



OncoPed

Test genetico NGS sviluppato dal CGT Laboratory di Cogentech

Introduzione

OncoPed è il test molecolare innovativo proposto da Cogentech, basato su un processo tecnologico avanzato, denominato Next Generation Sequencing (NGS), che consente di rilevare la presenza di variazioni a livello del genoma del paziente. Queste variazioni includono sia le mutazioni puntiformi (sostituzioni, piccole delezioni/inserzioni o SNV) che i grandi riarrangiamenti (CNV) dovuti alla delezione/duplicazione di uno o più esoni dei geni in esame. Il test viene offerto a **livello germinale** ed include l'analisi di geni coinvolti nella **predisposizione** a tumori in età pediatrica, nonostante la tecnologia sia in grado di rilevare varianti anche a livello somatico. Il pannello consente di effettuare approfondimenti diagnostici molecolari nei geni di predisposizione al medulloblastoma, tumore di Wilms, alcuni tumori ovarici rari (Sertoly-Leydig e SCCOTH), retinoblastoma, melanoma/melanoma uveale, tumori renali, alcuni linfomi, tumori rabdoidi, tumori che si sviluppano nelle sindromi di Gorlin, di DICER1 e di Carney.

I geni compresi nella versione attuale del pannello sono elencati qui di seguito:

SUFU, PTCH1, DICER1, RB1, BAP1, POT1, PRKAR1A, SMARCB1, SMARCA4, TP53, APC, MUTYH, CDKN2A, CDK4, MITF, PTEN, VHL, WT1, FLCN, MET, FH, FBXW7, BRCA1, BRCA2, PALB2, CDH1, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2.

Come viene effettuato il test

Il test viene eseguito su DNA genomico estratto da un campione ematico del paziente (**campione germinale**) successivamente arricchito per i geni di interesse mediante la tecnica definita 'a cattura', in cui si usano sonde disegnate tramite un criterio che permette di selezionare specificatamente solo regioni ben definite. Nel dettaglio, le sonde sono state create sfruttando la tecnologia Agilent Sure Select, includendo le zone nucleotidiche degli esoni dei geni prescelti ed almeno 20 basi delle aree introniche adiacenti.

L'insieme dei frammenti genomici 'catturati' dalle sonde rappresenta le regioni arricchite dei geni d'interesse (libreria), che vengono successivamente sequenziati tramite un processo che impiega tecniche NGS e l'uso degli strumenti **MiSeq Dx** o **NextSeq 550 Dx** di Illumina.

Le varianti riscontrate vengono confermate con sequenziamento diretto Sanger oppure con Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), su seconda aliquota di sangue, qualora si trattasse di VUS (varianti a significato incerto) o di varianti patogeniche. Nel caso di varianti SNV in *PMS2* è previsto l'utilizzo di Long Range PCR per selezionare il gene rispetto agli pseudogeni. La piattaforma ABI3500 Dx Genetic Analyzer (Applied Biosystems) viene utilizzata sia per l'identificazione delle sequenze con metodo di Sanger che per i frammenti di MLPA. Le elaborazioni informatiche di questi dati vengono effettuate rispettivamente con software Mutation Surveyor e Gene Marker, entrambi venduti dalla ditta SoftGenetics.

L'analisi bioinformatica

Alla fine della fase di sequenziamento NGS, i dati vengono sottoposti a una serie di **analisi bioinformatiche** avanzate che includono:

- l'**analisi primaria**, ovvero la generazione delle sequenze (reads) e la valutazione della loro qualità;
- l'**analisi secondaria**, che consiste nell'appaiamento dei dati ottenuti con le corrispondenti regioni del genoma scelto come riferimento (GRCh37-hg19): si definisce la presenza di eventuali varianti SNV o di CNV;
- l'**analisi terziaria**, che permette l'interpretazione delle varianti, a cui segue eventualmente l'emissione di un referto di diagnosi molecolare.

Mentre l'analisi primaria viene effettuata dal sequenziatore NGS, le altre sono eseguite da una procedura automatizzata (**pipeline**) sviluppata in collaborazione con una ditta esperta del settore (enGenome). La **pipeline** è stata creata in modo da:

- evidenziare eventuali regioni di interesse con bassa copertura di sequenziamento: queste zone verranno rianalizzate tramite il sequenziamento col metodo di Sanger, per garantire sempre una copertura della regione di interesse del 100%;
- generare risultati relativi ai soli geni richiesti.



Verifica del pannello

La robustezza del pannello OncoPed è stata verificata confrontando i dati ottenuti con questo pannello con quelli ricavati dall'analisi dello stesso campione esaminato con il pannello OncoPan® o con un differente approccio NGS (WES, Whole Exon Sequencing). Sono stati assegnati i valori di *specificità* e *sensibilità*, indagando alcuni geni comuni a tutti gli approcci, relativamente agli esoni codificanti e alle sequenze introniche adiacenti (-21 o +7 paia di basi dalle giunzioni di splicing, per le SNV).

| | SNV | CNV |
|-------------|-------|-------|
| Sensibilità | 99.9% | 99.9% |
| Specificità | 100% | 99.9% |

Elenco degli esiti di questa analisi

Limiti del pannello

Quest'analisi non è in grado di evidenziare varianti introniche profonde, riarrangiamenti genomici, espansioni di triplette e mosaicismi della linea germinale sotto il 10% di frequenza dell'allele meno rappresentato.

Conclusioni

Il pannello OncoPed si è dimostrato affidabile nei limiti dei valori riportati. Per migliorare sempre più l'accuratezza dell'analisi CNV, saranno aggiunti ulteriori dati per irrobustirne la 'baseline', ovvero l'insieme di controlli necessari al processo per valutare la variazione della profondità di lettura delle regioni indagate, con particolare attenzione a quei geni che nel genoma umano hanno dei corrispondenti pseudogeni (PMS2). La **profondità di lettura** media ottimale (calcolata rispetto a tutte le regioni di ogni campione) è stata stimata intorno a 200x, con un minimo di 30X.

Infine ogni regione sequenziata con tecnica NGS viene visualizzata tramite il programma IGV (Integrative Genomics Viewer del Broad Institute), per ridurre ulteriormente la possibilità di avere falsi negativi.