



# AMES

Group

GENETICA MEDICA · MICROBIOLOGIA · PATOLOGIA CLINICA



## **CENTRO POLIDIAGNOSTICO STRUMENTALE SRL**

Via Padre Carmine Fico, 24 - 80013 CASALNUOVO DI NAPOLI (NA)

Tel. e Fax 081.5224316 - 8420923 - 5227785 - 5227636

e-mail: [genetica@centroames.it](mailto:genetica@centroames.it) - [marketing@centroames.it](mailto:marketing@centroames.it)

**web site: [www.centroames.it](http://www.centroames.it)**

P.I. 02982591212 - Reg. Imp. di Napoli 01730460639 - N. R.E.A. 316414



# indice

<b>1</b>	<b>Presentazione del centro polidiagnostico strumentale ames settore di genetica medica</b>	<b>pag.</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Attività</b>	<b>pag.</b>	<b>6</b>
2.1	Ambulatorio	pag.	6
2.2	Citogenetica	pag.	6
2.3	Biologia molecolare	pag.	7
2.4	Genetica molecolare prenatale	pag.	7
2.5	Genetica forense	pag.	7
<b>3</b>	<b>Modalità di accesso alle prestazioni</b>	<b>pag.</b>	<b>7</b>
3.1	Ubicazione del laboratorio e dell'ambulatorio consulenze	pag.	7
3.2	Informazioni e prenotazioni	pag.	7
3.3	Pagamento del ticket	pag.	8
3.4	Consegna dei referti	pag.	8
3.5	Privacy	pag.	8
<b>4</b>	<b>Informazioni per l'utente</b>	<b>pag.</b>	<b>8</b>
4.1	Sito Internet	pag.	8
4.2	Reclami e Segnalazioni	pag.	8
<b>5</b>	<b>Certificazioni e standard di qualità</b>	<b>pag.</b>	<b>9</b>
<b>6</b>	<b>Citogenetica</b>	<b>pag.</b>	<b>9</b>
6.1	Analisi citogenetica prenatale su villi coriali, liquido amniotico	pag.	9
6.2	Aalisi citogenetica/molecolare su materiale o tessuto abortivo	pag.	10
6.3	Analisi citogenetica postnatale	pag.	11
<b>7</b>	<b>Genetica molecolare</b>	<b>pag.</b>	<b>12</b>
7.1	Principi	pag.	12
7.2	Quando si esegue	pag.	12
7.3	Metodi	pag.	12
<b>8</b>	<b>Cariotipa molecolare</b>	<b>pag.</b>	<b>12</b>
8.1	Principi	pag.	12
8.2	Analisi prenatale mediante CGH Array	pag.	13
8.3	Analisi postnatale mediante CGH Array	pag.	14

<b>9</b>	<b>Cariotipa molecolare</b>	<b>pag.</b>	<b>15</b>
9.1	Principi	pag.	15
9.2	Screening genetico di mutazioni mediante NGS	pag.	15
<b>10</b>	<b>Test genetica prenatale</b>	<b>pag.</b>	<b>15</b>
10.1	Analisi delle aneuploidie mediante QF-PCR	pag.	15
10.2	Diagnosi prenatale non invasiva su sangue periferico materno (vera prenatal test®)	pag.	16
10.3	Fattore RH fetale	pag.	17
10.4	Ultramniocentesi	pag.	18
<b>11</b>	<b>Elenco dei test eseguiti</b>	<b>pag.</b>	<b>20</b>
11.1	Amiloidosi familiare	pag.	20
11.2	Analisi molecolare mielodisplastica dei geni TP53 E ASX1	pag.	20
11.3	Analisi di zigosita'	pag.	20
11.4	Cardiomiopatia ipertrofica	pag.	21
11.5	Cardiomiopatia dilatativa (DCM)	pag.	21
11.6	Cecita' congenita notturna	pag.	22
11.7	Celiachia	pag.	22
11.8	Displasia aritmogena del ventricolo destro (D/ARVD)	pag.	23
11.9	Degenerazione maculare senile (DMS)	pag.	23
11.10	Disomie uniparentali (UDP)	pag.	24
11.11	Distrofia muscolare di Duchenne – Becker (DMD)	pag.	24
11.12	Emocromatosi ereditaria	pag.	25
11.13	Febbre mediterranea familiare	pag.	25
11.14	Fibrosi cistica (CF)	pag.	26
11.15	Intolleranza al lattosio	pag.	26
11.16	Iperplasia surrenale congenita (CAH)	pag.	26
11.17	Ipoacusia	pag.	27
11.18	Ipogonadismo ipogonadotropo congenito (CHH)	pag.	27
11.19	Malattia di Best o distrofia maculare vitelliforme	pag.	28
11.20	Malattia di Fabry	pag.	28
11.21	Malattia di Stargardt	pag.	29
11.22	Melanoma (CDKN2A)	pag.	29
11.23	Microrodelezioni del cromosoma y	pag.	30
11.24	Neoplasia endocrina multipla	pag.	30
11.25	Neuropatia ereditaria con paralisi da pressione (HNPP)	pag.	31
11.26	Porfirie	pag.	31
11.27	Sindrome del QT-LUNGO (LQTS)	pag.	32
11.28	Rene Policistico dell'adulto (ADPKD)	pag.	32
11.29	Retinite pigmentosa autosomica recessiva, dominante e x-linked	pag.	33
11.30	Sindrome di Charcot-Marie-Tooth	pag.	33
11.31	Sindrome di Marfan	pag.	34
11.32	Sindrome Angelman	pag.	35
11.33	Sindrome Brugada	pag.	35
11.34	Sindrome di Gilbert	pag.	35
11.35	Sindrome di Prader Willi	pag.	36
11.36	Sindrome di Silver Russell (SRS)	pag.	36
11.37	Sindrome Von Hippel-Lindau (VHL)	pag.	37
11.38	Sindrome di Usher (SRS)	pag.	37

11.39	Sindrome dell' x-fragile	pag.	37
11.40	Tachicardia ventricolare (TV)	pag.	38
11.41	Talassemia Beta ed Alfa	pag.	38
11.42	Trombofilia	pag.	39
11.43	Vitreoretinopatie	pag.	40
<b>12</b>	<b>Farmacogenetica e Diagnosi Molecolare in Oncologia</b>	<b>pag.</b>	<b>40</b>
12.1	Farmacogenetica	pag.	40
12.2	Diagnosi Molecolare in Oncologia	pag.	41
<b>13</b>	<b>Infettivologia Molecolare</b>	<b>pag.</b>	<b>43</b>
13.1	Ricerca di candida species	pag.	43
13.2	Ricerca di Chlamydia Trachomatis	pag.	44
13.3	Ricerca di Citomegalovirus (CMV)	pag.	44
13.4	Ricerca di Gardenerella	pag.	44
13.5	Ricerca di HBV	pag.	44
13.6	Ricerca di HCV	pag.	45
13.7	Ricerca e Genotipizzazione di Papilloma Virus (HPV)	pag.	45
13.8	Ricerca di Herpes Simplex Virus (HSV 1-2)	pag.	45
13.9	Ricerca di Mycoplasma Genitalium- Mycoplasma Hominis	pag.	45
13.10	Ricerca di Neisseria Gonorrhoeae	pag.	46
13.11	Ricerca di Toxoplasma Gondii	pag.	46
13.12	Ricerca di Trichomonas Vaginalis	pag.	46
13.13	Ricerca di Rubella virus	pag.	47
13.14	Ricerca di pseudomonas aeruginosa	pag.	47
13.15	Ricerca di Ureaplasma parvum-ureaplasma urealyticum	pag.	47
13.16	Ricerca di Virus Varicella - Zoster	pag.	47
<b>14</b>	<b>Genetica Forense</b>	<b>pag.</b>	<b>48</b>
14.1	Principi	pag.	48
14.2	Test di Paternità	pag.	48
<b>15</b>	<b>Test di parentela</b>	<b>pag.</b>	<b>48</b>

## 1 Presentazione del centro polidiagnostico strumentale ames

### Settore di Genetica Medica

L'attività del Centro Polidiagnostico Strumentale AMES si estende in tutto il territorio nazionale, fornendo supporto diagnostico specialistico per strutture sanitarie, pubbliche e private, laboratori di analisi, case di cura, ospedali, cliniche private, poliambulatori medici, centri di procreazione medicalmente assistita e medici specialisti in differenti discipline. La diagnosi molecolare di una malattia genetica è spesso essenziale per una corretta diagnosi clinica e per fornire, quando possibile, l'adeguato supporto terapeutico. Il settore di Genetica del Centro AMES è in grado di offrire test di diagnosi molecolare per diverse patologie genetiche, eseguibili sia in epoca pre-natale che post-natale. I test genetici sono effettuati secondo protocolli nazionali ed internazionali. Il referto, redatto al termine delle indagini di laboratorio, riporta con chiarezza il tipo di metodiche utilizzate, il risultato ottenuto ed un commento dettagliato che aiuterà il medico richiedente nell'interpretazione dei dati, fornendo indicazioni su eventuali limiti della metodica utilizzata e su altre indagini necessarie per completare l'iter diagnostico. L'evoluzione tecnologica nel settore della genetica impone un continuo aggiornamento delle strumentazioni. Strumento fondamentale del modello organizzativo del Centro AMES è rappresentato dalla dotazione strumentale, quanto di più moderno ed avanzato sia oggi reperibile, continuamente aggiornata ai progressi della tecnica ed alle nuove esigenze diagnostiche emergenti. Il nostro obiettivo è quello di offrire prestazioni di alta specializzazione in citogenetica ed in genetica per la prevenzione e la ricerca delle malattie genetiche pre-natale, post-natale ed acquisite. Ciò costituisce per il Centro AMES un impegno costante, ed allo stesso tempo uno strumento con cui contribuire alla crescita di tutti i collaboratori della struttura, degli altri specialisti e del cittadino nonché allo sviluppo della sanità del proprio territorio. Il Centro AMES svolge attività diagnostica e di consulenza clinica per patologie ereditarie e variabilità genetica. Erega prestazioni per conto del Sistema Sanitario Nazionale come laboratorio d'alta specializzazione, pertanto, dispone di personale altamente qualificato e costantemente aggiornato sulle novità analitiche e tecnologiche.

Il Centro AMES è dotato di personale appartenente ai profili professionali di biologi, chimici, medici, ingegneri, fisici, tecnici sanitari di laboratorio, infermieri e amministrativi.

## 2 Attività

### 2.1 Ambulatorio

Presso l'ambulatorio del Centro AMES si effettua il servizio di consulenza genetica pre test, post test e clinica nella quale i soggetti e le famiglie vengono informati sulla natura, l'ereditarietà e le implicazioni delle malattie genetiche. La consulenza è anche finalizzata a fornire un aiuto all'utente al fine di prendere decisioni informate d'ordine medico e personale.

L'attività di consulenza spazia in diversi campi:

- consulenza genetica diagnostica (prenatale, postnatale, ed oncologica);
- consulenza genetica per la caratterizzazione dei portatori sani;
- consulenza genetica di suscettibilità;
- consulenza genetica pre test pre sintomatici;
- consulenza genetica farmacogenetica;
- consulenza genetica per indagine forense.

### 2.2 Citogenetica classica e molecolare

Le analisi citogenetiche consentono lo studio dell'assetto cromosomico delle cellule, ovvero del cariotipo, e l'individuazione di piccole alterazioni strutturali dei cromosomi. L'attività prevede l'effettuazione di indagini diagnostiche volte all'identificazione delle anomalie cromosomiche costituzionali (citogenetica costituzionale), acquisite (citogenetica acquisita) e allo studio delle anomalie cromosomiche indotte e delle sindromi da instabilità cromosomica (mutagenesi citogenetica).

Inoltre, attraverso il cariotipo molecolare o ibridazione genomica comparativa su microarray (Array - Comparative Genomic Hybridization o Array-CGH) è possibile analizzare l'assetto cromosomico del paziente con una risoluzione maggiore, a fine di individuare eventuali anomalie cromosomiche di dimensioni inferiori rispetto a quelle rilevabili con la citogenetica classica.

### 2.3 Biologia molecolare

Le indagini di genetica molecolare consistono nello studio del DNA le cui alterazioni possono essere correlate o responsabili di un particolare fenotipo; attraverso l'analisi molecolare è quindi possibile individuare mutazioni del patrimonio genetico responsabili di malattie ereditarie e/o varianti polimorfiche. Con la Next Generation Sequencing (NGS), grazie alla produzione di miliardi di sequenze di DNA in forma di corti frammenti, è possibile costruire una mappa dei geni coinvolti in numerose patologie. Inoltre con le moderne tecniche di biologia molecolare è possibile la diagnosi molecolare delle infezioni virali, batteriche e parassitarie mediante amplificazione genica (PCR).

### 2.4 Genetica molecolare prenatale - Post Natale

L'impiego delle tecniche di biologia molecolare nella genetica prenatale ha permesso, mediante analisi del DNA, di individuare le mutazioni geniche associate alle malattie genetiche più frequenti e più gravi che possono interessare il feto e comprometterne la salute.

Le tecniche di biologia molecolare impiegate sono:

- QF-PCR (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction);
- Cariotipo;
- Cariotipo molecolare (Array - Comparative Genomic Hybridization o Array-CGH);
- Next Generation Sequencing (NGS);
- Real Time PCR;
- Sequenziamento Sanger.

A seconda della procedura di prelievo del campione da analizzare, i test prenatali si suddividono in due categorie:

test prenatali invasivi (ad es. amniocentesi e villocentesi);

test prenatali non invasivi (prelievo ematico della madre per l'analisi della frazione fetale del DNA libero circolante).

### 2.5 Genetica forense

L'attività di questo settore del Laboratorio è rivolta alle indagini di paternità, di identità e criminalistiche ed è rivolto ad utenti esterni.

Ulteriori indagini genetiche

2.6 Il Centro Ames utilizza le tecnologie più avanzate nell'ambito della genetica e si avvale di genetisti di altissimo livello provenienti dal mondo Universitario e della ricerca medica. Per tale motivo è possibile richiedere indagini molecolari per altre patologie non specificatamente descritte all'interno di questa carta dei servizi, così come è possibile svolgere alcune analisi presenti nella carta anche su differenti materiali biologici. Lo specialista, tramite un continuo contatto con i genetisti del Centro Ames, potrà richiedere specifiche analisi e confrontarsi su eventuali criticità emergenti sia pre sia post indagini genetiche.

## 3 Modalità di accesso alle prestazioni

Per poter effettuare un'analisi presso il Centro AMES è necessaria una richiesta su ricettario regionale da parte del Medico di Medicina Generale unitamente alla richiesta dello specialista. La richiesta deve riportare sempre il quesito diagnostico o la motivazione clinica. Naturalmente è possibile accedere alle prestazioni del Centro Ames anche in regime non convenzionato.

### 3.1 Ubicazione del laboratorio e dell'ambulatorio consulenze

Il Centro AMES è ubicato in Via Padre Carmine Fico n. 24; il laboratorio e l'ambulatorio per il prelievo si trovano al piano terra dell'edificio mentre gli Ambulatori per le consulenze genetiche sono ubicati al primo piano e al piano terra dell'edificio.

### 3.2 Informazioni e prenotazioni

Orario di apertura al pubblico della segreteria

Per appuntamenti, prelievi, informazioni e consegna referti:

dal Lunedì al Venerdì dalle ore 7.30 alle ore 13.00 e dalle ore 15.00 alle ore 19.00, il Sabato dalle ore 7.30 alle ore 12.30 e dalle ore 14.00 alle ore 18.00, la Domenica dalle ore 8.00 alle ore 12.00.



Appuntamenti telefonici

Per prenotare una consulenza pre o post natale e per test genetici: Telefonare al numero 081 5224316 o al numero verde 800 586 368.

3.3 Modalità pagamento del ticket e/o delle prestazioni sanitarie All'accettazione: Il pagamento del ticket si effettua al momento del prelievo. Il pagamento può essere effettuato in contanti o bancomat.

Esenzioni: sono esenti i pazienti già in possesso di un certificato di esenzione totale o malattia rara e per reddito come indicato dalla vigente normativa.

On-line: L'utente, a seguito della registrazione sul sito web, provvederà ad effettuare il pagamento on line del test richiesto mediante la procedura presente in "pagamenti on line" nella sezione "servizi on line" del sito. Dopo la conferma del pagamento, lo staff del centro invierà le istruzioni per la spedizione del campione biologico e/o l'eventuale invio e ritiro delle apposite provette per la raccolta del campione ematico, e se necessario provvederà ad organizzare il prelievo presso il domicilio della paziente ad opera di un nostro infermiere (nel caso di test prenatale).

3.4 Modalità di consegna dei referti

I referti possono essere ritirati a partire dal giorno indicato dal personale amministrativo al momento dell'accettazione o secondo indicazioni fornite al momento della consulenza. E' possibile richiedere la spedizione presso il domicilio o a mezzo di posta elettronica del referto previo compilazione di modulo di autorizzazione al momento della consulenza o dell'accettazione o della consegna del campione. Al momento del ritiro del referto è necessario presentare la ricevuta di pagamento del ticket ed il documento di riconoscimento. È inoltre importante tenere presente che nel caso in cui si sia sprovvisti del documento di riconoscimento o della delega necessaria al ritiro, gli operatori non potranno consegnare il referto.

A seguito della registrazione "on-line" è possibile ricevere il referto mediante posta elettronica.

3.5 Privacy

Al fine di garantire la riservatezza delle persone che effettuano gli esami, il Centro Polidiagnostico Strumentale AMES si attiene alle seguenti indicazioni:

- il referto è consegnato in modo da garantire la totale riservatezza del contenuto;
- il referto viene consegnato ad una persona diversa dal diretto interessato esclusivamente in presenza di delega scritta.

Al momento del ritiro del referto è sempre presente un medico o un biologo specialista al quale rivolgersi in caso si desiderino chiarimenti.

## 4 Informazioni per l'utente

4.1 Sito internet

L'utente può avere informazioni sul laboratorio consultando il sito internet alla pagina <http://www.centro-ames.it>.

4.2 Reclami e segnalazioni

L'utente ha la possibilità di inviare segnalazioni, reclami ed elogi, scritti o verbali relativi a questioni tecnico professionali e non.

Reclami

Chi può presentare un reclamo:

direttamente l'interessato, i suoi parenti o le associazioni di volontariato e tutela (in questo caso su delega scritta del diretto interessato).

A chi deve essere indirizzato il reclamo:

al Direttore Generale del Centro Polidiagnostico Strumentale AMES.

Cosa deve contenere il reclamo:

le generalità del soggetto interessato (nome, cognome, indirizzo e recapito telefonico laddove si possiede), un'adeguata descrizione dell'evento denunciato, la firma.



Il reclamo può essere consegnato:  
a mano direttamente al Centro Polidiagnostico Strumentale AMES; per posta al seguente indirizzo:  
Via Padre Carmine Fico n°24, Casalnuovo di Napoli, 80013;  
per fax: 0815224316; per e-mail: [genetica@centroames.it](mailto:genetica@centroames.it), [centroames@libero.it](mailto:centroames@libero.it)  
In questo caso il reclamo dovrà essere formalizzato con una firma autografa presso l'Ufficio Relazioni con il Pubblico.  
Gli utenti possono anche inviare reclami non formali  
al Direttore del Centro AMES per e-mail: [centroames@libero.it](mailto:centroames@libero.it) al Laboratorio di Genetica per e-mail: [genetica@centroames.it](mailto:genetica@centroames.it)

## 5 Certificazioni e standard di qualità

Il laboratorio di Genetica Medica del Centro Polidiagnostico AMES opera in riferimento agli standard qualitativi del disciplinare della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU), finalizzati ad operare per un miglioramento continuo della qualità delle prestazioni offerte a garanzia dei cittadini ed anche a tutela di tutti i professionisti del settore in riferimento alle linee guida e alle raccomandazioni delle Società Scientifiche.

Per il controllo dell'adeguatezza a tali standard il laboratorio di Genetica Medica del Centro Polidiagnostico AMES esegue il monitoraggio di indicatori di qualità. Tra i vari indicatori procediamo al monitoraggio dei tempi di risposta, il numero dei reclami, la soddisfazione degli utenti attraverso questionari specifici.

L'orientamento alla qualità coinvolge, in un processo di miglioramento, l'intera attività del laboratorio di Genetica Medica del Centro Polidiagnostico AMES allo scopo di migliorarne l'efficienza e l'efficacia in relazione alla "soddisfazione" dell'utente/paziente e delle parti interessate al processo. A tale scopo abbiamo sviluppato il nostro sistema di gestione orientato alla Qualità secondo il modello UNI EN ISO 9001:2008

Inoltre presso il Centro Polidiagnostico AMES vengono eseguiti i CEQ dei test Genetici dell'Istituto Superiore della Sanità e di quelli europei.

