

COMITATO NAZIONALE PER LA BIOSICUREZZA  
E LE BIOTECNOLOGIE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

**LINEE GUIDA  
PER TEST GENETICI**

Rapporto del Gruppo di lavoro

19 maggio 1998

**Presidente**

**Prof. Leonardo Santi**

**Coordinatore**

**Prof. Giuliano D'Agnolo**

### **Componenti**

Dr. Piero Battaglia  
Prof. Bruno Brambati  
Prof. Angelo Carbonara  
Prof. Salvatore Carta  
Dr.ssa Marina Cerbo  
Prof. Luigi Chieco-Bianchi  
Prof.ssa Franca Dagna Bricarelli  
Prof. Bruno Dallapiccola  
Prof. Mario De Marchi  
Prof. Giovanni Battista Ferrara  
Prof.ssa Marina Frontali  
Prof. ssa Ginevra Guanti  
Prof.ssa Gioia Jacopini  
Prof. Giovanni Mazzotti  
Prof. Giovanni Romeo  
Prof. Aldo Scarpa  
Prof. Vittorio Silingardi  
Dr. Amedeo Spagnolo  
Dr.ssa Domenica Taruscio (Segreteria Scientifica)  
Prof. Alberto G. Ugazio  
Dr.ssa Liliana Varesco

### **Segreteria del Comitato**

Dr. Bruno Valente (Presidenza del Consiglio dei Ministri)  
Prof. Mario Bebi (Presidenza del Consiglio dei Ministri)  
Dr.ssa Alessandra Cifani (Presidenza del Consiglio dei Ministri)

---

## SOMMARIO

---

|             |                                                                               |           |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b>   | <b>PREMESSA</b>                                                               | <b>6</b>  |
| <b>1.1</b>  | <b>Malattie genetiche</b>                                                     | <b>6</b>  |
| 1.1.1       | Malattie mendeliane                                                           | 7         |
| 1.1.2       | Malattie cromosomiche                                                         | 8         |
| 1.1.3       | Malattie multifattoriali                                                      | 8         |
| 1.1.4       | Malattie mitocondriali                                                        | 8         |
| <b>1.2</b>  | <b>Diagnosi delle malattie genetiche</b>                                      | <b>9</b>  |
| <b>2.</b>   | <b>TEST GENETICI</b>                                                          | <b>10</b> |
| <b>2.1</b>  | <b>Definizione</b>                                                            | <b>10</b> |
| <b>2.2</b>  | <b>Classificazione</b>                                                        | <b>10</b> |
| 2.2.1       | Test diagnostici                                                              | 10        |
| 2.2.2       | Test preclinici o presintomatici                                              | 11        |
| 2.2.3       | Test per la valutazione della suscettibilità genetica                         | 11        |
| 2.2.4       | Test per l'identificazione degli eterozigoti                                  | 12        |
| 2.2.5       | Indagini medico-legali                                                        | 12        |
| <b>2.3.</b> | <b>Peculiarità dei test genetici rispetto ad altre analisi biomediche</b>     | <b>12</b> |
| 2.3.1       | Criteri per giudicare sull'utilità dei test genetici                          | 12        |
| 2.3.2       | Necessità di assicurare la qualità dei test genetici                          | 12        |
| 2.3.3       | Importanza della validazione e interpretazione dei risultati                  | 13        |
| 2.3.4       | Problemi psicologici, sociali ed etici                                        | 13        |
| 2.3.5       | Consulenza genetica                                                           | 14        |
| <b>3.</b>   | <b>OBIETTIVI DELLE LINEE GUIDA</b>                                            | <b>15</b> |
| <b>4.</b>   | <b>VALIDAZIONE SCIENTIFICA DEI TEST GENETICI</b>                              | <b>17</b> |
| <b>4.1</b>  | <b>Tappe nello sviluppo di ogni test genetico</b>                             | <b>17</b> |
| <b>4.2</b>  | <b>Determinare le relazioni tra gene e malattia</b>                           | <b>17</b> |
| 4.2.1       | Studi di concatenazione genica (linkage)                                      | 18        |
| 4.2.2       | Identificazione diretta del gene mutato responsabile della malattia           | 18        |
| 4.2.3       | Studio dei prodotti genici                                                    | 18        |
| 4.2.4       | Studi di associazione                                                         | 19        |
| <b>4.3</b>  | <b>Determinare la validità analitica di un test genetico</b>                  | <b>19</b> |
| <b>4.4</b>  | <b>Determinare la sensibilità ed il valore predittivo di un test genetico</b> | <b>21</b> |
| <b>4.5</b>  | <b>Stabilire l'utilità clinica di un test genetico</b>                        | <b>23</b> |
| <b>4.6</b>  | <b>Decidere di introdurre un test genetico nella pratica clinica</b>          | <b>25</b> |
| <b>5.</b>   | <b>REQUISITI RICHIESTI AI LABORATORI CHE INTENDONO ESEGUIRE TEST GENETICI</b> | <b>26</b> |
| 5.1         | Denominazione dei laboratori                                                  | 26        |
| 5.1.1       | Denominazione dei laboratori                                                  | 26        |
| 5.1.2       | Direzione dei laboratori                                                      | 26        |
| <b>5.2.</b> | <b>Requisiti del laboratorio che esegue test genetici</b>                     | <b>26</b> |
| 5.2.1       | Accreditamento                                                                | 26        |
| 5.2.2       | Indicazioni generali                                                          | 27        |
|             | 5.2.2.1 Standard                                                              | 27        |
|             | 5.2.2.2 Qualificazione del personale                                          | 27        |
|             | 5.2.2.3 Controlli interni di qualità                                          | 28        |
|             | 5.2.2.4 Controlli esterni di qualità                                          | 28        |
| <b>5.3</b>  | <b>Archiviazione dei dati</b>                                                 | <b>29</b> |
| <b>5.4</b>  | <b>Refertazione</b>                                                           | <b>30</b> |
| <b>5.5</b>  | <b>Introduzione di nuovi test genetici</b>                                    | <b>30</b> |

|            |                                                                             |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.6</b> | <b>Interazioni fra clinica e laboratorio</b>                                | <b>31</b> |
| <b>6.</b>  | <b>GESTIONE DEI TEST GENETICI</b>                                           | <b>32</b> |
| <b>6.1</b> | <b>Consulenza e consenso informato</b>                                      | <b>32</b> |
| 6.1.1      | Sperimentazione dei test genetici                                           | 33        |
| 6.1.2      | Uso dei test genetici nella pratica clinica                                 | 35        |
| 6.1.3      | Principi comuni alle fasi sperimentali e alla pratica clinica               | 37        |
| <b>6.2</b> | <b>Atteggiamento direttivo o non direttivo nelle attività di consulenza</b> | <b>38</b> |
| 6.2.1      | Screening neonatali                                                         | 38        |
| 6.2.2      | Test preconcezionali e prenatali                                            | 39        |
| 6.2.3      | Test presintomatici e test predittivi                                       | 41        |
| 6.2.4      | Test di conferma diagnostica                                                | 42        |
| <b>6.3</b> | <b>Test per i minori</b>                                                    | <b>44</b> |
| <b>6.4</b> | <b>Comunicazione del risultato</b>                                          | <b>45</b> |
| <b>6.5</b> | <b>Confidenzialità e riservatezza</b>                                       | <b>46</b> |
| <b>6.6</b> | <b>Conflitto di interessi</b>                                               | <b>47</b> |
| <b>6.7</b> | <b>Accesso ai test</b>                                                      | <b>49</b> |
| <b>6.8</b> | <b>Formazione degli operatori ed educazione sanitaria della popolazione</b> | <b>49</b> |
| <b>7.</b>  | <b>PROPOSTE DI PROGRAMMAZIONE SANITARIA PER L'USO DEI TEST GENETICI</b>     | <b>52</b> |
| <b>8.</b>  | <b>CONCLUSIONI</b>                                                          | <b>55</b> |
| <b>9.</b>  | <b>APPENDICE</b>                                                            | <b>61</b> |
| <b>9.1</b> | <b>Principi di buona pratica per eseguire test genetici</b>                 | <b>61</b> |
| 9.1.1      | Requisiti del laboratorio                                                   | 62        |
| 9.1.2      | Citogenetica                                                                | 62        |
| 9.1.3      | Genetica Molecolare                                                         | 62        |
| <b>9.2</b> | <b>Test genetici nella diagnosi prenatale</b>                               | <b>68</b> |
| 9.2.1      | Definizione                                                                 | 68        |
| 9.2.2      | Caratteristiche peculiari della diagnosi genetica prenatale                 | 68        |
| 9.2.3      | Indicazioni                                                                 | 69        |
|            | 9.2.3.1 Test di screening                                                   | 71        |
| 9.2.4      | Consulenza genetica                                                         | 73        |
| 9.2.5      | Fasi della gravidanza in cui si attua la diagnosi prenatale                 | 74        |
| 9.2.6      | Metodi di prelievo                                                          | 74        |
| 9.2.7      | Metodi di analisi genetica dei tessuti fetali                               | 75        |
| 9.2.8      | Centri di prelievo di tessuti embrio-fetali                                 | 75        |
| 9.2.9      | Organizzazione dei centri di diagnosi prenatale                             | 76        |
| <b>9.3</b> | <b>Test genetici nella diagnosi tumorale</b>                                | <b>77</b> |
| 9.3.1      | Aspetti epidemiologici e socio-culturali                                    | 77        |
| 9.3.2      | Basi scientifiche                                                           | 77        |
| 9.3.3      | Principali specificità della malattia "cancro"                              | 79        |
| 9.3.4      | Modalità di impiego dei test genetici in oncologia                          | 81        |
| 9.3.5      | Conclusioni operative                                                       | 83        |

|            |                                          |           |
|------------|------------------------------------------|-----------|
| <b>9.4</b> | <b>Test genetici nelle malattie rare</b> | <b>85</b> |
| 9.4.1      | Definizione                              | 85        |
| 9.4.2      | Problemi specifici delle malattie rare   | 85        |
| 9.4.3      | Obiettivi                                | 85        |
| <b>10.</b> | <b>BIBLIOGRAFIA CONSULTATA</b>           | <b>87</b> |
| <b>11.</b> | <b>GLOSSARIO</b>                         | <b>91</b> |

## 1. PREMESSA

Il patrimonio genetico (genoma) di un individuo è costituito da acido desossiribonucleico (DNA), organizzato in unità codificanti (geni) e da regioni non codificanti ed ordinato in strutture (cromosomi), di numero e forma caratteristici per ogni specie. Nell'uomo il genoma è costituito da 46 cromosomi (22 coppie di autosomi e due cromosomi sessuali, definiti XY nel maschio, e XX nella femmina). Il genoma è presente nel nucleo di tutte le cellule dell'organismo; queste, a loro volta, sono distinguibili in due gruppi o "linee": *la linea somatica*, comprendente la grandissima maggioranza delle cellule dei diversi tessuti, e *la linea germinale*, che comprende le cellule delle gonadi deputate specificamente alla riproduzione, e quindi alla trasmissione del patrimonio ereditario da una generazione a quella successiva (ovociti nella donna e spermatozoi nell'uomo, nonché le cellule meno specializzate da cui rispettivamente derivano). Le cellule della linea somatica possiedono due copie identiche del genoma ( $2n$ ), mentre quelle della linea germinale ne possiedono una sola copia ( $n$ ).

Ogni soggetto possiede, nel proprio genoma, due copie di ciascun cromosoma e dunque anche due esemplari di ciascun gene (alleli). I due alleli non sono necessariamente identici, essendo stati ereditati rispettivamente uno dalla madre e l'altro dal padre. Se un individuo è portatore di due alleli diversi nello stesso sito cromosomico (locus), si definisce come "eterozigote" a tale locus. Se i due alleli sono identici allora l'individuo è "omozigote", sempre relativamente a quel determinato locus cromosomico.

Va aggiunto che una piccola, ma non trascurabile, parte del patrimonio ereditario si trova fuori dal nucleo, in organelli cellulari denominati mitocondri, deputati alla produzione di energia. Il genoma mitocondriale è ereditato dalla madre ed è meno "stabile" rispetto al genoma cromosomico, cioè è molto più suscettibile all'insorgenza di mutazioni.

Mentre il DNA è deputato alla conservazione dell'informazione genetica, un altro acido nucleico contenuto nella cellula (acido ribonucleico, RNA) presenta diverse funzioni, molte delle quali riconducibili alla "traduzione" della informazione contenuta nel DNA in proteine, e quindi in strutture delle cellule e dei tessuti dell'organismo.

### 1.1 Malattie genetiche

Le malattie genetiche sono causate da alterazioni (mutazioni) del patrimonio genetico di un individuo; se le mutazioni interessano le cellule germinali, la malattia si può trasmettere alla prole (malattie ereditarie), se invece la lesione interessa solo le cellule somatiche, la malattia non viene trasmessa alla generazione successiva. Pertanto, la presenza di alterazioni genetiche in cellule somatiche può essere causa di varie patologie, quali ad esempio il cancro, malattia genetica che nella maggior parte dei casi non è ereditaria. Inoltre, una determinata malattia può originare dall'interazione tra fattori genetici ed ambientali: in tale

caso il singolo individuo erediterà la predisposizione ad ammalarsi, ma la malattia si manifesterà solo per l'intervento di altri fattori, non genetici.

La probabilità che i figli ereditino una determinata malattia dai genitori dipende dal tipo di difetto e dal modo in cui questo viene trasmesso.

Le malattie genetiche si possono suddividere in **monogeniche** o **mendeliane**, dovute alla alterazione di un singolo gene, **cromosomiche**, causate dalla alterazione del numero o della struttura dei cromosomi, e **multifattoriali**, dovute alla interazione fra più geni e l'ambiente. Un ulteriore gruppo è rappresentato dalle malattie **mitocondriali**.

### 1.1.1 Malattie mendeliane

Le malattie mendeliane sono causate da mutazioni di singoli geni e trasmesse secondo i principi classici (mendeliani) dell'ereditarietà. Sono malattie importanti nel loro complesso perché molto numerose (se ne conoscono alcune migliaia) e colpiscono complessivamente l'1% dei nati, ma nella maggior parte dei casi le singole malattie sono piuttosto rare (incidenza inferiore a 1:10.000 nuovi nati).

Le modalità di trasmissione mendeliana sono tre: autosomica dominante, autosomica recessiva e legata al cromosoma X, quest'ultima suddivisa a sua volta in dominante e recessiva. Le mutazioni *dominanti* si manifestano a livello fenotipico anche nei soggetti eterozigoti, cioè coloro che portano un solo allele mutato per quel carattere, oltre a quello normale. Le mutazioni *recessive*, invece, per manifestarsi fenotipicamente devono coinvolgere i due alleli (cioè avviene negli omozigoti), mentre negli eterozigoti sono clinicamente silenti. La stessa distinzione tra dominanti e recessive viene fatta anche per le mutazioni che interessano i geni dei cromosomi sessuali, anche se con qualche differenza. I maschi possiedono un solo cromosoma X (si parla di emizigosi), pertanto ogni mutazione presente sul cromosoma X, anche se recessiva si manifesta a livello fenotipico. Le donne possiedono due cromosomi X, uno dei quali viene inattivato casualmente in una fase precoce dell'embriogenesi; per questo fenomeno, circa metà delle cellule mantiene attivo il cromosoma sessuale ereditato dal padre e metà quello ereditato dalla madre. Perciò, le donne portatrici di una mutazione legata all'X hanno due popolazioni cellulari (mosaicismo): una con l'X mutato attivo, l'altra con l'X normale attivo. Esiste anche un'eredità legata al cromosoma Y, ma di rilievo pratico più specialistico, in quanto questo cromosoma contiene pochi geni ed è importante quasi solo per l'informazione correlata allo sviluppo sessuale maschile.

### **1.1.2 Malattie cromosomiche**

Le malattie causate da anomalie cromosomiche sono tra le più frequenti cause di morte prenatale o di malattie congenite. Originano da alterazioni cromosomiche numeriche o strutturali. Le mutazioni cromosomiche più frequenti sono le trisomie (presenza di 3 copie di uno stesso cromosoma, es. la sindrome di Down o trisomia 21) o monosomie (cioè assenza di un cromosoma, ad es. sindrome di Turner). La frequenza delle trisomie, nel concepito aumenta con l'aumentare dell'età della madre

Le anomalie cromosomiche di struttura originano da rotture e da un alterato ricongiungimento delle regioni cromosomiche spezzate: le anomalie più importanti sono le delezioni e le traslocazioni. La delezione è la perdita di un segmento di cromosoma: gli eterozigoti per tali aberrazioni presentano spesso difetti congeniti e ritardo mentale. La traslocazione consiste nel trasferimento di segmenti tra cromosomi diversi. Se nel riarrangiamento non viene perso DNA i portatori di traslocazione possono anche essere clinicamente non affetti ma a rischio di produrre gameti con corredo cromosomico sbilanciato e quindi di concepire figli con anomalie cromosomiche.

### **1.1.3 Malattie multifattoriali**

La maggior parte dei caratteri umani è determinata dall'intervento di più geni che spesso interagiscono tra loro e con l'ambiente (caratteri multifattoriali). Molti difetti congeniti e malattie dell'adulto sono il risultato dell'interazione tra fattori genetici, spesso multipli, e fattori ambientali (**malattie multifattoriali**) e vengono trasmessi secondo modalità diverse da quelle mendeliane classiche.

La distribuzione combinata di questi fattori genetici nelle varie popolazioni, così come l'esposizione a questi fattori ambientali, seguono patterns molto complessi, con una notevole variabilità; il rischio di malattia dei singoli individui, ognuno caratterizzato da una specifica costellazione di caratteristiche genetiche e di esposizione a vari fattori ambientali, segue relazioni di tipo probabilistico molto complesse. Queste relazioni, che determinano il rischio di malattia (alla nascita o in funzione dell'età), sono descritte in maniera poco accurata dai modelli probabilistici oggi utilizzati.

### **1.1.4 Malattie mitocondriali**

I mitocondri (organelli cellulari deputati alla produzione di energia) contengono un proprio DNA. I mitocondri sono forniti dalla madre e sono più suscettibili all'insorgenza di mutazioni. Poiché i mitocondri sono solo parzialmente autonomi ed in parte dipendono dal genoma nucleare, si distinguono tre gruppi di malattie mitocondriali geneticamente determinate: dovute a difetti del DNA nucleare; a difetti del DNA mitocondriale e a difetti di comunicazione fra i due genomi.

## 1.2 Diagnosi delle malattie genetiche

Si basa sull'accurata valutazione clinica e sull'anamnesi familiare che hanno un ruolo primario nel percorso diagnostico. L'esame clinico richiede spesso di essere approfondito e completato con indagini di laboratorio, compresi i test genetici. Infatti, in un numero sempre più elevato di malattie sono oggi disponibili indagini biochimiche, citogenetiche o molecolari che consentono di definirne il difetto genetico e, quindi, di confermare il sospetto clinico, di effettuare la diagnosi in epoca prenatale e di identificare i soggetti a rischio in fase preclinica (o presintomatica).

In particolare, a seconda del tipo di malattia genetica, queste analisi di laboratorio possono includere: *indagini biochimiche* (dosaggi enzimatici); *indagini citogenetiche* (analisi dei cromosomi); *analisi molecolari* (analisi del DNA e dell'RNA).

L'*analisi citogenetica* viene di solito eseguita su colture di linfociti prelevati dal sangue periferico. Per poter essere analizzati i cromosomi vengono trattati con particolari sostanze coloranti (tecniche di bandeggiamento) che mettono in risalto regioni a diverse intensità di colorazione. I cromosomi bandeggiati vengono suddivisi e classificati secondo una nomenclatura standardizzata. Mediante questa indagine è possibile identificare le alterazioni di numero e di struttura dei cromosomi (vedi Appendice).

Le *analisi molecolari*, utilizzano gli acidi nucleici (DNA, RNA) estratti dalle cellule e impiegano tecniche sofisticate (che prevedono l'uso di particolari enzimi o enzimi di restrizione, di retrotrascrizione, di amplificazione del DNA mediante PCR = Polymerase Chain Reaction). Esse consentono di definire le basi biologiche di molte malattie, nonché di identificare specifiche sequenze/geni, mediante l'uso di sonde molecolari (citogenetica molecolare, ibridazione in situ a fluorescenza o FISH, painting cromosomico ecc.)(Vedi Appendice).

## **2. TEST GENETICI**

### **2.1 Definizione**

Per test genetico si intende l'analisi a scopo clinico di DNA, RNA, cromosomi, proteine, metaboliti o altri prodotti genici per evidenziare genotipi, mutazioni, fenotipi o cariotipi correlati o meno con patologie ereditabili umane. Questa definizione include gli screening prenatali, neonatali e dei portatori, così pure i test sulle famiglie a rischio. I risultati di queste indagini si possono applicare alla diagnosi ed alla prognosi di malattie ereditarie, alla predizione del rischio-malattia, all'identificazione dei portatori sani, alle correlazioni fenotipo-genotipo.

Inoltre, pur mantenendo valida la definizione di test genetico appena descritta, questo documento considera oltre i test utilizzati per l'identificazione individuale per motivi medico-legali anche i test per l'analisi a scopo clinico di DNA, RNA, cromosomi, proteine o altri prodotti genici per evidenziare genotipi, mutazioni, fenotipi o cariotipi correlati a patologie umane insorte su cellule somatiche.

Vengono invece esclusi i test effettuati a solo scopo di ricerca.

### **2.2 Classificazione**

I test genetici sono ormai ampiamente utilizzati nella pratica medica, senza che al momento, vi sia una adeguata regolamentazione. I vari test possono essere classificati a seconda delle loro finalità.

#### **2.2.1 Test diagnostici**

E' il caso di test che consentono di stabilire una diagnosi o di confermare un sospetto clinico in un individuo già affetto. Possono essere effettuati durante il periodo prenatale (Vedi Test genetici nella diagnosi prenatale in Appendice) o durante tutto l'arco di vita post-natale. Esempi sono: l'analisi citogenetica per individuare anomalie cromosomiche (es. identificazione della trisomia 21 nella sindrome di Down), la ricerca di mutazioni del gene CFTR in neonati con infezioni polmonari ricorrenti e sospetta fibrosi cistica, l'identificazione di espansioni del gene FRAXA in pazienti con un quadro clinico di ritardo mentale.

Talora un test diagnostico consente anche di fare valutazioni sulla prognosi della patologia in esame. Infatti, nel test diagnostico la caratterizzazione delle varie mutazioni e la successiva correlazione fenotipo-genotipo consentono spesso di attribuire a determinati genotipi quadri clinici caratterizzati da gradi variabili di gravità e diverso decorso. Per esempio nella fibrosi cistica esistono genotipi associati ad insufficienza e altri a sufficienza pancreatica, nelle talassemie determinate mutazioni consentono la sintesi di discrete quantità di emoglobina, nella maggior parte delle malattie neurologiche da espansione di triplette la gravità della sintomatologia è correlata con il grado di espansione.

### **2.2.2 Test preclinici o presintomatici**

Numerose malattie genetiche, soprattutto quelle di tipo autosomico dominante, possono non essere presenti alla nascita ma comparire più tardivamente, anche in età avanzata. Se il gene responsabile è stato mappato o clonato diventa possibile stabilire se un soggetto asintomatico abbia o meno ereditato l'allele mutato e quindi possa sviluppare in futuro la malattia ad esso associata.

Il risultato del test genetico può consentire di ridurre morbidità e/o mortalità, qualora siano disponibili forme di prevenzione secondaria o adeguate terapie. Spesso la disponibilità di un test genetico non si accompagna ad una migliore capacità di gestione clinica. Tuttavia, anche in questi casi, la disponibilità di un test genetico potrebbe essere di aiuto per l'individuo a rischio; infatti i risultati potrebbero fornire/gli informazioni utili nell'effettuare scelte su alcuni importanti aspetti della vita (la propria vita familiare, inclusa la scelta di maternità/paternità, la vita lavorativa, sociale, ecc.).

### **2.2.3 Test per la valutazione della suscettibilità genetica**

Alcuni test consentono l'individuazione di genotipi che non sono di per sé stessi causa di malattia, ma comportano un aumento del rischio a sviluppare una determinata patologia in seguito all'esposizione a fattori ambientali favorevoli, o alla presenza di altri fattori genetici scatenanti. Al primo gruppo appartengono il deficit in glucosio-6-fosfato deidrogenasi che predispone a crisi di emolisi acuta in seguito ad esempio all'assunzione di determinati farmaci, o il deficit di alfa-1-antitripsina, che associato al fumo, predispone all'enfisema polmonare giovanile. Al secondo gruppo appartengono patologie quali ad esempio ipertensione, diabete, ictus ed i cosiddetti tumori familiari, come la poliposi familiare o il carcinoma familiare della mammella e dell'ovaio. Tuttavia, una percentuale relativamente piccola di tumori è dovuta alla mutazione di singoli geni. Un punto critico è quindi la valutazione del valore predittivo del test utilizzato. Nella grande maggioranza dei casi un'alterazione di tipo ereditario in un gene associato al cancro rappresenta uno dei potenziali fattori implicati nello sviluppo della malattia in una data persona ed evidenzia, quindi, solo una maggiore predisposizione alla malattia. Inoltre, l'eventuale identificazione di soggetti sani ad alto rischio genetico di cancro comporta la necessità di decidere se intraprendere delle misure di prevenzione. L'approccio alla prevenzione è tuttavia molto complesso, in quanto la disponibilità di misure efficaci varia notevolmente a seconda del tipo di patologia.

### **2.2.4 Test per l'identificazione degli eterozigoti**

Nel caso di malattie autosomiche recessive particolarmente frequenti, come ad esempio la talassemia, è possibile identificare i portatori eterozigoti a livello della popolazione. Queste indagini finalizzate alla prevenzione della nascita di omozigoti, quando effettuate in maniera corretta e soprattutto quando associate ad una larga diffusione dell'informazione, hanno avuto il risultato di ridurre l'incidenza della patologia in esame.

### **2.2.5 Indagini medico-legali**

La presenza nel genoma umano di un numero straordinariamente elevato di regioni polimorfe, cioè individualmente variabili, e di marcatori utili a riconoscere queste regioni, consente l'accertamento di paternità o l'attribuzione di tracce biologiche a determinati individui, con un grado di probabilità molto elevato.

### **2.3 Peculiarità dei test genetici rispetto ad altre analisi biomediche**

Rispetto ad altri esami di laboratorio, i test genetici presentano alcune peculiarità, in quanto i risultati coinvolgono l'identità biologico-personale non solo del singolo ma anche della sua famiglia di origine e della sua discendenza.

#### **2.3.1 Criteri per giudicare sull'utilità dei test genetici**

In molte malattie genetiche non vi sono terapie efficaci e risolutive, ma solo cure palliative in grado di alleviare alcune complicanze. In altre malattie vengono sperimentate terapie, la cui efficacia e sicurezza non sono ancora dimostrate. Tuttavia il risultato di un test genetico, ancorché sfavorevole, può avere aspetti positivi potendo influire sulle decisioni riproduttive e sull'eventuale prevenzione della malattia nella successiva generazione, nonché sulla pianificazione familiare, sull'organizzazione della vita del soggetto, sulle decisioni da prendere in tema di lavoro, ecc. L'utilità di un test genetico non può dunque essere valutata con il solo criterio delle sue implicazioni mediche, ma vanno anche considerate le implicazioni più ampie che coinvolgono aspetti della vita dell'utente, il quale dovrà perciò ricevere informazioni complete sul significato delle indagini ed avere lo spazio per una autonoma valutazione.

#### **2.3.2 Necessità di assicurare la qualità dei test genetici**

La maggior parte delle tecnologie, soprattutto quelle molecolari, oggi utilizzate nell'analisi del genoma umano hanno un livello molto basso di automazione. La qualità dei dati generati dipende quindi largamente dall'esperienza e professionalità dell'operatore, al quale è affidata l'esecuzione del test genetico. Parimenti, l'interpretazione dei dati ottenuti con questo tipo di analisi è quasi totalmente affidata alle competenze in materia dell'operatore. In considerazione di ciò e del diverso contesto applicativo in cui le comuni tecniche molecolari utilizzate in un laboratorio di ricerca debbono essere utilizzate in un laboratorio di diagnostica molecolare, il problema del controllo di qualità per i test genetici riveste oggi grande importanza.

#### **2.3.3 Importanza della validazione e interpretazione dei risultati**

I test genetici possono predire i rischi di future patologie prima della comparsa dei sintomi clinici; molto raramente però questa predizione raggiunge la certezza. Inoltre non sempre la

predizione di un test genetico può essere avvalorata dal riscontro di segni clinici o strumentali indipendenti. In mancanza di questi segni, una conferma potrà venire solo dalla comparsa della malattia. Infine poichè i genotipi responsabili di malattia possono essere diversi per tipo e frequenza nelle diverse popolazioni, spesso è necessario considerare il gruppo etnico a cui appartiene il soggetto analizzato sia per decidere l'effettuazione dei test sia per interpretarne i risultati. Queste caratteristiche richiedono particolari cautele e competenze sia nella validazione clinica dei test genetici sia nell'interpretazione dei risultati.

#### **2.3.4 Problemi psicologici, sociali ed etici**

I test genetici sono fonte di complessi problemi psicologici, sociali ed etici. La crescente consapevolezza delle loro implicazioni ha concorso a sviluppare un ampio dibattito in campo bioetico a livello nazionale ed internazionale circa le finalità, i mezzi e le modalità di uso dei test genetici. I soggetti che hanno ricevuto il risultato di un test genetico possono andare incontro a stress psicologici di vario genere. Frequente è ad esempio l'autosvalutazione in caso di risultato sfavorevole in quanto il soggetto si percepisce come "imperfetto" e/o "dannoso" nei confronti della prole. In conseguenza dei risultati dei test genetici possono inoltre verificarsi discriminazioni sociali, difficoltà di inserimento nel lavoro o nella vita di relazione o nell'erogazione di beni o servizi (ad es. assicurazioni). Inoltre il risultato di un test genetico può avere implicazioni nella pianificazione familiare. Le coppie con prole a rischio hanno di fronte a sé scelte riproduttive che vanno dalla decisione di correre il rischio di un figlio affetto, alla inibizione generalizzata della riproduzione, alla diagnosi prenatale, all'interruzione di gravidanza, fino alle tecniche di fecondazione medicalmente assistita. Molte di queste opzioni possono essere in contrasto con il credo religioso della coppia o con i suoi principi etici. Infine i risultati di un test genetico possono rivelare informazioni importanti per la salute futura di parenti i quali potrebbero non voler sapere o far sapere tali informazioni, ponendo così numerosi problemi etici e di riservatezza. Tutte le problematiche di questo tipo richiedono particolari procedure sia nell'offerta di un test genetico che nella comunicazione del risultato. Tali procedure sono generalmente comprese nella consulenza genetica che deve essere parte integrante dei test genetici.

#### **2.3.5 Consulenza genetica**

Risale al 1975 la definizione di consulenza genetica (Ad hoc Committee on Genetic Counseling, 1975) come "processo di comunicazione che concerne i problemi umani legati all'occorrenza, o al rischio di ricorrenza, di una patologia genetica in una famiglia". Tale processo comprende il tentativo di una o più figure professionali, adeguatamente preparate, di aiutare l'individuo o la famiglia 1) a comprendere le informazioni mediche che includono la diagnosi, il probabile decorso della malattia e le forme di assistenza disponibili; 2) a valutare il modo in cui l'ereditarietà contribuisce al verificarsi della malattia e il rischio di ricorrenza esistente per

taluni familiari; 3) a capire tutte le opzioni esistenti nell'affrontare il rischio di malattia; 4) a compiere le scelte che essi riterranno più adeguate, tenuto conto sia del rischio che delle aspirazioni dei familiari, e ad agire coerentemente rispetto alle scelte compiute; 5) a realizzare il miglior adattamento possibile alla malattia del familiare affetto e/o al rischio di ricorrenza della malattia stessa.

Tale definizione, per molti versi ancor oggi valida, pone l'accento sul processo di comunicazione che, proprio per la valenza emotiva dei temi trattati - salute, malattia, procreazione, morte, ecc - ha una forte connotazione psicologica e deve quindi essere modulato secondo i molteplici significati psicologici che questi temi assumono per l'individuo.

La consulenza genetica è altresì il momento di processi decisionali complessi, riguardanti molteplici aspetti legati alla malattia genetica tra i quali particolare rilievo assumono sia le scelte riproduttive in situazione di rischio, sia la scelta fra conoscere o meno la propria costituzione genetica e quindi il proprio rischio di malattia. Si tratta di scelte che, per le loro risonanze profonde, non possono essere delegate ad alcuna figura professionale e richiedono la piena autonomia decisionale, come condizione essenziale perché l'esito di tali scelte - quale che sia - venga integrato in modo non distruttivo nel mondo psicologico ed etico dell'individuo o della coppia.

### 3. OBIETTIVI DELLE LINEE GUIDA

Queste linee guida hanno l'obiettivo di definire alcuni principi generali, molti dei quali largamente condivisi in analoghi documenti di altri Paesi (Holtzman & Watson, 1997) allo scopo di fornire uno strumento agli operatori sanitari e di laboratorio nell'esecuzione e nella gestione dei test genetici e ai responsabili della Sanità Pubblica nella programmazione e promozione di questo settore e nell'operare gli opportuni controlli al fine di garantire:

- un uso appropriato di test genetici sicuri ed efficaci
- un'esecuzione di test genetici in laboratori con elevati standard di qualità
- una gestione dei test genetici che garantisca all'utente una reale autonomia decisionale, un'adeguata assistenza psicologica e sociale ed una particolare attenzione ai problemi etici e di riservatezza.

Le tecniche di DNA ricombinante scoperte negli anni '70 e la loro applicazione alla mappatura e sequenziamento del genoma umano hanno enormemente accelerato la scoperta di geni responsabili di malattia o di suscettibilità alla malattia. I progressi della ricerca di base stanno portando rapidamente allo sviluppo di test genetici sia per patologie monogeniche o mendeliane che multifattoriali (da interazione tra più geni e l'ambiente). Conseguentemente, nella pratica clinica si rende disponibile un numero crescente di test genetici, alcuni dei quali sono già in uso corrente con finalità diagnostiche o predittive. E' difficile fare oggi una previsione su come i test genetici si svilupperanno nei prossimi anni, sulla rapidità della loro diffusione e soprattutto sui benefici che ne deriveranno per i singoli individui, per i componenti della famiglia e per la società. Diverse variabili possono influenzare lo sviluppo dei test genetici, alcune accelerandolo ed altre ritardandolo. Tra queste si possono annoverare:

- la competitività della scienza moderna, più o meno avvertibile secondo i Paesi, che favorisce la pubblicazione tempestiva delle scoperte;
- il grado dell'interesse pubblico e della pressione sociale nei confronti della lotta alle malattie;
- l'esigenza delle imprese di biotecnologie ad un allargamento del mercato dei test genetici, che ne migliori la resa economica;
- la diffusione delle conoscenze sui progressi della scienza e della medicina [attraverso](#) i mezzi di informazione.

Questi fattori possono interagire tra di loro in varie maniere. Per esempio, la pubblicità data alle scoperte scientifiche dai mezzi di comunicazione non riflette solo l'interesse del pubblico, ma lo stimola. Le imprese di biotecnologie dedicano un'attenzione mirata sia alla copertura data dai mezzi di comunicazione che alla conseguente risposta da parte del pubblico, per

ricavarne indicazioni di marketing. Sebbene questi interessi siano di per sè tutti legittimi, la loro somma può in definitiva rappresentare una considerevole spinta alla diffusione dei test genetici, favorendo anche un loro eventuale impiego prematuro.

Le presenti linee guida nascono da una sintesi delle attuali acquisizioni scientifiche; esse rappresentano quindi una prima risposta, che necessiterà di periodico aggiornamento secondo l'evoluzione delle conoscenze scientifiche medesime.

