time del gene sintetico delle CAR-T

TALASSEMIE

Le talassemie sono **malattie ereditarie del sangue** che comportano **anemia**, cioè una diminuzione della quantità di emoglobina, proteina contenuta all'interno dei globuli rossi che ha la funzione di trasportare l'ossigeno nel sangue. Le talassemie sono un gruppo di difetti dell'emoglobina che causano un'anemia di tipo microcitico, vale a dire con globuli rossi più piccoli rispetto alla norma (**microcitemia**). L'emoglobina è composta da quattro catene, due catene alfa e due catene beta ciascuna delle quali contiene ferro (Fe^{2+}) e trasporta ossigeno (O_2)

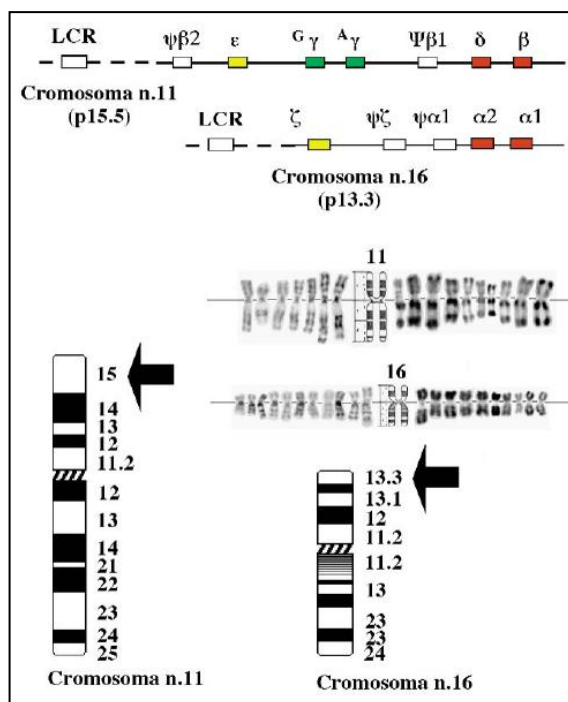
Le talassemie sono dovute ad una alterata sintesi delle proteine che costituiscono l'emoglobina e sono classificate in base al tipo di catena deficitaria. Si distinguono:



- **Alfa talassemia**, quando è alterato il gene che contiene le informazioni necessarie per sintetizzare le catene alfa

- **Beta talassemia** quando il gene alterato è quello che contiene le informazioni necessarie per sintetizzare la catena beta ed è più frequente nei soggetti dell'area mediterranea e del sud-est asiatico.

L'alfa talassemia è causata da alterazioni di uno o più dei 4 geni che contengono le informazioni necessarie per sintetizzare la catena alfa dell'emoglobina. Poiché i geni α -globina sono quattro (due per ciascun allele, situati sul braccio corto del cromosoma 16), la patologia si presenta notevolmente eterogenea e complessa. I soggetti con alterazioni di uno solo dei 4 geni sono portatori silenti di alfa talassemia in quanto gli altri tre geni permettono di produrre quantità quasi normali di catene alfa. La condizione di **portatore silente** non dà sintomi e non si manifesta neppure all'emocromo in quanto non c'è anemia e non c'è neppure microcitemia. La diagnosi deve basarsi sull'impiego di test molecolari. I soggetti con alterazioni di due dei 4 geni sono portatori di **trait talassemico** che non dà solitamente sintomi, ma può venir sospettato quando si esegue un esame emocromocitometrico che svela un'anemia microcitica di grado moderato-lieve e la diagnosi va confermata con test molecolari. I soggetti con alterazioni di tre dei 4 geni sono affetti da **HbH disease** ed il sospetto diagnostico viene dai sintomi e dalla dimostrazione di anemia microcitica moderato-grave; una prima conferma può venire dalla dimostrazione nel sangue della emoglobina H o di Bart. I test molecolari permettono di mettere in evidenza le delezioni o le mutazioni che causano la malattia. Quasi tutti i feti in cui tutti e quattro i geni alfa globinici sono mutati o deleti sono affetti da **idrope fetale con emoglobina di Bart** e muoiono in utero o nelle prime ore di vita a meno che non vengano trattati immediatamente in terapia intensiva e trasfusi. La diagnosi può venire dalla dimostrazione elettroforetica o con altre tecniche cromatografiche più sofisticate della emoglobina H o di Bart. Anche in questo caso, le indagini molecolari permettono di confermare la diagnosi.



Le talassemie di tipo beta – la forma di gran lunga più diffusa nel nostro Paese e lungo tutta la costa del Mar Mediterraneo – sono un gruppo eterogeneo di emopatie ereditarie recessive, causate da alterazioni del gene beta-globina (HBB) localizzato sul cromosoma 11 che determinano una sintesi ridotta (β^+) o assente (β^0) delle catene beta del tetramero dell'emoglobina. La maggior parte delle alterazioni sono singole sostituzioni, delezioni o inserzioni di pochi nucleotidi, più raramente le beta talassemie hanno origine da grosse delezioni geniche.

Quando entrambi i genitori sono portatori di una mutazione in un solo gene beta globinico essi hanno ciascuno il **trait beta talassemico** e rischiano ad ogni gravidanza, con un 25% di probabilità, di avere un figlio affetto da talassemia major. Se invece uno solo dei due genitori ha il trait talassemico, avrà ad ogni

gravidanza un rischio del 50% di trasmettere il gene alterato al figlio. La condizione di **trait talassemico** o **talassemia minor** di regola non causa sintomi. Viene solitamente sospettata quando si esegue un esame emocromocitometrico che dimostra una lieve anemia e globuli rossi più piccoli del normale (microcitemia, svelata da un basso valore del Volume Corpuscolare Medio – MCV dall'inglese *Mean Corpuscular Volume*) e viene confermata dall'elettroforesi dell'emoglobina che dimostra alti livelli di emoglobina A2, superiori al 3,5%.

La **talassemia major**, in cui entrambi i due geni beta-globinici sono alterati, invece, si manifesta in genere entro il primo o il secondo anno di vita con i sintomi legati ad una grave anemia e alla componente emolitica. Mentre nelle forme di beta-talassemia minor si ha un incremento di Hb A2, nella beta-talassemia major è aumentata l'Hb F.

La diagnosi molecolare di talassemie o di altre emoglobinopatie può essere utilizzata per confermare un sospetto diagnostico, per effettuare una diagnosi prenatale in coppie a rischio, per definire il genotipo di fenotipi complessi e/o atipici che possono derivare dalla combinazione di diversi difetti a carico dei geni globinici, per eseguire lo screening e l'identificazione precoce di coppie a rischio. Le basi molecolari di questo gruppo di patologie sono estremamente eterogenee.

