



TEST DI SCREENING PRENATALE NON INVASIVO DI MALATTIE GENETICHE

Finalità del test GeneSafe™

GeneSafe™ è un test di screening multigenico non invasivo che, analizzando il DNA libero fetale nel sangue della gestante (cfDNA), rileva la presenza di mutazioni responsabili di gravi patologie genetiche.

GeneSafe™ prevede 3 livelli d'indagine:

- GeneSafe™ **INHERITED**, è un livello di screening che permette di individuare nel feto **malattie genetiche a trasmissione ereditaria**.
- GeneSafe™ **DE NOVO**, permette di eseguire lo screening di gravi malattie genetiche non trasmesse dai genitori (de novo).
- GeneSafe™ **COMPLETE**, effettua lo screening nel feto sia di **malattie genetiche a trasmissione ereditaria** che ad insorgenza *de novo*.

Il test GeneSafe™ può essere eseguito come esame singolo, ma quando abbinato allo studio non invasivo del cariotipo fetale, test **PranatalSAFE™ Karyo**, permette di raggiungere il più alto livello d'informazione possibile, mediante tecniche prenatali non invasive, ad oggi disponibile.

Malattie genetiche indagate dal test GeneSafe™

Il test GeneSafe™ **INHERITED**, permette di individuare mutazioni su **4 geni** responsabili delle **4 malattie genetiche** più frequentemente riscontrate nella popolazione Italiana, quali **Fibrosi Cistica, Anemia Falciforme, Beta Talassemia e Sordità Ereditaria**. I geni investigati dal test GeneSafe™ **INHERITED**, e le relative patologie genetiche, sono riportati in **Tabella 1**.

Tabella 1. Lista dei geni indagati dal test GeneSafe™ **INHERITED e delle patologie associate.**

Malattie genetiche ereditarie individuate da GeneSAFE™ <i>Inherited</i>	Gene
Fibrosi Cistica	CFTR
Beta Talassemia	HBB
Anemia Falciforme	HBB
Sordità Ereditaria autosomica recessiva tipo 1A	CX26(GJB2)
Sordità Ereditaria autosomica recessiva tipo 1B	CX30(GJB6)

Il test GeneSafe™ **DE NOVO**, permette di rilevare mutazioni su **25 geni** in relazione a **44 malattie monogeniche** non ereditate dai genitori, ma comparse *de novo* nel feto.

I geni investigati dal test GeneSafe™ **DE NOVO**, e le relative patologie genetiche, sono riportati in **Tabella 2**.

Le patologie indagate dal test GeneSafe™ **DE NOVO** spesso non sono rilevabili alle indagini ecografiche del primo trimestre (alcune sono rilevabili ecograficamente solo al secondo o al terzo trimestre) e sono indipendenti dall'età materna.

A differenza dei NIPT tradizionali, che individuano anomalie fetali associate ad età materna avanzata (es. sindrome di Down), il test GeneSafe™ **DE NOVO** identifica malattie genetiche associate ad **età paterna avanzata**

(es. Acondroplasia, sindrome di Pfeiffer, di Apert, di Crouzon, Osteogenesis Imperfecta, etc.), causate da errori genetici che insorgono durante il processo di spermatogenesi, fornendo alle coppie meno giovani la possibilità di utilizzare un test di screening più completo.

Le mutazioni individuate dal test **GeneSafe™ DE NOVO** possono insorgere in modo casuale per la prima volta nel feto e in questi casi denominate *de novo*. Tali mutazioni non sono rilevabili con i test di screening pre-concezionali eseguiti sui genitori poiché a carattere non ereditario.

Le suddette mutazioni *de novo* possono determinare nel bambino **displasie scheletriche, difetti cardiaci, anomalie congenite multiple, e/o deficit intellettivi**.

L'incidenza cumulativa delle patologie investigate mediante il test **GeneSafe™ DE NOVO** è ~1/600.