## 4. VALIDAZIONE SCIENTIFICA DEI TEST GENETICI

### 4.1 Tappe nello sviluppo di ogni test genetico

Lo sviluppo dei test genetici attraversa in generale **tre stadi di ricerca**:

Il *primo stadio* riguarda l'identificazione della correlazione tra una determinata alterazione genetica ed una data patologia. In questo stadio non vi è alcun utilizzo clinico del test ed i risultati ottenuti non vengono comunicati ai pazienti.

Segue un *secondo stadio sperimentale* in cui si verifica l'accuratezza del test nell'evidenziare l'alterazione genetica (**validità analitica**) e la malattia (**validità clinica**).

Il *terzo stadio sperimentale* è quello della **valutazione dell'utilità clinica** del test genetico per l'individuo e per la sua famiglia.

La validità analitica, la validità clinica e l'utilità clinica debbono essere valutate all'interno di protocolli sperimentali soggetti al controllo degli organi di consulenza scientifica del Ministero della Sanità (vedi Conclusioni, punto a).

Le persone coinvolte nella sperimentazione devono essere informate che partecipano ad un'attività di ricerca e devono rilasciare un consenso scritto, nel quale vengono esplicitate le modalità con cui si intende condurre la ricerca e le opzioni disponibili al soggetto nell'ambito del protocollo di ricerca (es. comunicazione o meno dei risultati del test).

**L'utilizzazione del test nella pratica clinica** è successiva al completamento di questi tre stadi di ricerca. I principi riguardanti il controllo di qualità, la consulenza genetica e la comunicazione dei risultati riguardano in particolare questa fase.

**Un principio che deve in ogni caso essere sempre rispettato e considerato sovrano nella decisione di introdurre un dato test genetico nella pratica clinica, è la sua effettiva utilità per l'utenza.**

Questo significa porre una barriera alle proposte avventate, agli usi inappropriati ed alla divulgazione di notizie non scientificamente corrette.

### 4.2 Determinare le relazioni tra gene e malattia

Principio: I genotipi definiti tramite test genetici devono dimostrare una correlazione altamente significativa con la patologia in esame. Questi risultati devono derivare da più osservazioni indipendenti e devono essere convalidate sulla base delle metodologie e dei criteri accettati dalla comunità scientifica.

Il coinvolgimento di un gene in una malattia può essere dimostrato in base a: 1) studi di concatenazione genica (linkage); 2) identificazione diretta del gene-malattia e/o della mutazione genica; 3) studi dell'espressione genica; 4) studi di associazione.

#### **4.2.1 Studi di concatenazione genica (linkage)**

Questo tipo di indagine è facilitata dalla identificazione sul DNA di numerosi marcatori (i cosiddetti microsatelliti) molto polimorfici nella popolazione e "informativi" nella maggior parte delle famiglie. Quando nell'ambito di gruppi familiari i soggetti affetti trasmettono alleli di un dato marcatore insieme con l'allele della malattia con una frequenza statisticamente superiore all'atteso, si conclude che il marcatore è concatenato ("linked") con il gene-malattia. L'analisi fornisce anche una stima della distanza in centimorgan (cM) del locus polimorfico dal gene-malattia. Naturalmente per definire un "linkage" sono necessari diversi gruppi familiari con numerosi soggetti affetti e soggetti sani; inoltre l'analisi comporta lo studio di diversi marcatori localizzati a monte, a valle o all'interno del gene. L'analisi di linkage localizza il gene- malattia in una determinata regione cromosomica ma non lo identifica.

#### **4.2.2 Identificazione diretta del gene mutato responsabile della malattia**

Una volta clonato un gene candidato, è essenziale stabilire se esso presenti mutazioni responsabili della patologia in esame o semplici polimorfismi non associati alla malattia. Questo problema viene in generale risolto valutando la frequenza della variante nella popolazione di controllo di individui sani o, se possibile, valutando gli effetti della mutazione sulla struttura e sulla funzionalità della proteina. Questa fase è stata completata per molti geni-malattia, e per molti di essi si conoscono le diverse mutazioni, la loro relativa frequenza nei diversi gruppi etnici e le varianti polimorfiche non associate a malattia. Alcune mutazioni hanno l'effetto di bloccare del tutto la sintesi della proteina, altre portano alla sintesi di un prodotto alterato, anche se parzialmente funzionante, altre ancora si associano ad una riduzione dell'espressione. Dal confronto tra tipo di mutazione e fenotipo clinico sono derivati dati di estremo interesse per quanto concerne la gravità e prognosi delle diverse patologie.

#### **4.2.3 Studio dei prodotti genici**

Prima dell'avvento delle tecnologie del DNA ricombinante, la correlazione gene-malattia era basata sullo studio della proteina, che rappresenta il prodotto primario del gene, o di fenotipi ad esso direttamente correlati. Esempi di questo tipo sono l'iperfenilalaninemia nei soggetti affetti da fenilchetonuria (esame ampiamente usato negli screening neonatali), il dosaggio del colesterolo sierico nell'ipercolesterolemia familiare, il dosaggio della glucosio-6-fosfato deidrogenasi e delle sue varianti nei soggetti con deficit dell'enzima.

#### **4.2.4 Studi di associazione**

Lo studio di marcatori polimorfici in un gruppo di pazienti paragonato ad un gruppo di controllo ha spesso messo in evidenza che nel gruppo di pazienti la frequenza di un dato allele è significativamente aumentata rispetto ai controlli. Esempi sono l'associazione dell'antigene

HLA-B27 con la spondilite anchilosante e dell'allele E4 dell'apolipoproteina E con la malattia di Alzheimer. Il riscontro di un'associazione in studi epidemiologici non basta da solo a dimostrare un nesso di casualità. Tra le osservazioni che possono suffragare il significato eziologico di un'associazione dimostrata a livello epidemiologico, vi sono la forza statistica dell'associazione, relazioni di dose-effetto (per esempio un rischio di malattia più elevato per gli omozigoti che per gli eterozigoti), la concordanza dei risultati tra studi e la plausibilità biologica. Anche se non è sempre chiaro il significato biologico delle varie associazioni, esse sono state spesso utili nel risolvere situazioni di eterogeneità genetica ed ancora oggi possono contribuire alla valutazione del rischio di malattia.

#### 4.3 Determinare la validità analitica di un test genetico

Principio: Prima di introdurre un test nella pratica clinica è indispensabile determinarne specificità e sensibilità analitica.

La **validità analitica** di un test genetico è data dalla sua *specificità* e dalla sua *sensibilità*.

La *specificità* corrisponde alla percentuale di campioni che sono negativi al test sul totale dei campioni che effettivamente non contengono l'analita che il test vuole ricercare; permette quindi di valutare i risultati "falsi positivi".

La *sensibilità* corrisponde alla percentuale di campioni che sono positivi al test sul totale dei campioni che effettivamente contengono l'analita che il test vuole ricercare; permette quindi di valutare i risultati "falsi negativi".

L'obiettivo dei test di genetica molecolare è determinare alterazioni nel DNA o nell'mRNA, e quello dei test biochimici misurare l'attività di enzimi o determinare altri analiti, come proteine o piccoli metaboliti.

La sensibilità analitica dei test può non essere assoluta, per esempio quando farmaci o sostanze contenute nella dieta vengono ad interferire con la determinazione biochimica dell'analita. Ad esempio, molti test sul DNA impiegati per ricercare mutazioni sconosciute non sono in grado di identificare tutte le mutazioni patogeniche. Ciononostante essi risultano utili nell'identificazione di mutazioni presenti in alcune famiglie e, una volta identificata la mutazione questa è rilevata, nelle famiglie in cui è presente, con alta specificità e sensibilità. Anche la specificità può non essere perfetta. È il caso dei test basati su analiti che possono essere alterati anche in condizioni diverse dalla malattia in oggetto, per esempio il test al cloruro ferrico, usato un tempo per riconoscere metaboliti anomali nei bambini con fenilchetonuria (PKU).

La validazione analitica del test richiede una serie di procedure, alcune delle quali vengono svolte nel laboratorio che per primo ha messo a punto l'esame, altre nei laboratori che in tempi successivi introducono nuove tecniche o modificano le metodiche correnti per la determinazione di un analita già analizzato, altre infine in laboratori che intendono introdurre nel loro repertorio un metodo già ben stabilito altrove. Questo ultimo punto sarà discusso nel paragrafo sul Controllo di qualità.

La validazione di un nuovo metodo richiede che esso venga confrontato con quello fino a quel momento ritenuto più affidabile (lo standard di riferimento). Questo potrebbe essere il primo test introdotto nella pratica clinica, per esempio il sequenziamento del DNA per mettere in evidenza le mutazioni patogeniche. Nel caso in cui si vuole convalidare una nuova metodica, si dovranno confrontare le sue prestazioni in termini di sensibilità e specificità analitiche con quelle dello standard di riferimento (qualora disponibile) suddividendo i campioni codificati tra laboratori esperti nelle rispettive metodiche.

Indipendentemente dall'esistenza di uno standard di riferimento, la validazione richiede determinazioni ripetute, per accertare che una osservazione singola non sia accidentale, e prove in "cieco" di campioni codificati, sia positivi, cioè di pazienti nei quali si sa che l'alterazione è presente, che negativi, cioè di controlli sani.

Le organizzazioni impegnate nello sviluppo e nella valutazione di un test dovranno poter disporre di un numero sufficiente di campioni sui quali effettuare le prove. La validazione dell'analisi non assicura di per se' che il test mantenga la stessa validità analitica in tutte le condizioni di impiego, a meno che non si curi di utilizzare procedure più simili a quelle che verranno messe in atto dagli utenti finali.

#### 4.4 Determinare la sensibilità ed il valore predittivo di un test genetico

Principio: La validità clinica di un test dovrà essere valutata in base ad osservazioni raccolte attraverso appositi protocolli di ricerca.

La validità clinica è determinata dalla sensibilità clinica (probabilità che il test sia positivo in individui con la patologia in esame), dalla specificità clinica (probabilità che il test sia negativo in individui senza la patologia in esame) e dal valore predittivo positivo (probabilità che un individuo risultato positivo al test abbia effettivamente la patologia in esame).

I fattori che limitano la validità clinica di un test genetico sono l'eterogeneità genetica, che riduce la sensibilità clinica, e la penetranza ridotta, che riduce il valore predittivo positivo (VPP). I due fenomeni hanno ovviamente conseguenze diverse nella pratica clinica.

*Eterogeneità.* La stessa patologia può essere determinata da mutazioni diverse nello stesso gene (eterogeneità allelica) o mutazioni in loci diversi (eterogeneità da locus). Un unico test genetico solitamente non è in grado di identificare mutazioni in loci diversi e spesso nemmeno tutti gli alleli patologici di un determinato locus, soprattutto quando sono numerosi. Le conseguenze di queste limitazioni sono accettabili se si esaminano mutazioni con una frequenza complessiva di almeno il 90-95%, come la mutazione b-39 del gene beta della globina per la talassemia in Sardegna, e la mutazione DF508 per la fibrosi cistica nei paesi del Nord Europa. In qualche caso, i test basati su riconoscimento di alterazioni grossolane, come proteine troncate, che possono derivare da molte mutazioni differenti, possono avere una sensibilità maggiore rispetto ai test diretti sul DNA che non sono in grado di identificare tutte le mutazioni di questo tipo. In ogni caso la pratica impossibilità di identificare tutte le possibili mutazioni a carico di un dato gene si riflette in una riduzione della sensibilità clinica.

Nelle neoplasie comuni, come il carcinoma della mammella, carcinoma del colon e melanoma, solo una piccola percentuale dei pazienti è portatrice di mutazioni trasmissibili ereditariamente. Pertanto la sensibilità clinica di test genetici per la identificazione di queste mutazioni sarà bassa se eseguita su individui affetti da queste neoplasie indipendentemente dalla loro storia familiare, anche impiegando test capaci di identificare tutte o quasi tutte le mutazioni trasmissibili ereditariamente. Viceversa, nelle famiglie ad alto rischio con più soggetti affetti da queste neoplasie in due o più generazioni, la sensibilità, determinata valutando la proporzione di soggetti affetti con test positivo, risulta più elevata.

*Penetranza.* La penetranza è la percentuale di individui che avendo un dato genotipo mostrano il carattere associato a quel genotipo. La valutazione della penetranza corrisponde al valore predittivo di un test che identifica un dato genotipo. La penetranza incompleta può dipendere da altri geni "modificatori" o da fattori ambientali favorevoli. Ad esempio, nell'ambito delle famiglie ad alto rischio per carcinoma mammario, il 20-30% delle donne che hanno ereditato la mutazione ai geni BRCA1 e BRCA2 non svilupperà la neoplasia; questa

ridotta penetranza può essere attribuita al mancato intervento di mutazioni somatiche o di altri fattori genetici o ambientali che possono concorrere nel processo della trasformazione neoplastica.

Principio: Per la validazione clinica di un test genetico, è essenziale scegliere un campione che abbia le stesse caratteristiche di quello su cui il test dovrà essere usato a scopo diagnostico.

Come si è detto il valore predittivo positivo dipende dalla prevalenza della patologia. Tenendo costanti la sensibilità e la specificità di un test, il valore predittivo positivo è tanto più elevato quanto più elevata è la prevalenza della patologia. Per esempio, un test che abbia una sensibilità del 50% ed una specificità del 90%, avrà un valore predittivo positivo del 5% se la prevalenza è dell'1%, ma del 36% se la prevalenza è del 10%. Quando si usa il dosaggio dell'alfa-fetoproteina sul siero materno per identificare le donne a rischio di anomalie del tubo neurale, il valore predittivo positivo è diverso nei paesi anglosassoni ove la patologia ha un'elevata prevalenza (1 su 700) rispetto ai paesi mediterranei ove la patologia ha una prevalenza 2-3 volte inferiore (1 su 1.500). Analogamente un valore predittivo positivo determinato su famiglie ad alto rischio per carcinoma della mammella non può essere estrapolato allo stesso test effettuato sulla popolazione generale.

Si può stimare in maniera indiretta il valore predittivo positivo di un test, analizzando gruppi di individui sani che abbiano superato l'età alla quale la malattia si sarebbe dovuta manifestare, identificando quelli con test positivo (falsi positivi) e calcolando quale percentuale essi costituiscono di tutti coloro che hanno un test positivo. Si tratta di un metodo applicabile in famiglie ad alto rischio; per contro, applicarlo a studi di popolazione richiede considerevole impegno nell'effettuazione dei test e nel follow-up. Un metodo più rigoroso, applicabile allo studio sia di famiglie ad alto rischio che di campioni della popolazione, è quello di analizzare individui sani e seguire i casi positivi fino a che abbiano superato l'età alla quale la malattia si manifesta. Questo può richiedere anni. Se durante questo periodo si rendessero disponibili trattamenti potenzialmente capaci di ridurre la gravità o la comparsa della malattia nei casi positivi, sarà ancora possibile stimare il valore predittivo positivo del test se i trattamenti vengono effettuati adottando prove cliniche randomizzate.

In questa prospettiva, è evidente che una corretta valutazione del valore predittivo positivo dei test per patologie genetiche che fanno la loro comparsa in età avanzata può richiedere diversi anni. Se la diffusione del test dovesse essere dilazionata fino al completamento dell'iter descritto, ne potrebbero seguire un freno allo sviluppo di nuove metodiche e forse un danno ai soggetti esclusi dal test, laddove ne fosse dimostrata l'utilità clinica.

|                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Principio: Quando uno stesso test genetico può essere applicato a scopi diversi, è necessario che esso venga formalmente validato per ciascuna applicazione. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Quando test sviluppati per un determinato scopo vengono applicati ad uno scopo diverso, non è detto che la sensibilità ed il valore predittivo positivo siano gli stessi nelle due applicazioni. Un esempio significativo al riguardo è quello della valutazione del livello dell'alfa-fetoproteina nel siero materno, inizialmente proposto per identificare anomalie del tubo neurale durante la gravidanza. Successivamente si è scoperto che lo stesso test può identificare donne a rischio per feti affetti da sindrome di Down, ma la sensibilità ed il valore predittivo positivo sono in questo caso nettamente inferiori.

Anche i test diretti sul DNA possono avere una validità clinica diversa a seconda che vengano utilizzati a scopo diagnostico in soggetti affetti, per una diagnosi preclinica in soggetti asintomatici, per l'identificazione di portatori nella popolazione, o infine per una diagnosi prenatale. Questo principio deve essere tenuto ben presente. Pertanto è necessario predisporre le più efficaci misure atte a frenare l'uso indiscriminato di un test senza che se ne abbia una corretta ed indipendente validazione per ciascuno dei possibili impieghi.

#### **4.5 Stabilire l'utilità clinica di un test genetico**

|                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Principio: Prima dell'introduzione di un test genetico nella pratica clinica, è indispensabile che siano valutati i benefici ed i rischi associati sia ai risultati positivi che a quelli negativi del test. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Il concetto di utilità clinica di un test genetico deve essere più esteso di quello normalmente in uso per altri test biomedici. Infatti, il numero di malattie genetiche di cui sia possibile modificare l'insorgenza o il decorso attraverso trattamenti specifici è, al momento attuale, molto limitato. Pertanto una diagnosi effettuata attraverso un test genetico non necessariamente comporta un miglioramento sul piano strettamente clinico. Tuttavia tra i possibili benefici dei test genetici, ancorchè con risultato positivo, è certamente da includere anche una consapevole programmazione della riproduzione e la eventuale scelta di percorsi che prevengano la trasmissione della malattia alle generazioni future. Infine, deve essere considerato il disagio psicologico, talora molto intenso, di chi essendo a rischio per una malattia genetica, vive quotidianamente in una condizione di incertezza per il proprio futuro. In situazioni di questo genere talora il risultato di un test genetico, anche se sfavorevole, può comportare un miglioramento della propria condizione psicologica.

Tra i benefici di un risultato negativo vi è la rassicurazione che una malattia probabilmente non si manifesterà in futuro. Per esempio, nel caso della diagnostica prenatale, i genitori potranno su questa base continuare la gravidanza sapendo che il figlio non è affetto dalla

malattia per cui si era fatto il test, sebbene la possibilità che egli abbia altre anomalie genetiche o congenite rimanga inalterata. Il rischio di carcinoma mammario in una donna la cui sorella sia anch'essa affetta e positiva per il BRCA1 si riduce dal 45% (rischio a priori) al 12%, che corrisponde al rischio della popolazione generale, nel caso che il test per BRCA1 risulti negativo.

L'entità dei benefici e dei danni derivanti da risultati negativi o positivi dovrebbe essere analizzata attraverso appositi studi riguardanti le motivazioni per le quali un test può essere richiesto e il follow-up sia dei casi con risultato negativo che di quelli con risultato positivo. Se manca la possibilità di dare successivamente assistenza ai casi con esito positivo per migliorarne le condizioni, si dovranno valutare rischi e benefici della comunicazione pura e semplice del risultato.

Nel caso in cui esistano trattamenti terapeutici o preventivi per la malattia diagnosticata, l'utilità clinica dei test genetici dipende in gran parte dalla sicurezza ed efficacia degli interventi disponibili a cui sottoporre gli individui risultati positivi. I diversi interventi possono essere valutati in maniera rigorosa mediante i cosiddetti trials clinici randomizzati, ove soggetti positivi o negativi al test vengono casualmente inseriti nei gruppi che subiranno o meno ciascun tipo di trattamento, oppure nessun trattamento. Esiste però un'obiettivo difficile alla conduzione di studi randomizzati, legata alla loro scarsa accettabilità da parte di medici e pazienti. Talora la scelta del trattamento può essere fatta congiuntamente dallo stesso paziente e dai medici. Un'altra possibilità di sperimentazione clinica è rappresentata dai registri nei quali sono inseriti tutti i soggetti risultati positivi al test, qualunque sia il trattamento a cui vengono sottoposti. I dati relativi allo stato di salute vengono periodicamente aggiornati, rendendo possibile modificazioni e miglioramenti dei protocolli terapeutici.

Analogamente a quanto accennato in precedenza, se i test per malattie potenzialmente curabili o prevenibili venissero confinati allo stadio sperimentale fino al completamento della sperimentazione clinica, i soggetti esclusi potrebbero subire un danno, se il test fosse di effettiva utilità. E' però altrettanto vero che la diffusione di procedure di efficacia non dimostrata e' ancora più pericolosa, poiché espone al rischio che procedure inutili o dannose entrino definitivamente nella pratica clinica. L'unica soluzione praticabile e' quella di avviare quanto più precocemente possibile gli studi necessari a valutare validità e utilità cliniche dei test, allargando gli studi sperimentali al maggior numero possibile di soggetti, previo l'indispensabile consenso informato.

#### **4.6 Decidere di introdurre un test genetico nella pratica clinica**

Principio: Chi ha sviluppato un test è tenuto a rendere disponibili i dati relativi alla validazione analitica ed all'utilità clinica, per consentire una decisione informata sul suo impiego.

Prima di introdurre un test nella pratica clinica è importante conoscerne la sensibilità, il valore predittivo positivo e l'utilità clinica, nel senso più esteso del termine.

Nel caso particolare dei test usati per screening di popolazione, questi dovrebbero essere intrapresi quando la specificità ed il valore predittivo positivo del test siano molto elevati, a meno che non si disponga di mezzi idonei a dare una conferma diagnostica indipendente prima di mettere in atto gli interventi del caso. Negli screening neonatali per malattie curabili vengono preferiti i test con la maggiore sensibilità. Nel caso dello screening degli eterozigoti effettuato su coniugi, è importante che il test sia in grado di identificare la maggior parte dei portatori. In caso contrario, ne deriverà un numero elevato di coppie con una mutazione accertata in uno solo dei coniugi, che possono egualmente avere un rischio elevato, potendo l'altro coniuge avere una mutazione non riconosciuta. In queste situazioni l'incertezza che ne deriva può suscitare confusione ed ansia e generare la convinzione non dimostrata che la futura prole avrà un rischio elevato di malattia.

## **5. REQUISITI RICHIESTI AI LABORATORI CHE INTENDONO ESEGUIRE TEST GENETICI**

### **5.1 Definizione dei laboratori**

Principio: I laboratori di Genetica sono finalizzati a svolgere indagini specifiche (citogenetica, genetica molecolare, biochimica, ecc.) per l'identificazione delle malattie su base genetica e possono essere integrati in organizzazione di tipo dipartimentale. E' indicato che tali laboratori abbiano un bacino di utenza regionale o sovraregionale.

Sono laboratori specialistici riconosciuti a livello legislativo nazionale (prima dal D.P.C.M. del 10/2/1984 e poi dal D.P.R. del 14/1/1997) e presenti in tutto il territorio nazionale.

#### **5.1.1 Denominazione dei laboratori**

I laboratori di Genetica storicamente sono stati denominati sulla base della tipologia delle tecniche usate o della patologia esaminata. Pertanto oltre al Laboratorio di Genetica Umana o di Genetica Medica sono riconosciuti: Laboratorio di Citogenetica, Laboratorio di Genetica Molecolare, Laboratorio per le malattie congenite del metabolismo, Laboratorio per lo studio delle Talassemie o delle Emoglobinopatie, Laboratorio di Immunogenetica o Tipizzazione Tissutale, Laboratorio per gli screening neonatali (definiti dalla legge), ecc..

#### **5.1.2 Direzione dei laboratori**

La direzione del laboratorio di Genetica e l'accesso al livello dirigenziale sono regolamentati dalla vigente normativa (D. Leg.vo 502/1992 e successive modifiche ed integrazioni).

## **5.2 Requisiti del laboratorio che esegue test genetici**

Principio: I laboratori che eseguono i test genetici devono essere assoggettati ad un programma di accreditamento specifico.

### **5.2.1 Accreditamento**

Il programma di accreditamento comprende l'istituzione di un organismo nazionale presso il Ministero della Sanità e l'Istituto Superiore di Sanità, i cui compiti siano:

- a) definire e aggiornare i requisiti per l'accREDITamento dei laboratori secondo le indicazioni nazionali (vedi Appendice).
- b) stabilire il programma di formazione degli ispettori deputati alla verifica dei requisiti;
- c) definire le metodologie e gli standard per la verifica dei laboratori e i protocolli per le visite ispettive finalizzate all'accREDITamento.

### **5.2.2 Indicazioni generali**

#### **5.2.2.1 Standard**

Sono individuati alcuni standard, ulteriori rispetto a quelli definiti dalla normativa vigente, cui il laboratorio che esegue test genetici deve aderire, con il proposito di garantire l'accuratezza dell'esecuzione di test genetici in base alle metodologie ed ai reagenti attualmente a disposizione (vedi Appendice).

Alcuni standard sono obbligatori ed in tal caso viene usata la parola "si deve". Alcuni standard sono altamente raccomandati, ma non assolutamente obbligatori, e in questo caso si utilizzano parole quali "si dovrebbe" e "è raccomandato".

La precisione e la sicurezza di ogni procedimento devono essere documentate in ogni laboratorio.

Il laboratorio che esegue test genetici deve operare sulla base di standard di qualità che rappresentano requisiti minimi richiesti per l'autorizzazione ad operare nel campo.

In particolare i laboratori dovranno rispondere ai requisiti di cui ai seguenti punti:

#### **5.2.2.2 Qualificazione del personale**

Principio: Il personale laureato, compreso il Direttore, del laboratorio di Genetica (medico o biologo dirigente di II livello nelle strutture pubbliche) in cui si eseguono test genetici deve essere specializzato in Genetica Medica e possedere documentata competenza professionale nelle specifiche attività che riguardano il laboratorio di genetica.

La competenza professionale si dovrebbe basare su una profonda conoscenza dei fondamenti dei test genetici e dovrebbe essere suffragata da attività di aggiornamento (corsi, workshops nazionali ed internazionali) e da pubblicazioni su riviste qualificate. Il Direttore del laboratorio e lo staff tecnico devono partecipare a programmi di aggiornamento professionale continuo.

La preparazione di base dello staff del laboratorio deve essere curata attraverso corsi di aggiornamento annuali. I programmi d'insegnamento per il personale di un laboratorio in cui si eseguono test genetici devono includere nozioni di Genetica e Biologia Molecolare; inoltre i tecnici che operano nel Laboratorio di Genetica devono seguire corsi di formazione e di aggiornamento specifici.

Il personale del laboratorio deve essere sufficiente ad eseguire la quantità e la varietà di test richiesti senza un livello di pressione che potrebbe indurre in errore.

#### **5.2.2.3 Controlli interni di qualità**

Principio: Si rende necessario istituire una serie di standard di controllo per tutti i reagenti e le metodologie impiegati in laboratorio.

Deve essere previsto che al personale che esegue i test vengano affidati campioni ad esso sconosciuti, per verificare la capacità di riprodurre i risultati dei test. Il laboratorio deve tener nota di questi risultati per ciascun individuo.

Devono essere disponibili campioni provenienti, oltre che da pazienti, anche da portatori sani e controlli negativi (pannello) per ottimizzare la validità analitica e per promuovere la qualità; in questo processo occorre garantire l'impossibilità di risalire al nome del paziente da cui è stato prelevato il campione, in riferimento alle normative vigenti sul rispetto della "privacy"- Supplemento Ordinario alla "Gazzetta Ufficiale" n.5 dell'8 Gennaio 1996 e successive integrazioni - e assicurare una gestione dei campioni libera da conflitti di interessi fra le esigenze del controllo di qualità e l'attività del laboratorio.

#### **5.2.2.4 Controlli esterni di qualità**

Principio: Il laboratorio deve partecipare ad almeno un programma di controllo esterno di qualità per ogni categoria di analisi effettuata, riconosciuto a livello nazionale e coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità.

Il controllo di qualità deve essere pianificato su base annuale con possibilità di verifica di tutti i controlli interni ed esterni istituiti per garantire la validità, l'accuratezza, la precisione, la riproducibilità e l'efficacia.

Nel formulare i programmi nazionali dei controlli di qualità dovrebbe essere acquisito il parere delle società scientifiche nazionali o internazionali del settore.

Se il risultato del controllo di qualità esterno è insoddisfacente per una singola categoria (indagini citogenetiche, Southern blotting, polimerase chain reaction=P.C.R., cromatografia, saggi enzimatici, ecc.) il laboratorio deve partecipare ad ulteriori controlli di qualità specifici finché i risultati diventino soddisfacenti.

I campioni dei controlli di qualità devono essere analizzati in un modo comparabile a quello utilizzato per testare i campioni dei pazienti.

I laboratori che utilizzano una tecnica innovativa e peculiare devono essere in grado di dimostrare la correttezza dei risultati anche impiegando metodi convenzionali.

E' necessario possedere linee cellulari o DNA con mutazioni note provenienti da banche nazionali e/o internazionali per la valutazione delle analisi molecolari. Questo materiale potrà essere utilizzato per la validazione e la calibrazione dei test genetici introdotti nel laboratorio.

Inoltre è auspicabile che tutti i laboratori partecipino anche a programmi di controllo internazionali (già esistenti o da istituire) per poter effettuare una analisi comparata di tutti gli aspetti connessi al test. In questo modo verrà garantita la possibilità di un miglioramento nella qualità di esecuzione dei test.

### **5.3 Archiviazione dei dati**

Principio: Il laboratorio deve allestire un archivio che includa elenchi permanenti contenenti i dati dei soggetti testati per il tempo previsto dalla normativa vigente (Decreto 14/1/1997).

L'archivio deve includere registri e almeno un sommario dei risultati ottenuti.

Devono essere conservati come archivio permanente: membrane o autoradiografie o fotografie di prodotti di amplificazione ottenuti mediante PCR (polimerase chain reaction=P.C.R.) delle analisi effettuate, negativi fotografici o stampe o CD per le indagini cromosomiche.

I dati possono essere salvati anche solo in files di computer, ma in questo caso bisogna assicurarsi che siano conservati i back-up, al fine di evitare perdite di dati. Il laboratorio deve conservare i files permanenti su tutti i test dei controlli di qualità interni ed esterni.

## 5.4 Refertazione

**Principio: la refertazione deve essere standardizzata e deve contenere:**

- a. la data di raccolta del campione;
- b. il numero di identificazione del campione che sia unico per il laboratorio e/o l'Istituzione;
- c. il nome dell'individuo testato;
- d. la data in cui l'individuo è stato sottoposto a test;
- e. il tipo di tecnica usata;
- f. la data della risposta;
- g. i risultati del test;
- h. tutti i valori di controllo ed i ranges normali, dove è possibile;
- i. le interpretazioni adeguate e le firme del Dirigente responsabile diretto dell'indagine e del Direttore del Laboratorio o chi ne fa le veci in sua assenza.

I referti dei laboratori devono includere sufficienti informazioni in modo da consentire al medico richiedente non-genetista una corretta interpretazione ed una corretta modalità di comunicazione dell'esito del test al paziente o ai genitori del paziente nel caso in cui questi sia minorenne.

Il referto deve contenere tutte le informazioni, direttamente correlate ai risultati del test, utili ad una corretta consulenza genetica.

## 5.5 Introduzione di nuovi test genetici

**Principio:** L'introduzione nel laboratorio di nuovi test genetici è subordinata alla dimostrazione della loro validità e utilità clinica.

L'introduzione in un laboratorio di un nuovo test genetico presuppone che questo sia stato adeguatamente validato sul piano analitico e clinico e sia disponibile il relativo protocollo di utilizzo. Quest'ultimo sarà soggetto a revisione sulla base di eventuali nuove evidenze disponibili, riguardo alla validità e utilità clinica del test.

Prima di impiegare un nuovo test genetico routinariamente, un laboratorio deve condurre una fase pilota di verifica della "performance" del test in quel dato laboratorio.

Se il laboratorio sta utilizzando un kit previamente approvato, la sua verifica implica la dimostrazione che le caratteristiche corrispondono a quelle indicate dal fornitore.

Se non viene utilizzato alcun kit e il laboratorio inizia ad utilizzare il test come in altri laboratori (impiegando lo stesso o altri metodi), deve dimostrare che i risultati ottenuti sono comparabili a quelli degli altri laboratori.

Una dimostrazione delle caratteristiche operative del test può essere ottenuta mediante l'uso di test "in cieco" (impiegando campioni che contengono il marcatore cercato o altre sostanze distinguibili dal marcatore).

Le procedure per la verifica della "performance" di un nuovo test genetico, quando introdotto in un laboratorio, vanno stabilite da parte di appositi organismi nazionali.

I laboratori di ricerca che sottopongono i risultati dei test a medici che potranno utilizzarli per decisioni cliniche, devono sottoporre i loro test genetici agli stessi controlli interni ed esterni dei laboratori clinici.

***I protocolli di buona pratica per eseguire test genetici vengono allegati in Appendice.***

## **5.6 Interazione fra clinica e laboratorio**

Principio: Per un corretto impiego dei test genetici è richiesta una stretta collaborazione tra i clinici, che interagiscono con il soggetto che si sottopone al test, e il laboratorio che lo fornisce.

Le interazioni fra il laboratorio e i clinici sono maggiori per i test genetici rispetto a qualsiasi altro servizio prestato da un laboratorio. La decisione sull'impiego di un test genetico e le implicazioni del suo risultato devono essere valutati e discussi con il medico curante. Il potenziale errore nel riferire informazioni circa il test, la sua scelta, la probabilità, la predittività e la natura condizionante del test sono elementi critici del rapporto di collaborazione fra il laboratorio e il medico richiedente e/o chiunque sia destinato a venire a conoscenza dei risultati del test.

A causa della complessità nell'interpretazione dei risultati dei test genetici è necessaria una maggiore quantità di informazioni relative al soggetto in esame ed una maggiore informazione rivolta all'interessato (consenso informato) rispetto agli esami condotti in un normale laboratorio clinico. Un test genetico richiede, in aggiunta alle informazioni di routine, e, qualora ne sia appropriata la domanda, ogni informazione di laboratorio e clinica compresa l'appartenenza etnica notizie riguardo alla storia familiare della patologia in questione (albero genealogico completo) e una documentazione scritta che attesti il consenso informato (Vedi Capitolo Gestione dei test genetici).

La mancanza dei requisiti richiesti per la corretta esecuzione ed interpretazione del test impone che il medico curante si impegni nell'ottenere tutte le informazioni necessarie. Nel

caso in cui queste non possano essere ottenute nella loro completezza, si richiede una estrema cautela nel procedimento per l'effettuazione del test.

Principio: i risultati del test devono essere riportati con terminologia comprensibile anche ai non-genetisti: da questo punto di vista il laboratorio che esegue il test deve dare piena disponibilità alla relativa consulenza genetica.

## **6. GESTIONE DEI TEST GENETICI**

### **6.1 Consulenza e consenso informato**

A differenza di altre analisi in uso nella pratica clinica i risultati dei test genetici hanno numerose implicazioni sul piano psicologico, sociale e riproduttivo. Il patrimonio genetico rappresenta infatti un elemento fondante dell'identità personale e familiare. La decifrazione e la circolazione dell'informazione genetica possono assumere, più di altre informazioni biologiche, aspetti di minaccia e di violazione del sé oltre che esporre a potenziali discriminazioni sociali.

Principio: Devono essere considerati parti integranti di un test genetico la comunicazione e l'interpretazione dei risultati e la consulenza sulle loro possibili implicazioni.

