

**RACCOMANDAZIONI PER LA DIAGNOSI DI CONDIZIONI  
PREDISPONENTI ALLO SVILUPPO DI SINDROMI  
MIELODISPLASTICHE/MIELOPROLIFERATIVE IN AMBITO  
PEDIATRICO.**

**RICCARDO MASETTI<sup>1</sup>, LUCIA PEDACE<sup>2</sup>, FRANCESCA VENDEMINI<sup>3</sup>, KATIA GIRARDI<sup>2</sup>, RITA DEVITO<sup>4</sup>, TIZIANA COLIVA<sup>3</sup>, MARCO ZECCA<sup>5</sup>, MARCO TARTAGLIA<sup>6</sup>, FRANCO LOCATELLI<sup>2,7</sup>**

<sup>1</sup> Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna

<sup>2</sup> Dipartimento di Onco-Ematologia e Terapia Cellulare e Genica IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>3</sup> UOS Ematologia Pediatrica, Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca, Fondazione MBBM, ASST Monza

<sup>4</sup> UOC di Anatomia Patologica, Dipartimento dei laboratori, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>5</sup> Ematologia - Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento Salute della Donna e del Bambino, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

<sup>6</sup> Area di Ricerca Genetica e Malattie Rare, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>7</sup> Sapienza Università di Roma

## SOMMARIO

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>2</b>
<b>COME IDENTIFICARE UN PAZIENTE AFFETTO DA SINDROME PREDISPONENTE A MALATTIA MIELODYSPLASTICA/MIELOPROLIFERATIVA .....</b>	<b>5</b>
<b>FAMILIARI SANI.....</b>	<b>7</b>
<b>RICERCA DI MUTAZIONI GERMINALI IN SOSPETTA SINDROME DI PREDISPOSIZIONE A SINDROME MIELODISPLASIA/LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE MEDIANTE ANALISI DI SEQUENZIAMENTO MASSIVO PARALLELO .....</b>	<b>10</b>
<b>CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE.....</b>	<b>13</b>
<b>CENTRALIZZAZIONE DEI CAMPIONI BIOLOGICI.....</b>	<b>13</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>15</b>
<b>APPENDICE A: Modulo inoltro campioni biologici .....</b>	<b>17</b>
<b>APPENDICE B: Consenso informato all'esecuzione del test genetico .....</b>	<b>20</b>

Le sindromi mielodisplastiche (MDS) sono un gruppo eterogeneo di disordini ematopoietici clonali caratterizzati da ematopoiesi inefficace, citopenia e rischio di sviluppare leucemia acuta mieloide (LAM) per le quali, nella maggioranza dei casi, il ricorso al trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) rappresenta l'unico approccio curativo. Le MDS sono patologie frequenti nell'adulto e nell'anziano, mentre rappresentano condizioni rare in età pediatrica con un'incidenza annuale di 1-4 casi per milione nei pazienti di età inferiore a 18 anni e costituiscono meno del 5% delle neoplasie ematologiche maligne dell'età pediatrica (tabella 1) [1-2]. Sono rappresentate dalla citopenia refrattaria dell'infanzia (RCC), che rappresenta la variante più comune delle MDS in età pediatrica, e da MDS cosiddette “*advanced*”, ovvero quadri caratterizzati dalla presenza di un eccesso di blasti (EB) come riportato nella tabella di seguito [1].

	% Blasti sangue midollare	% Blasti sangue periferico
<b>Citopenia refrattaria (RCC)</b>	<5%	<2%
<b>MDS con eccesso di blasti (MDS-EB)</b>	5-20%	≥2%
<b>MDS-EB in trasformazione (MDS-EB-t)</b>	20-29%	20-29%

**Tabella 1:** MDS dell'età pediatrica

A differenza di quanto osservato nell'adulto dove nella maggior parte dei casi le sindromi mielodisplastiche sono associate a mutazioni somatiche, in età pediatrica la presenza di condizioni genetiche costituzionali predisponenti è riconoscibile ad oggi in più di un terzo dei pazienti che sviluppano MDS [1]. Oltre alla nota correlazione tra sindromi da insufficienza midollare ereditaria (IBMFs) e MDS, negli ultimi anni sono state identificate sempre più frequentemente mutazioni germinali che concorrono allo sviluppo di MDS e che definiscono le cosiddette sindromi di

predisposizione alle MDS [3]. L'ampia diffusione di tecniche di analisi molecolare e l'emergente utilizzo del sequenziamento massivo parallelo hanno infatti consentito di identificare mutazioni in numerosi geni come *CEBPA*, *GATA2*, *SAMD9/SAMD9L*, *ETV6*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *SRP72* [4-13], che definiscono sindromi familiari che predispongono allo sviluppo di MDS e/o leucemia acuta correlate a quadri clinici eterogenei.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha recentemente messo in evidenza il ruolo cruciale della ricerca di mutazioni familiari nel processo diagnostico delle leucemie (Tabella 2) includendo una sezione relativa alle predisposizioni nella più recente classificazione delle neoplasie mieloidi [14]. L'identificazione di una mutazione germinale in un paziente affetto da MDS/LAM permette infatti di garantire la gestione diagnostica e terapeutica più appropriata del probando e dei familiari potenziali portatori della mutazione causativa della malattia. Un esempio della rilevanza del riconoscimento di tali mutazioni è evidenziato nella gestione dei pazienti pediatrici affetti da citopenia refrattaria (RCC) e mutazione germinale in *GATA2*: in questi bambini, in considerazione dell'elevato rischio di evoluzione verso forme di MDS *advanced*, non è raccomandato il ricorso alla terapia immunosoppressiva ma l'utilizzo del TCSE come unico approccio curativo [1].

