

Notiziario

dell'Istituto Superiore di Sanità

Direttore reggente dell'Istituto Superiore di Sanità e Responsabile scientifico: Aurelia Sargentini

Direttore responsabile: Vilma Alberani; Redazione: Gabriella Bucossi, Paola De Castro Pietrangeli, Franco Timitilli

Composizione, Stampa e Distribuzione: Patrizia Mochi, Massimo Corbo

Redazione, Amministrazione e Stampa: Istituto Superiore di Sanità, Servizio per le attività editoriali, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

Tel. (06) 49901 - Telex 610071 ISTSAN I - Telegr. ISTISAN - 00161 Roma - Telefax (06) 4469938

Iscritto al n. 475/88 del 16 settembre 1988. Registro Stampa Tribunale di Roma

© Istituto Superiore di Sanità 1996

Test diagnostici di genetica molecolare

Nell'ambito della linea di ricerca su "Valutazione delle diagnosi precoci di patologia ereditaria" del progetto-obiettivo di ricerca dell'Istituto superiore di Sanità "Fattori di rischio per la salute materno infantile", d'intesa con l'Associazione Italiana di Genetica Medica, è stato stilato il seguente documento che intende fare il punto delle attuali acquisizioni ed orientamenti nel settore dei test diagnostici di genetica molecolare, soprattutto per quanto riguarda le diagnosi precoci di patologie ereditarie.

Premessa

E' ormai opinione diffusa che l'aumento delle conoscenze della genetica molecolare e soprattutto del progetto genoma potrà determinare la diffusione dei test genetici in modo indiscriminato e soprattutto non suffragata da reali necessità di applicazione. Un test genetico dovrebbe permettere ai singoli individui e ai loro familiari di identificare, comprendere e talvolta controllare il loro rischio di malattia (The ethics of prediction:

genetic risk and the physician-patient relationship. 1995. *Genome Sci. Technol.*, 1: 21). La valutazione del rischio di malattia attraverso i test genetici ha un immediato impatto sulla sfera sociale (individuo, famiglia, gruppo etnico, popolazione). I test genetici spesso permettono infatti all'individuo di ottenere informazioni delle quali probabilmente non sarebbe mai venuto a conoscenza. La deontologia professionale di ogni medico o biologo esige pertanto che, proprio a tutela dei diritti della persona, queste informazioni siano trattate con il massimo riserbo e professionalità. La conoscenza di informazioni incomplete o peggio non correttamente inquadrata sul proprio genoma potrebbe avere pesanti ripercussioni sociali. Infatti l'individuazione di un genotipo patologico non è sempre associata allo sviluppo di una grave malattia. Un test non giustificato in queste situazioni potrebbe condizionare il futuro di una persona. Le attuali potenzialità della ricerca molecolare consentono infatti di rivelare la presen-

za di geni mutati associati a malattia molto tempo prima della conoscenza della patogenesi e soprattutto dello sviluppo di terapie adeguate. Questo divario tra la capacità diagnostica e la capacità terapeutica non dovrebbe mai essere dimenticato nello sviluppo e nell'applicazione di un test genetico. La non corretta conoscenza dell'applicazione di un test (valore intrinseco del test) potrebbe danneggiare la sua attendibilità e accuratezza diagnostica. A questo si aggiunge il numero sempre crescente di laboratori o di centri che forniscono un numero elevato di test molecolari senza una adeguata competenza e spesso privi di una sperimentazione sufficiente alla valutazione del test (ad esempio, test di screening di mutazione incompleti, mancanza di controlli positivi per la rarità di alcuni genotipi, mancanza di test funzionali di controllo, completa assenza di test di conferma). Una corretta diagnosi genetica comporta infatti una adeguata consulenza genetica e, quando disponibile, una cor-

retta impostazione terapeutica; consente, inoltre, una corretta gestione del paziente per ottenere risultati anche dal punto di vista dell'economia sanitaria.

Da più parti infatti si richiama l'attenzione sulla necessità che le associazioni scientifiche forniscano linee guida generali di applicazione dei test di genetica molecolare. In questa direzione si sono mosse: l'American Society of Human Genetics (ASHG), l'European Society of Human Genetics (ESHG), la World Medical Association (WMA), la British Medical Association (BMA), il National Center for Human Genome Research (NIH), il Comitato Nazionale di Bioetica (marzo 1994).