## 6 Citogenetica

La citogenetica è quel ramo della genetica umana che studia la morfologia dei cromosomi e il cariotipo, ossia l'insieme dei cromosomi di una cellula allo scopo di identificare la presenza di eventuali anomalie che sono alla base di condizioni patologiche specifiche o di riduzione della fertilità.

### 6.1. Analisi citogenetica in diagnosi prenatale su villi coriali e liquido amniotico

La diagnosi prenatale si esegue su liquido amniotico e villi coriali e permette di conoscere se il feto è affetto da alterazioni del patrimonio cromosomico sia numeriche (trisomie e monosomie), sia strutturali, come traslocazioni, delezioni, duplicazioni ed inversioni. E' eseguita in gravidanza (dal primo fino al secondo trimestre) e permette lo studio del cariotipo fetale attraverso un'indagine citogenetica su villo coriale o da liquido amniotico. Tale prestazione in caso di gravidanza a rischio per anomalie genetiche ed anomalie cromosomiche, è esente da ticket, come da protocollo regionale.

Indicazione all'analisi:

- madri con età superiore ai 35 anni di età;
- genitori con precedente figlio affetto da anomalia cromosomica o da malattia genetica diagnosticabile;
- genitori portatori di riarrangiamento strutturale o da malattia genetica;
- patologia fetale eco evidenziata;
- test di screening.

Modalità dell'esame:

l'esame prevede l'esecuzione della coltura cellulare e l'analisi del cariotipo con tecniche di colorazio-

ne differenziale su tessuti fetali quali villi coriali e liquido amniotico. In caso d'analisi su villi coriali si effettua una valutazione immediata della presenza di materiale fetale e l'esito di tale valutazione è tempestivamente comunicato via fax al personale della struttura di provenienza.

Dove si effettua l'analisi:

il prelievo di liquido amniotico e di villo coriale è eseguito presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames o presso altra struttura che presenti requisiti appropriati per l'esecuzione del prelievo.

Tempi di risposta:

- standard liquido amniotico 21 giorni;
- standard villo coriale coltura a breve termine 7 giorni;
- standard villo coriale, coltura a lungo termine 21 giorni.

Giorni e orari di accettazione dei campioni:

dal lunedì al venerdì dalle 8.00 alle 13.00 e dalle 15.00 alle 19.00;

sabato dalle ore 7.30 alle 12.30 e dalle 14.00 alle 18.00;

domenica dalle 8.00 alle 12.00.

Per invio di campioni urgenti sono necessari accordi telefonici con il Laboratorio.

Documentazione da allegare al campione:

- richiesta su ricettario regionale;
- tessera sanitaria;
- consulenza genetica;
- consenso informato.

Scheda dati paziente (anagrafici ed anamnestici).

Modalità di raccolta del materiale biologico:

√ Campioni di liquido amniotico

Quantità di campione necessario per l'esame: 18-20 ml distribuiti in 2 provette da 9-10 ml ciascuna;

- tipo di contenitore: provetta conica sterile con tappo a vite;
- modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente, data di nascita, firma dell'utente;
- conservazione del campione: temperatura ambiente;
- tempi di consegna al laboratorio: nel più breve tempo e comunque entro 24 ore dal prelievo.

Nota: in caso di prelievo che presenta contaminazione ematica è necessario aggiungere 1 goccia di eparina.

Campioni di villi coriali

- quantità di campione necessario per l'esame: 15-25 mg;
- tipo di contenitore: siringa o provetta (a fondo piatto sterile con tappo a vite) forniti dal laboratorio contenenti il terreno per la raccolta;
- modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente, data di nascita e firma dell'utente;
- conservazione del campione: temperatura ambiente;
- tempi di consegna al laboratorio: nel più breve tempo e comunque entro 24 ore.

In caso di gravidanza gemellare o nel caso di contaminazione ematica è necessario inviare anche un campione di sangue materno: 2 provette tappo viola con anticoagulante.

## 6.2 Analisi citogenetica/molecolare di materiale o tessuto abortivo

L'analisi citogenetica prevede lo studio del cariotipo fetale su villo coriale da aborto spontaneo e/o tessuti fetali. L'analisi molecolare prevede la ricerca delle aneuploidie cromosomiche più frequenti. Giorni e orari di accettazione dei campioni:

- dal lunedì al venerdì dalle 8.00 alle 13.00 e dalle 15.00 alle 19.00;
- sabato dalle ore 7.30 alle 12.30 e dalle 14.00 alle 18.00;
- domenica dalle 8.00 alle 12.00.

Per invio di campioni urgenti sono necessari accordi telefonici con il Laboratorio. E' inoltre possibile, su appuntamento da concordare con il Laboratorio, effettuare prelievi a domicilio grazie ad infermieri specializzati.

Documentazione necessaria, da allegare al campione:

- richiesta su ricettario regionale o modelli aziendali;
- fotocopia tessera sanitaria;

- consenso informato;
- scheda dati paziente (anagrafici ed anamnestici).

Modalità di raccolta del materiale biologico e refertazione:

- quantità di campione necessario per l'esame: >15-20 mg;
- tipo di contenitore: provetta sterile contenete terreno di coltura fornito dal laboratorio o contenitore sterile con soluzione fisiologica sterile;
- modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente e data di nascita. Data la possibilità di evidenziare contaminazione di DNA materno su DNA fetale, è necessario che il campione di materiale abortivo sia accompagnato da un campione materno di sangue periferico in EDTA.

### 6.3 ANALISI CITOGENETICA POST-NATALE

L'indagine citogenetica in diagnosi post natale consiste nello studio del corredo cromosomico (cariotipo o mappa cromosomica) su individui con sospetta sindrome cromosomica, per familiarità a soggetti con anomalie cromosomiche, su genitori di soggetti malformati o con sospetta sindrome cromosomica deceduti senza diagnosi, qualora si riscontri ritardo mentale e/o difetti congeniti, ritardo dell'accrescimento, su neonati nati morti e su coppie con aborti spontanei ripetuti, nel caso di infertilità maschile e/o femminile con amenorrea primaria o secondaria (assenza o interruzione del ciclo mestruale) al fine di riconoscere anomalie cromosomiche che si associano ad una condizione patologica, ad una riduzione della fertilità o ad una maggiore probabilità di generare figli affetti da patologia cromosomica.

L'esame prevede:

come parte integrante la consulenza genetica nella quale vengono raccolte informazioni sulla famiglia e il consenso informato all'esame; un prelievo di sangue periferico (non è necessario essere digiuni ma si può consumare una leggera colazione).

Documentazione necessaria, da allegare al campione:

- richiesta su ricettario regionale;
- tessera sanitaria;
- consulenza genetic;
- consenso informato;
- scheda dati paziente (anagrafici ed anamnestici).

Dove si effettua:

Il prelievo di sangue è eseguito presso il Centro Polidiagnostico AMES. Giorni e orari di accettazione dei campioni esterni:

- dal lunedì al venerdì dalle 8.00 alle 13.00 e dalle 15.00 alle 19.00;
- sabato dalle ore 7.30 alle 12.30 e dalle 14.00 alle 18.00;
- domenica dalle 8.00 alle 12.00.

Per invio di campioni urgenti sono necessari accordi telefonici con il Laboratorio. E' inoltre possibile, su appuntamento da concordare con il Laboratorio, effettuare prelievi a domicilio grazie ad infermieri specializzati.

Tempi di risposta:

Standard 21 giorni.

Note: il tempo di risposta può prolungarsi nel caso in cui si renda necessario l'allestimento di tecniche particolari qualora si evidenzia la necessità di effettuare indagini più approfondite.

Si esegue in:

- soggetti con sospetta sindrome cromosomica o malattia genetica;
- genitori e familiari di soggetti con anomalie cromosomiche;
- soggetti con ritardo mentale o ritardo d'accrescimento;
- morte neonatale;
- coppie con figlio con sospetta sindrome cromosomica, deceduto senza diagnosi;
- coppie con poliabortività;

- soggetti infertili;
- controllo dei genitori in diagnosi prenatale con anomalia cromosomica del feto.

Modalità di raccolta del materiale biologico:

Quantità di campione necessario per l'esame:  $\geq 3$  ml di sangue periferico Tipo di contenitore: provetta eparinata tappo verde;

Modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente, data di nascita. Conservazione del campione: temperatura ambiente

Tempi di consegna al laboratorio: entro 24 ore dal prelievo

## 7 Genetica molecolare

### 7.1 Principi

Le indagini di genetica molecolare consistono nello studio del DNA le cui alterazioni possono essere correlate o responsabili di un particolare fenotipo; attraverso l'analisi molecolare è quindi possibile individuare mutazioni del patrimonio genetico responsabili di malattie ereditarie. Le indagini molecolari permettono non soltanto di realizzare diagnosi caratterizzando geneticamente i soggetti affetti da una particolare patologia, ma anche di individuare i portatori sani; questa ultima informazione è impiegata nell'ambito della consulenza genetica per il calcolo del rischio di ricorrenza.

### 7.2 Quando si esegue

L'analisi molecolare può essere effettuata in epoca pre-natale e post-natale, a partire da diversi tipi di materiale biologico: villo coriale, liquido amniotico, sangue fetale o materiale abortivo nel caso di analisi prenatale; sangue periferico, biopsie di tessuto o tracce biologiche (capelli, sperma, ossa, dente ecc) nel caso di test condotti in epoca post-natale, materiale paraffinato, biopsie tumorali.

### 7.3 Metodi

Lo studio molecolare delle malattie genetiche prevede l'estrazione del DNA dal campione biologico e nella maggior parte dei casi una reazione di amplificazione del DNA estratto con tecnica di Polymerase Chain Reaction (PCR). La fase analitica successiva è rappresentata generalmente dal sequenziamento automatico del frammento amplificato in PCR. La ricerca di mutazioni viene quindi eseguita confrontando la sequenza ottenuta per il campione in esame con la sequenza di riferimento (sequenza detta "wild-type", cioè normale). Nel caso in cui le mutazioni che determinano una precisa patologia siano note ed in numero limitato, si può procedere alla sola ricerca di tali mutazioni invece di analizzare l'intero gene.

L'analisi mediante sequenziatore automatico è anche utilizzato per l'analisi di frammenti. Una delle applicazioni di questo tipo di analisi realizzata nel Laboratorio di Genetica del Centro AMES è la Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) in diagnosi prenatale impiegata per individuare alterazioni numeriche relative ai soli cromosomi 13, 18, 21 e ai cromosomi sessuali X e Y. La tecnica MLPA (Multiple Ligation dependent Probe Amplification) è utilizzata per la ricerca di delezioni o duplicazioni. La tipologia di analisi molecolare eseguita può essere diversa rispetto a quelle sopraindicate a seconda dei dati emersi dalla consulenza genetica. In alcuni casi per il completamento dell'analisi può essere necessario eseguire l'esame anche sui genitori o su altri familiari della persona che ha richiesto un'analisi molecolare.

## 8 Cariotipa molecolare

(Array - Comparative Genomic Hybridization o Array-CGH)

### 8.1 Principi

Il cariotipo molecolare o ibridazione genomica comparativa su microarray (Array - Comparative Genomic Hybridization o Array-CGH) è una tecnica di citogenetica molecolare, dotata di ampio potere risolutivo, che consente di identificare anomalie cromosomiche di tipo numerico (aneuploidie) a carico dei 22 autosomi e dei cromosomi sessuali (X e Y), e anche variazioni del numero di copie (CNV) di sequenze del DNA umano, come duplicazioni/amplificazioni (presenza in eccesso di materiale genetico) o delezioni (perdita di materiale genetico), rispetto al livello di ploidia del DNA di un campione

rispetto ad un controllo di riferimento. Il principio della tecnica si basa infatti sull'ibridazione competitiva tra due DNA genomici (campione e controllo di riferimento) diversamente marcati con specifici fluorocromi e coibridati su un array di oligonucleotidi. Il potere risolutivo della tecnica è variabile a seconda della piattaforma utilizzata, caratterizzata dal numero e dalla spaziatura media tra le sonde. La maggior parte delle piattaforme CGH array clinicamente disponibili sono progettate per rilevare aneuploidie e per identificare microdelezioni/microduplicazioni e riarrangiamenti cromosomici sub-lanciati subtelomerici, analizzando l'intero genoma o parti di questo in un singolo esperimento di ibridazione.

Per tale motivo rappresenta l'approccio di elezione nella diagnosi di laboratorio di malattie dovute a sbilanciamenti cromosomici criptici di dimensioni anche molto inferiori al limite di risoluzione della citogenetica convenzionale.

Inoltre questa metodica d'analisi mostra dati promettenti nella ricerca sul cancro e nella diagnosi, classificazione, prognosi di diverse neoplasie, oltre che per lo sviluppo degli obiettivi diagnostici e terapeutici. Ma questa tecnologia non è in grado di individuare gli squilibri cromosomici bilanciati come traslocazioni e le inversioni, alcuni ploidie ed un basso livello di mosaicismo o squilibri relativi a regioni cromosomiche non rappresentate dalle piattaforme selezionate. Il CGH array ha aumentato la capacità di rilevare varianti genomiche (CNV) patologiche presenti in pazienti con ritardo globale dello sviluppo, ritardo mentale, autismo, anomalie congenite multiple e dismorfismi.

## 8.2 Analisi prenatale mediante CGH array

Il CGH array è ampiamente usato nella diagnosi prenatale, in particolare dopo un risultato ecografico anormale e per una caratterizzazione più profonda di anomalie cromosomiche rilevate nel cariotipo fetale.

È possibile effettuare presso il Centro Ames diagnosi prenatale mediante CGH array attraverso l'utilizzo di due piattaforme fornite da Agilent Technologies:

- "Piattaforma base" (EasyChip 8x15K), specifica per le patologie che interessano il feto, e la cui progettazione è stata curata dal Prof. Novelli. Tale piattaforma presenta una risoluzione spaziale di 250 Kb per 43 regioni specifiche associate a particolari disturbi o sindromi, di 500 Kb per le regioni subtelomeriche e di 3-4 Mb per le restanti sequenze genomiche.

"EasyChip 8x15K" consente di identificare alterazioni cromosomiche quali microdelezioni/duplicazioni responsabili di differenti sindromi, tra cui: Sindrome di Glass, sindrome di Wolf-Hirschhorn, Cri du chat di sindrome, sindrome di Sotos, sindrome di Williams-Beuren, sindrome di Langer-Giedion, sindrome di Kleefstra, sindrome di DiGeorge, sindrome di WAGR, sindrome di Potocki-Shaffer, sindrome di Jacobsen, sindrome di Prader-Willi, sindrome di Angelman ATR-16 sindrome, la sindrome Diaker Miller, sindrome di Smith-Magenis, sindrome di Potocki Lupski, sindrome di Koolen-De Vries, sindrome di Down, sindrome Cat-eye e molti altri alterazioni cromosomiche.

- "Piattaforma ad alta risoluzione" (4x180K) che presenta circa 180.000 sonde di oligonucleotidi lunghe 60 mer sintetizzate in situ sul vetrino ed una risoluzione media delle sonde di 13 Kb. Questa piattaforma consente di analizzare 16.605 geni ed è suggerita nei casi di sospetto o familiarità per l'autismo, comportamento dello spettro autistico, ritardo mentale, ritardo dello sviluppo (DD), difetti cardiaci, dismorfismi e per un elevato numero di sindromi ed alterazioni cromosomiche oltre quelle identificabili con la piattaforma EasyChip 8x15K.

Il test genetico:

su DNA estratto da villi coriali o liquido amniotico o sangue fetale per le indagini prenatali.

Indicazioni di analisi:

l'analisi viene effettuata in casi isolati e/o sindromici di ritardo mentale, di fenotipo clinicamente riconducibile ad anomalie cromosomiche in un cariotipo normale, in gravidanze in cui siano evidenziate ecograficamente anomalie fetali, in presenza di riarrangiamenti cromosomici apparentemente equilibrate e nel caso di un eccesso di marker cromosomici.

Tempi di risposta:

- "Piattaforma base" (EasyChip 8x15K), 20-25 giorni;
- "Piattaforma ad alta risoluzione" (4x180K), 30-45 giorni.



Giorni e orari di accettazione dei campioni:

- dal lunedì al venerdì dalle 8.00 alle 13.00 e dalle 15.00 alle 19.00;
- sabato dalle ore 7.30 alle 12.30 e dalle 14.00 alle 18.00;
- domenica dalle 8.00 alle 12.00.

Per invio di campioni urgenti sono necessari accordi telefonici con il Laboratorio.

Documentazione da allegare al campione:

- richiesta su ricettario regionale;
- tessera sanitaria;
- consulenza genetica;
- consenso informato.

Scheda dati paziente (anagrafici ed anamnestici).

Modalità di raccolta del materiale biologico:

√ Campioni di liquido amniotico

Quantità di campione necessario per l'esame: 8 ml;

- tipo di contenitore: provetta conica sterile con tappo a vite;
- modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente, data di nascita, firma dell'utente;
- conservazione del campione: temperatura ambiente;
- tempi di consegna al laboratorio: nel più breve tempo e comunque entro 24 ore dal prelievo.

Nota: in caso di prelievo che presenta contaminazione ematica è necessario aggiungere 1 goccia di eparina.

√ Campioni di villi coriali

- quantità di campione necessario per l'esame: 15-25 mg;
- tipo di contenitore: siringa o provetta (a fondo piatto sterile con tappo a vite) forniti dal laboratorio contenenti il terreno per la raccolta;
- modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente, data di nascita e firma dell'utente;
- conservazione del campione: temperatura ambiente;
- tempi di consegna al laboratorio: nel più breve tempo e comunque entro 24 ore.

In caso di gravidanza gemellare è necessario inviare anche un campione di sangue materno: 2 provette tappo viola con anticoagulante.

### 8.3 Analisi postnatale mediante CGH array

La diagnosi postnatale viene effettuata utilizzando la "Piattaforma ad alta risoluzione" in cui la piattaforma selezionata è la 4x180K che presenta circa 180.000 sonde di oligonucleotidi lunghe 60 mer sintetizzate in situ sul vetrino ed una risoluzione media delle sonde di 13 Kb. Questa piattaforma consente di analizzare 16.605 geni ed è suggerita nei casi di sospetto o familiarità per l'autismo, comportamento dello spettro autistico, ritardo mentale, ritardo dello sviluppo (DD), difetti cardiaci, dismorfismi e per un elevato numero di sindromi ed alterazioni cromosomiche oltre quelle identificabili con la piattaforma EasyChip 8x15K.

Il test genetico: l'esame si esegue su DNA sangue periferico provetta EDTA. In caso d'analisi su villi coriali si effettua una valutazione immediata della presenza di materiale fetale e l'esito di tale valutazione è tempestivamente comunicato via fax al personale della struttura di provenienza.

Dove si effettua l'analisi:

il prelievo di sangue sarà eseguito nel Centro Polidiagnostico Strumentale Ames o presso altra struttura che presenti requisiti appropriati per l'esecuzione del prelievo.

Indicazioni di analisi:

l'analisi viene effettuata in casi isolati e/o sindromici di ritardo mentale, di fenotipo clinicamente riconducibile ad anomalie cromosomiche in un cariotipo normale, in gravidanze in cui siano evidenziate ecograficamente anomalie fetali, in presenza di riarrangiamenti cromosomici apparentemente equilibrate e nel caso di un eccesso di marker cromosomici.

## 9 Cariotipa molecolare

### 9.1 Principi

La NGS è una nuova tecnologia che consente grazie alla produzione di miliardi di sequenze di DNA in forma di corti frammenti, di costruire una mappa dei geni coinvolti in numerose patologie. Con tale analisi è possibile identificare mutazioni, in singoli geni (gene CFTR, gene RET) o in un pannello di oltre 4800 geni, <http://www.illumina.com/products/trusight-one-sequencing-panel.html> correlate alle patologie genetiche più diffuse ed ad oggi conosciute. E' possibile inoltre verificare la predisposizione a diversi tumori (BRCA1- BRCA2 per la predisposizione al carcinoma mammario e ovarico).

