



Società Italiana di Genetica Umana
Italian Society of Human Genetics

DOCUMENTO DI BUONA PRATICA PER LA DIAGNOSI CITOGENETICA E CITOGENOMICA COSTITUZIONALE

Redatto da: Gruppo di lavoro SIGU di Citogenetica e Citogenomica

Coordinatori: Laura Bernardini e Francesca Romana Grati

Estensori: Paola Battaglia, Anna Capalbo, Laura Cardarelli, Simona Cavani, Rita Genesio, Michela Malacarne, Francesca Malvestiti, Antonio Novelli, Maria Carla Pittalis, Maria Paola Recalcati, Sabine Stioui

Con la partecipazione di: Rita Calzone e Nicola Beltrami

Questo documento è dedicato alla memoria di Lucia Ballarati, socia SIGU e partecipante all'attività del gruppo di lavoro in citogenetica, prematuramente scomparsa nel corso dell'anno 2013

Indice

1.	Premessa	6
2.	Scopo del documento	6
3.	Metodi e fasi di sviluppo	6
4.	Criteri di costituzione del tavolo di lavoro	7
5.	Generalità	7
6.	Il laboratorio di Citogenetica e Citogenomica	8
7.	Indicazioni cliniche all'analisi citogenetica e citogenomica costituzionale	9
7.1.	Ambito prenatale	9
7.1.1.	Analisi cromosomica	9
7.1.2.	Analisi FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)	10
7.1.2.1.	FISH interfascia	10
7.1.2.2.	FISH su metafasi	10
7.1.2.3.	Multiplex-FISH (M-FISH) e Spectral Karyotyping (SKY)	11
7.1.3.	Analisi QF-PCR	11
7.1.4.	Analisi disomia uniparentale (UPD)	11
7.1.5.	Analisi mediante Microarray Cromosomico (CMA)	11
7.2.	Ambito postnatale	12

Approvato dal CD:

17.03.2023

Data Pubblicazione:

06/09/2023

Documento di buona pratica per la diagnosi
Citogenetica e Citogenomica costituzionale

Rev. 1

Pagina 1 / 76



7.2.1.	Analisi cromosomica	12
7.2.2.	Analisi FISH	13
7.2.2.1.	FISH interfascica	13
7.2.2.2.	FISH su metafasi	13
7.2.2.3.	Multiplex-FISH (M-FISH) e Spectral Karyotyping (SKY)	13
7.2.3.	Analisi QF-PCR	13
7.2.4.	Analisi UPD	14
7.2.5.	Analisi mediante Microarray Cromosomico (CMA)	14
8.	Analisi cromosomica costituzionale	15
8.1.	Aspetti generali	15
8.1.1.	Colture cellulari	15
8.1.2.	Bandeggio cromosomico	15
8.1.3.	Analisi dei cromosomi	17
8.2.	Diagnosi prenatale (DP)	17
8.2.1.	Cariotipo su villi coriali	17
8.2.1.1.	Metodi “diretto” e “coltura”	17
8.2.1.2.	Combinazione dei metodi “diretto” e “coltura”	18
8.2.1.3.	Singolo metodo o QF-PCR + coltura	19
8.2.2.	Cariotipo su cellule del liquido amniotico	19
8.2.2.1.	Metodi “in fiasca” e “in situ”	19
8.2.3.	Cariotipo su linfociti fetali	20
8.2.4.	Mosaicismo in diagnosi prenatale	20
8.2.4.1.	Mosaicismo nei villi coriali	21
8.2.4.2.	Mosaicismo nel liquido amniotico	21
8.2.4.3.	Pseudomosaicismo	22
8.2.4.4.	Approfondimenti per la classificazione di un mosaicismo in diagnosi prenatale	22
8.2.4.4.1.	Colture di sangue fetale	23
8.2.4.5.	Approfondimenti per sospetto mosaicismo in diagnosi prenatale	23
8.2.5.	Contaminazione con cellule materne (CCM)	24
8.2.5.1.	Liquido amniotico	25
8.2.5.2.	Villi coriali	25



8.2.5.3.	Sangue fetale	25
8.2.6.	Tetraploidia in diagnosi prenatale	25
8.3.	Diagnosi postnatale	25
8.3.1.	Cariotipo su sangue periferico	25
8.3.2.	Cariotipo su colture di fibroblasti, biopsia cutanea e biopsia gonadica	26
8.3.3.	Cariotipo su materiale abortivo	26
8.3.4.	Mosaicismo in diagnosi postnatale	26
8.4.	Sindromi mendeliane con instabilità cromosomica	28
8.4.1.	Anemia di Fanconi (FA)(OMIM: 227645, 227646, 227650, 300514, 600901, 603467, 609053, 609054, 610832, 613390, 613951, 614082, 614083, 615272, 616435, 617243, 617244, 617247, 617883)	30
8.4.2.	Sindrome di Bloom (BS) (OMIM: 210900)	30
8.4.3.	Atassia-telangiectasia (AT) (OMIM: 208900)	31
8.4.4.	Sindrome di Nijmegen (NBS) (OMIM: 251260)	31
8.4.5.	Sindrome di Werner (WS) (OMIM: 277700)	32
8.4.6.	Sindrome da Instabilità Centromerica e Anomalie Facciali (ICF) (OMIM: 242860)	32
8.4.7.	Sindrome di Roberts (RS) (OMIM: 268300)	32
8.4.8.	Sindrome da Aneuploidia variegata a mosaico (MVA) (OMIM: 257300)	33
8.5.	Disomia uniparentale (UPD)	33
8.5.1.	Tecniche di analisi in pre- e post-natale	34
8.6.	Ibridazione In Situ Fluorescente (FISH)	34
8.6.1.	FISH interfascica	36
8.6.1.1.	FISH interfascica per l'analisi rapida delle aneuploidie 13, 18, 21, X, Y in diagnosi prenatale	37
8.6.1.1.1.	Lettura e interpretazione dei risultati	37
8.6.2.	FISH su metafasi	38
8.6.3.	Caratterizzazione di marcatori cromosomici	38
9.	QF-PCR (Quantitative Fluorescent-PCR) in diagnosi prenatale	39
9.1.	Caratteristiche del campione	39
9.2.	Interpretazione dei risultati	40
9.2.1.	Campione disomico, aneuploide o triploide	40
9.2.2.	Campione a mosaico	40
9.2.3.	Campione con aneusomia segmentale	41



9.2.4.	Contaminazione materna	41
9.2.4.1.	Campioni ematici di liquido amniotico	41
9.2.4.2.	Campioni di villi coriali	42
9.2.4.3.	Campioni di materiale abortivo	42
9.2.5.	Zigosità	42
10.	Analisi mediante Microarray Cromosomico (CMA)	43
10.1.	Procedure	44
10.2.	Risoluzione	44
10.2.1.	DNA di Riferimento	45
10.2.2.	Accettazione campioni	45
10.2.3.	Fase analitica	45
10.3.	Interpretazione dei risultati	46
10.3.1.	CNV Patogenetiche	47
10.3.2.	CNV Probabilmente patogenetiche	47
10.3.3.	CNV a Significato incerto	47
10.3.4.	CNV Probabilmente benigne	48
10.3.5.	CNV Benigne	48
10.4.	Rivalutazione delle VOUS nel tempo	48
10.5.	Validazione delle CNV	48
11.	Refertazione	49
11.1.	Analisi del cariotipo	50
11.1.1.	Segnalazione dei mosaicismi	51
11.2.	Analisi FISH	52
11.2.1.	Analisi effettuate tramite QF-PCR	52
11.2.2.	Analisi delle aneuploidie	52
11.2.3.	Esclusione di contaminazione materna	52
11.2.4.	Zigosità	53
11.3.	Analisi UPD	53
11.4.	Analisi mediante Microarray Cromosomico (CMA)	53
11.4.1.	Regioni di omozigosità	54



11.4.2.	CNV clinicamente rilevanti ma non associate all'indicazione all'analisi: CNV inattese (incidental/secondary findings)	55
11.4.3.	CNV associate a patologie recessive	55
11.4.4.	Particolarità della refertazione CMA in diagnosi prenatale	56
11.5.	Referto preliminare	56
11.6.	Tempi di refertazione	57
12.	Conservazione del materiale documentale, dei dati e dei campioni	58
13.	Siti web utili	59
14.	Bibliografia	60
15.	Conflitto d'interessi	64
16.	Appendice con allegati	65
16.1.	Flowchart degli approfondimenti in relazione al tipo di indagine invasiva e loro esito	65
16.2.	Livelli di bandeggio	66
16.3.	Scale di quantità (5-50mg) di villi coriali a diversi livelli di frammentazione	67
16.4.	Esclusione di mosaicismo cromosomico in diagnosi postnatale	68
16.5.	Esclusione di mosaicismo cromosomico in diagnosi prenatale	69
16.6.	Tabella di probabilità per esclusione di mosaicismo	71
16.7.	Varianti Eucromatiche	72
16.8.	Modifiche sostanziali del presente documento rispetto alla versione precedente	75



1. Premessa

La prima edizione delle Linee Guida per la Diagnostica Citogenetica è stata redatta dall'Associazione Italiana di Citogenetica Medica (AICM) nel 1995, una seconda edizione (Consensus) dalla Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) nel 2007 ed una terza nel 2013, in associazione con la pubblicazione di Note Operative, redatta dal Gruppo di Lavoro di Citogenetica e Citogenomica SIGU, con lo scopo di fornire ai Laboratori di Citogenetica un riferimento per l'esecuzione delle indagini riportando i criteri minimi di analisi.

A 9 anni dalla pubblicazione si è reso necessario un aggiornamento dei documenti di riferimento, nonché un allineamento con i documenti SIGU pubblicati in questi anni. Per una maggior fruibilità, questa versione accorpa i 2 precedenti documenti e viene denominata "Buona Pratica" in quanto non rientra nella definizione di "Linea Guida" secondo la recente revisione dei criteri stabiliti in seguito alla riorganizzazione del Sistema Nazionale per le Linee Guida.

Questa revisione è stata realizzata da un sottogruppo di membri del GdL, partendo dal lavoro originale del 2013. Come la precedente edizione fa riferimento ai documenti internazionali elencati nella bibliografia.

2. Scopo del documento

Lo scopo di questo documento di indirizzo è quello di fornire delle indicazioni tecnico-scientifiche di buona pratica di laboratorio per la diagnosi Citogenetica e Citogenomica in ambito costituzionale. Si è posta particolare attenzione ai recenti avanzamenti riguardanti l'analisi e l'interpretazione dei dati di microarray e si sono dettagliati i criteri di analisi a fronte di un sospetto mosaicismismo cromosomico, anche in riferimento alla recente introduzione del test prenatale non invasivo basato sull'analisi di frammenti di DNA fetale circolanti nel sangue materno (NIPT). Per le revisioni sostanziali rispetto alla precedente versione si faccia riferimento all'Allegato 16.8.

In questo documento l'uso di "deve" indica un requisito obbligatorio; "dovrebbe" indica una forte raccomandazione; "si raccomanda" indica una raccomandazione; "è possibile", "è accettabile", "è opportuno" sono utilizzati quando sono possibili più approcci e tutti risultano adeguati; "non è possibile" è utilizzato dove potrebbe risultare compromessa la qualità del servizio.

Per quanto riguarda le raccomandazioni sulla diagnostica citogenetica in campo oncoematologico si deve fare riferimento ai documenti quali *"European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematologic neoplasm"* e *"Guidance for reporting the interpretation of cytogenomic test results in haematological neoplasms"*.

3. Metodi e fasi di sviluppo

Questo documento è stato preparato da un gruppo di specialisti in Genetica Medica esperti in analisi Citogenetica e Citogenomica in ambito costituzionale. Ogni sezione è stata sviluppata e aggiornata, a partire dai due documenti precedenti, da un sottogruppo. Tutti gli autori hanno poi espresso la loro opinione su ogni sezione e il testo è stato adattato alla luce delle risposte. Questo processo è stato ripetuto più volte fino a quando non è stato raggiunto un consenso, anche avvalendosi di una revisione e confronto coi documenti internazionali



e con versioni precedenti del documento. La bozza del documento è stata presentata a tutti i soci nel corso della riunione del GdL del 4 marzo 2022 al fine di condividere i contenuti e raccogliere opinioni riguardanti i punti controversi rimasti aperti. In conclusione, tutti i membri del gruppo hanno revisionato e approvato all'unanimità il documento.

4. Criteri di costituzione del tavolo di lavoro

Gli esperti sono stati selezionati in base a specifiche competenze in relazione ai temi trattati ed esperienza pluriennale nei vari ambiti diagnostici della Citogenetica e Citogenomica, dopo richiesta a tutti i membri del GdL.

Ad ogni esperto è stata chiesta una dichiarazione di eventuali conflitti di interesse o rapporti anche di finanziamento con soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario. Tali dichiarazioni sono presenti in calce al documento (Capitolo 15).

5. Generalità

I Laboratori di Genetica Medica (LGM) sono le strutture specialistiche competenti nell'esecuzione di test genetici. I LGM possono essere declinati in Laboratori di Citogenetica e Citogenomica, Genetica Molecolare, Genetica Biochimica, Immunogenetica, Genetica Oncologica, Genetica Forense o Farmacogenetica.

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

Il Laboratorio di Citogenetica e Citogenomica (LCC), di seguito denominato 'Laboratorio', esegue analisi per determinare il corredo cromosomico individuale, evidenziando eventuali variazioni del numero e della struttura dei cromosomi o variazioni di numero di copie di regioni cromosomiche.

Come per tutti i test genetici la consulenza genetica è parte integrante delle prestazioni erogate dal Laboratorio. Quest'ultimo deve fornire una nota informativa specifica che illustri le caratteristiche ed i limiti del test, i tempi di refertazione, nonché i criteri e le tempistiche adottati per la conservazione di eventuale materiale biologico residuo dopo l'emissione del referto ed eseguire i test solo dopo aver verificato che sia stato ottenuto il consenso in forma scritta. Nei casi in cui nel corso dell'indagine citogenetica si ritenga necessario eseguire approfondimenti diagnostici, non preventivati, per poter giungere ad una diagnosi (es.: FISH per caratterizzazione riarrangiamento cromosomico o mosaicismo, microarray, UPD), il clinico referente deve essere informato sulla loro motivazione e sul possibile ritardo sui tempi di refertazione. Inoltre, va verificato che il paziente abbia sottoscritto il consenso informato inerente all'approfondimento necessario.

È auspicabile che il Laboratorio avvii strette collaborazioni con Strutture di Genetica Clinica, stabilendo procedure condivise per la gestione dei test e dei percorsi diagnostici.



Per garantire una presa in carico completa della richiesta, il Laboratorio, qualora non eseguisse internamente le prestazioni per il completamento dell'iter diagnostico, deve prevedere collaborazioni con altri LGM.

6. Il laboratorio di Citogenetica e Citogenomica

Il Laboratorio deve pianificare le proprie attività in linea con quanto previsto da un Sistema di Gestione per la Qualità, in modo tale da garantire il controllo ed il monitoraggio dei processi primari e di supporto. Il documento SIGU *“Standard SIGUCERT: Sistema di Gestione per la Qualità nei Laboratori di Genetica Medica”* fornisce gli elementi essenziali riguardo i requisiti relativi alle risorse umane e strutturali e indica dettagliatamente i requisiti della fase pre-analitica, analitica e post-analitica, il cui soddisfacimento permette di assicurare la qualità dei test erogati.

Nella pianificazione dei propri processi, il Laboratorio deve definire, attraverso una valutazione dei rischi, quali siano quelli che possono influenzare la qualità delle prestazioni erogate e mettere in atto le azioni per mitigarli. La valutazione dei rischi è specifica di ogni Organizzazione ma, a titolo di esempio, si raccomanda di mettere in atto tutte le azioni per ottimizzare la corretta identificazione del campione, in ognuna delle differenti fasi del processo diagnostico, nell'ottica di ridurre al minimo il rischio di scambio di campioni.

Il Laboratorio deve inoltre prevedere la definizione della gestione sia dei processi di supporto, sia dei processi inerenti alle attività prettamente operative. A titolo di esempio il Laboratorio deve:

- definire le risorse necessarie all'espletamento ottimale dell'attività:
 - Personale (competenze, formazione)
 - Infrastruttura
 - Ambiente lavorativo
- stilare i documenti necessari allo svolgimento delle attività (Procedure, Istruzioni Operative specifiche per ciascun tipo di test, moduli di registrazione, etc.), con particolare attenzione alla definizione dei criteri di accettabilità/idoneità, all'identificazione ed alla tracciabilità dei campioni;
- definire la gestione delle Non Conformità (NC) e delle Azioni Correttive (AC);
- fornire informazioni precise circa le caratteristiche del prelievo e le modalità di conservazione e trasporto del materiale biologico.

In casi particolarmente urgenti e/o con difficoltà di prelievo è possibile valutare la processabilità di un campione non conforme, segnalando la possibilità di fallimento analitico.

Lo Standard SIGUCERT, al quale si rimanda per quanto riguarda i dettagli, fornisce quindi ai LGM gli strumenti per implementare un Sistema di Gestione per la Qualità specifico per la disciplina di Genetica.

Il monitoraggio costante delle attività deve avvenire attraverso la costruzione di un cruscotto di indicatori specifici.

L'attuale versione del documento *“Indicatori SIGUCERT Laboratori di Genetica Medica”* si basa su documenti di riferimento prodotti dalla SIGU e da società scientifiche internazionali e su informazioni ottenute a seguito della somministrazione di un apposito questionario ai Laboratori certificati SIGUCERT, che ha permesso una validazione dei target proposti. Il documento presenta nel capitolo relativo agli indicatori per il LCC, degli



indicatori specifici per il monitoraggio costante della qualità delle prestazioni erogate. Questi indicatori riguardano i seguenti ambiti:

- Area carichi di lavoro
- Livelli minimi di attività
- Controlli di qualità interni ed esterni
- Refertazione (formato e contenuto, specifiche del test e descrizione del risultato)
- Tempistica di refertazione
- Non conformità
- Contaminazione materna
- Fallimenti (sono riportati per tipologia di materiale gli indicatori/target di conformità)
- Analisi inferiori allo standard rispetto al livello di risoluzione e al numero di metafasi da analizzare (sono riportati per tipologia di materiale gli indicatori/target di conformità)

La definizione dei parametri secondo cui dovrebbero essere eseguite le analisi è invece oggetto del presente documento.

7. Indicazioni cliniche all'analisi citogenetica e citogenomica costituzionale

Per rispondere agli specifici quesiti diagnostici che portano alla richiesta di un test genetico, è necessario che vengano fornite le relative informazioni cliniche al laboratorio che esegue l'analisi. La correttezza delle informazioni riportate nelle indicazioni all'analisi è infatti essenziale per poter scegliere il percorso analitico più idoneo, per poter inquadrare correttamente i risultati e/o valutare la necessità di eventuali approfondimenti.

Al momento della stesura del presente documento, la letteratura riporta evidenze a supporto dell'utilizzo dell'esoma clinico come analisi di secondo livello a seguito di risultati normali di cariotipo e/o microarray. Inoltre, iniziano ad emergere evidenze circa l'utilizzo di tecniche genomiche per la valutazione delle *Copy Number Variants* (CNV) (microdelezioni/microduplicazioni).

Nel presente capitolo si riportano le indicazioni alle analisi citogenetiche in ambito prenatale e postnatale. Si precisa che per alcune indicazioni sono disponibili anche tecniche molecolari alternative (es.: MLPA, *real time PCR*).

7.1. Ambito prenatale

Si faccia riferimento alla Tabella in appendice (Allegato 16.1) per la *flowchart* degli approfondimenti da eseguire in relazione al tipo di indagine invasiva ed al suo esito.

7.1.1. Analisi cromosomica

L'analisi cromosomica prenatale può essere eseguita su villi coriali, liquido amniotico e sangue fetale durante tutto l'arco della gravidanza. La scelta del tessuto da indagare è condizionata dal periodo di gravidanza, dall'indicazione clinica e dallo specifico rischio riproduttivo. È indicata nelle gravidanze che presentano un aumento del rischio di anomalie cromosomiche nel feto rispetto alla popolazione generale. In particolare:



- età materna ≥ 35 anni;
- precedente prole con anomalia cromosomica;
- genitore portatore di un'anomalia cromosomica omogenea o a mosaico;
- anomalie fetali e/o segni predittivi evidenziati ecograficamente;
- screening prenatale (biochimico con o senza translucenza nucale) a rischio aumentato per patologia cromosomica nel feto;
- NIPT con risultato ad alto rischio, risultato inconclusivo o sesso discordante con l'ecografia;
- rischio di malattie mendeliane da instabilità cromosomica;
- anomalia a mosaico riscontrata in diagnosi prenatale su altro tessuto (es.: villi coriali);

Altre situazioni particolari devono essere valutate singolarmente con una consulenza genetica/multidisciplinare, che prenda in esame i rischi genetici del caso in oggetto e i rischi connessi con il prelievo delle cellule fetali, ad esempio, nel caso di gravidanze ottenute dopo trasferimento di embrione a mosaico alla PGT-A (ESHRE Working Group on Chromosomal Mosaicism et al., 2022).

Per i casi di NIPT ad alto rischio, in linea generale, il tessuto di elezione per le conferme è il liquido amniotico, salvo alcune situazioni specifiche riportate nel documento dedicato (*"Conferma diagnostica dopo NIPT con risultato ad alto rischio, non informativo o sesso discordante"*, 2020). Analogamente, nei casi di PGT-A a mosaico su trofoectoderma il tessuto di elezione per l'analisi citogenetica è il liquido amniotico.

Qualora si necessiti di una risposta rapida riguardante la presenza o meno di una delle aneuploidie più frequenti (cromosomi 13, 18, 21, X e Y), all'analisi cromosomica su liquido amniotico può essere associata l'analisi mediante FISH interfascica o l'analisi QF-PCR (vedi paragrafi specifici). Tali analisi non costituiscono un'alternativa al cariotipo.

7.1.2. Analisi FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

7.1.2.1. FISH interfascica

È indicata per:

- identificazione/esclusione rapida di aneuploidie;
- identificazione/conferma di mosaicismi;
- identificazione rapida di delezioni e duplicazioni, anche submicroscopiche.

7.1.2.2. FISH su metafasi

È indicata per:

- caratterizzazione di marcatori cromosomici;
- identificazione e/o caratterizzazione di riarrangiamenti cromosomici bilanciati e/o sbilanciati;
- identificazione di microdelezioni/microduplicazioni di specifiche regioni cromosomiche associate a quadri sindromici noti;
- identificazione/conferma di mosaicismi.



7.1.2.3. Multiplex-FISH (M-FISH) e Spectral Karyotyping (SKY)

È indicata per la caratterizzazione, con un singolo esperimento di FISH *multi-probe*, dei marcatori cromosomici, delle traslocazioni e dei riarrangiamenti cromosomici complessi.

7.1.3. Analisi QF-PCR

È indicata per:

- identificazione/esclusione rapida di aneuploidie omogenee dei cromosomi 13, 18, 21, X e Y nella diagnosi prenatale su liquido amniotico e villi coriali;
- identificazione/esclusione di contaminazione materna.

7.1.4. Analisi disomia uniparentale (UPD)

La ricerca prenatale di UPD è indicata in presenza di un aumento del rischio di patologia da *imprinting*, in particolare nei seguenti casi:

- marcatore cromosomico senza apparente materiale eucromatico derivato dai cromosomi associati a patologia da *imprinting* (6, 7, 11, 14, 15, 20);
- traslocazione robertsoniana bilanciata o isocromosoma coinvolgenti i cromosomi 14 e/o 15 (sia familiare che *de novo*);
- riarrangiamento cromosomico coinvolgente i cromosomi 6, 7, 11, 14, 15 e 20;
- cariotipo normale, qualora il genitore sia portatore di una traslocazione robertsoniana bilanciata coinvolgente i cromosomi 14 e/o 15 o di un riarrangiamento strutturale coinvolgente i cromosomi 6, 7, 11, 14, 15 e 20;
- mosaicismo per aneuploidia dei cromosomi 6, 7, 11, 14, 15 e 20 in liquido amniotico (di livello II o III) o villi coriali (di tipo I su metodo diretto, II, III);
- anomalie ecografiche compatibili con patologie dell'*imprinting*;
- NIPT ad alto rischio per trisomie dei cromosomi 6, 7, 11, 14, 15 e 20 non confermate sul liquido amniotico;
- NIPT ad alto rischio per duplicazioni di regioni cromosomiche ($\geq 7-10$ Mb), in particolare se pericentromeriche, che portano geni *imprinted*, non confermate su liquido amniotico (possibile presenza di marcatore cromosomico nel citotrofoblasto);
- cariotipo normale su liquido amniotico, dopo trasferimento di embrione con sospetto mosaico per aneuploidie dei cromosomi 6, 7, 11, 14, 15 e 20, rilevato alla PGT-A.