Test diagnostico	Mutazioni analizzate	Metodica
Screening molecolare Talassemia beta	25 mutazioni del gene beta-globina (HBB),	Ibridazione inversa
Screening molecolare Talassemia alfa	22 alterazioni del gene alfa-globina	Ibridazione inversa
Analisi duplicazioni/delezioni geni alfa e beta	Analisi delezioni/duplicazioni	MLPA

EMOCROMATOSI

L'emocromatosi è una malattia metabolica genetica dovuta all'accumulo di notevoli quantità di ferro in diversi organi e tessuti quali: fegato, pancreas, cute, cuore ed alcune ghiandole endocrine. Il progressivo accumulo di questo metallo nei tessuti provoca dei danni a livello di organo. La causa dell'emocromatosi ereditaria o primaria è genetica. La forma più comune è causata da una mutazione del gene HFE che codifica per una proteina che regola l'assorbimento del ferro alimentare. Esistono 5 forme di emocromatosi ereditaria con diverso esordio e dovute a mutazioni in geni differenti. Presso questa UOSD è possibile identificare 15 polimorfismi dei geni HFE (esoni 2, 3, 4), TFR2 (esoni 2, 4, 6) e FPN1 (esone 5), mediante amplificazione delle sequenze bersaglio, ibridazione inversa su striscia e successiva rivelazione colorimetrica. Mediante il test genetico è possibile effettuare la diagnosi precoce e la scelta di trattamenti adeguati durante la fase asintomatica, permettendo di prevenire le conseguenze cliniche dell'eccesso di ferro.

Test diagnostico	Mutazioni analizzate	Metodica
Screening molecolare Emocromatosi	V53M, V59M, H63H, H63D, S65C, C282Y, Q283P, E168Q, E168X, W169X (gene HFE) E60X, M172K, Y250X (gene TFR2) N144H, V162del (gene FPN1)	Ibridazione inversa

FARMACOGENETICA



la Farmacogenetica può essere definita come la disciplina che “si occupa delle basi genetiche delle differenze individuali nella risposta ai farmaci”, mentre spetta alla Farmacogenomica il compito di trasferire le nuove conoscenze sul genoma umano alla ricerca sia per la scoperta e sviluppo di nuovi farmaci che per l’individualizzazione delle terapie.

Sotto il profilo della pratica medica, lo sviluppo e l’impiego di “test di farmacogenetica” rispondono all’obiettivo di:

- aumentare l’efficacia del trattamento e ridurre il rischio di effetti avversi di un determinato farmaco;
- consentire la tempestività (precocità) di somministrazione di un farmaco eliminando la “fase di prova” prudenziale che oggi è necessario applicare, a tutto vantaggio della sicurezza della cura;
- ridurre il costo della terapia, evitando di somministrare farmaci che poi si dimostrano senza effetto in quel malato;
- consentire di recuperare molecole in prova, che hanno dato effetti avversi in alcuni malati, riconoscendo ed isolando per tempo (in anticipo) i pazienti ai quali non vanno somministrate, dai pazienti nei quali tali molecole si sono dimostrate utili.

Inoltre, ne possono derivare altre informazioni importanti:

- orientamenti per adattare la dose del farmaco all’individuo
- criteri per migliorare la classificazione sia delle malattie, sia delle classi di farmaci, in base anche ai meccanismi di azione genetica

La teoria che vede il cancro come il risultato dell’accumularsi di mutazioni genetiche non letali nelle cellule costituzionali dei vari tessuti corporei, definite cellule somatiche in contrapposizione alle cellule germinali deputate alla riproduzione (nota anche come teoria mutazionale somatica del cancro), rappresenta ad oggi il modello più consolidato. È stato ampiamente riportato che diversi tipi di tumore sono il risultato di mutazioni somatiche in geni critici, coinvolti prevalentemente nei meccanismi di crescita e differenziazione cellulare o nel riparo dei danni al DNA. Oggi, con l’avvento della genomica, si assiste ad una maggiore disponibilità sul mercato e nella pratica clinica oncologica dei test Next Generation Sequencing (NGS) per la profilazione genetica tramite biopsia solida e anche biopsia liquida. Questi nuovi test sono in grado di analizzare fino ad oltre 500 mutazioni geniche in una singola analisi e di fornire dati anche sul

Tumor Mutational Burden (TMB). In particolare, i test NGS risultano estremamente complessi e consentono l'individuazione:

- di tutte le mutazioni delle aree geniche sequenziate (actionable, passenger, druggable);
- delle mutazioni driver;
- del pathway mutazionale;
- del tumor mutational burden;
- delle interazioni tra le diverse alterazioni geniche mediante Network Analysis.

L'estrema complessità della gestione del modello mutazionale in oncologia richiede in maniera imprescindibile l'attivazione di gruppi inter-disciplinari, in cui siano integrate le competenze oncologiche, ematologiche, della biologia molecolare, delle anatomie patologiche, delle farmacie ospedaliere e di esperti di repository genomici e di normativa sulla privacy per poter governare i processi clinici e decisionali di appropriatezza.

L'approccio terapeutico molecolare fonda le basi della sua applicabilità nel modello mutazionale ed in particolare nel concetto che alcuni tumori risultano essere **"mutation addicted"**, cioè strettamente dipendenti dalla pre-senza di particolari mutazioni driver acquisite. Ciò si verifica in particolare quando una mutazione driver, acquisita precocemente, ha generato un clone predominante di cellule tumorali la cui crescita è sostenuta dalla mutazione. Rispetto ai farmaci a bersaglio molecolare le mutazioni possono essere distinte in **"druggable"** se riguardano proteine che possono essere direttamente colpite dal farmaco, o **"actionable"** se le corrispondenti proteine non sono trattabili direttamente ma fanno parte di pathway che una volta alterati possono essere bersaglio di trattamenti specifici. Le mutazioni del gene EGFR rappresentano un esempio di mutazioni druggable, trattabili con inibitori tirosino-chinasici, mentre le mutazioni del gene PTEN, che inducono alterazioni della pathway PI3K/AKT, sono un chiaro esempio di mutazioni actionable, trattabili cioè con inibitori di tale pathway. Ad una fase in cui molte cellule tumorali soccombono per l'azione del farmaco ed il paziente presenta un beneficio clinico, fa seguito in genere l'acquisizione o l'espansione di mutazioni secondarie in grado di favorire l'adattamento del tumore al nuovo ambiente e l'instaurarsi del fenomeno della **resistenza farmacologica**. Un tumore divenuto resistente ad un farmaco a bersaglio molecolare può essere trattato efficacemente con farmaci di nuova generazione rivolti contro le mutazioni inducenti resistenza. Con opportune strategie terapeutiche è già possibile, e verosimilmente lo sarà sempre più nel prossimo futuro, cronicizzare le patologie oncologiche in fase avanzata di crescita.

I risultati dei test molecolari vanno espressi nel report in termini di assenza o presenza di mutazione. Numerose agenzie come il College of American Pathologists hanno sviluppato specifiche checklist per il **report mutazionale**, allo scopo di implementare la standardizzazione nell'interpretazione dei risultati, che rappresenta un obiettivo di fondamentale importanza. Recentemente, l'AMP ha evidenziato un'alta variabilità nell'annotare le mutazioni somatiche nei pazienti oncologici ed ha proposto dettagliate linee-guida per la standardizzazione dei processi di classificazione, annotazione, interpretazione e reporting per le varianti somatiche. L'AMP ha stabilito un sistema basato su quattro livelli, in particolare:

- **livello 1, varianti con evidente rilevanza clinica;**

- **livello 2, varianti con potenziale rilevanza clinica;**
- **livello 3, varianti di significato clinico ignoto;**
- **livello 4, varianti benigne o probabilmente benigne.**

L'interpretazione delle varianti somatiche e potenzialmente germinali in un campione tumo-rale è particolarmente problematica e impegnativa, richiedendo personale altamente specializzato con una specifica formazione nel settore

