

## TEST GENETICI COSTITUZIONALI

### Cosa sono

I test genetici sono test atti ad individuare varianti genomiche (nella sequenza del DNA) che possono essere causative di / correlate a / predisponenti a patologie o a quadri clinici definiti o complessi. Diagnosticano varianti genomiche “costituzionali”, ovvero congenite e presenti nell’individuo in ogni cellula o a mosaico.

Si differenziano dai test genetici oncologici che diagnosticano varianti genomiche “somatiche”, ovvero presenti solo nelle cellule neoplastiche, sebbene oggi siano ormai emergenti e diagnosticabili varianti costituzionali predisponenti all’insorgenza di neoplasie.

### Indicazioni:

L’accesso ai test genetici è regolamentato da precisi e ben definiti criteri di appropriatezza atti a garantire indagini mirate e ad ottenere diagnosi in tempi contenuti. Tali criteri sono conformi alle linee guida e a documenti consensuali ufficiali fra le società nazionali delle categorie mediche specialistiche di interesse.

### Campioni

Test postnatale: sangue periferico e, raramente, saliva o piccola biopsia cutanea.

Test prenatali: villi coriali, liquido amniotico, sangue periferico materno (contenente DNA fetale circolante), raramente sangue fetale cordonale.

Test preimpianto: blastocisti. Alcuni test genetici sono anche effettuabili su poche cellule dell’embrione ottenuto in vitro con fecondazione assistita, quando ancora è allo stadio precoce di blastocisti. La diagnosi preimpianto è disponibile oggi in caso di familiarità per malattie ereditarie gravi ad insorgenza precoce e non suscettibili al trattamento curativo postnatale, o quando uno dei genitori è portatore sano di una anomalia cromosomica.

### Modalità di accesso ai test genetici

La maggior parte dei test genetici viene offerta dal SSN con ticket o gratuitamente se il paziente ha diritto ad una esenzione. Sono esclusi dal SSN solo alcuni test di ultima generazione, disponibili, ad oggi, esclusivamente per ricerca medico/scientifica.

Il Medico di base può prescrivere su impegnativa regionale la prestazione “Visita genetica” o “Prima visita di genetica medica”; non può prescrivere un test genetico.

Tutti i test genetici devono essere prescritti con impegnativa regionale dal Medico Genetista contestualmente alla Visita Genetica o da un Medico Specialista di branca secondo precisi criteri di appropriatezza, onde evitare percorsi diagnostici complessi, non mirati o dispersivi, con conseguente dilatazione del tempo di diagnosi e disorientamento del paziente.

---

la gemma rara – associazione di volontariato  
organizzazione di volontariato (ODV)

Sede legale – Varese, via V. Dandolo 5  
Sede operativa – Varese, v.le Borri 56  
c/o SMEL spec. in Citogenetica e Genetica Medica  
ASST Sette Laghi, Ospedale di Circolo e Fond. Macchi, Varese  
IBAN IT57W 0303210800010000001925  
C.F. 95060900123

Tel. 0332 393007  
segreteria@lagemmarara.org  
[www.lagemmarara.org](http://www.lagemmarara.org)

### **Esenzioni:**

Tutti i test genetici diagnostici sono prestazioni incluse nei Livelli Essenziali di Assistenza (LEA), definiti con [Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri 12 gennaio 2017](#), pertanto, sono resi disponibili con ticket dal SSN, oppure gratuitamente con le seguenti esenzioni:

**Esenzione M00** preconcezionale, per la coppia a rischio a causa di familiarità per patologia genetica.

**Esenzione M50** per le donne in gravidanza che hanno indicazione alla diagnosi prenatale.

**Esenzione per specifica Malattia Rara** (patologia con frequenza < 1/2000) in caso di patologia rara inserita nel Registro Nazionale delle Malattie Rare. L'esenzione per malattia rara ha validità per tutta la vita e consente l'accesso a tutte le prestazioni mediche correlate alla patologia diagnosticata ed ai test genetici diagnostici sia per il paziente che per i familiari. La diagnosi di Malattia rara viene rilasciata esclusivamente dai Presidi di Rete, centri di documentata esperienza in attività diagnostica e terapeutica, con adeguata dotazione di servizi per l'emergenza e per la diagnostica biochimica e genetica.