Queste raccomandazioni hanno lo scopo di guidare il clinico al riconoscimento di pazienti pediatrici affetti da sindromi genetiche predisponenti allo sviluppo di MDS per orientare l'approccio terapeutico e il riconoscimento precoce di familiari portatori della mutazione.

La gestione di pazienti affetti da IBMFS esula dagli obiettivi di questo documento essendo già presenti in letteratura raccomandazioni specifiche per patologia (15-18).

<p><b>Neoplasie mieloidi in assenza di disordini preesistenti o disfunzione d'organo</b></p> <p>Leucemia mieloide acuta con mutazione germinale di <i>CEBPA</i></p> <p>Neoplasie mieloidi con mutazione germinale di <i>DDX41</i>*</p>
<p><b>Neoplasie mieloidi associate a disordine piastrinico preesistente</b></p> <p>Neoplasie mieloidi con mutazione germinale di <i>RUNX1</i>*</p> <p>Neoplasie mieloidi con mutazione germinale di <i>ANKRD26</i>*</p> <p>Neoplasie mieloidi con mutazione germinale di <i>ETV6</i>*</p>
<p><b>Neoplasie mieloidi associate ad altre disfunzioni d'organo</b></p> <p>Neoplasie mieloidi con mutazione germinale di <i>GATA2</i></p> <p>Neoplasie mieloidi associate a sindromi da insufficienza midollare</p> <p>Neoplasie mieloidi associate ad alterazione dei telomeri</p> <p>JMML associate a neurofibromatosi, sindrome di Noonan o sindromi relate</p> <p>Neoplasie mieloidi associate a sindrome di Down*</p>

**Tabella 2:** Classificazione delle neoplasie mieloidi associate a mutazioni germinali in geni noti

\*Associazione anche con neoplasie linfoidi

Da Arber et al, Blood 2016, 127:2391-2405 [14]

In ogni paziente pediatrico che sviluppa MDS è importante valutare con attenzione l'anamnesi familiare e personale alla ricerca di condizioni suggestive di una sindrome di predisposizione a mielodisplasia. Tali elementi possono essere rappresentati da una chiara storia familiare di MDS o LAM o da elementi anamnestici e clinici sfumati che richiedono un alto indice di sospetto per giungere alla diagnosi corretta. È importante sottolineare che lo spettro fenotipico delle sindromi di predisposizione alle MDS rimane in gran parte indefinito e che la penetranza incompleta e l'espressività variabile osservate in queste condizioni possono rendere ulteriormente difficoltosa la diagnosi. Tra i dati laboratoristici che rappresentano un ausilio diagnostico, la presenza di anomalie citogenetiche, in particolare di una monosomia del cromosoma 7, dovrebbe sollevare il sospetto di una predisposizione genetica.

All'**anamnesi familiare** è rilevante ricercare una storia di insufficienza midollare, citopenia prolungata (in particolare trombocitopenia), facile sanguinamento, macrocitosi, disordini emopoietici insorti in giovane età e dismorfismi peculiari (Figura 1, Tabella 3).

All'**anamnesi personale** e alla **valutazione obiettiva** del probando è importante mettere in evidenza una storia di prematurità, basso peso alla nascita, infezioni atipiche e severe, disordini di cute e sottocute, anomalie immunitarie, fibrosi polmonare e proteinosi alveolare, insufficienza surrenalica, ipoplasia gonadica, disordini neurologici quali ritardo dello sviluppo psicomotorio, sordità neurosensoriale e atassia, citopenia (in particolare trombocitopenia) preesistente alla diagnosi di MDS/LAM, tendenza al sanguinamento e macrocitosi.

Le indagini di laboratorio basali da eseguire nel probando sono rappresentate da:

- esame emocromocitometrico con striscio di sangue periferico, elettroforesi dell'emoglobina, funzionalità epato-renale, immunoglobuline sieriche, sottopopolazioni linfocitarie;

- aspirato midollare e biopsia ossea per valutazione morfologia e cellularità midollare;
- citogenetica convenzionale e FISH su sangue midollare;
- dosaggio di tripsinogeno, amilasi sieriche, test funzionali come DEB test e analisi della lunghezza dei telomeri per escludere IBMFS.