Il tessuto di elezione per la ricerca di UPD in diagnosi prenatale è il liquido amniotico, tranne i casi con anomalie strutturali omogenee.

7.1.5. Analisi mediante Microarray Cromosomico (CMA)

È indicata per:

- anomalie ecografiche, inclusa IUGR e translucenza nucale $\geq 3,5$ mm;



- riarrangiamenti cromosomici *de novo*;
- caratterizzazione di marcatori cromosomici;
- sospetta disomia uniparentale (SNP-array eseguito su trio familiare)
- NIPT con risultato ad alto rischio per aneusomia segmentale e/o microdelezioni/ microduplicazioni con punti di rottura ricorrenti;
- familiarità per riarrangiamenti cromosomici criptici;
- precedente gravidanza con variazione/i di numero di copie (CNV) patogenetica/che o probabilmente patogenetica/che. In questi casi valutare anche la possibilità di indagare la presenza della CNV con altre tecniche di genetica e citogenetica molecolare *targeted* alternative alla CMA (es.: qPCR, MLPA, FISH);

Altre situazioni particolari devono essere valutate singolarmente prendendo in esame i rischi genetici del caso in oggetto ed i rischi connessi con il prelievo delle cellule fetali. Nel caso di CNV familiare a penetranza ridotta ed espressività variabile, valutare attentamente con la gestante in consulenza pre-test l'opportunità di procedere con l'analisi, vista l'imprevedibilità del fenotipo postnatale nel caso il feto abbia ereditato la CNV.

7.2. Ambito postnatale

7.2.1. Analisi cromosomica

L'analisi cromosomica postnatale comprende le indagini del cariotipo eseguite su sangue periferico, biopsia cutanea, biopsia gonadica, materiale abortivo (villo coriale, sacco, funicolo, cute, etc.).

È indicata in caso di:

- fenotipo riconducibile ad una sindrome/patologia cromosomica;
- ritardo di accrescimento;
- sospetto di sindrome da instabilità cromosomica;
- sospetto mosaicismo cromosomico;
- conferma postnatale di NIPT positivo (non indagato su tessuti fetali);
- madri con anomalia identificata dal NIPT non confermata nel feto (es: aneusomie cromosoma X);
- genitali ambigui (incluso NIPT con sesso discordante dal dato ecografico);
- caratterizzazione di riarrangiamenti cromosomici identificati mediante CMA;
- genitori o familiari di un individuo/feto con anomalie cromosomiche;
- genitori di soggetti malformati o con sospetta sindrome cromosomica, deceduti senza diagnosi;
- coppie con poliabortività (due o più aborti spontanei);
- coppie con infertilità;
- femmine con amenorrea primaria, secondaria o menopausa precoce;
- femmine con malattie recessive legate all'X;
- soggetti con variazione nella pigmentazione cutanea;
- embrione/feto malformato e/o aborto spontaneo ripetuto;
- neonato nato morto o deceduto in epoca perinatale.

Generalmente l'analisi cromosomica postnatale si esegue su sangue periferico, tuttavia può essere indicata



l'indagine su biopsia di cute in caso di:

- verifica di una condizione di mosaico riscontrata su altro tessuto (es.: sangue periferico);
- sospetto clinico di mosaicismo o diagnosi di specifiche condizioni nelle quali l'anomalia cromosomica non è riscontrabile su sangue periferico (es.: Sindrome di Pallister-Killian);
- aplasia midollare, trapianto di midollo o altre condizioni che non consentono l'utilizzo del sangue periferico;
- perimortalità.

L'analisi cromosomica su biopsia gonadica può essere indicata in caso di:

- pazienti con Disordini della Differenziazione Sessuale (DSD), un insieme di condizioni cliniche congenite in cui non c'è concordanza tra sesso cromosomico e sesso fenotipico;
- coppie con cariotipo normale e ricorrenza della stessa anomalia cromosomica nella prole.

7.2.2. Analisi FISH

7.2.2.1. FISH interfascica

È indicata nei casi di:

- ricerca/conferma rapida di delezioni e duplicazioni anche submicroscopiche;
- identificazione/conferma di mosaicismi.

7.2.2.2. FISH su metafasi

È indicata nei casi di:

- identificazione/caratterizzazione di marcatori cromosomici ;
- identificazione/caratterizzazione di riarrangiamenti cromosomici (incluse traslocazioni criptiche);
- identificazione/caratterizzazione/conferma di microdelezioni/microduplicazioni;
- identificazione/conferma di mosaicismi.
- piccolo cromosoma derivativo del cromosoma X per verificare la presenza/assenza di Xist.

7.2.2.3. Multiplex-FISH (M-FISH) e Spectral Karyotyping (SKY)

È indicata per la caratterizzazione, con un singolo esperimento di FISH *multi-probe*, dei marcatori cromosomici, delle traslocazioni e dei riarrangiamenti cromosomici complessi.

7.2.3. Analisi QF-PCR

È indicata per:

- identificazione/esclusione delle aneuploidie omogenee dei cromosomi 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y nei prodotti abortivi;



7.2.4. Analisi UPD

È indicata nei casi di:

- soggetti con fenotipo anomalo e portatori di marcatori cromosomici, apparentemente privi di materiale eucromatico, derivati dai cromosomi 6, 7, 11, 14, 15 o 20;
- soggetti con fenotipo anomalo e portatori di riarrangiamenti cromosomici (*de novo* o familiari) coinvolgenti i cromosomi 6, 7, 11, 14, 15 o 20;
- soggetti con sospetto clinico di Sindrome di Prader-Willi o Angelman nei quali è stata esclusa la delezione coinvolgente la regione critica;
- soggetti con sospetto clinico di Sindrome di Silver-Russel o di Beckwith-Wiedemann;
- neonati affetti da diabete mellito neonatale;
- soggetti con caratteristiche cliniche suggestive di Sindrome di Temple o Sindrome di Kagami-Ogata;
- soggetti con sospetto clinico di Sindrome di Mulchandani-Bhoj-Coulin;
- soggetti con sospetto clinico di Pseudoipoparatiroidismo.
- soggetti omozigoti per una malattia autosomica recessiva con un solo genitore eterozigote per la mutazione;
- femmine omozigoti per una patologia X-linked recessiva o i soggetti con trasmissione padre-figlio di una patologia X-linked;
- soggetti con regioni di omozigosità estese (> 10 Mb se interstiziali e >6 Mb se terminali) identificate mediante SNP-array su cromosomi soggetti ad *imprinting*.

7.2.5. Analisi mediante Microarray Cromosomico (CMA)

In linea generale si raccomanda di procedere con l'analisi tramite CMA, come test genetico di prima scelta, in presenza delle seguenti condizioni (isolate o in associazione tra loro):

- disabilità intellettiva;
- disturbi dello spettro autistico;
- epilessia;
- ipotonia muscolare;
- anomalie della crescita, sia in eccesso che in difetto, inclusa macrocefalia o microcefalia;
- una (o più) malformazione/i maggiore/i;
- anomalie fenotipiche minori, soprattutto a carico delle strutture cranio-facciali, delle mani e dei piedi;
- morte fetale tardiva o nato morto o in epoca perinatale.

È inoltre indicato nei casi di:

- sospetta sindrome da microdelezione/microduplicazione;
- caratterizzazione di riarrangiamenti cromosomici individuati all'analisi del cariotipo
- eventuale conferma di CNV identificate mediante NGS (previa verifica della copertura sulla piattaforma utilizzata);

Altre situazioni particolari devono essere valutate singolarmente prendendo in esame i rischi genetici del caso in oggetto (es. anomalia identificata dal NIPT e non confermata nel feto).



8. Analisi cromosomica costituzionale

8.1. Aspetti generali

L'analisi del cariotipo costituzionale, chiamato anche 'esame cromosomico' o 'mappa cromosomica', consiste nell'analisi dei cromosomi delle cellule di un individuo e permette l'identificazione di anomalie del numero o della struttura dei cromosomi.

La risoluzione dei preparati cromosomici, ottenuta mediante le tecniche di bandeggio, consente di individuare riarrangiamenti strutturali di dimensioni medie di 10-15 Megabasi (Mb). Le tecniche di citogenetica molecolare quali, ad esempio, l'array-CGH/SNP o la FISH sono indicate per la ricerca di eventuali anomalie submicroscopiche.

8.1.1. Colture cellulari

Le indagini citogenetiche possono essere eseguite su diversi tessuti, sia studiando le cellule in divisione spontanea (es.: citotrofoblasto), sia utilizzando colture cellulari a breve/medio/lungo termine (es.: sangue periferico, liquido amniotico, mesoderma).

Si raccomanda, nelle analisi prenatali, di allestire le colture cellulari almeno in duplicato per ridurre il rischio di insuccesso.

In caso di allestimento di più colture cellulari indipendenti, è buona norma utilizzare due diversi incubatori e usare due tipi di terreno o due lotti diversi dello stesso terreno, al fine di limitare i rischi di insuccesso conseguenti a contaminazione delle colture, scarsa crescita cellulare e/o artefatti. È opportuno inoltre processare le colture in tempi diversi.

In diagnosi prenatale si consiglia di conservare una coltura almeno fino all'emissione del referto definitivo, nel caso siano necessari approfondimenti non preventivati come FISH, CMA, UPD, di cui è opportuno informare il medico referente e/o il centro inviante e/o il richiedente.

È opportuna la conservazione dell'eventuale materiale cellulare residuo o delle colture anche dopo la conclusione dell'esame. Per questo aspetto si rimanda alle *Linee di Indirizzo sulla Conservazione del Materiale Biologico e Documentale relativo ai Test Genetici* (SIGU, 2021).

8.1.2. Bandeggio cromosomico

Il cariotipo deve essere analizzato con una tecnica di bandeggio (G, Q, R), ad eccezione delle sindromi da instabilità cromosomica e nella ricerca di aberrazioni indotte da agenti clastogeni.

Il laboratorio deve disporre di tecniche di colorazione differenziale per specifiche regioni cromosomiche, quali ad esempio C, NOR, DA-DAPI, eventualmente sostituibili da FISH.

Il livello di risoluzione del bandeggio deve essere riportato nella documentazione del laboratorio e nel referto.



L'International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN, edizione corrente) definisce 5 livelli di risoluzione del bandeggio cromosomico (300, 400, 550, 700, 850 bphs – *bands per haploid set*), da usare come parametri di riferimento per definire il grado di risoluzione dei cromosomi.

Il livello di risoluzione del bandeggio di una metafase è talvolta ricavabile direttamente dai sistemi di analisi dell'immagine. Esistono comunque diversi metodi per definire il grado di risoluzione di una metafase. Per valutare il livello di bandeggio di un preparato, è opportuno utilizzare un metodo oggettivo e riproducibile, che dovrebbe essere formalmente riportato nel manuale di laboratorio. Nella Tabella dei "Livelli di bandeggio" (Allegato n. 16.2) sono riportati alcuni cromosomi il cui bandeggio varia a differenti gradi di risoluzione.

Il livello di risoluzione deve essere correlato al quesito diagnostico e al tipo di tessuto studiato: il numero di 300 bande rappresenta il livello minimo raccomandato per l'analisi su villi coriali con il metodo diretto; 400 bande sono il livello minimo per l'analisi prenatale su coltura di villo coriale o di liquido amniotico e per quella postnatale. Nelle indagini su sangue periferico, nei casi di poliabortività, disabilità intellettiva, difetti congeniti, dismorfismi sarebbe opportuna la valutazione ad un livello di bandeggio di 550 bphs, sebbene esistano ad oggi tecniche più sensibili nell'identificare riarrangiamenti strutturali bilanciati e sbilanciati. In particolare, il cariotipo non è l'indagine di elezione per l'identificazione di anomalie strutturali in casi di sospetta sindrome da microdelezione/microduplicazione, essendo preferibili la CMA o l'analisi FISH con sonde selezionate in base al sospetto clinico. In generale, la tecnica array-CGH/SNP è preferibile in tutti i casi di disabilità intellettiva, difetti congeniti, dismorfismi.

La Tabella 1 (v. sotto) riporta i livelli minimi di bandeggio che si raccomanda di ottenere.

Quando non è possibile ottenere la risoluzione raccomandata in rapporto al quesito diagnostico, in assenza di anomalie cromosomiche, è indicata la consulenza genetica per valutare la necessità di un'eventuale ripetizione dell'esame o esecuzione di altre indagini di approfondimento.

Tabella 1 – Livelli di bandeggio minimi richiesti a seconda del tessuto/indicazione

Tessuto/Indicazione	LIVELLO MINIMO di bandeggio (bphs)
Villi Coriali – Analisi con metodo diretto	300
Villi Coriali – Analisi dopo coltura	400
Liquido Amniotico	400
Sangue periferico/fetale	400
Conferma di un'aneuploidia (linfociti, liquido amniotico, villo diretto, coltura di tessuti solidi)	<300
Esclusione di un riarrangiamento strutturale noto di grandi dimensioni (linfociti, biopsia di cute, villo diretto, liquido amniotico)	300
Identificazione o esclusione di un piccolo riarrangiamento strutturale noto (linfociti,	400



biopsia di cute, coltura di villi, liquido amniotico)	
---	--

bphs = bands per haploid set

8.1.3. Analisi dei cromosomi

Le Linee Guida Europee, cui si riferiscono per i principi generali queste indicazioni di buona pratica, fissano come criteri minimi di base per la definizione del cariotipo costituzionale, l'analisi di 2 metafasi mediante il confronto dei cromosomi di ogni coppia di omologhi, non sovrapposti, banda per banda. Se uno dei cromosomi della coppia è sovrapposto ad un altro cromosoma, quella coppia di omologhi deve essere controllata in un'altra metafase per assicurarsi che non siano presenti riarrangiamenti strutturali.

Tuttavia, il GdL di Citogenetica e Citogenomica SIGU ritiene che il numero delle metafasi da esaminare debba essere correlato alla specifica indicazione clinica ed alle esigenze eventualmente emerse durante l'analisi, in particolare nei casi in cui si sospetti la presenza di un mosaicismo (vedi paragrafi specifici per diagnosi pre- e postnatale). Il numero minimo di metafasi che si raccomanda di analizzare per le diverse metodiche è riportato negli specifici paragrafi. Il grado di mosaicismo che può essere escluso in base al numero di cellule analizzate è ricavabile dai lavori di Hook (1977) e di Claussen et al. (1984)(Vedi allegato 16.4 e allegato n. 16.5.a e 16.5.b).

Per tutte le analisi si raccomanda di riportare sul foglio di lavoro il/i vetrino/i analizzato/i, documentando le metafasi utilizzate per l'indagine.

L'analisi deve essere effettuata da personale specificatamente preparato. All'analisi e all'interpretazione del cariotipo dovrebbero contribuire 2 operatori, compreso un citogenetista con esperienza almeno quinquennale.

8.2. Diagnosi prenatale (DP)

8.2.1. Cariotipo su villi coriali

La biopsia di villi coriali deve essere analizzata al microscopio per stabilire l'idoneità all'analisi sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (come riferimento per la quantificazione vedi allegato n. 16.3; Grati et al. 2013). Il laboratorio deve possedere un protocollo scritto in cui siano specificate le condizioni di idoneità di un campione (es: frammentazione, presenza di decidua materna, etc.), nonché la quantità minima e quella ottimale affinché un campione sia da considerarsi processabile con il proprio metodo di analisi. Il protocollo deve descrivere anche come procedere nel caso non sia presente nel campione prelevato un'adeguata quantità di villi coriali per lo studio del cariotipo secondo il protocollo raccomandato, anche in relazione all'indicazione al test e/o alla contemporanea necessità di materiale per l'esecuzione di altre indagini (es.: Array-CGH/SNP, QF-PCR, test molecolari).

8.2.1.1. Metodi "diretto" e "coltura"

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



Nel metodo “diretto” le cellule del citotrofoblasto, che si dividono spontaneamente, possono essere analizzate dopo un breve periodo di incubazione. Il metodo diretto esclude il rischio di analizzare metafasi di origine materna.

Nell’analisi “dopo coltura”, il villo viene disgregato con tecniche meccaniche o enzimatiche, che consentono di liberare le cellule presenti nel core mesenchimale e di farle proliferare in coltura. È opportuno allestire almeno 2 colture indipendenti a lungo termine, quando la quantità di campione pervenuto lo consenta. Si ricorda che l’allestimento di 3 colture è da considerarsi ottimale per poter effettuare eventuali approfondimenti diagnostici in caso di mosaicismo.

Per l’analisi dei villi coriali è necessario utilizzare entrambe le metodiche, per massimizzare l’affidabilità diagnostica in termini di definizione del cariotipo fetale. Sono possibili discrepanze tra il cariotipo ottenuto con il metodo diretto e quello ottenuto dopo coltura, che devono essere interpretate e discusse in sede di consulenza genetica (vedi anche paragrafo 8.2.4.1).

Se il campione di villi coriali non è sufficiente per eseguire entrambe le metodiche, si raccomanda di utilizzare il metodo che garantisca al laboratorio, sulla base della propria esperienza, la maggiore possibilità di successo diagnostico. Da un punto di vista embriologico si precisa che il tessuto che meglio correla con il cariotipo fetale è il mesenchima e che in presenza di un cariotipo anomalo omogeneo ottenuto con il solo metodo diretto vi è la possibilità di avere un cariotipo normale su liquido dell’8%, contro un 3% nel caso si analizzasse solo la coltura a lungo termine. Viceversa, in presenza di un cariotipo normale ottenuto con il solo metodo diretto vi è la possibilità di avere un cariotipo anomalo (omogeneo o a mosaico) su liquido dello 0.09%, contro uno 0.03% nel caso si analizzasse solo la coltura a lungo termine. Tali percentuali sono variabili a seconda dell’anomalia cromosomica considerata (Grati et al., 2021).

Qualora il laboratorio sostituisca il metodo “diretto” con la tecnica QF-PCR, è necessario eseguire il cariotipo su “coltura”. Le stesse considerazioni riguardanti i risultati discordanti valgono anche in questo caso, tenendo presente che non è possibile stimare quanto la QF-PCR contribuisca alla riduzione di tale rischio per le aneuploidie principali.

In caso di scarsità del campione ed in presenza di indicazioni quali NT aumentata ($\geq 3,5$ mm) o malformazioni ecografiche, per le quali è indicata l’esecuzione di array-CGH/SNP, sarebbe preferibile dare precedenza a tale percorso diagnostico, sottolineando nel referto la necessità di discutere i limiti di un eventuale risultato normale alla luce della mancanza del cariotipo.

8.2.1.2. Combinazione dei metodi “diretto” e “coltura”

Si raccomanda di analizzare almeno 6 metafasi ottenute da metodo diretto e 10 da coltura, possibilmente da 2 colture indipendenti, ed eseguire la ricostruzione del cariotipo su almeno 3 metafasi, di cui almeno 1 da metodo diretto.

Il livello di risoluzione deve essere di almeno 300 bande per il metodo diretto e di 400 per la coltura.

In caso di mosaicismo è necessario analizzare un numero maggiore di metafasi ricostruendo almeno un cariotipo per ogni linea cellulare identificata (v. par. 8.2.4). In presenza di un mosaico è necessario confrontare i risultati



ottenuti con le due metodiche e, in sede di consulenza genetica, va attentamente valutata l'eventuale necessità di successivi approfondimenti diagnostici e/o di ripetizione dell'analisi su un altro tessuto fetale (es.: liquido amniotico, sangue fetale, cute fetale).

8.2.1.3. Singolo metodo o QF-PCR + coltura

Quando non è possibile l'esecuzione sia del metodo diretto che del metodo della coltura o il metodo diretto venga sostituito con la QF-PCR, per cui ci si limita all'utilizzo di una sola delle due metodiche per l'analisi del cariotipo:

- a. l'indagine cromosomica deve essere eseguita analizzando almeno 16 metafasi, possibilmente da 2 colture indipendenti, di cui almeno 3 con ricostruzione del cariotipo alla risoluzione indicata in Tabella 1 (par. 8.1.2). In presenza di un mosaico si raccomanda, ove possibile, di analizzare un maggior numero di metafasi e di ricostruire almeno un cariotipo per linea cellulare identificata. Si raccomanda di valutare in sede di consulenza genetica l'eventuale necessità di ripetizione dell'esame su un altro tessuto fetale o l'esecuzione di ulteriori approfondimenti diagnostici.
- b. l'analisi cromosomica con una sola tecnica incrementa la probabilità di un risultato discordante dal cariotipo fetale; tale eventualità va segnalata nel referto, rimandando ad una consulenza genetica per la discussione del risultato;
- c. con l'applicazione del solo metodo dopo coltura, è opportuno analizzare le metafasi provenienti da più aree di crescita, ottenute da almeno due colture indipendenti;
- d. con l'applicazione del solo metodo dopo coltura, in presenza di un cariotipo femminile normale, è consigliato escludere la possibile crescita in coltura di cellule di origine materna, poiché il villo coriale potrebbe essere potenzialmente contaminato da tessuti materni.

8.2.2. Cariotipo su cellule del liquido amniotico

8.2.2.1. Metodi "in fiasca" e "in situ"

Per ogni campione di liquido amniotico si raccomanda di allestire non meno di 3 colture primarie, utilizzando due diversi incubatori. L'analisi del cariotipo deve essere eseguita su almeno 2 colture primarie.

Metodo "in fiasca": si devono analizzare almeno 16 metafasi da almeno 2 colture indipendenti, nelle quali siano cresciute complessivamente non meno di 10 colonie.

Metodo "in situ": si devono analizzare almeno 10 metafasi provenienti da 10 colonie ottenute da almeno 2 colture indipendenti. È consigliabile includere nell'indagine i cloni con una singola metafase solo se non sono disponibili sufficienti cloni in cui siano presenti più metafasi.

Indipendentemente dal metodo di coltura utilizzato, si raccomanda di ricostruire il cariotipo di almeno 3 metafasi. Il livello di risoluzione minima per le indagini su liquido amniotico deve essere di 400 bande.

In caso di riscontro di mosaicismo o qualora l'indagine su liquido amniotico sia effettuata come approfondimento a seguito di riscontro di mosaicismo su villi coriali è necessario analizzare un numero maggiore



di metafasi/colonie, esaminando più colture indipendenti e ricostruendo almeno un cariotipo per ogni linea cellulare identificata (vedi par. 8.2.4.5)

Ogni laboratorio dovrebbe specificare la quantità di liquido amniotico ottimale e quella minima perché un campione sia processabile con il proprio metodo di analisi

Qualora la qualità del preparato sia scarsa e la crescita cellulare o la risoluzione dell'analisi non idonee ad eseguire l'analisi secondo il protocollo raccomandato, il referto deve riportare una nota relativa, rimandando ad un colloquio con il medico specialista/genetista per la discussione del risultato.

Nelle indagini effettuate per la conferma di risultati NIPT ad alto rischio, in caso di riscontro di cariotipo normale è appropriato analizzare il campione secondo i criteri utilizzati quando l'indicazione all'esame è la ricerca/esclusione di un mosaicismo osservato su precedente campione di villi coriali, estendendo l'analisi ad un maggior numero di metafasi (vedi par. 8.2.4.5).

Quando non è possibile completare un'indagine con il solo metodo in situ, si può ricorrere all'analisi in fiasca dopo tripsinizzazione. In questi casi è opportuno analizzare tutti i cloni possibili con metodo in situ ed estendere l'analisi nella coltura aggiuntiva, in modo da raggiungere i parametri di lettura previsti, facendo riferimento a quanto riportato in Sikkema-Raddatz et al., 1997 (vedi allegato n. 16.6).

8.2.3. Cariotipo su linfociti fetali

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

Sul campione di sangue prelevato deve essere esclusa la contaminazione da cellule materne, mediante appropriate tecniche (es.: test di denaturazione alcalina, QF-PCR, test di differenziazione su base volumetrica, etc.)

Il livello di risoluzione minima per le indagini su linfociti fetali deve essere di 400 bande.