**Esenzione R99** riservata ai pazienti con sospetta malattia rara registrata nel Registro Nazionale delle MR ed ai familiari non sintomatici di soggetti con variante genetica nota.

Per Sindromi genetiche non rare:

**Esenzione 065** per S. di DOWN

**Esenzione 066** per S. di Klinefelter

**Esenzione per reddito E01, E02, E03, E04** riservata a 4 specifiche categorie definite da condizioni personali e sociali associate a determinate situazioni reddituali. Non riguarda la spesa farmaceutica.

**Esenzione pediatrica E11** solo per la regione Lombardia e valida fino ai 13 anni e 364 gg di età. Nelle altre regioni italiane è sostituita dall'esenzione per reddito **E01** fino a 5 anni e 364 giorni di età e da **R99** dai 6 anni o per qualsiasi età e fascia di reddito.

**Consenso informato:** L'accesso ai test genetici è consentito solo in seguito ad ottenimento di consenso informato firmato dal paziente maggiorenne o da un suo tutore in caso di inabilità del paziente, o da entrambi i genitori in caso di paziente minore.

### **TIPOLOGIE DEI TEST GENETICI**

I test genetici si suddividono in:

- 1) **Test Citogenetici:** analizzano i cromosomi e si suddividono, a loro volta, in due tipologie: test di citogenetica classica e test di citogenetica molecolare. Individuano varianti genomiche.
- 2) **Test Molecolari:** analizzano i geni (contenuti nei cromosomi). Individuano varianti geniche.

#### **1) Test Citogenetici**

##### **Test di citogenetica classica**

**Esame del cariotipo - DIAGNOSTICO:** consente di analizzare l'intero assetto cromosomico di un individuo, ovvero il cariotipo, costituito da 46 cromosomi nella specie umana. Il cariotipo normale è definito da 23 coppie di cromosomi omologhi, contenenti gli stessi geni e di differente origine parentale; la 23° coppia è costituita da due cromosomi omologhi X nel sesso femminile e da un cromosoma X ed un cromosoma Y nel sesso maschile. Il cariotipo femminile normale è definito dalla formula 46,XX; il cariotipo maschile normale dalla formula 46,XY. Il test consente di individuare anomalie cromosomiche numeriche o strutturali costituzionali. Le anomalie cromosomiche costituzionali possono, meno frequentemente, essere presenti soltanto in una % variabile di cellule dell'individuo: in tal caso viene diagnosticata una condizione di mosaico. I mosaici si associano generalmente a caratteristiche cliniche attenuate.

Le anomalie cromosomiche numeriche si correlano sempre a quadri clinici variamente alterati, tranne in rare eccezioni. Le anomalie strutturali sbilanciate identificate mediante analisi citogenetica classica hanno dimensioni maggiori di 10 Mb e



---

la gemma rara – genetica per le malattie rare – medicina ricerca assistenza

correlano a quadri clinici alterati in quanto comportano perdita o guadagno di variabili porzioni di cromosoma contenenti geni. Le anomalie strutturali bilanciate non comportano perdita o guadagno di tratti cromosomici e sono presenti in soggetti sani, salvo rare eccezioni.

L'esame del cariotipo può essere eseguito su sangue periferico in epoca postnatale o in epoca prenatale con prelievo invasivo di villi coriali in 11° – 13° settimana di gravidanza o di liquido amniotico dalla 15° settimana (con rischio di perdita della gravidanza a causa del prelievo pari a 1-1,5% per villocentesi ed a 0,5 % per amniocentesi). L'analisi del cariotipo è eseguibile anche preimpianto.

