

Indagine conoscitiva sulla diffusione delle analisi di biologia molecolare nei laboratori clinici della regione Puglia

Marina Micelli¹, Mario Correale², Antonio Iacobacci³, Sergio Giannattasio⁴

¹Laboratorio di Coagulazione-Azienda Ospedaliera Policlinico, 70124 Bari;

²Laboratorio Analisi - IRCCS "De Bellis", 70013 Castellana Grotte (BA);

³Laboratorio Analisi - C.C.R., 70124 Bari;

⁴CNR - Centro Studi sui Mitocondri e Metabolismo Energetico, 70126 Bari.

ABSTRACT

A survey on the diffusion of molecular biology tests in the clinical laboratories of Puglia region

In view of the increasing interest on the application of molecular biology techniques in the clinical laboratory, the need is felt for an appropriate knowledge of the existing laboratories performing molecular biology tests, in order to optimize a diagnostic service network in a region. Therefore, a survey has been organized in the Puglia region, by sending a questionnaire to 105 public clinical laboratories, asking them to give information about the molecular biology tests performed, the methodologies, and the human and instrumental resources involved. Valid results were obtained from 75 participants: out of them, 35 declared to use molecular biology techniques for the execution of at least one type of diagnostic test. The use of molecular biology techniques showed wider diffusion in the area of clinical microbiology, partially due to the availability of automatic instruments and diagnostic kits. The execution of 8530 HCV-RNA tests/year, of 3610 HIV-RNA tests year, and 3170 HBV-RNA tests/year, together with a number of additional microbiologic tests based on molecular biology, was recorded. In the field of hereditary and oncologic pathology the diffusion of molecular biology was much lower, and the number of tests per year was seldom higher than a few hundreds. The results from the survey are considered as a valid basis for future rationalization of the molecular biology and medical genetics services regional network.

RIASSUNTO

In considerazione del crescente interesse delle indagini di biologia molecolare nel laboratorio clinico, e considerando che la ottimizzazione dei servizi di diagnostica molecolare necessita di una conoscenza preliminare delle strutture esistenti, è stata effettuata una indagine conoscitiva relativa alla diffusione delle metodologie pertinenti nei laboratori clinici della regione Puglia. È stato predisposto un questionario adatto, che è stato inviato a 105 laboratori pubblici: sono stati raccolti i dati da 75 laboratori. Di essi, 35 utilizzano tecniche di biologia molecolare per almeno un tipo di indagine. Sono risultate sufficientemente diffuse le indagini di biologia molecolare in campo microbiologico, in parte come conseguenza della disponibilità di apparecchiature automatiche e di kits diagnostici. Si è registrata l'esecuzione di 8530 esami/anno per HCV-RNA, 3610 esami/anno per HIV-RNA, 3170 esami/anno per HBV-RNA, nonché un numero consistente di altre indagini del settore. Nel campo della patologia ereditaria ed oncologica si è registrata una minore diffusione, essendo le indagini di pertinenza eseguite in un numero ridotto di centri, ed il numero degli esami eseguiti annualmente raramente superiore alle poche centinaia. I risultati della rilevazione costituiscono una valida piattaforma di conoscenze ai fini di una razionalizzazione dei servizi di biologia molecolare e di genetica medica.

INTRODUZIONE

Le recenti acquisizioni sulla comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base di molte patologie umane hanno aperto nuove prospettive nel campo della prevenzione, della diagnosi e della terapia di malattie sia a base genetica che causate da agenti patogeni esterni. In questo ambito lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare applicate alla genetica umana e alla microbiologia sta dando un forte impulso all'implementazione di protocolli innovativi per le indagini diagnostiche nei laboratori di analisi cliniche.

La possibilità di avere dati aggiornati sulla diffusione delle tecniche di biologia molecolare nel laboratorio clinico è un prerequisite sia per l'ottimizzazione dei servizi di diagnostica molecolare a livello territoriale, sia per la standardizzazione e lo sviluppo di sistemi di controllo di qualità.

Pertanto, il nostro gruppo di lavoro, che comprende un medico e due biologi che svolgono attività in laboratori di analisi cliniche, ed un ricercatore attivo nel campo dello studio delle basi molecolari delle patologie ereditarie, ha ritenuto utile effettuare, nell'ambito delle attività della De-

legazione Regionale S.I.Bio.C., un'indagine conoscitiva relativa alla diffusione delle metodologie di biologia molecolare nei laboratori clinici della regione Puglia.

METODOLOGIA

A tale scopo è stato predisposto un questionario al fine di valutare i diversi campi e modi di applicazione delle tecniche di biologia molecolare in patologia clinica.