### 9.2 Screening genico di mutazioni mediante NGS

Prevsso il Laboratorio di Genetica Medica del Centro AMES è possibile, mediante le tecnologia NGS, eseguire lo screening di mutazioni responsabili di numerose patologia, quali ad esempio:

- CANALOPATIE;
- AUTISMO;
- IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE;
- SINDROME DEL QT LUNGO;
- SINDROME DI BRUGADA;
- SINDROME DI MARFAN;
- SINDROME DEL QT CORTO;
- DISPLASIA ARITMOGENA DEL VENTRICOLO DESTRO;
- CARDIOMIOPATIA DILATATIVA;
- Etc.

Il test genetico:

su DNA estratto da linfociti del sangue periferico (2 tubi Vacutainer EDTA di 3 ml di sangue intero) per le indagini postnatali.

Su DNA estratto da villi coriali o liquido amniotico per le indagini prenatali

## 10 Test genetica prenatale

Oltre le tecniche sopracitate, quali ANALISI CITOGENETICA IN DIAGNOSI PRENATALE SU VILLI CO-RIALI E LIQUIDO AMNIOTICO (cap. 6.2) ed l'ANALISI PRENATALE mediante CGH ARRAY (8.2), altri

test eseguibili presso il Centro Polidiagnostico Strumentale AMES sono :

- Analisi delle aneuploidie mediante QF-PCR;
- Vera Prenatal test®;
- Fattore RH fetale;
- Ultramniocentesi.

### 10.1 Analisi delle aneuploidie mediante QF-PCR

La tecnica della QF-PCR (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction ) nasce dall' applicazione della biologia molecolare alla genetica prenatale e consiste in una tecnica di amplificazione quantitativa fluorescente di sequenze di DNA ripetute altamente polimorfiche. La tecnica permette di definire l'assetto numerico dei cromosomi 13, 18, 21, X ed Y, per poter evidenziare la presenza di eventuali aneuploidie. Questa metodica, altamente innovativa, rappresenta un utile supporto diagnostico nei casi di fallimento della coltura cellulare, referti ecografici dubbi in gravidanze inoltrate, riscontro immediato di sindromi polimalformative (es. triploidie) e conferma di ITG per trisomie 13, 18, e 21; inoltre consente di effettuare un' amniocentesi anche a sole 12-14 settimane (amniocentesi precoce).



Indicazione all'analisi:

- madri con età superiore ai 35 anni di età;
- genitori con precedente figlio affetto da anomalia cromosomica o da malattia genetica diagnosticabile;
- genitori portatori di riarrangiamento strutturale o da malattia genetica;
- patologia fetale eco evidenziata;
- test di screening.

Il test genetico:

l'esame si esegue su DNA estratto da villi coriali, liquido amniotico o sangue fetale. In caso d'analisi su villi coriali si effettua una valutazione immediata della presenza di materiale fetale e l'esito di tale valutazione è tempestivamente comunicato via fax al personale della struttura di provenienza.

Dove si effettua l'analisi:

il prelievo di liquido amniotico e di villo coriale è eseguito presso il Centro Polidiagnostico Strumen- tale Ames o presso altra struttura che presenti requisiti appropriati per l'esecuzione del prelievo.

Tempi di risposta:

- QF-PCR per aneuploidie 24-48 ore.

Giorni e orari di accettazione dei campioni:

- dal lunedì al venerdì dalle 8.00 alle 13.00 e dalle 15.00 alle 19.00;
- sabato dalle ore 7.30 alle 12.30 e dalle 14.00 alle 18.00;
- domenica dalle 8.00 alle 12.00.

Per invio di campioni urgenti sono necessari accordi telefonici con il Laboratorio.

Documentazione da allegare al campione:

- richiesta su ricettario regionale;
- tessera sanitaria;
- consulenza genetica;
- consenso informato.

Scheda dati paziente (anagrafici ed anamnestici).

Modalità di raccolta del materiale biologico:

√ Campioni di liquido amniotico

Quantità di campione necessario per l'esame: 3 ml;

- tipo di contenitore: provetta conica sterile con tappo a vite;
- modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente, data di nascita, firma dell'utente;
- conservazione del campione: temperatura ambiente;
- tempi di consegna al laboratorio: nel più breve tempo e comunque entro 24 ore dal prelievo.

Nota: in caso di prelievo che presenta contaminazione ematica è necessario aggiungere 1 goccia di eparina.

√ Campioni di villi coriali

- quantità di campione necessario per l'esame: 15-25 mg;
- tipo di contenitore: siringa o provetta (a fondo piatto sterile con tappo a vite) forniti dal laboratorio contenenti il terreno per la raccolta;
- modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente, data di nascita e firma dell'utente;
- conservazione del campione: temperatura ambiente;
- tempi di consegna al laboratorio: nel più breve tempo e comunque entro 24 ore.

In caso di gravidanza gemellare è necessario inviare anche un campione di sangue materno: 2 provette tappo viola con anticoagulante.

## 10.2 Diagnosi prenatale non invasiva su sangue periferico materno (vera prenatal test®)

Il test prenatale non invasivo, Vera Prenatal test®, è un test innovativo effettuabile anche in caso di gravidanze bigemellare, che consente lo screening delle principali aneuploidie cromosomiche fetali ad alto e basso rischio (aneuploidie dei cromosomi 13, 18, 21, X ed Y), oltre alla determinazione del

sesso fetale nelle gravidanze singole.

Inoltre, è possibile effettuare un ulteriore approfondimento analitico per la valutazione di eventuali microdelezioni responsabili delle più comuni sindromi da microdelezione, come la Sindrome di George, Sindrome di Angelman, Sindrome di Prader-Willi, Sindrome di Cri du Chat e la Sindrome di Hirschhorn. Il Vera Prenatal test® consiste in un semplice prelievo di sangue materno in apposite provette che stabilizzano le cellule ematiche e ne impediscono il rilascio di DNA genomico. Il campione viene poi sottoposto ad un protocollo standardizzato di estrazione, amplificazione e sequenziamento del DNA fetale. Il test prenatale non invasivo si esegue direttamente presso il laboratorio di Genetica Medica del Centro AMES, grazie all'utilizzo della tecnologia Illumina®. Il Vera Prenatal test® è un test altamente sensibile (ad es. presenta il 99,9% per il rilevamento della trisomia del cromosoma 21) che consente risultati accurati anche a partire da quantità minime di campione (fetal fraction 1.5%).

Il Vera Prenatal test® risulta maggiormente attendibile e sicuro rispetto ai comuni test di sequenziamento, poiché si avvale della tecnologia Next Generation Sequencing (sequenziamento massivo parallelo) del DNA, che assicura un incremento di 3-4 ordini di grandezza del numero di sequenze ottenute in ciascuna corsa, aumentandone notevolmente l'accuratezza.

Giorni ed orari di accettazione dei campioni:

- dal lunedì al venerdì dalle 7.30 alle 13.00 e dalle 15.00 alle 19.00;
- sabato dalle ore 7.30 alle 12.30 e dalle 14.00 alle 18.00;
- domenica dalle 8.00 alle 12.00.

Per invio di campioni urgenti sono necessari accordi telefonici con il Laboratorio. E' inoltre possibile, su appuntamento da concordare con il Laboratorio, effettuare prelievi a domicilio grazie ad infermieri specializzati.

Documentazione necessaria, da allegare al campione:

- fotocopia tessera sanitaria;
- consenso informato;
- scheda dati paziente (anagrafici ed anamnestici).

Modalità di raccolta del materiale biologico e refertazione:

Quantità di campione necessario per l'esame: 8-10 ml.

Tipo di contenitore: provette sterili Cell-Free DNA fornite dal laboratorio.

Modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente e data di nascita. Conservazione del campione: temperatura ambiente.

Tempi di consegna del referto: 1-2 giorni lavorativi dall'arrivo in azienda.

Il campione deve pervenire al laboratorio entro massimo 4/5 giorni dall'esecuzione del prelievo.

### 10.3 Fattore RH fetale

La determinazione non invasiva del genotipo del fattore Rh fetale è un'analisi genetica che permette di determinare il genotipo del fattore Rh fetale. Questo dato è di fondamentale importanza per scongiurare l'insorgere dell'eritroblastosi fetale, detta anche malattia emolitica Feto-Neonatale, che è una condizione patologica che può presentarsi durante la gravidanza e può colpire il feto di una madre con fattore Rhesus negativo e padre Rhesus positivo, quando il feto è RH positivo. Infatti, durante la gestazione si possono avere scambi di sangue tra madre e feto; generalmente la percentuale di rischio d'immunizzazione della donna durante la prima gravidanza è bassa e proporzionale alla quantità di sangue fetale passata nel circolo materno, ma aumenta nel caso di parto cesareo, placenta previa, gravidanze ectopiche, aborti spontanei e indotti, amniocentesi, analisi dei villi coriali e traumi placentari.

A causa dello scambio di sangue madre – feto con fattore Rh differente, il sistema immunitario della madre può sviluppare anticorpi IgG anti-D (anti fattore RH+). In assenza delle opportune precauzioni c'è il rischio che nelle gravidanze con feto Rh positivo, gli anticorpi anti-D materni raggiungono il circolo fetale per via transplacentare già a partire dal 4° mese e riconoscendo gli eritrociti fetali come estranei, li attaccheranno distruggendoli (anemia emolitica).

Per cercare di correggere l'anemia, il midollo osseo fetale mette in circolazione forme immature di GR dette eritroblasti, causando l'eritroblastosi fetale che può essere così grave da provocare la morte in utero del feto (solitamente tra la 25ª e la 35ª settimana).

La condizione del feto che riesce a sopravvivere può evolvere in una sintomatologia caratterizzata da

ittero grave, anemie congenite, idrope, possibili danni neurologici, aumento del volume della milza e del fegato (epatosplenomegalia).

L'antigene D è il più potente immunogeno e l'immunizzazione persiste solitamente per molti anni. Inoltre, anche se la concentrazione di anticorpi circolanti scende al di sotto del valore minimo rilevabile dai test, il successivo contatto con l'antigene determina una rapida risposta secondaria.

La conoscenza dello status del genotipo RHD fetale è fondamentale:

- nelle donne RhD negative non immunizzate, per scegliere quelle che dovranno essere sottoposte a immunoprofilassi mirata o sistematica;
- nelle donne RhD negative già immunizzate, per identificare i feti a rischio di anemia (feto RhD positivo) che dovranno essere sottoposti ad un monitoraggio particolare.

#### Il test genetico

La presenza del gene RHD fetale nel plasma del sangue materno viene identificato mediante la metodologia PCR Real Time mirata su 3 regioni distinte del gene RHD: gli esoni 5, 7 e 10, allo scopo di rilevare con precisione il maggiore numero possibile di varianti del gene RHD.

Giorni ed orari di accettazione dei campioni:

- dal lunedì al venerdì dalle 7.30 alle 13.00 e dalle 15.00 alle 19.00;
- sabato dalle ore 7.30 alle 12.30 e dalle 14.00 alle 18.00;
- domenica dalle 8.00 alle 12.00.

Per invio di campioni urgenti sono necessari accordi telefonici con il Laboratorio. E' inoltre possibile, su appuntamento da concordare con il Laboratorio, effettuare prelievi a domicilio grazie ad infermieri specializzati.

Documentazione necessaria, da allegare al campione:

- fotocopia tessera sanitaria;
- consenso informato;
- scheda dati paziente (anagrafici ed anamnestici).

Modalità di raccolta del materiale biologico e refertazione:

Quantità di campione necessario per l'esame: 8-10 ml. Tipo di contenitore: provetta da emocromo sterile.

Modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente e data di nascita. Conservazione del campione: temperatura ambiente, da pervenire al centro entro 21/48 ore. Tempi di consegna del referto: 3/5 giorni lavorativi.

#### 10.4 Ultramniocentesi

L'Ultramniocentesi è il più ampio screening prenatale disponibile sul mercato che consente di diagnosticare tutte le principali malattie genetiche fetali. Tale test è un'enorme evoluzione nella diagnosi prenatale che consente di rilevare dal 7% di malattie genetiche finora diagnosticabili grazie all'amniocentesi molecolare ad oltre l'80%.

L'amniocentesi "tradizionale" prevede l'esame del cariotipo fetale nel liquido amniotico, tale esame consente l'analisi dei maggiori difetti dei cromosomi, difetti del numero (aneuploidie complete o a mosaico), e della struttura come traslocazioni (bilanciate o sbilanciate), inversioni o grossolane delezioni.

La Ultramniocentesi, invece, è un test diagnostico che, attraverso l'analisi di tutto il corredo genetico del feto permette di eseguire la contemporanea analisi di oltre 300 geni che sono alla base della maggior parte delle malattie genetiche rilevabili in utero. Fra queste le più frequenti nella popolazione italiana come la Talassemia, la Sordità ereditaria, l'Atrofia muscolo spinale, l'Anemia falciforme, la Fibrosi cistica ed, in generale, tutte le principali patologie cardiovascolari, scheletriche, malformative e neurologiche.

Il DNA isolato dalle cellule fetali viene quindi amplificato mediante tecnica PCR. Successivamente, attraverso un processo di sequenziamento massivo parallelo (MPS), che impiega tecniche di Next Generation Sequencing (NGS), si sequenziano completamente 4800 geni ad elevata profondità di lettura.

La Next Generation Prenatal Diagnosis (NGPD), permette uno studio sul genoma del nascituro completo e necessita, per essere utilizzata, di una consulenza genetica attenta ed esplicativa.

Indicazione all'analisi:

- per le gestanti che desiderano ridurre il rischio di una malattia genetica nel feto.
- anamnesi personale/familiare di malattie genetiche ereditarie.
- per gravidanze ottenute sia tramite concepimento naturale sia mediante l'accesso a tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA).
- per le coppie che hanno fatto ricorso a tecniche di fecondazione eterologa.
- per le coppie che hanno già deciso di sottoporsi ad una amniocentesi/villocentesesi e desiderano un'analisi più approfondita.

Il test genetico:

l'esame si esegue su DNA estratto da villi coriali, liquido amniotico o sangue fetale. In caso d'analisi su villi coriali si effettua una valutazione immediata della presenza di materiale fetale e l'esito di tale valutazione è tempestivamente comunicato via fax al personale della struttura di provenienza.

Dove si effettua l'analisi:

il prelievo di liquido amniotico e di villo coriale è eseguito presso il Centro Polidiagnostico Strumen- tale Ames o presso altra struttura che presenti requisiti appropriati per l'esecuzione del prelievo.

Tempi di risposta:

- 20-25 giorni lavorativi.

Giorni e orari di accettazione dei campioni:

- dal lunedì al venerdì dalle 8.00 alle 13.00 e dalle 15.00 alle 19.00;
- sabato dalle ore 7.30 alle 12.30 e dalle 14.00 alle 18.00;
- domenica dalle 8.00 alle 12.00.

Per invio di campioni urgenti sono necessari accordi telefonici con il Laboratorio.

Documentazione da allegare al campione:

- richiesta su ricettario regionale;
- tessera sanitaria;
- consulenza genetica;
- consenso informato.

Scheda dati paziente (anagrafici ed anamnestici).

Modalità di raccolta del materiale biologico:

√ Campioni di liquido amniotico

Quantità di campione necessario per l'esame: 3 ml in un'unica provetta;

- tipo di contenitore: provetta conica sterile con tappo a vite;
- modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente, data di nascita, firma dell'utente;
- conservazione del campione: temperatura ambiente;
- tempi di consegna al laboratorio: nel più breve tempo e comunque entro 24 ore dal prelievo.

Nota: in caso di prelievo che presenta contaminazione ematica è necessario aggiungere 1 goccia di eparina.

√ Campioni di villi coriali

- quantità di campione necessario per l'esame: 5-10 mg;
- tipo di contenitore: siringa o provetta (a fondo piatto sterile con tappo a vite) forniti dal laboratorio contenenti il terreno per la raccolta;
- modalità di identificazione del campione: cognome e nome utente, data di nascita e firma dell'utente;
- conservazione del campione: temperatura ambiente;
- tempi di consegna al laboratorio: nel più breve tempo e comunque entro 24 ore.

In caso di gravidanza gemellare o di contaminazione ematica è necessario inviare anche un campione di sangue materno: 2 provette tappo viola con anticoagulante.

## 11 Elenco dei test eseguiti

Presso il laboratorio di Genetica Medica del Centro Ames è possibile eseguire i seguenti test:

### 11.1 Amiloidosi familiare

Le Amiloidosi Familiari, patologie che interessano l'intero organismo, sono malattie rare; in Italia si riscontrano 800 nuovi casi di amiloidosi ogni anno. Le amiloidosi sistemiche ereditarie sono malattie a trasmissione autosomica dominante ed ad esordio in età adulta, causate da alterazioni di diverse molecole: transtiretina (TTR), apolipoproteina A-I (APO A-I), apolipoproteina A-II (APO A-II), lisozima, catena  $\alpha$  del fibrinogeno e gelsolina. La forma più frequente è l'amiloidosi causata da mutazioni che interessano il gene della transtiretina. L'amiloidosi è una malattia caratterizzata dall'accumulo di materiale proteico insolubile, detto amiloide, in sede extracellulare.

La sintomatologia è varia, a seconda degli organi interessati, e frequentemente coinvolge il cuore ed i reni.

Il test genetico:

Il test prevede il sequenziamento degli esoni codificanti del gene TTR e del gene APO A1 per identificare le mutazioni responsabili della patologia. Il test si esegue mediante la tecnica della NGS (Next Generation Sequencing) e successivo sequenziamento con metodica Sanger per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante NGS.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette Vacutainer EDTA con 3ml di sangue intero.

Indicazioni all'analisi:

è eseguito sui soggetti affetti con diagnosi clinica effettuata tramite esami strumentali indicativi per tale patologia e per i soggetti che presentano una familiarità.

### 11.2 Analisi molecolare mielodisplastica dei geni TP53 e ASXL

Nelle Sindromi Mielodisplastiche (SMD) le alterazioni citogenetiche e molecolari hanno un significato prognostico noto. Circa nel 50% dei pazienti con SMD che non mostrano aberrazioni del cariotipo, l'analisi di anomalie molecolari definite, aiuta alla conoscenza della prognosi di questi pazienti.

La frequenza delle mutazioni dei geni TP53 è del 5-15% nelle SMD de novo e questa incidenza aumenta nelle forme secondarie. Le mutazioni di ASXL1 sono più frequenti con un'incidenza del 21%. La presenza di mutazioni di TP53 e/o ASXL1 ha una prognosi negativa nei pazienti con SMD.

Il test genetico:

consiste nella ricerca di mutazioni negli esoni 5-9 del gene TP53 e dell'esone 12 del gene ASXL1 mediante sequenziamento con metodica Sanger.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette Vacutainer EDTA con 3ml di sangue intero.

Indicazioni all'analisi:

l'analisi è eseguita in soggetti con diagnosi clinica di SMD.

### 11.3 Analisi di zigosità

L'analisi molecolare di zigosità viene eseguita a completamento di indagini molecolari in epoca prenatale per specifiche patologie e/o a completamento dell'analisi citogenetica prenatale, nel caso di gravidanze gemellari. Il test serve per valutare se i gemelli sono omozigoti o eterozigoti.

Il test genetico:

viene eseguito mediante amplificazione, con un kit commerciale, dei micro satelliti, loci altamente polimorfici, a cui segue l'analisi, basata sul confronto dei genotipi individuati ai suddetti loci, mediante software specifici.

Il test si esegue:

su villi coriali, liquido amniotico o linfociti da sangue fetale.



Indicazione all'analisi:

l'analisi di zigosità si effettua in caso di gravidanza gemellare per verificare se i gemelli hanno genotipo uguale o diverso.

#### 11.4 Cardiomiopatia ipertrofica

La Cardiomiopatia ipertrofica è la più frequente malattia genetica del muscolo cardiaco, con una prevalenza di 1:500 nella popolazione generale, pari a oltre 100.000 pazienti stimati in Italia. La patologia è caratterizzata dall'ispessimento delle pareti del ventricolo sinistro del cuore (ipertrofia); molto spesso l'ispessimento provoca un ostacolo al deflusso di sangue nel cuore generando la comparsa di sintomi da sforzo. La Cardiomiopatia ipertrofica è una malattia autosomica dominante del sarcomero, causata da mutazioni in oltre 13 geni codificanti proteine dell'apparato contrattile del cardiomiocita.

Il test genetico:

è possibile eseguire un test genetico per individuare il tipo di mutazione genetica associata alla malattia, cioè per sapere se la malattia è riconducibile ad un fattore ereditario. L'esame consiste nell'analisi dei geni attualmente riportati dalla letteratura scientifica come principale causa della Cardiomiopatia ipertrofica mediante tecnica NGS (Next Generation Sequencing). I geni sequenziati sono:

- TNNT2 (Troponina T);
- MYBPC3 (proteina C legante la miosina);
- MYH7 (catena pesante beta- miosina);
- MYL2 (catena regolatrice leggera 2 della miosina);
- MYL3 (catena essenziale leggera 1 della miosina);
- TPM1 (alfa-tropomiosina);
- ACTC (alfa-actina);
- TNNI3 (Troponina I);
- LAMP2 (proteina di membrana tipo 2 associata al lisosoma);
- PRKAG2 (sub unità catalitica 2 della proteina chinasi AMP-attivata).