Nell'offrire un test genetico ad un soggetto è necessario discutere preliminarmente tutte le possibili implicazioni dei diversi risultati in quanto:

- a) spesso le malattie predette dai test genetici non possono essere curate o prevenute e quindi l'individuo che deve decidere se sottoporsi al test può trovarsi a valutare l'utilità dell'informazione genetica anche su un piano non medico;
- b) a seconda dell'attendibilità del test genetico varia il rischio che l'utente possa intraprendere, a seguito del risultato, azioni che sarebbero inopportune se il risultato fosse errato; ciò è tanto più rilevante in quanto, il valore predittivo di un test genetico e la sua attendibilità sono sovente difficilmente valutabili;
- c) soggetti o coppie che attraverso test genetici apprendano di avere un rischio di concepire figli affetti possono evitare il concepimento o la nascita di tali figli ricorrendo anche alle tecniche di fecondazione assistita con seme eterologo o alla diagnosi prenatale; le decisioni nella sfera riproduttiva che conseguono al risultato di un test genetico possono essere assai complesse e le azioni da intraprendere non senza rischi;

d) i test genetici possono rivelare informazioni anche sul futuro stato di salute di consanguinei del soggetto che vi si è sottoposto. L'eventuale comunicazione del risultato del test ai parenti potrebbe costituire una lesione del loro diritto a non conoscere la propria condizione genetica; d'altro canto, la mancata comunicazione potrebbe costituire una sottrazione di una informazione importante per la loro salute o per quella dei loro figli.

e) il test genetico può rivelare informazioni non richieste, come ad esempio una non paternità o il sesso del nascituro. In questo caso si pone il problema se comunicare o meno l'informazione non richiesta.

f) il risultato di un test genetico potrebbe essere usato da compagnie di assicurazione o datori di lavoro per operare una discriminazione nei confronti di persone ad alto rischio per una malattia genetica.

g) la conoscenza del risultato potrebbe portare ad una stigmatizzazione dei soggetti in questione e delle loro famiglie.

Il consenso informato ad un test genetico è il risultato di un processo che deve aiutare il soggetto a decidere se sottoporsi o meno al test. Tale processo consultoriale è una tappa essenziale sia nella sperimentazione del test che nel suo uso routinario. Infatti, in entrambe le situazioni, è della massima importanza che il consenso informato nasca da un dialogo nel corso del quale il/la potenziale utente riceve dal/la sanitario/a che gestisce il test genetico, informazioni complete e accurate riguardo a tutte le possibili implicazioni dei risultati ottenibili.

#### **6.1.1 Sperimentazione dei test genetici**

La valutazione della validità di un nuovo test genetico, della sua sicurezza e dell'efficacia degli interventi che ne conseguono pone problemi particolari. Negli studi pilota non si possono fornire a priori ai soggetti in studio cifre relative al valore predittivo del risultato, alla probabilità di risultati falsi positivi o negativi, alla efficacia di trattamenti preventivi o terapeutici. Per queste ricerche è necessario quindi basarsi sulla validità del disegno sperimentale e sulla garanzia del massimo rispetto dei soggetti partecipanti allo studio.

Principio: Negli studi per la validazione di un test, il consenso informato deve essere richiesto ogni qualvolta esista la possibilità di risalire da un campione biologico al soggetto dal quale è stato ottenuto.

Come per la sperimentazione clinica dei farmaci, è necessario chiedere un consenso informato anche per la sperimentazione di test genetici.

Non si può rinunciare al consenso informato nemmeno quando tutte le seguenti condizioni siano soddisfatte:

- la partecipazione allo studio comporti per i partecipanti un rischio minimo e comunque commisurato ai potenziali benefici della ricerca;
- la rinuncia al consenso non leda i diritti dei partecipanti; questi ultimi dovranno essere comunque informati dei loro diritti e delle garanzie previste per legge a tutela della loro salute;
- la sperimentazione non possa essere altrimenti effettuata;
- il progetto sperimentale sia scientificamente valido;
- l'anonimato dei risultati sia garantito.

Se per la validazione di un test genetico viene usato un campione biologico già raccolto per altri fini, è necessario il consenso informato qualora sia possibile risalire al soggetto da cui il campione è stato ottenuto. Qualora invece non sia possibile risalirvi (uso anonimo del campione) il consenso informato non è necessario, tuttavia devono comunque venire osservate le norme sulla tutela della riservatezza dei dati personali.

I partecipanti allo studio devono essere informati:

- a) dei benefici che possono derivare dallo studio in questione;
- b) dei rischi connessi con la partecipazione allo studio;
- c) della possibilità di conoscere o meno il risultato del test e, in caso affermativo, in quale fase dello studio (prima o dopo la validazione).

I partecipanti devono essere liberi di decidere se conoscere o meno i risultati, soprattutto quando non esista una terapia sicura ed efficace. È altresì importante che siano informati che, nella sperimentazione di un test, il rigore nella attribuzione dei campioni biologici può essere meno accurato di quanto non accada sul singolo test. I partecipanti devono essere informati su chi ha accesso ai risultati e quali conseguenze potrebbero loro derivarne dalla diffusione dei risultati (ad esempio discriminazione sociale). Un consenso scritto da parte del soggetto è necessario qualora il risultato del singolo partecipante debba essere trasferito a terze persone. In ogni caso tale risultato non deve essere riportato su cartelle cliniche o altri documenti ufficiali del soggetto.

Principio: Se la validazione di un test genetico è connessa con lo studio della sua utilità clinica è necessario informare i partecipanti dei due aspetti della ricerca ed ottenerne il consenso informato per entrambe le finalità.

La validazione di un test può essere associata alla valutazione dell'efficacia di nuovi trattamenti. Se il risultato positivo di un test comporta la partecipazione ad un trial clinico, il soggetto deve esserne informato al momento in cui il test gli/le viene proposto. E' inoltre possibile che i soggetti che forniscono determinati risultati siano inclusi in registri da utilizzare per la validazione e la valutazione dell'efficacia di trattamenti. Il consenso informato per l'inclusione in un registro è necessario se il registro potrebbe avere lo scopo di rintracciare i soggetti che si sono sottoposti al test. Devono inoltre essere rispettate le leggi vigenti per la tutela delle persone rispetto al trattamento di dati personali (legge 675, 1996; Gazzetta Ufficiale n. 279, 29/11/1997 e successive integrazioni).

### **6.1.2 Uso dei test genetici nella pratica clinica**

Dopo aver validato un test genetico e averne quantificati la sensibilità e il valore predittivo rimangono ancora dei rischi connessi con il risultato: a) rischi psicologici (come, ad esempio, uno stato ansioso o depressivo derivante dalla consapevolezza di ammalarsi in futuro, senso di colpa, alterazione dell'immagine di sé, ecc.); b) rischi fisici (ad esempio, complicazioni derivanti dall'uso di trattamenti o terapie conseguenti al risultato del test, ovvero la comparsa della malattia per inefficacia del trattamento preventivo); c) rischi di discriminazione (come la perdita del lavoro o di un'assicurazione); d) rischi di stigmatizzazione (come la perdita di contatti sociali nel luogo di lavoro, in famiglia, ecc.). Ne consegue che la comprensione e la valutazione da parte dell'utente dei rischi e dei benefici che possano derivare da un test genetico rimane un processo complesso anche dopo che il test è stato validato. E' quindi indispensabile che l'offerta di test genetici, ancorchè validati, avvenga nell'ambito di una consulenza genetica capace di fornire al/la potenziale utente un'informazione completa sulle caratteristiche e le implicazioni del test, di offrire spazio ai suoi dubbi ed alle sue preoccupazioni, di garantire una sua decisione autonoma, ed infine di assicurare un supporto psicologico adeguato sia nella fase decisionale che nell'affrontare le conseguenze del risultato.

Principio: Potenziali utenti di un test genetico devono essere informati sulle sue caratteristiche e sulle possibili implicazioni dei diversi risultati, prima di effettuare il test.

Il soggetto al quale viene offerto un test genetico deve ricevere una completa informazione sui suoi aspetti tecnici, sulle sue finalità, nonché sugli eventuali trattamenti o interventi che potranno essere attuati a seconda del tipo di risultati. Deve inoltre essere informato dei vantaggi che ne possono derivare e dei rischi ai quali va incontro, in modo da maturare autonomamente la volontà di sottoporsi al test. La conoscenza della sensibilità e del valore predittivo del test permette al soggetto di valutare meglio le modificazioni del rischio di malattia che possono derivare dal risultato del test. Il/la potenziale utente deve inoltre essere informato/a:

a) delle modalità e dei tempi sia dell'esecuzione del test che della comunicazione del risultato;  
b) delle implicazioni dei risultati possibili, compreso: lo stress psicologico derivante dalla consapevolezza di potersi ammalare in futuro o di generare un figlio affetto da una grave malattia; della necessità di decidere riguardo ad eventuali trattamenti che possano prevenire la malattia o ridurre il danno; della possibilità che il risultato fornisca informazioni su terze persone o comunque informazioni non richieste (non paternità, sesso di un feto, ecc.) e della necessità di decidere a priori se, e come, comunicare tali informazioni alle persone coinvolte; del rischio di perdere il lavoro o l'assicurazione; della possibilità di essere discriminati o stigmatizzati nei rapporti sociali. Nel caso di test genetici sul feto si dovrà inoltre tenere conto del rapporto affettivo materno-fetale e delle sue particolari implicazioni sul piano etico, emotivo e psicologico nonché delle sue diverse valenze nelle varie fasi della gestazione.

Infine, nel caso di diagnosi prenatale, l'uso delle tecniche invasive per il prelievo fetale e la opzione di una interruzione di gravidanza in caso di feto affetto impongono una rigorosa ed esauriente informazione sulle modalità di esecuzione e sul rischio derivante dalla loro applicazione, espresso in termini percentuali.

c) dei sistemi adottati per la tutela della riservatezza dei risultati e di chi abbia accesso ad essi; di dove e per quanto tempo, sarà conservato il campione biologico usato per il test; di chi avrà la disponibilità del campione e per quali scopi; del diritto del soggetto a limitare l'accesso ai risultati e la disponibilità del campione per altri fini.

Tutti questi aspetti devono essere discussi con il/la potenziale utente, fornendo tutte le informazioni necessarie e favorendone l'autonomia decisionale. La firma di un consenso informato scritto è l'ultima fase del processo comunicativo. Nel testo devono essere specificate tutte le informazioni fornite, le problematiche esaminate con l'utente e le scelte da questi effettuate. E' consigliabile suddividere la consulenza in due o più colloqui e fornire le informazioni sia in forma verbale che scritta, a meno che non vi sia la necessità immediata di provvedere all'esecuzione del test, in casi previsti dalla normativa vigente.

La responsabilità della consulenza è di chi gestisce sia la comunicazione che l'interpretazione dei risultati.

### **6.1.3 Principi comuni alle fasi sperimentali e alla pratica clinica**

Principio: Le informazioni sul test genetico e sulle sue implicazioni, e tutto il processo di consulenza devono essere formulati in un linguaggio adeguato al livello di comprensione e di cultura del/la potenziale utente.

Le informazioni fornite prima del test dovrebbero offrire al potenziale utente la possibilità di comprendere ciò che gli/le viene comunicato e di esprimere le proprie valutazioni e le preoccupazioni relativamente ai vari aspetti del test. Il colloquio diretto con il consulente ha

particolare rilevanza per coloro che non possono o non sanno leggere e quindi non sono in grado di utilizzare materiali scritti. Possono essere usate anche altre modalità di comunicazione che siano comunque idonee a fornire quelle informazioni supplementari, di solito fornite in forma scritta, che hanno lo scopo di rafforzare la comprensione dei problemi trattati (sistemi audiovisivi).

Nel caso delle persone non udenti deve essere presente al colloquio un interprete della lingua dei segni, ed è utile avvalersi anche dell'ausilio di materiali scritti o visivi. Nel caso in cui il soggetto comprenda con difficoltà la lingua italiana, si dovrà ricorrere all'aiuto di un traduttore nella/dalla lingua del/la potenziale utente.

Particolare attenzione deve essere posta al contesto culturale dal quale proviene il soggetto, soprattutto se appartenente ad altre etnie, in modo da adeguarsi al suo livello di comprensione ed al suo sistema di valori.

Principio: E' inaccettabile che il/la potenziale utente del test o i suoi familiari vengano influenzati o forzati a prendere una specifica decisione riguardo ad un test genetico. Il rispetto dell'autonomia del soggetto deve essere assoluto. Questo implica di poter disporre di una informazione aggiornata ed esauriente e di essere liberi da costrizioni esterne. Il soggetto a cui viene offerto un test deve sapere che la sua accettazione è volontaria e che, qualunque sia la sua decisione, non viene messo in discussione il suo diritto ad essere assistito nel migliore dei modi.

L'informazione sui vantaggi e sugli svantaggi del test deve essere presentata in modo completo, obiettivo e non direttivo. Se coloro che offrono il test hanno difficoltà a discuterne in modo esauriente ed obiettivo, o perchè non sufficientemente convinti dell'importanza del processo consultoriale, o perchè non sufficientemente informati sul test, o per ragioni di tempo, devono indirizzare il/la potenziale utente a chi potrà farlo in modo adeguato.

Trova generale consenso il principio che il soggetto che presenta un rischio aumentato di malattia genetica possa usufruire dell'assistenza sanitaria senza costi aggiuntivi. Poichè è tuttavia possibile che venga attuata una qualche discriminazione, soprattutto da parte di compagnie di assicurazione private o da parte di datori di lavoro, chi offre un test genetico deve informare l'utente della possibilità che questo accada. E' chiaro che chi rischia di perdere l'assicurazione o il posto di lavoro a seconda del risultato di un test genetico, vede limitato l'esercizio della sua autonomia decisionale. Sarà necessario precludere alle compagnie di assicurazione e ai datori di lavoro, pubblici o privati, l'accesso all'informazione genetica, per evitare loro di trarre vantaggio dalla discriminazione dei soggetti con elevato rischio di malattie genetiche (legge 675, 1996 e successive integrazioni).

## **6.2 Atteggiamento direttivo o non direttivo nelle attività di consulenza**

Si è già sottolineato come debbano essere evitate azioni coercitive o valutazioni che influenzino la decisione del/la potenziale utente riguardo al test. Vi sono tuttavia situazioni nelle quali coloro che forniscono la consulenza possono esplicitare le loro preferenze ed assumere quindi un atteggiamento direttivo. In questo paragrafo verrà valutata l'opportunità di atteggiamenti direttivi o non direttivi nei diversi tipi di test.

### **6.2.1 Screening neonatali**

Lo screening neonatale di alcune malattie come la fenilchetonuria e l'ipotiroidismo congenito consente di identificare i bambini affetti e di avviare tempestivamente trattamenti in grado di prevenire o ridurre il danno che ne deriva. In questi casi, se lo screening è correttamente eseguito, i rischi sono minimi. Per altri screening neonatali, come ad esempio quello per la distrofia muscolare di Duchenne, i benefici sono meno chiari a fronte di rischi maggiori. Ad esempio, il test può permettere di prevenire casi secondari nella stessa famiglia o, talora, di prolungare la sopravvivenza del paziente ma non di migliorare la qualità della vita, che rimarrà comunque fortemente compromessa. Mentre nel primo tipo di screening può essere consentita una maggiore direttività, nel secondo tipo la consulenza deve essere rigorosamente non direttiva e tutelare al massimo l'autonomia decisionale dei genitori.

Principio: Per screening con validità scientifica e utilità clinica ben dimostrate si può rinunciare al consenso informato dei genitori, ma essi devono essere sufficientemente informati sullo screening, in modo da capire - e non da subire - le ragioni per cui viene fatto.

I futuri genitori hanno il diritto di ricevere informazione sugli screening neonatali. Le informazioni dovrebbero essere date prima della nascita del bambino, soprattutto quando vi sia una tendenza a dimissioni rapide della madre e del neonato dall'ospedale o nel caso di parto a domicilio. Il tempo speso ad informare ripaga ottimizzando i risultati dello screening: i genitori bene informati sono più collaborativi e possono contribuire ad un maggiore efficienza del test. Ad esempio, se i genitori sono stati informati che c'è una maggiore probabilità di falsi risultati negativi quando il bambino viene prelevato nel corso della prima giornata di vita, potranno collaborare a far analizzare nuovamente il bambino.

Se il test permette anche la identificazione del portatore sano, oltre che dell'ammalato, si rende comunque necessario il consenso informato. Infatti la condizione di portatore sano può comportare vari svantaggi compreso il rischio di discriminazione o di stigmatizzazione sociale. Ai genitori devono essere chiarite le implicazioni di questo tipo di risultato.

Principio: Il consenso informato dei genitori è necessario nel caso in cui non siano state sufficientemente accertate la validità o l'utilità clinica dello screening neonatale.

Un atteggiamento più o meno direttivo deve essere commisurato al grado di consenso esistente sui benefici e sui rischi del test. Da questo punto di vista va rilevata l'urgenza di precise linee guida relative allo screening della fibrosi cistica previsto in Italia dalla legge n. 104 del 5.2.92 e dalla legge 548 del 23.12.93 senza che vi sia peraltro un consenso internazionale sull'effettiva utilità di questa procedura.

### **6.2.2 Test preconcezionali e prenatali**

Principio: nel caso di test che influenzino le decisioni riproduttive sono indispensabili una informazione completa e un comportamento non direttivo da parte di chi li gestisce, in modo da garantire il rispetto dei valori e delle convinzioni dell'individuo o della coppia.

La maggior parte delle malattie genetiche per le quali è disponibile un test preconcezionale o prenatale non possono essere prevenute nè curate o trattate in modo efficace, anche se sono stati raggiunti cospicui progressi terapeutici per alcune patologie (vedi trapianti di midollo osseo nelle talassemie) e ulteriori progressi potranno ancora venire dalla terapia genica. Una possibile opzione consentita dalla legge 194/78 è la interruzione volontaria di gravidanza in caso di feto affetto. La decisione di sottoporsi ad un test genetico prenatale ha risonanze profonde sul piano personale e deve essere raggiunta dai genitori in armonia con i propri desideri e valori morali o religiosi, senza alcuna interferenza da parte degli operatori sanitari, e senza condizionamenti economici o sociali. Se i futuri genitori chiedono l'opinione di chi gestisce il test, questi dovrà limitarsi ad incoraggiare una decisione autonoma dei coniugi e ad assisterli nel processo decisionale per arrivare alla scelta che ritengano migliore per la loro vita. I sanitari che avessero forti opinioni personali a favore o contro l'interruzione di gravidanza nel caso di feto affetto, dovranno opportunamente astenersi dall'esprimere le proprie convinzioni personali nell'offrire test che coinvolgano decisioni riproduttive e che esigano, pertanto, la totale autonomia della gestante/coppia.

Sebbene i test di screening eseguiti su sangue materno (ad esempio tri-test detto anche triplotest) abbiano irrilevanti rischi immediati per la madre, un risultato che evidenzia un aumentato rischio di patologia fetale comporterà la decisione di eseguire la diagnosi prenatale mediante tecniche invasive quindi con tutte le relative problematiche. La donna che prende in considerazione questo tipo di test deve ricevere preliminarmente una completa informazione e deve conoscere le implicazioni dei possibili risultati e della loro affidabilità.

I test per l'identificazione del portatore sano hanno implicazioni per i figli presenti e futuri del soggetto e richiedono che egli sia informato degli eventuali rischi riproduttivi e delle opzioni disponibili per minimizzarli. I rischi a breve termine di uno screening per l'identificazione dei portatori sani sono prevalentemente psicologici, in termini di ansia o di diminuzione dell'autostima in caso di risultato positivo. Prima del test bisogna informare in modo non direttivo la persona su tutte queste implicazioni, sia a breve che a lungo termine, e valutare le strategie che possono evitare il concepimento o la nascita di un figlio ammalato, come i metodi naturali di controllo della fertilità, la contraccezione, la diagnosi prenatale e l'interruzione di gravidanza. Il consenso informato è sempre necessario quando il test può influenzare il comportamento riproduttivo.

Principio: la richiesta, da parte di uno dei genitori, di un test genetico sul feto al fine di accertare una condizione non patologica non deve essere accolta, a meno che la condizione non sia connessa con un aumentato rischio di malattia per il feto.

Particolare attenzione è stata rivolta in quest'ambito alla richiesta di determinazione precoce del sesso fetale. L'accertamento del sesso del nascituro è stato utilizzato nella prevenzione di patologie genetiche legate al cromosoma X per le quali non si disponeva ancora di test specifici. Questa analisi ha una minore utilizzazione per di interesse a seguito dei progressi nella mappatura dei geni-malattia. Tuttavia esso si presta ad usi impropri, come la selezione del sesso dei figli per finalità socio-economiche o affettive. Esiste un generale consenso internazionale nel vietare questo uso improprio della diagnosi prenatale.

### **6.2.3 Test presintomatici e test predittivi**

Principio: Deve essere adottato un atteggiamento non direttivo nel caso di un test che riveli il rischio di una malattia futura, soprattutto quando non vi sia un trattamento efficace o privo di rischi per prevenirla o curarla.

La maggioranza delle malattie genetiche per le quali è disponibile un test presintomatico o preclinico non sono attualmente prevenibili né trattabili con metodi che aumentino la sopravvivenza e/o la qualità della vita. Di conseguenza un risultato positivo non comporta vantaggi sul piano medico-assistenziale e può generare elevati livelli di ansia. Molte persone chiedono di sottoporsi ad un test pensando di vedere confermato il risultato negativo che si aspettano, e possono decidere di rinunciare se poste di fronte alla concreta possibilità di un risultato sfavorevole. D'altro canto, persone appartenenti a famiglie ad alto rischio possono, attraverso meccanismi complessi, avere maturato il convincimento di essere affette. In questi

casi anche i risultati favorevoli possono portare ad effetti indesiderabili quali la "sindrome del sopravvissuto" o a crisi di identità. Nel corso della consulenza che precede il test è necessario lavorare su questi meccanismi psicologici, per aiutare l'individuo a confrontarsi con tutti i possibili risultati.

Nel caso di test predittivi, quindi che valutano la predisposizione ad ammalare, un risultato negativo potrebbe dare al soggetto un falso senso di sicurezza e indurlo a tralasciare quelle generiche misure cautelative che riducono il rischio o la gravità della futura malattia. Per queste ragioni il test deve essere offerto in modo non direttivo e nell'ambito di un processo consultoriale esauriente, che consenta di conoscere -e non di presumere- le opinioni del potenziale utente. Se, come spesso avviene, il test viene offerto per iniziativa di un sanitario, è ancora più importante che al soggetto venga garantita la possibilità di prendere una decisione autonoma, sulla base della propria scala di valori.

Nel caso in cui avesse posizioni fortemente pregiudiziali, in favore o contro il suo uso a prescindere da ogni fondamento scientifico, è meglio che si astenga dal processo consultoriale o che espliciti le proprie idee, sottolineandone il carattere personale (piuttosto che usare un atteggiamento direttivo subdolo o ambiguo). Solo nel caso in cui i benefici derivanti dal test (in termini di trattamenti sicuri ed efficaci) siano chiaramente prevalenti sui rischi, chi gestisce il test può raccomandarne l'esecuzione al soggetto, ferma restando l'autonomia decisionale di quest'ultimo. Chi gestisce il test ha l'obbligo di stimolare una decisione autonoma del soggetto e di informarlo/le del suo pieno diritto di decidere diversamente. Per tutti questi test deve essere ottenuto un consenso informato indipendentemente dall'entità dei benefici che possono derivare dal suo risultato. I soggetti devono inoltre essere informati che un risultato positivo può avere implicazioni per i figli attuali e futuri e per altri consanguinei.

#### **6.2.4 Test di conferma diagnostica**

I test genetici possono essere utilizzati, oltre che per prevedere una malattia futura in un soggetto sano, anche per confermare una diagnosi clinica o per contribuire ad una diagnosi differenziale in un paziente. E' infatti comune, che un medico chieda di sottoporre il paziente già sintomatico ad un test genetico, per confermare la diagnosi e impostare correttamente la terapia.

Alcuni test genetici, come quelli fondati sul dosaggio di enzimi o sull'analisi del cariotipo, sono stati introdotti da tempo nella pratica clinica, soprattutto pediatrica, a fini diagnostici. Per questi test è prassi comune in Italia non richiedere il consenso informato del paziente o dei genitori qualora si tratti di patologie pediatriche, essendo considerati alla stessa stregua delle altre analisi in uso nel procedimento diagnostico, che non comportano particolari rischi. Le

informazioni sulle implicazioni di un eventuale risultato positivo vengono fornite al paziente, o a chi ne ha la responsabilità, a test già effettuato.

Generalizzare tale prassi estesa a tutti i test genetici effettuati a fini diagnostici potrebbe, però, porre cospicui problemi, soprattutto nel caso di test per malattie che insorgono tardivamente, in età giovanile o adulta. E' infatti opportuno ricordare che i test genetici fondati sull'analisi del DNA non indicano necessariamente che esiste un processo patologico in atto, ma solo che esiste una predisposizione o un rischio del soggetto ad ammalarsi di una specifica malattia. Ciò implica che qualora l'analisi del DNA per una malattia ad insorgenza in età giovanile o adulta (ad esempio per la Malattia di Huntington) venisse effettuato in una persona a rischio, sulla base di una sintomatologia aspecifica (ad esempio una sintomatologia ansiosa o depressiva), insorta magari per altre cause, il test configurerebbe di fatto la situazione di un test presintomatico, per il quale non sarebbe stato chiesto il necessario consenso informato. Inoltre un eventuale risultato positivo del test condurrebbe erroneamente a considerare già insorta la patologia genetica in questione. Esempi di questo tipo servono ad illustrare come il confine tra l'uso "predittivo" e l'uso "diagnostico" di un test genetico possa essere assai labile e debba essere oggetto di una attenta disamina perchè le garanzie elaborate per l'uso "predittivo" dei test genetici non vengano di fatto vanificate dall'uso diagnostico.

In attesa di una più ampia discussione sull'argomento si propongono i seguenti principi:

Principio: Un medico curante può richiedere a fini diagnostici un test genetico per un paziente quando esista una congruità tra la sintomatologia presentata ed il quadro clinico della malattia di cui si chiede il test.

Andranno a questo scopo elaborati, da parte delle Associazioni di Medici e Genetisti, dei criteri di elegibilità dei pazienti da sottoporre ad un test genetico per uso diagnostico. Tali criteri dovranno essere diffusi ad opera delle Autorità Sanitarie in modo capillare tra gli operatori sanitari sul territorio. Tale prassi, oltre a garantire un uso eticamente corretto del test genetico, ha il vantaggio di limitare l'uso dei test solo ai casi per i quali è effettivamente appropriato.

Principio: Se un medico curante ritiene opportuno sottoporre un paziente ad un test genetico per la verifica di ipotesi diagnostiche relative a malattie ad insorgenza in età giovanile o adulta, dovrà spiegare al paziente stesso o, nel caso di un minore, ai genitori la motivazione del test, i benefici ed i rischi ad esso connessi, i limiti dei possibili risultati e le implicazioni del test per il paziente e per i familiari, ed ottenerne il consenso informato.

Nel caso in cui un paziente maggiorenne sia temporaneamente o permanentemente incapace di prendere una decisione autonoma, dovrà essere chiesto il consenso informato del parente

più stretto o di chiunque ne esercita la tutela. Nel caso infine che non sia disponibile alcun parente, il medico curante potrà decidere di sottoporre al test il paziente in assenza di consenso informato, solo in caso in cui i vantaggi che possono derivare dal risultato del test in termini di trattamento della malattia in atto siano evidenti ed indiscutibili.

### **6.3 Test per i minori**

Il consenso informato ai test genetici implica la capacità di assumersi la responsabilità della decisione e dunque richiede, da parte del/la utente, maturità e consapevolezza decisionale che ha posto in particolare evidenza la questione del test genetico nel caso dei minori, soprattutto per quanto riguarda i test predittivi di malattie dell'età giovanile o adulta, vale a dire di patologie che insorgono dopo che il soggetto avrà raggiunto la maggior età e quindi la capacità di decidere in piena autonomia. Il problema assume una particolare rilevanza quando dal risultato del test predittivo non consegua alcun trattamento preventivo efficace o miglioramento della salute del minore. In questi casi i genitori che richiedessero il test per un minore non avrebbero come finalità la salute del/della figlio/a, sia pure con le migliori intenzioni, non essere i migliori interpreti del benessere psico-sociale dei propri figli.

Principio: I test genetici predittivi possono essere effettuati su minori sani a rischio per patologie genetiche dell'età giovanile o adulta con consenso informativo dei genitori, o di chi detiene la patria potestà, solo nel caso in cui esistono concrete possibilità di terapie o trattamenti preventivi efficaci da attuare prima del raggiungimento della maggiore età.

Diversi ordini di considerazioni sono alla base di questa raccomandazione. Da un lato, la violazione del diritto del minore di decidere, una volta divenuto adulto, se eseguire o meno il test, e, dall'altro la violazione del diritto alla riservatezza del risultato, anche se da parte dei genitori. Infatti, se il test genetico venisse eseguito sul minore dietro richiesta dei genitori quei diritti sarebbero di fatto annullati, in assenza di contropartite in termini di salute futura. A queste considerazioni di natura etica se ne aggiungono anche altre di natura psicologica quali: il danno potenziale che il risultato del test, soprattutto se sfavorevole, potrebbe causare all'autostima del minore; l'alterazione del rapporto dei genitori con un/una figlio/a che ammalerà in senso iperprotettivo oppure discriminatorio nei confronti di fratelli e sorelle; la discriminazione del minore stesso a livello scolastico o di investimento educativo e il riverberare di tutto questo sulla sua futura carriera lavorativa così come sulla sua capacità di costruire relazioni stabili e significative. Ovviamente, tutte queste considerazioni non valgono per i test predittivi di quelle patologie in cui una diagnosi precoce è invece a tutto vantaggio del minore perché il soggetto può essere sottoposto fin dall'adolescenza a protocolli di analisi che consentono opportuni trattamenti volti ad attendere o a prevenire gli effetti della

malattia (si veda ad esempio il caso della poliposi familiare del colon). Analogamente, laddove la patologia sia già in atto ed il test genetico abbia finalità diagnostiche o la malattia tenda a manifestarsi in età infantile, l'applicazione di un test genetico sul minore non si accompagna alle difficoltà psicologiche ed etiche precedentemente considerate. Una volta stabilito questo principio generale è opportuno tuttavia esaminare i limiti. Vi possono essere infatti motivi particolari per cui vengono richiesti test su minori, com'è il caso, ad esempio, di agenzie di adozione che chiedono test predittivi su bambini a rischio per patologie genetiche, ai fini di una migliore collaborazione in famiglie adottive. Una richiesta di test predittivi può anche essere fatta dal minore stesso in caso di matrimonio o di gravidanza. In tutti questi casi il consulente genetista dovrà esprimere il proprio parere non attenendosi rigidamente ad una norma ma dopo avere attentamente vagliato i reali vantaggi e gli svantaggi che l'effettuazione del test può comportare per il minore.

#### **6.4 Comunicazione del risultato**

Principio: Chi si sottopone al test deve essere informato delle modalità con le quali gli/le verrà comunicato il risultato prima che il test venga eseguito. Chi gestisce il test ha l'obbligo di comunicare al soggetto sia un risultato negativo che positivo.

Le implicazioni di un risultato positivo o negativo devono essere esaminate preliminarmente con il soggetto, prima dell'esecuzione del test, in modo da prepararlo ad affrontare ogni evenienza. Al momento della comunicazione del risultato il soggetto deve essere aiutato psicologicamente a far fronte ai problemi che potrebbero derivarne e che possono essere più complessi rispetto a quanto previsto nella fase precedente al test.

Per queste ragioni è raccomandabile che la comunicazione del risultato di un test venga fatta di persona, da chi ha gestito la fase precedente il test, e non per lettera o telefono. Oltre alla comunicazione verbale e diretta del risultato del test, dovrà essere fornito all'utente anche un risultato scritto, corredato dalla sua interpretazione in termini di attendibilità dell'analisi eseguita e di entità dei rischi per sé e per i familiari. Solo in casi eccezionali un risultato negativo può essere comunicato all'utente per lettera, purché corredato da sufficienti spiegazioni sui limiti del test, e da tutte le indicazioni sul modo in cui l'utente può, in caso di dubbio, ottenere ulteriori spiegazioni.

Le istituzioni pubbliche o private che offrono test genetici devono servirsi, nella gestione della fase consultoriale, di personale esperto. Tale personale deve provvedere alla consulenza direttamente e/o addestrare altro personale sanitario e supervisionarne il lavoro. In quest'ambito, accanto a medici specialisti esperti in genetica è opportuno prevedere, secondo

quanto già in atto in altri paesi, la formazione di consulenti genetisti non medici. Psicologi, assistenti sociali e personale infermieristico possono, se opportunamente preparati anche dal punto di vista bioetico, svolgere un ruolo rilevante nella gestione di casi particolarmente complessi dal punto di vista psico-sociale. In casi di psicopatologia di particolare gravità, potrà anche essere previsto il ricorso ad una assistenza psichiatrica.

Principio: Chiunque si sottoponga ad un test, dopo consenso informato, deve essere lasciato libero di non conoscerne il risultato, anche se il test è già stato eseguito.

Tra la decisione di sottoporsi al test e la comunicazione del risultato possono intervenire eventi o ripensamenti che inducono l'utente a modificare la propria decisione. Non deve quindi essere esercitata alcuna pressione per comunicargli/le il risultato.

### **6.5 Confidenzialità e Riservatezza**

Principio: L'accesso al risultato di un test genetico è consentito solo a chi sia stato esplicitamente indicato dall'utente per iscritto al momento del consenso informato o successivamente. In nessun caso il risultato deve essere comunicato a terze persone, siano essi datori di lavoro, compagnie di assicurazione, o altri enti, senza il consenso scritto del soggetto in questione.

Chi si sottopone al test deve essere rassicurato/a che il risultato non verrà comunicato a persone non da lui/lei esplicitamente autorizzate, consentendogli/le di accedere al test senza temere violazioni della privacy. Devono essere evitati sistemi di comunicazione che non garantiscono la riservatezza, come il fax o sistemi di posta elettronica. I risultati di test predittivi possono essere riportati su cartelle cliniche solo nel caso in cui l'utente abbia dato specifico consenso scritto a tale operazione.

I risultati di test diagnostici possono essere riportati su cartelle cliniche in quanto parte della storia clinica di un paziente, ma è preferibile che ciò avvenga in forma codificata per tutelare il diritto alla riservatezza, sia del paziente che dei familiari.

Infine, la archiviazione dei risultati di un test genetico presso il laboratorio che li ha eseguiti o presso il sanitario che ha gestito la fase consultoriale deve prevedere misure efficienti di protezione della confidenzialità dei dati, tenendo conto delle norme vigenti. La archiviazione dell'informazione in forma codificata può essere utile per limitare l'accesso ai dati, purché si garantisca un controllo rigoroso della chiave di accesso.

Principio: Coloro che sono coinvolti nella gestione di un test genetico in tutte le sue fasi, compreso il personale di laboratorio che lo esegue, sono tenuti al segreto professionale e devono pertanto astenersi dal fornire qualsiasi tipo di informazione riguardo al test a chiunque, compresi i familiari dell'utente, senza l'esplicito permesso scritto di quest'ultimo.

Nessun tipo di informazione riguardo alla richiesta di un test, alla decisione di sottoporvisi o meno, a maggior ragione, riguardo al risultato può essere fornita ad un familiare o chiunque altro, senza il consenso scritto dell'utente. Una deroga a questo principio può essere presa in considerazione solo nel caso in cui dalla mancanza dell'informazione derivi al familiare o ad altre persone un danno irreversibile o la morte, altrimenti prevenibile, ed il soggetto che si è sottoposto al test si rifiuti persistentemente di comunicare l'informazione, nonostante i tentativi di convincerlo a farlo. Nel caso di minori a rischio per gravi patologie prevenibili (es. poliposi familiare del colon) che potrebbero essere sottoposti ad un test predittivo, il consulente dovrà tentare di ottenere il consenso del genitore portatore della mutazione. Qualora ogni tentativo risultasse vano, dovrà essere preso in considerazione il ricorso al giudice tutelare in attuazione delle leggi vigenti a tutela del minore. Ad ogni modo, le ragioni per cui l'informazione derivante dal test potrebbe essere rilevante per i familiari del/della potenziale utente devono essere sempre esplicitate nella fase consultoriale.