## Test di citogenetica molecolare

**Test array CGH o Microarray Costituzionale (CMA) - DIAGNOSTICO:** consente di identificare anomalie cromosomiche di piccola dimensione, definite criptiche perché possono avere dimensioni inferiori a 10 Mb, pertanto, non sono visibili all'analisi classica del cariotipo. Si tratta di microdelezioni o microduplicazioni cromosomiche definite con il termine CNVs = Variazioni nel Numero di Copie. Le CNVs possono avere un contenuto genico o essere prive di geni, possono essere di origine "de novo" o ereditate da un genitore portatore. La patogenicità di una CNV viene valutata tenendone in conto il contenuto genico, l'origine parentale, la frequenza nella popolazione sana e nei soggetti con quadro clinico alterato e la dimensione. Non tutte le varianti sono patogeni che, cioè causative di una patologia, molte hanno significato clinico incerto o sconosciuto (VOUS) e molte hanno significato di predisposizione; esistono anche varianti benigne, particolarmente rappresentate nella popolazione sana e raramente nei casi patologici, e varianti polimorfiche con frequenza maggiore dell'1%. Il test può essere eseguito su DNA estratto da sangue periferico in epoca postnatale e su DNA da villi coriali o amniociti in epoca prenatale; è eseguibile anche preimpianto.

**Test SNP (single nucleotide polymorphisms) array - DIAGNOSTICO:** il DNA è costituito da una lunga catena di unità chimiche legate fra loro dette nucleotidi, caratterizzati da 4 tipi diversi di basi azotate: Adenina, Guanina, Citosina e Timina. Lungo il cromosoma sono presenti nucleotidi che possono essere frequentemente differenti nei due cromosomi: si tratta di nucleotidi altamente polimorfici, o SNPs. Il test SNP array identifica la presenza di regioni con identici SNPs sui due cromosomi omologhi, quindi individua una perdita di eterozigosi (diversità di sequenza fra i due omologhi). Questo riscontro può corrispondere ad una delezione cromosomica in eterozigosi, cioè su uno solo dei cromosomi omologhi, o può essere dovuto a UPD (disomia uniparentale) ovvero alla provenienza da un solo genitore di un tratto cromosomico o di un intero cromosoma. La UPD porta gli alleli, cioè le forme alternative nella sequenza del DNA di un gene, in condizione di omozigosi (identità di sequenza). La perdita di eterozigosi può portare a manifestazione di malattie genetiche recessive.

**MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification) - DIAGNOSTICO:** è un test quantitativo che consente di diagnosticare delezioni o duplicazioni a carico di un singolo gene o interne ad esso. Si esegue in seguito a specifico sospetto diagnostico per geni la cui delezione/duplicazione totale o parziale si correla a specifiche patologie. Il test può essere eseguito su DNA estratto da sangue periferico in epoca postnatale e su DNA da villi coriali o amniociti in epoca prenatale.

**FISH (Ibridazione In Situ Fluorescente) - DIAGNOSTICO:** è un test di citogenetica molecolare che consente di identificare CNVs posizionate in regioni cromosomiche specificatamente correlate ad alcune patologie. La CNV viene identificata direttamente su un preparato per analisi cromosomica mediante l'utilizzo di sonde (piccole sequenze di DNA) fluorescenti, che si legano esclusivamente e specificatamente alla regione correlata alla patologia da indagare e si visualizzano sul cromosoma come spot fluorescenti. Questo test può essere utilizzato a seguito di sospetto diagnostico per una singola patologia e darà il risultato solo per la regione cromosomica specificatamente coinvolta nella patologia sospettata. Tutte le varianti identificabili con FISH sono anche diagnosticabili con test CMA. Il test può essere eseguito su DNA estratto da sangue periferico in epoca postnatale e su DNA da villi coriali o amniociti in epoca prenatale.