Presso questa U.O.S.D. sono disponibili i seguenti test farmaco-genetici in ambito oncologico eseguiti in collaborazione con la **U.O.C. Anatomia Patologica**, per quelli su **tessuti oncologici*** :

GENE	REGIONE ANALIZZATA
Sindrome di Gilbert	promoter del gene UGT-A1 [(TA)6] [(TA)7]
5-Fluorouracile Test di tossicità`	DPYD introne 14 splicing
Irinotecano Test di tossicità`	promoter del gene UGT-A1 [(TA)6] [(TA)7]
Farmaci Tiopurinici Test di tossicità`	TPMT Alleli difettivi TPMT*2 TPMT*3A TPMT*3C
Farmacogenetica dei Gliomi* Test risposta terapeutica	metilazione di MGMT , status mutazionale di IDH1-2 , codelezione 1p-19q)
HER2/NEU* Test risposta terapeutica	Espressione in FISH HER2/NEU
PARP-INIBITORI* Test risposta terapeutica	Analisi in NGS BRCA1/BRCA2
MUTAZIONI KRAS/NRAS* Test risposta terapeutica	Codoni esoni 2,3,4 KRAS/NRAS
MUTAZIONI EGFR* Test risposta terapeutica	Esoni 18,19,20,21 EGFR
MUTAZIONI BRAF* Test risposta terapeutica e prognostica	Codone 600 BRAF
RIARRANGIAMENTI ALK/ROS*	ANALISI IN FISH Riarrangimenti ALK/ROS

FARMACOGENETICA DEI GLIOMI

Lo sviluppo della biologia molecolare ha consentito una definizione più accurata dei tumori cerebrali, sia in termini diagnostici che prognostici. I gliomi sono i tumori cerebrali più comuni e sono classificati secondo i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) in: astrocitomi, oligodendrogliomi, oligoastrocitomi misti, ed ependimomi. Nel 2016 sono state pubblicate le nuove linee guida dell'OMS, che prevedono l'analisi di marker molecolari accanto alla caratterizzazione istopatologica per la diagnosi dei tumori del Sistema Nervoso Centrale. Secondo i nuovi criteri, per la corretta diagnosi dei gliomi degli adulti è necessaria l'analisi dello status mutazionale dei geni *IDH1* e *IDH2* e della codelezione dei bracci cromosomici 1p e 19q. Le mutazioni dei geni *IDH1* (codone 132) e *IDH2* (codone 172) sono presenti praticamente in tutti i gliomi di basso grado: oligodendrogliomi e astrocitomi e nei glioblastomi secondari. Mentre la presenza della codelezione 1p/19q è tipica dei soli oligodendrogliomi. Quindi, secondo l'OMS, per avere una diagnosi di glioma di basso grado è necessario che almeno uno dei due geni *IDH* sia mutato e per distinguere tra oligodendrogliomi e astrocitomi occorre verificare la presenza della 1p/19q co-del.

CO-DELEZIONE 1p-19q

Si tratta della perdita combinata del braccio corto del cromosoma 1 (1p) e del braccio lungo del cromosoma 19 (19q) ed è riconosciuto come un marker prognostico favorevole e predittivo di risposta alla chemioterapia alchilante sia da sola che in combinazione con la radioterapia.

STATUS MUTAZIONALE IDH1-IDH2

- **IDH1:** situato sul braccio lungo del cromosoma 2 (2q32), codifica per isocitrato deidrogenasi citosolico. Le mutazioni interessano un singolo residuo amminoacidico 132, nella maggior parte dei casi (> 85%) con conseguente sostituzione dell'arginina con istidina e quindi denominata R132H.
- **IDH2:** situato sul braccio lungo del cromosoma 15 (15q21), codifica per isocitrato deidrogenasi mitocondriale. Le mutazioni interessano un singolo residuo amminoacidico 172, analogo al residuo R132 in IDH1.

Tutti i pazienti con *IDH1* o *IDH2* mutato, trattati con radioterapia o agenti alchilanti hanno mostrato una maggiore sopravvivenza rispetto ai pazienti con *IDH* wild-type.

ANALISI DI METILAZIONE DEL PROMOTORE MGMT

Il gene **MGMT** codifica per una proteina coinvolta nel sistema del riparo del DNA. La proteina ha il compito di rimuovere i gruppi alchilici a livello delle guanine in posizione O-6, impedendo così la formazione di cross-links fra le molecole di DNA, se così non fosse la cellula andrebbe in apoptosi. La presenza di metilazione a carico del promotore MGMT ha valore prognostico e predittivo di risposta alla terapia con agenti alchilanti.

Presso questa U.O.S.D. è possibile studiare i principali biomarcatori (metilazione di MGMT, status mutazionale di IDH1-2, codelezione 1p-19q) rilevati su campioni tumorali chirurgici. L'analisi molecolare è condotta mediante l'utilizzo delle tecniche di MLPA e MS-MLPA per analisi di dose e metilazione dei principali biomarkers genetici.

TEST GENOMICI

per il carcinoma mammario ormonoresponsivo in stadio precoce

Nelle pazienti affette da tumore mammario operato, un trattamento sistemico adiuvante deve essere preso in considerazione in funzione della significativa riduzione del rischio di recidiva e di morte ottenuta con la poli-chemioterapia, con la terapia endocrina e con la terapia biologica, in seguito a una attenta valutazione di precisi fattori prognostici, fattori predittivi di risposta a specifici trattamenti, benefici assoluti attesi e, non ultime, co-morbidità e preferenza delle

	Gene	Assigned biological processes
Proliferation associated Genes	UBE2C	Protein degradation, cell division
	BIRC5	Anti-apoptosis, cell division, cytokinesis, chromosome localization
	DHCR7	Cholesterol biosynthesis
Hormone Receptor associated Genes	STC2	Cell-to-cell communication
	AZGP1	Cell adhesion
	IL6ST	Various signal transduction pathways, cell proliferation, T cell proliferation
	RBBP8	DNA repair
	MGP	Transcriptional regulation

Genes and assigned biological processes

pazienti. Mentre per i tumori HER2-positivi (HER2+) e triplo-negativi, ossia tumori che non esprimono i recettori per gli estrogeni (ER-) e il progesterone (PgR-) e sono HER2-negativi (HER2-), il beneficio della chemioterapia (CT) è evidente e spesso indispensabile, nei tumori ormono-positivi HER2-negativi (ER+/HER2-) il beneficio dell'aggiunta della CT all'ormonoterapia adiuvante è controverso in pazienti (soprattutto giovani, con tumori piccoli e metastasi linfonodali

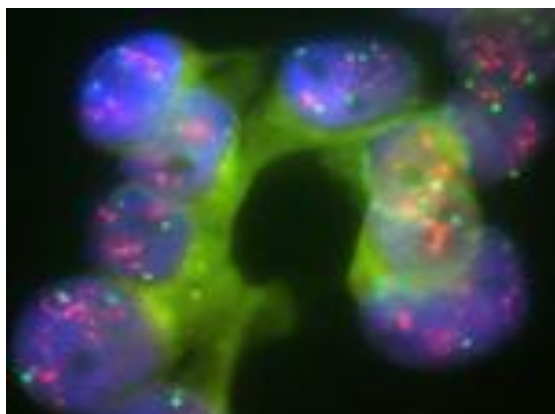
assenti) a non-alto rischio. Per definire con maggiore precisione la prognosi e selezionare il miglior trattamento per la singola paziente sono stati elaborati test multigenici prognostici (TMP), basati sull'analisi dei profili di espressione genica tumorale.