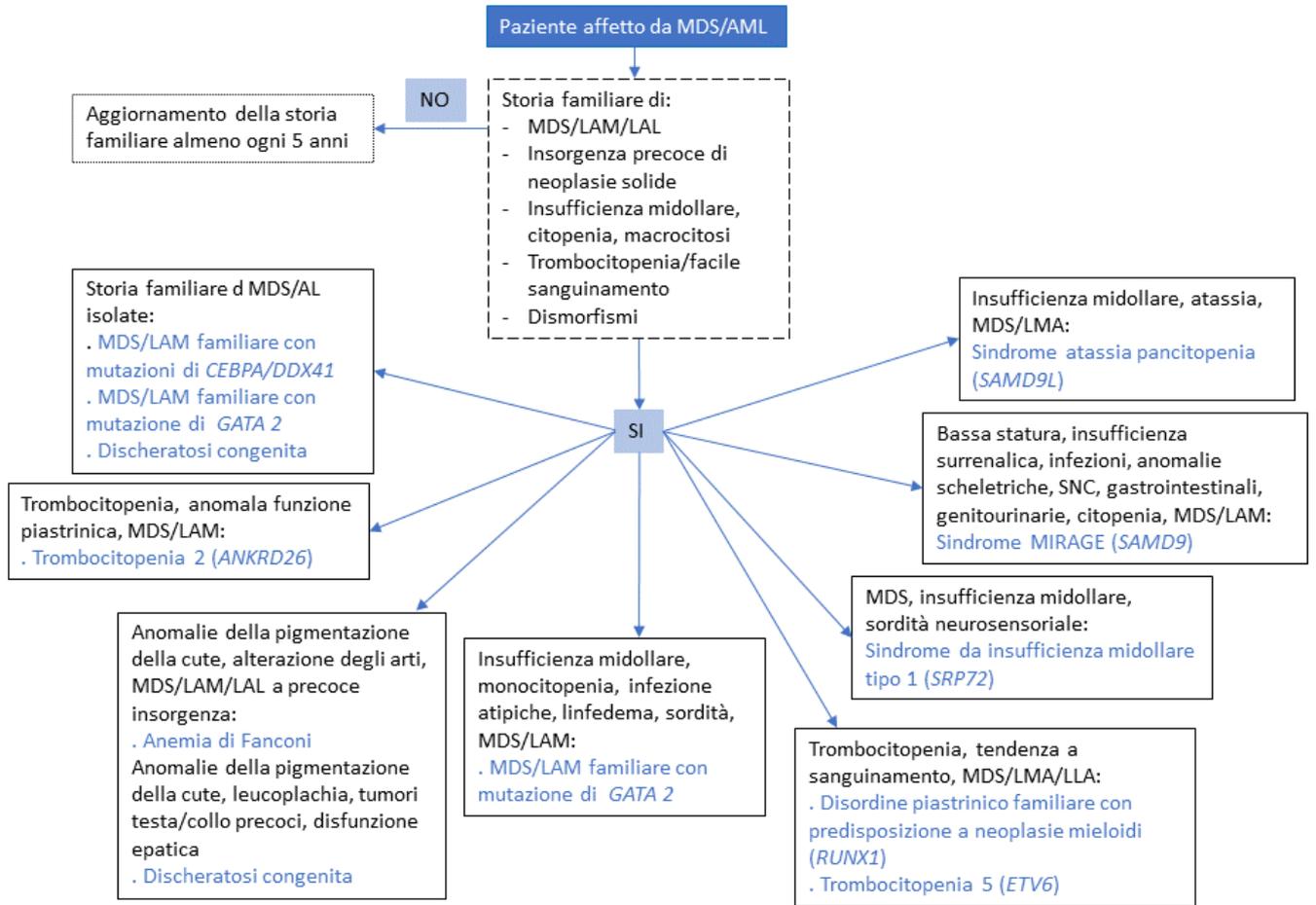
L'insieme di dati anamnestici e clinico-laboratoristici possono suggerire il sospetto diagnostico di sindrome di predisposizione alle MDS e quindi la presenza di mutazioni germinali in geni associati (Tabella 3):

- Linfedema primario, panniculite, eritema nodoso, sordità neurosensoriale, ipertelorismo, proteinosi alveolare polmonare, malformazioni artero-venose, immunodeficienza con riduzione del numero di monociti, linfociti B, NK, neutrofili e linfociti CD4, predisposizione a infezioni disseminate da micobatteri atipici e herpesvirus (da verruche cutanee e genitali ricorrenti a infezioni severe): mutazione germinale di *GATA2* [5-6]
- Insufficienza surrenalica, ipoplasia gonadica, ritardo dello sviluppo psicomotorio, predisposizione a infezioni severe, diarrea cronica, piastrinopenia, anemia: mutazione germinale di *SAMD9* [7]
- Atassia cerebellare, iperreflessia tendinea, nistagmo, dismetria, disartria e citopenia di vario grado: mutazione germinale di *SAMD9L* [8]
- Sordità neurosensoriale, citopenia di vario grado: mutazione germinale di *SRP72*
- Trombocitopenia (mutazione germinale di *ETV6* [9], *RUNX1* [10], *ANKRD26* [11]), piastrine di aspetto pallido per riduzione di alfa-granuli (*ANKRD26*) tendenza al sanguinamento (*RUNX1*, *ETV6*, *ANKRD26*), macrocitosi (*ETV6*) ed eczema (*RUNX1*).

I familiari sani di un paziente affetto da sindrome da predisposizione a MDS/LAM, dovrebbero essere valutati da un genetista clinico con esperienza in campo onco-ematologico per ottenere indicazioni relative alle indagini diagnostiche e ottimizzare la presa in carico del paziente.

Se la mutazione patogenetica del probando è nota, questa dovrebbe essere ricercata nei familiari indipendentemente dal quadro clinico, essendo lo spettro fenotipico di malattia generalmente eterogeneo anche tra individui che condividono la stessa mutazione. Tale approccio è importante sia per escludere potenziali donatori di cellule staminali ematopoietiche affetti sia per definire l'adeguato *follow up* del familiare portatore della mutazione.

I familiari sani, portatori di una mutazione predisponente, dovrebbero essere sottoposti ad accertamenti per escludere la presenza di neoplasie non ancora diagnosticate e a un monitoraggio con emocromo ogni 6 mesi. L'esecuzione di un aspirato midollare è raccomandata per ottenere una valutazione morfologica basale che rappresenti un riferimento per il successivo follow-up [11, 19]. Nel caso in cui le conte cellulari su sangue periferico dovessero mettere in evidenza significative modificazioni rispetto alla condizione basale è raccomandata una ripetizione dell'esame a 1-2 settimane di distanza. Nel caso di persistenza di tali alterazioni la ripetizione dell'aspirato midollare è fortemente raccomandata.



**Figura 1:** Algoritmo diagnostico per l'identificazione clinica di sindromi di predisposizioni alle MDS/LAM. LAL: Leucemia acuta linfoblastica.