Si raccomanda di riferirsi al quesito diagnostico per quanto riguarda il numero di metafasi da analizzare. Nel caso di controllo su sangue fetale di un mosaico riscontrato in precedenza su villi coriali o liquido amniotico, è opportuno estendere l'analisi fino a 100 metafasi, valutando eventualmente se effettuare l'estensione dell'indagine mediante FISH con sonda cromosoma specifica. Nel caso in cui si riscontri un cariotipo normale sui linfociti fetali, è opportuno segnalare sul referto la probabilità di esclusione del mosaicismo in base al numero delle metafasi analizzate.

Per le restanti indicazioni l'indagine cromosomica deve essere eseguita analizzando almeno 16 metafasi di cui almeno 3 con ricostruzione del cariotipo. In caso di mosaicismo è necessaria la ricostruzione di almeno un cariotipo per ogni linea cellulare identificata. Si raccomanda l'uso della tecnica array-CGH/SNP nel caso in cui l'analisi venga richiesta a seguito dell'accertamento ecografico di malformazione/i fetale/i e/o ritardo di crescita.

8.2.4. Mosaicismo in diagnosi prenatale

Il mosaicismo cromosomico rappresenta uno dei più complessi problemi diagnostici nell'analisi del cariotipo fetale, sia sui villi coriali che su liquido amniotico. Il mosaicismo vero, il mosaicismo confinato alla placenta (CPM)



riscontrabile nei villi coriali e lo pseudomosaicismo nelle colture di amniociti/villi coriali sono classificati in base a specifici criteri. Si raccomanda di fare riferimento a quanto riportato in “*Gardner and Sutherland’s - Chromosome abnormalities and genetic counselling*” (Gardner and Amor, 2018).

Il CPM, lo pseudomosaicismo ed il mosaicismo vero possono avere origine da:

- un errore mitotico postzigotico precoce in un embrione diploide normale;
- un fenomeno di ricostituzione della disomia da un concepimento trisomico (*trisomy rescue*);
- un artefatto colturale.

8.2.4.1. Mosaicismo nei villi coriali

Differenze nel cariotipo delle diverse componenti dell’unità feto-placentare (citotrofoblasto, mesenchima e feto) vengono osservate nell’1-2% circa dei prelievi di villi coriali.

Il mosaicismo nei villi coriali può presentarsi in tre diverse tipologie:

- Tipo I: l’anomalia cromosomica risulta presente solo nel citotrofoblasto, cioè evidenziabile solo con il metodo diretto;
- Tipo II: l’anomalia cromosomica si osserva solo nella componente mesenchimale del villo, cioè presente solo nella coltura;
- Tipo III: la linea cellulare anomala è presente sia nel citotrofoblasto che nel mesenchima, rilevabile tramite metodo diretto e dopo coltura.

Il riconoscimento di una condizione di mosaicismo nei villi coriali richiede la discussione del risultato in sede di consulenza genetica e, generalmente, una conferma su un altro tessuto fetale (es.: liquido amniotico, sangue fetale).

8.2.4.2. Mosaicismo nel liquido amniotico

Una condizione di mosaicismo fetale vero nei campioni di liquido amniotico si osserva in circa lo 0,2% dei casi, mentre lo pseudomosaicismo risulta più frequente, evidenziandosi in media nel 3-8% dei campioni (Barch et al., 1991).

Nel liquido amniotico si possono evidenziare tre livelli di mosaicismo:

- I Livello: presenza di singola cellula con anomalia numerica o strutturale, osservabile con una frequenza che varia dal 2.5% al 7%;
- II Livello: due o più cellule con la stessa anomalia cromosomica provenienti da una coltura in fiasca, oppure singola colonia o più colonie anomale osservate in una singola coltura in situ, stimabile ad una frequenza pari allo 0.7–1.1%;
- III Livello: più metafasi o colonie provenienti da almeno due colture in fiasca diverse o da almeno due colture in situ indipendenti.

I livelli I e II sono comunemente definiti pseudomosaicismi, mentre il livello III corrisponde ad un mosaicismo fetale vero.



8.2.4.3. Pseudomosaicismo

Il riscontro in una singola coltura di liquido amniotico di uno o più cloni (metodo in situ) o di una o più cellule (metodo in fiasca) con corredo cromosomico diverso da quello riscontrato nelle colonie/cellule delle altre colture corrisponde a mosaicismi di livello I e II (Gardner and Amor, 2018), più comunemente definiti come pseudomosaicismi.

Tali ritrovamenti sono di difficile valutazione non solo a livello tecnico, ma anche a livello di correlazione con il fenotipo. Infatti è possibile, soprattutto in caso di riscontro di singolo clone/cellula con alterazione cromosomica, che l'anomalia sia insorta *in vitro* e costituisca un artefatto colturale; è inoltre possibile che i cloni/cellule siano derivati dalla placenta e pertanto siano indice di un CPM e non siano quindi rappresentativi del feto. Nel valutare un ritrovamento interpretabile come pseudomosaicismo, occorre comunque considerare che i mosaicismi "a bassa percentuale" costituiscono uno dei limiti riconosciuti delle indagini citogenetiche prenatali.

Per la refertazione degli pseudomosaicismi vedi il capitolo 11, Refertazione.

8.2.4.4. Approfondimenti per la classificazione di un mosaicismo in diagnosi prenatale

In caso di riscontro di una o più cellule/cloni anomale/i durante l'analisi è buona pratica di laboratorio applicare i criteri di comportamento di seguito riportati, suggeriti da Hsu e Benn (1999) e da Gardner and Amor (2018), per arrivare a classificare il ritrovamento come pseudomosaicismo o mosaicismo vero. Tali criteri sono stati definiti per le analisi su liquido amniotico, ma possono essere applicabili anche per i casi di sospetto mosaicismo riscontrati su coltura di villi coriali (Tabella 2).

Tabella 2: Approfondimenti per la classificazione di un mosaicismo in DP (§)

	CVS: A LUNGO TERMINE LA: IN FIASCA	LA: IN SITU
APPROFONDIMENTO ESTESO Riscontro in singola coltura di: -trisomia 2*, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21 o 22 in una/più cellula/e o uno/più cloni -riarrangiamento strutturale sbilanciato in più cellule o più cloni; -marcatore cromosomico in più cellule o più cloni	20 CELLULE DA CIASCUNA DI 2 COLTURE INDIPENDENTI ESCLUSA COLTURA CON ANOMALIA	24 CLONI DA 2 COLTURE INDIPENDENTI ESCLUSA COLTURA CON ANOMALIA
APPROFONDIMENTO MODERATO Riscontro in singola coltura di: -trisomia 1, 2*, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 17 o 19 in una/più cellula/e o uno/più cloni; -cromosoma X o Y sovrannumerario in una/più cellula/e o uno/più cloni -monosomia X o altra monosomia in più cellule o uno/più cloni; -marcatore cromosomico osservato in singola cellula o clone; -riarrangiamento strutturale bilanciato in più cellule o più cloni	20 CELLULE DA COLTURA INDIPENDENTE ESCLUSA COLTURA CON ANOMALIA	12 CLONI DA COLTURA INDIPENDENTE ESCLUSA COLTURA CON ANOMALIA



-riarrangiamento strutturale sbilanciato in singolo clone		
APPROFONDIMENTO BASE Riscontro di singola cellula con: -45,X; -riarrangiamento strutturale sbilanciato; -riarrangiamento strutturale bilanciato; -rottura di un cromosoma a livello del centromero con perdita di uno dei due bracci;	20 CELLULE DA 2 COLTURE INDIPENDENTI COMPRESA COLTURA CON ANOMALIA	--
Riscontro di altre anomalie in una singola cellula	--	--

§Ci si riferisce a "cellula/e" nel caso di colture in fiasca e a "cloni" nel caso di colture in situ

*Relativamente al riscontro di uno o più cloni in singola fiasca con trisomia 2, per le colture di liquido amniotico è consigliato un approfondimento esteso. Limitatamente alle colture di villi coriali, in assenza di segni ecografici, è invece considerato sufficiente un approfondimento moderato, in considerazione della bassa probabilità di coinvolgimento fetale. --: nessun approfondimento necessario

Nel caso di riscontro di una singola cellula con anomalia cromosomica su metodo diretto, si raccomanda di estendere l'analisi ad almeno 12 metafasi e di aumentare il numero di cellule analizzate su coltura secondo le indicazioni contenute in Tabella 3.

Quando non si riescano a completare gli approfondimenti diagnostici, le azioni da intraprendere dipendono dal/i cromosoma/i coinvolto/i, dai criteri clinici e scientifici e dal giudizio professionale applicato a ciascun singolo caso.

8.2.4.4.1. Colture di sangue fetale

Se un'anomalia di possibile significato clinico viene riscontrata in una singola cellula, devono essere analizzate un minimo di 30 metafasi, con estensione a 100 nel caso l'anomalia correli con l'indicazione all'esame.

8.2.4.5. Approfondimenti per sospetto mosaicismo in diagnosi prenatale

Per la gestione delle analisi su villi coriali e su liquido amniotico, quando l'indicazione all'indagine sia il sospetto di anomalie a mosaico (es.: risultati NIPT ad alto rischio con riscontro di cariotipo normale all'analisi standard, controllo su liquido amniotico di un cariotipo a mosaico su villi coriali, trasferimento di embrioni apparentemente a mosaico dopo PGT-A con riscontro di cariotipo normale all'analisi convenzionale), oppure nel caso di riscontro di singola cellula con anomalia cromosomica su diretta di villo, è buona pratica di laboratorio applicare i criteri di comportamento riportati di seguito in Tabella 3.



In particolare è indicato tale approfondimento per le seguenti anomalie cromosomiche che hanno maggiore probabilità di essere confermate sui tessuti fetali (Benn et al., 2019):

- trisomia autosomica coinvolgente i cromosomi 4, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22;
- cromosoma X o Y sovrannumerario;
- monosomia X;
- riarrangiamento strutturale;
- marcatore cromosomico.

Tabella 3: Approfondimenti per sospetto mosaicismo in DP

Tecnica	N. minimo metafasi/cloni	N. minimo colture indipendenti
Analisi diretta di CVS	12 metafasi	1
Colture in fiasca di CVS/L.A	30 metafasi	2
Colture in situ di L.A.	20 cloni	3
Colture di sangue fetale	50 metafasi (100 se riscontro di metafase con anomalia ricercata)	2

Quando non si riescano a completare gli approfondimenti diagnostici, le azioni da intraprendere dipendono dal/i cromosoma/i coinvolto/i, da criteri clinici e scientifici e dal giudizio professionale applicato a ciascun singolo caso.

8.2.5. Contaminazione con cellule materne (CCM)

Qualora si sospetti la presenza di contaminazione da parte di cellule di origine materna, come nel caso di campioni di liquidi amniotici francamente ematici o in campioni di villi coriali in cui tale eventualità sia suggerita dalla morfologia tissutale/cellulare, in caso di riscontro di cariotipo femminile si dovrebbe considerare di confermare l'origine fetale delle cellule del campione mediante tecniche appropriate (es.: QF-PCR).

La spiegazione più probabile dell'osservazione di cellule XX in un campione altrimenti XY è la presenza di contaminazione materna. Poiché si può ritenere che le cellule XY rappresentino le reali cellule fetali, l'analisi citogenetica completa deve essere eseguita su questo tipo di cellule. Occorre comunque documentare anche le cellule XX, per poter valutare il grado di CCM e l'eventualità di segnalarlo nel referto. Poiché, anche se raramente, la presenza di cellule XY/XX in uno stesso campione in diagnosi prenatale potrebbe essere indice di chimerismo, gemello riassorbito o ambiguità genitale, nel refertare un CCM si raccomanda di suggerire l'esecuzione di un'ecografia per il controllo del sesso fetale.

In alcuni casi potrebbero rendersi necessari un secondo prelievo di tessuti fetali e/o il confronto di polimorfismi (citogenetici o molecolari) tra un campione materno ed uno fetale.



8.2.5.1. Liquido amniotico

La frequenza di CCM in campioni di liquido amniotico è di circa 0,5%. I fattori che possono aumentarne la probabilità sono il calibro dell'ago utilizzato per l'amniocentesi, la mancata eliminazione dei primi ml di liquido aspirato, la durata del periodo di coltura e la presenza di sangue nel campione.

8.2.5.2. Villi coriali

La frequenza di CCM in campioni di villi coriali è circa 1-2%. La pulizia dei campioni dalla decidua materna, globuli rossi, membrane e altro materiale deve avvenire mediante controllo al microscopio.

8.2.5.3. Sangue fetale

Si deve escludere l'eventuale presenza di CCM prima di processare campioni di sangue fetale.

8.2.6. Tetraploidia in diagnosi prenatale

La tetraploidia, omogenea o a mosaico, è un'anomalia citogenetica molto rara nei nati vivi mentre è un fenomeno che si osserva frequentemente nelle colture in vitro di cellule fetali. È quindi difficile distinguere tra artefatto colturale, mosaicismo confinato nella placenta e vera tetraploidia.

In un contesto ecografico nella norma, la tetraploidia è solitamente un artefatto colturale, mentre in presenza di rilievi ecografici aspecifici va considerata la possibilità che la tetraploidia sia presente nei tessuti fetali.

In caso di ritrovamento di cellule tetraploidi nell'analisi diretta di villi coriali si può fare riferimento al protocollo in tre fasi per la gestione delle analisi con metafasi tetraploidi proposto da Noomen et al. (2001).

La presenza di cellule tetraploidi anche in colture di amniociti è considerata un artefatto colturale. Comunque se la frequenza della tetraploidia è molto elevata e riscontrata in colture primarie multiple potrebbe essere considerata la possibilità di segnalarla in una nota del referto e sarebbe utile eseguire un controllo ecografico (Milunsky, 2021).

8.3. Diagnosi postnatale

8.3.1. Cariotipo su sangue periferico

Si raccomanda di allestire una coltura per ogni caso, conservando il campione residuo in condizioni idonee a garantire, se necessario, l'allestimento di altre colture successivamente. Si raccomanda, in caso l'indicazione all'esame sia un sospetto mosaicismo, l'allestimento di due colture.

Analisi del cariotipo: si raccomanda di analizzare almeno 16 metafasi di cui almeno 2 con ricostruzione del cariotipo e in caso di mosaicismo almeno 2 ricostruzioni per linea cellulare. In caso di richiesta specifica di ricerca/conferma di mosaicismo, è opportuno estendere l'analisi fino a 100 metafasi, eventualmente valutando di effettuare l'estensione della conta mediante un'indagine FISH con sonda cromosoma specifica. Qualora in base all'indicazione non si ritenga necessaria la ricerca di un'eventuale linea in mosaico (es.: ricerca/esclusione



di riarrangiamento cromosomico familiare) l'analisi può essere effettuata su 5 metafasi, almeno 2 delle quali con ricostruzione del cariotipo.

8.3.2. Cariotipo su colture di fibroblasti, biopsia cutanea e biopsia gonadica

Si raccomanda di allestire almeno 2 colture indipendenti.

Analisi del cariotipo: analizzare almeno 16 metafasi, delle quali almeno 2 con ricostruzione del cariotipo; in caso di mosaicismo eseguire 2 ricostruzioni per linea cellulare ed estendere l'analisi ad un maggior numero di metafasi (vd par. 8.3.4). In caso di richiesta di ricerca/conferma di mosaicismo, è opportuno estendere l'analisi fino a 100 metafasi, eventualmente valutando di effettuare l'estensione della conta mediante un'indagine FISH con sonda cromosoma specifica.

Il livello di risoluzione minima deve essere di 400 bande.

8.3.3. Cariotipo su materiale abortivo

L'indagine citogenetica su materiale abortivo può essere condotta sia sugli annessi embrionali (es.: villi coriali, sacco amniotico, cordone) che su tessuti fetali (es.: cute).

La coltura per l'esecuzione dell'indagine citogenetica su materiale abortivo può essere gravata da un elevato tasso di insuccessi (30-40%) in relazione alla qualità del campione inviato. Per ottimizzare le possibilità di successo si raccomanda di:

- analizzare villi coriali preferenzialmente con il metodo diretto, in quanto la coltura a lungo termine comporta un aumento della possibilità di contaminazione da tessuto materno,
- effettuare, se possibile, anche colture di altri tessuti (es.: sacco amniotico, cordone ombelicale o cute fetale).

Inoltre considerate le modalità con cui vengono prelevati i campioni da materiale abortivo, il rischio di CCM è significativo, particolarmente negli aborti precoci. Nella selezione dei tessuti da mettere in coltura si raccomanda di adottare tutti gli accorgimenti necessari per minimizzare il rischio di crescita di cellule di origine materna.

Analisi del cariotipo: analizzare almeno 10 metafasi, di cui almeno 2 con la ricostruzione del cariotipo e 2 ricostruzioni per linea cellulare in caso di mosaicismo.

Nel caso di mancata crescita cellulare o impossibilità a raggiungere gli standard di analisi, al fine di ottenere dei risultati di interesse diagnostico, e' possibile utilizzare altre metodiche (es.: QF-PCR, MLPA, microarray). A questo fine può essere utile conservare preventivamente un'aliquota di campione.

8.3.4. Mosaicismo in diagnosi postnatale

L'interpretazione e la refertazione del mosaicismo cromosomico possono risultare complessi. In generale si ritiene che il problema relativo all'osservazione di singole cellule aneuploidi e l'opportunità di estendere la conta



cromosomica ad un numero elevato di metafasi vadano valutati tenendo conto dell'indicazione all'analisi e del fenotipo.

I referenti clinici dovrebbero essere consapevoli che un mosaico può essere confermato, ma non può mai essere escluso in maniera affidabile da alcun tipo di analisi e, in particolare, da quelle che non prevedono un conteggio esteso di cellule.

La presenza di più linee cellulari può dipendere da diverse cause, come:

- aneuploidie dei cromosomi sessuali legate all'età;
- mosaicismo costituzionale vero: la percentuale delle diverse linee cellulari può variare nei diversi tessuti e per alcune anomalie cromosomiche è riconosciuto un confinamento tessuto specifico;
- chimerismo;
- artefatti colturali.

Qualora dall'analisi delle prime 16 metafasi venga rilevata un'aneuploidia (esclusa la monosomia di un autosoma) o un riarrangiamento strutturale, è opportuno estendere il conteggio a 30 cellule. Il riscontro di una seconda cellula con la stessa anomalia suggerisce di analizzare almeno 50 cellule, ed eventualmente estendere il conteggio fino a 100 metafasi.

Si consiglia di analizzare almeno 30 cellule, ed eventualmente estendere il conteggio fino a 100 metafasi quando è presente una delle seguenti indicazioni:

- genitali ambigui;
- sospetto di trisomia a mosaico per i cromosomi 13, 18, 21;
- fenotipo suggestivo di una nota sindrome autosomica a mosaico (es.: trisomia 8; trisomia 9, +i(12)(p10); +dic(15)(q12);
- fenotipo suggestivo di una sindrome da aneuploidia, ma con cariotipo normale all'analisi di routine;
- marcatore cromosomico a mosaico;
- genitori di soggetti con marcatore cromosomico;
- diagnosi clinica o sospetta diagnosi di aneuploidia coinvolgente i cromosomi sessuali, notoriamente associati a mosaicismo (es.: sindrome di Turner). Di fronte al sospetto clinico di sindrome di Turner potrebbe essere opportuno valutare la possibilità di ricercare la presenza della linea 45,X su fibroblasti da biopsia cutanea;
- follow up di una diagnosi prenatale di un possibile mosaicismo clinicamente significativo in neonato affetto;
- genitori con più di un figlio con la stessa anomalia cromosomica;
- variazioni nella pigmentazione cutanea;
- emi-ipertrofia.

In alternativa all'analisi del cariotipo la FISH può essere adatta a confermare un sospetto mosaicismo, se è disponibile la sonda opportuna.

È opportuno segnalare i mosaicismi con bassa frequenza nei soggetti con fenotipo sindromico e valutare l'estensione dell'indagine citogenetica ai fibroblasti da biopsia cutanea. La richiesta di un campione di un altro



tessuto (es.: cute, striscio buccale) può risultare appropriata per anomalie cromosomiche caratterizzate da mosaicismo tessuto specifico (es.: sindrome di Pallister-Killian).

Si ritiene opportuno ricordare il fisiologico incremento di aneuploidia dei cromosomi sessuali, in particolare la monosomia del cromosoma X in soggetti femminili e la perdita del cromosoma Y in soggetti maschili in rapporto con l'età avanzata (Gardner e Amor, 2018). Conseguentemente, una linea con monosomia X potrebbe essere considerata priva di significato in relazione all'età della donna, se fenotipicamente normale, e alla percentuale di cellule analizzate (Russell et al., 2007) (Fig. 1). Pertanto non andrebbe segnalata nel referto una linea cellulare monosomica all'interno del range atteso in base all'età.

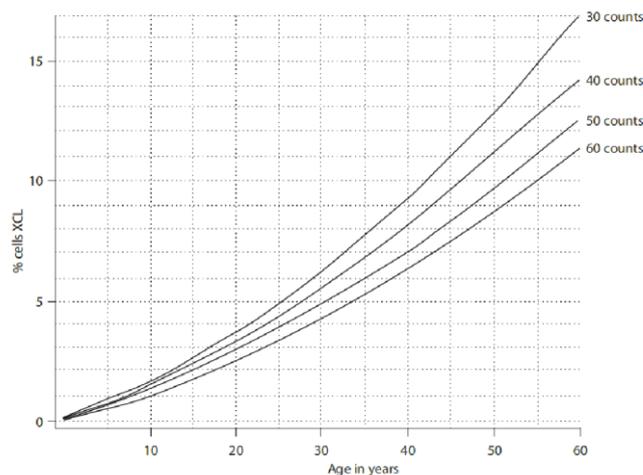


Figura 1: % di perdita del cromosoma X in relazione all'età della popolazione femminile (Russell et al., 2007)

La perdita a mosaico del cromosoma Y nelle cellule del sangue periferico è la più comune anomalia cromosomica acquisita nel processo fisiologico di invecchiamento dell'uomo. La prevalenza di tale evento aumenta con l'età e può superare il 20% nella popolazione maschile sopra gli 80 anni di età (Forsberg, 2017).

In campioni di individui fenotipicamente normali possono essere rilevate cellule con riarrangiamenti coinvolgenti i cromosomi 7 e 14 in bassa percentuale, riferibili ad artefatti di coltura.

8.4. Sindromi mendeliane con instabilità cromosomica

Le sindromi con instabilità cromosomica sono un gruppo di malattie genetiche rare, caratterizzate da un aumento della frequenza, spontanea e/o indotta, di specifiche anomalie cromosomiche. Le più note sono l'Anemia di Fanconi (FA), la Sindrome di Bloom (BS), l'Atassia-telangectasia, la sindrome di Nijmegen (NBS), la sindrome di Werner (WS), la sindrome da Instabilità centromerica e anomalie facciali (ICF), la sindrome di Roberts (RS) e la sindrome da aneuploidia variegata a mosaico (MVA). In considerazione della loro rarità e della complessità dell'indagine citogenetica, finalizzata a identificare uno specifico e variabile fenotipo cellulare, si raccomanda che il loro studio venga condotto esclusivamente da laboratori con adeguata esperienza che



dispongano anche di linee cellulari di soggetti affetti da utilizzare come controlli positivi nel protocollo diagnostico.

L'evoluzione delle tecniche di sequenziamento del DNA ha consentito il riconoscimento delle basi molecolari della maggior parte di queste malattie, rendendo attualmente possibili indagini di mutazioni nel/i gene/i-malattia, anche in epoca prenatale. Ove disponibile è preferibile l'utilizzo di queste tecniche molecolari rispetto alle indagini citogenetiche.

Nelle sindromi da instabilità cromosomica il quadro citogenetico presenta specifiche caratteristiche, pertanto, sulla base dell'indicazione clinica, il citogenetista deve utilizzare il protocollo più adatto ad analizzare il fenotipo cellulare che deve essere valutato su almeno 50 metafasi per tipo di coltura. La ricerca di questi riarrangiamenti cromosomici, associati a quadri sindromici per i quali non è disponibile un'indagine di mutazione sul gene-malattia, può essere utilizzata anche per una diagnosi fetale. In questo caso si ritiene presupposto indispensabile all'esecuzione di una diagnosi prenatale conoscere la condizione di rischio a priori della coppia e aver caratterizzato citogeneticamente l'eventuale precedente figlio affetto.