Tabella 2. Lista dei geni indagati dal test **GeneSafe™ DE NOVO e delle patologie associate.**

GENE	MALATTIE SINDROMICHE	GENE	PATOLOGIE SCHELETRICHE
JAG1	Sindrome di Alagille	COL2A1	Acondrogenesi tipo 2 Acondroplasia Sindrome CATSHL
CHD7	Sindrome di CHARGE		Sindromedi Crouzon con acanthosis nigricans
HDAC8	Sindrome di Cornelia de Lange tipo 5	FGFR3	Ipocondroplasia Sindrome di Muenke Displasia tanatofora, tipo I Displasia tanatofora, tipo II Sindrome di Ehlers-Danlos, classica Sindrome di Ehlers-Danlos, tipo VIA Osteogenesi imperfetta, tipo I Osteogenesi imperfetta, tipo II Osteogenesi imperfetta, tipo III Osteogenesi imperfetta, tipo IV Sindrome di Ehlers-Danlos, forma cardiaco-valvolare Sindrome di Ehlers-Danlos, tipo VIII
NIPBL	Sindrome di Cornelia de Lange tipo 1		
MECP2	Sindrome di Rett	COL1A1	Osteogenesi imperfetta, tipo I Osteogenesi imperfetta, tipo II Osteogenesi imperfetta, tipo III Osteogenesi imperfetta, tipo IV Sindrome di Ehlers-Danlos, forma cardiaco-valvolare Sindrome di Ehlers-Danlos, tipo VIII
NSD1	Sindrome di Sotos tipo1		
ASXL1	Sindrome di Bohring-Opitz	COL1A2	Osteogenesi imperfetta, tipo II Osteogenesi imperfetta, tipo III Osteogenesi imperfetta, tipo IV
SETBP1	Sindrome di Schinzel-Giedion		
SINDROME DI NOONAN		CRANIOSINOSTOSI	Sindrome di Antley-Bixler senza anomalie genitali o disordini della steroidognesi Sindrome di Apert Sindrome di Crouzon Sindromedi Jackson-Weiss Sindrome di Pfeiffer, tipo 1 Sindrome di Pfeiffer, tipo 2 Sindrome di Pfeiffer, tipo 3
BRAF	Sindrome Cardio facio cutanea (CFS) tipo 1	FGFR2	
CBL	Sindrome di Noonan-simile con o senza leucemia mielomonocitica giovanile		
KRAS	Sindrome di Noonan /cancers		
MAP2K1	Sindrome Cardio facio cutanea (CFS) tipo e 3		
MAP2K2	Sindrome Cardio facio cutanea (CFS) tipo 4		
NRAS	Sindrome di Noonan 6/cancers		
PTPN11	Sindrome Noonan 1/ Sindrome di LEOPARD/cancers		
PTPN11	Leucemia mielomonocitica giovanile (JMML)		
RAF1	Sindrome di Noonan 5/Sindrome di LEOPARD 2		
RIT1	Sindrome di Noonan 8		
SHOC2	Sindrome Noonan-simile con capelli caduchi in fase anagen		
SOS1	Sindrome di Noonan 4		

Indicazioni al test GeneSafe™

GeneSafe™ è indicato nei seguenti casi:

- Gravidanze in cui è controindicata la diagnosi prenatale invasiva (es. rischio di aborto spontaneo);
- Età paterna avanzata;
- Quadro ecografico di anomalie fetali suggestive di malattia genetica.
- Pazienti a rischio di trasmettere al feto una malattia genetica individuabile con il test.
- Gestanti che desiderano ridurre il rischio di una malattia genetica nel feto.

Chi può sottoporsi al test GeneSafe™

Tutte le donne in gravidanza con un'età gestazionale di almeno **10 settimane**. Il test può essere eseguito sia in caso di gravidanze singole che gemellari, ottenute sia mediante concepimento naturale che con tecniche di procreazione medicalmente assistita, omologhe o eterologhe.