## **6.6 Conflitto di interessi**

Principio: Deve essere adottata grande cautela da chi gestisce la fase consultoriale che precede il test nell'individuare situazioni di conflitto tra la decisione di una persona a sottoporsi ad un test genetico che può rivelare l'elevato rischio di malattia anche in un familiare, e la volontà di quest'ultimo di non sapere, o di non far sapere, tale informazione. Nel caso che si verifichi una situazione del genere deve essere fatto ogni possibile tentativo di comporre il conflitto tra le due diverse posizioni. Se ciò risultasse impossibile, il prevalere dell'una decisione sull'altra dovrà essere valutato nel singolo caso, tenendo conto della gravità delle conseguenze prevedibili nei due casi.

Un test genetico eseguito su un soggetto può rivelare l'elevato rischio di malattia di un consanguineo (ad esempio il genitore, nel caso di malattie autosomiche dominanti ad insorgenza tardiva). Se il consanguineo non desidera che sia rivelato il suo assetto genetico, il risultato del test può configurarsi come una violazione della privacy e/o della sua autonomia decisionale, anche nel caso in cui l'informazione non gli/le venga esplicitamente comunicata. Infatti dal risultato del test possono conseguire azioni, da parte del soggetto che vi si è

sottoposto, tali da rivelare al consanguineo il tipo di risultato ottenuto. Chi gestisce la fase consultoriale di un test genetico deve individuare queste situazioni prima dell'esecuzione del test e tentare con ogni mezzo di comporre il conflitto, o proponendo al/la potenziale utente eventuali procedure alternative (test di esclusione) o cercando di trovare un accordo tra le opposte ragioni delle due parti. Nel caso in cui ogni tentativo sia vano, prevale il diritto al test di chi l'ha richiesto, se la rinuncia ad esso comporta la omissione di trattamenti che prevengono o curano la malattia o l'adozione di strategie che prevengono il concepimento o la nascita di figli ammalati.

Principio: L'offerta di un test genetico e la relativa fase consultoriale devono essere basate su precisi criteri di eleggibilità del/la potenziale utente e sulla sua volontà di sottoporsi al test. Deve essere evitato, o, nel caso, reso esplicito un eventuale interesse di chi offre il test, o di chi gestisce la fase consultoriale, a reclutare il maggior numero possibile di utenti.

Chi offre un test genetico o chi ne gestisce la fase consultoriale può trarre un beneficio, diretto o indiretto, dall'incremento del numero di test eseguiti. Una situazione del genere può realizzarsi, ad esempio, se chi offre il test ha un interesse economico nel laboratorio che lo esegue, o se le sue prestazioni vengono remunerate per numero di test eseguiti piuttosto che per ore di consulenza effettuate. Ciò può condurre l'operatore ad assumere un atteggiamento direttivo, incoraggiando il/la potenziale utente a sottoporsi al test. In linea di principio chi può avere, direttamente o indirettamente, un beneficio dall'incremento del numero di test deve astenersi dal gestire l'offerta di test e la fase consultoriale conseguente. Nel caso in cui questo non possa essere evitato, il conflitto di interessi deve essere reso esplicito al/la potenziale utente.

## **6.7 Accesso ai test**

Principio: I test genetici scientificamente validati e di provata utilità clinica devono essere accessibili a tutti coloro per i quali vi è una indicazione, indipendentemente dalla possibilità di sostenerne le spese e dalla copertura assicurativa.

I test genetici predittivi, eseguiti su soggetti asintomatici, possono essere considerati alla stregua dei servizi di medicina preventiva. In generale, se un test genetico ha un'utilità clinica, cioè può condurre a trattamenti, non altrimenti effettuabili, che prevengono la malattia e/o ne riducono il danno, l'accesso al test dovrebbe, nei limiti del possibile, essere gratuito. Deve essere fatto ogni sforzo per eliminare le barriere economiche che possono impedire

l'accesso ai test genetici alle classi sociali meno abbienti. L'accesso a polizze assicurative private non deve essere influenzato dal risultato di test genetici.

In futuro è prevedibile che l'offerta di test genetici provenga sempre più spesso da medici di base o di primo livello. E' quindi da prendere in seria considerazione la necessità di riferire i potenziali utenti a genetisti medici, a consulenti genetisti o ad altri specialisti esperti nel campo per valutare la effettiva presenza di una indicazione al test e per gestire in modo appropriato la interpretazione dei risultati e la fase consultoriale pre- e post-test. Le Autorità Sanitarie Nazionali e Regionali dovranno provvedere alla definizione ed alla pubblicazione di una lista di centri pubblici e privati accreditati per la gestione dei test genetici, il cui utilizzo è previsto in casi selezionati a carico del S.S.N.

## **6.8 Formazione degli operatori ed educazione sanitaria della popolazione**

Principio: Gli operatori coinvolti nell'offerta e nella gestione di un test genetico devono conoscere in modo esauriente le caratteristiche del test, i criteri di eleggibilità dei/lle potenziali utenti, i benefici e i rischi nonché le implicazioni non mediche che possono derivare dal suo risultato. Essi sono responsabili di eventuali carenze o scorrettezze nella gestione del test.

La proliferazione dei test genetici, la progressiva diffusione del loro uso, e la complessità della loro gestione pongono cospicui problemi nella formazione dei medici, ai quali è affidata la corretta integrazione dei test nella pratica clinica, nonché nella educazione sanitaria della popolazione, che viene chiamata, in quanto potenziale utente, ad operare scelte quanto più possibile autonome e quindi informate.

In Italia, a differenza di altri paesi Europei, vi è stata una forte carenza da parte delle autorità sanitarie, nazionali e regionali, nella programmazione di Consulenti Genetici che provvedessero, con personale appositamente addestrato, alla copertura sul territorio nazionale delle nuove esigenze che la ricerca sui test genetici andava creando. Nel nostro Paese esistono Scuole di Specializzazione in Genetica Medica per la preparazione di medici e biologi alla gestione dei test genetici; tuttavia data la rapida evoluzione nelle conoscenze in questo specifico settore, occorre valutare l'adeguatezza della preparazione fornita rispetto ai requisiti attuali. D'altro canto, solo molto recentemente la figura professionale del Genetista Medico o Biologo è stata prevista negli organici del S.S.N. Nella formazione universitaria dei medici proprio quei corsi che dovrebbero costituire la base per una corretta gestione dei test genetici, quali la Genetica Medica (comprendente fondamenti di calcolo delle probabilità), la Bioetica e la Psicologia, sono tuttora, nel migliore dei casi, insegnamenti facoltativi. Il laureato in medicina frequenta corsi di genetica generale e umana nel primo anno di università, senza nessuna formazione, per quanto attiene alle norme etiche ed al rapporto con l'utente, che non sia quella del tradizionale rapporto medico-paziente acquisita nell'ambito di una medicina

sostanzialmente terapeutica. In realtà, l'uso predittivo dei test genetici pone il medico di fronte ad un utente che è sostanzialmente sano e che egli deve sollecitare ad una decisione autonoma, utilizzando un approccio non direttivo che è assai diverso dall'atteggiamento prescrittivo della maggior parte dei medici, abituati ad assumersi responsabilità terapeutiche verso il loro paziente. Tuttavia, in anni recenti e sotto l'impulso dello sviluppo della ricerca in genetica umana e medica, sono sorti più o meno spontaneamente numerosi gruppi, afferenti a Istituti o Dipartimenti universitari, a presidi sanitari territoriali pubblici o privati, ad Associazioni per la lotta a specifiche malattie genetiche, che competentemente offrono e gestiscono test genetici. Il personale che opera in tali settori ha di fatto, al di là degli specifici titoli di studio, acquisito sul campo una competenza preziosa, che costituisce una ricchezza nazionale da valorizzare per evitare un uso e una gestione scorretti dei test genetici. La relativa facilità delle tecniche di laboratorio per l'esecuzione di molti test genetici consente a personale competente sul piano tecnico, ma del tutto ignaro delle complessità interpretative del risultato e delle sue implicazioni psicosociali, di offrire test genetici senza le opportune garanzie per l'utente.

In questa situazione è indispensabile che le Autorità competenti provvedano rapidamente:

- a) ad individuare i consulenti genetisti medici e non medici che siano già in possesso di una comprovata competenza nella corretta gestione dei test genetici i quali fungano, nell'immediato, da riferimento per le strutture sanitarie territoriali in attesa che vengano istituiti corsi teorici e pratici mirati ad una più ampia diffusione delle competenze sui test genetici tra gli operatori sanitari;
- b) a promuovere nei cittadini e nei medici le conoscenze utili a comprendere gli elementi essenziali dei test genetici.

## 7. PROPOSTE DI PROGRAMMAZIONE SANITARIA PER L'USO DEI TEST GENETICI

Allo scopo di conoscere le iniziative di programmazione sanitaria di alcune Regioni e lo stato dell'arte in materia di diagnosi precoce delle malattie genetiche, a livello nazionale, e' stato promosso il Workshop "Diagnosi precoce di malattie genetiche e della suscettibilita' ereditaria allo sviluppo di neoplasie: proposte per una programmazione sanitaria", organizzato dall'Istituto Superiore di Sanita', 18-19 dicembre 1997 (Responsabile Scientifico: Dr.ssa Domenica Taruscio; Vedi Atti del Workshop).

Dagli interventi delle Regioni invitate a partecipare a questa iniziativa sono emersi due approcci rispetto alla programmazione sanitaria:

1) L'approccio proposto dalla Regione Emilia Romagna privilegia la organizzazione di un **coordinamento regionale**; questo consentirebbe di individuare e collegare competenze specifiche e settoriali rendendo ottimali ed uniformi diagnosi, prevenzione e cura dei soggetti affetti da malattie genetiche e delle loro famiglie.

Inoltre il coordinamento consentirebbe anche per la Genetica Medica, che eroga prestazioni in regime di attività specialistica ambulatoriale, di "individuare criteri per la definizione di piani preventivi di attività" (circolare regionale n°24 del 22/7/1997) al fine di una più razionale utilizzazione delle risorse e di una migliore offerta assistenziale.

Le principali funzioni del coordinamento sarebbero:

- la identificazione delle competenze specifiche esistenti sul territorio regionale con offerta di percorsi diagnostico-assistenziali ottimali rendendo più lineare ogni singolo percorso e/o processo organizzativo;
- la utilizzazione coordinata evitando duplicazioni delle risorse presenti in Regione con riduzione dei costi gestionali;
- la individuazione di eventuali carenze e il conseguente sviluppo delle competenze mancanti;
- la definizione dei livelli assistenziali minimi in accordo con il piano sanitario regionale e nazionale;
- la garanzia della rispondenza dei percorsi clinico/diagnostici ai requisiti identificati anche a livello nazionale ed internazionale per specifiche patologie genetiche (diagnosi presintomatiche, diagnosi ai minori);
- l'attivazione di procedure per il controllo di qualità e l'accreditamento delle strutture di genetica;
- il collegamento con i flussi informativi regionali, nazionali ed internazionali esistenti.

2) Un differente approccio e' costituito dal modello già operativo nella Regione Liguria che poggia sulla istituzione del **Dipartimento Regionale di Genetica** mediante una legge approvata dal Consiglio regionale nella seduta del 28 ottobre 1997.

In particolare, tale legge prevede che il Dipartimento regionale di genetica sia costituito dall'aggregazione funzionale di servizi operativi nell'ambito della genetica medica in grado di assicurare tecniche diagnostiche, competenze cliniche e terapeutiche comprese quelle riabilitative, consulenza genetica, assistenza specialistica, ricerca scientifica, indagini epidemiologiche, collaborazioni nazionali ed internazionali per la prevenzione, la diagnosi e la cura delle malattie su base genetica.

Fanno parte del Dipartimento regionale di genetica le strutture pubbliche o private convenzionate rientranti nelle seguenti categorie:

- a) laboratori di genetica, servizi di genetica clinica che operano esclusivamente nel campo della genetica medica;
- b) settori la cui attività verte su competenze specifiche della genetica medica, facenti parte di unità operative o servizi di altra disciplina medica.

Infine, e' costituito il Comitato Etico che esprime parere vincolante su progetti di ricerca biomedica e di sperimentazione clinica e terapeutica.

La composizione del Comitato Etico prevede non solo la presenza di tecnici altamente qualificati, ma anche di rappresentanti di espressioni socio-culturali religiose e filosofiche e dai tecnici dell'informazione.

Inoltre, nell'ambito del Workshop e' stato illustrato lo stato dell'arte in Italia sui seguenti argomenti:

- 1) diagnosi prenatale;
- 2) modelli per la prevenzione e la diagnosi di specifiche malattie genetiche;
- 3) criteri per l'applicazione dei test genetici nella prevenzione dei tumori eredo-familiari.

L'intervento del Dirigente Generale del Dipartimento della Programmazione del Ministero della Sanita', ha sottolineato il particolare rilievo che, nel contesto della programmazione sanitaria, assume il dibattito sui servizi sanitari rivolti alla diagnosi delle malattie genetiche e alla evidenziazione della suscettibilità ereditaria allo sviluppo di neoplasie.

In particolare, e' stato evidenziato come le linee guida siano uno strumento coerente nello scenario attuale, che vede la definizione da parte del documento di programmazione sanitaria nazionale per eccellenza, il Piano Sanitario Nazionale, di "obiettivi di salute" e attribuisce concretamente alle regioni e alle aziende sanitarie (unità sanitarie locali ed aziende

ospedaliera) il potere di organizzare le risorse in modo da raggiungere gli obiettivi predefiniti. Inoltre, le linee guida possono consentire, in accordo con gli obiettivi predefiniti, di selezionare tra i vari comportamenti possibili e coerenti con i principi generali, quelli più efficienti ed efficaci considerando i seguenti problemi:

- la variabilità del comportamento degli operatori di fronte al medesimo problema clinico-assistenziale;
- la difficoltà da parte degli operatori di giocare un ruolo consapevole nella gestione delle risorse;
- la crescente complessità tecnologica dell'assistenza sanitaria;
- la difficoltà, aumentando la complessità organizzativa e le aspettative dell'utenza, di contenere i costi dell'assistenza garantendo adeguati livelli qualitativi.

## 8. CONCLUSIONI

Le linee guida proposte dal Gruppo di lavoro intendono fornire uno strumento per ottimizzare i potenziali benefici derivanti dall'utilizzo dei test genetici a livello sanitario e sociale, ed in particolare promuovere:

- un uso appropriato di test genetici sicuri ed efficaci
- un'esecuzione di test genetici in laboratori con elevati standard di qualità
- una gestione dei test genetici che garantisca all'utente una reale autonomia decisionale, un'adeguata assistenza psicologica e sociale ed una particolare attenzione ai problemi etici e di riservatezza.

La predisposizione e la continua revisione dei protocolli di utilizzo dei singoli test genetici sulla base delle nuove acquisizioni scientifiche, e la loro diffusione presso gli operatori sanitari sono condizioni indispensabili per raggiungere e consolidare nel tempo tali obiettivi.

**Per un'azione di governo coerente con le presenti linee guida, il Gruppo di lavoro ritiene utile formulare alcune raccomandazioni relative a:**

- a) l'introduzione di nuovi test genetici nella pratica clinica ivi compresa la commercializzazione di kit diagnostici;
  - b) le caratteristiche dei laboratori autorizzati all'esecuzione dei test genetici;
  - c) la formazione del personale sanitario coinvolto nella gestione dei test genetici;
  - d) l'organizzazione dei servizi sanitari interessati;
  - e) l'educazione sanitaria della popolazione;
  - f) l'accessibilità al test;
  - g) la regolamentazione della pubblicità dei test genetici;
  - h) la pianificazione a livello nazionale delle risorse destinate alle patologie rare.
- 
- a) Introduzione dei test genetici nella pratica clinica ivi compresa la commercializzazione di kit diagnostici

Il Ministero della Sanità dovrà attivare procedure per la valutazione ed il riconoscimento ufficiale dei test genetici utilizzabili nella pratica clinica che definiscano i protocolli da seguire per la validazione clinica.

La validazione di tali test dovrà essere basata su protocolli approvati dagli organi di consulenza scientifica del Ministero della Sanità (Istituto Superiore di Sanità e Consiglio Superiore di Sanità) che dovranno valutare sia richieste di singoli laboratori che intendono passare dall'uso di un test genetico "solo per la ricerca" ad un impiego nella pratica clinica sia richieste di ditte relative alla commercializzazione di kit diagnostici per test genetici.

Devono essere individuati i laboratori di riferimento per la validazione analitica.

Solo i test valutati ed approvati secondo tali procedure potranno essere eseguiti al di fuori di protocolli di ricerca o con oneri finanziari a carico dei pazienti o del S.S.N.

Deve essere compilata e periodicamente aggiornata una lista dei test genetici validati e di provata utilità clinica che devono essere accessibili a tutti coloro per i quali vi è indicazione.

Per i test genetici già in uso nei laboratori nazionali, si dovrà prevedere di:

- 1) effettuarne una ricognizione completa;
- 2) in caso di kit commerciali, per la validazione ci si avvarrà della documentazione relativa, nazionale e/o internazionale;
- 3) in caso di test genetici che non rientrano nella categoria "kit commerciali" se ne dovrà accertare la validazione attraverso la letteratura internazionale.

In attesa del completamento delle procedure di cui ai punti 2 e 3, dovranno comunque essere attivati i controlli di qualità interni (vedi paragrafo 5.2.2.3) ed esterni (vedi paragrafo 5.2.3.4).

E' prevedibile che in futuro venga esercitata una pressione da parte delle ditte che commercializzano kit per test genetici per la vendita di alcuni di essi direttamente al pubblico. In una condizione, quale quella attuale, in cui non si sono ancora sufficientemente diffuse né una cultura genetica di base né, tantomeno, le consapevolezza di tutte le implicazioni psico-sociali dei test genetici, si ritiene che la commercializzazione diretta al pubblico di kit per test genetici debba essere esplicitamente vietata dal Ministero della Sanità per impedirne usi scorretti o abusi, come l'effettuazione su individui non consenzienti.

#### **b) Caratteristiche dei laboratori autorizzati all'esecuzione dei test genetici**

I Laboratori che eseguono test genetici dovrebbero essere assoggettati ad uno specifico programma di accreditamento secondo quanto previsto dalle presenti linee guida.

A tale scopo dovrebbero essere approntate le procedure per l'ispezione dei laboratori che eseguono test genetici ed il relativo accreditamento.

La disciplina dell'accreditamento dei laboratori che eseguono test genetici dovrà prevedere:

- l'aggiornamento dei requisiti richiesti secondo le indicazioni nazionali (vedi Appendice);
- la durata della validità dell'accreditamento;

- il controllo e l'ispezione dei laboratori che si occupano di test genetici da parte di ispettori appositamente formati dall'Istituto Superiore di Sanità.

- la possibilità di accesso a tutti i controlli interni ed esterni istituiti per garantirne la validità, l'accuratezza, la precisione, la riproducibilità e l'efficacia nell'applicazione.

Ogni laboratorio deve essere preparato a fornire agli ispettori tutti i dati relativi ai test e gli elementi necessari ad assicurarne la qualità, includendo i controlli interni ed esterni per la validazione e quelli utilizzati per garantire l'accuratezza, la precisione, la riproducibilità.

Sanzioni devono essere previste per i laboratori che non garantiscono un costante adeguamento a tecniche innovative volte a migliorare la qualità dei test.

L'attività dei laboratori in cui si eseguono test genetici deve essere programmata o sviluppata in base ai bacini d'utenza secondo le indicazioni nazionali.

Deve essere assicurato il coordinamento tra i diversi laboratori abilitati dall'autorità sanitaria ad applicare i vari test, con riferimento alla provata competenza e qualificazione scientifica e tecnica degli operatori e all'esistenza di strutture adeguate. Deve essere promossa l'organizzazione di centri specializzati per la diagnosi di gruppi di patologie o di singole malattie genetiche.

### **c) Formazione del personale sanitario coinvolto nella gestione dei test genetici**

Nella prospettiva futura della più ampia diffusione tra gli operatori sanitari, medici e paramedici delle competenze necessarie alla offerta e gestione dei test genetici, è indispensabile che i fondamenti della genetica medica, con particolare riferimento ai test genetici, siano integrati in corsi fondamentali delle Facoltà Mediche, nei Corsi di Lauree in Biologia, nei D.U. per Scienze Infermieristiche, in tutte le Scuole di Specializzazione Medica; inoltre dovrebbero essere previsti corsi post-specializzazione (ad esempio tipo Master). Dovranno inoltre essere previsti corsi di aggiornamento periodico sui test genetici, trattandosi di un settore in continua evoluzione. Dovrà essere fatto ogni sforzo perchè l'aggiornamento raggiunga anche gli operatori sanitari di primo livello o di base, poichè a loro compete il ruolo più importante nell'indirizzare l'utente in ambito sanitario. Dovranno infine essere istituiti corsi parauniversitari (o diplomi) per la formazione di consulenti genetisti non medici, esperti nella gestione dei problemi psicologici, sociali ed etici connessi con i test genetici, sul modello di quanto già avviene in altri Paesi.

Andranno analogamente elaborate procedure di consulenza genetica e di consenso informato, differenziate per tipo di patologia, che riassumono, specificandole, le informazioni comunicate all'utente. Per garantire una corretta integrazione dei test genetici nella pratica medica, le autorità sanitarie nazionali in collaborazione con le Associazioni dei Medici e dei Genetisti e con le Associazioni rivolte alla lotta contro le malattie genetiche, dovranno elaborare e diffondere protocolli di comportamento a seconda del tipo di malattia, del tipo di test e del tipo di uso che ne viene fatto, in modo da coprire tutto lo spettro delle problematiche connesse con

i test genetici, dai criteri di eleggibilità degli/delle utenti, al livello di consulenza pre- e post-test più appropriato, al tipo di informazioni su rischi, benefici e implicazioni non mediche da fornire al/la utente.

#### **d) Organizzazione dei servizi sanitari interessati**

Tenuto conto del rapido aumento delle conoscenze di genetica molecolare e della complessità delle problematiche cliniche ed etico-sociali da esse suscitate, è opportuno individuare Centri di riferimento interdisciplinari per la consulenza genetica. Tali Centri si possono configurare come unità funzionali composte da genetisti medici, genetisti biologi, biologi molecolari, psicologi e medici specialisti che, mediante un lavoro di équipe, siano in grado di assicurare una adeguata integrazione nella pratica clinica delle nuove conoscenze scientifiche via via disponibili. Data la complessità delle problematiche cliniche ed etico-sociali è opportuno che tali Centri si realizzino in istituzioni (I.R.C.C.S, Dipartimenti Universitari ed Ospedalieri) attive sul piano della ricerca nel campo della genetica medica.

Nella programmazione delle risorse (professionali e tecniche) necessarie per soddisfare le necessità della popolazione, le autorità sanitarie dovranno procedere ad un censimento delle unità pubbliche e private presenti sul territorio nazionale che già offrono e gestiscono test genetici, nonché alla valutazione della loro attività in termini di competenza (nella esecuzione dei test genetici, interpretazione dei risultati, gestione della fase consultoriale, ecc.).

Nella programmazione nazionale e regionale i Centri di riferimento possono avere sia funzioni di gestione diretta dei test sia funzione di addestramento del personale di altre strutture.

#### **e) Educazione sanitaria della popolazione**

Deve essere promossa l'educazione sanitaria della popolazione italiana relativamente alla genetica e ai test genetici. Particolare importanza deve essere data alla collaborazione fra i servizi sanitari, le Associazioni Scientifiche e le Associazioni dei pazienti e delle famiglie.

Molti dei nuovi sviluppi applicativi della medicina, ed in particolare quelli relativi alla genetica umana, pongono ai potenziali utenti problemi decisionali complessi che richiedono una piena conoscenza e consapevolezza dei rischi, dei benefici e delle implicazioni non mediche delle diverse opzioni esistenti. Talora le barriere culturali rendono difficile al/la potenziale utente la reale comprensione delle informazioni ricevute nel corso della fase consultoriale, anche la più accurata. Per una corretta gestione dei test genetici, oltre che per un reale esercizio dell'autonomia decisionale dell'utente nel campo della salute, si rende necessario accrescere il livello delle conoscenze medico-scientifiche e genetiche di base della popolazione generale. Perciò è auspicabile che alcuni principi base della genetica vengano inclusi nei programmi della scuola dell'obbligo, e che vengano promossi programmi di educazione sanitaria che aiutino la popolazione ad orientarsi e a difendersi dalla giungla di informazioni non corrette che prolifera in questo settore. Tali programmi, che potranno servirsi dei mezzi di

comunicazione di massa e della diffusione di materiale divulgativo, dovranno essere sottoposti ad una attenta valutazione relativamente alla loro reale efficacia. Bisogna infine considerare che la crescente presenza di immigrati nel nostro paese riverbererà i suoi effetti anche in campo sanitario. Il medico si trova a confronto non solo con patologie genetiche che possono essere per lui nuove ma anche, e soprattutto, con modi profondamente diversi di intendere la salute e le malattie. E' perciò necessario avviare programmi transculturali che offrano strumenti di conoscenza delle diverse comunità etniche presenti nel nostro paese e che consentano di formare operatori socio-sanitari sensibili alle diversità etno-culturali. Tradurre l'intervento sanitario e, più specificamente, la consulenza genetica in modi e termini fruibili da un'utenza con appartenenze culturali, religiose e sociali molto diverse potrebbe essere facilitato dall'incrementare il numero degli appartenenti alle varie minoranze etniche tra i partecipanti ai corsi per operatori (infermieri, consulenti, genetisti, pediatri, ecc.). Occorre infatti prepararsi per tempo ad una società che, a differenza del passato, si va rapidamente facendo, linguisticamente e culturalmente, più complessa.

#### **f) Accessibilità ai test genetici**

E' essenziale, a fronte di una adeguata educazione della popolazione, garantire l'accesso ai programmi di screening ed alle successive fasi di follow-up a tutti gli aventi diritto.

Tuttavia, i finanziamenti pubblici dovrebbero essere limitati a programmi di screening dei quali sia stato dimostrato un favorevole rapporto tra benefici, danni/rischi e costi.

#### **g) Regolamentazione della pubblicità dei test genetici**

La pubblicità a mezzo stampa o in qualsiasi forma di test genetici e di reagenti connessi alla loro esecuzione, assoggettati ad autorizzazione, andrebbe regolamentata analogamente a quella per farmaci (cfr. art. 201 R.D. 27 luglio 1934 n.1265, D.M. 19 marzo 1980 e successive modifiche ed integrazioni). La pubblicità non deve prevedere asserzioni non veritiere, ingannevoli, imprecise o non controllabili, e non deve comunque arrecare pregiudizio alla sanità pubblica, ne' indurre una pressione sociale che vada ad inficiare l'autonomia decisionale del soggetto (ingenerando ad es. false aspettative nella popolazione o una domanda inappropriata di prestazioni).

Si propone che venga vietata in ogni caso la pubblicità di test genetici che:

- 1) attribuisca al test o al reagente efficacia o indicazioni diverse da quelle riconosciute dal Ministero della Sanità in sede di autorizzazione all'introduzione nella pratica clinica e all'immissione in commercio;
- 2) faccia apparire superflua la consultazione del medico o il ricorso a centri specializzati e ne induca l'auto-diagnostica;
- 3) susciti sensazioni o immagini eccessive senza rapporto con il significato del test;
- 4) dissimuli il suo fine commerciale;

- 5) faccia intravedere la concessione di premi o di altri vantaggi materiali;
- 6) utilizzi attestati o perizie.

**h) pianificazione a livello nazionale delle risorse destinate alle patologie rare**

Per le patologie rare e' necessaria una pianificazione a livello nazionale che razionalizzi l'offerta di consulenza genetica e di diagnostica, individuando modalita' di coordinamento fra le diverse realta' operanti sul territorio.

## 9. APPENDICE

### 9.1 Principi di buona pratica per eseguire test genetici

#### 9.1.1 Requisiti del laboratorio

Il laboratorio deve avere locali sufficienti, in accordo con la legislazione corrente, per garantire che tutte le procedure vengano eseguite senza un eventuale affollamento che potrebbe portare ad errori.

I locali devono avere un'illuminazione e una ventilazione adeguata.

Il laboratorio deve stabilire ed adottare procedure per un'appropriata manutenzione delle attrezzature a disposizione. Devono essere effettuati controlli di routine sul funzionamento di tutte le apparecchiature (centrifughe, microscopi, incubatori, ecc.), mantenendo precise annotazioni di questi controlli, comprese le manutenzioni e le riparazioni.

Gli spazi sterili dove si effettuano colture cellulari devono essere adeguati alle norme europee.

Il prelievo di campioni di sangue deve essere effettuato in locali che assicurino l'asepsi. La pelle del donatore deve essere disinfettata in modo da assicurare la minima possibilità di infezione del donatore o contaminazione del campione. Tutti gli aghi e le siringhe devono essere a perdere.

Gli spazi dove vengono eseguite indagini di Genetica Molecolare devono rispondere a precise caratteristiche. Devono poter essere distinti due locali: il primo viene considerato "zona pulita" in cui vengono preparati tutti i reagenti, viene separato il DNA dai campioni in arrivo e viene messa a punto la reazione di amplificazione (PCR); il secondo, considerato "zona sporca", in cui viene effettuata la reazione di amplificazione, l'esecuzione dei test e la valutazione dei dati ottenuti.

L'interpretazione finale potrà essere effettuata anche nel primo locale.

Risulta in ogni caso tassativo che lo spostamento di materiali come degli operatori debba avvenire in un solo senso, dalla "zona pulita" alla "zona sporca" e mai nel senso inverso.

I laboratori che usano materiali radioattivi devono avere una specifica sezione per il loro deposito e per l'esecuzione delle procedure che richiedono il loro uso. I materiali radioattivi devono essere stoccati in zone stabilite in base alla normativa nazionale.

Devono essere disponibili frigoriferi e congelatori con temperature ottimali per la conservazione di ogni tipo di campione o reagente. La temperatura deve essere monitorata giornalmente. E' raccomandato l'uso di termometri per i frigoriferi e per i congelatori. Questi dovrebbero essere collegati a sistemi di allarme dotati di segnale sonoro tenuto sotto controllo 24 ore al giorno. Nei laboratori dove è utilizzato l'azoto liquido per la conservazione di cellule congelate, il livello dell'azoto liquido nei contenitori deve essere monitorato a intervalli di tempo tali da assicurare il suo perfetto mantenimento. La temperatura dei locali e/o la temperatura degli incubatori nei quali si effettuano i test deve essere monitorata giornalmente

per assicurare che le analisi vengano eseguite entro i livelli di temperature specificate nel manuale di procedure del laboratorio.

### **9.1.2 Citogenetica**

Per l'esecuzione dei test di Citogenetica si fa riferimento a "Diagnostica Citogenetica - Consensus 1995", complete di "Aggiornamento Linee Guida per la diagnostica citogenetica", A.I.C.M. Newsletter (Settembre 1996) dell'Associazione Italiana Citogenetica Medica (confluita dal 1997 nella Società Italiana di Genetica Umana=S.I.G.U.).

### **9.1.3 Genetica Molecolare**

#### **Estrazione del DNA.**

Il DNA deve essere purificato secondo metodi standardizzati riportati in letteratura e convalidati in laboratorio.

Devono essere disponibili metodi idonei di conservazione del DNA per la protezione dell'integrità del materiale.

Il DNA deve essere integro e non degradato. Deve essere evitata ogni interpretazione di risultati da DNA degradato.

#### **Analisi dei polimorfismi di lunghezza del frammento di restrizione (RFLP)**

Endonucleasi di restrizione.

Gli enzimi devono essere conservati ed utilizzati in condizioni raccomandate dalla ditta produttrice (cioè temperatura di conservazione, temperatura del test, tampone) per garantire l'idonea digestione del DNA.

Quando si effettua la digestione del DNA, si deve anche digerire DNA umano normale che produrrà un polimorfismo di grandezze conosciute per accertare la completa digestione da endonucleasi.

Ogni lotto di enzimi deve, pertanto, essere controllato prima dell'uso per determinare la sua capacità di azione specifica sul DNA umano.

#### **Sonde**

Ogni nuova sonda di DNA utilizzata dovrebbe essere convalidata da studi familiari dimostranti l'ereditarietà mendeliana del polimorfismo evidenziato e da ampi studi sulla popolazione.

La sonda dovrebbe essere usata nella forma riportata in letteratura e come è stata usata per determinare il pattern di ereditarietà e la distribuzione del polimorfismo nella popolazione.

### **Elettroforesi**

Nella corsa elettroforetica devono essere inclusi indicatori di grandezza di sequenze conosciute che diano bande elettroforetiche ben definite che abbraccino e fiancheggiano l'intero range del sistema di DNA da testare. In ciascuna corsa elettroforetica dovrebbe essere incluso, come controllo, DNA umano per determinare se è stata raggiunta una digestione endonucleasica completa.

In ogni pozzetto devono essere caricate uguali quantità (mg/ml) di DNA.

Per ogni corsa elettroforetica dovrebbe essere conservata una fotografia del pattern risultante dalla separazione elettroforetica colorata con bromuro di etidio.

### **Preibridizzazione, ibridizzazione, autoradiografia**

La preibridizzazione, ibridizzazione e autoradiografia devono essere condotte secondo condizioni determinate sperimentalmente di concentrazione, temperatura e concentrazione salina che dipendono dalla natura della sonda.

Le condizioni di stringenza dovrebbero essere scelte in modo da minimizzare la possibilità di cross-ibridizzazione.

Le sonde dovrebbero essere marcate mediante un metodo idoneo alla sonda in uso (es. nick translation, hexamer priming, end labelling).

Ogni sonda usata dovrebbe dare un segnale adeguato per evidenziare un gene in singola copia.

La rimarcatura della stessa membrana deve essere effettuata solo dopo una completa asportazione della sonda precedentemente usata (deibridazione).

### **Analisi dei risultati**

Devono essere analizzate solo autoradiografie o membrane che rivelino gli appropriati pattern del DNA di controllo umano e i marcatori di peso molecolare.

Ogni autoradiografia o membrana dovrebbe essere letta separatamente da due o più individui.

Il report di laboratorio per ogni frammento evidenziato dovrebbe specificare la sonda, l'endonucleasi di restrizione usata, la dimensione del frammento (Kb) e la localizzazione cromosomica come definito dal Workshop Internazionale per la mappatura dei geni umani.

### **Amplificazione genica mediante reazione polimerasica a catena (P.C.R.)**

Apparecchiatura e reagenti.

Lo spazio di lavoro di pre-amplificazione include l'area di lavoro dove viene purificato il DNA, dove vengono manipolati i reagenti per l'amplificazione, dove vengono preparate le miscele di amplificazione.

Lo spazio di lavoro di post-amplificazione include ogni area in cui è presente DNA amplificato (incluso gli amplificatori). La manipolazione dei plasmidi o fagi contenenti geni non deve essere eseguita nello spazio di lavoro di pre-amplificazione. Si raccomanda il lavaggio frequente con acido diluito o candeggina e/o trattamento UV delle superfici di lavoro.

Le apparecchiature di amplificazione devono mantenere in maniera precisa e riproducibile la temperatura appropriata dei campioni. L'esattezza del controllo della temperatura per i campioni deve essere verificata ad intervalli regolari.

E' richiesto l'uso di pipette, guanti e camici separati per ogni stanza.

Tutti i reagenti (soluzioni) contenenti componenti multipli usati nelle analisi devono essere divisi in quantitativi che vengono usati in un solo giorno; in alternativa i reagenti possono essere dispensati in aliquote per usarli più volte a patto che ci sia documentazione disponibile atta ad assicurare l'assenza di contaminazione ogni volta che vengono utilizzati.

I reagenti (per esempio sostanze chimiche, enzimi) devono essere conservati ed utilizzati nelle condizioni raccomandate dalla ditta produttrice (cioè temperatura di conservazione, temperatura del test, tampone, concentrazione). I reagenti usati per l' amplificazione non devono essere utilizzati in aree di lavoro post-amplificazione. Ogni lotto di reagente deve essere testato prima dell'uso routinario.