Attualmente, diverse organizzazioni e società scientifiche hanno elaborato e iniziato a sperimentare approcci diversi di controllo e analisi di qualità delle procedure dei test basati sul DNA; tra queste, ad esempio, le Società di Ematologia, di Genetica Forense e di Biochimica Clinica. Nonostante



te il vivo interesse esistente su tali temi ed i pregevoli risultati ottenuti, non sono tuttora disponibili in Italia standard nazionali per la maggior parte dei test molecolari.

Questo documento vuol rappresentare un punto di partenza per un ampio dibattito all'interno del mondo scientifico italiano con l'obiettivo di giungere a idonee linee guida per contribuire alla regolamentazione del settore.

I test genetici

Per test genetico molecolare si intende l'analisi del DNA e di ogni prodotto genico, compreso l'RNA, per definire genotipi, mutazioni, fenotipi e cariotipi a scopo clinico. Gli scopi di un test genetico comprendono: la predizione del rischio di malattia, l'identificazione dei portatori, il controllo, la diagnosi e la prognosi di una malattia ereditaria. Vengono presi in considerazione in questa trattazione i test genetici condotti per sola finalità di ricerca e quelli per finalità forensi.

L'attuale sviluppo delle conoscenze genetiche e la ricaduta potenziale sull'utenza delle indagini diagnostiche suggerisce di classificare i test genetici in sei tipologie differenti. Questa classificazione (Juengst, 1995. In: *The diagnostic challenge. The human genome*. Fisher & Klose (Eds). München, Boehringer Mannheim. p. 193-222) può essere utile a comprendere le implicazioni del test genetico.

1. *Diagnostico*: E' un test capace di porre o confermare la diagnosi di una malattia genetica presente nel probando al momento dell'esame. E' utile per la determinazione di patologie per le quali è necessaria la diagnosi differenziale, o quando ci si trova in pre-

senza di sospetti diagnostici (ad esempio, fibrosi cistica, ritardo mentale legato all'X con X fragile, atrofia muscolare spinale, neurofibromatosi).

2. *Prognostico*: E' un test capace di prevedere l'insorgenza di una patologia con un elevato grado di certezza. Questo tipo di test è presintomatico se è in grado di diagnosticare una patologia in una fase precoce (ad esempio, distrofia miotonica, corea di Huntington).

3. *Predittivo*: E' un test capace di identificare una mutazione che costituisce un potenziale fattore di rischio per lo sviluppo di una patologia, a condizione che la sua insorgenza non sia di fatto impedita da altri fattori genetici o ambientali. Questo tipo di test predice lo sviluppo di una malattia in assenza di controllo della "predisposizione" (ad esempio, test neonatale per la fenilchetonuria).

4. *Disuscettibilità*: E' un test che stabilisce la vulnerabilità a un particolare stimolo ambientale. In conseguenza della identificazione della suscettibilità genetica possono essere proposti interventi utili a ridurre gli effetti di tale suscettibilità. Queste patologie non sono solo determinate geneticamente e perciò sono almeno in parte controllabili (ad esempio, il deficit di alfa-1-antitripsina determina la suscettibilità a sviluppare enfisema polmonare nei fumatori).

5. *Probabilistico*: E' un test capace di individuare un genotipo a rischio di sviluppare una patologia, con una probabilità significativamente aumentata rispetto alla popolazione generale (ad esempio, mutazioni di p53 nelle famiglie con sindrome di Li-Fraumeni, BRCA1 e BRCA2 nel carcinoma mammario e in quello dell'ovaio, HNPCC nel carcinoma intestinale).

6. *Profilo genetico*: E' un test capace di identificare una associazione empirica fra una particolare mutazione genica e l'aumento di incidenza di una malattia (ad esempio, presunta associazione tra le delezioni del gene ACE e il rischio di infarto del miocardio).

Indicazioni per il test diagnostico

Una diagnosi genetica dovrebbe essere fornita solo quando sono disponibili per quella particolare patologia interventi di controllo o di trattamento oppure quando il risultato dell'analisi è determinante per una scelta riproduttiva (When is genetic screening permissible? 1995. *Nature*, 377: 273). Questo ovviamente prescinde da particolari situazioni come ad esempio l'applicazione del test alle persone che appartengono a famiglie nelle quali segrega una patologia genetica ad insorgenza tardiva. I test genetici sui minori dovrebbero essere evitati per quanto possibile, ad eccezione di situazioni particolari per le quali si dimostri la loro utilità diretta in termini medici psicosociali e riproduttivi (Genetic testing "needs more checks". 1995. *Nature*, 378: 120). I test per le cardiomiopatie ipertrofiche familiari e per la sindrome di Romano-Ward sono esempi illustrativi di possibili applicazioni dei test genetici preventivi, in quanto la disponibilità di terapie specifiche può prevenire l'aritmia. Analogamente, i soggetti a rischio per ipercolesterolemia familiare potrebbero trarre beneficio da restrizioni dietetiche. Tuttavia in alcuni casi, ad esempio la diagnosi presintomatica di fibrosi cistica, non è stato dimostrato un beneficio di tipo medico, ma un possibile incremento

