

Che cos'è l'array CGH:

L'ibridazione genomica comparativa su microarray (*Array - Comparative Genomic Hybridization* o *Array-CGH*), chiamata anche cariotipo molecolare, è una tecnica sviluppata per identificare variazioni del contenuto di piccole porzioni cromosomiche, come duplicazioni/amplificazioni (presenza di copie in eccesso di segmenti di DNA), o delezioni (perdite di porzioni di genoma). Queste anomalie del DNA, chiamate complessivamente Copy Number Variations (CNV), sono frequentemente la causa di diverse patologie quali, ad esempio, sindromi malformative, ritardo cognitivo, autismo, epilessia, patologie cardiache congenite e sindromi complesse che possono interessare vari organi e apparati.

Il principio su cui si basa la tecnica dell'Array CGH è la comparazione quantitativa del DNA in esame o *DNA test* (estratto dal prelievo ematico del paziente) e del DNA genomico di riferimento proveniente da un soggetto sano (*reference DNA*).

Durante il processo analitico questi DNA sono marcati in maniera differente con molecole fluorescenti (generalmente si utilizza un fluorocromo rosso per il DNA test ed un fluorocromo verde per il *reference DNA*) e, successivamente, vengono mescolati in parti uguali e fatti incubare (Ibridazione) su un microarray (vetrino), costituito da un supporto di vetro la cui superficie è coperta di frammenti di DNA, noti come sonde o cloni. Ognuno di questi cloni rappresenta una specifica regione del genoma umano, fino a ricomprendere l'intero assetto cromosomico umano.

Al termine dell'incubazione, sia il DNA in esame che quello di controllo si legheranno ai corrispondenti cloni presenti sull'array (ogni frammento di DNA incubato si lega al clone corrispondente alla sua regione). Il risultato sarà l'emissione di due distinti segnali fluorescenti le cui intensità saranno misurate a seguito di lettura degli arrays mediante un apposito strumento (scanner). Sull'immagine ottenuta verrà poi effettuata l'analisi comparativa tra le intensità di fluorescenza emesse dai due DNA e la relativa elaborazione dei dati mediante un apposito software, al fine evidenziare eventuali variazioni del numero di copie del DNA test rispetto al DNA di riferimento.

In caso di assetto cromosomico normale, il rapporto tra le due emissioni è bilanciato (1:1). Qualora vi siano nel DNA in esame delle **delezioni** (assenza di un cromosoma o parte di esso), il rapporto tra quest'ultimo ed il DNA di controllo sarà di 1:2. Nel caso di **duplicazioni** (presenza di un cromosoma soprannumerario o parte di esso) il rapporto tra il DNA embrionale e quello di controllo sarà di 2:1.

I vantaggi della tecnica Array-CGH

La citogenetica tradizionale, rappresentata dal cariotipo standard (osservazione del numero dei cromosomi), pur utilissima nell'individuare un gran numero di anomalie cromosomiche, numeriche e strutturali, è necessariamente limitata nelle sue possibilità diagnostiche dal potere di risoluzione del microscopio.

Soprattutto nelle malattie genetiche caratterizzate da vari dismorfismi e/o ritardi cognitivi, l'analisi del cariotipo con tecnica citogenetica tradizionale, a causa del suo basso potere di risoluzione,

potrebbe risultare normale malgrado un fenotipo chiaramente patologico, poiché il numero di cromosomi osservati è nella norma e non si riesce a rilevare alterazioni di numero di piccole porzioni cromosomiche.

Il maggiore progresso degli ultimi anni, nel campo della citogenetica, e' rappresentato dallo sviluppo della tecnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridation*), una metodologia citochimica che consente di individuare la duplicazione o delezione di specifiche sequenze di DNA a livello cromosomico.

La FISH, nonostante sia di grande applicazione nella diagnosi clinica odierna, è necessariamente limitata dal fatto di essere una tecnica di "indagine mirata": la sua applicazione consente solo di poter individuare mutazioni specifiche a livello di precisi loci cromosomici.

Con l'impiego della tecnica Array-CGH si è grado di valutare la presenza di eventuali anomalie cromosomiche a livello dell'**intero genoma** in un unico esperimento, senza sapere in anticipo cosa cercare. In un certo senso, è come se si effettuassero centinaia di migliaia di FISH contemporaneamente.