<b>Domanda</b>	<b>Considera</b>
Qualcuno nella famiglia del bambino presenta valori dell'emocromo cronicamente ridotti, inclusi globuli rossi (anemia), piastrine (trombocitopenia), globuli bianchi (leucopenia, monocitopenia e linfopenia)? Qualcuno ha mai necessitato di una trasfusione per bassi valori ematici?	<i>GATA2, SAMD9, SAMD9L, ANKRD26, ETV6, RUNX1, TERC/TERT, IBMFS, anemia di Fanconi</i>
Il bambino o qualche componente della famiglia presenta una tendenza al facile sanguinamento o allo sviluppo di ematomi?	<i>ANKRD26, ETV6, RUNX1</i>
Il bambino o qualche componente della famiglia ha o ha avuto verruche (nella regione genitale, mani, piedi o qualunque altro sito). Se sì, dove e per quanti anni?	<i>GATA2</i>
Il bambino o qualche componente della famiglia sviluppa facilmente infezioni o infezioni severe o atipiche? Se sì, quante infezioni, di quale tipo e a quale età (ad esempio meningiti, polmoniti, sepsi, infezioni da funghi)? Per trattare tali infezioni è stata necessaria l'ospedalizzazione?	<i>GATA2, SAMD9 e IBMFS</i>
Qualcuno nella famiglia presenta un gonfiore in un arto? (noto anche come linfedema). Se sì quale arto è interessato? E' stato identificato il motivo di questo edema?	<i>GATA2</i>
Il bambino o qualche componente della famiglia presenta sordità? Se sì, a che età è stata diagnosticata? Quale causa è stata identificata alla base della sordità?	<i>GATA2, SRP72 e IBMFS</i>
Il bambino o qualche componente della famiglia ha presentato una riduzione della crescita durante il periodo prenatale o postnatale?	<i>SAMD9 o IBMFS</i>
Il bambino o qualche componente della famiglia presenta una anomalia della cute chiamata eczema?	<i>RUNX1</i>
Il bambino o qualche componente della famiglia presenta una malattia polmonare chiamata proteinosi alveolare polmonare?	<i>GATA2</i>
Qualcuno in famiglia presenta bassa statura?	<i>SAMD9 e anemia di Fanconi</i>
Qualcuno in famiglia presenta ritardo mentale?	<i>SAMD9, anemia di Fanconi e IBMFS</i>
Il bambino o qualche componente della famiglia presenta insufficienza surrenalica o iperpigmentazione della cute?	<i>SAMD9 e anemia di Fanconi</i>
Qualche componente della famiglia presenta alterato sviluppo dei genitali (e.g., micropene, criptorchidismo, ipospadia, ovaie ipoplasiche)?	<i>SAMD9 e anemia di Fanconi</i>
Qualche familiare soffre o ha sofferto di pubertà ritardata o presenta segni sfumati di pubertà?	<i>SAMD9 e anemia di Fanconi</i>
In famiglia ci sono stati eventi di morti inspiegate?	<i>SAMD9</i>
Il bambino o qualche componente della famiglia ha una storia di diarrea cronica? Se sì, è stata documentata una dilatazione del colon?	<i>SAMD9</i>
Il bambino o qualche componente della famiglia presenta atassia (mancanza di coordinazione muscolare interessante i movimenti volontari come camminare)?	<i>SAMD9L</i>

Nel paziente con recente diagnosi di MDS/LAM nell'ambito di una sospetta sindrome di predisposizione alle MDS, sarà possibile eseguire la ricerca di varianti patogenetiche mediante sequenziamento massivo parallelo con l'utilizzo di un pannello di geni noti essere implicati nella patogenesi delle MDS presenti nel *database* OMIM. Tale *screening* consentirà di analizzare tutte le porzioni codificanti dei geni noti implicati nell'aumento di predisposizione a MDS/LAM, tra cui *GATA2*, *SAMD9*, *SAMD9L*, *ANKRD26*, *CEBPA*, *DDX41*, *ETV6*, *RUNX1*, e *SRP72* (Tabella 4). In tabella 5 viene riportato l'elenco completo dei geni che verranno analizzati. Il pannello verrà rivalutato ed incrementato nel tempo alla luce delle nuove acquisizioni scientifiche.

Se la ricerca di mutazioni patogenetiche in tali geni risultasse negativa, previo confronto con il Laboratorio di Genetica Molecolare e Genomica Funzionale di riferimento, sarà possibile eseguire un approfondimento con eventuale studio dell'intero esoma, approccio che verrà valutato per ogni singolo caso.

Gene/Sindrome	Ereditarietà	OMIM	Neoplasie ematologiche	Caratteristiche di laboratorio	Caratteristiche cliniche principali
<b>GATA2</b> MDS/LAM familiare (Emberger syndrome, MonoMac syndrome)	AD	614038	MDS, LAM	Insufficienza midollare, monocitopenia, immunodeficienza cellulare e umorale	Infezioni da micobatteri atipici e virus erpetici, linfedema, sordità, malformazioni artero-venose, proteinosi alveolare polmonare
<b>SAMD9</b> Sindrome MIRAGE	AD	617 053	MDS, LAM	Citopenia, alterazioni immunologiche	Bassa statura, insufficienza surrenalica, infezioni, anomalie scheletriche, SNC, gastrointestinali, genitourinarie
<b>SAMD9L</b> Sindrome atassia pancitopenia	AD	159 550	MDS, LAM	Insufficienza midollare	Atassia (variabile)
<b>SRP72</b> Sindrome da insufficienza midollare tipo 1	AD	614 675	MDS	Insufficienza midollare	Sordità neurosensoriale
<b>DDX41</b> MDS familiare	AD	616 871	MDS, LAM	-	Assenti fino alla diagnosi di neoplasia ematologica
<b>RUNX1</b> Disordine piastrinico familiare con propensione a neoplasie mieloidi	AD	601399	MDS, LAM, LLA	Trombocitopenia, anomala funzione piastrinica	Tendenza al sanguinamento, eczema
<b>ANKRD26</b> Trombocitopenia 2	AD	188000	MDS, LAM	Trombocitopenia con MPV normale, anomala funzione piastrinica, piastrine di aspetto pallido	Tendenza al sanguinamento
<b>ETV6</b> Trombocitopenia 5	AD	616216	LLA, MDS, LAM	Trombocitopenia con MPV normale, anomala funzione piastrinica, macrocitosi	Tendenza al sanguinamento
<b>CEBPA</b> LAM familiare con mutazione di CEBPA	AD	601626	LAM	-	Assenti fino alla diagnosi di neoplasia ematologica

