

Introduzione

Lo scopo di queste linee guida è quello contribuire al miglioramento e all'armonizzazione della refertazione relativa alla diagnosi genetica molecolare. L'intento è quello di fornire indicazioni per la redazione di referti strutturati che rispondano al quesito diagnostico in modo accurato, comprensibile e conciso. Nella stesura di queste linee guida si è ritenuto necessario elaborare un Documento che fosse armonizzato con Eurogentest e ISS che richiedono di esplicitare nelle Conclusioni anche l'interpretazione del Risultato.

Il referto quindi dovrebbe prevedere le seguenti sezioni:

1. IDENTIFICAZIONE LABORATORIO

Intestazione completa del Laboratorio che esegue l'analisi:

- Ospedale/Istituto....
- Direttore (di Struttura Complessa o Responsabile Servizio/SS)
- Indirizzo, Telefono, Fax, e-mail, sito WEB
- Certificazioni UNI EN ISO 9001 - UNI EN ISO 15189 (se ottenute)

2. ANAGRAFICA PAZIENTE e TRACCIABILITA'

2.1 Identificazione Paziente:

Il paziente deve essere identificato da almeno 2 elementi: Cognome Nome e Data Nascita
Dovrebbero essere campi prestabiliti (agevola in caso di nomi stranieri)
Sesso, Luogo di nascita, origine etnica: opzionali, ma talvolta necessari (vedi FC, Talassemia,
Cod. Fiscale (opzionale)

2.2 Materiale Biologico ricevuto:

Sangue periferico, Liquido amniotico, biopsia cutanea ecc.

Nel caso di materiale biologico che sia già stato trattato in altra sede (es: coltura di amniociti, DNA già estratto in altro Centro/Lab/Istituto Inviante) è opportuno che venga indicato il campione biologico e il Laboratorio di provenienza.

2.3 Data Accettazione:

S'intende la data di accettazione amministrativa a partire dalla quale si può cominciare l'analisi e dalla quale si conta il tempo di esecuzione e refertazione.

(Vedi Non Conformità per campioni incompleti per dati, documentazione e/o materiale non idoneo)

2.4 Medico Referente:

S'intende lo specialista che ha posto il sospetto diagnostico e che commenterà il referto al paziente o ai familiari. "Referente" e non Richiedente per sottolineare che spesso viene riportato il medico che redige materialmente la richiesta e non sempre coincide con il Referente (es. medico di base).

2.5 Indicazione Clinica:

dovrebbe contenere 3 informazioni :

- la malattia per la quale si richiede il test (es. Sindrome dell'X-Fragile, Fibrosi Cistica ecc.)
- finalità del test (t. diagnostico, t. presintomatico, t. identificazione portatore ecc)
- indicazione (es. familiarità per FC)

3. DESCRIZIONE TEST ESEGUITO

3.1 Analisi Molecolare del Gene.....

Indicare il/i Gene/i, il corrispondente OMIM e, dove pertinente, indicare numero di accesso Database NCBI : NM_.....

3.2 Analisi Eseguite: includere dettagli tecnici utilizzati per l'analisi

E' utile per stabilire quale test è stato eseguito, qualora esistano test ulteriori o alternativi ai quali il pz potrebbe essere sottoposto in futuro, oppure per altri familiari che debbano sottoporsi allo stesso test.

Es. Ricerca mutazioni in esoni e giunzioni introne/esone (indicare in dettaglio quali esoni vengono esaminati)

Ricerca di Espansioni di sequenze ripetute (indicare in quale regione del gene: es. 5'UTR, promotore ecc)

Ricerca di delezioni/duplicazioni

Analisi Microsatelliti (es. per esclusione contaminazione materna, per ricerca Disomia Uniparentale ecc.)

Analisi di mutazione già nota e

Screening di mutazioni note (seguendo Nomenclatura HGVS <http://www.hgvs.org/mutnomen/>) (vedi anche punto 4.2)

.....

3.3 Metodi Utilizzati: breve descrizione delle metodiche e/o Kit commerciali usati.

Es. Amplificazione Genica (PCR):

- indicare regione genomica (esoni, microsatelliti cromosoma #...)
- indicare Primers, o Kit commerciale usato

Es. DHPLC e Sequenziamento diretto :

- indicare esoni analizzati

Es. Southern blot :

- indicare enzimi di restrizione usati
- indicare sonde molecolari usate

.....

