AMES Group

GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA

SNP ARRAY

Negli ultimi anni, con l'avvento di nuove tecniche di citogenetica molecolare per l'analisi dei cromosomi, mediante microarray, il limite di risoluzione di 5Mb imposto dalla citogenetica convenzionale, è stato notevolmente abbassato.

L'analisi molecolare dei cromosomi consente di identificare anche patologie derivanti da alterazioni cromosomiche submicroscopiche, non evidenziabili con il cariotipo tradizionale, aumentando sensibilmente l'accuratezza dell'esame.

Per anni, la tecnologia di microarray più utilizzata è stata il CGH-array che mediante l'uso di specifiche sonde, permette di rilevare anche variazioni del numero di copie (CNV) di poche kb.

Di recente introduzione sono gli SNP-array, chip contenenti sonde specifiche per polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) distribuiti uniformemente lungo tutto il genoma.

Gli SNP-array, a differenza del classico CGH-array, consentono oltre al rilevamento di CNV, anche di determinare il genotipo corrispondente al singolo SNP e dall'analisi della distribuzione della frequenza allelica di tutti gli SNP del soggetto in esame è possibile valutare la presenza di eventuali disomie uniparentali (UDP), perdite di eterozigosità (LOH, loss of heterozigosity) di determinate regioni cromosomiche e di rilevare l'identità genetica dei discendenti (consanguineità dei genitori) utile nella valutazione di malattie autosomiche recessive.

Con il termine disomia uniparentale (UPD) si definisce l'ereditarietà di due cromosomi omologhi da un solo genitore; è causata principalmente da eventi di non-disgiunzione, seguiti da meccanismi di correzione di trisomie o monosomie.

Inoltre, anomalie strutturali, come le traslocazioni Robertsoniane e cromosomi marcatori soprannumerari, sembrano essere associate ad un rischio aumentato di UPD.

Le disomie uniparentali o la perdità di eterozigosità sono causa di diversi tipi di patologie genetiche sia costituzionali che acquisite.

Per la maggior parte dei geni, l'espressione di un allele non dipende dal fatto che l'allele sia stato ereditato dalla madre o dal padre.

Tuttavia in alcuni casi l'espressione di un allele dipende dalla sua origine parentale:

per alcuni geni viene espresso l'allele materno per altri quello paterno. A questo fenomeno si dà il nome di imprinting genomico.

Si de nisce "imprinted" la copia del gene che non viene espressa.

La presenza di UDP in regioni cromosomiche soggette ad imprinting genomico può portare all'espressione di fenotipi patologici.

In letteratura sono riportati casi di UPD per molti cromosomi.

Nella tabella seguente sono riportati cinque cromosomi per i quali è stato dimostrato un chiaro ruolo patogenetico, ed altri cromosomi per i quali non è ancora chiaro se esistano effetti legati a fenomeni di imprinting (Ledbetter Engel, 1995; Engel, 1998; Shaffer et al., 2001).

AMES Group Centro Polidiagnostico Strumentale
GENETICA MEDICA - MICROBIOLOGIA - PATOLOGIA CLINICA

Via Padre Carmine Fico, n. 24 | Cap. 80013 Casalnuovo di Napoli (NA)
Tel. e Fax 081 5224316 pbx - 081 8420923 - 081 5227785 - 081 5227636
genetica@centroames.it - marketing@centroames.it

Table1: Tipi di UPD e sindromi associate

	Tipo di UPD	Sindrome
Sicure	6 Paterno	Diabete neonatale (transiente)
	7 Materno	Silver-Russel
	11 Paterno	Wiedemann-Beckwith
	14 Materno	Mancanza di crescita, pubertà precoce
	14 Paterno	Nanismo, ipoplasia della gabbia toracica
	15 Materno	Prader-Willi
	15 Paterno	Angelman
Probabili	2 Materno	Ritardo di crescita, displasia broncopolmonare
	16 Materno	Febbre Familiare Mediterranea
	20 Materno/Paterno	Mancanza di crescita, iperattività

Gli SNP-array costituiscono attualmente il metodo più avanzato di analisi citogenetica, infatti permette la contemporanea determinazione del copy number variation con una risoluzione media di circa 65 Kb, e la rilevazione di eventuali tratti continui di omozigosità (LCSH) indicativi di disomie uniparenteli e/o consanguinità dei genitori.