Esistono sindromi da instabilità cromosomica ancora più rare, segnalate anche in singole famiglie, che presentano rotture e riarrangiamenti cromosomici, ma anche endoreduplicazioni o separazione prematura dei centromeri (PCS). Pertanto è opportuno non sottovalutare l'eventuale instabilità cromosomica nei soggetti che non presentano i sintomi classici delle sindromi più note. Per questo, è importante che ogni laboratorio conosca la frequenza delle rotture nei propri preparati cromosomici e nelle diverse condizioni di coltura. Nel caso in cui si evidenziasse un numero di rotture significativamente superiore allo standard del laboratorio, si impone la consulenza genetica e la ripetizione dell'analisi citogenetica a distanza di alcuni mesi, utilizzando colture non sincronizzate.

Esistono alcune condizioni in cui il test per escludere un disordine da instabilità cromosomica dovrebbe essere considerato a prescindere da specifici segni clinici. Queste includono la sindrome di TAR (*Thrombocytopenia-Absent Radius*) e altre condizioni da difetti di formazione degli arti, l'associazione VACTERL (*Vertebral defects, Anal atresia, Cardiac malformations, Tracheoesophageal fistula with Esophageal atresia, and Radial or Renal dysplasia, Limb anomalies*) e la microcefalia con grave ritardo di crescita intrauterino.

È noto che alcuni riarrangiamenti cromosomici sporadici, come la traslocazione reciproca tra i cromosomi 7 e 14 [t(7;14)], ricorrono con una frequenza di circa 1 su 500 metafasi nella popolazione generale. Un test citogenetico per sindrome da instabilità cromosomica in soggetti con caratteristiche cliniche non strettamente specifiche andrebbe quindi considerato positivo se risulta tale su due campioni distinti del paziente. In questi casi è opportuna la valutazione del referto nell'ambito di una consulenza genetica.

Considerata l'esistenza di mosaicismi tissutali, nell'eventualità di risultati dubbi, sarebbe opportuno valutare la possibilità di eseguire l'analisi su un altro tessuto (es.: fibroblasti di cute)



8.4.1. Anemia di Fanconi (FA) (OMIM: 227645, 227646, 227650, 300514, 600901, 603467, 609053, 609054, 610832, 613390, 613951, 614082, 614083, 615272, 616435, 617243, 617244, 617247, 617883)

Nelle cellule dei pazienti affetti da FA sono presenti rotture cromatidiche e cromosomiche, frammenti acentrici e figure multiradiali di tipo asimmetrico tra cromosomi non omologhi. Si possono notare anche riarrangiamenti come anelli e dicentrici, endoreduplicazioni e condensazione prematura dei cromosomi (PCC). L'instabilità cromosomica viene accentuata da alcuni agenti chimici alchilanti bifunzionali, come il diepossibutano (DEB) e la mitomicina C (MMC). In genere viene preferito l'utilizzo del DEB in quanto la MMC in vitro ha un elevato tasso di falsi positivi e/o negativi. Il numero delle cellule con aberrazioni spontanee o indotte dall'esposizione agli agenti alchilanti può variare tra i diversi pazienti. Il test viene eseguito, in genere, su colture di linfociti di sangue periferico, ma può essere effettuato anche su colture di fibroblasti e amniociti.

La diagnosi si basa sul confronto tra i livelli di instabilità cromosomica rilevati in una coltura spontanea e quelli indotti in colture con l'agente clastogenico. Considerando la necessità di allestire le colture con soluzioni fresche dell'agente alchilante e il rischio di inattivazione dello stesso in soluzione, è raccomandata l'analisi in parallelo di un campione di controllo, in particolare quando viene analizzato un singolo campione.

Si raccomanda di analizzare almeno 50 metafasi per tipo di coltura, in cui valutare: la percentuale di cellule con rotture, il numero medio di rotture per cellula, il numero medio di rotture per cellula aberrante e la percentuale di cellule con riarrangiamenti e di riportare tali percentuali sul referto. Non è richiesto un livello minimo di bandeggio. È importante tenere in considerazione i fattori che possono interferire con una corretta valutazione dell'instabilità cromosomica: il mosaicismo, l'espressione di siti fragili comuni, l'eventuale pregressa chemioterapia.

Il Laboratorio deve aver testato e validato la frequenza delle rotture cromosomiche in campioni normali, sia in colture spontanee che con l'agente clastogenico, al fine di stabilire i cut-off al di sotto dei quali il ritrovamento di rotture cromosomiche possa essere considerato un riscontro casuale e sarebbe opportuno riportarli nel referto.

È opportuno verificare almeno 1-2 volte l'anno, e comunque ad ogni cambio di lotto, l'efficacia dell'agente clastogenico nell'indurre rotture cromosomiche su un controllo positivo.

Date le importanti implicazioni terapeutiche e di sorveglianza e considerando che si tratta, comunque, di test fenotipici, sarebbe opportuno valutare con i clinici di riferimento la necessità di confermare i risultati ottenuti su un nuovo campione sia per i casi positivi che per quelli negativi in cui il sospetto clinico sia molto forte.

8.4.2. Sindrome di Bloom (BS) (OMIM: 210900)

La diagnosi di sindrome di Bloom (BS) viene posta quando, sulla base di un sospetto clinico, vengono riscontrate varianti patogenetiche bialleliche del gene BLM.

Nei casi in cui il test molecolare non sia disponibile o risulti non informativo, è di grande utilità lo studio dei Sister Chromatid Exchanges (SCE). Il test viene eseguito su colture di linfociti di sangue periferico, ma può essere



effettuato anche su fibroblasti e amniociti. In caso di positività vanno escluse varianti patogenetiche dei geni *RMI1*, *RMI2* e *TOP3A* che determinano una condizione Bloom-like (OMIM: 618097) e possono presentare un aumento degli SCE.

Nelle cellule dei pazienti con BS sono presenti rotture isocromatidiche, frammenti acentrici, cromosomi isodicentrici e figure quadriradiali simmetriche, che avvengono tra cromosomi omologhi.

Il numero medio degli SCE per cellula deve essere calcolato in almeno 50 metafasi poiché circa il 20% dei pazienti presenta una condizione di mosaicismo con due popolazioni linfocitarie, una con un numero normale di SCE ed una con un numero aumentato (low-SCE/high-SCE).

Ogni laboratorio deve definire i propri valori di riferimento su 20 soggetti sani. Generalmente il numero medio di SCE è inferiore a 12 nelle cellule di persone non affette e aumenta da 40 a più di 100 scambi per metafase negli affetti, con formazione dei cosiddetti "cromosomi arlecchino".

8.4.3. Atassia-telangiectasia (AT) (OMIM: 208900)

Attualmente la diagnosi si basa sull'analisi molecolare dei geni coinvolti.

L'instabilità cromosomica delle cellule dei pazienti con AT aumenta dopo esposizione delle cellule alle radiazioni ionizzanti e al radiomimetico bleomicina. Di conseguenza lo studio dei soggetti con sospetta AT dovrebbe includere un test di sensibilità alle radiazioni. Tale sensibilità viene in genere misurata mediante test di sopravvivenza effettuati su linfociti o fibroblasti ma può anche essere valutata tramite indagini citogenetiche.

A livello citogenetico nelle cellule dei pazienti sono presenti rotture cromatidiche e cromosomiche, frammenti acentrici, figure multiradiali di tipo asimmetrico tra cromosomi non omologhi, riarrangiamenti del tipo traslocazioni e inversioni, sia sporadici che clonali, che coinvolgono preferenzialmente i cromosomi 7 e 14, con punti di rottura in 7p15, 7q35, 14q11-12, 14q32. Questi riarrangiamenti sono presenti nel 2-100% dei linfociti T di alcuni pazienti. La frequenza delle cellule con aberrazioni varia tra 10% e 50%.

Al fine di valutare l'instabilità cromosomica spontanea e indotta si deve eseguire il confronto tra il numero delle anomalie osservate nel campione in studio e quello di un controllo normale valutando 50-100 metafasi. Poiché alcuni soggetti non rispondono o hanno risposte intermedie all'irradiazione, dovrebbero essere anche controllate 50 metafasi con bandeggio, alla ricerca di riarrangiamenti coinvolgenti i loci del recettore dell'antigene delle cellule T sui cromosomi 7 e 14.

8.4.4. Sindrome di Nijmegen (NBS) (OMIM: 251260)

L'instabilità cromosomica delle cellule dei pazienti con NBS aumenta dopo esposizione delle cellule alle radiazioni ionizzanti e al radiomimetico bleomicina e agli agenti clastogeni, come la mitomicina C (MMC) e il diepossibutano (DEB). Di conseguenza lo studio dei soggetti con sospetta NBS dovrebbe includere un test di sensibilità alle radiazioni. Tale sensibilità viene in genere misurata mediante test di sopravvivenza effettuati su linfociti o fibroblasti ma può anche essere valutata tramite indagini citogenetiche.



La diagnosi genetica viene confermata mediante analisi molecolare per la ricerca di mutazioni nel gene NBN, le cui mutazioni in omozigosi si riscontrano nella quasi totalità dei pazienti.

I soggetti con NBS presentano una instabilità cromosomica spontanea che interessa prevalentemente i cromosomi 7 e 14. La frequenza delle anomalie varia tra 5% e 22% delle metafasi. Si tratta di rotture cromatidiche e cromosomiche e di anomalie strutturali.

Al fine di valutare l'instabilità cromosomica indotta, si raccomanda di allestire colture addizionate con bleomicina e confrontare il numero delle rotture spontanee e indotte osservate nel campione in esame e in un controllo normale allestiti contemporaneamente.

8.4.5. **Sindrome di Werner (WS)** (OMIM: 277700)

La diagnosi si basa sull'analisi molecolare del gene WRN, in combinazione con le analisi in Western blot, che mostrano l'assenza della proteina WRN normale.

Nelle cellule dei pazienti si osservano rotture cromatidiche e cromosomiche, frammenti e cloni con anomalie strutturali di vario tipo, ad esempio delezioni e traslocazioni multiple. Questo quadro citogenetico è stato designato come *variegated translocation mosaicism* (VTM). Le anomalie sono presenti soprattutto nei fibroblasti, ma sono state osservate anche nei linfociti, con una frequenza compresa tra l'11% e il 20% delle cellule.

8.4.6. **Sindrome da Instabilità Centromerica e Anomalie Facciali (ICF)** (OMIM: 242860)

L'instabilità cromosomica di questi pazienti coinvolge l'eterocromatina pericentromerica dei cromosomi 1, 9 e 16 e consiste in despiralizzazioni, delezioni, associazioni tra cromosomi omologhi e non omologhi e interscambi tra queste regioni, con la formazione di figure a bracci multipli (*multibranch configurations*). Queste anomalie, presenti preferenzialmente nei linfociti, ricorrono con frequenze variabili (16%-90% delle cellule) e interessano per lo più i cromosomi 1 e 16, singolarmente o in associazione, ma anche il cromosoma 9. I pazienti hanno inoltre la tendenza a formare micronuclei.

Per l'analisi dovrebbero essere analizzate 50 metafasi con bandeggio alla ricerca di anomalie dell'eterocromatina dei cromosomi 1, 9, 16 e di figure a bracci multipli.

8.4.7. **Sindrome di Roberts (RS)** (OMIM: 268300)

La diagnosi citogenetica risulta di grande utilità dopo un sospetto clinico di RS e, in particolare, diventa dirimente nelle condizioni cliniche meno marcate. La ricerca di varianti patogenetiche bialleliche del gene ESCO2 conferma la diagnosi.

Il fenotipo citogenetico patognomonico della RS è rappresentato dalla prematura separazione dei centromeri/repulsione eterocromatica. Tale condizione è visibile nei preparati citogenetici come *puffing* dei centromeri e delle regioni eterocromatiche pericentromeriche con conseguente formazione di cromosomi



mitotici a cromatidi separati disposti in parallelo (*railroad track chromosomes*) per l'assenza della costrizione primaria. Il *puffing* dei centromeri presenta una distribuzione non casuale prevalentemente a carico dei cromosomi 1, 9, 16 con un numero variabile da cellula a cellula, mentre il cromosoma Y si presenta con una tipica conformazione aperta per la repulsione eterocromatica della porzione distale del braccio lungo.

L'analisi citogenetica da linfociti periferici, dovrebbe valutare la presenza di *puffing* dei centromeri (per i cromosomi metacentrici) e *split* dei centromeri (per i cromosomi acrocentrici) su 50 metafasi in bande C o *block-stained* (colorazione Giemsa convenzionale) e 50 metafasi dovrebbero essere conteggiate per la ricerca di aneuploidie. Il bandeggio routinario GTG non mette in evidenza le caratteristiche citogenetiche peculiari della RS, in tal caso un sospetto può essere posto per la separazione cromatidica a livello del braccio lungo del cromosoma Y.

8.4.8. **Sindrome da Aneuploidia variegata a mosaico (MVA) (OMIM: 257300)**

Questa sindrome presenta un fenotipo cromosomico caratterizzato da diverse aneuploidie presenti in quasi tutte le cellule (trisomie, doppie trisomie e monosomie) dovute alla prematura separazione dei centromeri durante le divisioni cellulari.

8.5. **Disomia uniparentale (UPD)**

Il termine disomia uniparentale (UPD) definisce l'eredità di due cromosomi omologhi da un solo genitore ed è causata principalmente da eventi di non-disgiunzione/*lagging* anafasico attraverso i quali vengono corrette le trisomie o le monosomie.

La UPD viene classificata come materna o paterna, a seconda dell'origine parentale del cromosoma interessato. In particolare può presentarsi come eterodisomia uniparentale (hUPD), isodisomia uniparentale (iUPD) o UPD segmentale.

La UPD è legata in circa il 2,3% dei casi, al riscontro di un mosaicismo placentare o fetale in combinazione con una linea trisomica. La UPD è associata alla presenza di un cariotipo normale in circa il 65% dei casi, ad un'anomalia cromosomica sbilanciata nel 16% e ad un'anomalia bilanciata nell'8% circa (Liehr et al., 2010).

La UPD per la maggioranza dei cromosomi è priva di effetto fenotipico, mentre si associa a fenotipo patologico in caso di:

- a. UPD di interi cromosomi o segmenti cromosomici che contengono geni *imprinted*. In particolare, la UPD si associa ad un effetto fenotipico specifico nei seguenti casi:
 - UPD6 paterna: Transient Neonatal Diabetes Mellitus (TNDM);
 - UPD7 materna: Sindrome di Silver-Russell (SRS);
 - UPD11 paterna: Sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS);
 - UPD14 materna: Sindrome di Temple (TS);
 - UPD14 paterna: Sindrome di Kagami-Ogata (KOS);
 - UPD15 paterna: Sindrome di Angelman (AS);



- UPD15 materna: Sindrome di Prader-Willi (PWS) ;
 - UPD20 materna: Sindrome di Mulchandani-Bhoj-Conlin (MBCS); Sindrome di Silver Russel (SRS)
 - UPD 20 paterna: Pseudoipparatiroidismo (PHP)
- b. UPD coinvolgente un cromosoma, o un segmento cromosomico, che contiene una variante patogenetica in eterozigosi di un gene responsabile di malattia autosomica recessiva (solo nel caso di isodisomia con conseguente omozigosi). UPD di un cromosoma X con mutazione per malattia X-linked recessiva nelle femmine.

8.5.1. Tecniche di analisi in pre- e post-natale

I protocolli per la ricerca di UPD prevedono analisi dei microsatelliti, SNPs, SNPs-array, Southern Blotting e tecniche di analisi dello stato di metilazione. Hanno lo scopo di evidenziare l'aplotipo del probando in relazione a quello dei genitori e/o di riconoscere lo stato di metilazione degli alleli. L'uso di SNPs-array può essere il metodo di scelta per identificare la iUPD nei cromosomi non *imprinted* per il riconoscimento dei geni recessivi all'interno della regione coinvolta.

È opportuno che risultati non informativi o dubbi siano approfonditi attraverso la conferma/esclusione di paternità o altre tecniche di indagine (es.: array-CGH/SNP per discriminare la UPD segmentale dalla delezione).

Nei casi in cui venga eseguita mediante analisi dei microsatelliti, l'analisi per la ricerca di UPD necessita di un campione di DNA del probando e un campione di DNA di entrambi i genitori. In caso di malattie recessive in cui i genitori non risultino entrambi eterozigoti per la mutazione identificata nel probando può essere utile la conferma della paternità.

In ambito prenatale, il DNA fetale può essere ottenuto da campioni di villi coriali, liquido amniotico e sangue fetale. Nel caso del riscontro sui villi coriali di anomalie in cui sono coinvolti cromosomi *imprinted* e ove sia previsto un successivo controllo sul liquido amniotico, il tessuto d'elezione per la ricerca della UPD sono gli amniociti. Nei casi di mosaicismo di I livello individuato con il metodo diretto (singola cellula), il mesenchima stesso può essere considerato come tessuto per l'approfondimento UPD.

In ambito postnatale, il DNA per l'analisi di UPD può essere ottenuto da campioni di sangue periferico, biopsia cutanea, mucosa buccale, saliva, urine.

Si raccomanda di non utilizzare per la ricerca di UPD tessuti che presentino dei mosaicismi, anche se in bassa percentuale.

8.6. Ibridazione In Situ Fluorescente (FISH)

La FISH consente di identificare i riarrangiamenti submicroscopici non visibili con le tradizionali tecniche di citogenetica. Questa metodica viene utilizzata in casi selezionati, per verificare sospetti diagnostici di sindromi da microdelezione/microduplicazione o per la caratterizzazione di anomalie cromosomiche e per la ricerca rapida di mosaicismi. La FISH non costituisce un'alternativa all'analisi del cariotipo, poiché indaga solo ciò che è relativo alla regione riconosciuta dalla sonda



Non è necessario confermare con la FISH tutte le anomalie osservate al cariotipo, ma è opportuno utilizzarla per caratterizzare i riarrangiamenti dubbi che possono avere un significato diagnostico o prognostico. La FISH può essere appropriata per la caratterizzazione di anomalie cromosomiche classiche, qualora queste si presentino in un contesto atipico.

L'intensità del segnale fluorescente è variabile e dipende da diversi fattori, come il polimorfismo delle sequenze ripetute (es.: sequenze alfoidi) e la qualità o l'invecchiamento del preparato. Se si analizza una delezione o un riarrangiamento, il migliore controllo dell'avvenuta ibridazione è il cromosoma omologo normale. Un ulteriore controllo può essere offerto co-ibridando una sonda per un locus diverso sullo stesso o su un altro cromosoma. In alternativa, qualora si utilizzi una sonda che non abbia un segnale di controllo interno, è opportuno che il Laboratorio adotti altri CQI, quale ad esempio l'inserimento nella seduta analitica di un campione noto.

Quando si utilizzano sonde non commerciali, è necessario adottare i criteri utili a prevenire possibili contaminazioni da DNA. Ogni nuovo lotto di sonde non commerciali da utilizzare a scopo diagnostico deve essere sottoposto a validazione secondo criteri interni stabiliti dal laboratorio. Questa comporta comunque il controllo di:

- a) specificità del target: consiste nel verificare che la sonda sia idonea a identificare l'alterazione cromosomica responsabile della patologia in studio (es.: mappare all'interno della regione critica di una determinata sindrome);
- b) sensibilità analitica (% di metafasi o nuclei interfasici con il pattern di ibridazione atteso);
- c) specificità analitica (% di segnali che ibrida con il locus corretto).

Nel caso di sonde commerciali i requisiti sono garantiti dalla ditta produttrice/fornitrice.

Il numero di cellule da analizzare dipende dall'indicazione all'analisi FISH e dalla possibilità che siano presenti mosaicismi. In Tabella 4 è riportato il numero minimo di cellule che si raccomanda di analizzare.



Tabella 4: Numero minimo di cellule da analizzare per ogni sonda/set di sonde FISH.

FISH	Analisi
FISH per caratterizzazione riarrangiamento strutturale/ricerca microdelezioni	5 metafasi
FISH “multiprobe” per ricerca riarrangiamenti subtelomerici	3 metafasi
FISH per ricerca mosaicismo	100 nuclei/metafasi
FISH interfascica per ricerca microduplicazioni	100 nuclei
FISH interfascica per la ricerca di aneuploidie in diagnosi prenatale	50 nuclei per sonda/set di sonde

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

- **Sonde alfoidi:** per caratterizzare marcatori cromosomici, valutare mosaicismi cromosomici e l'eventuale spostamento dei centromeri canonici e/o per localizzare quelli in sovrannumero.
- **Sonde painting cromosoma-specifiche:** per caratterizzare marcatori cromosomici e traslocazioni bilanciate/sbilanciate. Queste sonde, non sempre disperse uniformemente lungo il cromosoma bersaglio, possono non essere idonee ad identificare piccoli riarrangiamenti. La risoluzione di queste sonde è al massimo di 5 Mb.
- **Multiplex-FISH (M-FISH) e Spectral Karyotyping (SKY):** per caratterizzare con un singolo esperimento multiprobe marcatori cromosomici, traslocazioni e riarrangiamenti cromosomici complessi. I risultati dovrebbero essere confermati con sonde specifiche per i cromosomi coinvolti nel riarrangiamento.
- **Sonde a singola copia:** per caratterizzare riarrangiamenti cromosomici bilanciati e/o sbilanciati, per diagnosticare patologie da microdelezione/microduplicazione, per confermare microdelezioni/microduplicazioni osservate alla CMA, per escludere/evidenziare riarrangiamenti strutturali predisponenti nei genitori di probandi con microdelezioni/microduplicazioni evidenziate alla CMA. Per la corretta identificazione della coppia di cromosomi in esame è preferibile usare la contro-colorazione DAPI e/o abbinare una sonda di controllo.
- **Sonde subtelomeriche cromosoma-specifiche:** per diagnosticare riarrangiamenti bilanciati e sbilanciati coinvolgenti le regioni subtelomeriche, identificare o confermare riarrangiamenti coinvolgenti le regioni subtelomeriche e per caratterizzare traslocazioni bilanciate e sbilanciate. Sono stati descritti casi di mancata ibridazione di una sonda imputabile a delezioni polimorfiche nelle regioni bersaglio (es.: 2qtel). In questi casi l'analisi dei genitori e l'impiego di sonde locus-specifiche più prossimali possono dirimere eventuali dubbi interpretativi.

8.6.1. FISH interfascica

La FISH interfascica può essere effettuata utilizzando sonde alfoidi, subtelomeriche e/o locus-specifiche.

Prima di offrire questa tecnica nella routine diagnostica, si ritiene utile che ciascun laboratorio stabilisca un proprio standard sia per la classificazione delle osservazioni sia per l'interpretazione dei risultati. La ricerca di



aneuploidie nei nuclei interfascici, infatti, comporta notevoli difficoltà nell'interpretazione dei risultati: il numero dei segnali nelle cellule interfasiche può variare e alcuni nuclei, anche se normali, potrebbero non presentare due segnali. Lo standard dovrebbe essere costruito analizzando campioni positivi e negativi noti. Occorre allestire preparati di nuclei non coltivati con elevati standard di qualità. Un mosaicismo di basso livello (<10%) deve essere interpretato con cautela poiché potrebbe rientrare nei limiti della tecnica e della sensibilità della sonda utilizzata.

Le analisi di FISH interfascica dovrebbero essere valutate indipendentemente da due operatori.

8.6.1.1. FISH interfascica per l'analisi rapida delle aneuploidie 13, 18, 21, X, Y in diagnosi prenatale

La FISH sugli amniociti non coltivati può essere utilizzata per la ricerca rapida delle aneuploidie dei cromosomi 13, 18, 21, X e Y. Inoltre può essere utilizzata su villi coriali e su linfociti fetali nel caso in cui siano assenti metafasi o per estendere l'analisi. L'eventuale utilizzo in preparati di villi coriali deve tener conto della possibile presenza di contaminazione da parte di cellule materne.

Il test si basa sull'utilizzo di sonde che riconoscono:

- sequenze alfoidi o altre sequenze ripetute per il riconoscimento dei cromosomi X, Y e 18;
- sequenze a singola copia per il riconoscimento di regioni specifiche di cromosomi 13 e 21.

Questa indagine non costituisce un'alternativa all'analisi completa del cariotipo, ma è un test parziale che può essere utile qualora venga richiesta una diagnosi specifica urgente.