**Test su DNA fetale libero circolante o NIPT (Diagnosi Prenatale Non Invasiva) - NON DIAGNOSTICO:** il test non comporta alcun rischio di perdita della gravidanza in quanto si esegue su plasma materno tramite un semplice prelievo di sangue. Il test si basa sulla quantificazione dei frammenti di DNA fetale circolante nel plasma materno ed è in grado di individuare, con buona affidabilità, le più frequenti anomalie cromosomiche numeriche associate a sindromi, quali trisomia dei cromosomi 21, 13, 18, aneuploidie (variazioni di numero) dei cromosomi sessuali X e Y. Per la ricerca di tutte le altre



anomalie cromosomiche e delle CNVs associate alle principali sindromi da microdelezione il test non ha ancora raggiunto l'affidabilità necessaria alla sua offerta su larga scala e, ad oggi, non è ancora disponibile con il Sistema Sanitario Nazionale; può essere effettuato privatamente dalla 11° settimana gestazionale. L'esito positivo richiede una conferma diagnostica preferibilmente su liquido amniotico.

## 2) Test Molecolari

**Test di metilazione** – DIAGNOSTICO: si applica in particolari condizioni cliniche suggestive di alcune sindromi e consente di definire la correttezza del pattern di metilazione di alcune regioni cromosomiche. La metilazione è un meccanismo chimico di regolazione dell'espressione genica. Per una corretta regolazione genica in alcune regioni cromosomiche è necessario che sia presente il pattern di metilazione di entrambi i genitori: la presenza del solo pattern di metilazione materno o paterno diviene causativa di importanti sindromi quali la S. di Angelman, Prader Willi, Beckwith Wiedeman, Silver Russell.

**Test per UPD (Disomia Uniparentale)**- DIAGNOSTICO: individua l'origine uniparentale di interi cromosomi o di porzioni cromosomiche mediante analisi di microsatelliti, cioè brevissime sequenze di alcuni nucleotidi ripetute un numero n di volte sui cromosomi omologhi paterno e materno. Ove in un singolo cromosoma o in una porzione di esso venga riscontrata una elevatissima frequenza di microsatelliti esclusivamente materni o paterni si è in presenza di una UPD, cioè di una condizione genetica in cui due cromosomi omologhi o loro regioni interne provengono un solo genitore. La UPD, particolarmente per alcuni cromosomi o loro regioni interne, può portare a varie conseguenze quali l'insorgenza di patologie recessive. Il test si applica in caso di particolarissimi quadri clinici e successivamente ad esito positivo del test di metilazione o in caso di riscontro di anomalie cromosomiche bilanciate coinvolgenti i cromosomi 7, 11, 14, 15. Richiede anche il campione ematico dei genitori.

**Test di sequenziamento genico:** i test di sequenziamento genico si avvalgono di tecnologie che consentono la lettura della sequenza nucleotidica di un gene, ovvero della sequenza di basi azotate del DNA che compongono il testo per la costruzione di proteine. La sostituzione/delezione/inserzione anche di una sola di queste basi (o nucleotidi) costituisce una mutazione puntiforme e può portare ad una modificazione importante dell'intera sequenza, con conseguente produzione di una proteina alterata (con deficit funzionale o con perdita di funzionalità), o potrebbe portare ad una ridotta produzione proteica. Non tutte le varianti portano danni alle proteine o sono causative o correlate a patologie; esistono varianti di significato incerto (VOUS), sia riguardo alla funzionalità della proteina, sia riguardo al loro potenziale patogenico. Esistono anche varianti benigne o polimorfiche (con frequenza > 1% nella popolazione). Tutte le varianti possono essere de novo o ereditate.