Per i kit commerciali devono essere documentate l'origine, il numero del lotto, la data di scadenza e le condizioni di conservazione. Ogni laboratorio è responsabile della precisione del test. Reagenti appartenenti a kit con differente numero di lotto non devono essere mescolati.

### **Acidi nucleici**

E' possibile utilizzare il DNA o cDNA. Può essere usato DNA da qualunque cellula nucleata e RNA, includendo in quest'ultimo caso appropriati controlli per la trascrizione inversa.

Gli acidi nucleici devono essere preparati in modo da non andare incontro ad artefatti o ad inibizione della reazione PCR.

### **Primers**

I primers devono essere di specificità e sequenza note. Ogni nuovo lotto di reagenti dovrebbe essere testato su materiale di riferimento.

Le condizioni che influenzano la specificità devono essere ottimizzate per ogni set di primers e precisamente: a) concentrazione del DNA; b) tempi e temperatura di "annealing" ed estensione; c) concentrazione dell'enzima; d) concentrazione del primer; e) concentrazione di  $Mg^{++}$ .

### **Controlli**

Per controllare eventuali contaminazioni dei reagenti, deve essere incluso un controllo negativo (senza DNA) in ogni set di campioni PCR. E' consigliabile l'utilizzo di un controllo effettuato su una provetta aperta.

Quando il prodotto PCR è usato come risultato finale senza digestione o ibridizzazione, devono essere usati appropriati controlli negativi e positivi.

Si devono eseguire routinariamente tests di controllo di contaminazione nelle aree di lavoro di pre-amplificazione. Se si è evidenziato un inquinamento da prodotto amplificato, l'area deve essere pulita per eliminare la contaminazione e devono essere prese misure necessarie per prevenire una contaminazione futura.

### **Sonde oligonucleotidiche e ibridizzazione con DNA amplificato**

L'ibridizzazione deve essere eseguita sotto condizioni determinate sperimentalmente, che abbiano dato prova di mantenere le specificità definite dalla sonda.

Dovrebbero essere stabilite la specificità e la sensibilità del metodo di marcatura che devono essere riproducibili.

Ogni prova di ibridizzazione deve comprendere almeno un controllo positivo ed uno negativo. I controlli positivi contengono le sequenze riconosciute dalla sonda studiata. I controlli negativi contengono una sequenza differente ma possibilmente molto simile alla sequenza riconosciuta dalla sonda studiata.

Si raccomanda di controllare la quantità di DNA che è stata messa sulla membrana. Il miglior modo di fare questo è usare un primer marcato come oligonucleotide di ibridizzazione che quindi reagisce con tutti i campioni disposti sulla membrana e dà una misura della quantità relativa di DNA presente in ciascuna posizione.

### **Analisi dei risultati**

I limiti accettabili d'intensità di segnale devono essere desunti dal set di controlli positivi e negativi usato in ciascuna prova d'ibridizzazione.

Si raccomandano due interpretazioni indipendenti dei dati ottenuti dall'ibridazione.

### **Polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione dei prodotti amplificati (RFLP)**

Quando si digerisce DNA amplificato, devono anche essere digeriti in parallelo controlli di DNA amplificato che produrranno frammenti di grandezza conosciuta per monitorare la digestione completa.

Per ogni corsa elettroforetica, devono essere inclusi indicatori di grandezza nota che producano bande elettroforetiche discrete comprendenti e fiancheggiando l'intero range delle grandezze di frammento attese.

La quantità di DNA per pozzetto non deve alterare l'andamento della migrazione rispetto alla migrazione dei controlli.

Deve essere conservata una registrazione permanente (ad esempio una fotografia) di ciascuna corsa elettroforetica.

Dovrebbe essere incluso, per ciascun campione, il DNA amplificato incubato senza enzimi di restrizione.

I limiti di accettabilità dell'intensità di segnale devono essere specificati per i risultati positivi e negativi. Se questi non si ottengono si rende necessaria una correzione.

Il metodo di valutazione del risultato deve essere indicato.

### **Amplificazione sequenza-specifica**

Per ciascuna combinazione deve essere definita la combinazione di "primers" corrispondente. L'amplificazione positiva e negativa deve essere definita per tutte le miscele di "primers" e le sequenze oligonucleotidiche devono essere prontamente disponibili.

Ciascuna reazione di amplificazione deve includere controlli interni per riscontrare fallimenti tecnici (per esempio primers o stampi addizionali che diano un prodotto distinguibile da quello atteso).

In ciascuna prova di amplificazione si devono usare controlli per evidenziare contaminazioni con prodotti precedentemente amplificati (per esempio un controllo interno a tutti i prodotti di amplificazione o una combinazione di controlli per evidenziare qualunque tipo di DNA che potrebbe confondere i risultati finali).

I reagenti devono essere utilizzati sotto determinate condizioni empiriche che permettano la definizione specifica del prodotto utilizzato nei tests di routine. Ciascun set di "primers" deve essere testato per specificità e quantità di prodotto utilizzando materiale di riferimento sotto condizioni ottimali. Ci si deve assicurare che tutte le coppie di "primers" mostrino specificità ed adeguatezza in ogni test. La specificità e la sensibilità devono essere le stesse per ogni tipo di campione.

La specificità e la sensibilità del metodo di evidenziazione devono essere note e riproducibili.

Per i kits commerciali devono essere documentati l'origine, il numero di lotto, la data di scadenza e le condizioni di conservazione.

### **Analisi**

Limiti di accettabilità dell'intensità e della grandezza della banda devono essere specificati per i risultati positivi e negativi con ciascuna miscela di "primers". Se questi limiti non sono raggiunti è richiesta un'azione correttiva.

Devono essere indicati i criteri di assegnazione del risultato.

### **Metodi alternativi**

Se vengono utilizzati altri metodi devono sempre essere definiti gli standards e si devono utilizzare controlli atti ad assicurare l'accuratezza del test impiegato su ciascun campione. Devono essere applicati tutti gli standards compresi nelle sezioni precedenti.

## **9.2 TEST GENETICI NELLA DIAGNOSI PRENATALE**

### **9.2.1 Definizione**

La diagnosi prenatale è un complesso di indagini strumentali e di laboratorio finalizzate al monitoraggio dello stato di salute del concepito durante tutto l'arco della gravidanza e pertanto permette l'individuazione di definite patologie, siano esse su base ereditaria, infettiva, iatrogena o ambientale.

Lo sviluppo della diagnosi prenatale ha significativamente modificato il comportamento delle coppie a rischio di procreare e di far nascere figli con patologie genetiche e/o malformative, in quanto è possibile offrire loro informazioni sulla reale situazione del concepito ed eventualmente tranquillizzarli per il prosieguo della gravidanza.

I metodi di diagnosi prenatale possono essere non invasivi (ecografia fetale, indagini biochimiche e molecolari sul sangue materno) ed invasivi, in quanto prevedono il prelievo di tessuti fetali (villocentesi, amniocentesi, cordocentesi, fetoscopia).

Nel contesto di queste linee guida si ritiene di affrontare sinteticamente le problematiche e le peculiarità della diagnostica prenatale in quanto i test genetici possono essere impiegati per identificare alcune patologie genetiche di cui può essere colpito il concepito.

Da sottolineare che allo stato attuale, la diagnosi preimpianto e su cellule fetali in circolo materno sono ancora a livello sperimentale.

In particolare, la diagnosi genetica nella fase preimpianto, trova per ora indicazione per un assai ristretto numero di pazienti e di anomalie genetiche. Essa deve essere considerata in una fase clinica sperimentale: solo poche decine sono i nati da questa esperienza, e perciò si è ben lungi dal poterne definire i limiti statistici per la sicurezza biologica e diagnostica. In questo contesto, la diagnosi preimpianto va rigorosamente riservata a un limitatissimo numero di centri in grado di dimostrare contemporaneamente la competenza adeguata in termini di esperienza ostetrica, molecolare ed embriologica necessarie, le risorse, l'organizzazione e tutti i sistemi di controllo adeguati.

### **9.2.2 Caratteristiche peculiari della diagnosi genetica prenatale:**

- a) la diagnosi prenatale viene effettuata non sulla persona che ne fa richiesta, bensì su un soggetto, che nell'attuale legislazione, non ha riconoscimento giuridico (Diagnosi Prenatale, Comitato Nazionale per la Bioetica, 1992, pag. 41);
- b) la diagnosi prenatale, in considerazione dell'epoca in cui si effettuano le indagini, non permette di correlare in tempo reale il fenotipo con il genotipo. Pertanto in alcuni casi (es. malformazioni ecografiche) non è possibile formulare una precisa diagnosi clinica; qualora si applichino i test genetici questi consentono di identificare lo specifico difetto (es. anomalia cromosomica, mutazione genica ecc.) e hanno quindi un valore diagnostico anche se il

fenotipo potrà essere verificato con certezza al momento della nascita a termine (o dopo interruzione di gravidanza). Nelle patologie ad insorgenza tardiva (es. malattia di Huntington, distrofia miotonica, ecc.) il test genetico si configura tra quelli di tipo "presintomatico";

c) la diagnosi prenatale deve essere eseguita entro tempi molto più ristretti rispetto al periodo post-natale;

d) è possibile che la diagnosi di feto affetto si basi sul referto di un solo test genetico e su questa sola informazione la gestante/coppia può scegliere se continuare o interrompere la gravidanza. Non vi è altra situazione nella vita di un uomo in cui una malattia venga diagnosticata utilizzando un solo test; questo pone la gestante/coppia ma anche il personale sanitario, in una situazione psicologica particolarmente complessa e delicata;

e) l'utilizzo di metodi invasivi fa di per sé prevedere rischi per l'incolumità del concepito; ad esempio il rischio di aborto legato all'invasività dell'amniocentesi è circa 0.5-1%; mentre quello associato alla villocentesi è del 2-4%. Queste considerazioni impongono il raggiungimento dei livelli massimi di qualità degli interventi di consulenza, prelievo fetale, analisi genetica, ed assistenza che devono essere efficacemente coordinati. La coppia deve essere informata di tali rischi e ricevere indicazioni appropriate;

f) la diagnosi prenatale consente di predisporre, laddove presenti, gli interventi terapeutici ottimali per il trattamento del feto/neonato affetto sia in utero che alla nascita;

g) la diagnosi prenatale consente alle coppie a rischio di realizzare il progetto di famiglia.

L'attuazione di queste finalità deve avvenire nel rispetto del Principio etico di autonomia della gestante/coppia, di quello di beneficio (*bene facere*) nei suoi confronti e del feto e della normativa vigente (Diagnosi Prenatale, Comitato Nazionale per la Bioetica, 1992, pag. 41).

### 9.2.3 Indicazioni

La diagnosi prenatale è indicata nei casi in cui la malattia, di cui può essere affetto il feto, sia grave ed incurabile oppure nei casi in cui sia necessaria una diagnosi al fine di instaurare terapie precoci, anche in utero, o predisporre modalità particolari per l'espletamento del parto (es. deficit immunologici combinati).

La diagnosi prenatale generalmente si può porre in due gruppi di situazioni di rischio:

a) *gravidanze in cui il rischio procreativo è prevedibile "a priori"*, ad esempio: età materna avanzata; genitore portatore eterozigote di anomalie cromosomiche strutturali; genitori portatori di mutazioni geniche.

b) *gravidanze in cui il rischio di feto affetto si evidenzia durante la gestazione*, ne sono esempi: le malformazioni evidenziate all'ecografia; aumentato rischio che il feto sia affetto da sindrome di Down o altra anomalia cromosomica sulla base di screening biochimici; malattie infettive materne insorte in gravidanza.

La possibilità di individuare in epoca prenatale patologie genetiche o malformative fetali è strettamente correlata allo sviluppo delle tecniche ecografiche, di quelle di prelievo, delle

indagini di laboratorio e delle conoscenze dei difetti genetici responsabili delle specifiche patologie.

Attualmente circa l'80% delle diagnosi prenatali, eseguite per evidenziare patologie genetiche fetali, interessano l'indagine citogenetica o analisi del corredo cromosomico (cariotipo) fetale. Il tessuto di gran lunga più utilizzato a tale scopo è rappresentato dagli amniociti.

Le principali indicazioni all'indagine citogenetica per anomalie cromosomiche fetali sono:

- età materna avanzata (uguale o superiore a 35 anni);
- genitori con precedente figlio affetto da patologia cromosomica;
- genitore portatore di riarrangiamento strutturale non associato ad effetto fenotipico;
- genitore con aneuploidie dei cromosomi del sesso compatibili con la fertilità;
- anomalie fetali o alterazioni del volume del liquido amniotico evidenziate ecograficamente;
- probabilità di 1/350 o maggiore che il feto sia affetto da sindrome di Down (o alcune altre aneuploidie) sulla base dei parametri di screening biochimici (tri-test; ecc.) valutati su sangue materno;
- indicazioni particolari valutate singolarmente da specialisti del settore.

Diverse centinaia di malattie genetiche sono oggi diagnosticabili mediante tecniche di genetica molecolare; in questi casi il trofoblasto è il tessuto di elezione per effettuare la diagnosi prenatale, in quanto è possibile ottenere DNA in breve tempo ed in quantità adeguata per l'esecuzione di diagnosi molecolari. Tuttavia, per alcuni tipi di malattie ereditarie la diagnosi di elezione si basa tuttora su test biochimici su cellule di colture del trofoblasto o di amniociti.

Generalmente la diagnosi prenatale viene richiesta per le più frequenti malattie genetiche (talassemia; fibrosi cistica, sindrome dell'X-fragile, ecc.) o per mutazioni di difetti genici identificati in specifiche famiglie.

Presupposti indispensabili per affrontare correttamente un'indagine fetale per evidenziare malattie genetiche sono i seguenti:

- precisa identificazione del difetto responsabile della malattia e/o dello stato di portatore dei genitori;
- corretta valutazione del rischio procreativo;
- identificazione del metodo più idoneo da utilizzare in epoca prenatale sia per il prelievo di materiale fetale, sia per i test genetici.

Come precedentemente menzionato, nell'ambito delle tecniche non invasive e in fase di sperimentazione la diagnosi prenatale di malattie genetiche basata su indagini molecolari eseguite su cellule fetali reperibili nel circolo materno tra la 6<sup>a</sup>-8<sup>a</sup> settimana di gravidanza. È altresì in fase di sperimentazione la diagnosi di patologie genetiche cromosomiche o geniche effettuata mediante ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) o PCR, utilizzando uno al massimo due blastomeri ottenuti, per micromanipolazione, da embrioni di 8 cellule

ovviamente in caso di fecondazione in vitro mediante FIVET o ICSI. Considerando che la diagnosi è basata sull'analisi di una singola cellula i limiti di questa tecnica sono ancora enormi.

### **9.2.3.1 Test di screening**

L'indicazione ai metodi invasivi può essere posta a seguito di indagini non invasive di screening in grado di identificare particolari situazioni ad aumentato rischio di patologia per il feto. Tra questi rivestono ruoli importanti l'ecografia e gli screening biochimici su sangue materno.

#### *Indagini ecografiche*

Ogni gravidanza costituisce un'indicazione allo screening ecografico per evidenziare difetti strutturali del feto, non necessariamente associati ad anomalie cromosomiche, biochimiche o molecolari.

Le potenzialità di questa tecnica sono direttamente correlate all'esperienza dell'operatore ed alle apparecchiature utilizzate.

Particolarmente significativa è l'ecografia eseguita intorno alla 20<sup>a</sup> settimana di gestazione. Recentemente sono stati eseguiti studi prospettivi tra la 10<sup>a</sup> e la 13<sup>a</sup> settimana di gravidanza utilizzando la misurazione del maggior spessore della translucenza retronucale (Harris Birthright Center, London 1996; Snijders et al., 1996). L'efficacia della translucenza retronucale come marker diagnostico è risultata molto variabile in diversi studi (dal 40% all'80% e più). Pertanto si ritiene necessario acquisire maggiore esperienza e soprattutto devono essere adottati protocolli comuni che prevedano di uniformare il metodo di rilevazione, la qualità della strumentazione, ecc.

Ovviamente l'ecografia di II livello, indicata per evidenziare malformazioni del feto, deve essere eseguita secondo i criteri di qualità nazionali ed internazionali al fine di garantire attendibilità ed evitare ansie inutili per i genitori ed indagini aggiuntive non necessarie o evitare interruzione volontaria di gravidanza con feto sano.

#### *Indagini biochimiche*

In questi ultimi anni è stato messo a punto e rapidamente utilizzato il così detto tri-test (sinonimo triplotest), screening biochimico su siero materno che, intorno alla 16<sup>a</sup> settimana di gestazione, sulla base dei valori di tre analiti (riduzione dell'alfa fetoproteina, aumento della beta gonadotropina corionica, ed aumento dell'estriolo non coniugato) e di altri parametri materni (età, peso, diabete, fumo, ecc.) permette di valutare in modo più personalizzato il rischio di feto affetto da sindrome di Down o da altra anomalia cromosomica ed i difetti del tubo neurale. Qualora il valore ottenuto superi un certo cut-off, in genere quello corrispondente al rischio delle donne di 35 anni, può essere indicato, su scelta dei genitori, eseguire la diagnosi citogenetica fetale.

Generalmente il tri-test viene effettuato alle donne con età inferiore ai 35 anni e permette di identificare, se eseguito nelle condizioni di qualità ottimali, circa il 70% delle gravidanze con feto affetto, con una percentuale di falsi positivi, cioè di amniocentesi “inutili” di circa il 6-8%. La donna che prende in considerazione questo tipo di test deve ricevere preliminarmente una completa informazione e conoscere le implicazioni dei possibili risultati e la loro affidabilità. Sono tuttora in fase di sperimentazione l'uso di test biochimici quali il dosaggio della beta gonadotropina corionica libera (FhCG) e della Pregnancy Associated Plasm Protein (PAPP-A)(Grudzinskas & Ward, 1997) su siero materno eseguiti nel I trimestre di gravidanza. L'uso combinato dei test biochimici ed ecografia permette di aumentare l'efficacia dei test di screening.

In conclusione, si può osservare che esistono metodi di screening prenatale dei difetti congeniti che hanno raggiunto livelli di validazione diversa; inoltre questi metodi presentano problematiche (difficoltà) applicative diverse (livelli tecnici di esecuzione, accettabilità da parte della popolazione, ecc.) di cui occorre tenere conto qualora si intenda ricorrere al loro utilizzo. Per la validazione dei test ed i controlli di qualità si rinvia ai Capitoli relativi di queste Linee Guida. Mentre per quanto concerne l'accettabilità dei test da parte della popolazione, oltre a sottolineare l'importanza del consulenza (Capitolo relativo di queste Linee Guida), si ritengono essenziali studi di opinione presso la popolazione sia per verificarne il grado di conoscenza dei problemi affrontati dal proposto screening sia per valutarne il grado di accettabilità.

#### **9.2.4 Consulenza genetica**

Principio: Una scelta consapevole basata su un'informazione chiara, completa ed aggiornata è l'indispensabile premessa alla diagnosi prenatale.

La Consulenza deve evitare di essere direttiva, e deve essere improntata costantemente al rispetto del Principio di autonomia della persona. Le caratteristiche tecniche, i rischi materni e fetali, le probabilità di successo delle tecniche di prelievo e di errore diagnostico, le problematiche relative al soggetto affetto dalle specifiche anomalie, le problematiche legate all'interruzione volontaria di gravidanza, le varie possibili scelte riproduttive, devono costituire il contenuto del messaggio verbale che deve anche essere riassunto in forma scritta; la comunicazione scritta e' raccomandabile per consentire una corretta memorizzazione dell'informazione orale e costituisce la base del consenso informato.

L'informazione sui rischi delle tecniche invasive di prelievo fetale e gli errori di analisi devono fare riferimento non solo alla letteratura ma anche all'esperienza del centro che provvede alla diagnosi prenatale. Il notevole e rapido sviluppo delle conoscenze sul genoma umano così

come dei metodi fisici (ecografia bi- e tridimensionale, risonanza magnetica) consentiranno nel breve/medio termine il riconoscimento di anomalie tradizionalmente definite minori, perchè giudicate di scarso effetto sulla qualità di vita del soggetto portatore. Sin da ora, sono disponibili test per l'identificazione di geni con espressione tardiva, nel corso della vita adulta (rene policistico dell'adulto, malattia di Huntington). Tutto ciò amplificherà le difficoltà nella gestione della consulenza genetica prenatale che, mantenendosi rispettosa dell'autonomia decisionale della gestante/coppia, dovrà comunque mirare all'osservanza dell'altro fondamentale Principio dell'atto medico che è quello di beneficio (*bene facere*). Per una valutazione approfondita delle problematiche legate all'informazione e consulenza per i test genetici si faccia riferimento al Capitolo Gestione dei test genetici di queste linee guida.

### **9.2.5 Fasi della gravidanza in cui si attua la diagnosi prenatale**

La diagnosi prenatale può essere effettuata nella fase preimpianto (biopsia di uno o due blastomeri) fino all'impianto dell'embrione sulla parete uterina, sia nel primo trimestre (villocentesi, ecografia) che nel secondo trimestre (amniocentesi, ecografia, ed, in casi particolari, cordocentesi). Le raccomandazioni della WHO- Regional Office for Europe (1992) sottolineano che i metodi invasivi per la diagnosi prenatale devono essere esercitati solo da operatori adeguatamente esperti e definiscono la villocentesi e l'amniocentesi metodi sicuri, suggerendo per la villocentesi le 10 settimane (ecograficamente accertate) come il limite al di sotto del quale non devono essere effettuati prelievi nella pratica clinica; ciò consente di evitare effetti dannosi sullo sviluppo embrio-fetale. L'European Association of Perinatal Medicine (1993) indica nell'intervallo tra la 15<sup>a</sup> e la 17<sup>a</sup> settimana il periodo di scelta per l'amniocentesi: il rischio di abortività e le complicanze post-prelievo raggiungono infatti in tale periodo i tassi minimi.

### **9.2.6 Metodi di prelievo**

La biopsia di blastomeri viene allestita con microago attraverso la zona pellucida, impiegando una micropipetta per immobilizzare l'embrione; per la biopsia del blastomero si fa precedere la deposizione di una goccia di tampone Tyrode a pH acido su un punto della superficie della zona pellucida per lisarla. Tutte queste operazioni si svolgono utilizzando un micromanipolatore. Il presupposto di tali biopsie è il ricorso alle tecnologie della riproduzione assistita.

La diagnosi genetica sul concepito nella fase preimpianto, limitata ad un numero ridotto di pazienti e per anomalie genetiche particolari, attualmente in una fase clinica sperimentale, deve essere rigorosamente riservata a centri in grado di dimostrare contemporaneamente

risorse, organizzazione, sistemi di controllo ed esperienza ostetrica, molecolare, embriologica e bioetica necessarie.

La villocentesi, l'amniocentesi e la cordocentesi prevedono l'introduzione di un ago attraverso la parete addominale materna rispettivamente nella placenta, nel sacco amniotico, nella vena ombelicale; l'intero intervento avviene sotto continuo controllo ecografico ed in campo sterile. Per la villocentesi viene anche utilizzata la via vagino-cervicale con l'introduzione di un fine catetere in cavità uterina, e quindi in placenta.

Per la villocentesi esiste un Registro Internazionale, che riporta le tecniche di prelievo usate, il numero di casi effettuati, il numero di affetti, il numero di gravidanze perse al follow-up, il numero degli aborti successivi al prelievo, il numero dei nati, le malformazioni osservate alla nascita. Il Registro è coordinato dal Programma per le Malattie genetiche del WHO di Ginevra.

#### **9.2.7 Metodi di analisi genetica dei tessuti fetali**

Per la citogenetica si ricorre ai metodi classici di coltura a lungo termine e, per il solo tessuto coriale, al metodo di coltura a breve termine; per l'identificazione rapida di un numero limitato di cromosomi o per quella di microdelezioni, la citogenetica ricorre poi anche all'utilizzazione di sonde geniche fluorescenti (Fluorescence In Situ Hybridization=FISH). Le analisi enzimatiche sono attuabili su cellule dopo coltura oppure su materiale fresco; l'analisi del DNA fa ricorso a metodi indiretti o diretti. Per un'analitica valutazione sia della validazione che dei controlli di qualità delle predette metodologie di analisi si rinvia ai Capitoli relativi di queste Linee Guida. La necessità dell'alta specializzazione e della perfetta organizzazione del lavoro per la diagnosi prenatale assieme alla relativa rarità della maggioranza delle malattie ereditarie rende necessario convogliare la casistica in centri di analisi accreditati per consentire il raggiungimento dei livelli di efficacia richiesti per l'intervento di diagnosi embrio-fetale. Per l'analisi enzimatica nelle malattie metaboliche e per quella del DNA è opportuno promuovere una rete di collaborazione a vari livelli: nazionale, europeo, mondiale.

#### **9.2.8 Centri di prelievo di tessuti embrio-fetali**

Un programma di utilizzazione di metodi invasivi per la diagnosi prenatale può essere avviato solo quando sia garantita la necessaria esperienza degli operatori e le risorse tecnologiche disponibili siano adeguate. L'operatore ostetrico deve avere un curriculum di esperto nei metodi di prelievo impiegati, essere addestrato all'utilizzazione del mezzo ecografico con un livello II di capacità tecnica, ed avere conoscenze della fisiopatologia fetale. Il livello qualitativo dell'operatore deve essere garantito da un numero sufficiente di interventi eseguiti in un tempo determinato (WHO-Regional Office for Europe, 1992; European Association of Perinatal Medicine, 1993). Il National Board of Health in Danimarca ha raccomandato che gli

operatori proposti per l'esecuzione dell'amniocentesi dispongano di un addestramento di almeno 100 amniocentesi e siano nella condizione di eseguire almeno 200 amniocentesi per anno, mentre per gli operatori proposti all'esecuzione della villocentesi l'addestramento preparatorio dovrebbe basarsi su almeno 250 villocentesi ed il numero dei prelievi per anno dovrebbe ammontare ad almeno 400 (Lundsteen & Vejerslev, 1997). L'adeguata preparazione degli operatori non può fare riferimento solo alla fase puramente sperimentale (il reperimento dei casi sperimentali è raro e difficoltoso) perciò, così come avviene per altre tecniche invasive in medicina, l'addestramento di un nuovo operatore può opportunamente realizzarsi con gradualità e direttamente sui casi clinici, esigendo pertanto la presenza costante e l'assistenza diretta di un operatore esperto. Ne consegue la necessità di disporre di Centri di riferimento, regionali o sovraregionali, per l'addestramento degli operatori ai metodi di diagnosi prenatale invasivi (WHO-Regional Office for Europe Working Group, Risk evaluation of chorionic villus sampling=CVS, document EUR/ICPMCH 123, Copenhagen, 1992; European Association of Perinatal Medicine, Recommendations and Protocols for Prenatal Diagnosis, 1993).

#### **9.2.9 Organizzazione dei Centri di Diagnosi Prenatale**

I Centri di Diagnosi Prenatale esplicano un'attività multidisciplinare che, anche se non necessariamente effettuata nella stessa struttura muraria, deve poter interagire consentendo il massimo di efficacia tecnica ed il minimo disagio per l'utenza. Le competenze di riferimento sono: ostetrica (di prelievo, sonografica, clinica); genetica medica per la consulenza genetica ed il diretto collegamento con i laboratori per l'analisi citogenetica e molecolare, patologia clinica per i test di screening; inoltre sono necessarie le specialità di embriologia, anatomia umana, radiologia, anatomia patologica, chirurgia pediatrica, psicologia. I Centri di Diagnosi Prenatale, così come i laboratori di genetica, devono essere Centri riconosciuti mediante un sistema di accreditamento (per i criteri vedi Capitolo relativo di queste Linee Guida). Le suddette strutture accreditate devono produrre un Rapporto annuale sulle proprie attività. È auspicabile effettuare un censimento dei Centri di Diagnosi Prenatale, così come dei laboratori citati, periodicamente aggiornato, che risulterebbe un utile strumento per la programmazione sanitaria, gli operatori del settore e gli utenti.

### **9.3 TEST GENETICI NELLA DIAGNOSI TUMORALE**

Per la stesura delle linee guida per i test genetici nella diagnosi tumorale viene utilizzata come base di lavoro il documento già elaborato dalla Commissione Oncologica Nazionale.

La possibilità di utilizzare test genetici per la valutazione del rischio di cancro e per la gestione clinica dei malati di cancro impone alcune riflessioni su alcuni importanti aspetti che contraddistinguono la malattia genetica cancro.

#### **9.3.1 Aspetti epidemiologici e socio-culturali**

I tumori sono una delle principali cause di morte nell'età adulta nei paesi del mondo occidentale. Sono, quindi, malattie frequenti nella popolazione generale e, pertanto, test genetici utili nella prevenzione, diagnosi e cura di alcuni tumori interessano potenzialmente un numero molto elevato di soggetti. Inoltre, dati gli aspetti non medici ma psicologici e socio-culturali peculiari della malattia cancro, l'offerta, o la potenziale offerta, di test genetici (specie in ambito preventivo) suscita una vasta eco nell'opinione pubblica.

Ciò pone peculiari problemi, sia di validazione che di utilizzo dei test genetici, rispetto a quelli tipici della gran parte delle malattie di origine genetica, rare nella popolazione generale se considerate singolarmente, e rende ancora più importante anticipare e cercare di prevenire tutti i possibili danni non solo medici ma soprattutto psicologici e sociali che potrebbero derivare da un uso distorto del test genetico.

#### **9.3.2 Basi scientifiche**

Negli ultimi vent'anni, numerose evidenze sperimentali hanno permesso di identificare geni umani (o prodotti di geni umani) alterati in maniera specifica in uno o più tipi di cellule tumorali. Per molti di essi sono almeno in parte noti i meccanismi biologici con cui, a livello cellulare, le forme alterate di questi geni sono in grado di contribuire alla tumorigenesi. Secondo quella che viene chiamata "teoria genetica del cancro", quindi, il tumore è la conseguenza dell'accumulo in un clone cellulare di mutazioni, principalmente somatiche ma anche germinali, in geni importanti nel controllo della proliferazione, differenziazione e morte cellulare. Poichè eventi "ambientali" (in senso lato: avvenimenti interni ed esterni alla singola cellula e/o all'organismo nel suo insieme) producono e, successivamente, interagiscono con queste alterazioni geniche (ed il genoma nel suo insieme), la valutazione del significato attribuibile alla singola alterazione genica rispetto all'evento biologico finale 'sviluppo del cancro', è molto complessa. Ciò è vero spesso anche in sistemi sperimentali relativamente semplici rispetto alla realtà della malattia cancro nella pratica clinica.

- Questa cautela è particolarmente necessaria quando si vuole trasferire alla pratica clinica quella parte di nuove conoscenze che concernono la suscettibilità ereditaria. Sulla base

di quanto detto e delle numerose evidenze di tipo epidemiologico, il cancro deve essere considerato una malattia multifattoriale (legata, cioè, a più fattori di tipo diverso, genetici e ambientali). Ciò significa che un'alterazione di tipo ereditario in un gene associato al cancro rappresenta uno dei potenziali fattori implicati nello sviluppo della malattia in una data persona. Il peso di questa singola alterazione potrà essere maggiore o minore, sia per motivi legati alla sua natura (quanto importante è lo squilibrio da essa generato nella cellula) sia per motivi da essa indipendenti (presenza di eventi genetici o ambientali in grado di contrastare o amplificare la sua azione). La possibilità di identificare una mutazione germinale in un gene associato al cancro non implica necessariamente la possibilità di dare un'interpretazione del significato della sua presenza in un individuo sano in termini di 'predittività' dell'evento cancro. Oggi noi non conosciamo il rischio attribuibile alla presenza di mutazioni germinali in geni di suscettibilità al cancro se non all'interno di quelle popolazioni (=famiglie) che sono state selezionate per particolari caratteristiche a partire dall'insieme della popolazione generale. E' stato osservato che questa 'predittività' può essere diversa quando il test viene utilizzato nella popolazione generale.

- Infine, la possibilità di identificare, con relativa facilità, i diversi pattern di geni (e loro prodotti proteici) alterati nel corso dello sviluppo dei vari tipi di tumori umani ha acceso la speranza di arrivare ad una classificazione molecolare dei tumori umani, che consenta un miglior approccio medico al singolo malato di cancro. Poichè, in questo contesto, il test genetico è utilizzato come un qualsiasi marcatore tumorale, questi possibili vantaggi prescindono da una conoscenza delle relazioni causali tra singolo gene e cancro (importanti, ad es., per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche): l'alterazione di un determinato gene potrebbe permettere di individuare un sottogruppo di tumori che si comportano in maniera diversa a parità di altre condizioni, indipendentemente dall'importanza del suo ruolo biologico. Tuttavia, i costi e alcuni problemi di natura tecnica rendono oggi molto impegnativi gli studi dei marcatori molecolari in ampie casistiche di tumori per cui, spesso, lavori scientifici che riportano correlazioni di tipo clinico su casistiche limitate rimangono per lungo tempo come unico riferimento o vengono affiancati da studi difficilmente assimilabili tra di loro. E' importante che il trasferimento alla pratica clinica non avvenga in maniera sregolata e sulla base di osservazioni preliminari: il numero dei geni che sono potenzialmente alterati nei vari tipi tumori diviene ogni giorno più elevato e non è ancora chiaro quali fra queste migliaia di geni si riveleranno effettivamente utili, come marcatori tumorali, sul piano assistenziale.

### **9.3.3 Principali specificità della malattia "cancro"**

Verranno di seguito elencati alcuni principi che riassumono le principali specificità della malattia "cancro" che derivano dalle considerazioni sopra espresse. Questi principi integrano (e non sostituiscono) i principi generali contenuti nelle altre parti del documento.

- Allo stato attuale delle conoscenze, una percentuale molto bassa di tumori può essere ricondotta alla presenza di singoli fattori ereditari. Essa comprende i casi di cancro insorti in soggetti appartenenti a famiglie in cui viene diagnosticata la presenza di fenotipi tumorali secondo le modalità proprie delle malattie da singolo difetto genico. Essa non va confusa con la percentuale (molto più ampia) di soggetti con tumore in cui si osserva una storia familiare oncologica positiva, essendo questa non necessariamente legata a singoli fattori ereditari.

- Il rischio di cancro attribuibile alla presenza di mutazioni ereditarie in singoli geni associati al cancro deve essere valutato mediante adeguati studi di popolazione. Pertanto, in ambito clinico, stime di rischio derivate da particolari sottogruppi (quali le famiglie con alta incidenza di cancro) non possono essere utilizzate per definire rischi di cancro su soggetti sani della popolazione generale.

Allo stato attuale, nessun test genetico di suscettibilità al cancro è appropriato per lo screening di soggetti sani della popolazione generale.

- L' eventuale identificazione di soggetti sani ad alto rischio genetico di cancro comporta l' assunzione di decisioni riguardanti l' opportunità di intraprendere eventuali misure di prevenzione. Poichè la disponibilità di opzioni preventive e/o terapeutiche efficaci (e i relativi rischi) varia notevolmente a seconda del tipo di tumore e, inoltre, efficacia e rischi valutati sulla popolazione generale non necessariamente sono applicabili a priori a soggetti selezionati per la presenza di un test genetico specifico, l'approccio al problema prevenzione in soggetti ad alto rischio genetico si configura molto complesso.

- Attualmente, sono disponibili misure di sorveglianza di provata efficacia per soggetti ad alto rischio genetico solo per poche specifiche situazioni.

- I problemi relativi alla valutazione del valore predittivo di un test genetico per una o più forme di cancro e dell' efficacia delle eventuali misure preventive e/o terapeutiche rendono la validazione di questi test (intesa come valutazione del rapporto tra costi e benefici associati al suo impiego clinico) particolarmente complessa.

