COLONSCREEN

REV.00 DEL01/07/2016

IL TEST COLONSCREEN®

Il ColonScreen® è un test diagnostico che permette di eseguire un'analisi genetica multipla **per valutare la predisposizione allo sviluppo del tumore al Colon-retto o della Poliposi Adenomatosa Familiare**. Il test, quindi, permette di identificare le pazienti a rischio di insorgenza delle suddette neoplasie attraverso l'analisi del loro DNA.

L'esame ColonScreen® prevede una consulenza pre e post test con il medico genetista della Bios SpA, al fine di consentire al cliente una corretta comprensione delle finalità e del risultato dell'indagine. La consulenza è gratuita per coloro che decidono di eseguire il ColonScreen®.

IL TUMORE

Il tumore, oggi, può essere considerato una patologia a componente genetica caratterizzata da una crescita cellulare incontrollata. Le cellule del nostro corpo ricevono dei segnali che indicano loro quando crescere e moltiplicarsi e quando tale crescita deve arrestarsi. Nel tumore tali cellule, a causa di alterazioni del proprio patrimonio genetico, non rispondono ai segnali di controllo e crescono e si moltiplicano irregolarmente diffondendosi in diverse parti del corpo. L'evento che determina l'alterazione della funzione dei geni viene definito **"mutazione"**. Quando un gene subisce una mutazione per varie cause (biologiche, chimiche, fisiche), le informazioni che arriveranno alla cellula saranno improprie per le funzioni a cui è deputata.

I TUMORI EREDITARI

Le neoplasie sono per lo più patologie multifattoriali alla cui insorgenza partecipano fattori di rischio di tipo costituzionale e ambientale. La maggior parte dei tumori sono cosiddetti **"sporadici"**, cioè si manifestano nella popolazione generale senza che ci siano elementi che facciano sospettare la presenza di un chiaro fattore predisponente su base genetica. In questo genere di tumori, le **alterazioni del DNA (mutazioni)** si sviluppano casualmente a livello delle cellule somatiche, cioè quelle cellule che costituiscono ogni organo ed apparato del nostro organismo. Queste mutazioni si originano nel DNA di un ristretto gruppo di cellule e determineranno l'errore genetico che si perpetuerà nelle discendenti di quelle cellule, le quali accumulandosi in un determinato organo si sostituiranno inizialmente al tessuto sano per poi diffondersi in altri organi vicini o a distanza (metastasi). Esistono però delle forme di tumore che possono essere definite **"familiari"**, in quanto le persone affette della famiglia presentano fra di loro uno stretto legame di parentela. La familiarità costituisce, senz'altro, un importante fattore di rischio, per lo più dovuto alla condivisione di fattori di rischio ambientali comuni (abitudini di vita, dieta, inquinanti, etc.), senza che vi sia una specifica alterazione genetica predisponente alla malattia. Solo una piccola, anche se significativa, percentuale dei tumori sono cosiddetti **"ereditari"**. Oggi si stima che circa il **10 % dei tumori colon-rettali** abbiano una componente **ereditaria**. In questi tumori le mutazioni del DNA insorgono a livello delle cellule germinali o riproduttive e quindi potranno essere trasmesse alla progenie. L'individuo avrà alla nascita quel difetto genetico su uno o più geni in tutte le cellule dell'organismo, e sarà quindi predisposto a sviluppare una neoplasia quando, nel corso della vita, altre mutazioni si sommeranno a quella predisponente. Ogni persona all'atto del suo concepimento, acquisisce due copie di ciascun gene, una copia viene trasmessa dal padre ed una dalla madre: eventuali alterazioni geniche presenti nel patrimonio genetico dei genitori verranno pertanto trasmesse ai figli. Se uno dei genitori presenta una mutazione a livello di uno dei geni coinvolti nell'insorgenza di un determinato tumore (ereditario), **i figli possiedono il 50% di probabilità di ereditare quella mutazione**. Le persone che ereditano una mutazione germinale in questi geni nascono con una copia del gene mutata. Queste persone **non ereditano il tumore, ma solamente la predisposizione a sviluppare più facilmente quel tumore** rispetto alla popolazione generale.