Il questionario, il cui schema è riportato in figura 1, è composto da due parti: una scheda generale ed una specifica di approfondimento per ogni tipo di indagine condotta con metodologie di biologia molecolare. Tra le varie informazioni sull'organizzazione tecnico-scientifica del laboratorio, è stata anche richiesta la tipologia del personale (a tempo pieno o parziale) dedicato alle attività di diagnostica molecolare quale indice dell'importanza di questo settore nella gestione del laboratorio.

In Puglia sono attivi due centri di riferimento per la diagnostica molecolare, il Servizio di Genetica Medica dell'I.R.C.C.S. "Casa Sollievo della Sofferenza" di S. Giovanni Rotondo (FG) e la Cattedra di Genetica Umana presso il Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Bari.

Alcuni dati relativi a queste strutture si possono trovare sul sito Internet GENET (<http://www.genet.it>) che riporta anche l'elenco dei Servizi di genetica esistenti in Italia ed il tipo di analisi effettuate.

Il questionario è stato inviato nel corso del 1999 ai laboratori pubblici di analisi cliniche della Regione Puglia, esclusi i Servizi di genetica sopra citati.

RISULTATI

Le informazioni raccolte attraverso il questionario sono state confrontate sia con quelle contenute nel suddetto sito, che con quelle contenute nella determinazione dirigenziale n.130 emanata dalla Regione Puglia in data 14.05.99 e che contiene l'elenco delle strutture specialistiche che possono erogare prestazioni contrassegnate con la lettera "R", comprendenti anche le tecniche di biologia molecolare (1-3).

L'indagine condotta attraverso il questionario ha permesso di raccogliere dati relativi a 75 laboratori pubblici pugliesi, su un totale di 105 presenti nel territorio. È risultato che il 47% (35 laboratori) utilizza tecniche di biologia molecolare per almeno un tipo di indagine. La figura 2 riporta un grafico che rappresenta i diversi tipi di materiale biologico utilizzati da questi laboratori per le analisi cliniche di biologia molecolare.

I risultati del questionario hanno evidenziato i seguenti settori di applicazione della biologia molecolare in campo biomedico: microbiologia, malattie genetiche, oncologia e citogenetica, sia a livello diagnostico che di ricerca. Il 50% dei laboratori clinici che utilizza le tecniche di biologia molecolare le applica solo nel settore della microbiologia. L'analisi molecolare effettuata con maggior frequenza è la ricerca dell'HCV-RNA (8580 esami/anno di cui 72% quan-

titativi, 16% qualitativi, 12% genotipizzazioni) seguita da quella dell'HIV-RNA (3610 esami/anno) e quella dell'HBV-DNA (3170 esami/anno). Il numero di indagini relative ad altri agenti infettivi è inferiore a 300 esami/anno (figura 3). In totale nella Regione Puglia vengono effettuate indagini di biologia molecolare per la ricerca di 14 agenti patogeni, per un totale di 17300 indagini all'anno. La diffusione di questo tipo di indagini è da attribuirsi anche alla disponibilità di kit commerciali per analisi microbiologiche.

Un'altra metà dei laboratori clinici pugliesi che hanno risposto al questionario, comprendenti in buona parte gli stessi che effettuano diagnosi molecolare in microbiologia, effettuano indagini molecolari anche su patologie monogeniche e poligeniche, tratti multifattoriali e neoplasie.

Escludendo i Servizi di Genetica prima menzionati, il numero di analisi di questo tipo è di 2120 determinazioni/anno su 20 patologie esaminate (figura 4). Il 25% dei laboratori che effettuano indagini di biologia molecolare eseguono anche analisi citogenetiche.

Dai questionari risulta inoltre che in pochissimi casi esiste un servizio di consulenza genetica integrato con un laboratorio di diagnostica molecolare.

La maggior parte dei laboratori clinici che utilizzano tecnologie di biologia molecolare per analisi genetiche sono dotati della strumentazione minima necessaria. L'uso di apparecchiature automatiche per analisi genetiche di routine è limitato alle analisi microbiologiche.

Circa il 70% del personale che si occupa di biologia molecolare clinica opera a tempo pieno.

DISCUSSIONE

Lo scopo di quest'iniziativa era di approfondire la conoscenza dello stato dell'arte e della diffusione della diagnostica molecolare nel territorio della Regione Puglia. I dati raccolti con questa indagine mostrano che nei laboratori clinici pugliesi:

1) le tecniche di biologia molecolare hanno ormai una larga diffusione specialmente nel settore della microbiologia, anche grazie alla disponibilità di kit commerciali e di sistemi automatici;

2) le indagini sulle malattie genetiche, che hanno un forte impatto sociale e che richiedono specifiche competenze risultano effettuate presso diversi centri alcuni dei quali già e riconosciuti come servizi di genetica medica.