8.6.1.1.1. Lettura e interpretazione dei risultati

Per la lettura e l'interpretazione dei risultati si raccomanda quanto segue:

- devono essere analizzati solamente i nuclei integri, non sovrapposti e con contorni facilmente identificabili;
- devono essere valutati un minimo di 50 nuclei interfascici in cui si riconoscano i segnali per ciascuna sonda utilizzata. Nei casi di ambiguità di lettura (es.: mosaici) si deve estendere l'analisi ad un numero maggiore di nuclei; ogni laboratorio dovrebbe definire le proprie soglie di lettura (inclusa la qualità dei segnali ed il numero dei nuclei marcati sul totale dei nuclei presenti);
- si devono seguire i protocolli forniti dalle ditte per quanto attiene alle sonde commerciali, oppure protocolli standardizzati nei casi in cui vengano utilizzate sonde non commerciali. Qualora vengano utilizzate sonde non commerciali, è necessario applicare le verifiche che ne garantiscano la sensibilità e la specificità. È comunque buona norma affiancare casi-controllo per tutte le sonde utilizzate.

È sconsigliato eseguire il test nei casi in cui il liquido amniotico presenti contaminazione evidente da sangue materno e nel caso l'analisi venga effettuata comunque, il referto deve riportare i limiti di un test effettuato su un campione ematico.



8.6.2. FISH su metafasi

La FISH su metafasi può essere effettuata utilizzando sonde alfoidi, painting, locus-specifiche e/o subtelomeriche.

Per il numero delle metafasi da analizzare vedi Tabella 4.

8.6.3. Caratterizzazione di marcatori cromosomici

Nel caso di riscontro di marcatori cromosomici, occorre:

1. definirne morfologia e struttura con tecniche di bandeggio e/o colorazioni differenziali che possano essere di aiuto nell'indirizzare eventuali successivi approfondimenti;
2. identificarne l'origine cromosomica ed il contenuto genico con analisi microarray, se la percentuale di cellule con marcatore cromosomico è almeno del 30% e le sue dimensioni sono tali da sospettare la presenza di eucromatina non solo pericentromerica;
3. quando non è possibile l'utilizzo della CMA, indagarne l'origine cromosomica con FISH (si suggerisce di seguire lo schema riportato nella Fig. 2);
4. in epoca prenatale si raccomanda di valutare la possibile presenza di UPD qualora il marcatore cromosomico origini dai cromosomi 6, 7, 11, 14, 15 e 20; in diagnosi postnatale le indagini per UPD sono indicate a seconda del quadro clinico/fenotipico.

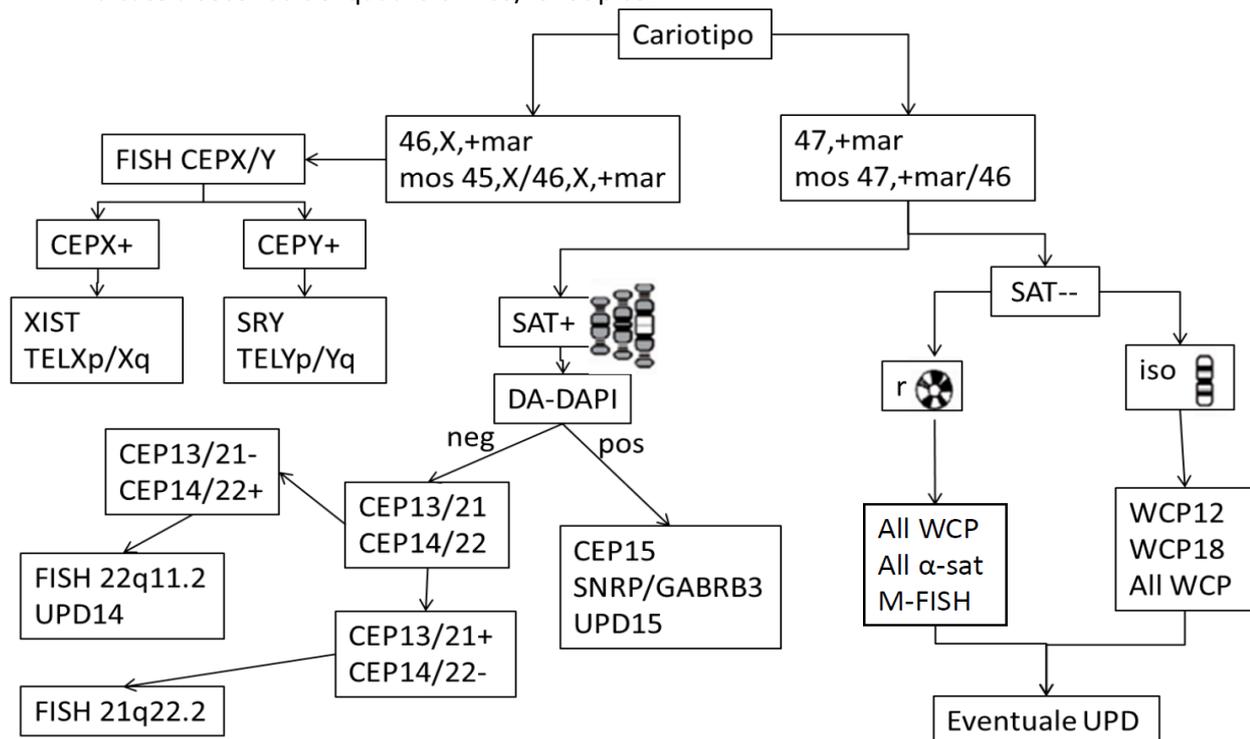


Figura 2: Schema riassuntivo per una corretta caratterizzazione di un marcatore cromosomico in assenza di risultato di CMA



9. QF-PCR (Quantitative Fluorescent-PCR) in diagnosi prenatale

L'analisi consiste nell'amplificazione e successiva rilevazione di sequenze ripetute cromosoma-specifiche (*Short Tandem Repeats* o STR), di seguito riportate come microsatelliti, con primer marcati con fluorocromi. Il numero degli alleli identificati per i diversi microsatelliti, quantificati calcolando il rapporto delle aree/altezze dei picchi, consente di estrapolare il numero dei cromosomi presenti nei campioni analizzati, mentre la tipologia degli alleli identificati permette il confronto degli stessi con quelli di altri campioni. Per il disegno, le specifiche del test ed i criteri per l'analisi dei dati fare riferimento alle linee-guida dell'ACGS (*Association for Clinical Genomic Science; Mann et al., updated 2018*).

La QF-PCR è un test diagnostico che viene utilizzato principalmente in diagnosi prenatale per la ricerca rapida della aneuploidie dei cromosomi 13, 18, 21, X e Y. Nel caso di impiego su campioni di villi coriali è tuttavia necessario interpretare clinicamente i risultati nel contesto delle caratteristiche embriologiche del tessuto analizzato, come discusso nel capitolo 8.2.1 relativo all'analisi su villi coriali.

La QF-PCR può anche essere impiegata su materiale abortivo, nel quale, considerata la frequenza delle aneuploidie negli aborti spontanei, si raccomanda, oltre ai cromosomi 13, 18, 21, X e Y, di estendere l'analisi ai cromosomi 15, 16 e 22 (Donaghue C. et al. 2017). Inoltre può essere utilizzata per la verifica di una possibile contaminazione materna nei tessuti fetali e può dare informazioni sulla zigosità nelle gravidanze gemellari.

Questa metodica è un'analisi "targettata" che fornisce informazioni limitate ai soli loci dei microsatelliti utilizzati, non è in grado di identificare aneuploidie parziali, tetraploidie e riarrangiamenti strutturali e pertanto non sostituisce l'analisi del cariotipo. Nel caso di riscontro di aneuploidia, è indicata l'analisi del cariotipo per evidenziare eventuali anomalie strutturali ed eventualmente estendere l'analisi ai genitori.

La QF-PCR può rilevare la presenza di mosaicismo per i cromosomi indagati, ma non è l'esame appropriato per la ricerca, esclusione, quantificazione o definizione del livello di un mosaico (vedi par. 9.2.2.).

9.1. Caratteristiche del campione

La QF-PCR può essere eseguita a partire da qualsiasi tessuto, prenatale o postnatale, da cui sia possibile estrarre DNA, includendo, nel caso del materiale abortivo, anche campioni con cellule non vitali e quindi non più idonei per l'analisi del cariotipo.

Relativamente alla diagnosi prenatale su villi coriali, si raccomanda, ove possibile, di effettuare l'estrazione del DNA partendo da almeno due frammenti diversi di tessuto, in modo da avere una maggiore rappresentatività del campione fetale.

Cellule di origine materna, derivanti da residui di sangue o decidua, possono contaminare il campione e dare origine a risultati non informativi. Pertanto, nella valutazione del campione da analizzare, si raccomanda di prestare particolare attenzione alla possibilità di contaminazione materna, in particolare per campioni di liquido amniotico fortemente ematici, campioni di villi coriali e campioni di tessuto abortivo (vedi par. 9.2.4).



Insieme al campione fetale può essere utile la raccolta anche di un campione materno (sangue o mucosa buccale) per eventuali indagini di comparazione tra polimorfismi madre/feto (esclusione di contaminazione del DNA fetale con DNA di origine materna, conferma di identità di campioni fetali con risultato patologico) (vedi par. 9.2.4).

9.2. Interpretazione dei risultati

In base alle indicazioni all'analisi gli esiti possono permettere di ottenere informazioni con diversa utilità clinica (vedi par. 7.1.3).

9.2.1. Campione disomico, aneuploide o triploide

In base all'analisi dell'elettroferogramma viene valutata la presenza di un assetto disomico o aneuploide per i cromosomi indagati. I risultati possono evidenziare un assetto:

Normale: per interpretare un risultato di QF-PCR come normale è necessario che ciascun cromosoma presenti almeno 2 microsatelliti informativi con un pattern biallelico, anche se tutti gli altri microsatelliti sono non-informativi.

Aneuploide: per interpretare un risultato di QF-PCR come aneuploide è necessario che siano presenti almeno 2 microsatelliti informativi compatibili con un genotipo aneuploide, anche con gli altri marcatori che risultano non-informativi. Non è possibile interpretare un risultato come aneuploide basandosi su un solo microsatellite. La presenza di tre diversi alleli in uno o più marcatori è indicativa di non-disgiunzione meiotica all'origine della linea trisomica.

Triploide: è suggestiva di triploidia la presenza nella QF-PCR di pattern trisomici per tutti gli autosomi analizzati, con rapporti allelici 1:1:1, 1:2 o 2:1, ed il riscontro di tre cromosomi X o 2 cromosomi X ed un cromosoma Y o un cromosoma X e due cromosomi Y.

9.2.2. Campione a mosaico

La QF-PCR può rilevare la presenza di mosaicismi cromosomici purché non siano in bassa percentuale, ma non è l'esame appropriato per la ricerca, esclusione o quantificazione di un mosaico.

L'analisi QF-PCR può permettere di rilevare un mosaicismo qualora si rilevi la presenza di extra picchi o di rapporti allelici anomali (non conclusivi) nei microsatelliti di un cromosoma. Il mosaicismo può essere più facilmente identificato in presenza di assetto triallelico, al contrario un mosaicismo con assetto diallelico è più difficilmente discriminabile, così come un mosaicismo per monosomia X.

Questi risultati possono non essere facilmente evidenziabili in quanto i rapporti allelici possono rimanere nel range normale o aneuploide, o avere valori intermedi *borderline*, soprattutto se il mosaico non è molto rappresentato. In presenza di sospetto mosaicismo, si raccomanda di rimandare all'analisi del cariotipo. Per considerare il risultato di una QF-PCR come mosaicismo occorre che i valori dei rapporti allelici siano interpretabili come indicativi della presenza di un mosaico e siano confermati nella ripetizione dell'analisi.



Anche se raramente, sui campioni di villi coriali si possono ottenere risultati completamente discrepanti tra la QF-PCR e il cariotipo, a causa di mosaicismi confinati alla placenta. Si raccomanda di analizzare con QF-PCR il DNA estratto da campioni sottoposti a disgregazione e quindi rappresentativi dell'intero tessuto. Nei casi in cui l'analisi del CVS con il metodo diretto sia sostituita, nella pratica di laboratorio, da quella mediante QF-PCR, si deve ricordare che un profilo normale di QF-PCR in presenza di un cariotipo normale su coltura a lungo termine non permetterà di escludere la presenza nel citotrofoblasto di aneuploidie a mosaico non sufficientemente rappresentate, di un'aneuploidia non indagata dalla QF-PCR o di un'anomalia cromosomica strutturale. Parimenti, un profilo di QF-PCR patologico, pur in presenza di un cariotipo su coltura a lungo termine omogeneamente aneuploide, non sarà dirimente nel distinguere sul citotrofoblasto tra la presenza di un'anomalia omogenea o di una a mosaico in alta percentuale. Per tali ragioni, nell'indagine citogenetica su villi coriali, la combinazione di QF-PCR e metodo della coltura a lungo termine ha minori capacità nell'individuare eventuali mosaicismi, rispetto all'abbinamento di metodo diretto e coltura con conseguente maggior rischio di una non corretta classificazione della costituzione fetale.

9.2.3. Campione con aneusomia segmentale

Una discordanza dei risultati di QF-PCR (normale/aneuploide) nella regione prossimale o distale di un cromosoma potrebbe essere indicativa della presenza di un'anomalia cromosomica parziale. In tali casi si raccomanda di rimandare ad approfondimenti con altre tecniche (es.: cariotipo, FISH locus specifiche, CMA) poiché la QF-PCR non è l'esame appropriato per la caratterizzazione di tali riarrangiamenti.

9.2.4. Contaminazione materna

La presenza di contaminazione materna può inficiare i risultati delle analisi prenatali. L'analisi di microsatelliti tramite QF-PCR può rilevare l'eventuale presenza di DNA di origine materna nel campione fetale in esame. Il confronto tra il DNA estratto dal tessuto fetale e quello estratto da un campione materno (es.: sangue, mucosa buccale) permette di confermare tale evento. In analogia con i criteri per la ricerca delle aneuploidie mediante QF-PCR, si raccomanda per la valutazione dei risultati un numero minimo di 2 microsatelliti informativi.

Qualora l'indagine QF-PCR venga eseguita per la valutazione della contaminazione materna, ogni laboratorio deve stabilire la soglia superata la quale il livello di contaminazione sia da considerarsi significativo e debba essere segnalato.

Nei casi di liquido amniotico fortemente ematico, villo coriale e materiale abortivo, in cui i risultati della QF-PCR evidenzino un genotipo femminile e una condizione di normalità per tutti i cromosomi indagati, è opportuno escludere una possibile contaminazione massiva da parte di tessuti di origine materna, tranne nei casi in cui vi sia la certezza dell'origine fetale del campione (es.: cute fetale).

9.2.4.1. Campioni ematici di liquido amniotico

L'analisi QF-PCR può essere eseguita su campioni di liquido amniotico ematici con i seguenti accorgimenti e limiti: se il genotipo è femminile, si deve escludere una possibile contaminazione materna mediante confronto con un campione di DNA materno; il riscontro di 2 genotipi, di cui almeno uno femminile, è compatibile con la



presenza di una contaminazione materna, che sarebbe opportuno verificare mediante confronto con i polimorfismi STR materni e segnalata nel referto.

Il risultato della QF-PCR può essere interpretato solo se il livello di contaminazione è basso e i rapporti allelici nei microsatelliti del genotipo fetale sono interpretabili (assenza di range intermedi). Se il campione materno non è disponibile, i risultati della QF-PCR non dovrebbero essere interpretati. Alternativamente il referto deve includere chiaramente i limiti interpretativi del test effettuato.

9.2.4.2. Campioni di villi coriali

I campioni di villi coriali di bassa qualità o nei quali la decidua sia stata rimossa in modo incompleto possono essere contaminati da tessuto materno. Se ne raccomanda la segnalazione sul foglio di lavoro.

Nei campioni di QF-PCR con genotipo femminile normale si raccomanda fortemente il confronto con un campione materno per escludere possibili contaminazioni.

Il riscontro di 2 genotipi, di cui almeno uno femminile, è compatibile con una contaminazione materna, che va verificata con il confronto con i polimorfismi STR materni e segnalata nel referto. Il risultato della QF-PCR può essere interpretato solo se il livello di contaminazione è basso e i rapporti allelici nei microsatelliti del genotipo fetale sono interpretabili (assenza di range intermedi). Tale condizione può rendere inattendibile anche il cariotipo sulla coltura di mesoderma qualora sia riscontrato un assetto femminile normale.

9.2.4.3. Campioni di materiale abortivo

Il DNA estratto dagli annessi embrionali (es.: villi coriali, sacco amniotico) o dalle colture cellulari a lungo termine dei campioni di materiale abortivo può essere contaminato dal tessuto materno. In caso i risultati della QF-PCR evidenzino un genotipo femminile normale si raccomanda il confronto con un campione materno per escludere possibili contaminazioni. Il riscontro di 2 genotipi, di cui almeno uno femminile è compatibile con una contaminazione materna che va verificata mediante il confronto con i polimorfismi STR materni e segnalata nel referto. Il risultato della QF-PCR può essere interpretato solo se il livello di contaminazione è basso e i rapporti allelici nei microsatelliti del genotipo fetale sono interpretabili (assenza di range intermedi). Tale condizione può rendere inattendibile anche l'analisi del cariotipo sulle colture degli stessi tessuti.

9.2.5. Zigosità

In caso di gravidanza gemellare, l'analisi QF-PCR può dare informazioni sulla zigosità. Due elettroferogrammi con risultati identici sono indicativi di campioni con stesso genotipo. Tale esito è generalmente compatibile con gemelli monozigoti; tuttavia, in caso di errore di campionamento, lo stesso esito potrebbe essere compatibile anche con un doppio prelievo dallo stesso gemello. Al contrario, genotipi che condividono solo parte dei microsatelliti sono indicativi di gemelli dizigotici. La probabilità di evidenziare profili con genotipo diverso è correlata al numero di marcatori testati ed al grado di consanguineità dei genitori.



10. Analisi mediante Microarray Cromosomico (CMA)

I *microarray* genomici sono matrici di frammenti di DNA fissati su supporti solidi che rappresentano il genoma, con una risoluzione che dipende dalla lunghezza delle sequenze, dalla loro distanza relativa (densità) e distribuzione lungo il genoma, che attualmente vengono largamente usati per l'analisi genomica di microdelezioni/microduplicazioni (CNV: *Copy Number Variations*).

L'analisi si basa o sul principio della *Comparative Genomic Hybridization* (CGH-array o aCGH) tra il campione di DNA del soggetto da analizzare e un DNA di controllo o "di riferimento", marcati con fluorocromi differenti oppure sul confronto dell'intensità di fluorescenza del DNA in esame con quella misurata in un set di esperimenti analoghi, eseguiti utilizzando un gruppo di DNA di riferimento, come per i *Single Nucleotide Polymorphisms* o *SNPs* (SNP-array).

Le piattaforme comunemente utilizzate includono gli oligo-array, gli SNP-array e gli oligoSNP-array che permettono un'analisi *whole genome*, ad eccezione delle regioni contenenti DNA altamente ripetitivo (regioni eterocromatiche, telomeri, satelliti e il braccio corto dei cromosomi acrocentrici).

Esistono inoltre piattaforme *targeted* che sono disegnate per analizzare regioni specifiche del genoma (ad es: regioni subtelomeriche; regioni associate a sindromi da microdelezione e/o microduplicazione) al fine di limitare i risultati di significato incerto (VOUS - *Variants Of Unknown Significance*).

Si sottolineano alcuni aspetti fondamentali connessi all'impiego di queste piattaforme:

- a) non consentono di determinare il numero assoluto di copie, ma piuttosto il numero relativo di copie rispetto al DNA di riferimento e non consentono di identificare riarrangiamenti bilanciati e mosaicismi in bassa percentuale;
- b) le piattaforme che includono SNP consentono di identificare triploidie e regioni di omozigosità (ROH), suggestive della presenza di condizioni di disomia uniparentale e di consanguineità. L'isodisomia uniparentale (iUPD) di un cromosoma viene rilevata come mancanza di eterozigosità dell'intero cromosoma, mentre la UPD può essere sospettata anche in presenza di una estesa ROH terminale o interstiziale, quale regione di isodisomia in un pattern di eterodisomia(hUPD)/isodisomia uniparentale (iUPD), o mixUPD. Una ROH terminale può anche suggerire la presenza di UPD segmentale. L'eterodisomia uniparentale completa, in assenza di regioni in iUPD, che rappresenta fino a 1/3 dei casi di hUPD (Hoppman et al., 2018), può essere rilevata invece solo mediante l'analisi del probando in combinazione con quella dei genitori. Il consenso informato pre-test deve includere il significato delle ROH, le loro eventuali implicazioni cliniche e la possibile individuazione di consanguineità.

L'identificazione delle CNV viene effettuata per mezzo di software e algoritmi, la cui efficienza dipende da alcuni parametri, come l'intensità di fluorescenza del DNA che si è legato alle sonde sull'array ed il rapporto tra l'intensità di fluorescenza ed il rumore di fondo. Questi valori dipendono dalla qualità del DNA di partenza e dal protocollo. La definizione dei parametri di qualità può variare a seconda del tipo di piattaforma utilizzata e del



protocollo sperimentale utilizzato. Per questo è difficile fissare parametri comuni a tutti i laboratori, sebbene nel caso di piattaforme commerciali sia la casa produttrice stessa ad indicare i parametri di qualità ottimali.

10.1. Procedure

È indispensabile che ogni laboratorio esegua internamente una verifica del protocollo e della piattaforma array scelta, da effettuarsi con l'analisi di almeno 5 campioni di controllo normali e altrettanti con sbilanciamenti noti, possibilmente di dimensioni e localizzazioni diverse. Sarebbe anche opportuno che ogni laboratorio eseguisse una serie di ibridazioni self/self nella aCGH (un esperimento di ibridazione nel quale si usa lo stesso DNA come campione e riferimento) o con una serie di repliche tecniche dell'esperimento negli oligoSNP-array. Teoricamente, in un esperimento di aCGH non dovrebbe essere presente alcuna anomalia genomica, mentre nel caso degli SNP-array il profilo genomico dovrebbe essere identico nelle due repliche. Tuttavia, nella pratica, dato che alcune sonde potrebbero non ibridare sempre in modo altamente specifico, si possono produrre risultati falsi positivi, anche in relazione alla qualità dell'esperimento.

Inoltre, è indispensabile effettuare una validazione del protocollo anche quando si introduce l'analisi su campione biologico diverso rispetto a quello utilizzato normalmente nel laboratorio.

Ogni laboratorio stabilisce, in base alla risoluzione della piattaforma utilizzata, il livello minimo di mosaicismi rilevabile. Può essere utile per il laboratorio che utilizza un approccio di array-CGH procedere all'analisi di campioni costituiti da concentrazioni decrescenti e note di una linea cellulare con una CNV già caratterizzata, per stabilire la concentrazione minima alla quale la CNV può essere identificata.

10.2. Risoluzione

La capacità di risoluzione di una piattaforma array nell'identificare sbilanciamenti genomici dipende dal numero delle sonde utilizzate, dalla distanza media relativa di sonde consecutive (*spacing*), dalla lunghezza delle sonde stesse e dagli algoritmi utilizzati per l'analisi dei dati. È ovvio che per ogni chiamata dell'algoritmo, a parità di numero di sonde consecutive sbilanciate, quanto minore è la dimensione di ogni sonda e la distanza relativa, tanto maggiore sarà la risoluzione dell'array e tanto più piccole le dimensioni delle anomalie che possono essere identificate. Tuttavia, la risoluzione effettiva di un array può essere diversa rispetto a quella teorica, poiché dipende dalla qualità dell'esperimento, dall'algoritmo e dai filtri utilizzati per l'analisi dei risultati. Il potere di risoluzione di un array è determinato quindi sia dal tipo di piattaforma scelta che dai criteri di analisi adottati. Ogni laboratorio dovrebbe documentare la risoluzione minima di ciascun tipo di microarray impiegato nella pratica clinica. La risoluzione effettiva deve essere riportata sul referto ed anche sull'informativa allegata al consenso.

In diagnosi postnatale, per l'analisi di soggetti con fenotipo suggestivo di patologia genomica, si raccomanda l'uso di array *whole genome* che garantiscano una risoluzione minima effettiva di circa 200 Kb.

In diagnosi prenatale si raccomanda di utilizzare una piattaforma o un filtro analitico che permettano di avere una risoluzione di circa 200 kb nelle regioni contenenti geni sensibili al dosaggio e/o geni-malattia e una risoluzione non maggiore di 500 kb nelle restanti regioni (*backbone*), per limitare l'identificazione di VOUS, a meno che non vengano riscontrate CNV di ridotta dimensione, ma con un chiaro significato patogenetico (es.