**Tabella 4:** Alcuni dei geni implicati nell'aumento di suscettibilità a MDS/LAM inclusi nel pannello NGS. Principali caratteristiche cliniche e di laboratorio. AD, autosomico dominante; LAL, leucemia linfoblastica acuta; LAM, leucemia mieloide acuta; MDS, sindrome mielodisplastica; SNC, sistema nervoso centrale

<i>ABCB7</i>	<i>CTCF</i>	<i>HSPA9</i>	<i>PIGA</i>	<i>SH3GL1</i>
<i>ABL1</i>	<i>CTC1</i>	<i>IDH1</i>	<i>PML</i>	<i>SH2B3</i>
<i>ABL2</i>	<i>CUBN</i>	<i>IDH2</i>	<i>PPM1D</i>	<i>SH3GL1</i>
<i>ACD</i>	<i>CUX1</i>	<i>IFIH1</i>	<i>PRF1</i>	<i>SLC19A2</i>
<i>ACSL6</i>	<i>CYCS</i>	<i>IFNG</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SLC25A38</i>
<i>ADAMTS13</i>	<i>DCLRE1C</i>	<i>IRF1</i>	<i>PUS1</i>	<i>SLX4</i>
<i>ADAR</i>	<i>DDX41</i>	<i>ITGA2</i>	<i>RAD51</i>	<i>SMC1A</i>
<i>AK2</i>	<i>DKC1</i>	<i>ITGA2B</i>	<i>RAD51C</i>	<i>SMC3</i>
<i>ALAS2</i>	<i>DNAJC21</i>	<i>ITGB3</i>	<i>RAG1</i>	<i>SMARCD2</i>
<i>AMN</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>JAGN1</i>	<i>RAG2</i>	<i>SRC</i>
<i>ANK1</i>	<i>EFL1</i>	<i>JAK2</i>	<i>RARA</i>	<i>SRP72</i>
<i>ANKRD26</i>	<i>ELANE</i>	<i>JAK3</i>	<i>RBM8A</i>	<i>STAG2</i>
<i>ARHGAP26</i>	<i>EPO</i>	<i>KIT</i>	<i>RFWD3</i>	<i>STAT5B</i>
<i>ARID2</i>	<i>ERBB3</i>	<i>KRAS</i>	<i>RNASEH2A</i>	<i>TERC</i>
<i>ASXL1</i>	<i>ERCC4</i>	<i>LIG4</i>	<i>RNASEH2C</i>	<i>TERT</i>
<i>ATM</i>	<i>ERCC6L2</i>	<i>LPP</i>	<i>RPL11</i>	<i>TET2</i>
<i>ATRX</i>	<i>ETV6</i>	<i>LUC7L2</i>	<i>RPL15</i>	<i>THCYTX</i>
<i>BCL11B</i>	<i>EZH2</i>	<i>MAD2L2</i>	<i>RPL26</i>	<i>THPO</i>
<i>BCOR</i>	<i>FANCA</i>	<i>MECOM</i>	<i>RPL27</i>	<i>TINF2</i>
<i>BCORL1</i>	<i>FANCB</i>	<i>MLF1</i>	<i>RPL35A</i>	<i>TMPRSS6</i>
<i>BCR</i>	<i>FANCC</i>	<i>MLF2</i>	<i>RPL5</i>	<i>TP53</i>
<i>BLM</i>	<i>FANCD2</i>	<i>MLLT10</i>	<i>RPS10</i>	<i>TREX1</i>
<i>BRAF</i>	<i>FANCE</i>	<i>MPL</i>	<i>RPS14</i>	<i>TSR2</i>
<i>BRCA1</i>	<i>FANCF</i>	<i>MYH9</i>	<i>RPS17</i>	<i>UBE2T</i>
<i>BRCA2</i>	<i>FANCG</i>	<i>MYSM1</i>	<i>RPS19</i>	<i>USB1</i>
<i>BRCC3</i>	<i>FANCI</i>	<i>NBN</i>	<i>RPS24</i>	<i>U2AF1</i>
<i>BRIP1</i>	<i>FANCL</i>	<i>NF1</i>	<i>RPS26</i>	<i>VPS45</i>
<i>BTK</i>	<i>FLT3</i>	<i>NHP2</i>	<i>RPS27</i>	<i>WAS</i>
<i>CALR</i>	<i>G6PC3</i>	<i>NOP10</i>	<i>RPS28</i>	<i>WRAP53</i>
<i>CBFB</i>	<i>GATA1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>RPS29</i>	<i>WT1</i>
<i>CBL</i>	<i>GATA2</i>	<i>NPM1</i>	<i>RPS7</i>	<i>XRCC2</i>
<i>CDC42</i>	<i>GFII</i>	<i>NRAS</i>	<i>RTEL1</i>	<i>YARS2</i>
<i>CEBPA</i>	<i>GLRX5</i>	<i>NSD1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>ZRSR2</i>
<i>CEBPE</i>	<i>GP1BA</i>	<i>NUMA1</i>	<i>SAMD9</i>	
<i>CHIC2</i>	<i>GP1BB</i>	<i>NUP214</i>	<i>SAMD9L</i>	
<i>CREBBP</i>	<i>GP9</i>	<i>PALB2</i>	<i>SAMHD1</i>	
<i>CSF3R</i>	<i>HAX1</i>	<i>PARN</i>	<i>SBDS</i>	
<i>CSMD1</i>	<i>HLTF</i>	<i>PHF6</i>	<i>SETBP1</i>	
<i>CSNK1A1</i>	<i>HOXA11</i>	<i>PICALM</i>	<i>SF3B1</i>	

**Tabella 5:** Elenco dei geni presenti nel pannello NGS.

## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

Il materiale biologico (almeno  $3 \times 10^6$  cellule) verrà processato per ottenere il DNA totale.

