

**Istituto Virtuale Nazionale
Malattie Neurologiche Rare**

Documento condiviso Progetto 2021 - WP5, Task 3 –

**Raccomandazioni per la compilazione del referto analisi pannelli
Leucodistrofie**

Raccomandazioni per la compilazione del referto per la diagnosi genetica di leucodistrofie

Il gruppo di lavoro ha discusso le modalità di refertazione di pannelli NGS (a fine diagnostico) di geni associati a forme di Leucodistrofia e si è concordato che sono valide le considerazioni fatte per quella relativa a Neuropatie e Atassie/HSP

1. Minimal gene sets

I pannelli utilizzati possono essere diversi da laboratorio a laboratorio ed è stato deciso che non possono essere identificati dei “minimal gene sets”.

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.

3. Campi obbligatori del referto

- Anagrafica del paziente e tracciabilità del campione
- Data del referto
- Medico/Struttura richiedente
- Quesito diagnostico
- Metodica NGS utilizzata, elenco dei geni analizzati, software di analisi utilizzato, limiti della metodologia.
- E’ auspicabile che la copertura >20x di tutti i geni inclusi nel pannello sia almeno pari o superiore al 95%. Il referto deve comunque riportare l’elenco di tutti i geni analizzati e relative coperture, oppure in alternativa (in caso di coperture molto uniformi) si può includere una frase per indicare che la copertura >20x di tutti i geni analizzati è pari o superiore al 95%.

4. Refertazione e interpretazione delle varianti

In base alle linee guida internazionali (ACMG, ACMG Technical Standard, ACGS Best Practice) il gruppo di lavoro raccomanda di indicare che nel referto non vengano riportati i polimorfismi presenti nei principali database di riferimento con una frequenza superiore all’1% nella popolazione (privi di significato patologico), le varianti benigne o probabilmente benigne e le varianti VUS in eterozigosi associate a patologia con trasmissione autosomica recessiva (il cui elenco può essere disponibile su richiesta). Il gruppo di lavoro raccomanda inoltre di non riportare le varianti classificate come VUS per le quali una eventuale successiva rivalutazione porterebbe con maggiore probabilità a un significato “benigno”.

Il gruppo di lavoro raccomanda di refertare le varianti NGS in due sezioni distinte:

Sezione 1 – varianti causative o verosimilmente causative del fenotipo per cui è stato richiesto il test

Questa sezione riporta la variante o le varianti che verosimilmente sono causative del fenotipo per cui è stato richiesto il test genetico.

Per queste varianti è opportuno indicare:

- gene e relativo NM
- zigosità
- frequenza nella popolazione
- OMIM number
- annotazione a livello di cDNA e proteina (ove possibile)
- classificazione ACMG (patogenetica, verosimilmente patogenetica) *
- modalità di trasmissione
- voce bibliografica relativa alla/alle variante/varianti identificata/e
- eventuale segregazione (ove necessario/utile a completamento dell'analisi)

*Nel caso che una variante di significato patogenetico/verosimilmente patogenetico venga identificata in un familiare riferito come sano si indica una rivalutazione clinica del nucleo familiare

*classificazione ACMG (patogenetica, verosimilmente patogenetica) e percorso che porta a tale classificazione. A seconda del laboratorio tale dato viene inserito nel referto o incluso in una scheda conservata nel laboratorio che ha eseguito l'analisi.

**in caso di identificazione di due varianti distinte in un gene recessivo, e in mancanza di DNA da membri familiari per lo studio di segregazione, il commento al referto deve riportare la necessità di estendere l'analisi ai familiari disponibili per definire la fase delle varianti identificate.

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.

Sezione 2 – Variant of unknown significance (VUS) nei geni compresi nel pannello

Questa categoria comprende:

1. le varianti classificate come VUS con criteri predittivi “positivi”, ma che non raggiungono “la soglia” ACMG di “verosimile patogenicità”, per le quali sia possibile effettuare ulteriori indagini (analisi segregazione genitori/famigliari, studi funzionali e/o biochimici). Si è concordato che nel referto non venga data indicazione allo studio funzionale e/o biochimico da effettuare. Si raccomanda di indicare quali azioni devono essere intraprese per poter riclassificare la variante come probabilmente patogenetica/patogenetica.
2. le varianti classificate come VUS con criteri predittivi “ampiamente positivi”, ma che non raggiungono “la soglia” ACMG di “verosimile patogenicità” e per le quali NON sia possibile effettuare ulteriori indagini.

Per tali varianti, l’interpretazione rimane più incerta e si può eventualmente aggiungere: *“La variante identificata non è stata precedentemente descritta in pazienti con leucodistrofia né in soggetti sani. Secondo le linee guida ACMG la variante è classificata come variante di significato incerto. Alla luce delle conoscenze attuali non è possibile attribuire alla variante identificata un chiaro ruolo patogenetico, né escludere un suo coinvolgimento nella patogenesi della malattia. Questa variante può essere suscettibile di rivalutazione nel tempo a seguito di nuove evidenze scientifiche oppure ad una rivalutazione clinica del paziente”*.

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 dal laboratorio.

Le singole varianti identificate in eterozigosi in geni recessivi classificate come patogenetiche o verosimilmente patogenetiche secondo i criteri ACMG. Per tali varianti, se non già effettuato o in corso, è opportuno indicare la necessità di un approfondimento diagnostico con altra metodica (es CGH, MLPA, real-time PCR su DNA genomico, analisi cDNA). 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.

5. Validazione delle varianti

In alcuni casi (geni codificanti per enzimi di cui sia possibile il dosaggio biochimico o per forme per le quali esistano marcatori biochimici) è opportuno riportare nel referto che la variante riportata o il suo impatto funzionale possono essere confermati o validati con l’analisi biochimica specifica (es. dosaggio ARSA, GALC, VLFCA).

5. Consulenza genetica

Il gruppo di lavoro consiglia di includere in tutti i referti in cui vengono riportate varianti incluse nella Sezione 1 e nella Sezione 2 l’indicazione alla consulenza genetica.

E’ inoltre opportuno sottolineare nel testo del referto 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.