CNV intrageniche, anche a carico di geni recessivi, ma con suggestiva correlazione genotipo-fenotipo). Fanno eccezione le situazioni in cui l'indagine sia indicata per caratterizzare un riarrangiamento cromosomico *de novo* rilevato con l'analisi del cariotipo. In questo caso, la risoluzione deve essere scelta in base all'anomalia cromosomica rilevata (regioni cromosomiche coinvolte, geni presenti nella regione).

10.2.1. DNA di Riferimento

Le tecniche di analisi genomica basate su array non sono in grado di definire in valore assoluto il numero di copie di DNA presenti in un campione. Il dato è relativo e viene ottenuto in rapporto al DNA di riferimento. In teoria, un'anomalia identificata con un'analisi aCGH potrebbe essere attribuita sia al campione che al DNA di riferimento. Per differenziare le CNV associate all'uno o all'altro genoma, ogni laboratorio dovrebbe avere due diversi DNA di riferimento (oppure 2 *pool* ottenuti miscelando DNA di diversi soggetti), uno di sesso maschile e uno di sesso femminile. I DNA di riferimento non commerciali dovrebbero essere caratterizzati mediante una serie di ibridazioni con altri DNA ottenuti da soggetti normali, evidenziando e annotando le CNV che li caratterizzano. È necessario caratterizzare ogni nuovo set di DNA di riferimento, confrontandolo con quello precedente. È possibile utilizzare come DNA di riferimento anche DNA ottenuti da linee stabili, che possono essere caratterizzate una sola volta.

Nelle piattaforme per le quali l'analisi comparativa è di tipo informatico si possono utilizzare sia set di dati di riferimento forniti dalle ditte commerciali (ad es.: 270 campioni Hapmap), sia campioni normali analizzati con la stessa piattaforma e la stessa tipologia di array (minimo 50 soggetti equamente distribuiti tra i due sessi).

Ogni laboratorio deve stabilire e documentare i criteri di utilizzo del DNA di riferimento (insieme di campioni o singolo campione; comparabile o non comparabile per sesso) e riportare sul referto il DNA di riferimento utilizzato.

10.2.2. Accettazione campioni

È necessario che il campione del probando sia inviato corredato delle informazioni cliniche del paziente, in quanto risultano fondamentali per una corretta ed esaustiva interpretazione dei risultati dell'analisi.

In diagnosi prenatale, si raccomanda di richiedere contestualmente al campione fetale anche i campioni dei genitori. Nel caso di fecondazione eterologa (ovo/semi-donazione) non è necessario richiedere il campione del donatore. Poiché l'esame generalmente non richiede un'amplificazione di DNA, bassi livelli di contaminazione materna possono non influire sui risultati. Quindi l'esclusione della contaminazione materna può non essere necessaria nei casi in cui la CMA venga eseguita su liquido amniotico limpido, colture cellulari a cariotipo maschile. Se possibile, è utile mantenere una fiasca di coltura o conservare del materiale di riserva, nel caso siano necessari approfondimenti o test di conferma.

10.2.3. Fase analitica

È opportuno processare un campione di DNA ritenuto qualitativamente e/o quantitativamente non ottimale quando non sia possibile ripetere l'estrazione dal campione di partenza o quando non sia possibile o opportuno richiedere un nuovo prelievo.



Qualora la quantità di DNA sia esigua, è possibile ottenerne una quantità idonea mediante la *Whole Genome Amplification*, che deve avere criteri di esecuzione prestabiliti.

È possibile ibridare un campione la cui marcatura sia risultata qualitativamente e/o quantitativamente non ottimale, se non è possibile ripetere la marcatura sul DNA di partenza, purché se ne tenga conto nell'interpretazione dei risultati.

L'hardware e il software impiegati per la scansione e l'estrazione dei dati devono essere adatti al tipo di piattaforma utilizzata.

È opportuno che il software utilizzato per l'analisi sia in grado di produrre sia dati grafici che numerici.

I parametri del software di analisi devono essere stabiliti in modo da assicurare l'identificazione di sbilanciamenti di dimensioni uguali o maggiori a quelli specificati dal laboratorio per il tipo di piattaforma impiegata.

Ogni laboratorio stabilisce il metodo di normalizzazione utilizzato. Per le piattaforme commerciali si possono adottare sistemi di controllo di qualità inclusi di solito nei software analitici, mentre per le piattaforme *home-made* il laboratorio deve fissare i parametri e i criteri qualitativi degli esperimenti.

Ogni laboratorio valida l'algoritmo scelto per l'analisi e stabilisce il numero minimo di sonde necessarie e i valori di log-ratio (logaritmo, di solito in base 2, del rapporto delle fluorescenze) per l'identificazione delle CNV.

I parametri analitici vanno fissati in modo tale da garantire inequivocabilmente l'identificazione di CNV alla risoluzione riportata nel referto.

10.3. Interpretazione dei risultati

Per la sua stessa natura, la tecnologia dei microarray produce un numero significativo di risultati di difficile interpretazione.

Al fine di una classificazione oggettiva ed univoca delle CNV, l'*American College of Medical Genetics (ACMG)* e il *Clinical Genome Resource (ClinGen)* hanno sviluppato un sistema di classificazione semi-quantitativo basato su diverse evidenze, a ognuna delle quali viene assegnato un punteggio che permette di ottenere uno *score* finale (Riggs et al., 2020). Tali evidenze riguardano:

- 1) il contenuto genico;
- 2) la sovrapposizione a regioni associate a sindromi genomiche note e, per le microdelezioni, qualora disponibili, le previsioni di sensibilità al dosaggio dei geni contenuti, gli effetti funzionali della CNV;
- 3) il numero di geni inclusi;
- 4) la sovrapposizione fenotipica con pazienti presenti in letteratura, l'analisi di Database di pazienti e di soggetti normali quali *Database of Genomic Variants (DGV)*, ENSEMBL, DECIPHER, UCSC, OMIM, DATABASE di TROINA, etc;
- 5) la familiarità del/dei riarrangiamento/i identificato/i e l'anamnesi familiare.



Si raccomanda di classificare le CNV identificate mediante il sistema interpretativo recentemente proposto da ACMG e ClinGen (Riggs et al., 2020), anche senza l'adozione dello *score* finale. Tale sistema si basa su cinque classi di CNV:

- patogenetiche;
- probabilmente patogenetiche;
- significato incerto;
- probabilmente benigne;
- benigne.

10.3.1. CNV Patogenetiche

Includono:

- CNV che si sovrappongono a regioni associate a sindromi da microdelezioni/ microduplicazioni;
- CNV che si sovrappongono completamente ad una regione nota sensibile al dosaggio;
- CNV con penetranza ed espressione ben documentate riportate in più pubblicazioni che descrivono pazienti con fenotipo sovrapponibile;
- CNV multigeniche che includono almeno un gene sensibile al dosaggio, anche se gli altri geni hanno un significato incerto.

10.3.2. CNV Probabilmente patogenetiche

Includono:

- delezioni che coinvolgono l'estremità 5' e i primi esoni di geni aploinsufficienti (HI);
- delezioni che coinvolgono più esoni all'interno di un gene HI;
- delezioni che coinvolgono gli esoni terminali e l'estremità 3' di geni HI;
- delezioni o duplicazioni che coinvolgono geni con più casi riportati in letteratura che correlano con il fenotipo dei soggetti analizzati;
- CNV contenenti elementi regolatori noti e validati di geni malattia.

10.3.3. CNV a Significato incerto

Includono:

- CNV senza geni nell'intervallo genomico rilevato, di dimensione maggiore rispetto alla soglia stabilita dal laboratorio da indicare nell'informativa/referto;
- CNV descritta in un piccolo numero di casi nella popolazione generale, ma non ad una frequenza sufficientemente elevata da essere considerato un polimorfismo (>1%);
- CNV che contiene un piccolo numero di geni, ma non è noto se i geni nell'intervallo siano sensibili al dosaggio;
- CNV descritta in più pubblicazioni e/o database in modo contraddittorio, senza conclusioni definitive riguardo al significato clinico;
- CNV interna ad un singolo gene con un effetto poco chiaro sul frame di lettura della trascrizione.



10.3.4. CNV Probabilmente benigne

Includono:

- CNV comuni nella popolazione generale ma con una frequenza inferiore all' 1%;
- CNV con una forte evidenza che ne esclude il coinvolgimento in malattie mendeliane, ma senza prove sufficienti per affermarlo definitivamente;
- CNV senza geni nell'intervallo genomico rilevato, di dimensione minore rispetto alla soglia stabilita dal laboratorio.

10.3.5. CNV Benigne

Includono:

- CNV riscontrate nella popolazione generale con una frequenza pari o superiore all' 1%; definiti come polimorfismi benigni.

È importante considerare attentamente il dosaggio della CNV documentata come variante benigna, dato, ad esempio, che le duplicazioni di alcune regioni possono essere benigne, mentre le delezioni dello stesso intervallo possono avere rilevanza clinica.

Per l'interpretazione delle CNV basata sul sistema a score sopra descritto si possono anche consultare sistemi di predizione come:

- cnvcalc
- DECIPHER
- Franklin

E' opportuno inserire i dati delle CNV riscontrate, sia *de novo* che ereditate, nei database nazionali o internazionali. La raccolta di questi dati consente di ottenere dei riferimenti aggiornati sulla patogenicità delle CNV.

10.4. Rivalutazione delle VOUS nel tempo

La descrizione di ulteriori pazienti in letteratura o nei database e/o le predizioni di patogenicità possono modificare nel tempo la classificazione di CNV refertate come VOUS. Tale ri-classificazione può essere effettuata dal laboratorio stesso, nel momento in cui l'esperienza e le nuove conoscenze maturate nel tempo siano sufficienti a determinare una rivalutazione della CNV, o può essere effettuata su richiesta del genetista clinico. In questi casi è auspicabile emettere un nuovo referto, che faccia riferimento al precedente e lo sostituisca con la nuova classificazione.

Si raccomanda di inserire nel consenso al test la voce corrispondente alla possibilità di ricontattare il paziente allo scopo di aggiornarlo sul significato clinico e le implicazioni dei risultati.

10.5. Validazione delle CNV

Per limitare la possibilità di risultati falsi positivi si raccomanda l'uso di test di conferma soprattutto nei casi in cui la CNV abbia una ridotta estensione (ai limiti del potere risolutivo della piattaforma utilizzata) e che non si



sovrapponga a una regione già descritta in un microriarrangiamento (del/dup) o nel caso di campioni di partenza o esperimenti con parametri di qualità subottimali.

Ogni laboratorio definisce le tecniche e i protocolli di validazione per confermare le CNV. Possibili tecniche utili a confermare i risultati sono la FISH, la MLPA, la PCR quantitativa (q-PCR), il cariotipo, oppure la ripetizione dell'esperimento utilizzando la stessa piattaforma o una piattaforma differente. Inoltre, la presenza della stessa CNV in un genitore può essere considerata come validazione della CNV riscontrata nel probando (conferma intrafamiliare).

Le stesse tecniche di validazione (FISH, MLPA, q-PCR, cariotipo) possono essere utilizzate per l'analisi di segregazione sui genitori. In questo caso si raccomanda di validare prima la tecnica sul probando.

Le analisi quantitative (ad es: q-PCR) eseguite sui familiari non consentono di distinguere lo stato di portatore di riarrangiamento bilanciato da quello di normalità. Quando possibile, nell'estendere l'indagine ai familiari del probando, il laboratorio dovrebbe privilegiare le tecniche che sono in grado di definire i meccanismi di insorgenza dello sbilanciamento e precisarne i rischi di ricorrenza (es. FISH).

Nella verifica della segregazione di una CNV è consigliato, quando possibile, ricorrere a tecniche mirate all'analisi della sola regione in esame (MLPA, FISH, q-PCR) per evitare di incorrere in altre varianti parentali di potenziale difficile gestione e comunque non pertinenti con il quesito posto dall'analisi. Qualora, per ragioni tecniche o pratiche, per esempio in diagnosi prenatale, il laboratorio decidesse di procedere all'analisi dei genitori mediante microarray genomici, si consiglia di considerare solo il risultato relativo alle regioni di interesse (CNV riscontrate nel feto/probando), compatibilmente con quanto espresso nel consenso acquisito nell'ambito della consulenza genetica.

11. Refertazione

Il referto deve fornire una descrizione chiara e non ambigua dei risultati.

È opportuno, quando possibile, indicare la sindrome o la patologia nota associata al risultato. Occorre tenere presente che il referto può entrare a fare parte della cartella clinica di un soggetto e che quindi potrebbe essere visto non solo dal medico referente, ma anche da altri sanitari non esperti o dal soggetto stesso.

Il referto deve contenere le seguenti informazioni:

- identificazione dettagliata della struttura;
- data di ricezione del campione (e data del prelievo, se discordante);
- data del referto, corrispondente alla conclusione dell'analisi;
- identificazione del medico e/o della struttura che ha richiesto l'analisi;
- cognome e nome del paziente;
- data di nascita del paziente;
- sesso del paziente;
- codice identificativo del campione;



- tessuto esaminato (inclusivo della specifica se dopo coltura o su campione fresco per metodiche molecolari);
- indicazione all'analisi;
- dettagli della metodica utilizzata;
- formula definita secondo l'edizione più aggiornata dell'ISCN;
- spiegazione della formula, scritta in forma comprensibile anche ai non specialisti;
- limiti del test (ove pertinente per tipologia di analisi);
- note (eventuali);
- eventuali caratteristiche non conformi del campione analizzato quando possono avere influenze sul risultato (es. liquido amniotico ematico, quantitativo scarso di villi coriali, contaminazione materna, ...)
- indicazione dei metodi di conferma dei risultati (eventuali);
- indicazione ad estendere l'indagine ad altri familiari a rischio e/o di effettuare una consulenza genetica (eventuale) e/o necessità di eseguire ulteriori indagini;
- firma del dirigente responsabile dell'analisi.

Inoltre, l'identificativo del paziente deve essere presente in ogni pagina e le pagine devono essere numerate (es. pag 1 di 1).

Non dovrebbero essere effettuate modifiche ai referti. I Laboratori devono redigere e mettere in atto procedure di validazione dei referti che garantiscano la tracciabilità di eventuali modifiche dopo l'emissione. In caso di modifiche al referto, il laboratorio deve possedere procedure scritte per la revisione e modifica dei referti. I referti revisionati devono riportare la data della prima emissione e la motivazione per la quale è stato revisionato il referto.

Si consiglia di segnalare nel referto se non si sia riusciti ad eseguire l'analisi secondo gli standard previsti in rapporto al quesito diagnostico.

11.1. Analisi del cariotipo

Oltre alle informazioni elencate precedentemente il referto deve riportare le seguenti informazioni relative alla metodica:

- tecnica/che di coltura utilizzata/e;
- tecnica/che di bandeggio;
- risoluzione del bandeggio;
- numero delle colture analizzate;
- numero delle metafasi/cloni analizzati (nel caso dei villi coriali deve essere riportato il numero delle metafasi analizzate con il metodo diretto e dopo coltura).

Nel referto del cariotipo non dovrebbero essere indicati gli eteromorfismi o le varianti normali come definite nello specifico capitolo dell'ISCN versione corrente o in "*Gardner and Sutherland's - Chromosome abnormalities and genetic counselling*" (Gardner and Amor, 2018).



Esistono tuttavia specifiche situazioni cliniche in cui tali varianti possono essere descritte nel commento a discrezione del laboratorio (ad esempio se hanno richiesto l'esecuzione di ulteriori indagini, l'estensione dell'analisi ai familiari o se utili per il corretto inquadramento in caso di eventuale futura diagnosi prenatale).

Esempi di tali varianti:

- inversioni pericentriche con punti di rottura nelle regioni eterocromatiche, come: $inv(1)(p11q12)$, $inv(1)(p12q12)$, $inv(9)(p11q12)$, $inv(9)(p11q13)$, $inv(16)(p11q11)$;
- varianti delle dimensioni dell'eterocromatina, incluse: $1qh+$, $9qh+$, $16qh+$, $Yqh+$, $Yqh-$;
- varianti del braccio corto dei cromosomi acrocentrici originatisi da traslocazioni dell'eterocromatina del braccio lungo del cromosoma Y (Yq) e cromosomi Y satellitati;
- varianti del braccio corto dei cromosomi acrocentrici;
- siti fragili sia rari che di media frequenza localizzati in $2q11$, $2q13$, $6p23$, $7p11$, $8q22$, $9p21$, $9q32$, $10q23$, $10q25$, $11q13$, $11q23$, $12q13$, $16p12$, $16q22$, $17p12$, $20p11$, $22q13$;
- inversioni pericentriche che sono state descritte come prive di significato clinico (Gardner and Amor, 2018): $inv(2)(p11.2q13)$, $inv(3)(p11q11)$, $inv(3)(p11q12)$, $inv(3)(p13q12)$, $inv(5)(p13q13)$, $inv(10)(p11.2q21.2)$, $inv(Y)(p11q11)$;
- varianti con materiale C-negativo in eccesso: $4p16.1$, $8p23.1$, $9p12$, $15q11.2$ e $16p11.2$ (vedi allegato n. 16.7.b);
- inserzioni di euromatina in $9qh$, $9q$ prossimale (vedi allegato 16.7.a).

Relativamente al riscontro di una linea cellulare con monosomia del cromosoma X poco rappresentata, questa non andrebbe segnalata nel referto se all'interno del *range* atteso in base all'età di una donna fenotipicamente normale. Analogamente nell'uomo, in assenza di dati clinici significativi, andrebbe valutata con attenzione l'opportunità di segnalare una linea cellulare poco rappresentata con perdita del cromosoma Y in relazione all'età (vedi Paragrafo 8.3.4).

11.1.1. Segnalazione dei mosaicismi

Pseudomosaicismi

I mosaicismi di Livello I che, secondo i criteri sopracitati, possono considerarsi degli artefatti, non devono essere menzionati nel referto. La possibilità di UPD può rendere opportuno segnalare anche una singola cellula trisomica identificata su villo coriale con metodo diretto per cromosomi contenenti geni *imprinted*, in considerazione di un possibile meccanismo estremamente precoce di correzione di uno zigote trisomico (*trisomy rescue*).

I mosaicismi di Livello II possono essere segnalati a discrezione del laboratorio, con le spiegazioni pertinenti e l'invio alla consulenza genetica, per una valutazione della possibilità di eseguire ulteriori indagini. Può essere appropriato segnalarne il riscontro nel referto quando i mosaicismi di livello II interessino aneuploidie di significato clinico e/o a rischio di UPD (es.: cr. 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21 o 22).

Mosaicismi veri



I mosaicismi di livello III devono essere descritti e refertati, secondo le indicazioni ISCN (versione corrente), con l'indicazione del numero di cellule/colonie osservate. I referti di mosaicismo cromosomico devono riportare l'indicazione alla discussione del risultato in sede di consulenza genetica

Nel refertare mosaicismi di livello III riscontrati su villi coriali è opportuno suggerire un *follow-up* su liquido amniotico o sangue fetale e/o l'esecuzione di un'ecografia dettagliata per valutare la morfologia fetale.

11.2. Analisi FISH

Oltre alle informazioni elencate precedentemente, il referto deve riportare le seguenti informazioni relative alla metodica:

- nome commerciale della sonda, riportando la regione bersaglio, quando disponibile il nome del clone, il locus o il gene (vedi versione corrente ISCN);
- numero delle metafasi/cloni/nuclei analizzati.

11.2.1. Analisi effettuate tramite QF-PCR

11.2.2. Analisi delle aneuploidie

Oltre alle informazioni generali già elencate, il referto dell'indagine QF-PCR deve riportare nelle note che la QF-PCR non consente di rilevare le tetraploidie, i riarrangiamenti strutturali e può non evidenziare la presenza di mosaicismi in bassa percentuale.

In un referto con esito normale è opportuno elencare i microsatelliti analizzati o il nome del kit utilizzato. Un risultato normale può essere esplicitato con frasi come: "compatibile con un normale assetto disomico per i cromosomi 13, 18, 21", "è stato evidenziato un apparente assetto normale per i cromosomi 13, 18, 21", "non sono state rilevate trisomie", "l'analisi dei marcatori dei cromosomi X e Y ha evidenziato la presenza di un genotipo femminile/maschile".

Nei referti con risultati indicativi di un'aneuploidia deve essere segnalato che il risultato "è indicativo della presenza di una trisomia/monosomia...".

11.2.3. Esclusione di contaminazione materna

Oltre alle informazioni generali già elencate, il referto dell'indagine QF-PCR, qualora sia stata eseguita per la valutazione della contaminazione materna, deve riportare nelle note la soglia sopra la quale il livello di contaminazione sia considerato significativo.

Un referto con esito di assenza di contaminazione può essere esplicitato con una frase "il test eseguito permette di escludere una contaminazione materna significativa nel campione fetale analizzato" oppure "il test eseguito non ha rilevato presenza di contaminazione materna significativa nel campione fetale analizzato".

Nei referti con risultati indicativi di una contaminazione materna significativa deve essere segnalato che il risultato "è indicativo della presenza di una contaminazione materna".



11.2.4. Zigosità

Un referto con esito di completa corrispondenza dei microsatelliti nei due campioni analizzati può essere esplicitato con una frase “l’esito del test è compatibile con la monozigosità per i campioni analizzati” o simile.

Un referto con esito di corrispondenza parziale dei microsatelliti nei due campioni analizzati può essere esplicitato con una frase “l’esito del test è compatibile con una dizigosità dei campioni analizzati” o simile.

11.3. Analisi UPD

Il referto deve contenere le informazioni generali già elencate, inoltre:

- un referto di normalità deve elencare i microsatelliti analizzati ed esplicitare la “esclusione di disomia uniparentale per il cromosoma.....”, o una formulazione equivalente;
- un referto che indichi la presenza di disomia uniparentale deve elencare i microsatelliti (aneuploidia e/o localizzazione della regione con UPD) secondo le indicazioni ISCN - versione corrente. Deve essere riportata l’eventuale necessità di ulteriori approfondimenti e della consulenza genetica.

11.4. Analisi mediante Microarray Cromosomico (CMA)

Oltre alle informazioni generali già elencate, il referto dell’indagine aCGH deve riportare le seguenti informazioni:

- descrizione della piattaforma utilizzata: tipo di array, versione, produttore;
- risoluzione effettiva dell’array;
- dettagli tecnici dell’analisi: analisi/campione vs DNA di riferimento (specificare il DNA di riferimento utilizzato);
- software utilizzato per l’analisi (versione) e algoritmo di analisi, compreso il numero minimo di sonde considerate per l’inclusione di una CNV;
- qualità complessiva dell’esperimento;
- indicazione dei metodi di conferma dei risultati (se eseguite), specificando i cloni, i microsatelliti, oppure il gene analizzato;
- limiti del test: le analisi mediante microarray non permettono la rilevazione di anomalie cromosomiche strutturali bilanciate, anomalie cromosomiche strutturali sbilanciate in regioni eterocromatiche o non coperte dalla piattaforma utilizzata, mosaicismi scarsamente rappresentati, difetti della metilazione, e varianti nucleotidiche; inoltre non permette di risalire all’eventuale riarrangiamento strutturale causativo della CNV. in aggiunta le analisi con aCGH non consentono la rilevazione delle poliploidie e solo l’analisi SNP-array del trio consente l’identificazione delle disomie uniparentali;
- assemblaggio genomico di riferimento (es.: hg19);
- dimensione, localizzazione cromosomica (bande) e quella genomica (coordinate) degli sbilanciamenti identificati;
- nel caso di una CNV intragenica si raccomanda di specificare il trascritto di riferimento (di norma il trascritto più lungo o quello clinicamente più rilevante);
- indicazione degli eventuali riferimenti bibliografici/database utilizzati per l’interpretazione;



- interpretazione clinica, includendo:
 - 1) il contenuto genico degli sbilanciamenti identificati. Con “contenuto genico” si intende riferirsi all’indicazione di:
 - a) specifici geni nel caso in cui questi abbiano un’ovvia rilevanza clinica;
 - b) la lista completa dei geni presenti in una CNV, quando questi non siano troppo numerosi; qualora una CNV includa numerosi geni e sia impossibile elencarli tutti, riportare una frase del tipo: “Nella regione sono contenuti X geni di cui Y sono geni malattia”.
 - 2) i risultati dell’analisi di segregazione sui genitori o l’indicazione ad effettuare l’analisi di segregazione;
 - 3) l’interpretazione delle CNV secondo la classificazione riportata nel capitolo CMA (vedi par. 10.3);
 - 4) se possibile, indicare se il risultato è coerente con l’indicazione clinica e/o le conseguenze attese dalla presenza dello sbilanciamento.