COLONSCREEN

REV.00 DEL01/07/2016

PER CHI È INDICATO IL TEST COLONSCREEN®

Il test di predisposizione genetica è indirizzato a quelle persone che ad una approfondita anamnesi familiare risultano con elevata e specifica incidenza di malattie neoplastiche nelle generazioni precedenti, e pertanto ad elevato rischio di essere portatori di mutazione germinale.

Si può sospettare una forma ereditaria di neoplasia quando in una famiglia vi sono:

- diversi soggetti affetti dallo stesso tipo di tumore o tumori correlati,
- soggetti affetti da tumori multipli,
- tumori insorti in età giovanile.

In particolare:

- Tumore colon-rettale diagnosticato 50 anni;
- Tumori all'utero od ovarici con una storia familiare di tumori gastrointestinali;
- Soggetti con più di un tumore associato a Sindrome di Lynch (es. tumore colon-rettale ed uterino);
- Tre o più casi in famiglia di tumore colon-rettale, ovarico, uterino, gastrico o altri tumori associati a Sindrome di Lynch;
- Risultati del test di instabilità dei Microsatelliti o di immonoistochimica nel tumore indicanti una ridotta capacità di riparazione degli errori di replicazione del DNA;
- Tumori primari multipli nello stesso paziente;
- Più membri della famiglia (sullo stesso lato) con tumore colon-rettale o altri tipi di tumore.
- Una mutazione nota in famiglia in uno dei geni associati alla predisposizione ai tumori colon-rettali / poliposi familiare

Il genetista, con il consenso informato della persona, deciderà se è indicato procedere con il test diagnostico di mutazione del DNA.

QUALI SONO I BENEFICI DEL TEST COLONSCREEN®

La possibilità di individuare i soggetti a rischio di sviluppare una neoplasia rappresenta oggi il miglior metodo per giungere ad una diagnosi precoce del tumore e quindi per ridurre la mortalità in tale patologia.

I membri di famiglie ad alto rischio ereditario, ed in particolare chi è stato interessato direttamente da una neoplasia, può richiedere una consulenza genetica e discutere con il genetista circa la propria situazione clinicogenetica.

Tale valutazione potrà promuovere il test genetico per accertare se il paziente è portatore di una mutazione che predispone allo sviluppo di un tumore specifico. In caso di positività del test l'accertamento potrà essere esteso ai familiari del paziente, al fine di individuare i soggetti a rischio.

L'informazione ottenuta dal test genetico può apportare notevoli **benefici**, quali:

- L'identificazione dei membri di una famiglia che sono ad **alto rischio di sviluppare il tumore**;
- L'organizzazione di un adeguato **programma di controllo medico** riservato ai soggetti ad alto rischio, in maniera tale da facilitare la diagnosi precoce all'insorgenza del tumore;
- La conoscenza della possibilità di **trasmissione delle mutazioni geniche** alla progenie e l'individuazione dei soggetti figli, con mutazioni geniche germinali, ad alto rischio;
- La valutazione di eventuali indicazioni a terapie di **profilassi preventiva**.

COLONSCREEN

REV.00 DEL01/07/2016

COME VIENE EFFETTUATO IL TEST COLONSCREEN®

Il test viene eseguito mediante il prelievo di un campione ematico. Tramite un'analisi complessa di laboratorio, Il DNA viene isolato dalle cellule nucleate ed **amplificato mediante tecnica PCR**.. Successivamente, attraverso un processo tecnologico avanzato di **sequenziamento massivo parallelo (MPS)**, che impiega tecniche di ***Next Generation Sequencing*** (NGS) utilizzando sequenziatori **ILLUMINA**, si sequenziano completamente, ad elevata profondità di lettura, **12 geni** (esoni e regioni introniche adiacenti, ± 5 nucleotidi)(Tabella 1) coinvolti nella maggior parte dei casi di predisposizione ereditaria allo sviluppo del tumore al Colon-retto o della Poliposi Adenomatosa Familiare:

MLH1	**EPCAM**
MSH2	**BMPR1A**
MSH6	**MUTYH**
APC	**SMAD4**
PMS1	**STK11**
PMS2	**PTEN**

Le sequenze geniche ottenute vengono analizzate attraverso un'avanzata analisi bioinformatica, perdeterminare la presenza di eventuali mutazioni nei geni in esame.