dei costi e dello stress familiare (ASHG/ACGM Report, 1995. Point to consider: ethical, legal, and psychosocial implications of genetic testing in children and adolescent. *Am. J. Human Genet.*, 57: 1233-1241). Nei casi in cui la malattia si manifesta tardivamente, l'analisi genetica dovrebbe essere rimandata almeno fino alla età in cui il consenso informato diventa possibile o fino all'insorgenza di sintomi sospetti, salvo nei casi in cui vi sia un reale vantaggio per il minore, anche solo in termini di qualità dell'assistenza. E' pertanto necessario valutare sempre le potenzialità che uno specifico test è in grado di offrire.

Nel proporre un test molecolare bisogna tenere presente non solo il risultato specifico sul paziente, ma anche il riflesso del risultato sulla sua famiglia in termini di ansietà, confusione, riflesso sulle relazioni intrafamiliari, sul lavoro e sulle scelte riproduttive. Un altro problema riguarderebbe l'impiego incontrollato nella popolazione generale dei test adatti alle persone appartenenti a famiglie ad alto rischio. Sembra, infatti, prematuro offrire oggi programmi di screening di popolazione per patologie come il cancro o la malattia di Alzheimer, senza disporre preliminarmente di dati sulla prevalenza delle mutazioni nella popolazione.

Si ritiene opportuno delegittimare la tendenza da più parti emergente a sottoporre a screening genetici persone e gruppi di persone per valutare la loro idoneità lavorativa o l'adeguatezza a determinati standard (Gene test: who benefits from risk? 1996. *Nature*, 379: 389-392).

L'accesso e la scelta a sottoporsi ad uno specifico test



diagnostico non possono essere condizionati da fattori economici. E' perciò necessario che i servizi di genetica medica vengano inquadrati in una normativa, all'interno del Servizio Sanitario Nazionale.

E' necessario evitare l'uso di test genetici per selezionare l'accesso al lavoro o per selezionare le persone che sottoscrivono le polizze assicurative. In Inghilterra, Germania, Giappone, Italia, Spagna e Portogallo non esistono leggi al riguardo. Negli USA almeno 10 diversi stati hanno proibito l'uso di test genetici a scopi assicurativi. In altri paesi come la Francia e l'Olanda, invece, è stata introdotta una moratoria temporanea, mentre il Belgio, l'Austria e la Norvegia hanno optato per un divieto assoluto (Gene test: who benefits from risk? 1996. *Nature*, **379**: 389-392).

Il consenso informato

Occorre informare il probando sulla possibilità che in un futuro più o meno prossimo lo studio molecolare possa inaspettatamente fornire anche informazioni non direttamente rivolte alla specifica patologia (ad esempio, non paternità, identificazione di alleli di suscettibilità ad altre patologie). E' infatti necessario spiegare al probando che il suo DNA sarà registrato e archiviato in una banca biologica e che in seguito potrebbe essere utilizzato anche per altri scopi di ricerca scientifica.

E' inoltre necessario informare il probando sull'esistenza di tecniche alternative a quelle proposte ed eventualmente fornire un confronto tra le diverse metodiche, qualora disponibili. Ciò, comunque, implica che non debbono essere esercitate pressioni per

utilizzare sempre tutte le soluzioni tecnologiche disponibili.

Al momento della consulenza genetica il paziente dovrebbe essere informato sui limiti di specificità e sensibilità del test diagnostico. Tali limiti dovrebbero essere richiamati nella refertazione. Pertanto la consulenza genetica relativa alle implicazioni del test, l'acquisizione del consenso informato e la successiva comunicazione e interpretazione dei risultati sono parte integrante del test stesso, salvo le eccezioni previste dalle vigenti normative (ad esempio, casi di emergenza, di soggetti incapaci, ecc.). E' pertanto necessario riaffermare il diritto della singola persona di scegliere se conoscere o meno il proprio genotipo in relazione a potenziali rischi per la propria salute o per quella della prole. Questi ed altri problemi connessi con l'accesso ai test genetici dovranno necessariamente essere discussi e definiti.