- I test genetici predittivi per una o più forme di cancro non sufficientemente validati sul piano clinico devono essere utilizzati esclusivamente all'interno di protocolli di ricerca clinica.
- Le potenziali conseguenze non mediche (psicologiche e sociali) di un test genetico predittivo per una o più forme di cancro sono molteplici. Questo tipo di test deve essere offerto solo da personale competente che abbia ricevuto una formazione adeguata e specifica sui vari aspetti che la consulenza genetica in oncologia comporta e che operi all'interno di équipes interdisciplinari. Essendo attualmente molto limitate le situazioni in cui la conoscenza del risultato del test può effettivamente portare ad interventi medici di provata efficacia ed essendo per lo più inesplorate le conseguenze non mediche in un contesto sociale e culturale come quello italiano, è imperativo che il diritto a conoscere dell'individuo sia basato su una corretta informazione dei potenziali vantaggi e svantaggi del test. E' indispensabile una qualificazione professionale specifica, costantemente aggiornata e interdisciplinare per poter assicurare una scelta veramente informata.
- Le potenziali conseguenze psicologiche e sociali di un test genetico predittivo per una o più forme di cancro sono presenti anche quando esso viene discusso in un contesto di ricerca. Pertanto, è imperativo che sia assicurato anche nei progetti di ricerca in questo settore un corretto approccio al problema.
- Nell'eseguire test genetici somatici in grado di rivelare mutazioni germinali si deve tener conto delle conseguenze mediche e non mediche associate alla possibile rilevazione di una caratteristica genetica di natura ereditaria. Pertanto, questi test debbono essere proposti solo nell'ambito di una apposita consulenza genetica.
- L'utilizzo in ambito clinico di test genetici in grado di rivelare alterazioni somatiche in malattie di tipo oncologico deve essere stato validato mediante studi clinici in grado di valutare l'accuratezza, l'utilità e la sicurezza del test proposto, le patologie per le quali esso risulta essere indicato e le specifiche modalità di esecuzione.

#### **9.3.4 Modalità di impiego dei test genetici in oncologia**

Come precedentemente specificato, per la stesura di queste linee guida per i test genetici nella diagnosi tumorale viene utilizzato il documento già elaborato dalla Commissione Oncologica Nazionale.

- Sulla base delle attuali evidenze scientifiche i tumori possono essere definiti malattie multifattoriali in cui lo sviluppo di cellule neoplastiche è dovuto all'accumularsi di mutazioni multiple in geni cruciali per mantenere un comportamento fisiologico nelle varie fasi di vita della cellula (es. deputati al controllo della proliferazione, differenziamento, senescenza e morte programmata e della riparazione del DNA).
- In oltre il 20% dei pazienti affetti da neoplasie viene riscontrata una storia oncologica in famigliari di primo o di secondo grado. Inoltre, l'1-5% di tutti i casi di tumore è associato a sindromi specifiche di natura ereditaria. L'identificazione dei portatori di forme di suscettibilità ereditaria allo sviluppo delle neoplasie rappresenta quindi una parte integrante dell'opera di prevenzione in campo oncologico in quanto, in casi selezionati, il riconoscimento del rischio di sviluppare tumori specifici si può accompagnare all'attuazione di interventi mirati, in grado di ridurre la morbilità e/o la mortalità per tali neoplasie.
- La determinazione del rischio genetico di cancro deve sempre avvenire nell'ambito di una consulenza genetica i cui elementi principali sono la ricostruzione della storia familiare, la valutazione di quest'ultima alla luce delle conoscenze attuali e una corretta comunicazione, al paziente e/o ai suoi familiari, delle informazioni relative alle varie opzioni disponibili (diagnostiche, terapeutiche e di prevenzione).
- L'offerta a pazienti affetti e loro famigliari asintomatici di test genetici volti ad individuare una predisposizione ereditaria allo sviluppo di neoplasie deve avvenire esclusivamente nell'ambito di tre situazioni: a) consulenza genetica per sindromi ereditarie note predisponenti al cancro; b) programmi di ricerca genetica e clinica approvati da istituzioni e organizzazioni nazionali e/o internazionali; c) eventuali programmi di screening che in futuro dovessero rivelarsi vantaggiosi sul piano del rapporto tra costi e benefici.
- L'offerta di test genetici deve essere proposta solo da laboratori altamente qualificati dotati delle figure professionali necessarie a garantire elevati standard di qualità e attivamente impegnati in una ricerca migliorativa delle prestazioni stesse come certificato dalla loro produzione scientifica e/o dalla loro partecipazione a progetti pilota in ambito nazionale e internazionale. E' auspicabile che tali laboratori attuino programmi di collaborazione e siano tra loro collegati in rete.
- La raccolta di un consenso informato all'esecuzione di analisi genetiche da parte dei pazienti e dei loro familiari rappresenta un elemento centrale del processo interattivo della consulenza genetica e richiede da un lato la piena consapevolezza da parte di chi si sottopone

all'analisi delle potenzialità e dei limiti della stessa, e dall'altro una garanzia di totale riservatezza circa i risultati del test.

- Al momento attuale, l'esecuzione di test genetici permette di ottenere una informazione clinicamente utile (sulla base della quale vengono prese decisioni mediche alternative di provata efficacia) in alcune sindromi ereditarie come il Retinoblastoma Familiare (gene RB), la Poliposi Familiare del Colon (gene APC), la sindrome di von Hippel-Lindau (gene VHL) e le Neoplasie Endocrine Multiple tipo 2 (gene RET).
- L'esecuzione di test genetici per l'identificazione di portatori asintomatici all'interno delle famiglie in cui si è manifestata in precedenza una delle condizioni di cui al punto precedente è pertanto da considerarsi parte integrante di una corretta prassi di assistenza clinica. Di conseguenza è opportuno che questi test siano riconosciuti dal Servizio Sanitario Nazionale come analisi di tipo diagnostico.
- In un secondo gruppo di sindromi ereditarie predisponenti al cancro di cui sono stati identificati alcuni dei geni responsabili (es. Carcinoma Familiare del Colonretto Non-associato a Poliposi o HNPCC - geni hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2; Carcinoma Familiare della mammella e ovaio - geni BRCA1, BRCA2; sindrome di Li-Fraumeni - gene TP53; Atassia-Telangiectasia - gene ATM; Xeroderma Pigmentoso - geni XP; Neurofibromatosi tipo 1 - gene NF1), i test genetici devono essere offerti solo nell'ambito di programmi di ricerca genetica e clinica in quanto i protocolli di follow-up oggi proposti a livello nazionale ed internazionale sono ancora in via di definizione (es. HNPCC) o non hanno ancora dimostrato una provata efficacia (es. sindrome di Li-Fraumeni).
- In particolare, in questo secondo gruppo di sindromi ereditarie predisponenti al cancro va segnalato il carcinoma familiare della mammella e dell'ovaio per il notevole impatto sociale, psicologico ed assistenziale insito in tale forma tumorale. La presenza di una documentata alterazione dei geni BRCA1 o BRCA2 in una paziente consente l'individuazione dei soggetti a rischio nell'ambito della famiglia. Tuttavia, allo stato attuale, è ancora in corso di valutazione l'efficacia dei protocolli di follow-up adottati da vari Centri.
- Si ravvisa, inoltre, la necessità di promuovere iniziative di aggiornamento professionale per i medici e gli altri operatori sanitari impiegati in strutture oncologiche affinché, nelle loro attività cliniche di assistenza e prevenzione, possano usufruire della consulenza genetica, dei test genetici e dei programmi di prevenzione offerti dai Centri di riferimento in maniera vantaggiosa sotto il profilo costi/benefici.

- Infine, data la particolare natura e la complessità delle problematiche relative alle forme di suscettibilità ereditaria allo sviluppo delle neoplasie, è auspicabile che vengano promossi studi per la valutazione dell'impatto psicologico e sociale di eventuali protocolli clinici comprendenti l'utilizzo di test genetici in ambito oncologico.

### **9.3.5 Conclusioni operative**

E' importante che, attraverso iniziative di aggiornamento professionale, medici operanti in strutture oncologiche e non, possano usufruire della consulenza genetica, dei test genetici e dei programmi di prevenzione offerti dai Centri di riferimento per la consulenza genetica oncologica in maniera vantaggiosa sotto il profilo costi/benefici. E' auspicabile infatti che in questi Centri siano avviati iter diagnostici sono per quei soggetti che potenzialmente potrebbero beneficiare di una approfondita valutazione del rischio genetico di cancro sulla base delle più recenti conoscenze scientifiche. In quest'ottica, anche le richieste della popolazione potrebbero essere indirizzate da campagne di educazione sanitaria sull'argomento.

- La valutazione del rischio genetico di cancro svolta nei Centri di riferimento per la consulenza genetica deve avvenire mediante una accurata ricostruzione della storia familiare e l'acquisizione di tutta la documentazione necessaria per la verifica dei dati relativi al caso indice e ai suoi familiari, previo consenso degli aventi diritto.
- L'esito della valutazione complessiva dei dati clinici e di familiarità deve essere comunicato al paziente e ai familiari a rischio nell'ambito di un apposito colloquio (consulenza genetica) in termini adeguati alla capacità di comprensione e modalità di percezione del rischio di malattia propri di ciascun individuo.
- Qualora venga riconosciuta la presenza di un rischio genetico di cancro, durante la stessa consulenza genetica e/o in sedute successive (incontri "pre-test") con la partecipazione di medici specialisti nelle patologie tumorali di interesse, dovranno essere discussi con il soggetto a rischio i vantaggi e i limiti di tutte le opzioni disponibili in termini di prevenzione secondaria nonché il significato e le potenzialità di una eventuale ricerca di mutazioni germinali in geni di suscettibilità allo sviluppo delle neoplasie.
- La raccolta del consenso informato all'esecuzione di test genetici, ovvero all'inserimento in protocolli di ricerca, è un momento fondamentale del processo interattivo della consulenza genetica. Il consulente deve condurre il colloquio in termini adeguati alla capacità di comprensione e modalità di percezione del rischio di malattia del soggetto, in

modo che la sua scelta tra le varie opzioni disponibili (compresa l'astensione totale da qualsiasi ulteriore approfondimento) sia libera e consapevole.

- I risultati dei test genetici devono essere comunicati nell'ambito di un apposito colloquio (incontro "post-test") durante il quale saranno nuovamente discussi con il soggetto il significato dell'analisi genetica eseguita nonché i vantaggi e limiti delle opzioni disponibili in termini di assistenza e di ricerca clinica alla luce del risultato specifico del test (sia esso negativo o positivo). E' auspicabile che siano previsti anche incontri successivi allo scopo di verificare il grado di comprensione delle informazioni trasmesse durante il colloquio post-test e alla valutazione del loro impatto psicologico e sociale.
- Si intendono per opzioni disponibili in ambito di assistenza quelle previste da protocolli nazionali e/o internazionali di provata efficacia. In assenza di tali protocolli ogni proposta di sorveglianza clinica o di terapia deve essere considerata di tipo sperimentale, essere approvata da un Comitato Etico e, possibilmente, inserita in studi collaborativi nazionali e/o internazionali volti a dimostrarne l'efficacia.

## **9.4 Test genetici nelle malattie rare**

### **9.4.1 Definizione**

La definizione di malattia rara non è uniforme, tuttavia generalmente per malattia rara si intende quella che ha una prevalenza uguale o inferiore a 1: 2000 circa. Va però considerato che le malattie rare sono numerose, circa 5.000 delle quali almeno il 90% sono malattie genetiche (Holtzman & Watson, 1997). Per tale motivo la frequenza complessiva nella popolazione generale italiana può essere significativa. Considerando inoltre che i pazienti affetti da malattie rare richiedono generalmente una assistenza specialistica e continuativa l'impatto economico e sociale delle malattie rare nel loro insieme è notevole.

### **9.4.2 Problemi specifici delle malattie rare**

Per le malattie genetiche rare valgono gli stessi principi generali riguardanti la validazione scientifica dei test genetici, i requisiti richiesti ai laboratori che intendono eseguirli, i criteri per la loro gestione.

Debbono tuttavia essere considerati alcuni punti specifici.

La bassa frequenza dei casi attesi comporta che la domanda dell'utenza possa non costituire una spinta sufficiente per un adeguato sviluppo e validazione di test genetici e/o la costituzione di centri di riferimento per la diagnosi, almeno a livello regionale. Inoltre, questa validazione è resa più difficile proprio dalle difficoltà di osservare casistiche di dimensioni adeguate. A questo è spesso conseguente un ritardo nella diagnosi, anche qualora esistano test diagnostici, in quanto vi è inadeguata e disomogenea diffusione dell'informazione, ad esempio la base di dati può essere ridondante per alcune malattie ed assente per altre. Inoltre, l'informazione disponibile per i pazienti e le famiglie può essere scarsa o addirittura assente. La situazione attuale richiede che le risorse presenti vengano utilizzate in maniera coordinata evitando duplicazioni, individuando eventuali aree (patologie o gruppi di patologie) non coperte e conseguentemente programmando lo sviluppo delle competenze mancanti.

### **9.4.3 Obiettivi**

Possono essere individuati i seguenti obiettivi:

- dovrebbe essere organizzato un sistema coordinato per la raccolta dei dati sulla frequenza e diagnosi delle malattie rare;
- dovrebbe essere incrementata la conoscenza scientifica destinando risorse a progetti di ricerca finalizzati alla prevenzione, diagnosi precoce e terapia di queste patologie. Tali progetti dovrebbero avere un carattere interdisciplinare e mirare ad un approccio il più possibile integrato.

In particolare, occorre sviluppare un sistema informativo che permetta di valutare la validità clinica dei test genetici per le malattie rare.

Infine, e' necessario fornire una adeguata informazione ai pazienti affetti e alle loro famiglie. Inoltre, va ulteriormente sviluppata la collaborazione fra gli operatori sanitari e le Associazioni di pazienti e famiglie.

Gli operatori sanitari che incontrano pazienti con sintomi indicativi di malattie genetiche rare devono avere accesso ad un'informazione accurata che li metta in grado di includere tali patologie nella diagnosi differenziale di altre malattie, di sapere ove rivolgersi per una diagnosi specialistica, clinica e/o di laboratorio. Qualora esistano dei test genetici e' importante assicurare che:

- a) siano realmente disponibili ed effettuati;
- b) l'offerta del test sia continuativa (cioe' che non cessi l'offerta del test per scarsita' di domanda rispetto a malattie piu' frequenti).

Pertanto, e' necessario identificare centri di riferimento nazionali per queste patologie e contemporaneamente organizzare una rete nazionale, eventualmente anche con collegamenti internazionali, per la prevenzione, diagnosi e trattamento di singole (o gruppi di) malattie rare.

## 10. BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

Ad hoc Committee on Genetic Counseling. Report to the American Society of Human Genetics. Am. J. Hum. Genet. 27:240-242, 1975.

Atti dello Workshop "Diagnosi precoce di malattie genetiche e della suscettibilità ereditaria allo sviluppo di neoplasie: proposte per una programmazione sanitaria", Istituto Superiore di Sanità, 18-19 dicembre 1997, Responsabile Scientifico: Dr.ssa D. Taruscio; Segreteria Tecnica: M. Falchi, F. Iosi, S. Paradisi.

Aggiornamento alle linee guida per la diagnostica citogenetica. Associazione Italiana di Citogenetica Medica (A.I.C.M.) Newsletter, settembre 1996.

Ajmar F., Dagna Bricarelli F., Danieli G.A., De Stefano F., Frontali M., Mordacci R., Novelli G., Rossi A.M., Sala G., Terragni F. Dalla Conferenza Internazionale "L'etica nella ricerca biomedica", Università degli Studi di Pisa, 22-24 Novembre, 1995; A.I.G.M. Newsletter, marzo 1996.

Annas G.J., Glantz L.H., Roche P.A. The genetic privacy act and commentary. Health Law Department, Boston University School of Public Health, 0211 Boston MA, 1995.

ASHG/ACGM Report, Points to consider: Ethical, Legal and Psychosocial Implications of Genetic Testing in Children and Adolescents. Am. J. Hum. Gen. 57, 1995.

British Medical Association. Our Genetic Future: The Science and Ethics of Genetic Technologies, London, British Medical Society, 1992.

Control of Hereditary Diseases. Report of a WHO Scientific Group. WHO Technical Report Series-865, World Health Organization, 1996.

Diagnosi prenatali. Comitato Nazionale per la Bioetica. Presidenza del Consiglio dei Ministri, Dipartimento per l'informazione e l'editoria. Roma, 18 luglio, 1992.

Diagnostica Citogenetica. Consensus 1995. Stampa a cura della Segreteria dell'Associazione Italiana di Citogenetica Medica ( A.I.C.M. ), maggio 1995.

European Association of Perinatal Medicine, Recommendations and Protocols for Prenatal Diagnosis, 1993.

Filo diretto con le malattie genetiche. Telethon in collaborazione con AIRH, 1996.

Genetic (a)l correctness. Editorial. *Nature Genetics* 17 (4):363-364, 1997.

Gazzetta Ufficiale dell'8 gennaio 1997, Supplemento Ordinario alla Gazzetta Ufficiale n.5 dell'8 gennaio 1996 - Serie generale n. 3: legge 31 dicembre 1996, n. 675 "Tutela delle persone e di altri soggetti rispetto al trattamento dei dati personali"; legge 31 dicembre 1996, n. 676 "Delega al Governo in materia di tutela delle persone e di altri soggetti rispetto al trattamento dei dati personali".

Gazzetta Ufficiale del 29 novembre 1997 - Serie Generale n. 279: provvedimento del 27 novembre 1997 "Autorizzazione n.2/1997 al trattamento dei dati idonei a rivelare lo stato di salute e la vita sessuale"; provvedimento del 28 novembre 1997 "Autorizzazione n.2/1997 al trattamento dei dati idonei a rivelare lo stato di salute e la vita sessuale". Autorità Garante per la protezione dei dati personali.

Geller G. et al. Genetic testing for susceptibility to adult-onset cancer. The process and content of informed consent. *JAMA*, 277:1467-1474, 1997.

Grudzinskas J.G. & Ward R.H.T. Screening for Down Syndrome in the First Trimester, 32<sup>nd</sup> Royal College of Obstetrics and Gynaecology Study Group. RCOG Press, London, 1997.

Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington's disease. *Neurology* 44:1533-1536, 1994.

Handyside A.H., Delhanty J.D.A. Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. *Trends in Genetics*, 13(7): 270-275, 1997.

Harper P.S. What do we mean by genetic testing? *J. Med. Genet.* 34: 749-752, 1997.

Holtzman N.A. Are we ready to screen for inherited susceptibility to cancer? *Oncology*, 10:57-64, 1996.

Holtzman N.A. Interim principles of the task force on genetic testing. The NIH-DOE Working Group on Ethical, Legal, and social Implications of Human Genome Research. 1997 (sito web: <http://www.med.jhu.edu/tfgtelsi>).

Holtzman N.A. Testing for genetic susceptibility to common cancers: clinical and ethical issues. *Advances in Oncology*, 13:9-15, 1997.

Holtzman N.A. & Watson M.S. Final report of the task force on genetic testing. Promoting safe and effective genetic testing in the United States, September 1997.

Linee guida per la sicurezza della sperimentazione in terapia genica. Rapporto del gruppo di lavoro. Presidenza del Consiglio dei Ministri, Comitato Scientifico per i rischi derivanti dall'impiego di agenti biologici. *BioTec*, Supplemento al n. 5, settembre-ottobre, 1996.

Lundsteen C. & Vejerslev L.O. Prenatal diagnosis in Denmark. *Eur. J. Hum. Genet.* 5(Suppl. 1): 14-21, 1997.

National Society of Genetic Counselors, Code of Ethics. *J. Genetic Counseling*, Vol. 1, n. 1, 1992.

Niermeijer M. Screening and counselling: report of discussion group on genetic screening, counselling and intervention. In Bankowsky, Z and Bryant, J (ed.) *Health Policy, Ethics and Human Values: European and North American Perspectives: Conference Highlights, Papers and Conclusions from the XXI<sup>st</sup> Council of International Organizations of Medical Science Conference*, Geneva, 1988.

Novelli G., Pignatti P.F., Migone N., Ballabio A., Ferrari M., Spagnolo A., Forabosco A., Mazzotti G., Dallapiccola B. Test diagnostici di genetica molecolare. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità*. Vol. 9 (9):1-4, 1996.

Progetto genoma umano. Comitato Nazionale per la Bioetica. Presidenza del Consiglio dei Ministri, Dipartimento per l'informazione e l'editoria. Roma, 18 marzo, 1995.

Snijders R.J.M. et al. First-trimester ultrasound screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 7:216-226, 1996.

Terapia genica. Comitato Nazionale per la Bioetica. Presidenza del Consiglio dei Ministri, Dipartimento per l'informazione e l'editoria. Roma, 15 febbraio, 1991.

Wadman M. U.S. urged to monitor some genetic tests. *Nature*, 385: 477, 1997.

WHO-Regional Office for Europe Working Group, Risk evaluation of chorionic villus sampling (CVS), document EUR/ICPMCH 123. Copenhagen, 1992.

## 11. GLOSSARIO

**Aberrazioni cromosomiche (o mutazioni cromosomiche)** Alterazioni del materiale genetico visibili al microscopio ottico. Comprendono le anomalie di numero e di struttura dei cromosomi. Possono essere a carico delle cellule germinali o somatiche e danno origine a fenotipi patologici detti rispettivamente "costituzionali" o "acquisiti".

**Acido desossiribonucleico** Vedi DNA.

**Acido ribonucleico** Vedi RNA, hnRNA, mRNA, tRNA, rRNA.

**Acrocentrico (cromosoma)** Detto di cromosoma con il centromero posto vicino ad una delle due estremità del cromosoma stesso.

**Allele** Una delle forme alternative di un gene che risiede in un dato locus sul cromosoma. Gli alleli occupano lo stesso locus sui cromosomi omologhi e rappresentano il genotipo di un determinato individuo a quel locus. Un individuo che possiede due alleli identici ad un determinato locus polimorfico è definito, per tale locus, *omozigote*; se, invece, possiede due alleli diversi l'individuo è definito *eterozigote* per quel locus.

**Allele mutante** Allele che differisce dall'allele trovato nel tipo standard o selvatico.

**Aminoacido** Unita' costitutiva delle proteine. Un aminoacido è un composto organico contenente almeno un gruppo aminico (-NH<sub>2</sub>) ed un gruppo carbossilico (-COOH). Sono una delle classi di composti organici più importanti degli organismi viventi. Circa 20 α-L-aminoacidi si trovano a costituire, normalmente, le proteine. In un gene, una tripletta di tre nucleotidi adiacenti (codone) codifica per un aminoacido.

**Amniocentesi** Prelievo di liquido del sacco amniotico che circonda il feto. L'amniocentesi a scopo di diagnosi prenatale viene generalmente effettuata nel secondo trimestre di gravidanza e consente di effettuare analisi citogenetiche, biochimiche e molecolari sulle cellule fetali in sospensione (derivate dalla cute e dagli epitelii del tratto gastrointestinale, respiratorio e genito-urinario).

**Amplificazione** Aumento del numero di copie di una sequenza di DNA.

**Anafase** Fase della mitosi e della meiosi, successiva alla metafase e precedente la telofase, durante la quale i cromatidi migrano dalla piastra metafasica verso i poli del fuso.

**Analita** Sostanza misurata da un test di laboratorio.

**Aneuploidia** Aberrazione cromosomica numerica dovuta alla presenza di un numero di cromosomi diverso da un multiplo esatto del corredo aploide. La monosomia e la trisomia rappresentano esempi di aneuploidia.

**Anticodone** Specifica tripletta di nucleotidi presente in ogni RNA transfer (tRNA) destinata a riconoscere una tripletta complementare (codone) presente sull'RNA messaggero (mRNA) durante la biosintesi delle proteine. Ciascun tipo di RNA transfer è caratterizzato da uno specifico anticodone e può legare solo un dato tipo di aminoacido.

**Antiparallelo** Termine usato per descrivere l'orientamento dei due filamenti complementari di una molecola di DNA a doppia elica, in cui all'estremità 5' di un filamento corrisponde l'estremità 3' dell'altro.

**Aploidia** Condizione di una cellula caratterizzata dalla presenza di un singolo corredo cromosomico ( $n$ ), cioè contenente un elemento di ogni coppia di cromosomi omologhi. L'assetto cromosomico aploide delle cellule umane consta di 23 cromosomi e come tale è presente nei gameti maturi, mentre in tutte le cellule somatiche è ripetuto due volte ( $2n$ , diploidia).

**Aplotipo** Combinazione di alleli di loci diversi sullo stesso cromosoma, che segregano in blocco in una famiglia. Viene anche denominato combinazione gametica e nella popolazione può avere una frequenza maggiore o minore dell'atteso (vedi Linkage disequilibrium).

**Associazione** In statistica, il verificarsi insieme di due o più fenomeni con frequenza maggiore di quella attesa per caso (cioè del prodotto delle rispettive frequenze, o probabilità composta). I fenomeni associati possono essere legati causalmente tra loro (es. associazione tra fattori di rischio e malattie), oppure avere cause comuni es. associazione tra gli elementi di una sindrome), ecc. In genetica il termine è talvolta utilizzato in luogo di concatenazione o linkage (vedi), oppure per indicare che in un gruppo di individui affetti da una certa malattia la frequenza di un determinato fenotipo (e quindi di un determinato gene) è maggiore che in un campione di individui senza la malattia. In questa accezione, il termine associazione non implica necessariamente che i due geni siano localizzati sullo stesso cromosoma.

**Autoradiografia** Tecnica che consente di rilevare la posizione di un radioisotopo in un tessuto, in una cellula o in un insieme di molecole. Il campione radioattivo viene posto a

contatto con una emulsione fotografica e l'emissione di particelle energetiche (usualmente particelle  $\beta$ ) provoca nell'emulsione la riduzione dei granuli di argento ad argento metallico quando il film viene sviluppato. In biologia molecolare, l'autoradiografia è comunemente utilizzata per evidenziare l'ibridazione di una sonda radioattiva con RNA o DNA denaturato, in vari esperimenti quali Southern blot, Northern blot, ibridazione di colonie batteriche o di placche fagiche.

**Autosoma** Tutti i cromosomi di una cellula esclusi i cromosomi del sesso. Una cellula diploide ha due copie di ogni autosoma. Le cellule somatiche umane possiedono 22 coppie di autosomi e due cromosomi sessuali (eterocromosomi).

**Bandeeggiamento (Tecnica di)** Insieme delle tecniche di colorazione speciale che permettono di analizzare e caratterizzare singolarmente i cromosomi. Le principali tecniche di bandeeggiamento vengono indicate con lettere maiuscole dell'alfabeto: C, G, Q, R ecc. Ad esempio, il bandeeggiamento C prevede la colorazione con liquido Giemsa di cromosomi denaturati ed evidenzia l'eterocromatina costitutiva presente a livello del centromero. Aberrazioni cromosomiche di una certa entità quali delezioni, inversioni, traslocazioni sono spesso evidenziabili con tali metodiche, rendendo il bandeeggiamento una tecnica di diagnosi citogenetica.

**Basi azotate** Fondamentali componenti degli acidi nucleici (DNA e RNA), composte di anelli azotati. Possono essere distinte in purine (adenina e guanina) o pirimidine (citosina, timina o uracile nell'RNA). Legami idrogeno fra le basi azotate uniscono i due filamenti di DNA a doppia elica (vedi anche nucleotide).

**Batteriofago** Virus che infetta cellule batteriche. In biologia molecolare, i batteriofagi vengono utilizzati come vettori di clonaggio.

**Blastomero** Una delle cellule che derivano dalla divisione dello zigote (vedi), fino allo stadio di blastocisti.

**Carattere (o fenotipo)** Qualunque caratteristica di un organismo che si possa riconoscere in maniera riproducibile secondo criteri definiti di classificazione (caratteri qualitativi) o di misura (caratteri quantitativi). Un carattere ereditario viene definito *dominante* (quando è fenotipicamente espresso anche negli eterozigoti per il gene che lo controlla); *recessivo* (espresso fenotipicamente soltanto negli individui omozigoti per il gene che lo controlla); *codominante* (carattere ereditario per il quale gli individui eterozigoti esprimono fenotipicamente gli effetti di entrambi gli alleli).

**Carattere ereditario monofattoriale (o mendeliano)** Caratteristica fenotipica determinata dall'espressione di un singolo gene.

**Carattere ereditario multifattoriale** Caratteristica fenotipica risultante dall'azione congiunta di più geni e di fattori ambientali.

**Cariocinesi** Vedi Mitosi.

**Cariotipo** Schema ordinato del corredo cromosomico di una cellula, nel quale i singoli cromosomi sono identificati in base alle loro caratteristiche morfologiche.

Nei preparati non bandeggiati sono utilizzati come parametri : *la lunghezza relativa del cromosoma* (classifica i cromosomi in ordine decrescente di lunghezza); *l'indice dei bracci cromosomici* (definito come rapporto tra braccio lungo q e braccio corto p); *l'indice centromerico* (definito come rapporto tra la lunghezza del braccio corto e la lunghezza totale del cromosoma).

**cDNA** Vedi DNA complementare.

**Cellula** Unità morfologica e funzionale degli organismi animali e vegetali, delimitata esternamente da una membrana cellulare, che per altro si ritrova anche al suo interno a delimitare organuli o inclusi. Il comparto racchiuso dalla membrana cellulare è divisibile, negli organismi eucarioti, in due componenti principali: il citoplasma, nella cui matrice sono contenuti gli organuli cellulari (ad esempio, mitocondri, reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi); il nucleo circondato da un involucro a doppia membrana e contenente gli acidi nucleici (DNA e RNA), i quali dirigono la sintesi di tutte le proteine cellulari (vedi procarioti ed eucarioti).

**Cellula competente** Cellula in grado di far penetrare del DNA esogeno al proprio interno, risultandone così trasformata.

**Cellule germinali** Vedi Linea germinale.

**Cellule somatiche** Tutte le cellule che formano un organismo, escluse le cellule della linea germinale.

**Centimorgan (cM)** vedi Unita' di mappa

**Centromero** Regione eterocromatica di un cromosoma, localizzata in corrispondenza della c.d. "costrizione primaria", in cui il cromosoma è più sottile. Il centromero tiene uniti i due cromatidi fratelli e contiene il sito di attacco per le fibre del fuso mitotico e meiotico.

**Chiasmi** Punti di scambio della cromatina tra cromatidi non-fratelli evidenziabili nella profase della meiosi I. I chiasmi sono le regioni (a forma di croce) a livello delle quali si è verificato il crossing-over. Il numero dei chiasmi varia da cromosoma a cromosoma.

**Ciclo cellulare** Successione ciclica di fasi funzionali della cellula da una divisione cellulare a quella successiva. La Mitosi o fase M (vedi) avviene in maniera ordinata ed attraverso la separazione dei cromatidi fratelli assicura che le due cellule figlie ricevano copie identiche di ciascun cromosoma del corredo diploide. L'intervallo tra una mitosi e la successiva, detto Interfase (vedi), si suddivide a sua volta in fasi diverse. Durante la fase G1 ogni cromosoma, e quindi ciascun allele, è rappresentato da una sola doppia elica di DNA; avviene l'espressione di molti geni attraverso la trascrizione in mRNA nel nucleo e la sintesi delle corrispondenti proteine nel citoplasma. Segue la fase S (sintesi del DNA), durante la quale avviene la duplicazione semiconservativa dell'intero genoma. Nella fase G2 ogni cromosoma, e quindi ciascun allele, è rappresentato da due doppie eliche di DNA, tra loro identiche, nella cromatina dei due cromatidi fratelli che si separeranno nella successiva fase M. Nei tessuti in quiescenza moltiplicativa le cellule sono considerate "fuori ciclo" (fase G0).

**Citogenetica** Ramo della genetica che ha per oggetto lo studio morfologico della struttura, della topologia e della funzione dei cromosomi.

**Citogenetica molecolare** Applicazione di metodiche molecolari alla Citogenetica (Vedi anche Ibridazione in situ).

### **Clonaggio (o clonazione)**

Produzione di un insieme di copie identiche (cloni) di molecole, cellule o organismi.

- 1) Isolamento di una cellula, e quindi delle cellule da questa derivate, a formare una linea cellulare di elementi identici tra loro (clonaggio cellulare).
- 2) Impiego delle tecniche del DNA ricombinante per inserire una specifica sequenza di DNA in un opportuno vettore allo scopo di ottenerne la propagazione in numerose copie attraverso l'amplificazione clonale delle cellule in cui tale vettore è stato inserito (clonaggio molecolare propriamente detto).

Il termine viene anche usato per indicare:

3) Generazione di un individuo con patrimonio genetico identico ad un solo individuo parentale, nel caso di organismi che si riproducono sessualmente. A tal fine, viene introdotto il nucleo diploide di una cellula somatica (in fase G0, vedi ciclo cellulare) in un gamete femminile privato del proprio nucleo.

**Clonaggio per posizione (positional cloning)** Strategia per clonare un gene attraverso la definizione via via più precisa della sua posizione in mappe genetiche e fisiche, fino all'identificazione della corrispondente sequenza di DNA in cloni genomici e/o di cDNA.

**Clone** Popolazione di cellule o organismi aventi lo stesso genotipo, in quanto derivati da un unico progenitore. Per estensione, in biologia molecolare il termine è usato per indicare una colonia di microrganismi contenenti una specifica sequenza di DNA inserita in un vettore.

**Codice genetico** Sistema di codificazione mediante il quale l'informazione genetica presente nel DNA sotto forma di sequenze nucleotidiche viene tradotta, tramite l'RNA messaggero (mRNA) e l'RNA transfer (tRNA), nel linguaggio aminoacidico delle proteine. Per codice genetico si intendono le regole di corrispondenza tra le possibili "triplette" - sequenze di tre nucleotidi adiacenti - ed i diversi aminoacidi codificati o i segnali di inizio e di fine della traduzione dell'mRNA. Ogni tripletta è detta "codone": combinando i quattro nucleotidi tre a tre è possibile ottenere 64 ( $4^3$ ) codoni diversi. Poiché sono necessarie solo 20 triplette per codificare i 20 diversi aminoacidi, si dice che il codice è "degenerato": un aminoacido può essere codificato da più di una tripletta (ad esempio, l'alanina è codificata dai codoni GCA, GCC, GCG, GCU). Per molte delle triplette che codificano per lo stesso aminoacido le prime due basi sono costanti, mentre l'ultima può variare. I codoni UAA, UAG, UGA vengono chiamati "codoni terminatori", in quanto per nessuno di essi esiste un corrispondente RNA transfer nella cellula: essi segnalano la fine della traduzione in sequenza proteica di un mRNA. La tripletta AUG codifica per l'aminoacido metionina e specifica anche il sito di inizio della traduzione dell'mRNA in una sequenza polipeptidica. Si parla di "universalità del codice" in quanto tutti gli organismi (tranne rare eccezioni) usano lo stesso codice genetico.

**Codominante (Carattere)** Carattere ereditario per il quale gli individui eterozigoti esprimono fenotipicamente gli effetti di entrambi gli alleli.

**Codone** Unità del codice genetico costituita da una sequenza di tre nucleotidi adiacenti (tripletta) che, lungo una molecola di RNA messaggero, specifica un determinato aminoacido o un segnale di inizio o di terminazione. Esistono 64 codoni diversi, originati combinando i quattro nucleotidi tre a tre ( $4^3$ ).

**Complementarietà** Regola generale di appaiamento delle basi negli acidi nucleici per cui una adenina si appaia sempre con una timina (o un uracile nel caso dell'RNA) e una guanina si appaia sempre con una citosina (e viceversa).

**Confondimento** In statistica, presenza di altri fattori o variabili che interferiscono con la possibilità di identificare un particolare fattore come agente causale di un dato evento.

**Consulenza genetica** Consulenza medica il cui intento è quello di fornire ad individui o famiglie affetti o a rischio per determinate malattie genetiche informazioni riguardanti la malattia e/o il rischio di malattia.