Si raccomanda di non refertare le CNV benigne e, a discrezione del laboratorio, le probabilmente benigne, ma di aggiungere una frase tipo “I polimorfismi noti sono disponibili su richiesta” oppure “Non sono state considerate nell’interpretazione dei risultati le variazioni del numero di copie di quei loci noti come siti benigni considerati non patogenetici alla data della refertazione”. Fanno eccezione varianti benigne/probabilmente benigne che coinvolgono geni malattia recessivi che correlano con il fenotipo del paziente (eterozigosi composta) (es.: del2q coinvolgente *NPHP1*).

In caso di analisi del trio si raccomanda di produrre referti separati per ciascun soggetto analizzato.

11.4.1. Regioni di omozigosità

Nel caso in cui sia stata utilizzata una piattaforma contenente SNP, nonostante l’indicazione all’analisi fosse la ricerca di CNV, si possono individuare incidentalmente regioni di omozigosità (ROH), che in funzione della loro estensione, posizione e numerosità sono solo suggestive di UPD, consanguineità e patologie mendeliane recessive e pertanto richiedono conferme diagnostiche mediante altre tecnologie. In questo caso si raccomanda di considerare per la refertazione:

- solo le ROH che per estensione eccedano quelle rilevate normalmente nella popolazione generale (ROH > 3 Mb); si raccomanda di includere nel commento la seguente frase: “sono state rilevate diverse grandi regioni di omozigosi in numero e dimensione superiore a quanto atteso nella popolazione generale di riferimento. Sebbene questo risultato non sia diagnostico di una condizione specifica, aumenta il rischio di patologie recessive associate ai geni presenti in queste regioni”. Si raccomanda di non includere nel commento il riferimento diretto alla consanguineità, a meno che non sia stata dichiarata al momento della consulenza, ma di fare riferimento solo ad un aumentato rischio di patologia recessiva.
- ROH identificate nei cromosomi sottoposti ad *imprinting* (6, 7, 11, 14, 15, 20) con una estensione di ≥ 10 Mb, se interstiziali, o ≥ 5 Mb se terminali, poiché potrebbero essere indicative della presenza di UPD;
- ROH ≥ 15 Mb rilevate sugli altri cromosomi.



In caso di rilevamento di una ROH con dimensioni comprese tra 3-5 Mb e 15 Mb, contenente geni-malattia con ereditarietà recessiva, il laboratorio può segnalarla nel referto affinché il genetista clinico possa rivalutare il fenotipo anche in funzione dei geni presenti nella regione di omozigosità e valutare l'opportunità di richiedere approfondimenti molecolari.

Si raccomanda di inserire sempre nel commento che l'ipotesi di UPD o di patologia recessiva deve essere confermata con tecniche alternative.

11.4.2. CNV clinicamente rilevanti ma non associate all'indicazione all'analisi: CNV inattese (incidental/secondary findings)

Occasionalmente, possono essere evidenziate CNV che non correlano con le indicazioni per le quali il paziente è stato indirizzato all'analisi CMA, ad esempio quelle che possono indicare uno stato presintomatico per un disturbo a esordio tardivo o un fattore di rischio per una condizione clinica (es.: geni di predisposizione al cancro o altre patologie).

Si raccomanda di classificare le CNV inattese con gli stessi criteri esposti nel paragrafo 10.3 e di commentare le CNV inattese che coinvolgono geni di predisposizione al cancro o altre patologie a esordio tardivo, quando la loro refertazione può facilitare un tempestivo e appropriato approccio clinico. Tali geni devono essere selezionati in base ai seguenti criteri: la penetranza stabilita è moderata-alta; il meccanismo patogenetico è noto e coerente con la presenza di una delezione/duplicazione intragenica e/o di una delezione/duplicazione dell'intero gene; la patogenicità delle varianti e le correlazioni genotipo-fenotipo sono ben stabilite ed esistono interventi disponibili clinicamente efficaci (elevato rischio-beneficio) [Talukdar et al., 2019].

L'ACMG aggiorna periodicamente una lista di geni che raccomanda di segnalare qualora coinvolti in risultati inattesi in analisi di esoma. Tale lista può essere utile anche per l'interpretazione di risultati inattesi in CMA ed è disponibile al seguente indirizzo: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg/> [Miller et al., 2021].

In ogni caso la scelta di analizzare e refertare o meno CNV inattese deve essere coerente con quanto espresso dal paziente e/o dal genitore/tutore nel consenso informato, che deve includere il riferimento alla possibilità di identificare questa categoria di risultati e la scelta consapevole di voler essere informati.

11.4.3. CNV associate a patologie recessive

Nel caso in cui all'interno di una CNV, in particolar modo se in delezione, ci fosse un gene associato ad una patologia recessiva o X-linked ciascun laboratorio potrà decidere se commentarlo o meno nel referto. Nel caso in cui si decida di non riportare lo stato di portatore si raccomanda di specificarlo nell'informativa e nel referto sottolineando che qualsiasi sospetto, del clinico referente, di patologia recessiva deve essere comunicato al laboratorio.

Ci sono situazioni specifiche per le quali, invece, si raccomanda di riportare nel referto lo stato di portatore:



- patologie ben caratterizzate per le quali il meccanismo di base sia la perdita di funzione e il fenotipo associato correli con il quadro clinico del paziente. In questo caso l'utilità di segnalare la condizione di portatore è relativa al calcolo del rischio di ricorrenza ed eventualmente all'esecuzione di eventuali test aggiuntivi nel probando o nei familiari interessati, in particolare quando la frequenza del portatore è ragionevolmente alta;
- nel caso in cui la CNV riscontrata rappresenti uno degli eventi attesi tra quelli coinvolti nella patologia per la quale il paziente è stato inviato all'analisi CMA. Il laboratorio, in questo caso, dovrebbe consigliare i test aggiuntivi ai fini di evidenziare l'altra variante causa della patologia e dovrebbe esplicitare che la CNV riscontrata non è diagnostica senza la conferma della seconda variante;
- CNV che coinvolgono geni sensibili al dosaggio sul cromosoma X in pazienti femmine.

11.4.4. Particolarità della refertazione CMA in diagnosi prenatale

Si raccomanda di riportare il riferimento all'esclusione della contaminazione materna nei casi in cui si renda necessaria. Nel caso in cui non sia stato possibile effettuarla è necessario specificarlo.

La CMA ha il limite di identificare CNV a significato incerto o che rappresentano fattori di rischio di patologia, in particolare disturbi del neurosviluppo a penetranza incompleta, rendendo complicata la gestione del dato in sede di consulenza post-test. Pertanto, si raccomanda di esplicitare nell'informativa l'evenienza di CNV a significato incerto e/o a penetranza ridotta e di chiedere alla gestante il consenso ad essere informata o meno su tali risultati. Tuttavia, si ritiene opportuno di non riportare nel referto le CNV ricorrenti per le quali il ruolo patogenetico sia ad oggi ancora controverso o con una penetranza inferiore al 15% (Rosenfeld et al., 2013; Coe et al., 2014; Maya et al., 2018). Fanno parte di questo gruppo le seguenti CNV:

- dup 15q13.3 (CHRNA7);
- del/dup 15q11.2 (NIPA1);
- del/dup 16p13.11 (MYH11);
- del regione PAR1 (non comprendente il gene SHOX);
- dup regione PAR1 (anche se comprendente il gene SHOX);
- dup Xp22.31 (STS e regione adiacente);
- del/dup regione PAR2.

In base ai criteri utilizzati e alla revisione della letteratura, la delezione 15q13.3, precedentemente inserita in questo elenco, è stata omessa dalla lista delle CNV non refertabili.

Il laboratorio dovrebbe prendere in considerazione l'opportunità di elencare tali regioni sia nell'informativa/consenso informato che nelle note del referto, specificando che non vengono riportate.

11.5. Referto preliminare

In generale i risultati preliminari dovrebbero essere comunicati da un supervisore o dal dirigente responsabile dell'analisi al clinico, con la chiara indicazione che i risultati dell'analisi sono provvisori e definendo quali anomalie debbano ancora essere escluse e/o confermate.



Società Italiana di Genetica Umana
Italian Society of Human Genetics

In caso di emissione di un referto preliminare, dovrebbe essere chiaramente indicato che si tratta di un risultato provvisorio e che sono in corso/necessari ulteriori approfondimenti per l'emissione di un referto definitivo. Il referto preliminare dovrebbe essere comunicato solo in casi particolari, al clinico e/o al paziente dal dirigente responsabile dell'analisi, come ad esempio nel caso in cui venga identificata una anomalia nel probando, per richiedere l'estensione dell'analisi ai genitori.

Copia di tale referto e dettagli delle informazioni fornite, anche se solo verbali, devono essere inclusi nella scheda/pagina elettronica di laboratorio del paziente.

11.6. Tempi di refertazione

Il tempo per la conclusione dell'analisi da parte del laboratorio deve tenere conto dell'indicazione alla diagnosi e della sua eventuale urgenza. Il laboratorio deve dichiarare e rendere disponibili per la consultazione i tempi di refertazione di tutte le analisi erogate. Nella Tabella 5 sono indicati i tempi (i giorni sono da riferirsi di calendario per tutte le tipologie di test/analisi) entro i quali il 90% delle indagini deve essere refertato.

La comunicazione di eventuale fallimento diagnostico in diagnosi prenatale deve avvenire entro i 14 giorni dall'arrivo del campione in laboratorio.



Tabella 5: Tempi di refertazione indagini citogenetiche

Indagine citogenetica	Tempo (giorni di calendario)
Cariotipo da colture di amniotici e da coltura a medio-lungo termine di trofoblasto	21
Cariotipo da colture di linfociti	28
Cariotipo da coltura a breve termine di trofoblasto (tecnica diretta)	7
Analisi urgenti su linfociti ottenuti da sangue fetale	7
Cariotipo da coltura di fibroblasti ottenuti da biopsia cutanea	28
FISH per indagini su campioni in prenatale*	4
FISH per indagini su campioni in postnatale	14
FISH per indagini su campioni in postnatale per riarrangiamenti subtelomerici	28
QF-PCR	4
CGH/SNP array per indagini su campioni in diagnosi postnatale	60
CGH/SNP array per indagini su campioni in diagnosi prenatale*	10

*Esclusi eventuali tempi di coltura

12. Conservazione del materiale documentale, dei dati e dei campioni

Per quanto riguarda la conservazione del materiale documentale (consensi informati, schede anamnestiche ecc) dei dati e del materiale biologico si fa riferimento al documento SIGU “*Linee di indirizzo sulla Conservazione del Materiale Biologico e Documentale relativo ai Test Genetici*” (2021) che, a seguito di attenta disamina della documentazione esistente in materia, propone dei tempi di conservazione specifici per i test e la documentazione di Citogenetica-Citogenomica.



13. Siti web utili

ACGS Association for Clinical Genomic Science, Best Practice Guidelines: <https://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/>

ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg/>

American College of Medical Genetics and Genomics: Practice Guidelines: <https://www.acmg.net/ACMG/Medical-Genetics-Practice-Resources/Practice-Guidelines.aspx>

Australian Commission on Safety and Quality in Health Care: National Pathology Accreditation Standards, National Accreditation Advisory Council (NPAAC): <https://www.safetyandquality.gov.au/our-work/accreditation/pathology-accreditation-standards#national-pathology-accreditation-standards>

CCMG Canadian College of Medical Geneticists: Practice Guidelines, Position Statements, Surveys and Reports.: <https://www.ccmg-ccgm.org/practice-resources/practice-guidelines/>

ClinGen Genome Dosage Map: <https://search.clinicalgenome.org/kb/gene-dosage>

ChromosOmics – DataBases: <http://cs-tl.de/Start.html>

College of American Pathologists: Protocols and Guidelines: <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/current-cap-guidelines>

CNVCALC: (<https://cnvcalc.clinicalgenome.org>)

DATABASE OF GENOMIC VARIANTS: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>

DECIPHER: <https://www.deciphergenomics.org/>

ECA - Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance:

<http://www.eurogentest.org/web/info/public/unit1/guidelines/cytogenetics/index.xhtml>

ENSEMBL: <http://www.ensembl.org/index.html>

Franklin: (<https://www.genoox.com>)

Human Phenotype Ontology (HPO): <https://monarchinitiative.org>

ISCA: <https://www.iscaconsortium.org/>

OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

SIENA DATABASE CLINICO: <http://www.biobank.unisi.it>

SIGU: <https://sigu.net>

The Chromosome Anomaly Collection: http://www.ngri.org.uk/wessex/collection/ev_chart.htm

TROINA DATABASE: <http://gvarianti.homelinux.net/gvariantib37/index.php>

UCSC: <https://genome.ucsc.edu/>



14. Bibliografia

TESTI

Gardner RJM and Amor DJ. **Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling**, 5th Ed., Oxford University Press, 2018.

McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S. **ISCN 2020. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020)**, Karger Ed., Basel, 2020.

Milunsky A, Milunsky JM. **Genetic Disorders and the Fetus - Diagnosis, Prevention and Treatment**. Wiley Ed., 2021.

Wyandt HE et al. **Human Chromosome Variation: Heteromorphism, Polymorphism and Pathogenesis**, 2nd ed., Springer Ed., 2017

LINEE-GUIDA E DOCUMENTI

AIRFA (Associazione Italiana per la Ricerca sull'Anemia di Fanconi), Anemia di Fanconi - **Linee Guida per la diagnosi e la Gestione**, 4° Ed., 2016

Attuazione delle linee guida per le attività di genetica Medica, Accordo Stato Regioni. 2009

Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici n.8/2016

Deans ZC et al. **Recommendations for reporting results of diagnostic genomic testing**. Eur J Hum Genet. 2022;30:1011-1016.

ESHRE Working Group on Chromosomal Mosaicism et al. **ESHRE survey results and good practice recommendations on managing chromosomal mosaicism**. Hum Reprod Open. 2022;2022(4):hoac044.

Gestione della morte endouterina fetale (MEF). Prendersi cura della natimortalità. Realizzato dalla Fondazione Confalonieri Ragonese su mandato SIGO, AOGOI, AGU - del 17 febbraio 2023

Gonzales PR et al. **Interpretation and reporting of large regions of homozygosity and suspected consanguinity/uniparental disomy, 2021 revision: A technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)**. Genet Med. 2022;24:255-261.

Hsu LYF, Benn PA. **Revised guidelines for the diagnosis of mosaicism in amniocytes**. Pren Diagn. 1999;19: 1081-1090.

Linee guida per le attività di Genetica Medica - Accordo Stato Regioni (GU n.224 del 23.09.2004)

Mann K. et al. **ACGS best practice guidelines for use of Quantitative Fluorescence-PCR for the detection of aneuploidy v4**, Guidelines updated by the Association for Clinical Genetic Science (formally Clinical Molecular Genetics Society and Association of Clinical Cytogenetics) (approved 26/11/18).

Miller DT et al. **ACMG Secondary Findings Working Group. ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)**. Genet Med. 2021;23:1381-1390.



Rack KA et al. **European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms**. *Leukemia*. 2019;33:1851-1867.

Riggs ER et al. **Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)**. *Genet Med*. 2020;22:245-257.

SIGU. Conferma diagnostica dopo NIPT con risultato ad alto rischio, non informativo o sesso discordante. Redatto da GdL SIGU di Citogenetica e Citogenomica. 2020. (Approvato da: Società Italiana di Ecografia Ostetrica e Ginecologica e Metodologie Biofisiche (SIEOG), Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia (SIGO) e Associazione Ostetrici e Ginecologi Ospedalieri Italiani (AOGOI). <https://www.sigu.net/commissioni/more/sezione-id/5/area/Documenti>

SIGU. Indicatori SIGUCERT Laboratorio di Genetica Medica, Approvato dalla Commissione SIGU per la Qualità. <https://sigu.net/category/linee-guida-e-raccomandazioni/>

SIGU. Linee di indirizzo sulla Conservazione del Materiale Biologico e Documentale relativo ai Test Genetici, a cura del Gruppo di Lavoro SIGU-Sanità. 2021. <https://sigu.net/category/linee-guida-e-raccomandazioni/>

SIGU. Linee Guida SIGU per la Diagnosi Citogenetica e sezione Note Operative Citogenetica Costituzionale a cura del Gruppo di Lavoro in Citogenetica. 2013. <https://sigu.net/category/linee-guida-e-raccomandazioni/>

SIGU-SIEOG. Uso appropriato delle tecniche di CMA (Chromosomal Microarray Analysis) nella diagnosi prenatale Raccomandazioni Congiunte SIGU (Società Italiana Genetica Umana) e SIEOG (Società Italiana di Ecografia Ostetrico-Ginecologica). 2017. <https://sigu.net/category/linee-guida-e-raccomandazioni/>

SIGU. Standard SIGUCERT: Sistema di Gestione per la Qualità nei laboratori di Genetica Medica. Rev 20.7.2018, a cura della Commissione Tecnica SIGUCERT. <https://sigu.net/category/sigucert/>

Silva M et al. **European guidelines for constitutional cytogenomic analysis**. *Eur J Hum Genet*. 2019;27:1–16

Talukdar S et al. **Structural Aberrations with Secondary Implications (SASIs): consensus recommendations for reporting of cancer susceptibility genes identified during analysis of Copy Number Variants (CNVs)**. *J Med Genet*. 2019;56:718-726.

ARTICOLI

Ababou M. **Bloom syndrome and the underlying causes of genetic instability**. *Mol Genet Metab*. 2021;133:35-48.

Afifi HH et al. **Expanding the mutation and clinical spectrum of Roberts syndrome**. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2016;56:154-162.

Algahtami Aset al. **Postnatal clinical phenotype of five patients with Pallister-Killian syndrome (tetrasomy 12p): interest of array-CGH for diagnosis and review of the literature**. *Mol Genet Genomic*. 2019;7:e00939

Amirifar P et al. **Ataxia-telangiectasia: epidemiology, pathogenesis, clinical phenotype, diagnosis, prognosis and management**. *Expert Rev Clin Immunol*. 2020;16:859-871.

Auerbach AD. **Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis**. *Curr Protoc Hum Genet*. 2015;85:8.7.1-8.7.17.



- Auerbach AD. **Fanconi anemia and its diagnosis.** Mutat Res. 2009;668:4-10.
- Benn P et al. **Rare autosomal trisomies: comparison of detection through cell-free DNA analysis and direct chromosome preparation of chorionic villus samples.** Ultrasound Obstet Gynecol. 2019;54:458-467.
- Benn P. **Uniparental disomy: origin, frequency and clinical significance.** Prenat Diagn. 2021;41:564-572
- Bruck J et al. **Molecular characterizations of Temple syndrome families with 14q32 epimutations.** Eur J Med Genet. 2020;63:104077.
- Cavazza et al. **Parental genome unification is highly error-prone in mammalian embryos.** Cell. 2021;184:2860-2877
- Claussen Uet al. **Exclusion of chromosomal mosaicism in prenatal diagnosis.** Hum Genet. 1984;67:23-28.
- Coe BP et al. **Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay.** Nat Genet. 2014;46:1063-71.
- Coorens THH et al. **Inherent mosaicism and extensive mutation of human placentas.** Nature. 2021;592:80-85.
- Dolanc Merc et al. **The genetic approach to stillbirth: a »systematic review«.** Prenat Diagn. 2023;1-9
- Donaghue et al. **Efficient and cost-effective genetic analysis of products of conception and fetal tissues using a QF-PCR/array CGH strategy; five years of data.** Molecular Cytogenetics. 2017;10:12.
- Eggenhuizen GM et al. **Confined placental mosaicism and the association with pregnancy outcome and fetal growth: a review of the literature.** Human Reproduction Update. 2021; 00(0):1-19.
- Forsberg LA. **Loss of chromosome Y (LOY) in blood cells is associated with increased risk for disease and mortality in aging men.** Hum Genet. 2017;136:657-663.
- Garcia-Acero M et al. **Disorders of sex development: genetic characterization of a patient cohort.** Mol Med Rep. 2020;21:97-106.
- Grassmann F et al. **Y chromosome mosaicism is associated with age-related macular degeneration.** Eur J Hum Genet. 2019;27:36-41.
- Grati FR et al. **QF-PCR as a substitute for karyotyping of cytotrophoblast for the analysis of chorionic villi: advantages and limitations from a cytogenetic retrospective audit of 44,727 first-trimester prenatal diagnoses.** Prenat Diagn. 2013;33:502-508.
- Grati FR et al. **Chromosomal mosaicism in the fetoplacental unit.** Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2017;42:39-52.
- Grati FR et al. **An evidence-based scoring system for prioritizing mosaic aneuploid embryos following preimplantation genetic screening.** Reprod Biomed Online. 2018;36:442-449.
- Grati FR et al. **Performance of conventional cytogenetic analysis on chorionic villi when only one cell layer, cytotrophoblast or mesenchyme alone, is analyzed.** Prenat Diagn. 2021;41:652-660.
- Hook EB. **Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use.** Am J Hum Genet. 1977;29:94-7.



- Hoppman N et al. **Patterns of homozygosity in patients with uniparental disomy: detection rate and suggested reporting thresholds for SNP microarrays.** Genet Med. 2018;20:1522-1527.
- Kearney et al. **Diagnostic implications of excessive homozygosity detected by SNP-based microarrays: consanguinity, uniparental disomy, and recessive single-gene mutations.** Clin Lab Med. 2011;31:595-613.
- Kiaee F et al. **Clinical, Immunologic and Molecular Spectrum of Patients with Immunodeficiency, Centromeric Instability, and Facial Anomalies (ICF) Syndrome: A Systematic Review.** Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2021;21:664-672.
- Kuhn EM, Therman E. **Cytogenetics of Bloom's syndrome.** Cancer Genet Cytogenet. 1986;22:1-18.
- Kurtas NE et al. **Small supernumerary marker chromosomes: a legacy of trisomy rescue?** Hum Mutat. 2019;40:193-200.
- Liehr T. **Cytogenetically visible copy number variations (CG-CNVs) in banding and molecular cytogenetics of human; about heteromorphisms and euchromatic variants.** Molecular Cytogenetics. 2016;9:5.
- Liehr T. **Chromothripsis detectable in small supernumerary marker chromosomes (aSMC) using fluorescence in situ hybridization.** Methods Biol Mol. 2018;1769:79-84.
- Lindgren V et al. **Temple syndrome resulting from uniparental disomy is undiagnosed by a methylation assay due to low-level mosaicism for trisomy 14.** Am J Med Genet A. 2021;185:1538-1543.
- Maya I et al. **When genotype is not predictive of phenotype: implications for genetic counseling based on 21,594 chromosomal microarray analysis examinations.** Genet Med. 2018;20:128-131.
- Muftuoglu M et al. **The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis.** Hum Genet. 2008;124:369-77.
- Mulchandani S et al. **Maternal uniparental disomy of chromosome 20: a novel imprinting disorder of growth failure.** Genetics in Medicine. 2016;18:309-315.
- Omark J et al. **Kagami-Ogata syndrome in a patient with 46,XX,t(2;14)(q11.2;q32.2)mat disrupting MEG3.** J Hum Genet. 2021;66:439-443.
- Oshima J et al. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022.
- Pelleri MC et al. **Partial trisomy 21 map: ten cases further supporting the highly restricted Down syndrome critical region (HR-DSCR) on human chromosome 21.** Mol Genet Genomic Med. 2019;7:e797.
- Pemberton TJ et al. **Genomic patterns of homozygosity in worldwide human populations.** Am J Hum Genet. 2012;91:275-92.
- Rosenfeld JA et al. **Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations.** Genet Med. 2013;15:478-81.
- Sieben CJ et al. **BubR1 allelic effects drive phenotypic heterogeneity in mosaic-variegated aneuploidy progeria syndrome.** J Clin Invest. 2020;130:6188. Erratum for: J Clin Invest. 2020;130:171-188.
- Sikkema-Raddatz Bet al. **Probability tables for exclusion of mosaicism in prenatal diagnosis.** Prenat Diagn. 1997;17:115-8.



Società Italiana di Genetica Umana
Italian Society of Human Genetics

Tannorella P et al. **Maternal uniparental disomy of chromosome 20 (UPD(20)mat) as differential diagnosis of Silver Russel syndrome: identification of three new cases.** Genes (Basel). 2021;12:588.

Taylor AMR et al. **Chromosome instability syndromes.** Nat Rev Dis Primers. 2019;5:64.

Thakur S et al. **Pallister-Killian syndrome: Review of fetal phenotype.** Clin Genet. 2019;95:79-84.