In sintesi, rispetto ad altre metodiche di indagine, come l'esame tradizionale del cariotipo, l'analisi del genoma basata su array ha una risoluzione molto più elevata (100 volte). Ciò consente di evidenziare anomalie del DNA che normalmente non potrebbero essere rilevate, incrementando notevolmente le possibilità di raggiungere una diagnosi certa. Inoltre, l'array-CGH permette di definire esattamente la regione genomica alterata e quindi anche i geni in essa contenuti, migliorando la comprensione delle relazioni esistenti tra variazioni del numero di copie e patologia.

MENTRE IL CARIOTIPO STANDARD CONSENTE UNA DIAGNOSI IN CIRCA 3 BAMBINI SU 100, IL CGH ARRAY CONSENTE LA DIAGNOSI IN CIRCA 1 BAMBINO SU 4 (Eur J Pediatr. 2015 Jan;174(1):75-83. doi: 10.1007/s00431-014-2367-6, Mol Cytogenet. 2013 Apr 5;6(1):16. doi: 10.1186/1755-8166-6-16.).

Il principale impiego diagnostico dell' array CGH:

Il cariotipo molecolare può essere impiegato in diagnostica pre-natale per la diagnosi prenatale di molte sindromi caratterizzate da CNV sub-cromosomiche note.

In epoca post-natale, l'analisi è particolarmente indicata in:

§ soggetti con difetti congeniti e/o ritardo mentale idiopatico (con cariotipo standard normale) o autismo:

le suddette patologie hanno una frequenza complessiva nella popolazione pari a 1-3%.

§ neonati con quadro dismorfico/malformativo (con cariotipo normale), nati morti o nati vivi e deceduti in epoca neonatale (con cariotipo normale o nell'impossibilità di campione idoneo all'analisi convenzionale).

Impiego in ricerca scientifica:

Il CGH array, oltre ad essere un irrinunciabile strumento diagnostico, è anche un potente mezzo per la scoperta di nuove correlazioni fra alterazioni genetiche e quadri clinici. Queste correlazioni sono alla base dello studio di nuovi pathways patogenetici e quindi, in ultima analisi, contribuiscono alla scoperta di nuovi farmaci.

Diffusione dell' array CGH a livello nazionale e regionale:

Il cariotipo molecolare è ormai una tecnologia diagnostica di routine da almeno un decennio, utilizzata in quasi tutti i policlinici universitari italiani e anche in molte aziende ospedaliere non universitarie. Si allega una lista non esaustiva dei principali policlinici o ospedali italiani in possesso di tale tecnologia. In Veneto il cariotipo molecolare è eseguito di routine sia c/o il Policlinico di Padova, sia c/o l' Ospedale San Bortolo di Vicenza.

Necessità di acquisizione dell' array CGH da parte del Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Odontostomatologiche e Materno-Infantili dell' Università di Verona:

L' assenza di cariotipo molecolare c/o l' Ospedale Universitario di Verona rappresenta in generale una notevole lacuna ma penalizza soprattutto il Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Odontostomatologiche e Materno-Infantili, al quale afferisce la massima parte di pazienti per i quali questa diagnostica sarebbe indicata. L' attuale necessità di effettuare il test al di fuori dell' AOUIVR (a Vicenza o Padova) comporta un disagio per pazienti e famiglie ma soprattutto una dispersione dell' iter diagnostico. E' infatti raccomandabile e raccomandato dalle principali linee guida pediatriche e neuropsichiatriche infantili che questa diagnostica venga effettuata in seno al servizio che effettua l' inquadramento clinico e il percorso di cura, in modo da assicurare la massima integrazione fra le informazioni cliniche e quelle molecolari. Ciò migliora grandemente l' interpretazione e l' utilizzo clinico del dato molecolare. Sono centinaia i pazienti della provincia di Verona che annualmente necessitano di sottoporsi a test CGH array.

Quale tecnologia acquisire?

Attualmente lo il SureScan Dx Microarray Scanner Bundle di Agilent è l' unica tecnologia disponibile per l' utilizzo diagnostico dell' array CGH (marchio IVD/CE su scanner e consumabili) oltre a rappresentare la tecnologia con migliori performance tecniche in assoluto.