La molteplicità di informazioni deriva dalla possibilità di interpretare il dato delle sonde SNP sia a livello qualitativo (genotyping) che quantitativo (numero di copie di DNA).

Inoltre, valutando la presenza di un numero anomalo di alleli per differenti SNP, gli SNP-array consentono anche il rilevamento di poliploidie, chimerismi e mosaicismi.

AMES Group Centro Polidiagnostico Strumentale
GENETICA MEDICA - MICROBIOLOGIA - PATOLOGIA CLINICA
Via Padre Carmine Fico, n. 24 | Cap. 80013 Casalnuovo di Napoli (NA)
Tel. e Fax 081 5224316 pbx - 081 8420923 - 081 5227785 - 081 5227636
genetica@centroames.it - marketing@centroames.it

LA TECNICA SNP-ARRAY ILLUMINA

Presso il Centro Ames viene utilizzato il chip illumina **HumanCytoSNP-12 BeadChip, Illumina**, con tecnologia BeadArray.

La tecnologia BeadArray si basa sull'utilizzo di biglie in silico di circa 3 micron assemblate in pozzetti su di un substrato solido (il vetrino) con una spaziatura uniforme di ~ 5,7 micron.

Ogni biglia è ricoperta da centinaia di migliaia di copie di uno stesso oligonucleotide specifico per lo SNP di interesse; tale oligonucleotide rappresenta la sequenze letta dal sistema di scannerizzazione Illumina.

L'uso delle BeadArray permette di ottenere un array ad alta densità che rappresenta un vantaggio per numerose applicazioni, in particolare permette di aumentare la copertura genomica in analisi di whole-genome genotyping, oltre ad aumentare la risoluzione delle normali analisi di citogenetica e di rilevazione delle CNV.

La capacità risolutiva degli array da noi utilizzati **(HumanCytoSNP-12 BeadChip, Illumina)** permette di rilevare le anomalie cromosomiche determinanti le sindromi più frequenti, mediante l'analisi ~300.000 SNP in ~250 regioni malattia, comprese le regioni subtelomeriche, pericentromeriche, e i cromosomi sessuali attraverso lo studio di oltre 800 geni.

Il chip HumanCytoSNP-12 BeadChips (Illumina) è periodicamente sottoposto a rigorosi test funzionali per garantirne prestazioni forti e riproducibili.

Per l'appunto, i risultati di HumanCytoSNP-12 BeadChip (Illumina) mostrano una forte riproducibilità (> 99,9%) e concordanza con il progetto HapMap International (> 99,2%).

Table2: CytoSNP-12 v2.1 BeadChip Comprehensive Coverage

Feature	Description
Overview	
No. Markers per Sample	299,140
No. Samples per BeadChip	12
DNA Input (per sample)	200 ng
Scan Time per Sample [a]	3min
Minor Allele Frequency [b]	
CEU / CHB + JPT / YRI (Median)	0.21 / 0.19 / 0.19
Spacing (kb)	
Mean / Median	9.7 / 6.2
90th %ile Largest Gap	18.7
Resolution (targeted / overall)	**~ 62 kb / ~ 72 kb**
Marker Categories	
Marker Within 10 kb of aRefSeq Gene	148,967
Non-Synonymous SNPs[c]	2420
MHC [d] / ADME [e] / Indel SNPs	760 / 2388 / 0
Sex Chromosome (X / Y / PAR Loci)	15,400 /2972 /770
Mitochondrial SNPs	0

a. Scan times are approximations based on the iScan System

b. Based on HapMap ref 24

c. Based on RefSeq and Ensembl databases

d. Based on de Bakker PI, McVean G, Sabeti PC, et al. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. Nat Genet. 2006;38(10):1166-72

e. Within 10 kb of 333 known ADME-related genes

AMES Group Centro Polidiagnostico Strumentale
GENETICA MEDICA - MICROBIOLOGIA - PATOLOGIA CLINICA
Via Padre Carmine Fico, n. 24 | Cap. 80013 Casalnuovo di Napoli (NA)
Tel. e Fax 081 5224316 pbx - 081 8420923 - 081 5227785 - 081 5227636
genetica@centroames.it - marketing@centroames.it