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette Vacutainer EDTA con 3ml di sangue intero.

Indicazione all'analisi:

l'analisi viene eseguita in soggetti con sospetto o chiara diagnosi di Cardiomiopatia ipertrofica.

Una volta identificata la mutazione causativa della malattia nel paziente il test può essere esteso a cascata sui familiari. La Cardiomiopatia ipertrofica è una malattia genetica e ciò implica la necessità di una diagnosi precoce e dello studio genetico dei familiari.

#### 11.5 Cardiomiopatia dilatativa (DCM):

La cardiomiopatia dilatativa (DCM) è una malattia del muscolo cardiaco, caratterizzata dalla dilatazione ventricolare e dalla funzione sistolica ridotta. I pazienti presentano insufficienza cardiaca, aritmie e aumento del rischio di morte improvvisa. La prevalenza della DCM è 1/2.500, con un'incidenza di 7/100.000 casi l'anno. In molti casi, la malattia è ereditaria e viene, perciò, definita DCM familiare (FDC). La FDC corrisponde al 20-48% dei casi di DCM ed è causata soprattutto da mutazioni nei geni che codificano per le proteine del citoscheletro e del sarcomero delle cellule muscolari cardiache. In particolare la patologia è causata nel 6% dei casi da mutazioni nel gene LMNA (Lamina A/C), nel 4.2% dei casi da mutazioni nel gene MYH7 (Miosina 7), nel 3% -4% dei casi da mutazioni nel gene MYH6 (Miosina 6), nel 2%-4% dei casi da mutazioni nel gene SCN5A (subunità del canale del sodio voltaggio-dipendente di tipo V) e nel 2%-4% dei casi da mutazioni nel gene MYBPC3 (proteina C legante la miosina).

Il test genetico:

consiste nella ricerca delle varianti di sequenza a carico dei geni associati alla patologia mediante Next Generation Sequencing e successivo sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante Next Generation Sequencing.

I geni sequenziati ed analizzati sono:

- LMNA (Lamina A/C);
- MYH7 (Miosina 7);
- MYH6 (Miosina 6);
- SCN5A (Subunità del canale del sodio voltaggio-dipendente);
- MYBPC3 (Miosina cardiaca).

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti (prelievo di sangue periferico in 2 provette Vacutainer da 3 ml con EDTA) per indagine postnatale.

Indicazione all'analisi:

su soggetti con diagnosi clinica accertata, con presenza di sospetto clinico o con familiarità.

#### 11.6 Cecità congenita notturna

Si tratta di una rara disfunzione retinica, ereditaria e non evolutiva che coinvolge soprattutto i bastoncelli ed è presente alla nascita. Nella cecità notturna il soggetto lamenta una scarsa visione quando la luce si attenua o al buio, inferiore a quello che viene considerato normale, o anche uno scarso adattamento al variare delle condizioni di illuminazione. Esistono tre modelli di trasmissione ereditaria: autosomica dominante, recessiva e recessiva legata all'X. La malattia è eterogenea. L'unico sintomo è l'emeralopia e l'acuità visiva è moderatamente ridotta. Il fondo dell'occhio e il campo visivo non presentano alterazioni particolari.

Il test genetico:

consiste nella ricerca delle varianti di sequenza a carico dei geni associati alla patologia mediante Next Generation Sequencing e successivo sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante Next Generation Sequencing. I geni sequenziali ed analizzati sono:

- GRM6, TRPM1, SLC24A1: per la diagnosi di cecità congenita notturna autosomica recessiva completa;
- RHO, PDE6B, GNAT1: per la diagnosi di cecità congenita notturna autosomica dominante completa;
- CACNA1F, CABP4: per la diagnosi di cecità congenita notturna x-linked ed autosomica recessiva incompleta.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti (prelievo di sangue periferico in 2 provette Vacutainer da 3 ml con EDTA) per indagine postnatale.

Indicazione all'analisi:

su soggetti con diagnosi clinica accertata, con presenza di sospetto clinico o di familiarità.

#### 11.7 Celiachia

La celiachia è una patologia multifattoriale autoimmune che si manifesta in individui di tutte le età geneticamente predisposti. I geni HLA costituiscono i principali fattori genetici di rischio; pertanto la tipizzazione dell'HLA nella celiachia è un test di suscettibilità che valuta la maggiore o minore predisposizione di un individuo a sviluppare la malattia in base alla presenza/assenza di fattori di rischio (DQ2, DQ8 o DQB1-02). Si tratta di un test genetico che pur non avendo un significato diagnostico assoluto può contribuire a risolvere casi dubbi; viene soprattutto utilizzato per il suo valore predittivo negativo in quanto soggetti negativi per DQ2, DQ8 e DQB1-02 sviluppano difficilmente tale patologia.

Il test genetico:

Il test per la diagnosi di Celiachia consiste nella tipizzazione del gene HLA mediante amplificazione con Multiplex-PCR (Polymerase Chain Reaction) del gene e successiva analisi dei prodotti amplificati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3ml di sangue intero in provetta Vacu-



tainer con EDTA), da liquido amniotico, villi coriali e sangue fetale.

Indicazioni all'analisi:

il test si effettua in caso di incertezza diagnostica oppure in soggetti appartenenti a categoria a rischio cioè familiari di celiaci e pazienti affetti da patologie associate alla celiachia, come: diabete mellito tipo 1, deficienza selettiva di IgA, tiroiditi autoimmuni, spettro autistico etc..

#### 11.8 Displasia aritmogena del ventricolo destro (D/ARVD)

La displasia/cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (D/ARVD) è una cardiopatia del muscolo cardiaco, caratterizzata clinicamente da aritmie ventricolari pericolose per la vita dei pazienti. La prevalenza è stimata tra 1:2.500 e 1:5.000. La D/ARVD è una delle cause maggiori di morte improvvisa nei giovani e negli atleti. La malattia consiste in una distrofia geneticamente determinata del miocardio del ventricolo destro, che viene sostituito da un tessuto grasso-fibroso di tale entità da causare aneurismi del ventricolo destro. I geni correlati con la patologia, responsabili del rimodellamento dei dischi intercalari, codificano per le seguenti proteine delle giunzioni cellulari meccaniche: placoglobina (JUP), placofilina (PKP2), desmogleina (DSG2), desmocollina (DSC2), desmoplachina (DSP). È stata riscontrata la ricorrenza familiare con trasmissione autosomica dominante e penetranza variabile.

Il test genetico:

consiste nella ricerca delle varianti di sequenza a carico dei geni associati alla patologia mediante Next Generation Sequencing e successivo sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante Next Generation Sequencing. I geni sequenziati ed analizzati sono:

- DSP (Desmoplachina);
- PKP2 (Placofilina-2);
- DSG2 (Desmogleina-2);
- DSC2 (Desmocollina-2);
- JUP (Placoglobina).

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti (prelievo di sangue periferico in 2 provette Vacutainer da 3 ml con EDTA) per indagine postnatale.

Indicazione all'analisi:

su soggetti con diagnosi clinica accertata, con presenza di sospetto clinico o con familiarità.

#### 11.9 Degenerazione maculare senile (DMS)

La Degenerazione maculare senile o DMS, è una patologia multifattoriale, nella quale oltre ad una componente genetica giocano un ruolo importante fattori quali il fumo, la dieta, l'età, i livelli plasmatici di colesterolo, l'ipertensione, esposizione alla luce solare. La DMS colpisce soprattutto le persone con più di cinquant'anni ed il rischio di sviluppare la malattia aumenta notevolmente con il progredire dell'età. Si stima che almeno una persona su quattro con più di 70 anni sia colpita da DMS. La DMS ha una prevalenza che varia dal 8.5% al 11% nella fascia di età compresa tra i 65 e i 74 anni, e del 27% al di sopra dei 75 anni. È ormai riconosciuto che la degenerazione maculare senile presenta una componente genetica: circa il 20% dei pazienti affetti presenta una storia familiare positiva per alterazioni a carico del gene ABCR o ABCA4 (ATP-binding cassette, sub-family A member 4) associato anche alla malattia di Stargardt. Sembra infatti che, mentre due alterazioni in questo gene causano la malattia di Stargardt, una sola alterazione predisponga allo sviluppo in età avanzata della DMS.

Il test genetico:

consiste nella ricerca di varianti di sequenza a carico degli esoni e delle regioni introniche fiancheggiati del gene ABCA4, VEGF e PEDF mediante NGS (Next Generation Sequencing) e conferma delle varianti rilevate con NGS, mediante sequenziamento diretto con metodica Sanger. Nei casi più indicativi e dove vi è richiesta del medico inviante, è possibile effettuare anche l'analisi mediante MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) per la ricerca di delezioni o duplicazioni a carico del gene ABCA4, non rilevabili utilizzando la metodica NGS.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico e 2 provette da 3ml di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA.

Indicazioni all'analisi:

l'analisi viene eseguita in soggetti con sospetto o chiara diagnosi di Degenerazione Maculare Senile. La DMS è una malattia genetica autosomica recessiva ciò implica la necessità di una diagnosi precoce e dello studio genetico dei familiari.

#### 11.10 Disomie uniparentali (UDP)

La Disomia Uniparentale consiste nell'ereditarietà di due cromosomi omologhi da parte di un solo genitore, seguiti generalmente da meccanismi di correzione, monosomie o trisomie; tale alterazione sembrerebbe associata maggiormente all'età materna.

L'analisi di UPD si rende necessaria quando sia stata evidenziata una trisomia a mosaico per il cromosoma 15, perché è stata dimostrata correlazione tra UPD materna e paterna e l'espressione di fenotipi patologici come la Sindrome di Prader-Willi, la Sindrome di Angelman. Sempre per gli stessi motivi è consigliata l'analisi di UPD anche in presenza di marcatori soprannumerari che coinvolge il cromosoma 15.

Il test genetico:

consiste nell'analisi da 4 a 10 polimorfismi del DNA relativi al cromosoma 15 nel paziente ed il loro confronto con gli stessi polimorfismi analizzati sui campioni dei genitori del paziente stesso. L'analisi molecolare si basa sulla metodica della PCR (Polymerase Chain Reaction) delle Short Tandem Repeat (STR), dei cromosomi in analisi e mediante corsa elettroforetica dei prodotti amplificati.

Il test si esegue:

per i genitori il test si esegue su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3 ml di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA); per il figlio si utilizzano campioni di villi coriali, liquido amniotico, linfociti da sangue fetale o linfociti da sangue periferico.

Indicazioni all'analisi:

l'indicazione a tale studio è data dalla presenza di mosaicismi, traslocazioni reciproche e robertsoniane, marcatori soprannumerari che coinvolgono i cromosomi nei quali è stata dimostrata la presenza di regioni soggette ad imprinting.

#### 11.11 Distrofia muscolae di Duchenne – Becker (DMD)

La Distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia genica degenerativa dei muscoli, che essendo a trasmissione recessiva legata al cromosoma X viene trasmessa dalle madri sane portatrici esclusivamente ai figli maschi, tranne rarissime eccezioni. La Distrofia di Duchenne è determinata da alterazioni di un gene, localizzato nel cromosoma X che codifica per una proteina chiamata distrofina. Le mutazioni possono essere di vario tipo e comprendono sia mutazioni puntiformi sia delezioni e duplicazioni di uno o più esoni del gene. Tali mutazioni hanno come effetto quello di causare l'assenza totale della proteina o la formazione di una proteina parzialmente funzionante (Distrofia Muscolare di Becker).

Il test genetico:

il test genetico si effettua mediante MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) dei 79 esoni e del promotore alternativo DP427c del gene distrofina per la ricerca di delezioni e duplicazioni. Inoltre, sotto indicazione del medico specialista, è possibile eseguire un sequenziamento completo dell'intero gene DMD mediante tecnica NGS.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3 ml di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA) per diagnosi post natale; su DNA estratto da villi coriali, liquido amniotico o sangue fetale per diagnosi pre natale.

Indicazioni all'analisi:

in ambito post natale l'analisi per DMD/BMD si effettua nel caso di maschi affetti o nel caso di femmine sospette portatrici. In ambito prenatale si effettua solo nei casi in cui la madre è portatrice della mutazione (oppure appartiene ad un nucleo familiare nel quale emerge un rischio teorico elevato del

suo stato di portatrice). La DMD/BMD è una malattia genetica ciò implica la necessità di una diagnosi precoce e dello studio genetico dei familiari.

#### 11.12 Emocromatosi ereditaria

L'Emocromatosi è una malattia ereditaria caratterizzata da progressivo accumulo di ferro alimentare nell'organismo. Tale patologia può essere asintomatica fino ad arrivare ad un livello di accumulo di ferro nell'organismo che diventa tossico, provocando gravi danni come cirrosi epatica, diabete, impotenza nell'uomo, alterazioni del ciclo mestruale nella donna e infertilità in entrambi. Esistono diverse forme di Emocromatosi causate da mutazioni in differenti geni. La forma più comune è l'Emocromatosi Classica o di Tipo 1, dovuta a mutazioni del gene HFE situato sul cromosoma 6p; l'Emocromatosi di Tipo 2 (detta anche Emocromatosi Giovanile) è una forma molto più rara dovuta a mutazioni nel gene dell'emojuvelina HJV localizzato sul cromosoma 1q (Sottotipo 2A) o a mutazioni nel gene dell'epcidina HAMP sito sul cromosoma 19q (sottotipo 2B).

Il test genetico:

il test per la diagnosi di Emocromatosi prevede la ricerca delle mutazioni C282Y, H63D e S65C del gene HFE, che rappresentano le mutazioni più frequenti nella popolazione. Tale test viene eseguito utilizzando tecniche di Real-Time PCR. Nel caso il test risulti negativo è possibile estendere l'analisi alla ricerca di ulteriori mutazioni a carico del gene HFE per un totale di 15 mutazioni rilevate. In questo caso la metodica utilizzata è quella del reverse dot blot.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3 mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA).

Indicazioni all'analisi:

il test di primo livello è eseguito quando la sintomatologia clinica e gli esami di laboratorio sono indicativi della patologia. L'approfondimento per la ricerca delle 15 mutazioni del gene HFE è eseguito su richiesta dello specialista, per soggetti risultati negativi o portatori al test di I livello (assenza delle 3 mutazioni ricercate o presenza di una sola mutazione in eterozigosi) e con un profilo clinico

- biochimico caratterizzato da iperferritinemia e saturazione della transferrina > 45%, in assenza di patologie epatiche, disordini ematologici o altre forme di sovraccarico di ferro secondario. La HFE è una malattia genetica ciò implica la necessità di una diagnosi precoce e dello studio genetico dei familiari .

#### 11.13 Febbre mediterranea familiare

La febbre mediterranea familiare (FMF) è una malattia autoinfiammatoria con brevi episodi ricorrenti di febbre e sierosite, che esitano in dolore addominale, toracico, articolare e muscolare. La FMF è tipica del Sud-Est del Mediterraneo con una prevalenza di 1/200-1/1000. La Febbre Mediterranea si suddivide in FMF tipo 1 e 2. Il tipo 1 presenta attacchi di febbre e sierosite, che durano 1-4 giorni e si risolvono spontaneamente. Il tipo 2 presenta amiloidosi, che costituisce il primo e unico sintomo. Stress, esposizione al freddo, pasti ricchi in grassi, infezioni, alcuni farmaci e ciclo mestruale sono possibili fattori scatenanti. La Febbre Mediterranea è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva dovuta a mutazioni nel gene MEFV, collocato sul cromosoma 16; la varianza fenotipica di tale patologia è dovuta alle numerose mutazioni descritte per tale gene, circa 218, che codifica per la proteina pirina/marenostrina (le mutazioni M694V omozigoti si associano a una forma clinica più grave). Poiché non tutti i pazienti presentano una mutazione di MEFV, è probabile che siano coinvolti altri fattori.

Il test genetico:

Il test ha un valore predittivo positivo nel 70-80% dei casi e consiste nel sequenziamento diretto (metodo Sanger) del gene MEFV per l'analisi delle mutazioni (note) causative della patologia.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette Vacutainer EDTA con 3ml di sangue intero.

Indicazione all'analisi:

l'analisi viene eseguita in soggetti con sospetto o chiara diagnosi di Porfiria e nei soggetti con familiarità.

#### 11.14 Fibrosi cistica (CF)

La Fibrosi Cistica (CF) è una malattia ereditaria, cronica evolutiva, causata da mutazioni del gene CFTR che codifica per una proteina che regola gli scambi idroelettrici. La frequenza della malattia è di circa un affetto ogni 2500-2700 nati. Le mutazioni fino ad ora descritte per la Fibrosi Cistica sono oltre 1500. In un malato di CF entrambi le copie del gene CFTR sono mutate, mentre nei portatori sani solo una copia del gene risulta mutata. La Fibrosi Cistica interessa prevalentemente il pancreas, il fegato, l'intestino, l'apparato riproduttivo e le vie aeree, comportando la produzione di secrezioni "disidratate": il sudore è ricco di sodio e cloro ed il muco è denso e vischioso.

Il test genetico:

di primo livello è finalizzato all'analisi per la ricerca delle 67 mutazioni più ricorrenti nella popolazione Italiana, mediante la tecnica del reverse dot blot (detection rate 89,2%). E' possibile inoltre effettuare un approfondimento di secondo livello per la ricerca delle mutazioni rare mediante il sequenziamento diretto del gene CFTR e screening di terzo livello per la ricerca di delezioni e duplicazioni mediante la metodica MLPA.

Il test si esegue: su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette Vacutainer EDTA con 3ml di sangue intero.

Indicazioni all'analisi:

Il test è consigliato per:

- coppie che non riescono ad avere figli per sottoporsi alle pratiche di inseminazione artificiale;
- coppie di soggetti consanguinei;
- coppie con gravidanza con intestino iperecogeno fetale;
- individui con storia familiare positive;
- presenza di sospetto clinico;
- CBAVD con test del sudore positivo o borderline.

La FC è una malattia genetica pertanto è necessaria una diagnosi precoce.

#### 11.15 Intolleranza al lattosio

L'intolleranza al lattosio, lo zucchero del latte, è una delle più diffuse intolleranze alimentari, dovuta alla mancanza di un enzima, la lattasi, prodotta dalle cellule del primo tratto dell'intestino. In questo caso si parla di deficienza primaria ed è ereditaria. Possono esserci però casi (morbo di Crohn, celiachia, infiammazioni e infezioni dell'intestino) in cui danni all'intestino distruggono le cellule che producono la lattasi ed in questo caso si può avere un'intolleranza secondaria (acquisita).

I sintomi sono vari e dipendono dai gradi di intolleranza al lattosio che va da pressoché totale a molto moderata. In genere comunque da trenta minuti a due ore dall'ingestione di latte o derivati si comincia ad avvertire nausea, senso di gonfiore, crampi, meteorismo, disturbi intestinali e, a volte, il tutto è accompagnato da rash cutanei.

Il test genetico:

l'intolleranza primaria al lattosio è riconducibile ad un polimorfismo nella posizione C-13910 del gene MCM6 (una regione regolatrice del gene della lattasi), che nell'omozigosi porta ad una carenza di lattasi nei microvilli dell'intestino tenue. La trasmissione ereditaria è autosomica recessiva, solo i portatori omozigoti sono dunque affetti dall'intolleranza. Il test consiste nella genotipizzazione del polimorfismo C-13910 del gene MCM6 mediante Real-Time PCR (Real time Polimerase Chain Reaction) e successiva analisi dei prodotti amplificati.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA).

Indicazioni all'analisi:

Il test viene effettuato nei soggetti in cui c'è il sospetto clinico per la positività alla sintomatologia.

#### 11.16 Iperplasia surrenale congenita (CAH)

L'iperplasia surrenalica congenita classica da deficit di 21-idrossilasi (21 OHD CAH classica) è la for-

ma più comune di iperplasia surrenalica congenita (CAH); è caratterizzata dalla forma virilizzante semplice oppure dalla forma con perdita di sale. Entrambe possono manifestarsi con ambiguità dei genitali nelle femmine e, in entrambi i sessi, con insufficienza surrenalica associata a disidratazione nel periodo neonatale, ipoglicemia potenzialmente fatale e iperandrogenismo. La prevalenza è circa 1/14.000. La CAH è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva causata da una mutazione nel gene CYP21A2, localizzato sul cromosoma 6p21, che controlla il cortisolo e la produzione di aldosterone; la mutazione in questo gene altera la sintesi ed i livelli di cortisolo ed aldosterone.