**Coppia di basi (basepair, bp)** Il più piccolo tratto di un acido nucleico a doppia elica, consistente di due basi (una per filamento) appaiate per mezzo di legami idrogeno. La coppia di basi è usata come unità di misura della lunghezza degli acidi nucleici a doppia elica.

**Costrizione primaria** Regione a livello del centromero in cui il cromosoma è più assottigliato.

**Costrizioni secondarie** Costrizioni costanti per posizione ed estensione, che differiscono dalle primarie per l'assenza, al loro livello, di una evidente angolatura dei segmenti cromosomici.

**Cromatidi fratelli** I due cromatidi identici che si formano per duplicazione del cromatidio parentale durante la fase S (sintesi) del ciclo cellulare e rimangono uniti tra loro a livello del centromero. Nelle fasi successive della divisione nucleare, i due cromatidi si separano e vengono distribuiti ad ognuna delle cellule figlie.

**Cromatidi non fratelli** Due cromatidi derivati rispettivamente da due cromosomi omologhi.

**Cromatidio (o cromatide)** Uno dei due filamenti prodotti nella duplicazione di un cromosoma, uniti al centromero.

**Cromatina** Complesso di acidi nucleici e proteine (istoni e proteine non istoniche) presente nel nucleo delle cellule in interfase ed intensamente colorabile con coloranti basici.

**Cromatina X (o corpo di Barr)** Masserella di cromatina, localizzata alla periferia dei nuclei interfasici ed osservabile, in condizioni normali, nelle cellule somatiche femminili e non presente nei maschi. Deriva da un processo di inattivazione di un cromosoma X. Poiché in ogni cellula somatica ci può essere un solo X attivo, il numero dei corpi di Barr nel nucleo è pari al numero dei cromosomi X presenti nel cariotipo meno uno. È costituita da eterocromatina facoltativa, in quanto ogni cellula XX inattiverà casualmente un cromosoma X, quello di origine paterna o quello di origine materna. L'analisi della cromatina di Barr è particolarmente utile in caso di aberrazioni a carico dei cromosomi X.

**Cromomero** Specifica zona del cromosoma, intensamente colorabile, visibile soprattutto durante la profase della meiosi. I cromomeri si trovano in posizione costante lungo i cromosomi e corrispondono a regioni in cui il filamento cromosomico è più addensato.

**Cromosoma** Unità discreta del genoma che contiene numerosi geni in sequenza lineare. Ciascun cromosoma consiste in un'unica molecola di DNA a doppia elica (nella fase G1), o in due molecole identiche (nelle fasi G2 ed M) sotto forma di cromatina più o meno addensata. I cromosomi sono evidenziabili microscopicamente come entità morfologiche soltanto durante le fasi della mitosi e della meiosi, e sono intensamente colorabili con coloranti basici. Il loro numero presente nel nucleo cellulare di una data specie animale o vegetale è costante. Nelle cellule somatiche umane, i cromosomi consistono di 22 paia di autosomi più due cromosomi sessuali: due cromosomi X nelle femmine, un cromosoma X e un cromosoma Y nei maschi. In condizioni normali, quindi, ciascuna cellula somatica umana contiene 46 cromosomi (corredo diploide). Ciascun cromosoma possiede due cromomeri terminali e un centromero, dalla posizione dei quali dipende la forma del cromosoma stesso (vedi Cariotipo).

**Cromosoma acentrico** Frammento di cromosoma (originatosi dalla rottura di un cromosoma) privo di centromero. Destino di un cromosoma acentrico è quello di essere perso da una delle due cellule durante la divisione cellulare, non essendo attaccato alle fibre del fuso.

**Cromosoma ad anello (ring chromosome=r)**

Cromosoma strutturalmente anormale nel quale l'estremità di ciascun braccio è deleta e le due braccia si sono riunite a formare un anello. La presenza del centromero consente all'anello di segregare nelle cellule figlie, sia pure con un'elevata instabilità che è dovuta allo scambio tra i cromatidi fratelli. Infatti, dopo la divisione del centromero, all'anafase, il cromosoma che ha subito lo scambio diventa dicentrico, di dimensioni doppie e si perde, dando origine a un mosaico (cromosoma ad anello/monosomia).

**Cromosoma dicentrico** Cromosoma originatosi dalla fusione di due frammenti di cromosoma recanti ciascuno il centromero. I cromosomi dicentrici sono instabili alla divisione cellulare e possono rompersi quando i due centromeri migrano ai poli opposti durante la mitosi.

**Cromosoma omologo** Ciascuno dei due cromosomi che si appaiano durante la meiosi I. Negli organismi diploidi le coppie di cromosomi omologhi sono formate da cromosomi con lo stesso corredo genico ma provenienti uno dalla cellula uovo e l'altro dallo spermatozoo.

**Cromosomi sessuali** Cromosomi che portano l'informazione per la determinazione del sesso; sono comunemente chiamati X e Y. Nella specie umana, in condizioni normali, nelle femmine si hanno due cromosomi X, nei maschi un cromosoma X ed un cromosoma Y.

**Crossing over** Scambio reciproco di sequenze nucleotidiche che avviene tra cromosomi omologhi durante la meiosi. Il crossing over è responsabile della ricombinazione genetica. Da un punto di vista citologico, il crossing over corrisponde ai chiasmi (vedi). Il principale meccanismo ipotizzato per spiegare il fenomeno del crossing over e' conosciuto come rottura e riunione.

**Crossing over ineguale** Meccanismo responsabile di riarrangiamenti genomici in seguito ad appaiamento errato tra sequenze omologhe, per struttura ma non per posizione di due cromosomi omologhi. L'appaiamento errato puo' essere favorito dalla somiglianza tra corte sequenze di basi in posizioni non omologhe o da una preesistente duplicazione genica piu' o meno estesa. Un crossing over nella regione mal appaiata puo' portare a duplicazione in alcuni gameti e a delezione in altri, e favorisce ulteriori eventi di crossing-over diseguale, con formazione di triplicati, ecc.

**Crossing over somatico** Crossing over che si verifica nel corso della mitosi di cellule somatiche.

**Degenerazione del codice genetico** Presenza nel codice genetico di più codoni (triplette diverse) che codificano uno stesso aminoacido.

**Delezione** Perdita di una porzione di genoma di dimensioni variabili: da un singolo nucleotide, ad uno o più geni, ad un segmento di cromosoma (delezione

cromosomica). La delezione cromosomica può essere *terminale* o *interstiziale*, a seconda se viene perduto un tratto posto all'estremità o all'interno del cromosoma.

**Denaturazione** Relativamente agli acidi nucleici, indica la transizione da una struttura a doppia elica ad uno stato a singolo filamento. Sperimentalmente, la denaturazione si induce mediante innalzamento di temperatura o trattamento degli acidi nucleici con soluzioni a pH estremo.

**Differenziamento cellulare** Comparsa di caratteristiche differenziali (morfologiche e funzionali) in cellule inizialmente identiche, in quanto derivate da un elemento progenitore comune. Tale processo avviene di regola nel corso dello sviluppo embrionale ed è alla base dell'istogenesi e dell'organogenesi; nella vita postnatale sussistono importanti processi di differenziamento in alcuni tessuti (quali, ad es., midollo osseo, testicolo). Gli elementi indifferenziati dispongono di un ampio ventaglio di potenzialità, mentre quelli differenziati hanno un destino determinato.

**Diploidia** Condizione di una cellula o di un organismo che possiede due corredi completi di cromosomi omologhi ( $2n$ ), ognuno dei quali corrispondente al corredo aploide ( $n$ ). Le cellule somatiche umane contengono 46 cromosomi (corredo diploide), cioè 23 coppie, ciascuna composta da un cromosoma di origine materna e da uno di origine paterna.

**Dizigotico** Vedi Gemello dizigotico

**DNA (acido deossiribonucleico)** Molecola che codifica l'informazione trasmessa ereditariamente. Il DNA è costituito da due filamenti di desossiribonucleotidi, uniti da legami idrogeno fra le coppie di basi complementari affrontate (adenina con timina, citosina con guanina) ed avvolti in senso opposto (antiparallelo) l'uno rispetto all'altro a formare una doppia elica. La replicazione del DNA è di tipo semiconservativo: le due molecole figlie posseggono ciascuna un filamento della molecola madre e uno neosintetizzato. Il DNA costituisce il genoma di tutti gli organismi, esclusi alcuni virus ad RNA. (Vedi anche basi azotate; complementarietà; doppia elica).

### **DNA complementare**

1) DNA copia (cDNA): molecola di DNA prodotta sullo stampo di un RNA ad opera dell'enzima DNA polimerasi RNA-dipendente o trascrittasi inversa (vedi). Il primo filamento di cDNA così prodotto può essere convertito nel corrispondente cDNA a doppia elica ad opera della DNA polimerasi, quindi clonato con le metodiche del DNA ricombinante.

2) Catena di DNA la cui sequenza polinucleotidica è antiparallela e complementare a quella di un'altra catena di DNA, ovvero che presenta adenina in luogo di timina, timina in luogo di adenina, guanina in luogo di citosina e citosina in luogo di guanina, rispetto alla catena di DNA della quale è complementare.

### **DNA fingerprinting (tipizzazione del DNA; impronta genetica)**

Tecnica basata sulla analisi dei numerosi loci ipervariabili presenti nel genoma umano e che permette di ottenere l'impronta genetica, in genere caratteristica di ogni individuo. Un locus ipervariabile, noto come DNA mini- o microsatellite, consiste in una serie di ripetizioni di una breve sequenza nucleotidica il cui numero varia da allele ad allele, cosicché il numero delle ripetizioni presenti nel genoma di ciascun individuo costituisce una particolare caratteristica genetica (l'impronta genetica) di questo. La variabilità individuale a livello dei loci (polimorfismi) del DNA mini- e microsatellite viene determinata mediante PCR (vedi), o più raramente, attraverso digestione con enzimi di restrizione. Il quadro e la lunghezza dei frammenti di restrizione così ottenuti sono una funzione del numero di ripetizioni presenti. L'analisi del numero variabile di ripetizioni in tandem (variable number of tandem repeats, VNTR) rappresenta uno dei principali mezzi per la tipizzazione del DNA.

**DNA polimerasi** Enzima che opera la duplicazione del DNA per incorporazione di desossiribonucleotidi trifosfati in processi di replicazione cellulare, ricombinazione e riparo del DNA. Sia nei procarioti che negli eucarioti esistono diversi tipi di DNA polimerasi, ognuno deputato a tipi diversi di eventi replicativi.

### **DNA polimerasi RNA-dipendente**

Vedi Trascrittasi inversa.

### **DNA ricombinante**

Molecola di DNA modificata con le tecniche dell'ingegneria genetica, in modo da contenere una o più sequenze nucleotidiche diverse rispetto alla molecola originaria. Le diverse sequenze polinucleotidiche presenti all'interno di una molecola di DNA ricombinante provengono generalmente da organismi di specie differenti. Le tecniche di DNA ricombinante permettono di tagliare segmenti di DNA dal genoma di una cellula ed inserirli mediante un vettore in altre cellule, le quali possono replicare il segmento milioni di volte durante la proliferazione cellulare. (Vedi anche ingegneria genetica, tecnologia del DNA ricombinante).

### **DNA ripetitivo**

Sequenze di DNA ripetute molte volte nel genoma di organismi eucarioti. Possono essere classificate in due categorie, che risultano diverse per localizzazione, per il numero delle ripetizioni e per la lunghezza del tratto ripetuto: a) *sequenze semplici ripetute in tandem o DNA satellite*, ricche in adenina e timina, ripetute migliaia di volte in tandem, di cui

sono esempi le sequenze alfoidi (localizzate nelle regioni centromeriche di tutti i cromosomi) e i minisatelliti; b) *sequenze ripetitive disperse*, sequenze disperse in tutto il genoma e che possono essere localizzate tra un gene e l'altro, all'interno di un gene o nel mezzo di DNA satellite; esistono elementi corti e altri più lunghi, chiamati rispettivamente SINE e LINE (Short e Long INterspersed Elements). Nell'uomo predominano tra le SINE, la famiglia Alu, e tra le LINE, la famiglia L1.

### **DNasi (desossiribonucleasi o deossiribonucleasi)**

Enzima che catalizza l'idrolisi dell'acido desossiribonucleico (DNA).

**Dominante** (Carattere). Carattere ereditario espresso fenotipicamente anche negli individui eterozigoti per il gene che lo controlla.

**Doppia elica** Struttura tridimensionale del DNA a doppio filamento, inizialmente proposta da Watson e Crick (1953), costituita da due catene polinucleotidiche di DNA conformate ad elica destrorsa, avvolte attorno allo stesso asse per formare la doppia elica. Le due catene sono antiparallele, cioè i loro legami 3',5'-fosfodiesterici hanno verso opposto. Le basi azotate di ciascun filamento sono situate all'interno della doppia elica con i piani molecolari paralleli tra loro e perpendicolari all'asse della molecola. Le basi di una catena sono appaiate mediante ponti a idrogeno con quelle dell'altra catena e l'appaiamento è possibile solo per le coppie adenina-timina e guanina-citosina (complementarietà).

**Dose genica** Numero di copie di un particolare gene presenti nel genoma.

### **Duplicazione**

1) Duplicazione cromosomica: aberrazione cromosomica consistente nella duplicazione di un segmento di un cromosoma, che quindi è presente due volte nel genoma aploide.

2) Duplicazione genica: meccanismo attraverso cui compaiono nel genoma nuovi geni prima assenti. La duplicazione di un gene o di un suo segmento si verifica soprattutto attraverso il crossing over ineguale e porta alla comparsa di due copie di un gene, una delle quali è libera di modificarsi per mutazione, trasformandosi nel tempo in un gene diverso da quello originario, codificante un prodotto con nuove proprietà.

**Effetto di posizione** Diverso tipo di espressione di un gene in funzione della posizione occupata dal gene stesso all'interno del cromosoma e dei rapporti con geni limitrofi. Eventi mutazionali quali delezioni, inversioni o traslocazioni possono avvicinare o allontanare sequenze nucleotidiche precedentemente contigue e pertanto modificare anche drasticamente

l'espressione di geni coinvolti in tali riarrangiamenti cromosomici. Per esempio, un gene precedentemente attivo può diventare inattivo se posto vicino all'eterocromatina.

**Elemento trasponibile** Vedi Trasposone

**Elettroforesi** Tecnica mediante la quale molecole dotate di una diversa carica elettrica (come proteine o acidi nucleici) vengono separate mediante un campo elettrico all'interno di una matrice inerte porosa (ad esempio, poliacrilamide o agarosio).

**Emizigosi** Condizione di un gene presente in singola copia in organismi diploidi, come avviene nel caso di aneuploidia o nel caso di geni localizzati sul cromosoma sessuale singolo.

**Enzima di restrizione (o endonucleasi di restrizione)** Enzima di origine batterica, in grado di tagliare il DNA in corrispondenza di specifiche sequenze nucleotidiche di riconoscimento dette siti di restrizione. Le endonucleasi di restrizione vengono largamente impiegate nella tecnologia del DNA ricombinante.

**Eredità citoplasmatica** Modalità di trasmissione ereditaria di tipo materno, propria dei caratteri controllati dal genoma mitocondriale (vedi mitocondrio).

**Eredità mendeliana** Modalità di trasmissione ereditaria dei caratteri controllati da un solo locus, per i quali valgono le leggi di Mendel.

**Esone** In un gene discontinuo, segmento di DNA genomico che, a differenza degli introni, si ritrova nell'mRNA maturo (vedi anche splicing).

**Esonucleasi** Enzima idrolitico che scinde gli acidi nucleici in corrispondenza delle estremità delle molecole.

**Espressione** Manifestazione fenotipica dell'azione di un gene. L'espressione consiste nella trascrizione della sequenza nucleotidica del DNA in quella dell'mRNA corrispondente e nella traduzione di quest'ultima nella sequenza della proteina codificata dal gene stesso.

**Espressività** Intensità della manifestazione fenotipica di un dato gene in un determinato individuo, considerata rispetto al fenotipo normale e misurata in termini qualitativi o quantitativi. L'espressività di un gene dipende da numerosi fattori, tra cui l'età e il sesso del soggetto, gli effetti ambientali e quelli dovuti all'espressione di altri geni.

**Eterocromatina** Regioni del cromosoma, composte prevalentemente di sequenze ripetitive, che sono permanentemente in una condizione molto condensata e facilmente evidenziabili con i coloranti basici anche nel nucleo in interfase. L'eterocromatina può essere: a)*costitutiva* (come quella dei centromeri), che è permanentemente non espressa e si presenta costantemente in un dato organismo, indipendentemente dal tipo di cellula e dal livello di attività trascrizionale di questa; b)*facoltativa*, che può acquisire i caratteri dell'eucromatina a seconda del tipo di cellula, dello stadio di differenziamento di questa, ecc. Nella specie umana, è rappresentata dalla eterocromatina del cromosoma X inattivato nelle femmine e nei maschi che hanno più di un X.

**Eterogeneità genetica** Si parla di eterogeneità genetica quando geni diversi sono responsabili di fenotipi simili. Pertanto anomalie multiple e diverse del DNA possono causare la medesima patologia. Può essere *eterogeneità allelica* quando si tratta di mutazioni diverse a carico dello stesso locus, o *eterogeneità di locus* quando le mutazioni sono a carico di loci diversi.

**Eterozigote** Portatore di due alleli diversi per un dato gene allo stesso locus sui due cromosomi omologhi.

**Eucariote** Cellula o organismo animale o vegetale caratterizzati da una netta delimitazione tra nucleo e citoplasma. Il genoma è suddiviso in cromosomi contenuti nel nucleo e separati dal citoplasma dalla membrana nucleare; i geni possono essere intercalati da sequenze nucleotidiche non codificanti (introni); vi sono tre differenti RNA polimerasi, ciascuna con diverse specificità trascrizionali; il citoplasma contiene diversi organelli delimitati da membrane, alcuni dei quali (mitocondri e cloroplasti) possono avere genomi e sistemi di espressione propri.

**Eucromatina** Componente cromosomica che, a differenza dell'eterocromatina, contiene una quantità maggiore di proteine non istoniche ed è costituita da DNA scarsamente ripetitivo ed attivamente trascritto. L'eucromatina è ben evidenziabile durante la metafase con i coloranti basici mentre al di fuori della mitosi l'eucromatina è dispersa nel nucleo cellulare, divenendo scarsamente colorabile.

**Euploidia** Condizione di una cellula o di un organismo caratterizzati da un numero di cromosomi corrispondente ad un multiplo esatto del corredo aploide ( $2n$ ,  $3n$ ,  $4n$ , ecc.).

**Fase di lettura** La sequenza con cui, all'interno di una molecola di acido nucleico, vengono lette le basi azotate a gruppi di tre, cioè il set di triplette nucleotidiche letto come sequenza di codoni.

**Fase di lettura aperta (Open Reading-Frame)** Fase di lettura non interrotta da codoni di stop. In sigla: ORF.

**Fattori di suscettibilità** Insieme di fattori che concorrono a determinare la propensione a venire colpiti da una malattia dovuta a più cause concomitanti (multifattoriale).

**Fenotipo** Insieme delle caratteristiche morfologiche e funzionali di un organismo determinate dal suo genotipo e modulate dall'ambiente. È possibile che due organismi abbiano il medesimo genotipo, ma presentino differenti fenotipi a causa di variazioni indotte dall'ambiente, oppure che presentino il medesimo fenotipo ma possiedano genotipi differenti, per esempio nel caso di un organismo eterozigote e uno omozigote dominante per uno stesso allele, oppure per penetranza incompleta.

**Fuso mitotico** Struttura formata da microtubuli che si costituisce all'inizio di ogni divisione cellulare e si disgrega alla fine della mitosi. Il fuso mitotico funge da impalcatura e da generatore di forze che presiedono all'orientamento dei cromosomi e alla loro distribuzione nelle due cellule figlie.

**Gamete** Cellula di tipo riproduttivo (uovo o spermatozoo) con corredo cromosomico aploide. Il gamete è il prodotto finale della gametogenesi (spermatogenesi nel maschio, ovogenesi nella femmina). Il gamete maschile (spermatozoo) si unisce con la corrispondente cellula femminile (cellula uovo) nel corso del processo di fecondazione per dare origine ad uno zigote diploide, destinato a svilupparsi in un nuovo individuo.

**Gemelli dizigotici** Gemelli originati dalla fecondazione di due cellule uovo da parte di due differenti spermatozoi. Dal punto di vista genetico tra due gemelli dizigotici esiste la medesima relazione che intercorre tra fratelli o sorelle.

**Gemelli monozigotici (identici, uniovulari)** Gemelli originati da un unico zigote per divisione dell'embrione in uno stadio precoce del suo sviluppo. Questi gemelli, derivando da un singolo uovo fecondato, sono geneticamente identici e perciò dello stesso sesso.

**Gene** Unità fondamentale, fisica e funzionale, dell'eredità che trasmette le informazioni da una generazione alla successiva. Un gene occupa una posizione definita e

fissa (*locus*) di un particolare cromosoma. Da un punto di vista biochimico, un gene è una sequenza polinucleotidica di DNA che trascrive un RNA messaggero e, attraverso di questo, codifica una specifica sequenza di aminoacidi in una catena polipeptidica. Un gene è composto da una regione codificante e da una sequenza regolativa che rende possibile la trascrizione; riguardo alla struttura, esistono geni continui e geni discontinui (vedi). La manifestazione dei caratteri fenotipici codificati dalle informazioni contenute nel materiale genico (genotipo) dipende dalla capacità dei geni di dirigere la sintesi delle proteine. I geni possono subire modificazioni chimiche o strutturali, note come mutazioni, spontaneamente oppure per effetto di agenti chimici, fisici o biologici.

**Gene continuo** Gene in cui tutta la sequenza del DNA codifica la proteina corrispondente e quindi è privo di introni. Sono tali i geni degli organismi procarioti.

**Gene discontinuo** Gene la cui sequenza di DNA è interrotta da uno o più segmenti polinucleotidici che non codificano alcuna proteina (introni). I segmenti di DNA trascritti nell'RNA messaggero utilizzato per la sintesi della proteina codificata sono noti come esoni. La maggior parte dei geni degli eucarioti sono discontinui. Sinonimo: gene interrotto.

**Geni oncosoppressori** Geni coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare, modulando negativamente l'espressione dei proto-oncogeni e i loro segnali proliferativi. La inattivazione (per mutazioni o delezioni) di entrambi gli alleli di un oncosoppressore porta alla rimozione dei segnali negativi per la proliferazione e alla abnorme espressione dei proto-oncogeni con conseguente espressione del fenotipo tumorale.

**Genetica** Termine coniato da William Bateson nel 1906 per indicare lo studio della genesi delle forme degli esseri viventi e della loro riproduzione e successivamente divenuta un ramo delle scienze naturali che studia la struttura e la funzione dei geni, i caratteri da essi controllati, le modalità della loro trasmissione e la loro distribuzione all'interno di gruppi di popolazione.

**Genetica di popolazione** Ramo della genetica che studia i genomi delle popolazioni, la frequenza e la distribuzione dei geni all'interno delle popolazioni, o di gruppi limitati di individui ed i fattori che ne cambiano le frequenze geniche.

### **Genetica inversa (reverse genetics)**

Modalità di analisi genetica che procede dal gene al fenotipo, cioè al contrario della genetica classica.

**Genetica medica** Ramo della genetica e della medicina che si occupa dello studio, della diagnosi e del trattamento delle malattie ereditarie o di malattie almeno in parte causate da anomalie genetiche.

**Genetica molecolare** Analisi genetica condotta a livello molecolare.

**Genetica umana** La genetica dell'uomo. Riguarda sia obiettivi di interesse clinico (genetica medica) che le variazioni fisiologiche del fenotipo. Per superare le ovvie limitazioni che si incontrano nell'analisi sull'uomo rispetto a sistemi sperimentali, la genetica umana ha sviluppato appropriati metodi di inferenza.

**Genoma** Tutte le sequenze di acido nucleico che costituiscono il patrimonio genetico completo di un organismo.

**Genoteche (o librerie)** Collezione di frammenti di DNA di dimensioni varie che rappresentano l'intero genoma di un organismo (genoteche genomiche), le sequenze nucleotidiche relative ad un unico cromosoma (genoteche cromosomiche) o la copia degli RNA messaggeri presenti in un certo tipo cellulare o tessuto (genoteche di cDNA). Tali frammenti di DNA sono inseriti in vettori (plasmidi, plasmidi P, batteriofagi, cromosomi artificiali di lievito o YAC=Yeast Artificial Chromosomes) in quanto ciò rende agevole la propagazione di tali sequenze nucleotidiche e ne semplifica l'analisi.

**Genotipo** Costituzione genica di un individuo, o più specificamente gli alleli presenti ad ogni particolare locus.

**Genotossico** Detto di un agente capace di danneggiare il DNA.

**"Home brew"** Reagenti, o la combinazione di reagenti, fatti in un dato laboratorio o comprati o ottenuti da un'altra organizzazione che sono usati da quel laboratorio per test clinici e non sono venduti ad altri laboratori.

**"Hot spot"** Regione di DNA in cui la frequenza di ricombinazione o di mutazione è molto superiore rispetto a quella media di regioni di grandezza simile.

### **Ibridazione**

1) In genetica molecolare: formazione di doppie eliche stabili tra sequenze nucleotidiche complementari per appaiamento delle basi secondo il modello di Watson e Crick. L'efficienza

dell' ibridazione tra due sequenze di DNA, di RNA oppure tra una di DNA e una di RNA è un indice del grado di omologia tra le stesse.

2) Incrocio di due cellule oppure di due individui o popolazioni geneticamente diversi della stessa specie (ibridazione intraspecifica) o di specie diverse (ibridazione interspecifica).

### **Ibridazione *in situ***

Tecnica di ibridazione utilizzata per localizzare sequenze di acidi nucleici su cromosomi, nuclei e citoplasma. Consiste nell'ibridare sul preparato citologico specifiche sonde marcate. Le sonde possono essere cromosoma-specifiche in grado di evidenziare l'intero cromosoma (painting cromosomico) o specifiche regioni di cromosoma (per esempio sequenze clonate da geni o sequenze ripetute in tandem come le sequenze alfoidi) o sequenze per identificare la localizzazione di specifici RNA nel citoplasma. Le sonde possono essere marcate con isotopi radioattivi o più frequentemente con fluorocromi ed in quest'ultimo caso si parla di ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH). La FISH rappresenta oggi la tecnica più diretta per il mappaggio genico, in quanto può facilmente definire la posizione sui cromosomi di qualunque gene clonato. Tra le altre principali applicazioni ricordiamo la caratterizzazione di duplicazioni, microdelezioni, traslocazioni, e la individuazione di anomalie cromosomiche numeriche sui nuclei in interfase.

### **Idiogramma**

Rappresentazione schematica del cariotipo di un individuo in cui le coppie di cromosomi omologhi vengono disposte in ordine di grandezza decrescente.

### **Incidenza**

In epidemiologia corrisponde al quoziente (o tasso) ricavato ponendo al numeratore il numero di individui che, in una popolazione ed in un periodo di tempo dati, sviluppano una certa malattia e al denominatore il numero totale di individui della popolazione a rischio di contrarre la malattia. Diversamente dalla prevalenza (vedi), l'incidenza fornisce quindi il tasso dei nuovi casi, e quindi l'andamento, di una malattia in una popolazione.

### **Ingegneria genetica**

Complesso delle tecniche e delle conoscenze volte alla manipolazione dei geni di organismi procarioti ed eucarioti e all'introduzione di questi in altri organismi in cui normalmente sono assenti, in condizioni in cui siano in grado di svolgere le loro funzioni biologiche. Tra le varie applicazioni vi sono l'allestimento di vaccini vivi e attenuati, la produzione di anticorpi monoclonali, l'inserzione nel genoma di procarioti di geni che codificano per la sintesi di sostanze quali antibiotici, ormoni, ecc. (vedi anche DNA ricombinante, ingegneria genetica).

**Inserto** In ingegneria genetica, il segmento di DNA estraneo inserito in un vettore.

**Integrazione** Inserzione di DNA virale o di altro DNA in un genoma ospite, sotto forma di una regione covalentemente unita su entrambi i lati alle sequenze nucleotidiche dell'ospite.

**Interfase** Periodo del ciclo cellulare che intercorre fra due successive divisioni mitotiche. Schematicamente l'interfase è suddivisa in tre periodi successivi chiamati G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>: durante la fase S avviene la sintesi del DNA che verrà successivamente ripartito tra le due cellule figlie nel processo di mitosi (vedi Ciclo cellulare).

**Introne** Segmento non codificante di un gene, inizialmente trascritto in RNA e successivamente rimosso dal trascritto primario durante lo *splicing*; pertanto l'introne non si trova nell'mRNA maturo.

**Inversione** Aberrazione strutturale cromosomica (riarrangiamento di struttura) che origina da due rotture sul cromosoma, successiva rotazione di 180° del tratto compreso tra le rotture e sua reintegrazione nel cromosoma stesso. Le inversioni possono essere *pericentromeriche* (comprendono la regione del centromero e le rotture si verificano sul braccio corto e sul braccio lungo del cromosoma) e *paracentromeriche* (non comprendono la regione del centromero e le due rotture si verificano sullo stesso braccio cromosomico).

**Istone** Tipo di proteina basica che forma l'unità attorno alla quale il DNA si avvolge dando luogo al nucleosoma, unità costitutiva dei cromosomi eucariotici.

**kb** Abbreviazione per kilobase: unità di misura corrispondente a 1000 coppie di basi azotate di DNA o mille basi di RNA.

**Leggi di Mendel** Vedi Eredità.

**Linea germinale** La serie delle cellule germinali, considerate dai precursori germinali primordiali fino ai gameti maturi, spermatozoi e cellule uovo, che posseggono un singolo corredo di cromosomi (aploide).

**Linkage** Tendenza di due geni ad essere ereditati insieme come risultato della loro collocazione sullo stesso cromosoma. Il linkage si misura come percentuale di ricombinazione fra due loci.

**Linkage disequilibrium (associazione gametica preferenziale)**

Fenomeno per cui, a livello di popolazione, specifiche combinazioni di alleli a due o più loci concatenati tendono a trovarsi insieme sullo stesso cromosoma più frequentemente di quanto

ci si attenda per caso. E' un evento che riguarda loci molto strettamente concatenati tra i quali, quindi, sono molto rare le ricombinazioni.

**Locus genico (plur. loci)** Posizione occupata in ognuno dei due cromosomi omologhi da un determinato gene o da uno dei suoi alleli. Cromosomi omologhi contengono serie identiche di *loci* genici disposti nel medesimo ordine. Quando a un dato locus esistono più forme alternative (alleli) e queste hanno nella popolazione una frequenza apprezzabile (per convenzione almeno 1%), quel locus è definito polimorfico.

**Malattia Mendeliana o da singolo gene** Presenza di mutazione(i) su un allele, sia singolo (malattia dominante nei maschi o femmine, malattie legate all' X nei maschi) che doppio (malattie recessive) responsabile della comparsa di una data malattia. L'ereditarietà di queste malattie segue i rapporti numerici descritti da G. Mendel.

**Mappa di restrizione** Mappa di una sequenza di DNA indicante la localizzazione dei siti di restrizione. Dal momento che tali enzimi sono molto specifici nelle loro caratteristiche e modalità di taglio, questo tipo di mappa può essere predetta sulla base della sequenza di un frammento noto di DNA.

**Mappa fisica** Schema rappresentante la posizione reciproca dei geni o dei marcatori genetici in un cromosoma, ottenuta mediante la misurazione diretta della distanza in paia di basi (bp) di DNA genomico. La misurazione può essere basata su analisi di citogenetica (distanze fra bande cromosomiche) o su analisi molecolari (mappe di restrizione).

**Mappa genetica** Mappa delle posizioni relative dei geni o dei marcatori genetici lungo un cromosoma. La distanza tra i geni viene misurata attraverso il linkage sulla base delle frequenze di ricombinazione genica. Le mappe genetiche sono di solito elaborazioni grafiche che evidenziano le posizioni reciproche dei vari geni su un cromosoma con le corrispondenti distanze, espresse in centimorgan (vedi).

**Marcatore** Elemento di identificazione o di riferimento (gene, enzima, determinante antigenico, ecc.). In particolare, allele di cui è in osservazione la modalità di trasmissione in un incrocio o locus polimorfico impiegato per analisi di linkage.

**Meiosi** Tipo di divisione cellulare caratteristica degli organismi a riproduzione sessuata. È il processo attraverso cui si realizzano la ricombinazione genetica e la divisione riduzionale di una cellula germinale immatura diploide ( $2n$ ) a formare quattro gameti immaturi aploidi ( $n$ ).

Avviene pertanto solo a livello delle cellule germinali e consiste di due particolari tipi di divisioni cellulari, meiosi I e meiosi II.

**Metacentrico (cromosoma)** Detto di un cromosoma con centromero in posizione mediana.

**Metafase** Stadio intermedio del ciclo mitotico e meiotico durante il quale la membrana nucleare si dissolve, i cromosomi si allineano sul piano equatoriale della cellula, con i centromeri uniti alle fibre del fuso e i cromatidi pronti a migrare ai due poli fusali.

**Metilazione del DNA** Legame covalente di gruppi metilici alle basi azotate del DNA. Negli eucarioti consiste principalmente nella metilazione delle citosine, ed è associata a ridotti livelli di trascrizione dei geni. Nei procarioti, oltre alle citosine vi può essere metilazione a livello di alcune adenine, e protegge il DNA di un batterio dall'azione delle sue stesse endonucleasi di restrizione.

**Minisatellite** Vedi DNA fingerprinting.

**Mitocondri** Organelli, delimitati da una doppia membrana fosfolipidica, presenti nel citoplasma di tutte le cellule eucariotiche e deputati ad attuare le trasformazioni energetiche della cellula. I mitocondri sono strutture semiautonome in quanto contengono un proprio genoma (un doppio filamento di forma circolare, non legato a proteine istoniche), dei ribosomi e sono in grado di effettuare sintesi proteica: il DNA mitocondriale codifica l'rRNA, il tRNA dei mitocondri e componenti della membrana mitocondriale. I mitocondri sono trasmessi esclusivamente dalla madre a tutti i propri figli, senza ricombinazione. Il polimorfismo del DNA mitocondriale è particolarmente utile nella genetica delle popolazioni.

**Mitosi** Processo di divisione nucleare di tutte le cellule eucariotiche, mediante il quale il numero dei cromosomi caratteristico della specie è mantenuto costante durante le successive divisioni delle cellule dallo zigote allo stadio adulto. Le fasi principali della mitosi sono: profase, metafase, anafase e telofase.

**Monosomia** Tipo di aneuploidia consistente nella mancanza, in un organismo diploide, di un elemento in una coppia di cromosomi omologhi ( $2n - 1$ ) e, quindi, nella presenza del cromosoma omologo spaio.

**Monozigote** Vedi Gemello monozygotico.

**Mosaico** Organismo costituito da due o più popolazioni di cellule geneticamente differenti.

**mRNA (RNA messaggero)** Prodotto di trascrizione di un gene che trasporta dal DNA al citoplasma l'informazione che codifica la sequenza di una particolare catena polipeptidica. Ogni differente catena polipeptidica che la cellula sintetizza richiede la presenza di un tipo corrispondente di mRNA. Negli eucarioti, l'mRNA in genere differisce dal trascritto iniziale, a causa della eliminazione di determinate sequenze non codificanti (splicing). L' mRNA maturo, a livello ribosomiale, serve quindi da matrice per il processo di traduzione, in cui viene sintetizzata la catena polipeptidica.