RISULTATI OTTENIBILI CON IL TEST COLONSCREEN®

"POSITIVO" - **Presenza di una o più mutazioni:** indica che il test ha rilevato una o più mutazioni a livello di uno (o più) geni responsabile della predisposizione ereditaria allo sviluppo del del tumore al Colon-retto o della Poliposi Adenomatosa Familiare, cioè presentano una copia del gene mutata. Il nostro genetista, in sede di consulenza genetica, spiegherà in maniera dettagliata il significato del risultato del test, fornendo una stima in termini probabilistici riguardo il rischio di sviluppare il tumore specifico, associato a quel tipo di mutazione riscontrata in un particolare gene. Un risultato positivo non significa che il paziente ai cui è stata riscontrata una mutazione svilupperanno necessariamente il tumore, ma solamente che quel paziente ha una **predisposizione a sviluppare il tumore**, cioè possiede un **rischio maggiore** rispetto ad una persona che non presenta la specifica mutazione. Infatti, non tutte le persone che sono portatrici di mutazione sviluppano la patologia neoplastica; sebbene queste mutazioni aumentano notevolmente il rischio di insorgenza del tumore, questo non si sviluppa finché la copia normale del gene corrispondente non viene soggetta a mutazione nel corso della vita. Poiché ciascuna persona eredita due copie dello stesso gene, deve incorrere un evento mutazionale in ciascuna copia per sopprimere la funzione di quel gene; l'acquisizione di una nuova mutazione può quindi provocare direttamente l'insorgenza del tumore. L'identificazione di una mutazione predisponente permette di stabilire un protocollo di controlli clinici ravvicinati e di valutare l'opportunità di interventi preventivi. Permette inoltre di estendere l'esame ad altri familiari a rischio che desiderino eseguirlo. In questi ultimi l'analisi ha valore di test predittivo, perché consente di distinguere, all'interno di queste famiglie, i soggetti portatori della mutazione dai non portatori, identificando con precisione gli individui che presentano un elevato rischio di tumore e coloro il cui rischio è paragonabile a quello della popolazione generale. In questo modo, i primi potranno essere avviati in maniera mirata a specifici programmi di sorveglianza, al fine di una diagnosi precoce, o di profilassi, mentre i secondi potranno essere indirizzati ai controlli previsti per la popolazione generale.

COLONSCREEN

REV.00 DEL01/07/2016

Le mutazioni riscontrabili tramite il test ColonScreen® possono rientrare nelle seguenti categorie prognostiche:

- **con significato patologico noto**;
- **con significato benigno** in quanto sono riscontrabili in individui normali e sono prive di significato patologico;
- **con significato incerto** in quanto non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica. In questo caso possono essere necessari ulteriori indagini per chiarire il significato della variante.

"NEGATIVO" - Assenza di mutazioni: indica che il test non ha rilevato la presenza di mutazioni nei geni esaminati. Tuttavia è importante sottolineare che un risultato negativo non significa che il paziente ha rischio zero di sviluppare un tumore; queste persone possiedono lo stesso rischio di tumore riportato per la popolazione generale, ciò perché la maggior parte di questo genere di tumori si estrinseca in forma sporadica.