Il test genetico:

consiste nell'amplificazione di DNA mediante Multiplex-PCR (Polymerase Chain Reaction) e successiva rilevazione mediante reverse dot blot, MLPA del gene CYP21A2 e del suo pseudogene e sequenziamento automatico Sanger del gene CYP21A2.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA), da liquido amniotico, villi coriali e sangue fetale.

Indicazioni all'analisi:

il test è rivolto ai soggetti che presentano sospetto clinico.

#### 11.17 Ipoacusia

L'ipoacusia è l'indebolimento dell'apparato uditivo dovuto ad un danno o alla degenerazione di uno o più dei suoi componenti. Può interessare un solo orecchio o entrambi e comporta una riduzione dell'udito lieve, media o grave. Le cause della ipoacusia possono essere molteplici: l'infezione, abuso di farmaci, o fattori genetici. Mutazioni puntiformi nei gene CNX26 e CNX30 e una mutazione delta (GJB6-D13S1830) nel gene CNX30 sono responsabili dell'ipoacusia genetica. I geni CNX codificano per proteine di membrana chiamate connesine che si assemblano per formare canali nella membrana plasmatica e assicurare la comunicazione tra cellule adiacenti (gap-junction).

Il test genetico:

consiste nella amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) e sequenziamento diretto con metodo Sanger dei geni CNX26 e CNX30 per la ricerca di mutazioni puntiformi. Per l'analisi della mutazione delta del gene CNX30 viene eseguita una PCR (Polymerase Chain Reaction) e successiva analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA), da liquido amniotico, villo coriale e sangue fetale.

Indicazione all'analisi:

il test è rivolto a soggetti che presentano un sospetto clinico o una familiarità per l'ipoacusia.

#### 11.18 Ipogonadismo ipogonadotropo congenito (CHH)

L'ipogonadismo ipogonadotropo congenito (CHH) è una malattia rara dello sviluppo sessuale caratterizzata da deficit delle gonadotropine (Gn) associato a bassi livelli di steroidi sessuali, dell'ormone follicolo stimolante (FSH) e luteinizzante (LH). La prevalenza esatta non è nota, si stima di circa 1/5.000. Il CHH può essere sospettato alla nascita nei maschi con micropene (spesso associato a criptorchidismo), nell'adolescenza, in caso di mancata pubertà, o nella vita adulta, come causa di infertilità. Il CHH è considerato isolato (IHH) quando il deficit è limitato alle gonadi. Sono stati definiti due sottotipi di IHH: la sindrome di Kallmann (CHH con anosmia), che si associa a un difetto della migrazione embrionale dei neuroni che sintetizzano l'ormone che rilascia le gonadotropine (GnRH), e l'IHH normosomico (nIHH), nel quale l'IHH è l'unico sintomo. L'ipogonadismo ipogonadotropo congenito fa anche parte di diverse altre condizioni, come le sindromi di Prader-Willi, Bardet-Biedl, Laurence-Moon e CHARGE. L'analisi molecolare dei geni candidati costituisce un importante strumento per la diagnosi.

Il test genetico

Il test genetico per la diagnosi di CHH consiste nel sequenziamento dei geni associati alla patologia mediante NGS (Next Generation Sequencing) ed il sequenziamento in automatico con metodo Sanger per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante NGS. I geni analizzati sono:



- GNRHR (Recettore per il GnRH);
- GNRH1 (Ormone di rilascio della gonadotropina);
- KISS1R (Recettore per KISS1R);
- KISS1 (Kisspeptina 1);
- TAC3 (Tachichinina 3);
- TACR3 (Recettore per TAC3);
- KAL1 (Anosmina);
- FGFR1 (Recettore 1 per FGF);
- FGF8 (Fattore di crescita dei fibroblasti 8);
- PROK2 (Prochineticina 2);
- PROKR2 (Recettore per PROK2);
- WDR11 (Unità ripetuta WD);
- CHD7 (Proteine che codificano per il cromo-dominio di una elicasi);
- SEMA3A (Semaforina A3);
- HS6ST1 (Eparan solfato sulfotransferasi);
- SOX10 (SRY-like-box);
- NROB1 (Recettore nucleare OB1);
- NR5A1 (Fattore steroidogenico 1);
- PIN1 (Peptidil-prolil isomerasi);
- SEMA3E (Semaforina E3).

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti (prelievo di sangue periferico in 2 provette Vacutainer con EDTA da 3mL).

Indicazioni all'analisi:

l'analisi è consigliata per i soggetti affetti (con diagnosi clinica eseguita tramite esami strumentali indicativi per tale patologia) o in presenza di sospetto clinico.

#### 11.19 Malattia di Best o Distrofia Maculare Vitelliforme

È un'affezione maculare bilaterale ereditaria che presenta una penetranza incompleta ed espressi- vità variabile. La diagnosi è spesso agevole e si avvale dell'aspetto clinico, fluorangiografico e degli esami elettrofisiologici. Tale patologia viene frequentemente trasmessa con modalità autosomica dominante. I geni principalmente responsabili sono BEST1 (VMD2) e PRPH2 (RDS/periferina).

Il test genetico:

Il test genetico per la diagnosi della Malattia di Best consiste nel sequenziamento dei geni PRPH2 e BEST1 mediante NGS (Next Generation Sequencing) ed il sequenziamento diretto (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante NGS.

L'analisi si esegue su:

DNA estratto da linfociti di sangue periferico, 2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA.

Indicazioni all'analisi:

l'analisi si effettua in presenza di sospetto clinico, per familiarità o sui soggetti affetti con diagnosi clinica eseguita tramite esami strumentali indicativi per tale patologia: indagini elettrofisiologiche (elettoretinogramma ed elettroculogramma), fluorangiografia retinica.

#### 11.20 Malattia di Fabry

- 11.20 La malattia di Fabry (FD) è una malattia ereditaria a trasmissione recessiva legata all' X che viene considerata rara per la sua bassa incidenza, 1 su 80000 nati vivi. Tale incidenza aumenta ad 1 su 3000 se si considerano le varianti ad esordio tardivo. La Malattia di Fabry è provocata da un'alterazione del metabolismo dei glicosfingolipidi dovuta a un deficit di un enzima lisosomiale, l'alfagalattosidasi A. GLA è il gene interessato. Il quadro clinico comprende un ampio spettro di sintomi, che varia dalle forme lievi, nelle donne eterozigote, ai casi gravi, nei maschi emizigoti con le forme classiche che non presentano alcuna attività dell' enzima alfagalattosidasi A. I sintomi più comuni includono dolore cutaneo (angiocheratoma), renale (insufficienza renale), cardiovascolare (cardiomiopatia ed aritmia).

Il test genetico:

il test si basa sull' amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) e sequenziamento delle regioni codificanti del gene  $\alpha$ -GalA per l'identificazione delle mutazioni puntiformi e sull' analisi mediante MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) dei 7 esoni del gene per la ricerca di delezioni o duplicazioni.

L'analisi si esegue su:

DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacu-tainer con EDTA), da liquido amniotico, villi coriali e sangue fetale.

Indicazioni all'analisi:

tutti i pazienti che presentano richiesta specifica di studio genetico per malattia di Fabry, per sospetto clinico o per familiarità.

#### 11.21 Malattia di Stargardt

La malattia di Stargardt è la più comune degenerazione maculare con ereditarietà di tipo recessivo (incidenza pari a 1:10.000). È caratterizzata da un esordio in età giovanile con riduzione della visione centrale, da una progressiva bilaterale atrofia dell'epitelio pigmentato maculare e del neuroepitelio associata frequentemente alla presenza di chiazze bianche/giallastre distribuite intorno alla macula e/o in media periferia retinica (fundus flavimaculato). Il gene responsabile è ABCA4 o ABCR (ATP binding cassette transporter), che codifica per una proteina di trasporto attraverso le membrane cellulari. Più raramente la malattia di Stargardt è trasmessa con modalità autosomica dominante, in questo caso il gene più frequentemente alterato è il gene ELOVL4 (Gene Elongation of very long chain fatty acids protein 4).

Il test genetico:

consiste nell' amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) degli esoni del gene ABCA4 e successivo sequenziamento delle regioni codificanti e delle regioni introniche fiancheggianti.

Nei casi più indicativi e dove vi è richiesta del medico inviante è possibile effettuare anche l' analisi mediante MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) per la ricerca di delezioni o duplicazioni a carico del gene ABCA4, non rilevabili con il sequenziamento.

Il test si esegue su:

DNA estratto da linfociti di sangue periferico, 2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacu-tainer con EDTA

Indicazione all'analisi:

è suggerita ai soggetti affetti con diagnosi clinica effettuata tramite esami strumentali indicativi per tale patologia : indagini elettrofisiologiche (elettroretinogramma ed elettroculogramma), fluorangiografia retinica, ecc., o in presenza di sospetto clinico e per familiarità.

#### 11.22 Melanoma (CDKN2A)

Il Melanoma cutaneo è un tumore maligno che deriva dalla trasformazione dei melanociti, alcune cellule che compongono la pelle. Tale tumore è piuttosto raro nei bambini e colpisce soprattutto soggetti intorno ai 45-50 anni. I principali fattori di rischio per il Melanoma cutaneo sono l'esposizione alla luce ultravioletta, l' insufficienza del sistema immunitario e alcune malattie ereditarie come lo Xeroderma pigmentoso. Il 25% dei casi di Melanoma è causato dalla mutazione del gene onco-soppressore CDKN2A che codifica per 2 proteine deputate al controllo negativo del ciclo cellulare: p16 e p19ARF. Mutazioni a carico di questo gene determinano una incapacità di limitare la crescita tumorale con conseguente sviluppo del cancro. La patologia risulta ereditata con un meccanismo autosomico dominante a penetranza variabile.

Il test genetico:

consiste nell'amplificazione degli esoni del gene CDKN2A mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) e sequenziamento diretto con il metodo Sanger. I prodotti amplificati sono sottoposti a separazione elettroforetica mediante elettroforesi capillare ed analisi con apposito software.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico, 2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA.



Indicazioni all'analisi:

è consigliato dai dermatologi nei pazienti che hanno subito asportazione chirurgica di nevi sospetti e nei familiari di pazienti con melanoma acclarato. Alcune forme di Melanoma sono ereditarie pertanto è necessaria la diagnosi precoce e l'analisi genetica dei familiari.

#### 11.23 Microrodelezioni del cromosoma Y

La sterilità maschile, da delezione del cromosoma Y, è caratterizzata da grave deficit della spermatogenesi. Le microdelezioni del cromosoma Y sono una causa genetica frequente di sterilità maschile. La prevalenza stimata è di 1/2.500. Il 5-10% dei casi di azospermia (assenza di sperma) o di oligospermia grave di tipo secretorio (<1 milione di spermatozoi/ml di liquido seminale) si associano a microdelezioni nella porzione eucromatica del braccio lungo del cromosoma Y, nel locus AZF (Fattore Azospermia). In questa regione, la struttura del cromosoma Y è ricca in sequenze palindrome ripetute in numero variabile, nominate STS (Sequenze Tagget Sites); la ricombinazione tra due di queste sequenze fiancheggianti, accomunate da un elevato grado di omologia, genera tal volte delezioni più o meno estese. Non tutte le delezioni del cromosoma Y causano necessariamente infertilità: in primo luogo, alcune delezioni (specialmente, alcune delezioni parziali) non comportano difetti della spermatogenesi; in secondo luogo, alcuni uomini con grave oligospermia possono avere figli senza ricorrere a terapie per l'infertilità.

Il test genetico:

consente di valutare la presenza di eventuali microdelezione del cromosoma Y responsabili delle alterazioni della spermatogenesi. Il test si effettua mediante amplificazione del DNA con Multiplex-Polymerase Chain Reaction che consente di amplificare 6 STS nel locus AZF e altri target di controllo. Gli amplificati ottenuti sono separati mediante elettroforesi capillare ed analizzati mediante un apposito software.

Il test si effettua:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico, 2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA.

Indicazioni all'analisi:

il test si esegue in soggetti con infertilità idiopatiche, alterazioni dello spermogramma quali azospermia o oligospermia.

#### 11.24 Neoplasia endocrina multipla

Le Neoplasie Endocrine Multiple (MEN) si distinguono in MEN tipo 1, MEN tipo 2 e quest' ultima si classifica in MEN 2A e MEN 2B. Tutte le MEN condividono alcune caratteristiche, sono tutti tumori composti da cellule di origine neuroendocrine, hanno una caratteristica progressione istologica da iperplasia ad adenoma e talora a carcinoma, sono sindromi ereditarie con trasmissione autosomica dominante. La MEN 1 (sindrome di Wermer) è caratterizzata da iperplasia delle paratiroidi, tumori del pancreas endocrino e tumori dell' ipofisi. La MEN 2A è costituita da carcinoma midollare della tiroide, feocromocitoma e iperplasia/neoplasia delle paratiroidi. Una sua variante è il carcinoma midollare familiare (FMTC) della tiroide in cui l'unica manifestazione della sindrome è il tumore tiroideo.

La MEN 2B presenta carcinoma midollare della tiroide, feocromocitoma, neuromi multipli delle mucose, habitus marfanoide. Il gene responsabile della MEN 1 è un oncosoppressore localizzato nel cromosoma 11 coinvolto nella crescita cellulare. La proteina prodotta da tale gene (gene MEN 1) è stata denominata menina. Affinché si manifesti la sindrome clinica è necessario che alla mutazione germinale si associ una mutazione somatica. Tali mutazioni del gene MEN 1 sono presenti in oltre il 90% delle famiglie affette. Il gene responsabile della MEN 2, invece, è il protooncogene RET, localizzato nel cromosoma 10, che codifica per un recettore tirosin-chinasico. La mutazione in tale gene può causare uno stimolo continuo alla crescita cellulare e quindi lo sviluppo delle neoplasie tipiche della MEN 2.

Il test genetico:

Il test per la diagnosi della Neoplasia Endocrina Multipla consiste nel sequenziamento dei geni MEN1 e RET mediante NGS (Next Generation Sequencing) e nel sequenziamento automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante NGS.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico, 2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA.

Indicazioni all'analisi:

il test si esegue sui soggetti affetti con diagnosi clinica effettuata tramite esami strumentali indicativi per tale patologia e/o in presenza di sospetto clinico e per familiarità.

#### 11.25 Neuropatia ereditaria con paralisi da pressione (HNPP)

La neuropatia ereditaria con predisposizione a paralisi ricorrenti sensibili alla pressione (HNPP) è una malattia autosomica dominante che causa una neuropatia demielinizzante episodica e ricorrente.

Segni clinici dovuti alle mononeuropatie sono il piede cadente, l'intorpidimento e la debolezza di mani e braccia, la perdita sensoriale dell'indice o del pollice o della porzione laterale della mano. L'HNPP è dovuta ad una mutazione del gene PMP22(17p12), che codifica per la proteina della mielina periferica 22 (PMP22), espressa prevalentemente nella mielina compatta del sistema nervoso periferico.

Nell' 80% dei casi la HNPP è dovuta alla delezione di 1.5-Mb nella regione cromosomica 17p11.2-12, che comprende PMP22.

Il Test genetico:

Il test per la diagnosi della Neuropatia ereditaria con paralisi da pressione consiste, per il primo livello, nella ricerca di delezioni del gene PMP22 mediante MLPA.

Ove richiesto è possibile il sequenziamento dell'intero gene PMP22.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico, 2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA.

Indicazioni all'analisi:

l'analisi si effettua su tutti i pazienti che presentano richiesta specifica per studio molecolare per HNPP, in caso di sospetto clinico o per familiarità. Tale esame è richiesto di solito dal neurologo e prevede una consulenza pre test in cui vengono raccolte le informazioni cliniche e la storia familiare.

#### 11.26 Le porfirie

Le Porfirie sono un gruppo di malattie metaboliche, con penetranza variabile, caratterizzate da manifestazioni neuroviscerali intermittenti, da lesioni cutanee o dalla combinazione delle due. Le Porfirie sono classificate in epatiche o eritropoietiche a seconda della origine principale dell'anomalia metabolica. I sintomi sono molto variabili ma la fotosensibilità cutanea accomuna tutte le diverse forme di Porfirie, le quali sono dovute a deficit di uno degli enzimi coinvolti nella biosintesi dell'eme; tale deficit è responsabile dell'accumulo di porfirine e dei loro precursori (acido delta-aminolevulinico, ALA e porfobilinogeno, PBG) nel fegato e nel midollo osseo. Tali patologie hanno origine genetica, penetranza variabile e la trasmissione risulta autosomica dominante con penetranza incompleta oppure autosomica recessiva con penetranza completa.

Il test genetico:

la diagnosi differenziale di Porfiria viene effettuata, al seguito del dosaggio delle porfirine nei diversi liquidi biologici e dei precursori delle porfirine nelle urine, grazie all'analisi genetica che consente di individuare il gene mutato. L'esame consiste nell'analisi dei geni attualmente individuati come principale causa delle Porfirie mediante tecnica NGS (Next Generation Sequencing) e successivo sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante Next Generation Sequencing.

I geni sequenziali sono:

- ALAD (Delta-aminolevulinico deidratasi);
- 2-ALAS2 (5-aminolevulinato sintasi);
- CPOX (Coproporfirinogeno ossidasi);
- FECH (Ferrochelatasi);
- GATA1 (Fattori trascrizione globina);
- HFE (Emocromatosi);
- UROS (Uroporfirinogeno III sintetasi);

- HMBS (Idrossimetilbilano sintetasi);
- PROX (fattore trascrizionale Prospero Homeobox 1);
- UROD (Uroporfirinogeno decarbossilasi).

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette Vacutainer EDTA con 3ml di sangue intero.

Indicazione all'analisi:

l'analisi viene eseguita in soggetti con sospetto o chiara diagnosi di Porfiria e nei soggetti con familiarità.

#### 11.27 Sindrome del QT-LUNGO (LQTS)

La sindrome del QT LUNGO (LQTS) è una cardiopatia ereditaria caratterizzata dal prolungamento dell'intervallo QT all'ECG basale e dal rischio elevato di aritmie che possono portare al decesso. La prevalenza della malattia è stimata in circa 1 ogni 2.000 nati vivi. I due sintomi principali della LQTS sono episodi sincopali che possono provocare l'arresto cardiaco e le anomalie elettrocardiografiche che comprendono il prolungamento dell'intervallo QT e le anomalie dell'onda T. Tutti i geni finora identificati per la LQTS codificano per le subunità o le proteine del canale ionico cardiaco coinvolte nelle correnti ioniche modulanti. La variante di LQTS più rilevante (LQT1) è dovuta alle mutazioni del gene KCNQ1, presenti in circa la metà dei pazienti genotipizzati. Le altre forme di LQTS sono dovute a mutazioni del gene KCNH2 (LQT2), nel 30% dei pazienti, e del gene SCN5A (QTL3), nel 10% dei pazienti. Altri geni (KCNE1 e KCNE2) sono responsabili in percentuale minore della patologia. La malattia può essere trasmessa con modalità autosomica dominante (Sindrome di Romano-Ward) o con modalità autosomica recessiva (Sindrome di Jervell e Lange-Nielsen), ma quest'ultima è associata a sordità neurosensoriale.

Il test genetico:

consiste nella ricerca delle varianti di sequenza a carico dei geni associati alla patologia mediante Next Generation Sequencing e successivo sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante Next Generation Sequencing. I geni sequenziati ed analizzati sono:

- KCNQ1 (Canale del potassio voltaggio-dipendente, KvLQT1);
- KCNH2 (Subunità H2 del canale del potassio voltaggio-dipendente);
- SCN5A (subunità del canale del sodio voltaggio-dipendente);
- KCNE1 (subunità 1 beta del canale del potassio MinK);
- KCNE2 (sub unità 2 beta del canale del potassio MinK).

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti (prelievo di sangue periferico in 2 provette Vacutainer da 3 ml con EDTA) per indagine postnatale.

Indicazione all'analisi:

su soggetti con diagnosi clinica accertata, con presenza di sospetto clinico o con familiarità.

#### 11.28 Rene policistico dell'adulto (ADPKD)

Il rene policistico dell'adulto o ADPKD (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease) è una delle malattie genetiche più comuni, con un'incidenza di 1 su 400-1000 nati vivi.

