

**Istituto Virtuale Nazionale  
Malattie Neurologiche Rare**

**Documento condiviso Progetto 2021 - WP5, Task 3 –**

**Guida Refertazione analisi molecolari mediante NGS  
Disabilità Intellettive**

## Raccomandazioni per la compilazione del referto

Il gruppo di lavoro, costituito da rappresentanti dei laboratori di genetica molecolare che si occupano di diagnosi genetica delle disabilità intellettive (ID), nell'ambito degli IRCCS afferenti all'Istituto Virtuale Malattie Rare (IVMR), ha discusso le modalità di refertazione dell'analisi mediante NGS (Whole Exome Sequencing: WES e Targeted Resequencing: TRS) di geni associati a disabilità intellettive (ID). Il gruppo di lavoro ha elaborato le seguenti raccomandazioni per l'identificazione e la classificazione delle varianti a singolo nucleotide (SNV) e loro refertazione, tenendo conto delle linee guida dell'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), dell'Association for Clinical Genomic Science (ACGS) delle indicazioni per la refertazione di analisi genetiche redatte dal GdL SIGU. Le raccomandazioni sono state tuttavia discusse dal gruppo di lavoro, considerando le specificità dell'applicazione del test alle disabilità intellettive, stabilendo quanto segue.

### 1. Minimal gene sets

I pannelli utilizzati al momento sono diversi da laboratorio a laboratorio. Al fine di armonizzare le analisi e rendere i risultati confrontabili, il gruppo di lavoro propone di utilizzare quale minimal gene set quello costituito dai geni green del dataset 'intellectual disability' di PanelApp (<https://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/285/>).

### 2. Informazioni necessarie al laboratorio per procedere a test NGS

- Anamnesi familiare (per es. se e quanti altri affetti, grado di parentela)
- Quadro clinico del paziente per il quale viene richiesta l'analisi
- Test clinici o strumentali, specifici per la patologia, i cui risultati siano utili all'interpretazione del risultato del test NGS.

Per meglio rispondere alla mission della rete RIN, **si prevede di sviluppare una scheda di raccolta dati condivisa da tutti i centri afferenti alla rete, al fine di istituire un database unico che contenga dati clinici e genomici ben strutturati e confrontabili.** Tale database sarà riversato su piattaforma REDCap non appena la stessa sarà resa disponibile da altri gruppi di lavoro. **Sarebbe inoltre opportuno ricevere contestualmente al prelievo del probando, il prelievo dei genitori, per poter procedere all'analisi di segregazione delle varianti, dirimente in taluni casi nell'interpretazione del dato analitico.**

### 3. Campi obbligatori del referto

- Anagrafica del paziente e tracciabilità del campione
- Indicazione clinica al test
- Tipo di campione biologico (Sangue periferico, DNA, etc)
- Medico e centro inviante
- Data del referto
- Geni esaminati: elenco geni virtuali (WES), elenco geni pannello (TRS)
- Coverage medio e coverage 20X

- Metodo analitico utilizzato: kit estrazione di DNA, kit di arricchimento, sequenziatore utilizzato, pipeline bioinformatica di allineamento e chiamata delle varianti, prioritizzazione delle varianti, genoma di riferimento
- Limiti tecnici del test: impossibilità di identificare Copy Number Variations (CNV), riarrangiamenti strutturali, etc
- Specificità e Sensibilità analitica

#### 4. Interpretazione delle varianti e refertazione

Le SNV vengono interpretate secondo le linee guida stabilite dall'ACMG in 5 classi cliniche: benigne [B], probabilmente benigne [LB], varianti a significato clinico incerto [VUS], probabilmente patogenetiche [LP] e patogenetiche [P]. Per facilitare l'assegnazione alla classe clinica di appartenenza, si raccomanda l'utilizzo di un sistema quantitativo attraverso un sistema a punti quale quello proposto da ACMG e ACGS (Tavtigian et al, 2018; Tavtigian et al, 2020).

Il gruppo di lavoro raccomanda di riportare nel referto le sole varianti P ed LP e di riportare le VUS per le quali una eventuale successiva rivalutazione (es. studio di segregazione, presenza della variante in altri familiari affetti, rivalutazione clinica del probando, etc) porterebbe con maggiore probabilità a un significato "patogenetico o probabilmente patogenetico".