STATISTICHE DI RISCHIO

Carcinoma del colon ereditario non poliposico (HNPCC - Hereditary Non-Polyposys Colon Cancer) L'HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer* - **HNPCC**), conosciuta anche come Sindrome di Lynch, è una malattia tumorale **autosomica dominante** caratterizzata da due manifestazioni fenotipiche: La **sindrome di Lynch I**, che è caratterizzata dall'insorgenza di una neoplasia al colon ad un'età media di circa 45 anni. La **sindrome di Lynch II**, che oltre al tumore al colon comprende lo sviluppo di **neoplasie extracoloniche**, a livello dell'endometrio, dell'ovaio, dello stomaco, del tratto urinario, dei dotti biliari. L'HNPCC è causata da un evento mutazionale ricorrente a livello di uno dei 4 geni attualmente conosciuti essere coinvolti nel controllo e nella riparazione degli errori di replicazione del DNA in tutte le cellule del corpo. Circa il **90%** delle mutazioni avvengono a livello dei geni **MSH2 e MLH1** (60% in MSH2 e 30% in MLH1) mentre solo raramente coinvolgono i geni PMS1 e PMS2. Quando avviene un evento mutazionale a livello di uno di questi geni, la capacità di effettuare la riparazione degli errori intercorsi durante la duplicazione del DNA diminuisce, e di conseguenza le mutazioni iniziano ad accumularsi nella cellula, conducendo allo sviluppo neoplastico. Nella **popolazione generale**, il rischio di sviluppare un **tumore al colon** nel corso della vita è attualmente stimato intorno al **6%**. Per quei pazienti (sia uomini che donne) che sono **portatori di mutazioni HNPCC**, il rischio di sviluppare il tumore al colon è stimato intorno al **75-90%**. Le neoplasie extracoloniche rappresentano un'importante complicazione, la più comune delle quali è rappresentata dal tumore all'**endometrio**, il cui rischio complessivo è stato valutato intorno al **30%**, contro il **3%** della **popolazione generale**. Il rischio di sviluppare un tumore ovarico è **3.5 volte più alto** e può ricorrere 20 anni prima rispetto alla popolazione di riferimento.

La **Poliposi Adenomatosa Familiare** (FAP o Adenomatosis coli o Poliposi Familiare del colon-retto) è una sindrome relativamente rara caratterizzata dalla comparsa, di solito in età giovanile, di centinaia o migliaia di adenomi distribuiti nei vari segmenti del grosso intestino. Se non trattata, la FAP progredisce quasi invariabilmente verso lo sviluppo di uno o più carcinomi colorettali, di solito nella terza o quarta decade di vita; la comparsa di lesioni maligne può essere prevenuta attraverso un'attenta sorveglianza endoscopica ed un tempestivo intervento chirurgico. La FAP rappresenta pertanto una condizione precancerosa "obbligata", nel senso che l'individuo affetto e non trattato in tempo va incontro al manifestarsi di un carcinoma invasivo con certezza pressoché assoluta. La FAP è una malattia ereditaria, autosomica dominante, solitamente ad elevata penetranza; ne consegue che un'attenta analisi dell'albero genealogico può permettere di individuare in ogni fratria i soggetti a rischio, nei quali iniziare una accurata sorveglianza endoscopica. Oggi ciò è reso ancor più agevole grazie all'identificazione del gene responsabile, quando mutato, della malattia (gene APC, Adenomatous Polyposis Coli). In un sottotipo di pazienti, una mutazione nel gene MUTYH (1p34.1) causa una poliposi autosomica recessiva, la poliposi adeno-

COLONSCREEN

REV.00 DEL01/07/2016

matosa familiare legata a MUTYH, caratterizzata da un leggero aumento del rischio di sviluppare tumori colon-rettali e polipi/adenomi nel tratto gastrointestinale superiore e inferiore.

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 patogenetiche noto o con significato incerto, sulla base dei dati della letteratura scientifica e la classificazione presente nel database di riferimento Human Gene Mutation Database (HGMD), aggiornato alla data del prelievo. Inoltre, seguendo le indicazioni dell'American College of Medical Genetics (ACMG), sono state considerate come patogenetiche o presunte patogenetiche solo le mutazioni con un valore di Minor Allele Frequency (MAF) <5% (1000 Genomes Project), riferibile come la frequenza di ricorrenza dell'allele meno comune all'interno della popolazione.

TARGET COVERAGE

Si intende per Target Coverage, il numero medio di letture (reads) ottenute dal sequenziamento per ciascuna base nucleotidica costituente il gene. Le varianti con una profondità di lettura (numero di reads) inferiore a 30X non vengono evidenziate dall'algoritmo di analisi bioinformatica.