È una malattia sistemica che interessa diversi organi e apparati, ma colpisce in particolare i due reni rappresentando la principale causa genetica di insufficienza renale dell'adulto, situazione che consegue al progressivo sviluppo e crescita di cisti renali. L'ADPKD è una malattia a trasmissione autosomica dominante nella quale sono coinvolti 2 geni: PKD1 e PKD2.

Il test genetico:

il test genetico per la diagnosi del Rene Policistico prevede il sequenziamento delle regioni codificanti e di parte delle regioni introniche dei geni PKD1 e PKD2, per la ricerca delle mutazioni puntiformi responsabili dell'insorgenza della malattia, mediante amplificazione con PCR (Polymerase Chain Reaction) e sequenziamento degli esoni dei geni PDK1 e PDK2.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico, 2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA.

Indicazioni all'analisi:

l'analisi si effettua su tutti i pazienti che presentano richiesta specifica di studio genetico per Rene policistico dell'adulto o Rene policistico autosomico dominante, in caso di sospetto clinico o per familiarità. Tale esame è richiesto di solito dal nefrologo e prevede una consulenza pre test in cui vengono raccolte le informazioni cliniche e la storia familiare. Il test genetico viene eseguito al fine di: confermare una diagnosi di ADPKD, eseguire una diagnosi presintomatica, confermare lo status genetico di potenziali donatori di rene.

#### 11.29 Retinite pigmentosa autosomica recessiva, dominante e x-linked

La retinite pigmentosa è una affezione ereditaria geneticamente determinata a trasmissione variabile. La malattia si manifesta in giovane età ed è caratterizzata da una perdita progressiva del campo visivo ad iniziare dalla periferia retinica per compromettere poi la zona centrale con gravi limitazioni sia visive sia del campo visivo periferico. La malattia può portare sino alla cecità completa. E' una malattia progressiva, altamente invalidante, anche nelle fasi molto precoci. L'incidenza è di circa 1 affetto ogni 3-4000 individui. Sono stati identificati circa 50 geni/loci responsabili della RP non sindromica (forme autosomiche dominanti, autosomiche recessive, legate all'X e digeniche). La diagnosi clinica si basa sulla presenza di cecità notturna e sui difetti del campo visivo periferico, sulle lesioni nel fondo dell'occhio, sul tracciato elettroretinografico ipovoltato e sul progressivo peggioramento di questi segni.

Il test genetico

Il test si basa sulla ricerca delle varianti di sequenza a carico dei geni associati alla patologia mediante NGS (Next Generation Sequencing) ed il sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante NGS. I principali geni analizzati sono:

- ABCA4 (ATP-binding cassette, sub-family A member 4);
- USH2A (usherina);
- CRB1 (crumbs homolog 1);
- RPE65 (retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa);
- RDH12 (retinol dehydrogenase 12 all-trans/9-cis/11-cis).

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette da 63mL di sangue intero Vacutainer con EDTA.

Indicazioni all'analisi:

soggetti affetti con diagnosi clinica effettuata tramite esami strumentali indicativi per tale patologia: indagini elettrofisiologiche (elettroretinogramma ed elettroculogramma), fluorangiografia retinica, ecc. o in presenza di sospetto clinico e per familiarità.

#### 11.30 Sindrome di Charcot-Marie-Tooth

La malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT), nota anche come Neuropatia motorio-sensitiva, è una malattia neurologica ereditaria a carico del sistema nervoso periferico; interessa 36 casi ogni 100.000 nascite. Sulla base del gene coinvolto e della sintomatologia riscontrata si distinguono: CMT di tipo 1, la forma più comune, CMT di tipo 2, CMT tipo 4 e CMT X-linked. Il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames effettua la diagnosi molecolare di tutte le forme.

Il test genetico:

si esegue il sequenziamento, mediante la tecnologia Next Generation Sequencing, dei seguenti geni:

- PMP22 (Proteina della Mielina Periferica 22);
- MPZ (Proteina Mielinica Zero);
- LITAF (Lipopolisaccaride-indotta fattore TNF-alfa);
- EGR2 (Recettore del fattore di crescita dell'epidermide);

- MFN2 (Mitofusina 2);
- KIF1B (Chinesina citosolica 1B);
- RAB7A (Proteina associate a Ras);
- LMNA (Lamina A/C);
- TRPV4 (canaled di trasporto cationico legato a recettore e potenziale transitorio);
- BSCL2 (Seipina);
- GARS (GAR sintasi);
- NEFL (Catena leggera neurofilamento);
- HSPB1 (Proteina da shock termico beta-1);
- GDAP1 (Gene ganglioside-indotto della proteina 1 di differenziazione);
- HSPB8 (Proteina da shock termico beta-8);
- DNMT2 (Dinamina 2);
- MTMR2 (proteina 2 correlata alla miotubularina);
- SBF2 (Miotubularina 2);
- SH3TC2 (Proteina 2 per dominio SH3 e motivi tetrapeptidici ripetuti);
- NDRG1 (Proteina N-Myc Downstream Regulated 1);
- PRX (Periaxina);
- FGD4 (Fabrin);
- FIG4 (Fosfoinositide 5 – fosfatasi);
- GJB1 (Proteina beta 1 giunzione gap);
- PRPS1 (Fosforibosil pirofosfato sintetasi).

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3 ml di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA), liquido amniotico e villi coriali.

Indicazione all'analisi:

l'analisi si effettua su tutti i pazienti che presentano richiesta specifica per studio molecolare per Charcot Marie Tooth, in caso di sospetto clinico o per familiarità. Tale esame è richiesto di solito dal neurologo e prevede una consulenza pre test in cui vengono raccolte le informazioni cliniche e la storia familiare.

### 11.31 Sindrome di Marfan

La sindrome di Marfan è una malattia genetica che colpisce il tessuto connettivo, cioè il tessuto che costituisce l'impalcatura dell'organismo. La malattia comporta manifestazioni principali a carico dell'apparato cardiovascolare (prolasso della valvola mitrale e dilatazione dell'aorta, che può arrivare a rompersi), dell'apparato scheletrico (statura molto alta, aspetto "dinoccolato", arti in proporzione molto più lunghi del tronco, dita lunghe e affusolate, articolazioni eccessivamente mobili, alterazioni dello sterno, piede piatto) e degli occhi (lussazione del cristallino, miopia). L'entità dei sintomi è molto variabile. Nella maggior parte dei casi la malattia è causata da mutazioni del gene della fibrillina-1 (FBN1), localizzato sul cromosoma 15. La trasmissione avviene in genere con modalità autosomica dominante. In alcune famiglie con una forma particolare della sindrome sono state identificate mutazioni a carico di altri due geni, chiamati TGFRB1 e TGFRB2. Di fatto i pazienti portatori di mutazioni in questi geni sono affetti da una sindrome che può somigliare a volte alla sindrome di Marfan, ma che si chiama sindrome di Loeys-Dietz.

Il test genetico

Il test si basa sulla ricerca delle varianti di sequenza a carico del gene FBN1 e dei geni TGFRB1 e TGFRB2 mediante NGS (Next Generation Sequencing) e sul sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante NGS.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette Vacutainer EDTA con 3ml di sangue intero.

Indicazioni all'analisi:

soggetti affetti con diagnosi clinica effettuata tramite esami strumentali indicativi per tale patologia o in presenza di sospetto clinico e per familiarità.



### 11.32 Sindrome di Angelman

La Sindrome di Angelman è un complesso disordine spesso di difficile diagnosi clinica specie nei primi anni di vita. La maggior parte dei casi deriva da una delezione della regione 15q11-q13 del cromosoma materno (circa 70%) e solo il 3-5% dei casi è dovuto a disomia uniparentale paterna, mentre è stata trovata una anomalia nel processo di imprinting in almeno un terzo del rimanente 25% di pazienti. Si ipotizza anche la possibilità di una mutazione a carico del gene UBE3A riscontrata in alcuni pazienti con Sindrome di Angelman. L'analisi per la Sindrome di Angelman comprende uno studio di tipo citogenetico e uno di tipo molecolare.

La sintomatologia della malattia è eterogenea e include bassa statura, ritardo mentale grave, epilessia ed ipotonia.

#### Il test genetico

Il test per la diagnosi di Angelman consiste nello studio del cariotipo per il rilevamento di eventuali riarrangiamenti cromosomici abbinato all'amplificazione del DNA del probando e dei genitori mediante multiplex-QF-PCR (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction) di specifiche STR (sequenze di DNA ripetute altamente polimorfiche) localizzate sul cromosoma 15. Gli amplificati ottenuti sono separati mediante elettroforesi capillare ed analizzati con uno specifico software per la ricerca di marcatori genetici indicativi di disomia uniparentale paterna.

Lo screening viene completato con l'analisi della regione critica 15q11.2-q13 per valutare eventuali difetti di metilazione dovuti a disomia uniparentale o a difetti di imprinting e di delezioni e/o duplicazioni mediante MS-MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification).

#### Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette Vacutainer EDTA con 3ml di sangue intero.

#### Indicazioni all'analisi:

il test è consigliato per bambini con quadro clinico sospetto o con eventuale familiarità.

### 11.33 Sindrome di Brugada

La sindrome di Brugada è una malattia genetica dei canali ionici che si manifesta con alterazioni elettrocardiografiche caratteristiche e può complicarsi con aritmie ventricolari maligne, causa di sincope e/o morte improvvisa. Dato che il quadro elettrocardiografico anomalo è spesso intermittente e la malattia presenta una grande variabilità geografica, è difficile stimare la prevalenza della malattia. Le coorti più numerose nei paesi orientali presentano una prevalenza tra 1/700 e 1/800. La prevalenza in Europa e negli Stati Uniti è più bassa: da 1/3.300 a 1/10.000. I sintomi in genere si presentano nella terza-quarta decade di vita e, più spesso, nei maschi rispetto alle femmine (8:1). Sono stati descritti sia casi sporadici che familiari e le analisi dell'albero genealogico suggeriscono una trasmissione autosomica dominante. Il primo gene coinvolto è il gene SCN5A, con una frequenza di mutazione del 25%, che codifica per la subunità del canale del sodio voltaggio-dipendente, responsabile della depolarizzazione iniziale del ciclo cardiaco.

#### Il test genetico:

consiste nella ricerca delle varianti di sequenza a carico del gene associato alla patologia mediante Next Generation Sequencing e successivo sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante Next Generation Sequencing. Il gene sequenziato ed analizzato è SCN5A.

#### Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti (prelievo di sangue periferico in 2 provette Vacutainer da 3 ml con EDTA) per indagine postnatale.

#### Indicazione all'analisi:

su soggetti con diagnosi clinica accertata, con presenza di sospetto clinico o con familiarità.

### 11.34 Sindrome Gilbert

Nella Sindrome di Gilbert l'alterazione genetica interessa il promotore del gene (UGT1A1) e comporta generalmente la presenza di 7 ripetizioni TA invece di 6 a livello del TATA box che produce l'enzima; in una piccola percentuale dei casi l'alterazione genetica può essere una mutazione nella regione codificante del gene UGT1A1. In questa malattia è, dunque, presente un deficit parziale dell'attività

dell'enzima UDP-glucoronil transferasi, in particolare, della isoforma UGT1A1. L'entità di tale deficit, compreso tra il 20 e il 70% del valore normale, determina la diversa espressione clinica e gravità sintomatologica (ittero) della malattia.

Il test genetico:

Il test si basa sulla ricerca delle varianti di sequenza a carico del gene UGT1A1 mediante NGS (Next Generation Sequencing) e sul sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante NGS.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette Vacutainer EDTA con 3ml di sangue intero.

Indicazioni all'analisi:

studio genetico per sospetto clinico o per familiarità.

#### 11.35 Sindrome di Prader-Willi

La Sindrome di Prader-Willi è una malattia genetica rara (1 su 15.000/ 25.000 nati vivi) dovuta ad alterazioni a carico del cromosoma 15, la cui diagnosi può essere difficile da stabilire clinicamente. I segni clinici più frequenti sono obesità, ridotto tono muscolare ed anomalie intellettive e comportamentali. Le basi genetiche risultano molto eterogenee: circa il 70% dei casi è dovuto a una delezione della regione 15q11-q13 del cromosoma paterno, il 28% è dovuto a disomia uniparentale materna mentre meno del 2% dei casi può presentare un errore nel processo di imprinting che causa una non espressione del gene paterno nella regione critica della PWS.

Il test genetico

Il test per la diagnosi di Angelman consiste nello studio del cariotipo sul sangue periferico per il rilevamento di eventuali riarrangiamenti cromosomici abbinato all'amplificazione del DNA del probando e dei genitori mediante multiplex-QF-PCR (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction) di specifiche STR (sequenze di DNA ripetute altamente polimorfiche) localizzate sul cromosoma 15. Gli amplificati ottenuti sono separati mediante elettroforesi capillare ed analizzati con uno specifico software per la presenza dei marcatori genetici di disomia uniparentale paterna.

Lo screening viene completato con l'analisi della regione critica 15q11.2-q13 per valutare eventuali difetti di metilazione dovuti a disomia uniparentale o a difetti di imprinting e di delezioni e/o duplicazioni mediante MS-MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification).

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in due provette da 3mL di sangue intero Vacutainer con EDTA.

Indicazioni all'analisi:

il test è consigliato per bambini con quadro clinico sospetto.

#### 11.36 Sindrome di Silver Russell (SRS)

La sindrome di Silver Russell (SRS) è un disordine clinicamente eterogeneo le cui basi genetiche sono in parte note. Sono stati identificati differenti anomalie cromosomiche coinvolgenti la regione del cromosoma 7p12-7p14 e sono anche descritti difetti genetici coinvolgenti regioni cromosomiche di altri cromosomi. Nel 10% dei pazienti è stata osservata presenza di Disomia Uniparentale per il cromosoma 7, in cui entrambi gli omologhi risultano di origine materna.

Il test genetico:

Il test consiste nello studio delle disomie materne del cromosoma 7, attraverso l'analisi da 5 a 10 polimorfismi del DNA con un confronto con i campioni dei genitori del paziente mediante PCR.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3 mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA) per i genitori, e su villi coriali, liquido amniotico, linfociti da sangue fetale o linfociti da sangue periferico per l'analisi su figlio.

Indicazioni all'analisi:

l'indicazione a tale studio è data dal rilevamento di tratti e caratteristiche tipiche osservate in consulenza clinica.



### 11.37 Sindrome Von Hippel-Lindau (VHL)

La malattia di Von Hippel-Lindau (VHL) è una sindrome con predisposizione familiare al cancro, associata a tumori maligni e benigni di natura variabile, per lo più emangioblastomi della retina, del cervelletto e della colonna vertebrale, carcinoma delle cellule renali (CCR) e feocromocitoma. La prevalenza è stimata in 1/53.000 casi e l'incidenza alla nascita in 1/36.000 casi. Colpisce entrambi i sessi. Viene diagnosticata in media attorno ai 26 anni, ma la malattia può essere individuata tra l'infanzia e i 70 anni. La malattia di Von Hippel-Lindau è causata da mutazioni del gene VHL (3p25.3), un oncosoppressore. La trasmissione è autosomica dominante a penetranza variabile. La maggior parte dei casi viene diagnosticata attraverso l'identificazione di una mutazione germinale di VHL.

Il test genetico:

Il test consiste nell'analisi mediante MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) per la ricerca di delezioni o duplicazioni a carico del gene VHL. Nei casi risultati negativi all'MLPA viene eseguita la ricerca di varianti di sequenza a carico degli esoni e delle regioni introniche fiancheggianti del gene VHL, mediante amplificazione con PCR (Polymerase Chain Reaction) degli esoni del gene VHL e, sequenziamento delle regioni codificanti e delle regioni introniche fiancheggianti, per la ricerca di varianti di sequenza (sequenziamento Sanger 72%).

L'analisi si effettua:

DNA estratto da linfociti di sangue periferico, 2 provette da 3 mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA.

Indicazione all'analisi:

l'analisi si effettua su soggetti con diagnosi clinica accertata o con presenza di sospetto clinico e per familiarità.

### 11.38 Sindrome di Usher (SRS)

La Sindrome di Usher (USH) è una malattia geneticamente e clinicamente eterogenea, trasmessa con modalità autosomica recessiva che comprende 12 loci, con 9 geni noti e 3 condizioni cliniche, USH1, USH2, USH3 che associano retinite pigmentosa e sordità con un'età di esordio variabile. La prevalenza della USH è di 3-4/100.000 nella popolazione europea.

La Sindrome di Usher Tipo 1 (USH1), presenta sordità profonda alla nascita; talvolta i pazienti presentano un residuo uditivo per le basse frequenze ed hanno problemi di equilibrio. Verso la fine della prima decade di età, manifestano i primi sintomi della retinite pigmentosa. I principali geni coinvolti sono: MYO7A (39%-55%), CDH23 (19%-35%), PCDH15 (11%-19%), USH1C (6%-7%) e USH1G (circa il 7%). La Sindrome di Usher Tipo 2 (USH2), è caratterizzata da una perdita uditiva bilaterale da moderata /grave. La perdita di udito è stazionaria nella maggior parte dei casi; molto raramente le persone perdono completamente la capacità uditiva. I principali geni coinvolti sono: USH2A (80%), GRP98 (15%) e DFNB31 (circa il 5%). Nella Sindrome di Usher Tipo 3 (USH3), i pazienti alla nascita possono non manifestare un deficit uditivo, ma l'ipoacusia che inizia nei primi anni di vita, è progressiva e intorno ai 30-50 anni può diventare profonda. La degenerazione della retina inizia a manifestarsi dopo l'adolescenza. In alcuni casi sono presenti anche problemi di equilibrio. Attualmente l'unico gene coinvolto e noto è USH3A.

Il test genetico:

il test si effettua mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) degli esoni dei geni interessati e sequenziamento delle regioni codificanti e delle regioni introniche fiancheggianti, per la ricerca di varianti di sequenza.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3 mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA).

Indicazioni all'analisi:

si consiglia ai soggetti affetti con diagnosi clinica effettuata tramite esami strumentali indicativi per tale patologia o in presenza di sospetto clinico e per familiarità.

### 11.39 Sindrome dell' x-fragile

La malattia è dovuta alla mutazione del gene FMR1 del cromosoma X, localizzato in Xq27.3 ed è ca-

ratterizzata dall'espansione di una sequenza ripetuta di basi CGG che causa una regolazione negativa dell'espressione del gene. Mentre nelle persone normali queste basi sono ripetute in un numero variabile da 5 a 44 volte, nelle persone malate il numero di ripetizione è maggiore di 200. Questa espansione, definita mutazione completa, provoca la mancata espressione del gene FMR. I maschi portatori di un gene FMR1 con una significativa espansione di CGG (>200) presentano i sintomi della malattia, visto che possiedono una sola copia del cromosoma X. Le donne portatrici del gene FMR1 espanso, avendo due copie del cromosoma X, possono presentare alcuni sintomi oppure essere normali. I sintomi della Sindrome dell' X Fragile sono ritardo mentale di grado moderato o grave, una facies caratteristica con volto allungato e grandi orecchie, grossi testicoli e basso tono muscolare.

Il test genetico:

il test consiste nello studio del gene FMR1 (locus Fraxa) per individuare l'eventuale pre mutazione o mutazione completa e si effettua mediante amplificazione con PCR (Polymerase Chain Reaction) della regione FMR-1 e, solo per i soggetti di sesso maschile, viene utilizzata anche la metodica MS-MLPA. La visualizzazione dei prodotti amplificati mediante le due metodiche, viene effettuata mediante corsa elettroforetica capillare automatizzata.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3 mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA), da liquido amniotico, villo coriale e sangue fetale.

Indicazioni all'analisi:

l'indagine è prevista per i soggetti che presentano una familiarità per la Sindrome dell'X-Fragile e/o per ritardo mentale, nei bambini con ritardo mentale e del linguaggio, nelle donne che mostrano Pre-mature Ovarian Insufficiency (POI) ed in caso di FXTAS (sindrome del tremore atassia associata all' X Fragile) che può essere presente sia negli uomini che nelle donne.

#### 11.40 Tachicardia ventricolare (TV)

La tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPVT) è una grave malattia aritmogena genetica, caratterizzata da tachicardia ventricolare (TV) indotta dallo stress adrenergico, con una prevalenza in Europa è di 1/10.000.

I geni noti responsabili della CPVT sono due, il primo codifica per il recettore cardiaco della rianodina (RYR2) e causa la CPVT in circa il 55-65% dei casi, il secondo codifica per la calsequestrina cardiaca (CASQ2), mutato in circa il 2% dei casi di CPVT.