Come viene effettuato il test GeneSafe™

Il test  GeneSafe™ si esegue mediante lo studio del DNA libero circolante (cfDNA) nel sangue materno che origina per apoptosi dai trofoblasti placentari.

Durante la gravidanza, alcuni frammenti del Dna del feto circolano nel sangue materno. Il DNA fetale è rilevabile a partire dalla 5° settimana di gestazione. La sua concentrazione aumenta nelle settimane successive e scompare subito dopo il parto. La quantità di DNA fetale circolante dalla 9°-10° settimana di gestazione è sufficiente per garantire l'elevata specificità e sensibilità del test. Il test viene eseguito mediante il prelievo di un campione ematico della gestante con un'età gestazionale di almeno 10 settimane. Tramite un'analisi complessa di laboratorio, il DNA fetale libero circolante è isolato dalla componente plasmatica del sangue materno. Successivamente si procede all'analisi per rilevare le mutazioni patologiche mediante l'innovativa tecnologia denominata *Next Generation Sequencing* (NGS).

Risultati ottenibili con il test GeneSafe™

“POSITIVO“: indica che il test **ha rilevato** una o più mutazioni a livello di uno (o più) geni. Tale risultato è compatibile con un **alto rischio per una specifica malattia genetica**. L'affidabilità del risultato viene riportato nella sezione “Risultati” del referto e nella sezione “Accuratezza del test” della relazione tecnica. Tale risultato indica che il feto presenta un elevato rischio per la specifica malattia indicata, ma non assicura che il feto abbia tale condizione. Il follow-up consigliato è un test di diagnosi prenatale invasiva, come il prelievo dei villi coriali (Villocentesi) o l'Amniocentesi. Il genetista di Genoma Group (o in generale uno specialista in genetica), in sede di consulenza genetica, spiegherà in maniera dettagliata il risultato del test e consiglierà di confermare il risultato mediante diagnosi prenatale invasiva. In nessun modo è possibile avvalersi della Legge 194/78 sull'interruzione volontaria della gravidanza senza prima aver confermato il risultato del test mediante amniocentesi o villocentesi.

Il test  GeneSafe™ identifica esclusivamente mutazioni **con significato patologico noto**. Il test non ricerca **varianti con significato benigno**, cioè quelle riscontrabili in individui normali e sono prive di significato patologico, e **varianti con significato clinico incerto**, cioè quelle non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica.

“NEGATIVO“: indica che il test **non ha rilevato** alcuna mutazione a significato patologico noto nei geni esaminati. Tale risultato è compatibile con un **basso rischio per una specifica malattia genetica**. L'affidabilità del risultato viene riportato nella sezione “Risultati” del referto e nella sezione “Accuratezza del test” della relazione tecnica. Tale risultato, tuttavia, riduce notevolmente le possibilità che il feto abbia le malattie genetiche esaminate, ma non può garantire che il feto sia sano.

In alcuni casi (circa l'1%) il test potrebbe produrre un **risultato non ottimale o non conclusivo**. In tali evenienze verrà richiesto alla gestante il prelievo di un nuovo campione ematico al fine di ripetere l'esame. In altri casi, al fine di una interpretazione ottimale dei risultati, potrebbe essere necessario esaminare anche un campione ematico paterno.

Parametri utilizzati per la refertazione delle varianti genetiche

L'analisi è mirata esclusivamente ai geni elencati in Tabella 1. Verranno refertate solo le mutazioni classificate come a significato patogenetico noto, sulla base dei dati della letteratura scientifica e la classificazione presente nei database di riferimento interrogati: ClinVar (NCBI); Human Gene Mutation Database (HGMD), aggiornati alla data del prelievo.

Target Coverage

Si intende per *Target Coverage*, il numero medio di letture (*reads*) ottenute dal sequenziamento per ciascuna base nucleotidica costituente il gene. Il *Target Coverage* del test >500X.