Il test genomico Endopredict® viene eseguito mediante analisi dell'espressione genica su RNA estratto dal tessuto paraffinato (FFPE) proveniente da biopsia tumorale o tessuto tumorale post exeresi chirurgica. EndoPredict® è un test genomico prognostico in grado di valutare la probabilità di recidiva a distanza di pazienti affette da neoplasia mammaria ER+/HER2-. Il test analizza l'attività di 12 geni (8 geni target: BIRC5, UBE2C, DHCR7, RBBP8, IL6ST, AZGP1, MGP and STC2) e 4 geni di controllo (CALM2, OAZ1, RPL37A, HBB) mediante RT-PCR nelle cellule neoplastiche, fornendo uno score genomico prognostico (EP risk score) che predice il tasso di recidiva tumorale a 10 anni considerando 5 anni di trattamento con sola terapia endocrina. Tale score viene combinato con variabili cliniche quali la dimensione del tumore e lo stato linfonodale, individuando uno score finale clinico-genomico (EPclin), variabile da 1.1 a 6.2, in grado di distinguere le pazienti in basso ed alto rischio di recidiva:

- a) EPclin > 3.3287 (più del 10% del rischio di recidiva), interpretato come alto rischio di recidiva
- b) EPclin < 3.3287 (rischio di recidiva inferiore al 10%), interpretato come basso rischio di recidiva

HER-2 E TUMORE MAMMARIO

Her- 2/neu è un oncogene che codifica per una proteina recettore per un particolare fattore di crescita che promuove la progressione del ciclo cellulare. Le cellule epiteliali normali del corpo contengono due copie di questo gene e producono bassi livelli di proteina che si trova inserita nella membrana cellulare. Nel 20-30% dei casi di carcinoma mammario invasivo il gene è amplificato e la proteina di conseguenza over-espressa. I tumori che presentano questa over-espressione hanno la tendenza a crescere in modo più aggressivo rispetto agli altri e resistono alla terapia ormonale e ad alcuni tipi di chemioterapia.



I pazienti positivi a questo test sono candidati per ricevere una terapia specifica e possono essere sottoposti a terapia target con un nuovo farmaco biologico: il Trastuzumab, una sostanza che appartiene alla classe di farmaci antitumorali che prendono il nome di anticorpi monoclonali. Il trastuzumab svolge la sua azione anti-tumorale legandosi alla proteina HER2, impedendo in tal modo al fattore di crescita di raggiungere le cellule neoplastiche e, di conseguenza, impedendone la divisione e la crescita. Il trastuzumab è efficace solo nelle donne con un livello elevato di

proteina HER2, mentre i suoi effetti sono meno evidenti nelle altre pazienti. Il test per lo studio del livello di espressione della proteina HER2 viene eseguito su tessuto tumorale, paraffinato, dopo fissazione su vetrino. Ci sono due modi per effettuare il test:

- testare i livelli di proteina HER2 con metodo immunoistochimico semiquantitativo (HercepTest: score 0, 1+, 2+,3+)
- valutare con la FISH il livello di amplificazione del gene, espresso dal rapporto HER2/CEN17 (sonda di controllo che ibridizza sul centromero del cromosoma 17, lo stesso dove è localizzato il gene Her2).

Nella pratica quotidiana la FISH viene riservata ai casi definiti immunoistochimicamente a positività intermedia (score 2+), essendo questi i soli casi in cui non si è riscontrata una buona correlazione con la risposta clinica.

Questa U.O. rientra nel gruppo **“CONTROLLO DI QUALITA’ INTERREGIONALE PER LA VALUTAZIONE DI HER2 CON METODICHE DI IBRIDAZIONE IN SITU SU CARCINOMA MAMMARIO”** promosso da SIAPEC-IAP.

Per la esecuzione dell’esame è necessario contattare direttamente la U.O. e disporre del blocchetto di inclusione per l’esame istologico (*Impegnativa :FISH n° 1 di sonda molecolare codice 91.37.3*). **Tempo di consegna : 7-10 gg**

PARP INIBITORI

APPLICAZIONE DI RACCOMANDAZIONI DI FARMACOGENETICA PER UTILIZZO DI PARP INIBITORI (OLAPARIB, RUCAPARIB E NIRAPARIB) IN CARCINOMA MAMMELLA TRIPLO NEGATIVO/CARCINOMA OVAIO

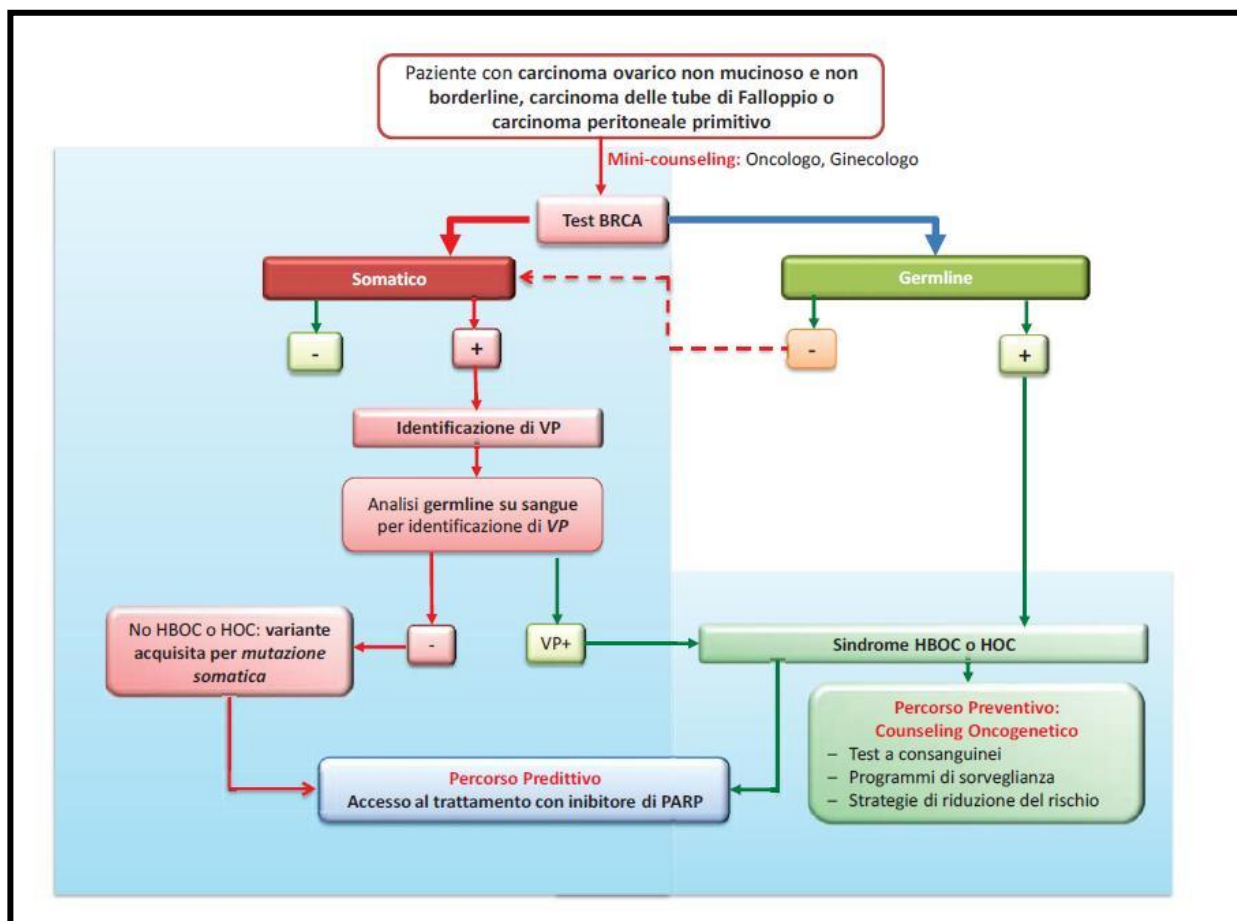
La prevalenza di varianti patogenetiche costituzionali *BRCA* in pazienti affette da carcinoma ovarico è >10%, indipendentemente dall'età alla diagnosi e dalla storia familiare. Circa il 25% delle portatrici di varianti patogenetiche *BRCA*, infatti, ha una diagnosi di carcinoma ovarico ad un'età superiore ai 60 anni. La prevalenza di varianti patogenetiche sale al 17-20% nelle pazienti con carcinoma ovarico sieroso, al 23-25% se di alto grado e al 30-40% se la malattia è platino-sensibile. Tuttavia una parte di pazienti affette da ca ovarico (circa il 7%) presenta mutazioni a carico dei geni *BRCA* solo a livello tumora (mutazione somatica).