Per le varianti da riportare nel referto è opportuno indicare:

- Gene, trascritto canonico (NM o ENST), OMIM, modalità di trasmissione e penetranza;
- Nomenclatura HGVS (annotazione a livello di cDNA e proteina), zigosità ed ereditarietà ove possibile;
- classificazione (P, LP e VUS\*); in caso di refertazione di VUS andrebbe specificato che comunque non sono state identificate varianti causative il fenotipo clinico. Va valutato se riportare in referto i criteri ACMG assegnati alla variante (dettagliare i criteri attribuiti e loro forza) o se semplicemente conservarli in formato elettronico o in forma scritta nel fascicolo del paziente.
- Referenze bibliografiche utilizzate

Queste varianti devono essere validate mediante sequenziamento Sanger e il commento al referto deve illustrare il nesso causale tra la variante identificata ed il fenotipo.

Per le singole varianti identificate in eterozigosi in geni recessivi è opportuno specificare la necessità di un approfondimento diagnostico con altra metodica.

Relativamente alla possibile riclassificazione nel tempo di tali varianti, nell'impossibilità realistica di garantire una revisione con cadenza regolare, si propone una revisione delle varianti in seguito a richiesta del clinico, qualora vi sia un aggiornamento del quadro clinico del paziente, oppure quando la stessa variante venga identificata più volte nel laboratorio.

#### 5. Refertazione di incidental findings/secondary findings

Il gruppo di lavoro consiglia di seguire le raccomandazioni contenute nelle linee guida dell'ACMG (Miller et al. 2022).

## 6. Validazione funzionale delle varianti

In alcuni casi (es. varianti predette come alteranti lo splicing ecc.), è opportuno riportare nel referto che la variante riportata o il suo impatto funzionale devono essere confermati o validati con metodiche alternative (es. studio dell'RNA). Se tale indagine non è disponibile presso il laboratorio stesso, il laboratorio potrà contattare gli altri centri partecipanti al gruppo di lavoro per indirizzare il paziente per la prosecuzione delle indagini.

## 7. Consulenza genetica

Il gruppo di lavoro consiglia di includere l'indicazione alla consulenza genetica in tutti i referti. E' inoltre opportuno sottolineare che un eventuale esito negativo dell'analisi molecolare tramite pannelli di geni non esclude che il quadro clinico presentato dal paziente abbia comunque una causa genetica.

## 8. Proposte di lavoro

Il gruppo di lavoro propone di affinare la scelta del minimal gene sets quando sarà definita una scheda di raccolta dati standard informatizzata. Le informazioni cliniche strutturate potrebbero permettere una selezione dei geni da analizzare personalizzata sul fenotipo del paziente (ad es geni associati a termini HPO).

Inoltre, si propone di elaborare una informativa condivisa che illustri le potenzialità, i limiti e le eventuali criticità di gestione dei risultati NGS.

## 9. Riferimenti

SIGU. INDICAZIONI PER LA REFERTAZIONE DI ANALISI GENETICHE ESEGUITE MEDIANTE METODICA NEXT-GENERATIONSEQUENCING (NGS). 2022

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. **Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.** Genet Med. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.

Miller DT, Lee K, Abul-Husn NS, Amendola LM, Brothers K, Chung WK, Gollob MH, Gordon AS, Harrison SM, Hershberger RE, Klein TE, Richards CS, Stewart DR, Martin CL; ACMG Secondary Findings Working Group. Electronic address: documents@acmg.net. **ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG).** Genet Med. 2022 Jul;24(7):1407-1414. doi: 10.1016/j.gim.2022.04.006. Epub 2022 Jun 17. PMID: 35802134.

Tavtigian SV, Greenblatt MS, Harrison SM, Nussbaum RL, Prabhu SA, Boucher KM, Biesecker LG; ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group (ClinGen SVI). **Modeling the ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework.** Genet Med. 2018 Sep;20(9):1054-1060. doi: 10.1038/gim.2017.210. Epub 2018 Jan 4. PMID: 29300386; PMCID: PMC6336098.

Tavtigian SV, Harrison SM, Boucher KM, Biesecker LG. **Fitting a naturally scaled point system to the ACMG/AMP variant classification guidelines.** Hum Mutat. 2020 Oct;41(10):1734-1737. doi: 10.1002/humu.24088. Epub 2020 Aug 30. PMID: 32720330; PMCID: PMC8011844.

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

[https://sigu.net/wp-content/uploads/2022/08/2022\\_08\\_07\\_Referto\\_ngs-1.pdf](https://sigu.net/wp-content/uploads/2022/08/2022_08_07_Referto_ngs-1.pdf)

ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease 2020 Sian Ellard, Emma L Baple, Alison Callaway, Ian Berry, Natalie Forrester, Clare Turnbull, Martina Owens, Diana M Eccles, Stephen Abbs, Richard Scott, Zandra C Deans, Tracy Lester, Jo Campbell, William G Newman, Simon Ramsden and Dominic J McMullan.

<https://www.acgs.uk.com/media/11631/uk->