La ricerca di varianti patogenetiche, costituzionali e/o somatiche verrà eseguita su tutti i campioni di DNA estratto da sangue midollare e/o sangue periferico alla diagnosi di malattia mediante analisi di sequenziamento parallelo ad alta profondità di lettura allo scopo di identificare possibili mutazioni puntiformi e piccole inserzioni/delezioni su un pannello definito di geni di rilevanza clinica. Le varianti ritenute verosimilmente causative del quadro clinico verranno confermate per escludere la presenza di artefatti mediante sequenziamento tradizionale Sanger, metodica indipendente di maggior accuratezza. L'origine *de novo* delle varianti verrà studiata mediante analisi di segregazione familiare (ricerca della mutazione su DNA estratto da sangue periferico dei genitori) mentre l'origine somatica e/o germinale verrà confermata mediante confronto di diversi tessuti del probando.

## CENTRALIZZAZIONE DEI CAMPIONI BIOLOGICI

I campioni potranno essere inviati a (Tab. 6)

<b>Dott.ssa Lucia Pedace</b>	Laboratorio di Genetica Molecolare e Genomica funzionale Ospedale Pediatrico Bambino Gesù Polo di Ricerca San Paolo fuori le mura Via di San Paolo, 15 - 00146 Roma
<b>Contatti:</b>	Email: <a href="mailto:lucia.pedace@opbg.net">lucia.pedace@opbg.net</a> Tel. : +39 06-6859-2634

**Tabella 6:** Destinatario della spedizione dei campioni

Il materiale centralizzato verrà analizzato dal Laboratorio di Riferimento il cui direttore è (Tab.7):

<b>Dott. Marco Tartaglia</b>	Responsabile di Area di Ricerca di Genetica e Malattie rare Laboratorio di Genetica Molecolare e Genomica funzionale Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - Roma
<b>Contatti:</b>	Email: <a href="mailto:marco.tartaglia@opbg.net">marco.tartaglia@opbg.net</a> Tel. : 06-68593742

**Tabella 7:** Laboratorio di riferimento

Alla diagnosi dovranno essere inviati i seguenti campioni:

- 4 ml di sangue midollare in provetta sterile in EDTA (2 provette);
- 4 ml di sangue periferico in provetta sterile in EDTA (2 provette);
- 2 provette di tampone buccale;
- 2 ml di sangue periferico di ciascun genitore in provetta sterile in EDTA (1 provetta per ogni genitore).

E' importante che i campioni vengano recapitati entro 24 ore dal prelievo.

I campioni possono essere inviati mediante spedizione TNT con codice dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù concordando l'arrivo del materiale con la Dott.ssa Lucia Pedace ([lucia.pedace@opbg.net](mailto:lucia.pedace@opbg.net)). La richiesta di spedizione potrà essere fatta telefonando al Numero Servizio Clienti TNT 199.803.868 comunicando il seguente codice di abbonamento da utilizzare esclusivamente per spedizioni finalizzate a questo studio: **n.11457577** ed inserendo come destinatario i dati riportati in tabella 6.

Ai campioni dovrà essere allegata adeguata documentazione (vedi Appendice A-B):

- Modulo inoltro campioni biologici;
- Consenso informato all'esecuzione del test genetico.

1. Locatelli F. and Strahm B. How I treat myelodysplastic syndromes of childhood. *Blood*. 2018 131(13): 1406-1414.
2. Hasle H. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016; (1): 598-604.
3. Babushok DV, Bessler M, Olson TS. Genetic predisposition to myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children and young adults. *Leuk. Lymphoma*. 2016; 57 (3): 520-36.
4. Tawana K, Rio-Machin A, Preudhomme C, *et al*. Familial *CEBPA*-mutated acute myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2017; 54(2):87-93.
5. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, *et al*. *GATA2* deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood*. 2014;123(6):809-21.
6. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, *et al*. Prevalence, clinical characteristics and prognosis of *GATA2* related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood*. 2016;127(11): 1387-97.
7. Narumi S, Amano N, Ishii T, *et al*. *SAMD9* mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. *Nat Genet*. 2016;48(7): 792-7.
8. Chen DH, Below JE, Shimamura A, *et al*. Ataxia-Pancytopenia Syndrome is caused by missense mutations in *SAMD9L*. *Am J Hum Genet*. 2016 98(6):1146-1158. Hock H, Shimamura A. *ETV6* in hematopoiesis and leukemia predisposition. *Semin Hematol*. 2017;54(2):98-104.
9. Schlegelberger B, and Heller PG. *RUNX1* deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Semin Hematol*. 2017; 54(2):75-80.
10. Babushok DV, Bessler M, Olson TS. Genetic predisposition to myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children and young adults. *Leuk Lymphoma*. 2016; 57(3): 520-36.
11. Noris P, Favier R, Alessi MC, *et al*. *ANKRD26*-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood*. 2013;122(11):1987-9.
12. Kirwan M, Walne AJ, Plagnol V, *et al*. Exome sequencing identifies autosomal-dominant *SRP72* mutations associated with familial aplasia and myelodysplasia. *Am J Hum Genet*. 2012; 90(5): 888-92.