Il numero dei laboratori pubblici che effettuano prestazioni nel settore della biologia molecolare e citogenetica, rilevato con il nostro questionario, risulta superiore a quello individuato dalla determinazione dirigenziale n.130 della Regione Puglia (35 laboratori contro 28). Dalla nostra rilevazione, infatti, è risultato che presso l'Azienda Ospedaliera Policlinico di Bari operano diversi laboratori nel settore della diagnostica molecolare, mentre dai dati regionali ne risultava uno solo. Pertanto, i dati ottenuti attraverso il questionario vanno ad integrare quelli forniti dalla Regione Puglia dando così un quadro più completo dell'effettiva attività di diagnostica molecolare svolta presso i laboratori clinici che operano nella regione.

**INDAGINE CONOSCITIVA RELATIVA ALLA
UTILIZZAZIONE DELLE METODOLOGIE DI BIOLOGIA
MOLECOLARE NEI LABORATORI CLINICI DELLA
REGIONE PUGLIA**

AZIENDA.....
LABORATORIO.....
RESPONSABILE - DOTT./DOTT.SSA.....
INDIRIZZO.....
N° TELEFONO....., FAX.....
E-MAIL.....

NOSTRO RIF.....

COMPILATORE.....

9. METODI DI ANALISI

- 1. Sonde
- 2. Elettroforesi di acidi nucleici
- 3. Clonaggio
- 4. Ibridazione nucleare mediante:
 - Northern Blotting
 - Southern Blotting
- 5. Amplificazione di acidi nucleici (PCR, LCR, TMA etc.)

RECCHIATURE IN DOTAZIONE PER L'ANALISI DEGLI ACIDI NUCLEICI:

- 6.
- 7.
- 8.
- 9.
- 10.
- 11.
- 12.
- 13.
- 14.

11. QUALE E QUANTO PERSONALE È UTILIZZATO A QUESTI FINI?

- 15. Medici n..... A tempo pieno Si No
- 16. Biologi n..... A tempo pieno Si No
- 17. Chimici n..... A tempo pieno Si No
- 18. Tecnici diplomati n..... A tempo pieno Si No

12. VIENE DA VOI RICHIESTA LA COMPILAZIONE DI UN MODELLO PER LA RACCOLTA DELLE INFORMAZIONI NECESSARIE PER L'ESECUZIONE E LA SUCCESSIVA VALUTAZIONE DELLE INDAGINI RICHIESTE? Si No

13. VIENE UTILIZZATO UN MODELLO PER LA REFERTAZIONE DELLE INDAGINI DI BIOLOGIA MOLECOLARE Si No

NOTA: Se si è risposto sì alle domande N. 12 e 13 allegare al questionario il modello utilizzato per la richiesta e/o quello utilizzato per la refertazione.

QUESTIONARIO: SCHEDA GENERALE

- 1. NEL TUO LABORATORIO VENGONO EFFETTUATE INDAGINI DI BIOLOGIA MOLECOLARE? Si No
- 2. SE NO, PREVEDI DI ATTIVARLE IN UN IMMEDIATO FUTURO? Si No
- 3. ESISTE UN'ATTIVITÀ DI CONSULENZA GENETICA? Si No

4. SE SÌ, DA QUALE PERSONALE È SVOLTA:

-
-
-

5. ESISTE UN LABORATORIO DI CITOGENETICA? Si No

PROSEGUIRE SOLO SE HAI RISPOSTO SÌ ALLA DOMANDA N° 1

6. CAMPI DI APPLICAZIONE

- Ricerca (.....)
- Batteriologia (.....)
- Virologia (.....)
- Oncologia (.....)
- Malattie genetiche (.....)
- Epidemiologia (.....)
- Medicina forense (.....)
- Accertamento di paternità (.....)
- Altro (.....)

TIPO DI ANALISI

7. MATERIALE BIOLOGICO UTILIZZATO

- Sangue
- Altri tessuti
- Altro (specificare).....

8. ACIDI NUCLEICI ESAMINATI:

- DNA Si No
- RNA Si No

QUESTIONARIO: SCHEDA SPECIFICA

(compilare una scheda per ogni indagine)

1. INDAGINE PER LA RICERCA DE.....

Sul seguente materiale:

- 2. Sangue
- 3. Altri tessuti
- 4. Altro (specificare).....