Le linee guida attualmente in uso in Italia e le raccomandazioni 2018 dei gruppi di lavoro 2018 AIOM, SIGU, SIBIOC e SIAPEC-IAP (Gennaio 2019) invitano a proporre l'invio al test *BRCA* sin dal momento della prima diagnosi di carcinoma epiteliale ovarico non mucinoso e non borderline, di carcinoma delle tube di Falloppio o di carcinoma peritoneale primitivo. L'Agenzia Italiana del Farmaco (Aifa) ha dato il via libera all'uso nella pratica clinica di Parp-inibitori da utilizzare nel momento in cui si è di fronte a una donna affetta da ca ovarico o mammario triplo negativo, a condizione che alla base ci sia una mutazione dei geni ***BRCA1* o *BRCA2***. Esistono numerose evidenze scientifiche per l'uso di PARP inibitori anche nel carcinoma pancreatico familiare con mutazioni *BRCA2*.

La proposta di esecuzione del test *BRCA* al momento della diagnosi deve avvenire fornendo una adeguata informazione su tutti gli aspetti collegati ai possibili risultati del test e rispettando i tempi decisionali della paziente. È preferibile effettuare in prima istanza la ricerca delle mutazioni di *BRCA1/2* su tessuto tumorale, in quanto il test *BRCA* su sangue periferico è in grado di evidenziare soltanto le varianti costituzionali/ereditarie. La natura della variante identificata (costituzionale o somatica) sarà contestualmente stabilita analizzando un tessuto normale (sangue, altro tessuto). Nel caso di variante acquisita per mutazione somatica, la paziente avrà accesso ad eventuale trattamento con inibitore di PARP. Nel caso di variante costituzionale, oltre alla possibilità di accedere ad eventuale trattamento con inibitore di PARP, la paziente potrà accedere, attraverso il counseling oncogenetico, al percorso preventivo (tramite l'avvio di programmi di sorveglianza clinico-strumentale o l'effettuazione di strategie di riduzione del rischio).

Il test *BRCA* eseguito su tessuto tumorale ("test somatico") è in grado di evidenziare sia le varianti acquisite per mutazione somatica sia quelle costituzionali. Pertanto, in caso di risultato positivo, l'alterazione va ricercata sul sangue periferico per verificare se si tratta di una variante costituzionale. L'analisi somatica consente di identificare una frazione di pazienti affette da carcinoma ovarico con variante patogenetica *BRCA* pari a circa il 7%, che rimarrebbero sconosciute con il solo test su sangue periferico.

Presso questa Unità Operativa è possibile eseguire il test molecolare sul tessuto tumorale fresco o conservato in paraffina ed eventualmente procedere a verifica di stato mutazionale costituzionale su sangue periferico dopo adeguata consulenza genetica post test



Modificato da: Raccomandazioni per l'implementazione del test BRCA nelle pazienti con carcinoma ovarico e nei familiari a rischio elevato di neoplasia (Raccomandazioni 2018 AIOM, SIGU, SIBIOC e SIAPEC-IAP Gennaio 2019)

MUTAZIONI KRAS E NRAS

La superficie delle cellule riceve continui segnali dall'ambiente circostante. Tali segnali sono ritrasmessi (trasduzione) all'interno della cellula da appositi recettori, - molecole presenti sulla membrana cellulare - che reagiscono con altre molecole specifiche presenti all'interno della cellula. Il fattore di crescita epidermico (EGF) è uno di questi segnali e l'EGFR, il recettore per l'EGF, è uno di questi recettori. La proteina K-ras che appartiene alla superfamiglia delle GTPasi, svolge, invece, un ruolo nella trasduzione degli stimoli provenienti dai recettori dei fattori di crescita della superficie cellulare. Nelle cellule tumorali, la proteina KRAS è un mediatore indispensabile alla trasmissione degli stimoli che favoriscono lo sviluppo del tumore, contribuendo ad attivare la proliferazione cellulare, a promuovere la crescita di vasi sanguigni che "alimentano" il tumore (angiogenesi) e a ridurre la morte cellulare programmata della cellula tumorale (apoptosi).

Il **Cetuximab** ed il **Panitumumab** sono degli anticorpi monoclonali diretti contro il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). In presenza di questo farmaco, il segnale di trasduzione scatenato dall'EGFR non si attiva, con conseguente riduzione dello stimolo proliferativo neoplastico. La presenza di mutazioni in punti specifici del gene KRAS ed NRAS sono un fattore predittivo, ormai consolidato, della mancanza di risposta agli anticorpi monoclonali anti-EGFR. Questa informazione svolge un ruolo essenziale nel percorso verso una medicina sempre più personalizzata in base al profilo genetico dei pazienti. Questi farmaci sono oggi, infatti, raccomandati solo per i pazienti con tumore al colon retto metastatico che esprimano l'EGFR e che abbiano il gene KRAS ed NRAS 'wild type', cioè non mutati.

La percentuale dei tumori del colon retto che presentano delle mutazioni nel proto-oncogene KRAS e NRAS sono pari a circa il 30-35%. Tali mutazioni coinvolgono, nel 90% dei casi, gli esoni 2, 3 e 4 dei rispettivi geni e comportano l'attivazione costitutiva delle proteine K-ras ed N-ras indipendentemente dai segnali dell'EGFR. Ne deriva che

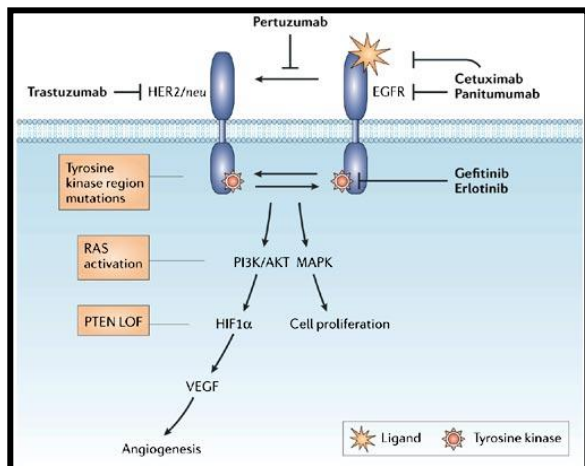
- se il gene KRAS e NRAS sono normali (wild-type), la corrispondente proteina oncogenica non è costitutivamente attiva ed il tumore è **sensibile** ai farmaci anti-EGFR
- se il gene KRAS e NRAS sono mutati, la corrispondente proteina oncogenica è costitutivamente attivata ed il tumore è **insensibile** ai farmaci anti-EGFR.