13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. 2016;127(20):2391-405.
14. Fanconi Anemia Research Fund Inc. Fanconi anemia: guidelines for diagnosis and management. 4th ed. 2014.
15. Vlachos A, Ball S, Dahl N, *et al*; Participants of Sixth Annual Daniella Maria Arturi International Consensus Conference. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol.* 2008; 142(6): 859-876
16. Dror Y, Donadieu J, Koglmeyer J, *et al.* Draft consensus guidelines for diagnosis and treatment of Shwachman-Diamond syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1242: 40-55.
17. Savage SA and Cook EF. Dyskeratosis congenita and telomere biology disorders: diagnosis and management guidelines. 2015.
18. Godley LA and Shimamura A. Genetic predisposition to hematologic malignancies: management and surveillance. *Blood.* 2017;130(4):424-432.

## MODULO INOLTRO CAMPIONI BIOLOGICI

CENTRO RICHIEDENTE		
MEDICO REFERENTE		
OSPEDALE - CITTA'		
REPARTO		
E-MAIL		
TELEFONO		
PAZIENTE		
NOME		
COGNOME		
DATA di NASCITA		
SESSO		
DIAGNOSI		
Diagnosi*		
Data Diagnosi		
Blasti (midollo)	Si            %	No
Citogenetica (midollo)*	Cariotipo: FISH:	
EMOCROMO		
Globuli Bianchi		
Neutrofili		
Linfociti		
Monociti		
Emoglobina		
MCV		
Piastrine		
ANAMNESI		
Epatomegalia	Si	No
Splenomegalia	Si	No
Anamnesi prenatale		
Peso alla nascita		
Età gestazionale		

Segni e Sintomi	Diatesi emorragica	Sì No	
	Infezioni ricorrenti	Sì No	
	<i>Facies</i> sindromica	Sì No	Specificare:
	Anomalie oculari	Sì No	Specificare:
	Epatite	Sì No	
	Fibrosi polmonare	Sì No	
	Proteinosi Alveolare	Sì No	
	Cardiopatie	Sì No	Specificare:
	Anomalie renali	Sì No	Specificare:
	Difetti endocrinologici	Sì No	Specificare:
	Ritardo neurologico	Sì No	Specificare:
	Anomalie scheletriche	Sì No	Specificare:
	Linfedema	Sì No	
	Altro		
Sottopopolazioni linfocitarie	Ly T	% (V.N. )	
	Ly B	% (V.N. )	
	NK	% (V.N. )	
Familiarità	Genitori consanguinei	Sì	No
	Precedenti interruzioni di gravidanza	Sì	No
	Familiari affetti da MDS/LAM/ALL/Anemia Aplastica	Sì	Specificare:
	Familiari con diagnosi di Neoplasia ad esordio precoce	Sì No	Specificare:

Anamnesi personale di precedente neoplasia	Sì No	Laboratorio di Genetica Molecolare e Genomica funzionale Ospedale Pediatrico Bambino Gesù Polo di Ricerca San Paolo fuori le mura Via di San Paolo, 15 - 00146 Roma Email: <a href="mailto:lucia.pedace@opbg.net">lucia.pedace@opbg.net</a>
Terapia in corso		
Trasfusioni nelle ultime 4 settimane	Sì Frequenza trasfusionale	
<b>CAMPIONI</b>	<b>DATA PRELIEVO: __/__/__</b>	
Sangue Periferico	2 provette EDTA	
Sangue Midollare	2 provette EDTA	
Tampone Buccale	2 provette	
Sangue Periferico	1 provetta EDTA madre	
Genitori	1 provetta EDTA padre	

° I Laboratori di Ricerca accettano i campioni biologici dal Lunedì al Venerdì dalle ore 8 alle ore 14.

\* Allegare referto se disponibile

## CONSENSO INFORMATO ALL' ESECUZIONE DI ANALISI GENETICHE

 **Paziente minorenni**
 **Paziente maggiorenne**

Io sottoscritto <sup>1</sup>	
<b>in qualità di genitore/tutore esercitante la responsabilità genitoriale sul minore<sup>2</sup></b>	
sono stato informato dal Dr.	
Sull'analisi genetica <sup>3</sup>	
prevista <sup>4</sup>	per me <span style="margin-left: 100px;">per mio/a figlio/a</span>

La firma del presente modulo di consenso è stata preceduta da un colloquio con il medico che mi ha informato della ipotesi diagnostica, della necessità di eseguire l'analisi genetica sopra indicata in relazione alla specifica condizione patologica, delle particolari caratteristiche del tipo di indagine e dei risultati attesi. Ho ricevuto dettagliate informazioni sul tipo di test e sulle eventuali indagini alternative, sul tipo di risultato, sulle sue implicazioni e di aver compreso l'utilità ed i limiti dell'analisi genetica proposta.

In particolare sono informato che:

- i test genetici e molecolari comprendono le analisi di specifici geni, del loro prodotto o della loro funzione, nonché ogni altro tipo di indagine del DNA, del RNA o dei cromosomi, finalizzata ad individuare o ad escludere mutazioni associate a patologie su base genetica. I test possono anche essere utilizzati per definire la variabilità interindividuale, per risolvere quesiti medico-legali e per valutare la sensibilità o la suscettibilità e le resistenze individuali;
- i risultati dei test genetici coinvolgono l'identità biologica non solo della singola persona, ma anche della sua famiglia;
- l'informazione derivante dal test genetico è permanente in quanto non si modifica nell'arco di vita dell'individuo
- della riservatezza del test: data la delicatezza delle implicazioni relative all'esecuzione dei test genetici, tutti gli operatori sanitari coinvolti sono tenuti a trattare sempre con la massima riservatezza e professionalità le informazioni derivanti dai test nel pieno rispetto della normativa vigente sulla tutela della privacy. Saranno inoltre garantiti ai sensi del D.L. N°196/03 l'anonimato e la riservatezza sulla provenienza del campione e sui dati genetici acquisiti;
- della peculiarità delle analisi genetico-molecolari: durante l'effettuazione di test genetici su più membri della famiglia potrebbe emergere che il risultato del test, se confrontato con i risultati di altri familiari, evidenzia l'assenza di una presunta relazione biologica o rivelare un'adozione non dichiarata.