Il test genetico:

Il test consiste nella ricerca delle varianti di sequenza a carico dei geni associati alla patologia mediante Next Generation Sequencing e successivo sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante Next Generation Sequencing. I geni sequenziati ed analizzati sono:

- RYR2;
- CASQ2.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti (prelievo di sangue periferico in 2 provette Vacutainer da 3 ml con EDTA) per indagine postnatale.

Indicazione all'analisi:

su soggetti con diagnosi clinica accertata, con presenza di sospetto clinico o con familiarità.

#### 11.41 Talassemia Beta ed Alfa

Le talassemie sono un gruppo di disturbi ereditari dovuti ad alterazioni nella sintesi dei componenti della emoglobina (HbA), proteina contenuta nei globuli rossi, che trasporta l'ossigeno dai polmoni ai tessuti periferici e smaltisce l'anidride carbonica raccolta nei tessuti periferici verso il polmone, da dove viene poi eliminata. L'emoglobina dell'adulto è formata da due subunità di tipo alfa e due subunità di tipo beta che si uniscono a formare una tasca dove è localizzato il gruppo eme, sito di legame di ossigeno e anidride carbonica.

Le beta talassemie sono un gruppo eterogeneo di patologie ereditarie accomunate dalla sintesi di-

fettosa o dalla assenza delle catene beta dell'emoglobina; tale alterazione comporta l'associazione delle catene alfa tra loro producendo una emoglobina strutturalmente e funzionalmente alterata che danneggia la membrana dei globuli rossi. Ne consegue una massiva distruzione dei globuli rossi nella milza (emolisi) e la precoce distruzione dei precursori eritroidi nel midollo (eritropoiesi inefficace). Il gene che codifica per la beta globina è localizzato sul cromosoma 11; la mutazione può essere riportata in omozigosi, cioè su entrambe le copie del gene, e dare Talassemia Major, oppure può essere presente in eterozigosi, quindi su una sola copia del gene, provocare Talassemia Intermedia.

La alfa talassemia è una malattia ereditaria provocata dalla sintesi difettosa o assente della catena alfa dell'emoglobina generando un accumulo di catene beta nell'adulto con formazione di varianti emoglobiniche patologiche come l'emoglobina H, (4 catene beta), o emoglobina di Bart nel feto, (4 catene gamma).

Esistono 4 geni localizzati sul cromosoma 16 che codificano per le catene alfa dell'emoglobina. Gli individui normali hanno 4 copie intatte del gene:

- i portatori silenti della talassemia alfa hanno una sola copia mutata del gene;
- il portatore classico possiede due geni alfa globinici alterati con conseguente riduzione del volume dei globuli rossi e della emoglobina in essi contenuta.

La mutazione di tutte le copie del gene alfa globinico genera una condizione molto grave nota come idrope fetale spesso letale per il feto durante la gravidanza.

Il test genetico:

Il test consiste nella amplificazione simultanea delle regioni del gene della beta globina e alfa globina dove sono localizzate le mutazioni più frequenti mediante Multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction) ed analisi delle mutazioni mediante reverse dot blot. Le mutazioni analizzate per la talassemia beta ed alfa sono rispettivamente 25 e 21.

Su richiesta del medico specialista, lo screening delle suddette mutazioni può essere aumentato con il sequenziamento diretto dei geni coinvolti nell'alfa nella beta talassemia mediante NGS (Next Generation Sequencing).

Il test si effettua:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3 mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA), da liquido amniotico, villo coriale e sangue fetale.

Indicazioni all'analisi:

l'analisi è consigliata per i soggetti con diagnosi clinica accertata, nei casi con sospetto clinico (elettroforesi dell'emoglobina anomala) e per familiarità.

#### 11.42 Trombofilia

Il termine Trombofilia si riferisce a un gruppo di patologie genetiche caratterizzate dalla tendenza a soffrire di episodi trombotici. Nella maggior parte dei casi si tratta di difetti o alterazioni a carico di uno o più fattori della coagulazione del sangue quali, protrombina, fattore V Leiden, metilentetraidrossidoreduttasi (MTHFR), fattore V H1299R; fattore XIII; beta fibrinogeno (FGB), human platelet alloantigens (HPA); inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), angiotensinogeno (AGT); enzima convertitore dell'angiotensina (ACE); apolipoproteina (ApoE); apolipoproteina B (ApoB), cistationina beta sintetasi (CBS) etc.. Tali fattori presentano varianti geniche la cui frequenza nella popolazione è sufficientemente alta da considerarle varianti polimorfiche.

Il test genetico:

consiste nell'amplificazione del DNA mediante Real-Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) e successiva analisi dei prodotti amplificati per la valutazione della presenza dei polimorfismi connessi con l'aumento del rischio trombotico. I polimorfismi analizzati sono:

- polimorfismo G1691A del fattore V Leiden;
- polimorfismo HR2 del fattore V;
- polimorfismo C677T e A1298C dell' MTHFR;
- polimorfismo G20210A della protrombina;
- polimorfismo V34L del fattore XIII;
- polimorfismo 1a/1b del HPA-1;

- polimorfismo -455G/A del FBG;
- polimorfismo 4G-5G del PAI-1;
- polimorfismo del C112R- R158C dell' APO E;
- polimorfismo R3500Q dell' APO B;
- polimorfismo M235T dell' AGT;
- polimorfismo I/D dell' ACE;
- polimorfismo ins68/del68 del CBS;
- polimorfismo A66G del MTRR.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (due provette da 3 mL di sangue intero Vacutainer con EDTA).

Indicazioni all'analisi:

si consiglia lo screening genetico dei fattori della coagulazione per la diagnosi della trombofilia ereditaria ai soggetti con storia familiare positiva, alle donne con poliabortività per accertata correlazione tra trombofilia ereditaria ed aborti in utero e per i soggetti che hanno manifestato precedenti trombosi. Inoltre è consigliata per le donne che assumono progestinici.

#### 11.43 Vitreoretinopatie

Le vitreoretinopatie ereditarie sono malattie degenerative del vitreo e della retina. Esse costituiscono un gruppo di malattie piuttosto rare, ma di notevole rilevanza clinica. Tra queste patologie le più diffuse sono la vitreo retinopatia essudativa familiare, la degenerazione a fiocchi di neve, la Sindrome di Stickler, la Sindrome di Wagner, la Sindrome di Goldmann-Favre e la vitreoretinocoroidopatia autosomica dominante.

Il test genetico:

il test consiste nella ricerca delle varianti di sequenza a carico dei geni associati alla patologia mediante NGS (Next Generation Sequencing) e sequenziamento in automatico (Sanger) per la conferma delle varianti di sequenza evidenziate mediante NGS.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3 mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA).

Indicazioni all'analisi:

l'analisi su soggetti con diagnosi clinica accertata e in casi di presenza di sospetto clinico e per familiarità.

## 12 Farmacogenetica e Diagnosi Molecolare in Oncologia

### 12.1 Farmacogenetica

Soggetti diversi rispondono in modo diverso allo stesso farmaco; tali differenze sono legate al grande numero di proteine che intervengono nella risposta alla terapia farmacologica. Ogni proteina è prodotta da una specifica sequenza di DNA, il gene; la maggior parte dei geni presenta caratteristiche diverse in individui diversi. Una nuova disciplina, la FARMACOGENETICA, si propone di studiare le variazioni nella sequenza dei geni ("varianti polimorfiche") responsabili dell'efficacia della terapia farmacologica in un determinato individuo. Test del DNA, che identificano queste varianti polimorfiche, sono in grado di predire, almeno in parte, come un paziente risponderà ad un determinato farmaco. I risultati del test genetico saranno utilizzati dal medico per scegliere quale farmaco impiegare per il trattamento del paziente e per ottimizzare il dosaggio da somministrare: "il farmaco giusto al paziente giusto". Le varianti polimorfiche in farmacogenetica vengono ricercate nei geni responsabili del metabolismo, del trasporto, dell'assorbimento, della distribuzione e dell'escrezione del farmaco nonché in quei geni che producono le proteine dei recettori del farmaco stesso.

Gli isoenzimi appartenenti al sistema del CYP450 sono responsabili del metabolismo di molti farmaci comunemente prescritti in quanto catalizzano la maggior parte delle reazioni di ossidazione che avvengono a livello epatico (reazione di fase I). Tra le numerose isoforme del CYP450, il Citocromo P450 isoforma 2D6 (CYP2D6) è coinvolto nel metabolismo ossidativo del 25% circa dei farmaci comunemente prescritti.

I genotipi 2D6 risultano altamente variabili tra i diversi individui, non solo perché esistono numerosi

polimorfismi a carico di questo gene ma anche perché un evento di duplicazione determina in alcuni di essi l'esistenza di più copie attive del gene. In base al genotipo sono state individuate quattro categorie fenotipiche: UM "ultra rapid metabolizers", EM "extensive metabolizers", IM "intermediate metabolizers" e PM "poor metabolizer".

I soggetti con fenotipo "extensive" o "intermediate" hanno un'attività enzimatica rispettivamente normale o inferiore ai limiti della norma, mentre i metabolizzatori "poveri" i PM e gli "ultra-rapidi" UM, presentano una capacità metabolica rispettivamente molto inferiore o molto superiore ai livelli normali. Gli individui appartenenti a queste due ultime categorie possono essere soggetti a reazioni avverse oppure a ridotti effetti terapeutici se il farmaco somministrato è substrato del prodotto del gene CYP2D6.

Il test genetico:

consiste nell'identificazione delle varianti polimorfiche dell'intero gene del citocromo CYP2D6 mediante NGS (Next Generation Sequencing) e conferma delle varianti geniche rilevate con NGS mediante sequenziamento diretto Sanger.

Il test si esegue:

su DNA estratto da linfociti di sangue periferico (2 provette da 3mL di sangue intero in provetta Vacutainer con EDTA).

Indicazione all'analisi:

l'analisi viene eseguita in soggetti in cui si verifica l'assenza di effetti terapeutici o l'insorgenza di effetti collaterali in seguito a somministrazione di terapie a base di farmaci substrato del CYP2D6.

## 12.2 Diagnosi molecolare in oncologia

La diagnostica molecolare in oncologia ha avuto il suo maggiore impatto nella diagnosi e nel trattamento del cancro al seno, ma anche nella diagnosi di tumore del colon-retto, del cancro del polmone e della prostata al fine di ridurre la mortalità. Nella lotta contro il cancro, la diagnostica molecolare è uno strumento di rilevamento precoce e di gestione della malattia, la chiave per una gestione più efficace del cancro e il fondamento della medicina personalizzata. Il Centro Ames effettua un ricco portafoglio di test che puntano alla rilevazione di mutazioni genetiche e di misurare l'espressione genica di tessuti tumorali fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

I saggi, con una sensibilità eccezionale (100%) e l'accuratezza (99%), si basano su una PCR real time denominata "ADx-ARMS" per rilevare le mutazioni somatiche più comuni di diversi geni come EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, EML4-ALK, PIK3CA, ROS, JAK2, BCR-ABL, TYMS, ERCC1, C-KIT e RRM1.

In particolar modo il kit per:

**EGFR:**

l'individuazione delle mutazioni somatiche più informative del gene del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). La presenza di mutazioni di EGFR sono ricercate in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule metastatico per predire la sensibilità a Iressa. Infatti, in Cina queste mutazioni sono selezionati in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), che hanno più probabilità di rispondere a Iressa (Gefitinib) o Tarceva (Erlotinib).

**KRAS:**

la presenza di mutazioni del gene KRAS in pazienti con carcinoma coloretale è rilevante per la resistenza a farmaci mirati come gli inibitori della tirosin-chinasi. I pazienti affetti senza mutazioni del gene KRAS sono molto più propensi a beneficiare del Erbitux (Cetuximab) o Vectibix (Panitumumab), rispetto ai pazienti con un gene KRAS mutato. L'Organizzazione europea "Drug Administration" e US FDA ha raccomandato l'impiego del test KRAS per rilevare eventuali mutazioni genetiche prima dell'utilizzo mirato del farmaco Cetuximab e Vectibix nel trattamento del cancro coloretale.

**NRAS:**

NRAS è un membro della famiglia RAS di piccole GTPasi e svolge un ruolo centrale nelle vie di segnalazione MAPK. NRAS è stato implicato nella patogenesi di diversi tumori. Le Mutazioni NRAS sono particolarmente comuni nel melanoma, nel carcinoma epatocellulare, nella leucemia mieloide e nel carcinoma della tiroide. In totale, si verificano mutazioni attivanti nei geni NRAS nel 13 ~ 25% dei melanomi cutanei, nel 1 ~ 6% di cancro del colon-retto e nel 1% di cancro al polmone, principalmente



negli esoni 2, 3 o 4.

La presenza di mutazioni del gene NRAS è rilevante per la resistenza ai farmaci nel carcinoma a piccole cellule del polmone trattati con inibitori della tirosin-chinasi.

#### **BRAF:**

BRAF è una serin/ treonin chinasi che svolge un ruolo all'interno del pathway di Ras-Raf-MEK-MAPK. Questo percorso, sotto il controllo dei fattori di crescita e ormoni, normalmente regola la proliferazione e sopravvivenza cellulare. Le mutazioni nel gene BRAF sono state associate con lo sviluppo del cancro. Mutazioni di BRAF si verificano in circa il 50% dei melanomi, in ~ 40% dei tumori tiroidei papillari, in ~ 30% dei tumori ovarici, in ~ 10% dei tumori del colon-retto e in ~ 10% dei tumori della prostata. I farmaci che bloccano la attivazione oncogenica di BRAF hanno avuto risultati impressionanti negli studi clinici e la ricerca di nuovi farmaci mirati a BRAF è un'area attiva di ricerca e sviluppo.

#### **EML4-ALK:**

l'oncogene di fusione EML4-ALK rappresenta uno dei nuovi bersagli molecolari nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC). Questa fusione comporta una piccola inversione all'interno del cromosoma 2p. Questa inversione è responsabile dell'espressione di una tirosina chinasi chimerica avente la metà N-terminale della proteina 4 (EML4) del microtubulo di echinodermi fusa al dominio chinasi intracellulare del linfoma anaplastico (ALK). La proteina EML4-ALK possiede una potente attività oncogenica sia in vitro che in vivo. Questa attività può essere bloccata da piccole molecole inibitorie, sostenendo il ruolo di EML4-ALK come un fattore chiave di tumorigenesi polmone.

#### **PIK3CA:**

esistono mutazioni del gene Phosphoinositide-3-chinasi subunità alfa catalitica (PIK3CA) in diversi tipi di tumori, tra cui il cancro al seno ed il cancro del polmone non a piccole cellule. La mutazione di PIK3CA può portare all'attivazione persistente del pathway a valle associate con lo sviluppo e la diffusione del cancro.

#### **ROS1:**

ROS1 è un tirosin-chinasi recettoriale della famiglia dei recettore dell'insulina. Riarrangiamenti cromosomici che coinvolgono il gene del recettore tirosina chinasi ROS1 si verificano in un sottogruppo di carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC). I partner di fusione di ROS1 includono SL-C34A2, CD74, SDC4, EZR ecc. Queste fusioni portano all'attività chinasi costitutiva e l'attivazione di percorsi a valle, come JAK / STAT, PI3K / AKT, RAS / MAPK, ecc, che porta alla carcinogenesi.

#### **JAK2:**

la famiglia di JAK tirosin-chinasi non-recettore, comprende JAK1, JAK2, JAK3, e TYK2. I fattori di crescita e le citochine sono in grado di regolare la trascrizione genica attraverso l'attivazione JAK-dipendente del trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione (STAT). La trasduzione JAK-STAT del segnale regola la proliferazione cellulare, il differenziamento, l'apoptosi e la regolazione immunitaria. L'attivazione di JAK2 da mutazione del amminoacido in posizione 617 (V617F) è associata a disturbi mieloproliferativi, compresa la policitemia vera (mutazioni trovate nel 90% dei casi), la trombocitemia essenziale (50%) e la mielofibrosi idiopatica (50%). La mutazione JAK2 è il principale indicatore in diagnostica di MPD. La mutazione JAK2 V617F è stata trovata in tre dei 24 campioni di cancro del polmone mediante sequenziamento dell'esoma. Se questa scoperta viene convalidata rappresenterà una nuova mutazione importante causativa del cancro del polmone, con l'ulteriore vantaggio che la chinasi mutante è inibita da farmaci ben studiati, come gefitinib.

#### **BCR-ABL:**

Il 95% dei pazienti con leucemia mieloide cronica (CML) ha un riarrangiamento cromosomico che produce l'oncogene di fusione BCR-ABL1. I pazienti con LMC in genere rispondono molto bene al trattamento con l'inibitore della tirosin-chinasi imatinib mesilato, conosciuta come Gleevec negli Stati Uniti e Glivec in Europa. Tuttavia, le cellule LMC in pazienti trattati con TKI possono sviluppare resistenza al farmaco a causa della comparsa della mutazione puntiforme T315I nel dominio della chinasi BCR-ABL. Nuovi inibitori come dasatinib e nilotinib sono significativamente più potenti di imati-



#### TYMS:

Timidilato sintetasi (TYMS) catalizza la metilazione di deoxyuridilate a deossitimidilato, che è un metabolita chiave per la replicazione e riparazione del DNA. I malati di cancro con un basso livello di espressione genica TYMS possono essere più sensibili al trattamento con la chemioterapia con fluorurati. Questo kit permette la valutazione quantitativa dell'espressione genica TYMS nel tessuto del cancro.

#### ERCC1:

il test ERCC1 fornisce informazioni sulla potenziale sensibilità del cancro di un paziente alle terapie a base di platino.

La combinazione di carboplatino e paclitaxel è il regime più comunemente usato per il trattamento del tumore non a piccole cellule del polmone (NSCLC). Questi farmaci inibiscono la crescita del cancro danneggiando il DNA. L'espressione del gene di riparazione del DNA di escissione riparazione cross-complementazione gruppo 1 (ERCC1) è segnalata per essere correlata con resistenza ai farmaci a base di platino. Le cellule tumorali con basso livello di enzima ERCC1 possono essere più sensibili ai farmaci a base di platino dal momento che sono meno in grado di riparare il DNA danneggiato.

#### C-KIT:

KIT è un recettore tirosina chinasi (RTK) che svolge normalmente un ruolo critico nelle emopoiesi. La mutazione del gene KIT conduce alla crescita aberrante della cellula ospitante la proteina mutante. Mutazioni di KIT sono state associate a diverse neoplasie, tra cui la leucemia mieloide acuta (AML), tumori stromali gastrointestinali (GIST) e carcinomi testicolari.

#### RRM1:

il gene RRM1 è l'abbreviazione di ribonucleotide reduttasi M1. La gemcitabina è l'analogo DCTP ed è l'inibitore della ribonucleotide reduttasi. RRM1 è uno degli obiettivi della gemcitabina. È stato dimostrato che. Un alto livello di espressione di RRM1 è collegato con la resistenza alla gemcitabina. Inoltre, i pazienti oncologici in uno stadio avanzato con un alto livello di espressione di RRM1 hanno prognosi infausta. Pertanto, la valutazione quantitativa dell'espressione genica RRM1 potrebbe determinare l'idoneità di gemcitabina a pazienti affetti da cancro NSCL e stimarne la prognosi.

## 13 Infettivologia Molecolare

Mediante le moderne tecniche di biologia molecolare (PCR ed RT-PCR) è possibile effettuare presso il Laboratorio di Genetica Medica del Centro AMES una ricerca rapida del genoma virale, batterico e/o micogeno, la sua titolazione e genotipizzazione, consentendo una diagnosi certa dell'infezione e una più specifica terapia.

I test d'infettivologia che si eseguono presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames sono:

### 13.1 Ricerca di Candida Species

La Candida appartiene alla famiglia dei lieviti e fa parte della normale flora batterica della pelle, della bocca, del tratto gastrointestinale e della vagina, ma può causare infezioni opportunistiche, candidosi, in soggetti affetti da condizioni patologiche o ridotte difese immunitarie. Esistono numerose specie di Candida; la Candida Albicans è responsabile del 56% dei casi di candidosi, la Candida Glabrata responsabile del 14% delle infezioni; minore incidenza hanno le infezioni da Candida Krusei e Candida non-Albicans.

Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa delle specie Candida Albicans, Candida Krusei e Candida Glabrata.

Tipo di campione: tampone vaginale, cervicale, uretrale eseguito ed identificato dal medico richiedente e liquido seminale.

Metodica: amplificazione di DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed interpretazione dei risultati mediante l'apposito software.