Per tale ragione, nei pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto, si raccomanda di effettuare la ricerca dello stato mutazionale del gene KRAS e NRAS, sul tessuto tumorale, prima di decidere il trattamento con anti-EGFR. Presso questa Unità Operativa è possibile eseguire il test molecolare sul tessuto tumorale fresco o conservato in paraffina. Per la esecuzione dell'esame è necessario contattare direttamente l'Unità Operativa di Genetica Medica

Esame	Metodica	Impegnative
KRAS/NRAS/BRAF	PCR real time	n. 1 estrazione DNA 91.36.5
Esoni 2,3 e 4	Tempo di consegna: 7-10 gg	n. 7 analisi sequenza DNA
BRAF codone V600		91.30.3

MUTAZIONI EGFR

Il **tumore al polmone** è il tipo di tumore più frequente nei maschi, ed è la prima causa di morte per cancro. Attualmente questa patologia in Italia è in calo nella popolazione maschile e in aumento in quella femminile. I principali fattori di rischio sono il fumo di sigaretta, attivo e passivo



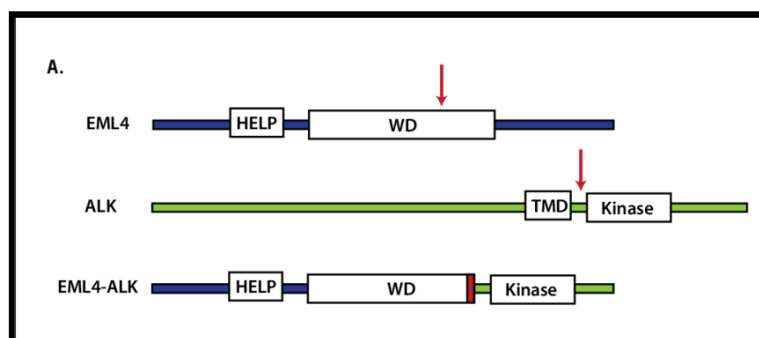
(statisticamente, un fumatore ha 23 volte più probabilità di ammalarsi di un non fumatore), l'esposizione a prodotti industriali, all'inquinamento ambientale, alle radiazioni. Esistono diversi tipi di tumore polmonare e il Carcinoma Non a Piccole Cellule ne rappresenta la forma più comune (80-85% dei casi). Esso comprende 3 diversi istotipi principali:

- Adenocarcinoma (50%)
- Carcinoma Squamocellulare (40%)
- Carcinoma a Grandi Cellule.

Il carcinoma a cellule squamose (il più diffuso negli uomini e circa un terzo dei casi totali), che si sviluppa nelle cellule che rivestono le vie respiratorie; l'adenocarcinoma, più frequente nelle donne, che si sviluppa nelle cellule che secernono il muco e spesso è associato a infiammazioni croniche o fibrosi polmonari; il carcinoma a grandi cellule, che colpisce circa il 15% dei malati; il carcinoma a piccole cellule (microcitoma, circa un quarto dei casi), dalle caratteristiche diverse rispetto agli altri tipi. L'importanza di questa suddivisione istologica è legata al diverso tipo di trattamento, dato che a differenza del microcitoma, il tumore NSCLC mostra una bassa sensibilità alla chemioterapia. Il trattamento di questo tipo di tumore può essere effettuato tramite intervento chirurgico, con l'asportazione del tessuto tumorale, radioterapia, chemioterapia e l'utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare. Diversi studi condotti hanno evidenziato che circa il 10-15% dei pazienti sono portatori nel gene **EGFR** di **mutazioni somatiche attivanti** e che queste ultime se presenti sono correlate ad una maggiore efficacia della terapia con inibitori della tirosinchinasi, quali Gefitinib ed Erlotinib. Queste mutazioni sono del tipo "gain of function", con maggiore attività del recettore. Le mutazioni più comuni sono le delezioni nell'esone 19 e la mutazione L858R nell'esone 21, che insieme costituiscono circa il 90% delle mutazioni identificate. È inoltre riportato, da vari studi clinici, che nella maggior parte dei pazienti che inizialmente rispondono bene alla terapia con EGFR TKI, col tempo si sviluppino meccanismi di **resistenza acquisita** agli stessi farmaci, con conseguente progressione della malattia. Circa il 50% di questi casi di resistenza è dovuta alla presenza della **mutazione T790M**. Il meccanismo principale di resistenza causato dalla mutazione secondaria T790M può essere modulato attraverso farmaci EGFR TKI di terza generazione come l'Osimertinib. Lo status mutazionale del gene EGFR, nel tessuto tumorale, può avere quindi un impatto considerevole nelle decisioni terapeutiche da intraprendere in caso di NSCLC.

Esame	Metodica	Impegnative
EGFR	PCR real time	n. 1 estrazione DNA 91.36.5
Esoni 18,19,20,21	Tempo di consegna: 7-10 gg	n. 7 analisi sequenza DNA 91.30.3

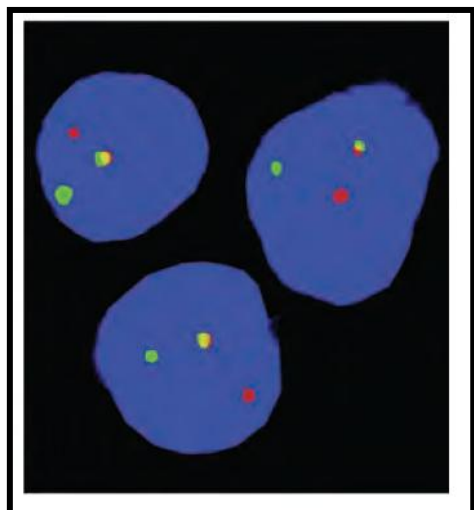
RIARRANGIAMENTI GENE ALK E GENE ROS1



Il riarrangiamento del gene ALK è stato descritto nel 2-5% dei casi di Adenocarcinoma del polmone, nei pazienti più giovani e che non hanno mai fumato o che hanno smesso da molto tempo (>10 anni). Il gene ALK si trova sul braccio corto del cromosoma 2 (2p23) che codifica per un recettore di membrana cellulare appartenente

alla famiglia dei recettori per l'insulina. Le principali mutazioni che riguardano il gene ALK consistono in traslocazioni che coinvolgono diversi geni partner. Tale alterazione è mutualmente esclusiva con altre mutazioni importanti dei geni EGFR e KRAS e il riarrangiamento del gene ROS1.