Sono consapevole che tutti i risultati ottenuti dalle analisi genetiche sono da considerarsi strettamente confidenziali e sottoposti al vincolo del segreto professionale prima ancora che protetti dalle disposizioni di legge, in particolare quelle contenute nel D.Lgs 30 giugno 2003, n.196 *Codice in materia di protezione dei dati personali* e nel Provvedimento dell'Autorità Garante *Autorizzazione al trattamento dei dati genetici, n. 8/2014, Autorizzazione generale al trattamento dei dati personali effettuato per scopi di ricerca scientifica n°9/2014, Autorizzazione generale al trattamento dei dati personali effettuato per scopi di ricerca scientifica n. 9/2016 e Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici n. 8/2016.*

Sono anche informato della possibilità di revocare il mio consenso.

<sup>1</sup> nato/a a ..... il ... / ... / ... residente ..... (Prov. ....) C.A.P ..... Via ..... Tel. .... .....
--

<sup>2</sup> Cancellare il campo nel caso in cui il paziente sia maggiorenne

<sup>3</sup> Specificare il tipo di analisi prevista

<sup>4</sup> Indicare la voce specifica

Dichiaro dunque di aver ricevuto le informazioni e il tempo necessari per valutare l'analisi clinica propostami, di aver potuto formulare domande, comprese quelle sulle alternative diagnostiche, e di aver ricevuto risposte soddisfacenti. Sono informato su cosa potrebbe avvenire qualora non fornissi il mio consenso all'analisi proposta.

Dichiaro di avere letto attentamente il documento e di aver compreso in ogni sua parte il significato di questo consenso e tutto ciò premesso

<b>Acconsento a</b>	<b>Sottopormi</b> <input type="checkbox"/>	<b>Far sottoporre mio figlio/a</b> <input type="checkbox"/>
Al prelievo del materiale biologico per l'esecuzione dell'analisi genetica sopra indicata		<b>SI</b> <input type="checkbox"/> <b>NO</b> <input type="checkbox"/>
Ad eventuali approfondimenti diagnostici per la completezza del test		<b>SI</b> <input type="checkbox"/> <b>NO</b> <input type="checkbox"/>
Ad essere informato circa i risultati ottenuti e sul loro significato, consapevole delle implicazioni familiari relative al test a cui acconsento		<b>SI</b> <input type="checkbox"/> <b>NO</b> <input type="checkbox"/>
A voler essere informato su eventuali risultati incidentali <sup>5</sup> di rilevanza clinica ottenuti dall'analisi		<b>SI</b> <input type="checkbox"/> <b>NO</b> <input type="checkbox"/>
Ad acconsentire al trattamento dei dati sensibili ed in particolare dei dati genetici per attività di ricerca medico scientifica/statistica collegata all'indagine genetica in atto;		<b>SI</b> <input type="checkbox"/> <b>NO</b> <input type="checkbox"/>
<b>Data</b> ... / ... / ...		
<b>Firma dello Specialista</b>		<b>Firma del paziente - genitore/tutore</b>
.....		.....

**PARTE RISERVATA AD EVENTUALE MEDIATORE CULTURALE**

<p>Io sottoscritto: _____ confermo di aver assistito al colloquio informativo tra il Dottor _____ e il Sig. _____ e confermo di aver esercitato la funzione di tramite e favorito la comprensione dell'informativa.</p> <p>Data ____/____/____ Firma del mediatore culturale _____</p>
--

**Consenso alla conservazione di Materiale Biologico**

Sono informato che, con garanzia della massima riservatezza derivante da specifica codifica, eventuale materiale biologico residuo sarà conservato presso questa struttura per

- approfondimenti clinici diagnostici qualora in futuro fossero disponibili nuove modalità di indagine
- scopi di ricerca scientifici.

Il materiale biologico residuo sarà conservato secondo le seguenti modalità:

- il campione di DNA/RNA estratto per eseguire suddette analisi verrà mantenuto presso il Laboratorio di Genetica Medica con la garanzia della massima riservatezza e nel rispetto della normativa vigente,
- la conservazione avverrà in modo codificato, rendendo il campione anonimo ma con la possibilità di risalire alla persona a cui è stato prelevato attraverso un codice (noto solo al personale autorizzato).

Al paziente identificato attraverso un codice verrà richiesto un consenso informato specifico nel caso di esecuzione di nuove indagini sui campioni biologici.

<sup>5</sup> *Incidental Findings*

Sono anche informato della possibilità di revocare in qualsiasi momento il mio consenso alla conservazione e alla modalità di archiviazione sotto indicate.

**Acconsento**

**Non Acconsento** alla conservazione di campioni biologici

Sono al corrente del fatto che tutti i dati personali compresi i risultati degli esami effettuati saranno conservati in archivi cartacei ed informatici nel rispetto delle leggi vigenti (circolare del Ministero della Sanità n. 61 del 19/12/1986 che indica che la documentazione diagnostica di laboratorio deve essere conservata per anni 20)

**Data:** .../.../.../

**Firma del paziente - genitore/tutore**

***PARTE RISERVATA AD EVENTUALE MEDIATORE CULTURALE***

Io sottoscritto: \_\_\_\_\_ confermo di aver assistito al colloquio informativo tra il Dottor \_\_\_\_\_ e il Sig. \_\_\_\_\_ e confermo di aver esercitato la funzione di tramite e favorito la comprensione dell'informativa.

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Firma del mediatore culturale \_\_\_\_\_