Nel proporre un test genetico è necessario informare il probando o i suoi familiari con linguaggio chiaro ed accessibile alla popolazione generale, sui seguenti punti:

- procedure di prelievo e rischio connesso;
- protocolli di analisi utilizzati;
- possibilità di risultati falsamente positivi o negativi, contaminazione biologica o di laboratorio, quantificazione del possibile errore diagnostico;
- genotipi e fattori di suscettibilità e/o di protezione (alleli, altre mutazioni, sesso, età, doppi alleli mutanti, polimorfismi), eterogeneità genetica e fenotipica, test di "linkage", difficoltà di interpretazione dei risultati del test;

- rischi per la salute del richiedente (infezioni/aborto, ecc.).

Accreditamento del laboratorio

La validità e l'efficacia di un test genetico devono essere valutate in termini di sensibilità, specificità, attendibilità e riproducibilità. Questi parametri spesso richiedono uno studio di valutazione su un elevato numero di campioni analizzati a volte per anni. Non è disponibile al momento una legislazione nazionale per i test genetici e pertanto la loro applicazione è attualmente non controllata. Analogamente i reagenti utilizzati per i test genetici (ad es. sonde, "primers") non vengono sottoposti a controlli di qualità né ad alcuna certificazione. Inoltre, poiché una diagnosi molecolare è realizzabile con numerose sonde o "primers" (si veda la sindrome di Di George, la sindrome di Williams, la lissencefalia, la sindrome Prader-Willi, ecc.), talvolta elaborate o prodotte in proprio, l'interpretazione dei risultati non è univoca e ciò potrebbe inficiare la conclusione diagnostica. Si ritiene necessario, pertanto, attraverso una stretta collaborazione tra le autorità sanitarie e le società scientifiche del settore, anche attraverso idonee iniziative di ricerca, arrivare alla preparazione di linee guida che supportino il legislatore nella predisposizione di una specifica normativa e pongano le basi per una certificazione di qualità dei laboratori stessi.

Test genetici multipli sul mercato

Molte compagnie internazionali stanno sviluppando

stemi di diagnosi genetica multipla, cioè basati sulla individuazione di centinaia di mutazioni diverse in più geni contemporaneamente. Alcune compagnie internazionali hanno recentemente messo a punto metodi in grado di analizzare il DNA di 500 individui diversi per 106 mutazioni differenti in 7 geni-malattia (MASDA, Multiple Allele-Specific Diagnostic Assay). La tecnologia del "DNA chip" renderà disponibile entro pochi anni nuovi "kit" basati sull'impiego di "chip" in grado di contenere 16.000 diversi oligonucleotidi in un'area di 1.5 cm². E' imminente la realizzazione di un test simile multigenico basato sull'RNA e non sul DNA per esaminare contemporaneamente l'espressione di numerosi geni (DNA chip intensify the sequence search. 1996. *Nature*, **379**: 392). L'impiego di questa tecnologia su larga scala suscita numerosi problemi etici e professionali, tra i quali:

1. L'estensione di questi test potrebbe avere ripercussioni sociali? Ad esempio, se utilizzate da compagnie di assicurazione, aziende, esercito, governi, quali sarebbero le conseguenze se venissero effettuati test di suscettibilità o di tipo predittivo?
2. La difficoltà di gestione del risultato in termini di consulenza genetica. Quale peso deve essere attribuito a certi polimorfismi che possono costituire fattori di rischio per malattie comuni?

Confidenzialità del test

La persona sottoposta ad un test genetico ha diritto di conoscere il proprio genotipo



ma anche, qualora lo desideri, di "non sapere".

I campioni biologici, non appena giunti in laboratorio, devono essere identificati nei registri in uso nel laboratorio con un codice anonimo progressivo.

Il risultato di un test genetico deve essere comunicato al probando e alla sua famiglia con la necessaria competenza e riservatezza, nella sede appropriata, evitando che la comunicazione venga effettuata a mezzo posta o fax. Il personale del laboratorio è tenuto a rispettare il segreto professionale. Il risultato di un test può ridurre l'ansietà ed avere importanti benefici di tipo psicosociale se favorevole o comunque accettato senza danno psicologico e comportamentale se comunicato con competenza e particolare sensibilità (si veda l'esperienza realizzata con la corea di Huntington).

Particolare attenzione deve essere posta alla comunicazione dei risultati dei test genetici applicati alla diagnosi prenatale.