### 13.2 Ricerca di Chlamydia Trachomatis

La Chlamydia Trachomatis (Clamidia) è un batterio intracellulare che rappresenta il principale agente eziologico di Malattie Sessualmente Trasmesse come uretrite non gonococcica (NGU) e post-gonococcica (blenorragia da inclusioni), epididimite, vaginite, sindrome uretrale acuta e, nella donna, malattia pelvica infiammatoria che spesso sfocia nella sterilità di coppia. Conseguenza della trasmissione verticale dell'infezione da C.trachomatis sono le infezioni del neonato (congiuntivite, polmonite, otite).

Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa di Chlamydia Trachomatis.

Tipo di campione: tampone vaginale, cervicale, uretrale eseguito ed identificato dal medico richiedente e liquido seminale.

Metodica: amplificazione di DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed interpretazione dei risultati mediante l'apposito software.

### 13.3 Ricerca di citomegalovirus (CMV)

Il citomegalovirus (CMV) appartiene alla famiglia degli Herpesvirus che comprende i più noti herpes labiale e genitale e il virus della varicella. I soggetti che hanno già avuto l'infezione non sono immuni completamente, quindi possono contrarre una reinfezione. Infatti, l'infezione da CMV si distingue in primaria o ricorrente, che a sua volta è distinta in riattivazione (da ceppo virale già presente nel soggetto) e reinfezione (da ceppo virale diverso da quello che ha già infettato l'organismo).

Le vie di contagio principali sono la saliva, il sangue, le urine e i rapporti sessuali. In casi molto rari il virus si trasmette in modo indiretto, attraverso l'utilizzo di oggetti comuni, come un bicchiere, uno spazzolino da denti o, importante per i bambini, un giocattolo. L'infezione generalmente causa solo una leggera febbre o senso di stanchezza, che spesso vengono ignorati o attribuiti ad altre cause, come influenza o stress.

Tipo di campione: sangue periferico EDTA.

Metodica: amplificazione di DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed analisi dei prodotti amplificati mediante valutazione della curva di melting.

### 13.4 Ricerca di Gardnerella

La Gardnerella vaginalis è un piccolo batterio comunemente riscontrato nella flora batterica della vagina. Tale microrganismo si stanza nella flora microbica normale della vagina in circa il 30% delle donne sane. Di queste circa, la metà risulta convivere in maniera asintomatica con la presenza di questo batterio. G. vaginalis; è un potenziale patogeno che può causare gravi danni alla mucosa vaginale nel caso in cui venga stravolto il normale ambiente di acidità (fattore di sicurezza e di controllo verso potenziali patogeni) sostenuto dai lattobacilli, fisiologicamente presenti come flora normale. In tal caso, questi stessi batteri, che appunto mantengono il pH vaginale su un valore da 3,8 a 4,5, sono soppiantati da una rapida crescita di G. vaginalis.

Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa di Gardnerella. Tipo di campione: tampone vaginale, cervicale, uretrale eseguito ed identificato dal medico richiedente e liquido seminale.

Metodica: amplificazione di DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed interpretazione dei risultati mediante apposito software.

### 13.5 Ricerca di HBV

Il virus dell'epatite B (HBV) è un virus a DNA appartenente alla famiglia Hepadnaviridae che è endemico in tutto il mondo e rappresenta la principale causa delle patologie epatiche. L'HBV si trasmette mediante contatto diretto con il sangue o con altri fluidi corporei. Tra le vie di trasmissione più comuni vanno annoverate le seguenti: trasfusioni ematiche, punture di ago, contatto diretto con ferite aperte, rapporti sessuali e passaggio dalla madre al neonato al momento della nascita. L'infezione da HBV può determinare tipicamente epatite itterica, epatite anitterica subclinica, epatite fulminante o epatite cronica persistente.

Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa e quantitativa

di HBV.

Tipo di campione: sangue periferico in EDTA.

Metodica: amplificazione del DNA virale mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction).

### 13.6 Ricerca di HCV

L' HCV (il virus dell'epatite C) colpisce in primo luogo il fegato generando epatite virale. L'infezione è spesso asintomatica, ma la sua cronicizzazione può condurre all'cirrosizzazione del fegato e, infine, alla cirrosi, che risulta generalmente evidente dopo molti anni. In alcuni casi, la cirrosi epatica potrà portare a sviluppare insufficienza epatica, cancro del fegato, varici esofagee e gastriche. Il contagio dell'infezione da HCV avviene principalmente per via parenterale, cioè attraverso il sangue, e molto meno frequentemente per via sessuale. L'infezione dell' HCV si trasmette preferenzialmente per via orizzontale, da individuo a individuo, e in minor misura, con una frequenza del 3-5%, per via verticale-perinatale, cioè da madre a figlio.

Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa, quantitativa e la genotipizzazione dell' HCV.

Tipo di campione: sangue periferico in EDTA.

Metodica: ricerca diretta di RNA virale mediante Real Time RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) della regione 5'-UTR del genoma del virus correlato all'Epatite di tipo C.

### 13.7 Ricerca e genotipizzazione di Papilloma virus (HPV)

Il Virus Papilloma Umano (HPV) è un virus a DNA appartenente al gruppo dei Papillomavirus. Le infezioni da HPV sono estremamente diffuse e possono causare anche malattie della pelle e delle mucose. Solitamente l'infezione provocata da questo virus non causa nessuna alterazione e si risolve da sola. In una minoranza di casi invece provoca delle lesioni a livello del collo dell'utero. La maggior parte di esse guarisce spontaneamente ma alcune, se non curate, progrediscono lentamente verso forme tumorali. Il virus si contrae generalmente attraverso rapporti sessuali, ma non si possono escludere vie indirette dell'infezione come bocca e unghie.

Esistono molteplici genotipi HPV classificati in base al rischio oncogeno.

Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca e la genotipizzazione di 28 genotipi HPV:

- 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 (HPV alto rischio oncogeno);
- 26, 53, 66 (HPV a probabile rischio oncogeno);
- 11, 40, 43, 44, 54, 70 (HPV a basso rischio oncogeno);
- 42, 61, 69 ( HPV con ruolo da definire).

Tipo di campione: tampone vaginale, cervicale, uretrale eseguito ed identificato dal medico richiedente e liquido seminale.

Metodica: ricerca diretta mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction).

### 13.8 RICERCA DI HERPES SIMPLEX VIRUS (HSV 1-2)

L'Herpes Simplex Virus (HSV), virus a DNA appartenente alla famiglia Herpesviridae, è l'agente eziologico responsabile della dermatosi vescicolare. Esistono due differenti tipi virali: Tipo 1, responsabile dell'Herpes labialis, Tipo 2, responsabile dell'Herpes genitalis. L'infezione da HSV si può riflettere anche nella trasmissione neonatale, determinando malformazioni fetali.

Presso il Centro Polidiagnostico strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa del Virus Herpes Simplex 1 e 2.

Tipo di campione: sangue periferico in EDTA.

Metodica: amplificazione del DNA virale mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed interpretazione dei risultati mediante apposito software.

### 13.9 Ricerca di Mycoplasma Genitalium-Mycoplasma Hominis

Mycoplasma genitalium è un batterio parassita che colonizza il tessuto epiteliale ciliato urogenitale e

respiratorio. I micoplasmi presenti a livello genitale, non sempre hanno un ruolo patogeno. Sulle mucose genitali sane, è possibile riscontrare come abituale ospite della flora microbica (flora micoplasmica) il *Mycoplasma hominis* e meno frequentemente altri micoplasmi. Il *Mycoplasma hominis* è un micoplasma presente sulle mucose urogenitali di quasi tutti gli individui sessualmente attivi, come normale flora microbica. Anche in gravidanza, il micoplasma fa parte della normale flora microbica genitale e viene trasmesso al neonato al momento del parto, come flora microbica. In determinate condizioni, alcuni micoplasmi possono essere responsabili di uretrite e malattia infiammatoria pelvica. Nella donna, *Mycoplasma genitalium* si può talora associare a vaginosi batterica, mentre nell'uomo si può associare prevalentemente a uretriti non gonococciche. Anche il *Mycoplasma hominis* è un ospite abituale dell'apparato genitale umano e si comporta solitamente come commensale e non come patogeno, anche se in determinate condizioni, può causare uretrite non gonococcica o infiammazione pelvica.

Presso il Centro Poidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa dei batteri *Mycoplasma Genitalium* e *Mycoplasma Hominis*.

Tipo di campione: tampone vaginale, cervicale, uretrale eseguito ed identificato dal medico richiedente e liquido seminale.

Metodica: amplificazione di DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed interpretazione dei risultati mediante apposito software.

#### 13.10 Ricerca di *Neisseria Gonorrhoeae*

*Neisseria gonorrhoeae* è un batterio gonococco trasmesso sessualmente che causa nell'uomo, dopo un breve periodo di incubazione di 1 -7 giorni, un'uretrite acuta caratterizzata da un'abbondante secrezione muco-purulenta. Nelle donne l'infezione si manifesta a livello cervicale con sintomi meno evidenti. Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa del batterio *Neisseria Gonorrhoeae*.

Tipo di campione: tampone vaginale, cervicale, uretrale eseguito ed identificato dal medico richiedente e liquido seminale.

Metodica: amplificazione di DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed analisi dei prodotti amplificati mediante valutazione della curva di melting.

#### 13.11 Ricerca di *Toxoplasma Gondii*

Il *Toxoplasma Gondii* è un parassita che vive nei gatti e negli animali a sangue caldo che può causare nell'uomo una infezione nota come toxoplasmosi. L'infezione è latente e normalmente non presenta sintomi, ma spesso dà sintomi simili a quelli dell'influenza o della mononucleosi nelle sue prime fasi acute. Se l'infezione da *Toxoplasma Gondii* accade per la prima volta durante la gravidanza, il parassita può attraversare la placenta portando possibilmente all'idrocefalo, un accumulo di liquido cefalo rachidiano intercranico, dovuto a flogosi acuta, e alla corioretinite, con la possibilità di aborto spontaneo o di morte intrauterina o ritardo mentale. Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa del parassita *Toxoplasma Gondii*.

Tipo di campione: sangue periferico in EDTA.

Metodica: amplificazione di DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed analisi dei prodotti amplificati mediante valutazione della curva di melting.

#### 13.12 Ricerca di *Trichomonas Vaginalis*

*Trichomonas Vaginalis* è un parassita responsabile dell'omonima malattia trichomoniasi vaginale, un'infiammazione vaginale. Il *Trichomonas Vaginalis* si trasmette per via sessuale ed è molto più comune nelle donne che negli uomini che sono portatori asintomatici. Nei casi di trichomoniasi si verifica irritazione ed infiammazione dell'epitelio della vagina o dell'uretra, più raramente della prostata. Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa del parassita *Trichomonas Vaginalis*.

Tipo di campione: tampone vaginale, cervicale, uretrale eseguito ed identificato dal medico richie-

dente e liquido seminale.

Metodica: amplificazione di DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed interpretazione dei risultati mediante apposito software.

#### 13.13 Ricerca di Rubella virus

Il virus Rubella, virus ad RNA appartenente alla famiglia dei Togavirus è l'agente eziologico della Rosolia, una malattia esantematica che colpisce soprattutto in età pediatrica.

La viremia compare dopo circa sei giorni dal contagio per scomparire prima che si palesi l'esantema, il virus infatti viene eliminato attraverso il naso-faringe fino a 14 giorni dalla comparsa dell'esantema. Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa del Virus Rubella.

Tipo di campione: sangue periferico in EDTA.

Metodica: ricerca diretta di RNA virale mediante Real Time RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed analisi dei prodotti amplificati mediante valutazione della curva di melting.

#### 13.14 Ricerca di pseudomonas aeruginosa

*Pseudomonas aeruginosa* è un batterio opportunisto molto virulento ed ubiquitario; è presente infatti nel suolo, nell'acqua e negli ambienti ospedalieri. *Pseudomonas Aeruginosa* causa infezioni polmonari, delle vie urinarie, della pelle e dell' orecchio ed endocarditi.

Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa di *Pseudomonas Aeruginosa*.

Tipo di campione: tampone vaginale, cervicale, uretrale eseguito ed identificato dal medico richiedente e liquido seminale.

Metodica: amplificazione di DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed interpretazione dei risultati mediante apposito software.

#### 13.15 Ricerca di Ureaplasma parvum-ureaplasma urealyticum

*Ureaplasma* è un batterio appartenente alla famiglia delle *Mycoplasmataceae* che colonizza le mucose dell' apparato genitale. In questa sede l'*Ureaplasma* prolifera e metabolizza l'urea in ammoniaca, da cui il suo nome. Nell'uomo la proliferazione incontrollata di *Ureaplasma* provoca infiammazione dell' uretra, uretrite non gonococcica. Nella donna, un'incontrollata crescita di *ureoplasma* è causa dello sviluppo di vaginosi batterica, malattia infiammatoria pelvica e sindrome uretrale.

L'*ureaplasma* può essere trasmesso sia attraverso rapporti sessuali vaginali, anali o orali che per via materno-fetale (durante la gravidanza o al momento del parto).

Presso il Centro Polidiagnostico Strumentale Ames si effettua la ricerca qualitativa di *Ureaplasma Parvum* e di *Ureaplasma Urealyticum*.

Tipo di campione: tampone vaginale, cervicale, uretrale eseguito ed identificato dal medico richiedente e liquido seminale.

Metodica: amplificazione di DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed interpretazione dei risultati mediante apposito software.

#### 13.16 Ricerca di Virus Varicella - Zoster

Il Virus Varicella Zoster (VZV o Herpesvirus Umano 3) è un virus a DNA appartenente alla sottofamiglia degli *Alphaherpesvirinae* responsabile della Varicella, malattia esantematica altamente infettiva. Il virus viene rilasciato nelle secrezioni nasali e faringee nonché nelle vescicole cutanee, per cui il contagio può avvenire mediante le goccioline di saliva disperse nell'aria con tosse e starnuti.

Tipo di campione: sangue periferico in EDTA

Metodica: amplificazione del virale DNA mediante Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) ed interpretazione dei risultati mediante apposito software.



## 14 Genetica Forense

### 14.1 I principi

Ogni individuo presenta nel proprio DNA uno specifico codice che definisce la sua impronta genetica. Infatti, ad eccezione dei gemelli monozigoti, che risultano perfettamente uguali, il profilo genetico di ogni individuo è praticamente unico, come le impronte digitali. Questa caratteristica è alla base della metodologia utilizzata per determinare se due persone sono correlate geneticamente.

### 14.2 Test di paternità

Il test di paternità si basa sul principio che ogni individuo eredita il proprio patrimonio genetico dai genitori, il 50% dal padre ed il 50% dalla madre, e consiste nel confrontare le caratteristiche genetiche del figlio oggetto di indagine di paternità con quelle del presunto padre e della madre. Il padre presunto, per essere considerato padre biologico, dovrà possedere metà del profilo genetico presente nel figlio/a. La paternità viene ESCLUSA nel caso in cui le caratteristiche genetiche del padre putativo discordino con quelle del figlio oggetto di indagine. La paternità viene attribuita qualora le caratteristiche genetiche del padre e del figlio concordino. Il test di paternità si basa sul confronto tra i profili genetici del figlio e quello dei due genitori. Tale esame prevede lo studio di tre campioni contemporaneamente, appartenenti a madre, figlio e presunto padre. L'esame può essere eseguito anche in assenza della madre e il confronto verrà fatto tra figlio e presunto padre. Il test genetico prevede lo studio di almeno 15 loci più l'amelogenina per definire il profilo genetico dei soggetti in esame. L'analisi molecolare si basa sull'utilizzo di kit commerciali riconosciuti dalla comunità dei genetisti forensi a livello internazionale.

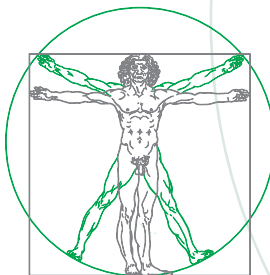
Il test viene effettuato:

su DNA estratto da tampone buccale, ma a seconda del caso può essere preso in considerazione DNA estratto da altri tessuti biologici (accordi con il laboratorio)

## 15 Test di parentela

Il test di parentela è una indagine simile al test di paternità volto a identificare differenti relazioni familiari. Viene richiesto per confermare la relazione biologica tra due o più persone e può essere applicato a diverse tipologie di parenti: per confermare se due o più persone sono fratelli o sorelle tra di loro, un'eventuale relazione biologica tra un individuo e i suoi presunti nonni, oppure può essere impiegato per valutare la probabilità che una persona sia lo zio o la zia di un altro individuo.





# AMES

Group

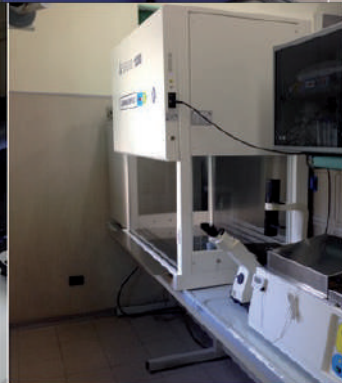
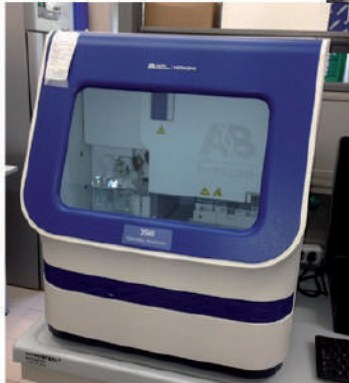
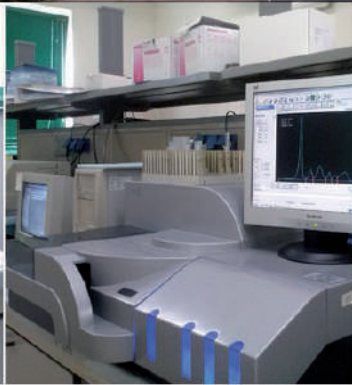
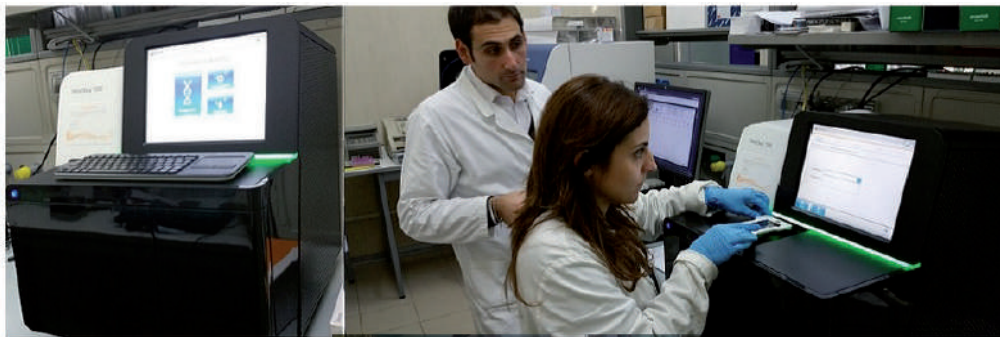
GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA

Centro Polidiagnostico Strumentale Srl  
Via Padre Carmine Fico, 24 - 80013 Casalnuovo di Napoli (Na)

Tel. e Fax: 081.5224316 - 8420923 - 5227785 - 5227636  
Numero Verde 800 586 368

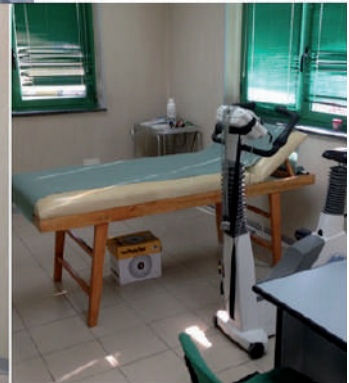
genetica@centroames.it | www.centroames.it





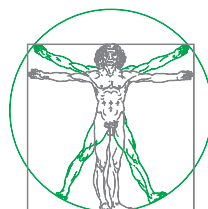
**CENTRO POLIDIAGNOSTICO  
STRUMENTALE SRL**

Via Padre Carmine Fico, 24  
80013 CASALNUOVO DI NAPOLI (NA)  
Tel. e Fax 081.5224316 - 8420923 - 5227785 - 5227636  
e-mail: [genetica@centroames.it](mailto:genetica@centroames.it)  
[marketing@centroames.it](mailto:marketing@centroames.it)  
web site: [www.centroames.it](http://www.centroames.it)  
P.I. 02982591212  
Reg. Imp. di Napoli 01730460639- N. R.E.A. 316414





“LA PREVENZIONE  
TI SALVA LA VITA”



**AMES**  
Group

GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA