



INFORMATIVA SUL TEST WES – SEQUENZIAMENTO INTERO ESOMA

Il sequenziamento dell'intero esoma (WES) è un test genetico eseguito con una tecnologia che consente l'analisi simultanea di un elevato numero di geni. Il nostro materiale genetico, racchiuso nel nucleo delle cellule del nostro organismo, è costituito da circa 20.000 geni codificanti proteine, impacchettati in strutture chiamate cromosomi. Ciascuna cellula contiene 46 cromosomi, organizzati in 23 coppie, ciascuna costituita da un cromosoma di origine paterna e uno di origine materna. Una malattia genetica si può verificare se uno o più geni non funzionano correttamente. L'identificazione dell'alterazione genetica alla base di una malattia è importante per aumentare le conoscenze relative alle patologie genetiche, per la gestione terapeutica del paziente e per chiarire gli eventuali rischi di ricorrenza nella famiglia. L'anomalia genetica può insorgere per la prima volta in un membro della famiglia (variante *de novo*) o essere stata ereditata da uno e da entrambi i genitori. Il sequenziamento dell'intero esoma (*Whole Exome Sequencing*, WES) si attesta come una delle metodiche di *Next-Generation Sequencing* (NGS) più avanzate e risolutive in ambito genetico. Attraverso il WES vengono sequenziati i geni codificanti proteine (regioni esoniche) con un unico test, permettendo l'individuazione della maggior parte delle alterazioni molecolari responsabili di un ampio spettro di disordini genetici. Infatti, le regioni esoniche, pur costituendo solo l'1% circa dell'intero genoma umano, contengono l'85% delle varianti patogenetiche responsabili di malattia. Il WES può essere eseguito limitatamente al campione del paziente (WES Singolo) oppure sul campione del paziente e dei genitori biologici e/o altri membri della famiglia (WES Familiare). Il sequenziamento dell'esoma è maggiormente indicato: quando in famiglia è presente una patologia verosimilmente di origine genetica, per cui le tecniche tradizionali di indagine non hanno identificato la causa genetica; in soggetti con fenotipi complessi con multiple diagnosi differenziali; in caso di malattie geneticamente eterogenee; in caso di disturbi genetici per i quali non è disponibile un test genetico specifico; se precedenti test genetici non sono risultati conclusivi.

PROCEDURA E CARATTERISTICHE DEL TEST

Il WES consiste nel sequenziamento dell'intera sequenza codificante e relative giunzioni esone/introne (± 20 basi nucleotidiche) dei geni nucleari codificanti proteine. Il test offre inoltre copertura completa delle varianti non codificanti rilevanti nel database ClinVar. La ricerca di alterazioni causative viene effettuata selezionando, sulla base delle caratteristiche cliniche riferite per il paziente, i geni con rilevanza clinica nota per la patologia in analisi al momento dell'esecuzione del test. La selezione dei geni da analizzare sulla base del fenotipo del paziente avviene mediante l'utilizzo di database quali PanelAPP, Human Phenotype Ontology (HPO), OMIM e Gene2Phenotype (G2P).

Il sequenziamento dell'esoma primariamente identifica varianti a singolo nucleotide e piccole inserzioni/delezioni (INDELs) all'interno delle regioni target. L'analisi inoltre include uno *screening* delle Variazioni del Numero di Copie (CNV) in geni associati al fenotipo del paziente.

Tale indagine consiste nell'applicazione di un algoritmo di chiamata delle CNV che rappresenta un primo livello di controllo in grado di segnalare la presenza di probabili delezioni/duplicazioni di potenziale interesse clinico. È fondamentale sottolineare che il test di sequenziamento dell'esoma non è il test diagnostico d'elezione per l'identificazione di grosse delezioni e/o duplicazioni e non è in grado di sostituire metodiche specifiche ad alta risoluzione, come l'Array-CGH o l'MLPA. Pertanto, ogni CNV individuata è da considerarsi un dato presunto che, per poter essere definito un risultato diagnostico, richiede una conferma obbligatoria tramite metodica ortogonale validata (ad esempio, Array-CGH, MLPA, Real-Time PCR, Sanger). Il laboratorio non esegue la validazione delle CNV individuate mediante *screening*, salvo diversamente indicato. Si sottolinea che l'assenza di CNV rilevate allo *screening* non esclude in modo definitivo la presenza di una CNV di significato clinico.

L'analisi è condotta con tecnologia NGS, con valori di sensibilità e precisione > 99% nell'identificazione delle varianti a singolo nucleotide (SNV) e con valori di sensibilità > 99% e precisione > 95% (coverage >15X), nel rilevare INDELs. La sensibilità nella chiamata delle CNV (nel range di 50 bp-1,6 Mb) è pari al 98%, con un tasso di falsi positivi pari all'1,38%.

L'analisi potrebbe essere eseguita in service presso laboratori esterni, qualificati e certificati, sulla base delle esigenze del laboratorio.

POSSIBILI RISULTATI DEL TEST

- Identificazione di varianti patogenetiche/probabilmente patogenetiche: presenza di una o più varianti di significato clinico in geni associati all'indicazione all'indagine.
- Identificazione di varianti di significato incerto (VUS): presenza di una o più varianti in geni associati al fenotipo in esame, per le quali non vi sono evidenze sufficienti di patogenicità al momento dell'interpretazione. Nell'ambito delle varianti di significato incerto verranno riportate nel referto le VUS che presentano un'alta probabilità di correlazione clinica e/o per le quali successivi approfondimenti potrebbero consentirne una riclassificazione.
- Nessuna variante identificata: non è stata riscontrata alcuna variante di significato clinico noto nei geni associati all'indicazione all'indagine. Questo risultato non esclude un'origine genetica della condizione in esame che potrebbe essere dovuta alla presenza di varianti non rilevabili con la metodica in uso.

L'interpretazione del significato clinico delle varianti genetiche si basa sulle conoscenze ed evidenze riportate in letteratura disponibili al momento dell'analisi dei dati e potrebbe cambiare col progredire delle conoscenze scientifiche.

Risultati secondari: dato il numero cospicuo di geni analizzati con il sequenziamento dell'esoma, parallelamente ai risultati principali, possono essere riscontrati dei "risultati secondari". Verranno riportati solo i risultati secondari inclusi nella "ACMG SF v3.3 list" (PMID: 40568962).

Si tratta di varianti con significato clinico noto in geni-malattia non correlati all'indicazione al test genetico richiesto ma:

- potenzialmente rilevanti per decisioni di tipo riproduttivo, in quanto potrebbero determinare un aumentato rischio di patologia genetica nella prole;
- predisponenti a patologie a insorgenza nell'adulto, per le quali la conoscenza del rischio può rappresentare un beneficio concreto in termini di terapia e/o prevenzione.

Salvo diversamente indicato, l'analisi dei risultati secondari non prevede lo studio dei dati relativi alle variazioni del numero di copie (CNV).

Al momento della compilazione del consenso informato il paziente ed eventuali familiari potranno decidere se essere informati o meno su eventuali risultati secondari.

Qualsiasi sia il risultato del test, si raccomanda di discuterlo nell'ambito di una consulenza genetica post-test.

Le conoscenze relative al patrimonio genetico umano e alla funzione dei geni in relazione alle patologie progrediscono molto velocemente. Pertanto, se il sequenziamento dell'esoma non darà un risultato inequivocabile alla prima analisi, le varianti genetiche identificate potranno essere



reinterpretate in futuro alla luce di nuove evidenze ed essere riconosciute come causa della condizione in esame. In questo caso sarà ricontattato per gli opportuni aggiornamenti.

LIMITI DEL TEST

Il test non è in grado di rilevare:

- Inversioni complesse;
- Conversioni geniche;
- Traslocazioni bilanciate;
- Malattie da espansione di triplette;
- Varianti in regioni non codificanti oltre le ± 20 paia di basi dal confine esone-introne (se non diversamente indicato).

Il test potrebbe non rilevare in modo affidabile quanto segue:

- Mosaicismi;
- Alterazioni all'interno di tratti di ripetizioni mononucleotidiche;
- INDELs maggiori di 50 paia di basi;
- Varianti all'interno di pseudogeni/segmenti duplicati;
- Alterazioni del numero di copie (in particolare CNV in regioni genomiche complesse o di piccole dimensioni, ad esempio delezioni o duplicazioni di un singolo esone).

È possibile che alcune regioni non possano essere sequenziate o che abbiano una copertura inferiore ai limiti fissati (20X) per garantire un'analisi accurata delle varianti, queste regioni non saranno quindi comprese nell'analisi.

Inoltre, il test non indaga tutto il patrimonio genetico, ma solo una parte, benché molto vasta, di esso. Pertanto, non si può escludere che il quadro clinico in esame sia dovuto ad alterazioni genetiche presenti in parti del genoma non analizzate con questo test.

In caso di pregresso trapianto di midollo osseo l'analisi su sangue periferico non fornirà un risultato corrispondente al profilo genetico del paziente (richiedere consulenza genetica per eventuali approcci metodologici alternativi).

L'interpretazione dei dati WES è strettamente vincolata alla accurata descrizione del fenotipo del paziente e dell'anamnesi familiare, così come alla corretta indicazione dei legami di parentela (in caso di analisi familiare). Pertanto, errori o omissioni nella descrizione del fenotipo o dei legami di parentela possono portare ad una diagnosi genetica errata.

TEMPI DI RISPOSTA

L'emissione del referto è prevista in circa 12-14 settimane dal ricevimento del campione. In rari casi, si può verificare la necessità di ripetere il prelievo per materiale non idoneo o esaurimento dello stesso.

PROTEZIONE DEI DATI PERSONALI

Personal Genomics considera i risultati del test assolutamente confidenziali. Tutti i suoi dati personali saranno trattati secondo quanto stabilito dalla normativa vigente in materia di protezione dei dati personali (privacy): D. Lgs. 196/2003 e Reg. UE 2016/679 e loro s.m. e i. Si veda in proposito l'apposito consenso informato allegato.

Utilizzo delle informazioni. I dati anonimizzati relativi alle pratiche standard (controllo qualità, procedure operative, standard di laboratorio) ed alle informazioni genetiche, ottenute nel corso dell'analisi, potranno essere utilizzate da Personal Genomics, previo suo consenso, per monitorare e migliorare il processo di sequenziamento del DNA e di interpretazione dei dati. In tutti i casi, l'utilizzo dei dati avverrà nel pieno rispetto delle normative vigenti.

Ricerca. Personal Genomics impiega le più moderne tecnologie e i più avanzati database oggi disponibili, che sono tuttavia ancora limitati, e che richiedono un costante sviluppo. Per rendere sempre più precisa e completa l'interpretazione dei risultati, Personal Genomics chiede che Lei acconsenta all'utilizzo del Suo campione residuo e delle Sue informazioni sanitarie, inclusi i dati genetici, a fini di ricerca. Il campione ed i dati ad esso correlati saranno naturalmente anonimizzati e questo processo, fondamentale per un costante miglioramento dell'interpretazione, sarà applicato nel pieno rispetto della normativa vigente. Lei ha comunque la possibilità di ritirare il suo implicito consenso all'utilizzo dei suoi dati per scopi di ricerca in qualsiasi momento, scrivendo a pg@pec.personalgenomics.it. Può tuttavia decidere che sia il campione residuo sia i suoi dati anonimizzati non vengano utilizzati da Personal Genomics a scopo di ricerca esprimendo la sua volontà nel consenso allegato.