Tecniche di sequenziamento genico:

a) Ricerca di mutazione nota (es familiare): sequenziamento di un breve tratto di gene contenente una variante nota. Il test può essere eseguito su DNA estratto da sangue periferico in epoca postnatale e su DNA da villi coriali o amniociti in epoca prenatale ed è eseguibile anche preimpianto.

b) Sequenziamento Sanger (di un singolo intero gene) DIAGNOSTICO: disponibile solo in epoca postnatale.

c) NGS (Next Generation Sequencing): sequenziamento massivo e contemporaneo di molti geni mediante:

- pannelli genici - DIAGNOSTICO = sequenziamento massivo di più geni (2 - 100) correlati ad una patologia
- Disponibile in epoca postnatale e in particolari condizioni di sospetto clinico anche in epoca prenatale (es. S. di Noonan).
- esoma clinico – NON DIAGNOSTICO = sequenziamento massivo di tutti i geni con prodotto proteico correlati a patologia (5.000 – 7.000 geni). Si esegue solo per ricerca.



- esoma completo (WES Whole Exome Sequencing) - NON DIAGNOSTICO = sequenziamento massivo di tutti i geni con prodotto proteico presenti nel nostro genoma (18.000-22.000 geni). Si esegue solo per ricerca.
- Genoma completo (WGS Whole Genome Sequencing) - NON DIAGNOSTICO = sequenziamento massivo dell'intero genoma, ovvero di tutte le sequenze con o senza prodotto proteico. Si esegue solo per ricerca.

In Italia sono eseguibili tutti i test genetici sopra illustrati.



---

la gemma rara – genetica per le malattie rare – medicina ricerca assistenza

## FONTI

Nuovi LEA

<http://www.salute.gov.it/portale/esenzioni/dettaglioContenutiEsenzioni.jsp?lingua=italiano&id=4773&area=esenzioni&menu=vuoto>

Centro Coordinamento Malattie Rare Mario Negri - Regione Lombardia

<http://malattierare.marionegri.it/content/view/111/107/>

Nuovo nomenclatore dell'assistenza specialistica ambulatoriale DPCM 12 gennaio 2017

<http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderPdf.spring?seriegu=SG&datagu=18/03/2017&redaz=17A02015&artp=4&art=1&subart=1&subart1=10&vers=1&prog=001>

## LEGENDA:

**Allele:** ciascuna delle due forme alternativa di un gene o di una qualsiasi sequenza sui due cromosomi omologhi.

**Amniocentesi:** prelievo di liquido amniotico mediante inserzione di ago per via addominale.

**Aneuploidia:** variazione nel numero di cromosomi.

**Anomalia cromosomica:** alterazione numerica o di struttura dei cromosomi.

**Base azotata:** Le basi azotate Adenina, Timina, Citosina e Guanina sono le lettere che, nel gene, compongono il testo per la codifica ed assemblaggio delle proteine.

**Blastocisti:** stadio evolutivo dell'embrione corrispondente al 5°-7° giorno di sviluppo, dalla fecondazione.

**Cariotipo:** assetto cromosomico

**CNV:** variazione nel numero di copie di una regione cromosomica (duplicazione = 3 copie, delezione = 1 copia, assetto bilanciato (normale) = 2 copie)

**Cromosoma:** singola molecola di DNA avvolta ed assemblata a componenti proteiche di struttura e visibile nelle cellule in divisione come un piccolo corpo (soma) evidenziabile con alcuni specifici coloranti. In ogni cellula con cariotipo normale vi sono 23 coppie di cromosomi uguali fra loro e di diversa origine parentale, detti cromosomi omologhi (46 cromosomi in totale). La 23° coppia è costituita dai cromosomi sessuali X e Y. Il cariotipo normale viene rappresentato con la formula 46,XX nel sesso femminile e 46,XY nel sesso maschile.

**Cromosomi omologhi:** cromosomi appartenenti ad una medesima coppia, di diversa origine parentale, contenenti alleli uguali o differenti degli stessi geni, agli stessi loci.

**Disomia uniparentale:** presenza di 2 cromosomi omologhi, o di regioni interne ad essi, di provenienza da uno stesso genitore.