3.4 Sensibilità Analitica del test: serve ad indicare la % di falsi negativi

Probabilità che una "mutazione" presente nel campione esaminato risulta Positiva (vero positivo)

Es. DHPLC : sensibilità analitica non inferiore al 95%

Sequenziamento diretto : sensibilità analitica 99.99%

MLPA : sensibilità analitica 99.99%

3.5 Specificità Analitica del test: serve ad indicare la % di falsi positivi

Probabilità che un campione "normale" risulti Negativo (vero negativo)

4. RISULTATO

4.1 Riportare il Genotipo identificato con terminologia appropriata seguendo la Nomenclatura HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>)

4.2 Nel caso di geni quali CFTR e beta globina, per i quali è stata aggiornata recentemente la nomenclatura, si farà comunque riferimento anche alla vecchia.

4.3 Nel caso vengano identificati Polimorfismi già descritti in Letteratura come NON associati alla malattia si scriva solo: "presenza di polimorfismi noti" senza richiamo nelle Conclusioni del referto.

4.4 Evitare l'uso di simboli + e - nel riportare le mutazioni perché si presta a errata interpretazione, è più appropriato riportare Presente/Assente accanto alla mutazione.

5. **CONCLUSIONE e INTERPRETAZIONE**

5.1 La Conclusione deve fornire un'interpretazione completa e chiara dei risultati del test genetico molecolare. I referti sono destinati oltre che al paziente, a diverse figure professionali, molte delle quali non sono sempre in grado di interpretare pienamente i risultati della genotipizzazione.

Questo è il motivo per il quale Eurogenetest e ISS indicano che l'inclusione nel Referto dell'Interpretazione del risultato, e non del solo risultato, è una responsabilità del Laboratorio che esegue l'analisi molecolare.

Ciò non toglie che a causa della loro complessità interpretativa e tecnologica, e delle loro potenziali implicazioni per altri membri della famiglia, per tutti i test genetici, è appropriata la Consulenza Genetica.

Si ritiene opportuno quindi fornire l'interpretazione del genotipo:

- eventuale patogenicità della alterazione riscontrata
- della sua compatibilità con l'indicazione clinica al test.
- rischio di trasmissione alla prole

5.2 **Mutazioni note, associate alla Patologia in esame:**

Segnalare che la Mutazione identificata è compatibile con la malattia riportata nell'indicazione clinica al test (opzionali i riferimenti Bibliografici)

5.3 **Mutazioni Nuove** distinguere tra:

5.3.1 Probabilmente associabili al fenotipo per caratteristiche proprie della mutazione
Es. Mutazioni non-sense, alterazioni splice-site, ins/del con slittamento di lettura, grosse delezioni
(Es. di Conclusione: La mutazione non è finora stata descritta in altri pz...ma è verosimilmente compatibile con la Sindrome di...)

5.3.2 Incerto valore Patogenetico

Es. Missense in Domini non funzionali
(Es. di Conclusione: ...Non è nota l'associazione della sostituzione nucleotidica identificata con la patologia in esame, pertanto rimane incerto il suo valore patogenetico)

Si ritiene NON appropriato riportare dati ottenuti da software di predizione quali Polyphen, SIFT ecc.

5.4 **Necessità di approfondimenti:**

Talvolta è possibile che l'alterazione riscontrata non consenta di giungere ad una conclusione diagnostica, ma con adeguati approfondimenti, che richiedono ulteriori analisi, potrebbe essere possibile dare un significato patogenetico all'alterazione riscontrata. Esempi:

- Sostituzione mai descritta in un sito di splicing (o nelle vicinanze): si può verificare su mRNA (cDNA) se tale sostituzione altera lo splicing e giungere ad una conclusione diagnostica.
- esame ai genitori e/o ad altri membri della famiglia, per vedere se è "de novo" o se segrega in altri soggetti nella famiglia.
-

In tali casi è bene indicare dopo la descrizione della alterazione riscontrata (e come Nota dopo le Conclusioni), la possibilità di ulteriori accertamenti che possono portare ad una conclusione diagnostica.

5.5 **In caso di risultati "positivi":**

È importante fornire una stima della Specificità Diagnostica* che indica il rischio di un risultato falso positivo in un individuo "normale"

Es. : malattie a esordio tardivo o in caso di penetranza ridotta

*Specificità Diagnostica : probabilità che i test sia negativo in individui senza la malattia in esame.

5.6 In caso di risultati "negativi":

E' raccomandata la nota relativa alla Sensibilità Diagnostica*

(ovviamente nel caso in cui questa sia stimabile) cioè la % dei Falsi Negativi.

*Sensibilità Diagnostica : probabilità che i test sia positivo in individui con la malattia in esame.

5.7 Informazioni su Rischio di Trasmissione Genetica, Rischio Riproduttivo e opportunità di estendere l'analisi a familiari a rischio e altre valutazioni:

Tali informazioni sono di pertinenza della Consulenza Genetica e spesso sono difficilmente riassumibili in 2-3 righe, ma anzi necessitano di una relazione, preferenzialmente preceduta da un colloquio con un specialista Genetista Medico.