Il riarrangiamento del gene ROS-1 (c-ros oncogene 1) è stato identificato principalmente negli adenocarcinomi ed è in grado di predire la risposta ai farmaci di nuova generazione. Il gene ROS1 si trova sul braccio lungo del cromosoma 6 in posizione 6q22. Tale gene codifica per un recettore di membrana con un'omologia di sequenza amminoacidica con la proteina ALK del 49%. Il riarrangiamento di ROS1 è stato identificato nel 2% dei casi di Adenocarcinoma del polmone, principalmente, ma non esclusivamente, in pazienti giovani e non fumatori. Tale alterazione è mutualmente esclusiva con la traslocazione del gene ALK e le mutazioni di EGFR e KRAS. Il riarrangiamento di ROS1 può avvenire con diversi geni partner e induce un'incontrollata proliferazione cellulare.



L'identificazione dei riarrangiamenti dei geni ALK e ROS1 è di fondamentale importanza per aiutare l'oncologo nella corretta scelta terapeutica in quanto predice la risposta a farmaci di nuova generazione come il Crizotinib. La tecnica d'elezione per l'analisi di questi riarrangiamenti è la Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) su nuclei interfascici, che può essere effettuata a partire da campioni istologici e citologici fissati in formalina e inclusi in paraffina. Il risultato è da considerarsi positivo quando almeno il 15% dei nuclei analizzati presenta il riarrangiamento del locus genico di ALK o di ROS1 analizzando un minimo di 100 nuclei cellulari del tessuto tumorale.

Presso questa Unità Operativa è possibile eseguire il test molecolare sul tessuto tumorale fresco o conservato in paraffina.

Esame	Metodica	Impegnative
Riarrangiamenti ALK/ROS	Analisi FISH Tempo di consegna: 7-10 gg	<i>FISH n° 2 di sonde molecolari codice 91.37.3</i>

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE DELLA UOSD DI GENETICA MEDICA CENSITE SU PUBMED

- **Priolo M**, Mancini C, Radio FC, Chiriatti L, Ciolfi A, Cappelletti C, Cordeddu V, Pintomalli L, Brusco A, **Mammi C**, Tartaglia M. [Natural history of MRAS-related Noonan syndrome: Evidence of mild adult-onset left ventricular hypertrophy and neuropsychiatric features.](#) Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2023 Jun;193(2):160-166.
- Oliva EN, Candoni A, Salutari P, Palumbo GA, Reda G, Iannì G, Tripepi G, Cuzzola M, Capelli D, **Mammi C**, Alati C, **Cannatà MC**, Niscola P, Serio B, Musto P, Vigna E, Volpe A, Melillo LMA, Arcadi MT, Mannina D, Zannier ME, Latagliata R. [Azacitidine Post-Remission Therapy for Elderly Patients with AML: A Randomized Phase-3 Trial \(QoLESS AZA-AMLE\).](#) Cancers (Basel). 2023 Apr 24;15(9):2441. doi: 10.3390/cancers15092441.
- Leone MP, Morlino S, Nardella G, Pracella R, Giachino D, Celli L, Baldo D, Turolla L, Piccione M, Salzano E, Busè M, Lastella P, Zollino M, Cantone R, Grosso E, Zonta A, Pasini B, Piscopo C, De Maggio I, **Priolo M**, **Mammi C**, Foadelli T, Trabatti C, Savasta S, Iolascon A, Ferraris A, Lodato V, Di Giosaffatte N, Majore S, Selicorni A, Petracca A, Fusco C, Celli M, Guarnieri V, Micale L, Castori M. [Specifications and validation of the ACMG/AMP criteria for clinical interpretation of sequence variants in collagen genes associated with joint hypermobility.](#) Hum Genet. 2023 Jun;142(6):785-808.
- **Priolo M**, Zara E, Radio FC, Ciolfi A, Spadaro F, Bellacchio E, Mancini C, Pantaleoni F, Cordeddu V, Chiriatti L, Niceta M, Africa E, **Mammi C**, Melis D, Coppola S, Tartaglia M. [Clinical profiling of MRD48 and functional characterization of two novel pathogenic RAC1 variants.](#) Eur J Hum Genet. 2023 Jul;31(7):805-814.
- Ferilli M, Ciolfi A, Pedace L, Niceta M, Radio FC, Pizzi S, Miele E, Cappelletti C, Mancini C, Galluccio T, Andreani M, Iascone M, Chiriatti L, Novelli A, Micalizzi A, Matraxia M, Menale L, Faletra F, Prontera P, Pilotta A, Bedeschi MF, Capolino R, Baban A, Seri M, **Mammi C**, Zampino G, Digilio MC, Dallapiccola B, **Priolo M**, Tartaglia M. [Genome-Wide DNA Methylation Profiling Solves Uncertainty in Classifying NSD1 Variants.](#) Genes (Basel). 2022 Nov 19;13(11):2163.
- Alfieri P, Macchiaiolo M, Collotta M, Montanaro FAM, Caciolo C, Cumbo F, Galassi P, Panfili FM, Cortellessa F, Zollino M, Accadia M, Seri M, Tartaglia M, Bartuli A, **Mammi C**, Vicari S, **Priolo M**. [Characterization of Cognitive, Language and Adaptive Profiles of Children and Adolescents with Malan Syndrome.](#) J Clin Med. 2022 Jul 14;11(14):4078
- Macchiaiolo M, Panfili FM, Vecchio D, Gonfiantini MV, Cortellessa F, Caciolo C, Zollino M, Accadia M, Seri M, Chinali M, **Mammi C**, Tartaglia M, Bartuli A, Alfieri P, **Priolo M**. [A deep](#)

[phenotyping experience: up to date in management and diagnosis of Malan syndrome in a single center surveillance report.](#) Orphanet J Rare Dis. 2022 Jun 18;17(1):235.