**De novo:** non ereditato.

**DNA:** Acido desossiribonucleico. E' la molecola che costituisce il genoma. Nella specie umana è suddiviso in 46 molecole corrispondenti ai 46 cromosomi. Ha sede nel nucleo della cellula (esiste anche un DNA extranucleo presente in particolari organelli della cellula detti mitocondri).

**Esoma:** insieme delle parti codificanti del nostro genoma, cioè di tutte le sequenze di DNA con prodotto proteico, costitutive dei geni. Costituisce circa il 2% di tutto il DNA.

**Eterozigosi:** diversità di sequenza nel DNA fra i 2 cromosomi omologhi o in una regione interna ad essi.

**Gene:** sequenza di DNA codificante per una proteina. I geni sono contenuti nei cromosomi. I cromosomi omologhi contengono la stessa serie di geni.

**Genoma:** l'intero DNA costituito sia dalle sequenze codificanti dei geni sia da tutte le sequenze prive di prodotto proteico. Costituisce circa il 98% dell'intero DNA e contiene regioni sia con funzione regolatrice dell'espressione dei geni, sia sequenze spaziatrici silenti.

**Liquido amniotico:** liquido di riempimento del sacco amniotico, nel quale si sviluppa il feto.

**Locus:** punto di mappaggio di un gene, di una CNV o di una particolare sequenza di DNA sul cromosoma.

**Malattia genetica recessiva:** malattia causata da mutazioni patogeni che in entrambi gli alleli di un gene.

**Mb:** Megabase = unità di misura che indica la lunghezza di segmento cromosomico contenente 1.000.000 di basi (o nucleotidi).

**Metilazione:** reazione chimica di legame di un gruppo metilico (-CH<sub>3</sub>) ad una molecola.

**Microsatelliti - STR (Short Tandem Repeats):** brevi sequenze di pochi nucleotidi, non codificanti e ripetute in tandem un numero N di volte sui cromosomi omologhi. Il numero di ripetizioni può essere uguale o diverso fra i due omologhi (omozigosi o eterozigosi degli alleli STS) ed è trasmissibile e stabilmente mantenuto nelle divisioni cellulari.

**Mosaico:** compresenza di 2 o più popolazioni cellulari con differente variante genetica, in uno stesso individuo. Può essere presente anche la popolazione cellulare normale.



**Nucleotide:** unità molecolare del DNA contenente una singola base azotata. Il DNA è una lunghissima catena di nucleotidi legati chimicamente fra loro.

**Omozigosi:** identità di sequenza nel DNA fra i 2 cromosomi omologhi o in una regione interna ad essi.

**Polimorfismo:** variante ad elevata frequenza (>1%) nella popolazione.

**Sindrome:** patologia costituita da un complesso di caratteristiche cliniche associate e ricorrenti.

**SNP:** singolo nucleotide polimorfico (ad alta frequenza).

**Trisomia:** triplice copia di cromosomi omologhi.

**Variante genetica costituzionale:** presente in tutte le cellule dalla nascita.

**Variante genetica somatica:** insorta in una singola cellula durante la vita di un individuo e trasmessa alle sole cellule da questa originate. E', pertanto, presente in una limitata popolazione cellulare.

**Variante genica:** variazione a carico di una singola base azotata nella sequenza di un gene rispetto ad una sequenza standard definita di riferimento, in quanto originaria o altamente conservata in varie specie nell'evoluzione o con maggiore frequenza nella popolazione.

**Variante genomica:** qualsiasi alterazione nella sequenza del DNA o nel numero di copie di una regione cromosomica. Sono varianti genomiche le anomalie cromosomiche, le CNVs, le mutazioni puntiformi.

**Variante o mutazione puntiforme:** variazione a carico di una singola base ( o nucleotide) nella sequenza del DNA.

**Villi coriali:** componente embrionale della placenta.

**Villocentesi:** prelievo di villi coriali tramite inserzione di ago per via addominale, raramente transvaginale.

**VOUS:** Variante di incerto significato.