2. ACIDO NUCLEICO ESTRATTO:

- 5. DNA Specificare:.....
- 6. RNA Specificare:.....
- 7. Con metodo manuale
- 8. Automatico
- 9. Con reagenti fatti in casa
- 10. Con kit commerciali

3. DESCRIVERE IN MANIERA DETTAGLIATA LE TECNICHE UTILIZZATE (es. sequenziamento del DNA, DGGE, SSCP, RG-PCR, ASO, DOT-BLOT, Southern, etc.), USANDO ANCHE ACRONIMI COMMERCIALI (es. NASBA, LCx, etc.):

- 11.
- 12.
- 13.
- 14.
- 15.
- 16.

4. LE METODICHE UTILIZZATE VENGONO EFFETTUATE CON METODO:

- 17. Manuale
- 18. Automatico
- 19. Semiautomatico
- 20. Con reagenti fatti in casa
- 21. Kit commerciali

5. NUMERO DETERMINAZIONI/ANNO.....

6. DA QUANTO TEMPO VENGONO SVOLTE QUESTE INDAGINI NEL TUO LABORATORIO?

- 22. Da meno di un anno
- 23. Da più di un anno
- 24. Da più di 3 anni

NOTA: Allegare richiesta e referto se specifici per questo tipo di indagine.

Figura 1
Schema del questionario inviato ai laboratori della Regione Puglia

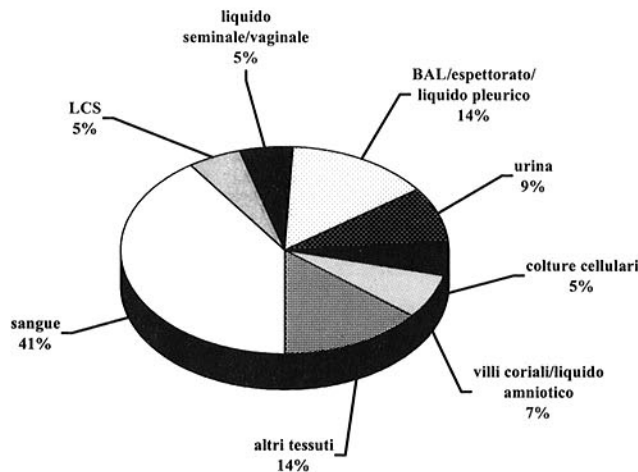


Figura 2
Materiale biologico utilizzato per analisi di biologia molecolare nei laboratori clinici pugliesi

Analisi Microbiologiche	Numero di determinazioni/anno
HCV-RNA	8580
HIV-RNA	3610
HBV-RNA	3170
HTLV-I/II	50
HGV	230
HPV	180
Rosolia	30
Toxoplasma	100
CMV	100
C. Trachomantis	550
Micobatteri Atipici	50
M. Tuberculosis	670
B. Menselae	(effettuate ma non quantificate)
B. Cepacia	(effettuate ma non quantificate)

Figura 3
Quantità delle analisi molecolari microbiologiche effettuate nei laboratori clinici pugliesi

Mentre le indagini molecolari in campo microbiologico appaiono sufficientemente diffuse nei laboratori clinici della Regione Puglia, e sicuramente lo saranno ancor di più nei prossimi anni, un discorso più approfondito va fatto per lo studio delle malattie genetiche (3).

Infatti, tenuto conto del rapido aumento delle conoscenze di genetica molecolare e della complessità delle problematiche cliniche ed etico-sociali da esse suscitate (4,5), è opportuno mantenere Centri di riferimento interdi-

sciplinari per la consulenza genetica. Tali Centri si possono configurare come unità funzionali composte da: genetisti, biologi molecolari, psicologi e medici di varie specialità che, mediante un lavoro di equipe, siano in grado di assicurare una adeguata integrazione delle sempre nuove acquisizioni scientifiche (6).

Già in altre regioni, quali l'Emilia Romagna e la Liguria, sono state attivate delle iniziative di programmazione sanitaria in materia di diagnosi precoce delle malattie genetiche (7). Nella prima è stata proposta l'organizzazione di un coordinamento regionale al fine di una più razionale utilizzazione delle risorse e di una migliore offerta assistenziale. Un differente approccio è costituito dal modello già operativo nella Regione Liguria dove è stato istituito un Dipartimento Regionale di Genetica, di cui fanno parte strutture pubbliche e private convenzionate operanti nei diversi campi della genetica medica (vedi Rapporto del Gruppo di Lavoro dell'Istituto Superiore di Sanità sulle Linee Guida per Test Genetici, <http://www.iss.it>). Le principali funzioni del coordinamento sono:

- la identificazione delle competenze specifiche esistenti sul territorio regionale con offerta di percorsi diagnostico-assistenziali ottimali per rendere più lineare ogni singolo percorso e/o processo organizzativo;
- la utilizzazione coordinata per evitare 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.