Costi dei test

La maggior parte dei test molecolari sono oggi basati sull'amplificazione enzimatica *in vitro* del DNA mediante PCR, oppure sul "Southern blotting" o sull'ibridizzazione *in situ*. Generalmente un protocollo standard, che comprenda l'estrazione del DNA, la produzione di ampliconi e/o di frammenti di restrizione e il loro riconoscimento specifico mediante ibridizzazione molecolare, comporta un costo mediamente non superiore alle 350.000 lire per test, come risulta dalla bozza del nuovo tariffario nazionale delle prestazioni di laboratorio (è ovvio che questa cifra

indicativa è variabile da malattia a malattia). Tuttavia, lo screening di mutazioni, o la ricerca di mutazioni in più geni, richiede ovviamente un aggravio dei costi.

Malattie orfane

Si intendono con questo termine le malattie ereditarie rare per le quali c'è stato uno scarso e spesso limitato interesse nella elaborazione e preparazione di test genetici di largo impiego e di sufficiente sperimentazione. In queste situazioni spesso le metodiche utilizzate non vengono sottoposte a verifica continua e il test viene effettuato poche volte l'anno. Pertanto non esistono per queste malattie controlli di qualità e di solito i laboratori non sono disponibili ad eseguire questi test. È auspicabile che le indagini molecolari per queste patologie siano centralizzate con il duplice obiettivo di garantire il servizio diagnostico e la qualità del risultato. I registri che, con l'intervento delle società scientifiche, predispongono il censimento dei servizi diagnostici nel settore delle malattie genetiche disponibili sul territorio costituiscono un affidabile riferimento per l'identificazione dei centri disponibili alle analisi molecolari anche delle patologie rare.

Il laboratorio di diagnostica molecolare

Un laboratorio di diagnosi molecolare dovrà ovviamente avere tutti i requisiti di standardizzazione di qualunque altro laboratorio di analisi e perciò disporre di tutti gli ausili strumentali ed analitici necessari secondo le vigenti leggi. In maniera particolare e differenziata dovrà invece disporre di tutta l'attrezzatura tecnica e la competenza per la preparazione e l'analisi degli acidi nucleici. Ciò comprende tutta la strumentazione per la valutazione qualitativa e quantitativa del DNA; la strumentazione per la produzione di ampliconi (prodotti di PCR) e la loro analisi mediante restrizione, l'evidenziazione con metodi radioisotopici e non radioisotopici e disporre di tecniche in loco per poter analizzare i prodotti con più di un sistema di rivelazione (meglio se dispone di tecniche di sequenziamento del DNA).

È necessario inoltre che il laboratorio molecolare disponga dei più moderni sistemi informatici e di collegamento elettronico per il continuo aggiornamento dei metodi diagnostici e degli utensili molecolari (es. nuovi microsatelliti, nuove mutazioni, nuovi siti di restrizione, disponibilità di nuove sonde, nuovi

protocolli). Il laboratorio dovrà per quanto possibile automatizzare le procedure diagnostiche e disporre di propri protocolli standardizzati convalidati da un apposito sistema di controllo di qualità. Il laboratorio dovrà inoltre avere sempre disponibili campioni di controllo (positivi e negativi). Ogni laboratorio dovrà valutare i propri limiti di accuratezza, sensibilità e riproducibilità del test, e la propria capacità analitica ad effettuare test in condizioni qualitativamente e quantitativamente difficili (DNA degradato, DNA estratto da fonti non convenzionali, tracce di DNA) (Quality control of the polymerase chain reaction. 1993. *Rev. Med. Virol.*, 3: 107).

È una responsabilità precisa del laboratorio di genetica molecolare interagire con le infrastrutture di altri servizi di genetica e fornire una costante informazione ai medici, ai pazienti, ai servizi di consulenza genetica su eventuali nuove acquisizioni sulla particolare patologia in esame o sui possibili ulteriori test genetici effettuabili.

Ogni laboratorio dovrà fornire garanzie di riservatezza nella manipolazione delle informazioni genetiche e nell'archiviazione dei campioni biologici.



Il lavoro è stato eseguito da

*Giuseppe Novelli, Pier Franco Pignatti, Nicola Migone, Andrea Ballabio, Maurizio Ferrari
per il Gruppo di Lavoro "Genetica Molecolare"
dell'Associazione Italiana di Genetica Medica (AIGM)*

*e da Amedeo Spagnolo, Antonino Forabosco, Giovanni Mazzotti, Bruno Dallapiccola
per la Linea di ricerca: "Valutazione delle diagnosi precoci di patologia ereditaria"
del Progetto di ricerca dell'Istituto Superiore di Sanità:
"Fattori di rischio per la salute materno infantile"*