- **Priolo M**, Mancini C, Pizzi S, Chiriatti L, Radio FC, Cordeddu V, Pintomalli L, **Mammì C**, Dallapiccola B, Tartaglia M. [Complex Presentation of Hao-Fountain Syndrome Solved by Exome Sequencing Highlighting Co-Occurring Genomic Variants.](#) Genes (Basel). 2022 May 16;13(5):889.
- **Priolo M**, Palermo V, Aiello F, Cioffi A, Pannone L, Muto V, Motta M, Mancini C, Radio FC, Niceta M, Leoni C, Pintomalli L, Carrozzo R, Rajola G, **Mammì C**, Zampino G, Martinelli S, Dallapiccola B, Pichierri P, Tartaglia [SHP2's gain-of-function in Werner syndrome causes childhood disease onset likely resulting from negative genetic interaction.](#) M. Clin Genet. 2022 Jul;102(1):12-21
- Perrone B, Ruffo P, Zelasco S, Giordano C, Morelli C, Barone I, Catalano S, Andò S, Sisci D, Tripepi G, **Mammì C**, Bonofiglio D, Conforti FL. [LPL, FNDC5 and PPARγ gene polymorphisms related to body composition parameters and lipid metabolic profile in adolescents from Southern Italy.](#) J Transl Med. 2022 Mar 3;20(1):107
- Oliva EN, Latagliata R, Sabattini E, **Mammì C**, Cuzzola M, **D'Errigo MG**, **Cannatà MC**, **Bova I**, Capodanno I, Palumbo GA, Pane F, Reda G, Fianchi L, Riva M, Poloni A. [Accuracy of bone marrow histochemical TP53 expression compared to the detection of TP53 somatic mutations in patients with myelodysplastic syndromes harbouring a del5q cytogenetic abnormality.](#) Am J Blood Res. 2021 Aug 15;11(4):417-426.
- **Priolo M**, Radio FC, Pizzi S, Pintomalli L, Pantaleoni F, Mancini C, Cordeddu V, Africa E, **Mammì C**, Dallapiccola B, Tartaglia M. [Co-Occurring Heterozygous CNOT3 and SMAD6 Truncating Variants: Unusual Presentation and Refinement of the IDDSADF Phenotype.](#) Genes (Basel). 2021 Jun 30;12(7):1009.
- Bonfanti R, Iafusco D, Rabbone I, Diedenhofen G, Bizzarri C, Patera PI, Reinstadler P, Costantino F, Calcaterra V, Iughetti L, Savastio S, Favia A, Cardella F, Lo Presti D, Girtler Y, Rabbiosi S, D'Annunzio G, Zanfardino A, Piscopo A, Casaburo F, Pintomalli L, Russo L, Grasso V, Minuto N, Mucciolo M, Novelli A, Marucci A, Piccini B, Toni S, Silvestri F, Carrera P, Rigamonti A, Frontino G, Trada M, Tinti D, Delvecchio M, Rapini N, Schiaffini R, **Mammì C**, Barbetti F; Diabetes Study Group of ISPED. [Differences between transient neonatal diabetes mellitus subtypes can guide diagnosis and therapy.](#) Eur J Endocrinol. 2021 Apr;184(4):575-585.
- Mulder PA, van Balkom IDC, Landlust AM, **Priolo M**, Menke LA, Acero IH, Alkuraya FS, Arias P, Bernardini L, Bijlsma EK, Cole T, Coubes C, Dapia I, Davies S, Di Donato N, Elcioglu NH, Fahrner JA, Foster A, González NG, Huber I, Iascone M, Kaiser AS, Kamath A, Kooblall K, Lapunzina P, Liebelt J, Lynch SA, Maas SM, **Mammì C**, Mathijssen IB, McKee S, Mirzaa GM, Montgomery T, Neubauer D, Neumann TE, **Pintomalli L**, Pisanti MA, Plomp AS, Price S, Salter C, Santos-Simarro F, Sarda P, Schanze D, Segovia M, Shaw-Smith C, Smithson S, Suri

- M, Tatton-Brown K, Tenorio J, Thakker RV, Valdez RM, Van Haeringen A, Van Hagen JM, Zenker M, Zollino M, Dunn WW, Piening S, Hennekam RC. Development, behaviour and sensory processing in Marshall-Smith syndrome and Malan syndrome: phenotype comparison in two related syndromes. *J Intellect Disabil Res.* 2020 Dec;64(12):956-969.
- Vincelli ID, Cufari P, Toscano C, Said AS, Campello M, Caruso G, **D'Errigo MG, Bova I, Mammì C**, Ciolli S, Martino M, Oliva B, Garreffa C, Martino B. A patient with chronic lymphocytic Leukemia, chronic Myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood* 2020 November; 136 (supplement1): 37.
 - Salzano G, Passanisi S, **Mammì C, Priolo M, Pintomalli L**, Caminiti L, Messina MF, Pajno GB, Lombardo F. Maturity Onset Diabetes of the Young is Not Necessarily Associated with Autosomal Inheritance: Case Description of a De Novo HFN1A Mutation. *Diabetes Ther.* 2019 May 16.
 - **Priolo M**, Schanze D, Tatton-Brown K, Mulder PA, Tenorio J, Kooblall K, Acero IH, Alkuraya FS, Arias P, Bernardini L, **Mammì C** et al. Further delineation of Malan syndrome. *Hum Mutat.* 2018 Sep;39(9):1226-1237.
 - Martino B, **Mammì C**, Labate C, Rodi S, Ielo D, **Priolo M**, et al. Genetic risk of prediabetes and diabetes development in chronic myeloid leukemia patients treated with nilotinib. *Exp Hematol.* 2017 Nov;55:71-75.
 - Gurrieri F, Cavaliere ML, Wischmeijer A, **Mammì C**, Neri G, Pisanti MA, Rodella G, Laganà C, **Priolo M** NFIX mutations affecting the DNA-binding domain cause a peculiar overgrowth syndrome (Malan syndrome): a new patients series. *Eur J Med Genet.* 2015 Sep;58(9):488-91
 - Passanisi S, Timpanaro T, Lo Presti D, **Mammì C**, Caruso-Nicoletti M. Treatment of transient neonatal diabetes mellitus: insulin pump or insulin glargine? Our experience. *Diabetes Technol Ther.* 2014 Dec; 16(12):880-4.
 - Pinelli M, Acquaviva F, Barbetti F, Caredda E, Cocozza S, Delvecchio M, Mozzillo E, Pirozzi D, Prisco F, Rabbone I, Sacchetti L, Tinto N, Toni S, Zucchini S, Iafusco D. Identification of candidate children for maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY2) gene testing: a seven-item clinical flowchart (7-iF).; **Italian Study Group on Diabetes of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. PLoS One.** 2013 Nov 11;8(11)
 - Morabito F, Hohaus S, **Mammì C**, Marcheselli L, Gentile M, Merli F, Montanini A, Stelitano C, La Sala A, Scalone R, Voso MT, Luminari S, Iannitto E, Gobbi P, Federico M. Role of glutathione-S-transferase (GST) polymorphisms in patients with advanced Hodgkin lymphoma: results from the HD2000 GISL trial. **Leuk Lymphoma.** 2012 Mar;53(3):406-10

- **Priolo M**, Grosso E, **Mammì C**, Labate C, Naretto VG, Vacalebri C, Caridi P, Laganà C. A peculiar mutation in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX causes Sotos-like overgrowth syndrome: a new case. **Gene**. **2012** Dec 10;511(1):103-5.
- Iafusco D, Massa O, Pasquino B, Colombo C, Iughetti L, Bizzarri C, **Mammì C**, Lo Presti D, Suprani T, Schiaffini R, Nichols CG, Russo L, Grasso V, Meschi F, Bonfanti R, Brescianini S, Barbetti F Minimal incidence of neonatal/infancy onset diabetes in Italy is 1:90,000 live births.; Early Diabetes Study Group of ISPED. **Acta Diabetol**. **2012** Oct; 49(5):405-8
- Fama A, Rago A, Gioiosa F, Marzano C, Latagliata R, **Mammì C**, Laganà C, D'Elia GM, Bizzoni L, Trasarti S, Ferretti A, Breccia M, Riggio O, Tafuri A. Budd-Chiari syndrome and splanchnic vein thrombosis: masked myeloproliferative neoplasms and JAK2V617F. **Clin Ter**. **2010**;161(2):169-71

Capitoli di libri Internazionali

- “Neonatal Diabetes Mellitus: an introduction”. Fabrizio Barbetti, **Corrado Mammì**, Ming Liu, Valeria Grasso, Peter Arvan, Maria Remedi, Colin Nichols. In ‘Diabetes associated with single gene defects and chromosomal abnormalities’. A volume in the series ‘**Frontiers in Diabetes**’, **2017**
- Malan Syndrome. **Priolo M**, Zenker M, Hennekam RC. in “Overgrowth Syndromes” a clinical Guide. Oxford University Press **2019**. p 153-162.