Accuratezza del test GeneSafe™

L'esame ha dimostrato, in studi di validazione preclinica, una sensibilità >99% nel rilevare le mutazioni nei geni investigati, con percentuali di falsi positivi <0.1%. Sebbene l'errore del test sia basso, tuttavia non è escludibile.

Limiti del test GeneSafe™

Questo esame valuta solo le malattie genetiche ed i geni elencati in Tabella 1. Il test non evidenzia altre malattie genetiche o geni non specificamente investigati.

L'esame inoltre non è in grado di evidenziare:

- mutazioni localizzate nelle regioni introniche oltre ± 5 nucleotidi dai breakpoints;
- delezioni, inversioni o duplicazioni maggiori di 20 bp;
- mosaicismi.

GeneSafe™ è un **test di screening** e non è un test diagnostico. Benché questo test sia molto accurato, **i risultati non sono diagnostici** e devono essere valutati nel contesto del quadro clinico della gestante e dell'anamnesi familiare. Inoltre, l'esame non è sostitutivo della diagnosi prenatale invasiva (Villocentesi o Amniocentesi).

Il test è stato validato su gravidanze singole o gemellari, monozigotiche o dizigotiche, con almeno 10 settimane di gestazione.

Nelle **gravidanze gemellari** non è possibile distinguere la condizione del singolo feto. Nelle gravidanze che sono iniziate come gemellari o plurime, seguite dall'aborto spontaneo di uno o più feti con riassorbimento della camera gestazionale (*vanishing twin*), potrebbe essere presente nel sangue materno anche il DNA fetale libero del feto abortito. Ciò potrebbe interferire nella qualità dei risultati, determinando falsi positivi.

L'esistenza di una condizione tumorale (**metastasi**) nella gestante potrebbe determinare risultati del test falsi positivi dovuti a mutazioni del DNA tumorale circolante (ctDNA) a livello di geni coinvolti nel processo di cancerogenesi (es. BRAF, HRAS, NRAS).

Un risultato "**NEGATIVO - Basso rischio per malattia genetica**" riduce notevolmente le possibilità che il feto abbia le malattie genetiche esaminate, ma non può garantire che il feto sia sano.

Il test GeneSafe™ identifica esclusivamente mutazioni **con significato patologico noto**. Il test non ricerca **varianti con significato benigno**, cioè quelle riscontrabili in individui normali e sono prive di significato patologico, e **varianti con significato clinico incerto**, cioè quelle non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica. L'interpretazione delle varianti genetiche si basa sulle più recenti conoscenze disponibili al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti.


Per i limiti sopra esposti, in caso di risultato positivo si raccomanda di eseguire un colloquio con un genetista e la conferma del risultato attraverso l'analisi genetica su liquido amniotico o villi coriali.

GeneSafe™: Tempi di Refertazione

I tempi stimati di refertazione sono di circa **10 giorni** lavorativi. I tempi di refertazione, tuttavia, non sono perentori e potrebbero prolungarsi in caso di ripetizioni dell'esame, risultati non ottimali, approfondimenti dell'esame o dubbi interpretativi.

Il test GeneSafe™ come integrazione al test PrenatalSafe™

Il test GeneSafe™ fornisce informazioni in merito al rischio di malattie genetiche riscontrabili nel feto, ma non fornisce alcuna informazione rispetto alle aneuploidie fetali, né rispetto alle anomalie cromosomiche strutturali.

Al fine di ottenere la maggiore quantità di informazione possibile, mediante tecniche di screening prenatale non invasive, è utile abbinare il test  GeneSafe™ al test **PranatalSAFE™ Karyo**. Quest'ultimo test è in grado di individuare aneuploidie e anomalie strutturali cromosomiche su tutto il cariotipo fetale, fornendo un'informazione molto simile a quella ottenibile mediante analisi prenatale invasiva.