Thomas C et al. **Aneuploidy in human eggs: contribution of the meiotic spindle.** Biochemical Society Transaction. 2021;49:107-118

Vega H et al. **ESCO2 spectrum disorders.** In: Adam MP et al, editors. 2020. GeneReviews [internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle;1993-2021.

Viotti M et al. **Preimplantation genetic testing for chromosomal abnormalities: aneuploidy, mosaicism and structural rearrangements.** Genes (Basel). 2020;11:602

Yamaguchi T et al. **Prenatal diagnosis of premature chromatid separation/mosaic variegated aneuploidy (PCS/MVA) syndrome.** J Obstet Gyn Res. 2018;44:1313-1317

15. Conflitto d'interessi

All'inizio della revisione del documento la dott.ssa Francesca Romana Grati era dipendente a tempo indeterminato di TOMA Advanced Biomedical Assays S.p.A. (ImpactLab), consulente e membro dell'Advisory Board di Menarini Silicon Biosystems/Menarini Biomarkers Singapore (MBS); successivamente, durante il processo di revisione, è diventata dipendente a tempo indeterminato di MBS. La dott.ssa Laura Cardarelli è dipendente di RDI – Rete Diagnostica Italiana, Gruppo Cerba Healthcare. Gli altri autori non presentano conflitti di interesse.

Approvato dal CD:

17.03.2023

Data Pubblicazione:

06/09/2023

Documento di buona pratica per la diagnosi

Citogenetica e Citogenomica costituzionale

Rev. 1

Pagina 64 / 76



16. Appendice con allegati

16.1. Flowchart degli approfondimenti in relazione al tipo di indagine invasiva e loro esito

Indagine invasiva	Esito	Approfondimenti		
VC/LA	Cariotipo fetale aneuploide	Nessuno		
	Cariotipo fetale normale	Nessuno oppure CMA in base all'indicazione		
	Cariotipo fetale con anomalia strutturale	Studio dei genitori	Eventuale citogenetica molecolare (FISH e/o CMA)	UPD se coinvolto cromosoma soggetto a imprinting
	VC esito non conclusivo (es. mosaicismo)	LA o SF		
	LA con mosaicismo	eventuale SF		
LA dopo VC	Cariotipo fetale normale	UPD se indicazione coinvolge cromosoma soggetto a imprinting		
	Cariotipo fetale anomalo	Nessuno		
SF dopo LA o VC	Cariotipo fetale normale	UPD se indicazione coinvolge cromosoma soggetto a imprinting (se non già eseguita su LA)		
	Cariotipo fetale anomalo	Nessuno		

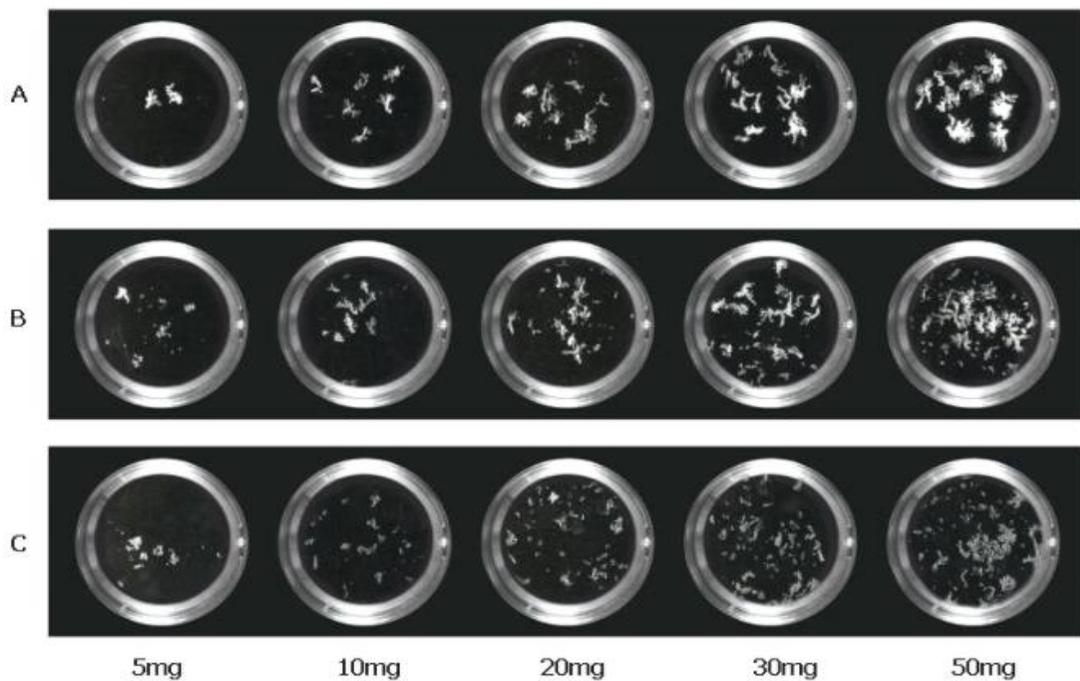


16.2. Livelli di bandeggio

LIVELLO di BANDEGGIO	Visibili:
<300 bande	identificazione inequivocabile dei cromosomi tramite morfologia e caratteristiche maggiori
300 bande	2 bande in 8p (8p12 e 8p22) 3 bande in 10q (10q21, 10q23, 10q25) 20p12 visibile 22q12 distinta
400 bande	3 bande a metà 4q (4q22-q28) 3 bande a metà 5q (5q14, 5q21, 5q23) 2 bande in 9p (9p21 e 9p23) 13q33 distinta
550 bande	5q31.2 distinta 8p21.2 visibile 2 bande in 11pter (11p15.2 e 11p15.4) 22q13.2 distinta
700 bande	2p25.2 distinta 2q37.2 distinta 10q21.1 e 10q21.3 separate 17q22-q24 separato in 3 bande
850 bande	4p15.31 e 4p15.33 distinte 5p15.32 distinta 11q24.1 e 11q24.3 distinte 19p13.12 e 19p13.2 distinte



16.3. Scale di quantità (5-50mg) di villi coriali a diversi livelli di frammentazione



A: basso; B: Intermedio; C: alto

Grati et al., Prenat Diagn. 2013;33:502-508.



16.4. Esclusione di mosaicismo cromosomico in diagnosi postnatale

TABLE 1
PERCENT MOSAICISM EXCLUDED WITH 0.90, 0.95, AND 0.99 CONFIDENCE IF SPECIFIED NUMBER OF CELLS ARE EVALUATED AND FOUND TO HAVE IDENTICAL KARYOTYPES

No. CELLS (n)	CONFIDENCE LEVELS			No. CELLS (n)	CONFIDENCE LEVELS		
	0.90	0.95	0.99		0.90	0.95	0.99
≤ 4	36	7%	8%	13%
5	38%	37	7%	8%	12%
6	32%	41%	...	38	6%	8%	12%
7	29%	35%	...	39	6%	8%	12%
8	26%	32%	46%	40	6%	8%	11%
9	23%	29%	41%	41	6%	8%	11%
10	21%	26%	37%	42	6%	7%	11%
11	19%	24%	35%	43	6%	7%	11%
12	18%	23%	32%	44	6%	7%	10%
13	17%	21%	30%	45	5%	7%	10%
14	16%	20%	29%	46	5%	7%	10%
15	15%	19%	27%	47	5%	7%	10%
16	14%	18%	26%	48	5%	7%	10%
17	13%	17%	24%	49	5%	6%	9%
18	13%	16%	23%	50-55	5%	6%	9%
19	12%	15%	22%	56	5%	6%	8%
20	11%	14%	21%	57-58	4%	6%	8%
21	11%	14%	20%	59-63	4%	5%	8%
22	10%	13%	19%	64-73	4%	5%	7%
23	10%	13%	19%	74	4%	4%	7%
24	10%	12%	18%	75	4%	4%	6%
25	9%	12%	17%	76-89	3%	4%	6%
26	9%	11%	17%	90-98	3%	4%	5%
27	9%	11%	16%	99-112	3%	3%	5%
28	8%	11%	16%	113	3%	3%	4%
29	8%	10%	15%	114-148	2%	3%	4%
30	8%	10%	15%	149-151	2%	2%	4%
31	8%	10%	14%	152-227	2%	2%	3%
32	7%	9%	14%	228-229	2%	2%	2%
33	7%	9%	14%	230-298	1%	2%	2%
34	7%	9%	13%	299-458	1%	1%	2%
35	7%	9%	13%	≥459	1%	1%	1%

Hook, Am J Hum Genet. 1977;29:94-97



16.5. Esclusione di mosaicismo cromosomico in diagnosi prenatale

a. Flask method

Table 2. Degree of mosaicism in percent that will be detected with a probability of 0.95 by analysing a sample of n cells from a mixture of k clones (rounded to the next not smaller integer)

No. cells (n)	No. clones (k)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
2	95	91	88	86	85	84	83	83	82	82	82	81	81	81	81	80	80	80	80	80
3	95	86	81	77	75	73	72	71	70	70	69	69	68	68	68	67	67	67	67	67
4	95	83	75	71	68	65	64	63	62	61	60	60	59	59	58	58	58	58	57	57
5	95	80	71	66	62	60	58	56	55	54	54	53	52	52	51	51	51	50	50	50
6	95	79	69	63	58	56	53	52	50	49	49	48	47	47	46	46	46	45	45	45
7	95	79	67	60	56	52	50	48	47	46	45	44	43	43	42	42	41	41	41	41
8	95	78	66	58	53	50	47	45	44	43	42	41	40	40	39	39	38	38	38	37
9	95	78	65	57	52	48	45	43	42	40	39	38	38	37	37	36	36	35	35	35
10	95	78	65	56	50	47	44	42	40	38	37	36	36	35	34	34	33	33	33	32
11	95	78	64	55	49	45	42	40	38	37	36	35	34	33	33	32	32	31	31	30
12	95	78	64	55	49	44	41	39	37	36	34	33	32	32	31	31	30	30	29	29
13	95	78	64	54	48	44	40	38	36	34	33	32	31	30	30	29	29	28	28	28
14	95	78	64	54	48	43	40	37	35	33	32	31	30	29	29	28	28	27	27	26
15	95	78	64	54	47	42	39	36	34	33	31	30	29	28	28	27	27	26	26	25
16	95	78	64	54	47	42	38	36	34	32	30	29	28	28	27	26	26	25	25	24
17	95	78	64	54	47	42	38	35	33	31	30	29	28	27	26	25	25	24	24	24
18	95	78	64	54	46	41	38	35	32	31	29	28	27	26	25	25	24	24	23	23
19	95	78	64	53	46	41	37	34	32	30	29	28	26	26	25	24	24	23	23	22
20	95	78	64	53	46	41	37	34	32	30	28	27	26	25	24	24	23	23	22	22
30	95	78	64	53	46	40	36	32	30	28	26	24	23	22	21	20	20	19	19	18
40	95	78	64	53	46	40	35	32	29	27	25	23	22	21	20	19	18	18	17	16
50	95	78	64	53	46	40	35	32	29	27	25	23	21	20	19	18	17	17	16	16
60	95	78	64	53	46	40	35	32	29	26	24	23	21	20	19	18	17	16	16	15
70	95	78	64	53	46	40	35	32	29	26	24	23	21	20	19	18	17	16	15	15
80	95	78	64	53	46	40	35	32	29	26	24	23	21	20	19	18	17	16	15	15
90	95	78	64	53	46	40	35	32	29	26	24	23	21	20	19	18	17	16	15	15
100	95	78	64	53	46	40	35	32	29	26	24	23	21	20	19	18	17	16	15	14

Claussen et al. Hum Genet. 1984;67: 23-28



Colony method

Table 1. Colony method: Lower limits for the degree of mosaicism excluded with 0.99 or 0.95 confidence if a specified number of clones are evaluated and found to be normal (degree in percent rounded to the next not smaller integer)

No. of clones (<i>n</i>)	Confidence levels		No. of clones (<i>n</i>)	Confidence levels	
	0.99	0.95		0.99	0.95
1	99	95	11	35	24
2	90	78	12	32	23
3	79	64	13	30	21
4	69	53	14	29	20
5	61	46	15	27	19
6	54	40	16	26	18
7	49	35	17	24	17
8	44	32	18	23	16
9	41	29	19	22	15
10	37	26	20	21	14

Claussen et al. Hum Genet. 1984;67: 23-28



16.6. Tabella di probabilità per esclusione di mosaicismo

Table I—Required number of samples to observe cells from M different colonies out of N colonies present. 95 per cent probability table

No. of colonies N present	No. of colonies M needed																													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	4	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	4	7	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	3	6	11	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	3	6	9	14	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	3	5	8	12	18	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	3	5	7	11	15	22	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	3	5	7	10*	13	18	26	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	3	5	7	9	12	16	22	31	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	3	5	7	9	12	15	19	25	35	57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12	3	4	6	9	11	14	18	22	29	39	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
13	3	4	6	8	11	13	16	20	25	32	44	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14	3	4	6	8	10	13	16	19	23	29	36	48	76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	3	4	6	8	10	12	15	18	22	26	32	40	53	83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	3	4	6	8	10	12	14	17	20	24	29	35	44	58	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17	3	4	6	8	9	12	14	17	19	23	27	32	39	48	63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18	3	4	6	7	9	11	14	16	19	22	26	30	35	42	52	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19	3	4	6	7	9	11	13	16	18	21	24	28	33	38	46	56	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20	3	4	6	7	9	11	13	15	18	20	23	27	31	36	42	49	60	77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	2	4	6	7	9	11	13	15	17	20	23	26	29	34	39	45	53	64	82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22	2	4	5	7	9	11	12	15	17	19	22	25	28	32	37	42	48	57	68	87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	2	4	5	7	9	10	12	14	16	19	21	24	27	31	35	39	45	52	60	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	2	4	5	7	9	10	12	14	16	18	21	23	26	30	33	37	42	48	55	64	77	0	0	0	0	0	0	0	0	
25	2	4	5	7	8	10	12	14	16	18	20	23	26	29	32	36	40	45	51	59	68	81	0	0	0	0	0	0	0	
26	2	4	5	7	8	10	12	14	16	18	20	22	25	28	31	35	39	43	48	54	62	72	86	0	0	0	0	0	0	
27	2	4	5	7	8	10	12	13	15	17	20	22	24	27	30	33	37	41	46	51	58	66	76	90	0	0	0	0	0	
28	2	4	5	7	8	10	12	13	15	17	19	22	24	27	29	32	36	40	44	49	54	61	69	80	0	0	0	0	0	
29	2	4	5	7	8	10	11	13	15	17	19	21	24	26	29	32	35	38	42	47	52	57	64	73	84	0	0	0	0	
30	2	4	5	7	8	10	11	13	15	17	19	21	23	26	28	31	34	37	41	45	49	55	61	68	77	88	0	0	0	

PROBABILITY TABLES FOR EXCLUSION OF MOSAICISM

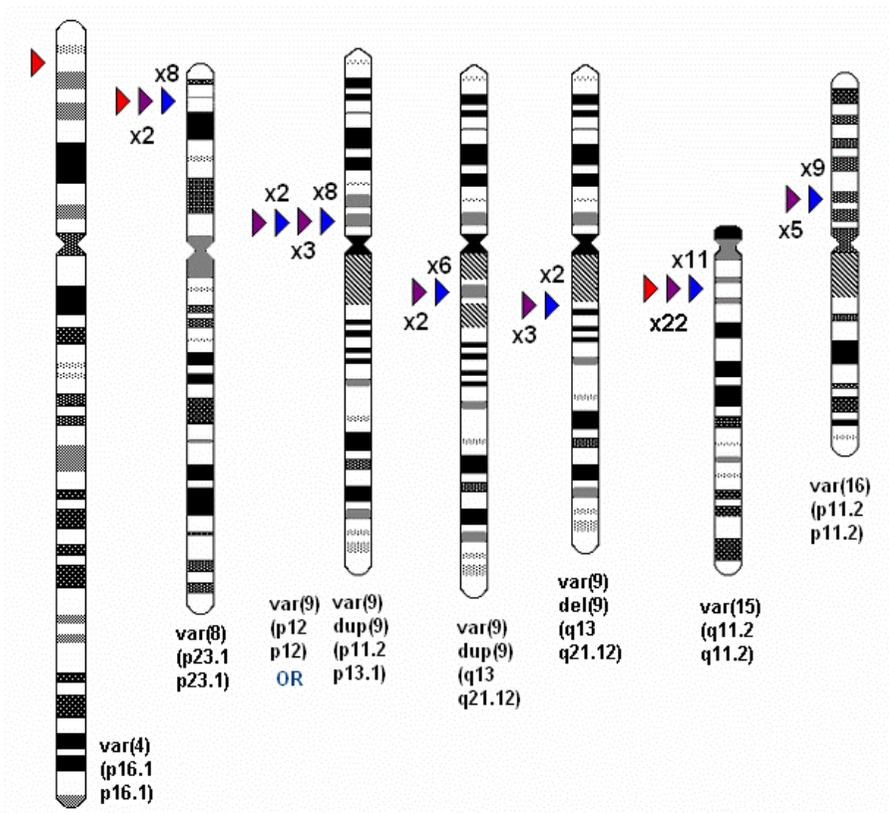
*Example: the analysis of ten metaphases is necessary to be at least 95 per cent sure that at least five different colonies have been sampled out of nine equal-sized colonies present.

Sikkema-Raddatz et al. Pren.Diagn. 1997;17:2:115-118



16.7. Varianti Eucromatiche

a.





Società Italiana di Genetica Umana
Italian Society of Human Genetics

Euchromatic variants (EVs) - large scale cytogenetically visible copy number variants **da** *“The Chromosome anomaly collection”*;
http://www.ngri.org.uk/wessex/collection/ev_chart.htm

b.

Approvato dal CD:

17.03.2023

Data Pubblicazione:

06/09/2023

*Documento di buona pratica per la diagnosi
Citogenetica e Citogenomica costituzionale*

Rev. 1

Pagina 73 / 76



Table 17–2. Euchromatic Duplications and Deletions (and One Quadruplication) Detectable by Microscope Cytogenetics, and Without Phenotypic Effect, as Inferred from the Observation of Transmission from Phenotypically Normal Parent to Normal Child

CHROMOSOME	DEL	DUP	QDP
1		p21-p31 q31.1-q32	
2	p12-p12 (x2) q13-q14.1		
3	p25.3-pter (x2)	q28-q29	
4	q34.1-q34.3	p16.1-p16.1	q12q13.1
5	p14.1-p14.3 (x2)		
6	q22.31-q23.1		
7		p22.3-pter (x2)	
8	p23.1/2-pter q24.13-q24.22	p22-p22 p23.1-p23.3	
9	p21.2-p22.1	p12-p21.3	
10	q11.2-q21.2	p11.1-q11.22 p13-p14	
11	p12-p12 q14.3-q22.1		
12		q21.31-q22	
13	q14.3-q21.33 q21-q21 q21.1-q21.31 q21.1-q21.33	q13-q14.3 q14-q21	
16	q13q22 (x4)		
18	p11.31-pter	p11.2-pter q11.2-q12.2	
22	q11.21-pter		

Notes: The estimated sizes of the deletions and duplications range from 4.2 to 16.0 Mb (del) and from 3.4 to 31.3 Mb (dup). The numbers of studied families, where more than one, are shown in parentheses.

Source: From Barber (2005), and the Chromosome Anomaly Collection website at <http://www.acngi.org.uk/wessex/collection> (updated information is posted in the "What's New" section). Additional material due to Chen et al. (2011b), Coussement et al. (2011), Kowalczyk et al. (2013), and Liehr et al. (2009b).

Gardner and Amor. 2018; pag.372



16.8. Modifiche sostanziali del presente documento rispetto alla versione precedente

SEZIONE	CAPITOLI/PARAGRAFI	DESCRIZIONE	BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO
PARTE GENERALE	Cap. 6 Par. 8.1.1 Cap. 13	La parte generale è stata snellita, rimandando per la struttura e per i requisiti del laboratorio e indicazioni di carattere generale agli altri documenti SIGU: <ul style="list-style-type: none">• Standard e indicatori SIGUCERT• Linee di indirizzo per la conservazione del materiale biologico e documentale	Indicatori SIGUCERT Laboratorio di Genetica Medica; https://sigu.net/category/linee-guida-e-raccomandazioni/ Linee di indirizzo sulla Conservazione del Materiale Biologico e Documentale relativo ai Test Genetici; https://sigu.net/category/linee-guida-e-raccomandazioni/
INDICAZIONE ALL'ANALISI	Cap. 7 Allegato 16.1	E' stato inserito un Capitolo dedicato alle indicazioni all'analisi citogenetica (standard o molecolare) sia in diagnosi pre- che postnatale, facendo riferimento anche a NIPT e PGT-A.	Conferma diagnostica dopo NIPT con risultato ad alto rischio, non informativo o sesso discordante; https://www.sigu.net/commissioni/more/sezione-id/5/area/Documenti ESHRE Working Group on Chromosomal Mosaicism et al., 2022 Dolanc Merc et al. Prenat Diagn. 2023;1-9 GESTIONE DELLA MORTE ENDOUTERINA FETALE (MEF). PRENDERSI CURA DELLA NATIMORTALITÀ realizzato dalla Fondazione Confalonieri Ragonese su > mandato SIGO, AOGOI, AGU - del 17 febbraio 2023
CITOGENETICA STANDARD	Par. 8.1.2 Par 8.2.4 Par. 8.2.4.4 Par. 8.2.5 Allegati: 16.5, 16.6	Revisione degli standard <i>minimi</i> di livello di bandeggio in base all'indicazione al test Particolare attenzione alla problematica del mosaicismo in diagnosi prenatale, con due paragrafi dedicati rispettivamente agli approfondimenti finalizzati alla classificazione del ritrovamento di un mosaicismo e agli approfondimenti quando ci sia un sospetto di mosaicismo	Conferma diagnostica dopo NIPT con risultato ad alto rischio, non informativo o sesso discordante; https://www.sigu.net/commissioni/more/sezione-id/5/area/Documenti Benn P et al., Ultrasound Obstet Gynecol. 2019;54:458-467 Coorens THH et al. Nature. 2021;592:80-85 Eggenhuizen GM et al. Human Reproduction Update. 2021; 00(0):1-19 Grati FR et al., 2018;36(4):442-449 Grati FR et al., Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2017; 42:39-52
QF-PCR	Cap. 8	Snellimento del capitolo dedicato alla QF-PCR (con eliminazione della descrizione della parte più tecnica del test)	Mann K. et al., ACGS best practice guidelines for use of Quantitative Fluorescence-PCR for the detection of aneuploidy v4 (approved 26/11/18).
CMA	Par. 10.2 e sottoparagrafi	Revisione dell'interpretazione e classificazione delle CNV in base alle raccomandazioni dell'ACMG	Coe BP et al., Nat Genet. 2014 Oct;46(10):1063-71 Lowther C et al., Genet Med. 2015 Feb;17(2):149-57. Riggs ER et al., Genet Med. 2020 February ; 22(2): 245-257 Rosenfeld JA, et al. Genet Med. 2013 Jun;15(6):478-81. Ziats et al., Genet Med. 2016 Nov;18(11):1111-1118.



REFERTAZIONE	Par. 11.5 e sottoparagrafi	<p>E' stato inserito un capitolo dedicato alla refertazione con le peculiarità di ogni test. In particolare, per la CMA è stata ampliata la parte dedicata alla refertazione delle ROH, di CNV con eventuali geni recessivi e <i>incidental/secondary findings</i>.</p> <p>Inserimento della parte dedicata esplicitamente alla CMA in diagnosi prenatale con riferimento al documento SIGU-SIEOG con aggiornamenti minimi.</p>	<p>Deans ZC et al., Eur J Hum Genet. 2022 Sep;30(9):1011-1016 Gonzales PR et al., Genet Med. 2022 Feb;24(2):255-261 Kearney KM et al., Clin Lab Med. 2011 Dec;31(4):595-613 Miller DT et al., Genet Med. 2021 Aug;23(8):1381-1390 Pemberton TJ et al., Am J Hum Genet. 2012 Aug 10;91(2):275-92 Riggs ER et al., Genet Med. 2020 February ; 22(2): 245–257 Talukdar S et al., J Med Genet. 2019 Nov;56(11):718-726</p> <p>Uso appropriato delle tecniche di CMA (Chromosomal Microarray Analysis) nella diagnosi prenatale; https://sigu.net/category/linee-guida-e-raccomandazioni/</p>
---------------------	----------------------------	---	---