LIMITI DEL TEST COLONSCREEN®

Le tecniche attuali di sequenziamento del DNA producono risultati con un'accuratezza superiore al 99%. Benché questo test sia molto accurato bisogna sempre considerare i limiti dell'esame, di seguito descritti.
Questo esame valuta solo i geni elencati in Tabella 1, e 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 della linea germinale (cioè mutazioni presenti solo nei gameti). Un risultato **"NEGATIVO" - Assenza di mutazioni** per i geni investigati non esclude la possibilità di essere portatori di una mutazione localizzata in una regione del genoma non investigata dall'esame. E' possibile che alcune zone del proprio DNA non possano essere sequenziate o che abbiano una copertura inferiore ai limiti fissati dagli esperti di GENOMA Group per garantire un'analisi accurata delle varianti. Queste regioni non saranno quindi comprese nell'analisi qualora non superino gli standard qualitativi richiesti. In alcuni casi, il risultato di un'analisi genomica può rivelare una variante o mutazione del DNA con un significato clinico non certo o determinabile in base alle attuali conoscenze medico-scientifiche. 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.Alcune patologie possono essere causate o regolate da più di una variante nel suo DNA in uno o più geni. Alcune di queste varianti possono non essere ancora state identificate o validate dalla comunità scientifica e quindi non essere riportate come patogenetiche al momento dell'analisi. Limite intrinseco della metodologia NGS utilizzata è la mancanza di uniformità di coverage per ciascuna regione genica analizzata. Tale limite si traduce nella possibilità, insita nelle metodiche NGS, che specifiche mutazioni dei geni selezionati potrebbero non essere state rilevate dal test. Esame eseguito in collaborazione con laboratori fiduciari altamente specializzati in genetica medica.

LA DIREZIONE

COLONSCREEN

REV.00 DEL01/07/2016

TABELLA 1: COLONSCREEN® - ELENCO DEI GENI ANALIZZATI E DELLE PATOLOGIE NEOPLASTICHE INVESTIGATE

1	Adenomatous polyposis coli ***(Colorectal, duodenal, liver, thyroid, pancreatic, CNS)***	**APC**
2	Polyposis syndrome ***(Colorectal, stomach, pancreatic)***	**BMPR1A**
3	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 8 ***Colorectal, uterine, stomach,ovarian, small bowel, hepatobiliary, urinary tract, brain, pancreatic, sebaceous***	**EPCAM**
4	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 2 ***Colorectal, uterine, stomach, ovarian, small bowel, hepatobiliary, urinary tract, brain, pancreatic, sebaceous***	**MLH1**
5	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 1 ***Colorectal, uterine, stomach, ovarian, small bowel, hepatobiliary, urinary tract, brain, pancreatic, sebaceous***	**MSH2**
6	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 5 Endometrial cancer, familial ***Colorectal, uterine, stomach, ovarian, small bowel, hepatobiliary, urinary tract, brain, pancreatic, sebaceous***	**MSH6**
7	Adenomas, multiple colorectal Colorectal adenomatous polyposis, autosomal recessive, with pilomatricomas Gastric cancer, somatic ***Breast, colorectal***	**MUTYH**
8	Mismatch repair cancer syndrome	**PMS1**
9	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 4 ***Colorectal, uterine, stomach, ovarian, small bowel, hepatobiliary, urinary tract, brain, pancreatic, sebaceous***	**PMS2**

COLONSCREEN

REV.00 DEL01/07/2016

10	Endometrial carcinoma, somatic Malignant melanoma, somatic Squamous cell carcinoma, head and neck, somatic Thyroid carcinoma, follicular, somatic Glioma susceptibility 2 Meningioma Prostate cancer, somatic ***Breast, uterine, kidney, thyroid, colorectal***	**PTEN**
11	Juvenile polyposis/hereditary hemorrhagic telangiectasia syndrome Pancreatic cancer, somatic Polyposis, juvenile intestinal	**SMAD4**
12	Peutz-Jeghers syndrome Pancreatic cancer Testicular tumor, somatic ***Small bowel, colorectal, pancreatic, breast, ovarian***	**STK11**