Alternative diagnostiche prenatali

Lo screening multigenico non invasivo di malattie genetiche, mediante analisi del DNA libero fetale nel sangue materno (cfDNA), è solo una delle opzioni per la gestante per determinare il rischio di patologie genetiche durante la gravidanza. Esistono diversi altri screening effettuabili in questo periodo. In particolare, un'indagine genetica molecolare più approfondita può essere ottenuta mediante "diagnosi prenatale invasiva", che può essere eseguita su villi coriali o liquido amniotico.

Il prelievo dei villi coriali (tessuto placentare che, pur essendo separato dal feto, ne contiene lo stesso DNA), o villocentesi, è effettuato tra la 11^a e la 12^a settimana di gestazione e consiste nel prelievo, sotto controllo ecografico, di un piccolo campione di villi coriali mediante una puntura attraverso l'addome materno. Tale prelievo comporta un rischio di aborto inferiore al 2%.

Il prelievo del liquido amniotico o amniocentesi viene eseguito mediante puntura transaddominale ecoguidata tra la 16^a e la 18^a settimana di gravidanza e comporta un rischio di aborto inferiore all'1%.

Informativa pre-test GeneSafe™

Genoma Group offre gratuitamente il servizio di informativa pre-test, sia telefonico che presso le proprie sedi, al fine spiegare alla gestante le finalità del test, benefici, limiti, e risultati ottenibili.

Consulenza genetica

Genoma Group offre gratuitamente il servizio di consulenza genetica, sia pre-test che post-test, presso le proprie sedi, al fine spiegare alla gestante le finalità del test, i risultati ottenibili, e i risultati emersi al completamento dell'esame, in particolar modo nei casi di riscontro patologico, con rischio elevato di patologia monogenica.

Bibliografia

1. Homsy J, Zaidi S, Shen Y, Ware JS, Samocha KE, Karczewski KJ, et al. De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies. *Science*. 2015;350:1262–6.
2. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, et al. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature*. 2013;498:220–3.
3. Sifrim A, Hitz M-P, Wilsdon A, Breckpot J, Turki SH A, Thienpont B, et al. Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nat Genet*. 2016;48:1060–5.
4. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet*. 2010;42:790–3.
5. Hoischen A, van Bon BWM, Rodríguez-Santiago B, Gilissen C, Vissers LELM, de Vries P, et al. De novo nonsense mutations in ASXL1 cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat Genet*. 2011;43:729–31.
6. Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*. 2014;515:216–21.
7. O'Roak BJ, Deriziotis P, Lee C, Vives L, Schwartz JJ, Girirajan S, et al. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet*. 2011;43:585–9.
8. Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N, Dlugos D, Eichler EE, et al. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*. 2013;501:217–21.
9. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BWM, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med*. 2012;367:1921–9.
10. Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet*. 2012;380:1674–82.
11. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J: Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 2010, 42:790–793.
12. Hoischen A, van Bon BW, Gilissen C, Arts P, van Lier B, Stehouwer M, de Vries P, de Reuver R, Wieskamp N, Mortier G, Devriendt K, Amorim MZ, Revencu N, Kidd A, Barbosa M, Turner A, Smith J, Oley C, Henderson A, Hayes IM, Thompson EM, Brunner HG, de Vries BB, Veltman JA: De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat Genet* 2010, 42:483–485.

13. Hoischen A, van Bon BW, Rodriguez-Santiago B, Gilissen C, Vissers LE, de Vries P, Janssen I, van Lier B, Hastings R, Smithson SF, Newbury-Ecob R, Kjaergaard S, Goodship J, McGowan R, Bartholdi D, Rauch A, Peippo M, Cobben JM, Wiczorek D, Gillessen-Kaesbach G, Veltman JA, Brunner HG, de Vries BB: De novo nonsense mutations in ASXL1 cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat Genet* 2011, 43:729–731.
14. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir AA, Wong WSW et al.: Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 2012, 488:471-475.
15. McRae J, et al.: Prevalence and architecture of de novo mutations in development disorders *Nature* 2017: 542:433-438.
16. Toriello et al., 2008