MODALITÀ DI ESECUZIONE

• L'indagine può essere eseguita sul DNA estratto da:

- *direttamente dalle cellule fetali non coltivate ottenute da villocentesi ed amniocentesi*
- *da cellule fetali poste in coltura ottenute da villocentesi ed amniocentesi*
- *da sangue periferico.*

• L'esecuzione del test prevede le seguenti fasi:

• **Estrazione del DNA:** da sangue periferico in EDTA o cellule fetali

• **Tecnica di studio/analisi:** Il DNA estratto è sottoposto ad analisi di array su vetrino HumanCyto SNP-12 BeadChip (Illumina) e piattaforma NextSeq 550 System.
I dati ottenuti vengono analizzati mediante sofware specifici: GenomeStudio Software (per le analisi di genotyping) e BlueFuse Multi (per l'analisi di CNV e UDP)

INDICAZIONI

Le principali indicazioni per l'impiego dello SNP-array in diagnosi prenatale sono le seguenti:

• Difetti dello sviluppo fetale evidenziati tramite ecografia; riconducibili ad una patologia cromoso mica, anche se il cariotipo tradizionale è risultato normale;

• Feto con anomalie cromosomiche (riarrangiamenti sbilanciati, riarrangiamenti apparentemente bilanciati de novo e la presenza di marker cromosomi) individuate attraverso l'analisi citogenetica classica;

• Aborti spontanei e terapeutici

In caso di diagnosi postnatale, il test può essere eseguito in pazienti con fenotipi complessi associati a ritardo mentale di grado variabile (autismo, epilessia ed ecc.) e in tutti gli individui con anomalie congenite.

VANTAGGI

L'analisi SNP-array consente di analizzare l'intero genoma in un unico test e con un'alta risoluzione, consentendo quindi l'identificazione di variazioni del numero di copie di piccole dimensioni, anche di poche centinaia di paia di basi, e la conseguente scoperta di nuove sindromi da microdelezione e microduplicazione.
Inoltre, il cariotipo molecolare permette di definire esattamente la regione genomica alterata e i geni in essa contenuti, migliorando la comprensione delle relazioni esistenti tra le anomalie del DNA e la patologia del paziente esaminato.

L'analisi SNP-array, permettendo lo studio di UDP, garantisce un notevole incremento della possibilità di formulare una diagnosi certa.
Trattandosi di una metodica molecolare di analisi del DNA non è soggetta al rischio della mancata crescita della coltura cellulare e, di conseguenza, di ripetizione del prelievo, garantendo un risultato in quasi il 100% dei casi.

LIMITI

Lo SNP-array non individua alterazioni cromosomiche bilanciate, che non hanno però significato clinico patologico, né i mosaici la cui percentuale della linea minoritaria sia inferiore all'8-10% delle cellule totali, la cui frequenza è estremamente rara e di difficile riscontro anche con l'esame citogenetico.

BIBLIOGRAFIA

- Srebniak MI, Boter M, Oudesluijs GO, et al. Genomic SNP array as a gold standard for prenatal diagnosis of foetal ultrasound abnormalities. Mol Cytogenet. 2012;5(1):14. doi: 10.1186/1755-8166-5-14.

- Bejjani BA, Sha er LG. Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. Annu Rev Genomics Hum Genet . 2008;9:71-86.

AMES Group
800 586 368

AMES Group Centro Polidiagnostico Strumentale
GENETICA MEDICA - MICROBIOLOGIA - PATOLOGIA CLINICA
Via Padre Carmine Fico, n. 24 | Cap. 80013 Casalnuovo di Napoli (NA)
Tel. e Fax 081 5224316 pbx - 081 8420923 - 081 5227785 - 081 5227636
genetica@centroames.it - marketing@centroames.it

AMES Group

GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA

www.centroames.it

Illumina
Propel Certified ™

2018-19
NextSeq ®

ORGANIZZAZIONE
CON SISTEMA DI
GESTIONE PER LA
QUALITÀ
CERTIFICATO

CSQ
ISO 9001

IQNet

Certified Partner
Società Italiana di Genetica Umana
Certificato
SIGUCERT