Un obiettivo fondamentale della programmazione nazionale e regionale in questo settore è la preparazione specifica e l'addestramento del personale che si occupa di un settore a così elevata specializzazione e tecnologia. In Puglia tale attività è attualmente svolta da strutture di ricerca nel campo della genetica molecolare di enti quali: Università, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Società ed Istituti Scientifici. Con tale obiettivo vengono organizzati periodicamente sia corsi teorico-pratici di biologia molecolare di base e di genetica molecolare e citogenetica, sia convegni tematici.

Infine, è assolutamente necessario individuare dei laboratori di riferimento per la validazione analitica dei test e per il controllo di qualità (8). In tal senso, particolare importanza rivestono i programmi per lo sviluppo di sistemi per il controllo di qualità, per ora attivi a livello sperimentale in centri di ricerca quali quello del CNR, operante nella regione con finanziamento della Commissione Europea (9).

<i>Patologie Ereditarie e Neoplasie</i>	<i>Numero di determinazioni/anno</i>
Emocromatosi	40
Fattore V Leiden	200
Oncogeni/Oncosoppressori	210
Fibrosi Cistica	153
Promotore gene UGT-1	100
G6PD (mutazione 563)	20
Fattore VII (Promotore introne 7)	60
Protrombina (mutazione 20210)	150
Glicoproteina piastrinica III AI 1-2	100
MTHFR (mutazione 677)	150
Ricerche sul Diabete	(effettuate ma non quantificate)
Markers Tiroidei	(effettuate ma non quantificate)
Traslocazioni Leucemie Acute	500
Antigeni HLA	200
Talasemie	(effettuate ma non quantificate)
Geni Linfocitari B e T	200
FRAXA	17
Infertilità Maschile	20

Figura 4
Quantità delle analisi molecolari di patologie ereditarie e neoplasie effettuate nei laboratori clinici pugliesi

Questa indagine, che ha consentito di conoscere l'effettiva distribuzione sul territorio della regione dei laboratori pubblici in grado di fornire indagini di biologia molecolare, vuol essere un punto di partenza per altre iniziative. La conoscenza territoriale è fondamentale per la programmazione di una razionale diffusione dei laboratori, al fine

di consentire soluzioni ottimali in termini di efficacia ed efficienza, ottimizzando le risorse ed indirizzando gli investimenti in un settore del laboratorio che ha ancora costi piuttosto elevati in termini di personale specializzato, apparecchiature e reagenti.

RINGRAZIAMENTI

La realizzazione di questo lavoro è stata resa possibile grazie alla collaborazione dei laboratori che hanno aderito all'indagine: ad essi vanno i più sentiti ringraziamenti.

BIBLIOGRAFIA

- Decreto Ministeriale n.150 del 22 luglio 1996: Prestazioni di assistenza specialistica ambulatoriale erogabili nell'ambito del Servizio Sanitario Nazionale e relative tariffe. GURI 1996;216:1-221.
- Assessorato alla Sanità Regione Puglia: Riconoscimento delle strutture specialistiche che possono erogare prestazioni contrassegnate con la lettera "R". Determinazione Dirigenziale n.130 del 14 maggio 1999.
- Correale M, Micelli M, Giannattasio S, Iacobacci A. Brevi considerazioni sulla diffusione delle analisi di biologia molecolare nella Regione Puglia. In stampa.
- Comitato nazionale per la bioetica. Orientamenti bioetici per i test genetici-Sintesi e raccomandazioni 19 novembre 1999 Presidenza del Consiglio dei Ministri- Dipartimento per l'informazione e l'editoria.
- Linee guida per la diagnostica citogenetica. Analysis 1995;8:323-341.
- Genetic Counselling. Analysis 1997;6:258-304.
- La genetica nella programmazione nazionale e regionale. Analysis 1991;3:99-154.
- Losekoot M, Bakker B, Laccone F, Stenhouse S and Elles R. A European pilot quality assessment scheme for molecular diagnosis of Huntington's disease. Eur J Hum Genet 1999;7:217-222.
- EC INCO-Copernicus Project "Molecular genetic testing in phenylketonurie: a model to assess the quality control system for monogenic disease".