**Mutageno** Agente chimico o fisico che aumenta il tasso di mutazione causando modificazioni permanenti nel DNA.

**Mutazione** Ogni cambiamento permanente nella sequenza nucleotidica del DNA, capace o meno di esercitare una influenza sul fenotipo. Le mutazioni possono essere classificate in base all'*origine*: mutazioni spontanee (insorgono in assenza di agenti mutageni) o indotte (dovute ad agenti chimici, fisici o biologici); alla *sede*: mutazioni germinali (colpiscono i gameti e possono essere trasmesse alla prole) o somatiche (colpiscono le cellule somatiche e non vengono trasmesse alla prole); all' *effetto funzionale* sul fenotipo: mutazioni letali (l'organismo che ne è colpito o muore prima di aver raggiunto l'età riproduttiva o raggiuntala, non si riproduce), subletale o deleteria, neutra (non si conosce un effetto di danno o di vantaggio genetico), vantaggiosa. Negli organismi diploidi possono esservi mutazioni *dominanti* o *recessive*, a seconda se l'effetto della mutazione è la manifestazione di un fenotipo dominante o recessivo. In base alla *topologia* ed *estensione* le mutazioni possono essere: mutazioni geniche (es. mutazioni puntiformi, inserzioni e delezioni intrageniche), cromosomiche (es. delezioni, inversioni, traslocazioni) e genomiche (es. monosomie, trisomie).

**Mutazione cromosomica** Vedi Aberrazione cromosomica; mutazione.

**Mutazione di senso (missense)** Sostituzione di una singola base del DNA che causa la comparsa di una tripletta che codifica un aminoacido diverso da quello codificato dalla tripletta originale.

**Mutazione di sfasamento del registro di lettura (frameshift)** Mutazione costituita dalla delezione o inserzione di un numero di coppie di basi (bp) che non è un multiplo di 3, che altera quindi il registro con cui vengono letti i codoni di un gene. Le regioni codificanti al 3' di

una tale mutazione verranno lette come codificanti aminoacidi diversi e spesso presenteranno codoni stop.

**Mutazione germinale** Mutazione presente negli spermatozoi o nella cellula uovo (o nei loro precursori) di un individuo e che può essere trasmessa alla prole. Quando una mutazione nella linea germinale si verifica per la prima volta, nella famiglia interessata non ci saranno portatori né storia clinica precedente. Una volta trasmesse alla discendenza, le mutazioni germinali saranno presenti in tutte le cellule della prole, incluse le cellule della linea germinale, e possono essere trasmesse alle generazioni successive, a meno che non interferiscano con la riproduzione.

**Mutazione non senso** Mutazione nella sequenza nucleotidica in cui il cambio di uno o più nucleotidi, una inserzione o una delezione, provocano la terminazione prematura della traduzione di un mRNA in seguito alla comparsa, nella corretta fase di lettura, di uno o più codoni di terminazione (UAA, UAG, UGA).

**Mutazione puntiforme** Mutazione consistente in un'alterazione, quale una sostituzione, una delezione o un'inserzione, di una singola coppia di basi del DNA.

**Mutazione somatica** Mutazione a livello del DNA di una qualunque cellula del corpo (cellule somatiche), eccezion fatta, quindi, per le cellule della linea germinale; pertanto essa non viene trasmessa alla discendenza. Nel caso in cui l'elemento colpito sia una cellula ancora in grado di dividersi, la mutazione viene trasmessa a tutte le cellule che derivano da essa per mitosi. In questo caso l'organismo diviene un mosaico, cioè sarà costituito da una popolazione di cellule normali ed una di cellule mutate.

**Mutazione spontanea** Mutazione che compare spontaneamente (cioè in assenza di mutageni) in un organismo, comunemente dovuta a errori nei processi di replicazione, ricombinazione o riparo del DNA.

**Non-disgiunzione** Anomalia nella segregazione dei cromosomi durante la divisione cellulare. I cromosomi restano uniti e, all'anafase, migrano allo stesso polo cosicché entrambi passano alla stessa cellula figlia, mentre l'altra non ne riceve alcuno. La mancata separazione è stata osservata durante la divisione mitotica ma molto più frequentemente durante la meiosi. La non-disgiunzione nelle cellule germinali, dopo la fecondazione con un gamete normale risulterà in uno zigote portatore di una trisomia o di una monosomia. La non-disgiunzione nelle cellule somatiche in una fase precoce dello sviluppo, può causare mosaici con cellule normali, trisomiche o monosomiche.

**Northern blot** Tecnica di biologia molecolare mediante la quale, molecole di RNA separate elettroforeticamente, sono trasferite da un gel di agarosio ad una membrana (per es. di nitrocellulosa o di nylon). L'RNA è successivamente ibridato con una specifica sonda marcata che evidenzia l'RNA di interesse. La tecnica permette l'analisi dell'RNA, ad esempio stabilendo l'avvenuta trascrizione (presenza o assenza, lunghezza e quantità dell'RNA).

**Nucleoside** Base purinica (adenina, guanina) o pirimidinica (citosina, timina o uracile nell'RNA) legata covalentemente ad una molecola di pentosio (desossiribosio nel DNA, ribosio nell'RNA).

**Nucleosoma** Unità strutturale della cromatina eucariotica. Consiste di un nucleo centrale di otto molecole di istoni attorno al quale si avvolge un segmento di DNA (di circa 148 coppie di basi). I nucleosomi sono le unità ripetitive che compongono il filamento cromatinico.

**Nucleotide** Unità di base degli acidi nucleici (DNA e RNA) costituita da una base purinica (adenina e guanina) o pirimidinica (citosina, timina o uracile nell'RNA), un pentosio (desossiribosio nel DNA, ribosio nell'RNA) ed un gruppo fosfato.

**Odd** Rapporto tra una probabilità (di essere malato o di essere portatore di un fattore di rischio) e il suo complemento a 1.

**"Odd Ratio"** Misura epidemiologica, tipica dello studio caso-controllo, che definisce il grado di associazione fra un fattore di rischio ed una specifica malattia. Viene calcolato mediante la tabella di contingenza (vedi) come rapporto tra gli odds di prevalenza del fattore di rischio tra i casi (malati o morti) con gli stessi odds osservati tra i controlli. E' utilizzato come stima del rischio relativo.

**Oligonucleotide** Sequenze generalmente di DNA a singolo filamento, di lunghezza limitata a qualche decina di nucleotidi e sintetizzate mediante apparecchiature computerizzate. Gli oligonucleotidi sono molto utilizzati come sonde sia in esperimenti di genetica molecolare che in diagnostica.

**Omologo** Vedi Cromosomi omologhi.

**Omozigote** Individuo che porta due alleli identici di un determinato gene allo stesso locus sui due cromosomi omologhi.

**Oncosoppressore** Vedi Gene oncosoppressore.

**ORF (open reading frame)** Vedi Fase di lettura aperta.

**Origine di replicazione** Sito di una molecola di DNA al livello del quale ha inizio la replicazione della stessa.

**PCR (polymerase chain reaction, reazione a catena della polimerasi)**

Tecnica di biologia molecolare utilizzata per amplificare in breve tempo tratti specifici di DNA, purché se ne conosca, almeno in parte, la sequenza. Si avvale di cicli di denaturazione, riassociazione con l'innescò e di estensione per amplificare di oltre  $10^6$  volte il numero di copie della sequenza di DNA bersaglio. Questa tecnica ha un grande numero di applicazioni in campi diversi, dalla ricerca alla diagnostica alla medicina legale.

**Penetranza** Il termine si riferisce all'espressione o non-espressione di un fenotipo. La penetranza è completa (100%) quando il fenotipo si esprime ogni volta che è presente il corrispondente genotipo; la penetranza è incompleta o ridotta quando il fenotipo può non esprimersi negli individui portatori del gene.

**Peptide** Composto formato da aminoacidi legati tra loro per la condensazione di un gruppo aminico ( $-NH_2$ ) di un aminoacido con il gruppo carbossilico ( $-COOH$ ) del successivo, attraverso un legame detto legame peptidico ( $-NH-CO-$ ).

**Plasmide** Elemento genetico extracromosomico, presente per lo più in cellule batteriche, in grado di replicare indipendentemente dal DNA dell'ospite. La maggior parte dei plasmidi è costituita da molecole circolari di DNA a doppia elica e spesso contengono geni per la resistenza agli antibiotici. Un plasmide non è fisicamente concatenato all'ai cromosomi, e può così essere perso dalle cellule ospiti. Numerosi plasmidi, naturali o parzialmente sintetici, trovano largo impiego in ingegneria genetica come vettori di clonazione.

**Polimorfismo genetico** Carattere che esiste nella popolazione con più di un fenotipo. Per definizione, la frequenza dell'allele raro deve essere almeno dell'1-2%. Quando la frequenza è inferiore a tale valore arbitrario, si preferisce parlare di varianti genetiche rare, che in molti loci sono presenti in aggiunta ai polimorfismi.

**Poliptide** Catena di aminoacidi ( $> 10-20$ ) uniti da legame peptidico ( $-NH-CO-$ ). Catene con un numero di peptidi minore di 10 sono comunemente dette oligopeptidi.

**Poliploidia** Condizione caratterizzata dalla presenza, nella cellula, di un numero di cromosomi superiore al valore diploide, corrispondente a un multiplo esatto del corredo aploide (es.  $3n$  = corredo triploide,  $4n$  = corredo tetraploide, ecc.).

**Portatore** Individuo eterozigote per un gene recessivo e che perciò può trasmettere il gene alla progenie senza mostrare manifestazioni a livello fenotipico.

**Predisposizione genetica** Aumentata suscettibilità, dipendente dal genotipo ad uno o più loci, a sviluppare una specifica malattia; perché questa si manifesti è spesso necessario anche il concorso di fattori ambientali.

**Prevalenza** In epidemiologia corrisponde al quoziente (o tasso) ricavato ponendo al numeratore il numero di persone che in una popolazione sono affette da una certa malattia in un determinato intervallo o punto temporale, e al denominatore il numero totale di persone della popolazione considerata. La prevalenza fornisce tutti i casi di malattia, vecchi e nuovi, a differenza dell'incidenza (vedi), ed è un valido indicatore sanitario per le patologie croniche di lungo decorso.

**Probando (proposito, caso indice)** Persona, con specifico fenotipo, attraverso la quale viene identificata una famiglia con determinate caratteristiche genetiche.

**Probe** Vedi Sonda.

**Procarioti** Organismi (esempio batteri), privi di membrana nucleare, che possiedono una singola molecola circolare di DNA non legata a proteine basiche come gli istoni, e una parete rigida contenente particolari strutture glicoproteiche, dette peptidoglicani. I procarioti non presentano organelli citoplasmatici (quale per es. mitocondri).

**Prodotto genico** RNA messaggero o proteina codificata da uno specifico gene.

**Profase** Stadio precoce della divisione nucleare, mitotica e meiotica, durante il quale i cromosomi si condensano e diventano visibili all'interno dell'involucro nucleare. La profase meiotica, durante la quale avviene l'appaiamento dei cromosomi omologhi, è complessa e viene a sua volta suddivisa in cinque fasi: leptotene, zigotene, pachitene, diplotene, diacinesi.

### **Progetto Genoma Umano (Human Genome Project)**

Progetto di collaborazione scientifica a livello internazionale (Unione Europea, USA, Giappone) volto alla mappatura e sequenziamento dei tre miliardi di nucleotidi che

compongono il genoma umano. Il Progetto è formalmente iniziato nel 1990 ed il suo completamento è previsto per il 2005. Obiettivi del Progetto sono, attraverso l'incremento delle conoscenze biologiche di base, l'approntamento di un spettro estremamente ampio di strumenti diagnostici sensibili, specifici e tempestivi per le malattie e le predisposizioni patologiche di origine genetica ed eventualmente di nuove strategie terapeutiche (terapia genica).

Il Progetto Genoma è ulteriormente integrato dal *Progetto Variazione del Genoma Umano* (Human Genome Diversity Project) che studia la variazione genetica nella specie umana, dalla genetica delle popolazioni alle differenze nelle suscettibilità a determinate patologie.

Il Progetto Genoma ha suscitato una imponente mobilitazione di energie scientifiche; vi sono tuttavia preoccupazioni su certe potenziali conseguenze negative a livello sociale e/o legislativo dell'uso dei risultati, riguardanti, ad es., possibili discriminazioni, garanzie di riservatezza, uso delle informazioni di possibile interesse commerciale, ecc. A tale proposito sono state adottate nel 1996 le raccomandazioni della Human Genome Organization (HUGO), un'associazione internazionale, senza fini di lucro, di ricercatori che svolgono ricerche sul genoma umano. Le raccomandazioni riguardano soprattutto la competenza scientifica, la comunicazione dei risultati, la possibilità di completa consultazione, il consenso informato, la riservatezza dell'informazione genetica, la collaborazione e il conflitto di interessi.

**Promotori** Sequenze nucleotidiche conservate, presenti a monte (5') di ogni gene espresso che interagiscono con la RNA polimerasi e sono la sede del sito di inizio della sintesi dell'RNA messaggero. I promotori spesso contengono le sequenze denominate TATA box a circa 30 coppie di basi a monte del sito di inizio, determinando l'esatto sito di inizio della trascrizione. Un'altra sequenza importante è CAAT (a una distanza di circa 80 coppie di basi) la quale è un sito di riconoscimento per la RNA polimerasi.

**Proteina** Polimero organico di elevato peso molecolare e struttura molto complessa, formato dall'unione con legame peptidico di alfa-aminoacidi. Alcune proteine sono costituite da più di una catena polipeptidica.

**Proto-oncogeni** Geni normali presenti nelle cellule eucariotiche, altamente conservati durante l'evoluzione e coinvolti nella regolazione della proliferazione e differenziamento cellulare. Se alterati (amplificati, mutati, sovraespressi, riarrangiati ecc.) danno origine ad *oncogeni attivati* capaci di causare trasformazione neoplastica.

**Pseudogeni** Sequenze di DNA, con struttura analoga a geni espressi, che hanno acquisito una o più mutazioni durante l'evoluzione divenendo incapaci di produrre una proteina. Un tipo di pseudogeni, i pseudogeni processati, sono privi di introni e presentano una

coda di poliadenina al 3', suggerendo che possano derivare da una trascrizione inversa di molecole di RNA messaggero.

**Reazione a catena della polimerasi** Vedi PCR.

**Recessivo** (Carattere) Carattere ereditario espresso solo negli individui omozigoti per il gene che lo controlla.

**Replicazione semi-conservativa** Meccanismo di replicazione del DNA a doppia elica, in cui ciascuna delle due doppie eliche neoformate contengono un filamento proveniente dalla doppia elica genitrice e un filamento neosintetizzato, complementare al primo.

**Retrotrascrizione** Processo di trascrizione dell'RNA in DNA complementare, ad opera dell'enzima trascrittasi inversa.

**Retrotrasposone** Tipo di trasposone che si integra nel genoma con un meccanismo che implica un processo di trascrizione inversa.

**Retrovirus** Virus ad RNA, il cui genoma e' costituito da RNA a singolo filamento comprendente le seguenti regioni: al 5' una sequenza regolativa (LTR); i geni (GAG) per le proteine strutturali; il gene (POL) per la trascrittasi inversa; i geni (ENV) per le glicoproteine di superficie; un'altra sequenza regolativa al 3' (LTR). Non appena le particelle virali penetrano nella cellula, la trascrittasi inversa produce un DNA il quale e' copia dell'RNA del genoma virale. Tale DNA, una volta integrato nel genoma della cellula (provirus), la induce a produrre RNA e proteine necessari per l'assemblaggio di nuove particelle virali.

**Riarrangiamento cromosomico** Aberrazione cromosomica che origina da una o piu' rotture trasversali del cromosoma cui segue una nuova giustapposizione di parti cromosomiche. Puo' coinvolgere uno stesso cromosoma (riarrangiamento intracromosomico: ad es., delezioni, inversioni, vedi) oppure cromosomi diversi (riarrangiamento intercromosomico: traslocazioni, vedi).

**Ribosomi** Particelle cellulari submicroscopiche costituite da RNA ribosomiale (rRNA) e proteine. I ribosomi dirigono le fasi del processo di sintesi delle proteine coordinando l'interazione tra RNA messaggero, RNA transfer ed altri cofattori proteici e non. E' a livello dei ribosomi che l'informazione contenuta nella sequenza nucleotidica viene tradotta in una specifica sequenza aminoacidica.

**Ricombinante** E' detto di un organismo, cellula, locus genico o DNA che sia andato incontro a ricombinazione.

**Ricombinazione** Processo che porta alla comparsa, nella progenie, di combinazioni di geni che non erano presenti in nessuno dei due genitori. La ricombinazione genica si verifica attraverso il processo del crossing-over e l'assortimento indipendente dei geni presenti sui cromosomi durante la gametogenesi e la successiva riunione casuale dei differenti tipi di gameti così formati, che si realizza con la fecondazione. La ricombinazione può essere intragenica; genica, quando un frammento di cromosoma viene sostituito con un frammento equivalente di un cromosoma omologo; mitotica, quando deriva da crossing-over somatico.

**Ricombinazione non omologa** Tipo di ricombinazione genetica in cui gli scambi di materiale genetico non avvengono tra sequenze omologhe; ne sono esempi la trasposizione e l'integrazione del DNA di un profago.

**Ricombinazione omologa** Tipo di ricombinazione genetica in cui lo scambio si verifica tra sequenze di DNA omologhe.

**Ricombinazione sito-specifica** Ricombinazione che avviene tra due sequenze specifiche non necessariamente omologhe, sotto il controllo di uno specifico meccanismo di ricombinazione.

**Riparazione del DNA (DNA repair)** Correzione attraverso vari meccanismi dei danni alla doppia elica del DNA provocati da agenti chimici o fisici, o di errori della replicazione. La riparazione dell'integrità strutturale del DNA può ripristinare l'informazione genetica corretta, oppure determinare una mutazione. Sinonimo: Riparo.

**Rischio attribuibile** In epidemiologia ha due significati: a) rischio attribuibile negli esposti è la differenza fra l'incidenza della patologia nei soggetti esposti al fattore di rischio e l'incidenza della stessa nei non esposti  $(A/A+B)-(C/C+D)$ ; b) rischio attribuibile di popolazione è la frazione dell'incidenza totale della patologia in una popolazione che è dovuta al (o associata con il) fattore di rischio.

**Rischio relativo** In epidemiologia, misura dell'associazione tra fattore di rischio e malattia: rapporto tra l'incidenza della malattia nei soggetti esposti e nei non esposti  $(A/A+B)/(C/C+D)$ . In particolare, per i test genetici misura il rischio di malattia in soggetti con test positivo o con specifico marcatore (Vedi odd ratio, tabella di contingenza).

**RNA (acido ribonucleico)** Acido nucleico a singolo filamento (puo' formare doppi filamenti) la cui composizione biochimica è simile al DNA ma con le seguenti differenze riguardanti il pentosio (l'RNA possiede ribosio anzichè desossiribosio) e una delle basi azotate (uracile invece di timina). In base alla funzione si distinguono vari tipi di RNA: RNA eterogeneo nucleare (hnRNA), RNA messaggero (mRNA), RNA ribosomiale (rRNA), RNA nucleare piccolo (snRNA) e RNA transfer (tRNA). Queste forme di RNA sono implicate nel processo di trascrizione dell'informazione contenuta nel DNA e nel trasporto di questa nel citoplasma (mRNA), ove dirigono la biosintesi delle proteine codificate (mRNA, rRNA e tRNA). L'RNA, inoltre, costituisce il genoma di alcuni virus detti virus a RNA a singola elica (es. Picornavirus, retrovirus) o virus a RNA a doppia elica (es. reovirus).

**RNA eterogeneo nucleare (hnRNA)** Lunga molecola di RNA a singolo filamento che costituisce il prodotto primario della trascrizione (trascritti primari) nel nucleo cellulare degli Eucarioti. Il trascritto primario prima di passare nel citoplasma va incontro a un processo di maturazione comprendente diverse modificazioni chimiche e strutturali: aggiunta all'estremità 5' di un cap o cappuccio, rimozione degli introni (splicing, vedi) e aggiunta all'estremità 3' di una coda di poliadenina (AAAA...). Il trascritto primario viene così trasformato in mRNA maturo.

**RNA messaggero** Vedi mRNA.

**RNA nucleare piccolo (snRNA)** Tipo di RNA di piccole dimensioni presente nel nucleo delle cellule eucariotiche. Le molecole di snRNA si trovano associate a specifiche proteine nucleari a formare le ribonucleoproteine nucleari (snRNP) che rivestono un ruolo importante nelle funzioni nucleari (per esempio una di esse, U1 agisce come sequenza guida esterna per facilitare la corretta rimozione delle sequenze introniche dai precursori dell'RNA messaggero).

**RNA polimerasi** Enzimi che catalizzano la biosintesi di molecole di RNA a partire dai singoli nucleotidi trifosfati, con liberazione di pirofosfato inorganico. La biosintesi dell'RNA può avvenire su uno stampo di DNA (RNA-polimerasi DNA-dipendente) o di RNA (RNA-polimerasi RNA-dipendente).

**rRNA (RNA ribosomiale)** Acido ribonucleico a singolo filamento presente nei ribosomi, nei quali ha funzioni sia strutturali che catalitiche. È il tipo di RNA più abbondante nella cellula e ricopre un ruolo basilare, per quanto non ancora del tutto chiarito, nella biosintesi proteica.

**Screening genetico** Intervento diagnostico a livello di popolazione per l'identificazione di soggetti ad elevato rischio di presentare una particolare malattia o di trasmetterla alla discendenza.

**Sensibilità analitica di un test** Percentuale di campioni che sono positivi al test sul totale dei campioni che effettivamente contengono l'analita che il test vuole ricercare; permette quindi di valutare i risultati "falsi negativi".

**Sensibilità clinica di un test** Probabilità che il test sia positivo in individui con la patologia in esame.

**Sensibilità di un test** E' la misura di accuratezza data dalla proporzione di persone realmente malate che vengono riconosciute tali dal test. Viene calcolata, in una tavola di contingenza 2x2 (vedi), dalla frazione di veri positivi riconosciuti come tali diviso il totale degli individui realmente malati ( $a/a+c$ ) (vedi anche specificità di un test e valore predittivo).

**Sequenza codificante** Vedi Esone

**Sequenziamento del DNA (DNA sequencing)** Determinazione della sequenza con cui i vari nucleotidi si susseguono in una molecola di DNA.

**Sonda (probe)** In genetica molecolare, è una sequenza di DNA o RNA marcata con un isotopo radioattivo o in maniera non radioattiva (es. digossigenina), utilizzata per riconoscere la presenza di una sequenza complementare (in una miscela di numerosi frammenti di DNA o RNA) tramite ibridazione molecolare.

**Southern blot** Tecnica di biologia molecolare mediante la quale frammenti di DNA, generalmente ottenuti mediante digestione con enzimi di restrizione, vengono separati elettroforeticamente su gel di agarosio e trasferiti ad una membrana (di nylon o nitrocellulosa). Il DNA trasferito su membrana è successivamente ibridato con una sonda marcata (radioattivamente o non) che evidenzia il DNA di interesse.

**Specificità analitica di un test** Percentuale di campioni che sono negativi al test sul totale dei campioni che effettivamente non contengono l'analita che il test vuole ricercare; permette quindi di valutare i risultati "falsi positivi".

**Specificità clinica di un test** Probabilità che il test sia negativo in individui senza la patologia in esame.

**Specificità di un test** E' la misura di accuratezza data dalla proporzione di individui realmente sani che vengono riconosciuti tali dal test. Viene calcolata, in una tavola di contingenza 2x2 (vedi), dalla frazione di veri negativi riconosciuti come tali diviso il totale degli individui realmente sani ( $d/b+d$ ) (vedi anche sensibilità di un test e valore predittivo).

**Splicing dell'RNA** Una delle fasi della maturazione delle molecole di RNA eterogeneo nucleare in RNA messaggero negli eucarioti. Consiste nel taglio e allontanamento degli introni (vedi) e saldatura dei tratti di RNA corrispondenti agli esoni (vedi). Le reazioni attraverso cui si realizza questo processo sono caratterizzate a numerosi enzimi e prevedono la partecipazione di piccole particelle ribonucleoproteiche contenenti RNA nucleare piccolo (vedi).

**Tasso di mutazione** Numero di eventi mutazionali di un gene per unità di tempo (per esempio, per una generazione cellulare).

Il tasso di mutazione in una cellula germinale e' definito convenzionalmente dal rapporto:  $m = \frac{\text{numero di gameti in cui sia avvenuta la mutazione}}{\text{numero totale di gameti che danno origine alla generazione successiva}}$ .

**Tavola (o tabella) di contingenza o Tavola 2x2** E' una tabella a due entrate e viene utilizzata in epidemiologia per effettuare misure di associazione. Per i test genetici, con la tabella di contingenza è possibile misurare l'associazione tra un marcatore o il risultato di un test e la presenza/assenza di una malattia. In particolare:

- sensibilità e specificità (vedi) di un test,
- valore predittivo positivo e negativo (vedi) di un test
- rischio attribuibile e rischio relativo (vedi) associati alla presenza di un marcatore.

|                       |                   | <u>Malattia</u> |         |
|-----------------------|-------------------|-----------------|---------|
|                       |                   | Presente        | Assente |
| <u>Test/marcatore</u> | Positivo/Presente | a               | b       |
|                       | Negativo/Assente  | c               | d       |

**Tecnologia del DNA ricombinante**      Complesso delle tecniche sperimentali e delle loro applicazioni basate sugli esperimenti di DNA ricombinante (vedi DNA ricombinante, ingegneria genetica).

**Telocentrico**      Detto di un cromosoma con un centromero in posizione terminale.

**Telofase**      Stadio finale della divisione nucleare, mitotica e meiotica. Durante la telofase i cromosomi, raggiunti i poli del fuso, subiscono un processo di despiralizzazione e intorno alla cromatina di ognuno dei due nuclei figli si organizza un nuovo involucro nucleare. Contemporaneamente ha luogo il processo di segmentazione e separazione del citoplasma che dà origine alle due cellule figlie (citodieresi).

**Telomero**      Porzione terminale di un cromosoma eucariotico.

**Terapia genica somatica**      Correzione di un difetto genetico in cellule somatiche mediante il trasferimento di DNA codificante il prodotto genico funzionale nelle cellule deficitarie dell'organismo. Il DNA esogeno non entra quindi a far parte della linea germinale e non viene trasmesso alle generazioni successive. Lo scopo della terapia genica somatica è quello di sostituire solo il gene difettivo, evitando le complicazioni derivanti dal rigetto dei trapianti. Le possibilità di un uso pratico di tale terapia sono, al momento, assai limitate.

**Teratogeno**      Agente chimico, fisico o biologico che interferisce con il normale sviluppo embrionale, causando malformazioni congenite o aumentandone l'incidenza.

**Test cieco**      Uso di un campione i cui contenuti sono sconosciuti ai tecnici del laboratorio che effettuano il test, per verificare la capacità del laboratorio stesso nell'eseguire un test correttamente. Normalmente il personale tecnico è a conoscenza del fatto che il campione viene usato per i controlli di qualità, ma non conosce (cioè è cieco) il suo contenuto. Nei controlli di qualità più rigorosi, il campione arriva al laboratorio come un campione di routine.

**Test di predisposizione** Test per identificare una condizione di particolare suscettibilità dell'organismo a sviluppare un carattere o una data malattia. Non tutte le persone con un risultato positivo manifesteranno però quel carattere o quella data malattia.

**Test di prestazione**      Uso di test ciechi per determinare se i laboratori clinici possono effettuare correttamente un'analisi. Abituamente i campioni utilizzati per il test sono forniti da una organizzazione indipendente rispetto ai laboratori che effettuano le analisi.

**Test presintomatico** Vedi definizione al punto 2.2.2 del testo.

**Tipo selvatico (wild type)** Per un dato organismo il genotipo o fenotipo (considerato "normale") prevalente in natura o nel ceppo standard di laboratorio.

**Traduzione** Processo di trasferimento dell'informazione contenuta in una molecola di RNA messaggero in una sequenza corrispondente di aminoacidi durante la biosintesi proteica.

**Transgenico** Organismo il cui genoma è stato modificato mediante l'introduzione di geni estranei con la tecnica del DNA ricombinante. Il nuovo gene può aggiungersi o sostituirsi al gene originario presente nell'organismo ricevente, oppure annullarne l'espressione (knock-out genico).

Per ottenere un animale transgenico è possibile prelevare da una femmina l'oocita fecondato, e introdurre all'interno del nucleo il gene di interesse clonato in un vettore, di solito retrovirale. In alternativa, il gene può essere inserito in colture di cellule embrionali dalle quali sarà possibile ottenere successivamente un embrione. In ambedue gli approcci, lo zigote o l'embrione, nel caso di mammiferi, viene inserito nell'utero di un'altra femmina dove prosegue lo sviluppo sino al termine della gravidanza. Se l'organismo è in grado di riprodursi, il gene trasferito potrà essere trasmesso alla progenie anch'essa portatrice del nuovo fenotipo.

**Trascrittasi inversa (DNA polimerasi RNA-dipendente)** Enzima presente in alcuni virus a RNA (retrovirus) che catalizza la biosintesi di molecole di DNA su stampi di RNA a catena singola. L'enzima viene impiegato in ingegneria genetica per produrre molecole di cDNA da una preparazione purificata di RNA.

**Trascritto** Molecola di RNA prodotta dalla trascrizione di un gene ad opera della RNA polimerasi. Il trascritto primario di solito deve subire una serie di modificazioni prima di trasformarsi nelle molecole mature di RNA messaggero, ribosomiale o transfer funzionalmente attive.

**Trascritto primario** Primo prodotto, non ulteriormente elaborato (quindi contenente le sequenze corrispondenti sia agli esoni che agli introni) del processo di trascrizione del DNA. Negli eucarioti corrisponde all'RNA eterogeneo nucleare (hnRNA).

**Trascrizione** Processo di trasferimento dell'informazione contenuta nel DNA in una sequenza complementare di RNA; la reazione è catalizzata dall'enzima RNA polimerasi DNA-dipendente.

**Trascrizione inversa** Processo di biosintesi di filamenti di DNA su stampi di RNA ad opera dell'enzima DNA polimerasi RNA-dipendente o trascrittasi inversa. Si verifica in cellule infettate da virus a RNA della classe dei retrovirus. Negli esperimenti di ingegneria genetica, la trascrizione inversa viene condotta in vitro a partire da RNA purificato e porta alla sintesi di DNA complementare (cDNA).

**Trasfezione** Meccanismo mediante il quale cellule eucariotiche in coltura acquistano nuovi marcatori genetici mediante incorporazione di DNA eterologo.

### **Trasformazione**

- 1) Trasformazione batterica: acquisizione di nuovi marcatori genetici mediante l'incorporazione di DNA esogeno in un batterio in stato di competenza.
- 2) Trasformazione delle cellule eucariotiche: conversione di cellule in coltura da uno stato normale ad uno stato di crescita non controllata, simile o identica alla condizione neoplastica.

**Traslocazione** Aberrazione cromosomica strutturale che consiste nel trasferimento di un segmento di cromosoma fra cromosomi diversi. Le traslocazioni comprendono: *le traslocazioni reciproche*, scambio simmetrico di segmenti di cromosoma fra cromosomi diversi; *le traslocazioni robertsoniane (fusioni centriche)*, originano da due rotture sui cromosomi acrocentrici, a livello del centromero o in una regione vicina al centromero e dalla successiva fusione delle braccia lunghe; *le traslocazioni non reciproche (traslocazioni per inserzione)*, originano da tre rotture cromosomiche, due delle quali sullo stesso cromosoma e la terza su un altro cromosoma; il segmento di cromosoma compreso tra le due rotture viene trasferito ed inserito sul cromosoma non omologo senza che si verifichi scambio reciproco di materiale.

**Trasposone** Sequenza di DNA in grado di promuovere il proprio spostamento in punti diversi del genoma. I trasposoni generalmente contengono numerosi geni e sono forniti alle estremità di sequenze di inserzione identiche che permettono loro di spostarsi facilmente da una posizione all'altra del genoma. Sinonimi: Elementi genetici trasponibili; elementi di inserzione

**Tripletta** Vedi Codone.

**Trisomia** Tipo di aneuploidia caratterizzata dalla presenza, in una cellula o un organismo diploide, di un cromosoma in sovrannumero (extracromosoma) in una coppia di omologhi ( $2n+1$ ). Condizione più rara è la doppia trisomia ( $2n+1+1$ ) che consiste nella presenza di un extracromosoma in due coppie omologhe diverse.

**tRNA (RNA transfer)** Piccole molecole di RNA che trasportano aminoacidi specifici verso la molecola dell'mRNA legata ai ribosomi, localizzandoli nella posizione esatta a livello della molecola polipeptidica in costruzione. L'aminoacido è inserito correttamente grazie alla complementarietà tra una tripletta di nucleotidi presente ad un'estremità del tRNA (anticodone) e una specifica tripletta di nucleotidi (codone) presente sulla molecola di mRNA che codifica quella specifica proteina.

**Unità di mappa o centimorgan (cM)** Unità di misura in base alla quale viene espressa la distanza di due geni su un cromosoma e la lunghezza dei cromosomi nelle mappe genetiche. Una unità di mappa corrisponde alla distanza di due geni che presentano una frequenza di crossing over dell'1%, e quindi ad un tratto di cromosoma nel quale in media si verifica un crossing-over ogni 50 meiosi, generando due gameti ricombinanti su 200.

**Utilità clinica di un test** Rapporto tra i benefici ed i danni associati alle opzioni mediche effettuate sulla base del risultato del test. Nel caso dei test genetici, l'utilità clinica di un test deve essere valutata tenendo in considerazione anche i benefici ed i danni di tipo non medico, cioè psicologici e sociali.

**Validità analitica** Sensibilità e specificità analitica di un test. Vedi anche sensibilità analitica e specificità analitica.

**Validità clinica** Sensibilità clinica, specificità e valore predittivo di un test nei confronti di una malattia. Vedi anche sensibilità, specificità, valore predittivo.

**Valore predittivo** In un test, percentuale dei positivi al test che sono veri positivi (valore predittivo positivo, VPP), oppure percentuale di persone con test negativo che sono veri negativi (valore predittivo negativo, VPN). In una tavola di contingenza 2x2 (vedi),  $VPP = a/a+b$ ,  $VPN = d/c+d$ . Il VP di un test è determinato, oltre che dalla sua sensibilità e specificità, anche dalla probabilità a priori di essere portatori della malattia.

**Variabilità** Insieme delle differenze fenotipiche più o meno marcate esistenti tra gli individui di una stessa specie, animale o vegetale, con l'esclusione di quelle correlate al sesso o dipendenti da momenti diversi del ciclo vitale.

**Variante** Organismo che presenta uno o più caratteri differenti (biochimici, morfologici, antigenici, ecc.) da quelli tipici della specie o del gruppo di appartenenza, per quanto mantenga i tratti fondamentali di questi.

**Vettore** Nelle tecniche di DNA ricombinante, un plasmide, un batteriofago o altro elemento di DNA con capacita' di replicazione autonoma, in cui e' stato inserito del DNA estraneo (inserto). Con il vettore viene replicato anche l'inserto che puo' pertanto essere moltiplicato (clonato) e successivamente recuperato per svolgere tutte le analisi del caso. Un vettore deve contenere uno o piu' siti di restrizione, geni che conferiscano un qualche carattere fenotipico alle cellule destinate a ospitarlo (formazione di placche, resistenza ad un antibiotico o ad un farmaco, ecc.) e essere capace di replicazione autonoma in tali cellule.

**Wild type** Vedi tipo selvatico.

**Western blot** Tecnica di biologia molecolare, mediante la quale molecole di proteine separate elettroforeticamente sono trasferite da un gel di poliacrilammide ad una membrana. Le proteine sono successivamente riconosciute generalmente tramite metodi immunologici.

**Zigote** Negli eucarioti e' la cellula uovo fecondata, a partire dal momento della fusione dei pronuclei maschile e femminile sino all'inizio del processo di segmentazione. Lo zigote possiede un corredo cromosomico diploide, derivante dalla fusione dei corredi aploidi dei due gameti.