Si ritiene però opportuno indicare l'eventuale Rischio di Trasmissione Genetica della "alterazione" riscontrata e rimandare alla Consulenza Genetica per il completamento di altre valutazioni quali Rischio Riproduttivo, estensione dell'indagine ad altri familiari, informazioni sulla malattia ecc. pertanto si propone di aggiungere a termine delle Conclusioni una nota che sottolinei la necessità di una consulenza genetica:

"Tale genotipo pone il soggetto a rischio di trasmettere la mutazione alla prole.

Pertanto per la valutazione del rischio riproduttivo e le potenziali implicazioni per altri membri della famiglia è appropriata una Consulenza Genetica."

5.8 Partecipazione e Superamento dei Controlli Esterni di Qualità (CEQ):

Oltre alla nota relativa alla partecipazione ai CEQ, è opportuno aggiungere anche l'informazione relativa al superamento del CEQ dell'anno in corso.

5.9 Sono sconsigliate Note riguardanti il "rischio di scambio di campioni, erronee identificazioni di paternità, ed errori nella definizione del genotipo. Questi ultimi possono derivare da traccedi contaminazione nelle reazioni di PCR, da contaminazione materna di campioni fetali e da rare varianti genetiche che possono interferire con l'analisi"

Questo tipo di note al termine di un referto NON sono necessarie poiché il Laboratorio ha gli strumenti per evitare di incorrere in tali errori, in particolare:

- Scambi di campioni:
 - tracciabilità del campione mediante per es. Codice a Barre;
 - identificazione paziente con almeno 2 elementi (CognomeNome e codice laboratorio-ID)
 - è buona pratica per es. confermare una mutazione mediante ripetizione dell'analisi a partire dal campione originale (sangue perif. ecc)
- Paternità biologica e rare varianti:

sono argomenti da discutere durante il colloquio Pre-Test che ha proprio lo scopo di chiarire il significato, i limiti, l'attendibilità, la specificità del test genetico e che ha la finalità di ottenere il consenso all'esecuzione dell'indagine molecolare; tra le informazioni che si forniscono c'è quella relativa al fatto che il test esamina caratteristiche genetiche ereditate dai genitori biologici, e che esistono dei limiti intrinseci al test (per es.: polimorfismi rari nelle sequenze dei primers usati per l'analisi) che possono abbassare la Sensibilità Analitica del Test (che peraltro deve essere indicata sul referto).
- Contaminazione in reazioni PCR : devono essere escluse inserendo opportuni controlli negativi (Bianco)
- Contaminazione Materna in Diagnosi Prenatale : deve essere SEMPRE esclusa con opportuna analisi di microsatelliti.

LOGO LABORATORIO

Direttore
(di Struttura Complessa o Responsabile Servizio/SS)
Indirizzo, Telefono, Fax, e-mail, sito WEB
Certificazioni UNI EN ISO 9001 - UNI EN ISO 15189

ANAGRAFICA PAZIENTE e TRACCIABILITA'

Cognome _____ Nome _____ Sesso : M F
Data Nascita _____ Luogo nascita _____ *Emia (opzionale)*
Cod. Fiscale (opzionale)
Data Accettazione _____ Codice Lab: _____
Materiale biologico ricevuto: _____
Medico Referente _____
Istituto/Ospedale _____
INDICAZIONE CLINICA _____

ANALISI del GENE ***
(OMIM.....NM.....)

Analisi eseguite:

Metodi utilizzati:

Sensibilità e Specificità analitiche riferite ad ogni metodo

RISULTATO

Descrizione del Genotipo
(secondo Nomenclatura HGVS <http://www.hgvs.org/mutnomen/>)

Indicare (se necessari) Valori Normali e Patologici
(es n. Triplette – X-Fragile – DM)

CONCLUSIONI

Descrizione e interpretazione chiara e completa del Risultato del Test.

Deve asserire se il Genotipo è compatibile con l'indicazione clinica al Test (test Diagnostico, test per identificazione di portatore).

Es:Tale genotipo è compatibile con la sindrome di.....

Es:Tale genotipo pone il soggetto nella condizione di portatore sano di

Deve riportare (se necessario e se stimabile) la Sensibilità Diagnostica del test.

Deve riportare la Nota che il Genotipo identificato pone il soggetto a rischio di trasmettere la mutazione alla prole. Pertanto per la valutazione del Rischio Riproduttivo e le potenziali implicazioni per altri membri della famiglia è appropriata la Consulenza Genetica

Luogo e Data _____

Il Dirigente

Il Direttore