



**Istituto Virtuale Nazionale
Malattie Neurologiche Rare**

Documento condiviso Progetto 2021 - WP5, Task 3 –

**Raccomandazioni per la compilazione del referto analisi pannelli
neuropatie ereditarie**

Raccomandazioni per la compilazione del referto

Il gruppo di lavoro ha discusso le modalità di refertazione, nei laboratori di genetica molecolare dell'Istituto Virtuale Malattie Rare, di pannelli NGS (a fine diagnostico) di geni associati a neuropatie ereditarie del sistema nervoso periferico e ha elaborato le seguenti raccomandazioni, tenendo conto sia della letteratura internazionale (ACMG, ACMG Technical Standard, ACGS Best Practice), sia del punto di vista dei partecipanti alla riunione, incluso il documento SIGU.

1. Minimal gene sets

I pannelli utilizzati possono essere diversi da laboratorio a laboratorio. E' stato deciso che non possono essere identificati "minimal gene sets" in quanto tutti i geni descritti in associazione a neuropatie ereditarie dovrebbero essere analizzati nei pazienti con questo specifico sospetto diagnostico.

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

- Patologia per cui è richiesta l'analisi (CMT, HNPP, dHMN, HSAN)
- Anagrafica del paziente e tracciabilità del campione
- Data del referto
- Inviante e indicazione clinica al test; quesito diagnostico (diagnostico, presintomatico, di portatore, prenatale, ...)
- Test eseguito: elenco dei geni analizzati (pannello di geni o pannello in silico) e relative coperture*, metodiche utilizzate, inclusa l'analisi dei dati (pipeline, db di riferimento e software usati, limiti, studio delle regioni non coperte, conferma di varianti patogenetiche).

* È auspicabile che il 95% di ogni gene incluso nel pannello sia coperto da almeno 20 letture. È inoltre opportuno indicare il coverage medio del pannello. Si può sottolineare se le regioni con copertura $\leq 20X$ sono state coperte in Sanger.

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 vengono 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 in eterozigosi, a significato sconosciuto, 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 trascritto (NM o ENST) o LGR; OMIM
- genotipo identificato per i geni patologia-correlati (gene, zigosità, frequenza nella popolazione, HGVS, annotazione a livello di cDNA e proteina, ove possibile)
- 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
- voce bibliografica relativa alla/alle variante/varianti identificata/e
- interpretazione della variante nel contesto della patologia (e della sua modalità di trasmissione) per la quale è stata richiesta l'analisi (non solo elenco)
- eventuale segregazione (ove necessario/utile a completamento dell'analisi)

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). È opportuno 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 neuropatia ereditaria 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”.*

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.

- 3) 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 MLPA).

5. Validazione funzionale delle varianti

In alcuni casi (es. CNVs identificate dai dati NGS, 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. MLPA se disponibile, real-time PCR su DNA genomico, 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.

6. 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. Ad esempio, nel referto si può aggiungere la seguente frase:

“Si raccomanda consulenza genetica. In particolare, per una corretta interpretazione, il risultato riportato nel presente referto deve essere discusso con il genetista medico e con il neurologo esperto di patologie del sistema nervoso periferico”

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.