



Presidenza del Consiglio dei Ministri

COMITATO NAZIONALE PER LA BIOETICA

COMITATO NAZIONALE PER LA BIOSICUREZZA, LE
BIOTECNOLOGIE E LE SCIENZE DELLA VITA

**Considerazioni sulla conservazione protratta del materiale
biologico residuo dello screening neonatale:
vantaggi, problematiche e situazione italiana**

16 luglio 2010

Presentazione

Il documento è stato elaborato dal Gruppo misto CNB – CNBBSV nell'ambito di un filone di studio e di ricerca dedicato alla genetica umana. Hanno partecipato attivamente, con la coordinazione del Gruppo di lavoro del Prof. Adriano Bompiani, i Proff.: Bruno Dallapiccola, Alberto Piazza, Monica Toraldo di Francia, Giancarlo Umani Ronchi, per per il Comitato Nazionale per la Bioetica (CNB). Per il Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita (CNBBSV), hanno partecipato il Prof. Giuliano D'Agnolo, la Prof.ssa Paola Izzo, il Dott. Ivano Giacomelli. Hanno collaborato inoltre, in qualità di esperti, la Dr. Valentina Coppola, il Dr. Carlo Corbetta, il Prof. Roberto Cerone, la Dr.ssa Antonella Olivieri e il Dr Carlo Petrini.

Presentato nella riunione plenaria del 25 marzo, ed esaminato nelle successive plenarie del 23 aprile e del 16 luglio, il documento è stato approvato dal CNB a seguito di ampia discussione nella plenaria del 16 luglio 2010, con il voto favorevole dei Proff. Amato, Battaglia, Bompiani, Dallapiccola, d'Avack, Di Segni, Flamigni, Forleo, Garattini, Isidori, Neri, Nicolussi, Palazzani, Piazza, Scaraffia, Toraldo di Francia, Umani Ronchi, Zuffa. Il Prof. D'Agostino si è astenuto dal voto. I Proff. Canestrari e Possenti, assenti alla seduta, hanno dato la loro adesione.

Prof. Francesco Paolo Casavola
Presidente del CNB

PREMESSA

Il CNB e il CNBBSV hanno ritenuto opportuno – con questo Documento – portare l’attenzione su un aspetto particolare offerto dallo “screening” neonatale obbligatorio di alcune malattie congenite curabili, eseguito su poche gocce di sangue raccolte alla nascita su opportuna carta da filtro (Guthrie card o cartoncino per screening neonatale), e cioè sulla conservazione protratta del materiale residuo all’esecuzione diretta dei test previsti dalla normativa vigente. In particolare, si propone di definire criteri per una conservazione uniforme, da adottare nei vari Centri di screening italiani, dei materiali residui dello screening neonatale sia obbligatoria per tempi brevi, sia volontaria per tempi prolungati, a seconda degli obiettivi che si intendono raggiungere e le risorse disponibili.

Non si intende, cioè con il presente Documento affrontare l’argomento - più ampio sul piano etico e giuridico – dell’indagine genetica condotta sul minore (in particolare sul neonato) per scopi medico-sanitari, argomento che i due Comitati si riservano eventualmente di esaminare in futuro. Si tratta, al momento, di proporre un completamento ad una legge nazionale dimostratasi sotto molti aspetti benefica ai fini della tutela della salute umana, ma gestita con una sostanziale spontaneità organizzativa e diversità dei comportamenti nei diversi Centri operativi – in merito alla conservazione dai campioni originali - che risulta opinabile sotto diversi aspetti.

Questa difformità può essere fonte di inconvenienti per il nato, allorché in presenza della necessità “tecnica” di replicare le analisi, il campione sia stato distrutto subito dopo le determinazioni iniziali; ma è fonte anche di una preoccupante perdita di conoscenza, almeno potenziale, di informazioni scientifiche e cliniche che potrebbero derivare dai campioni in tempi successivi.

Si affaccia dunque in Italia, come è avvenuto in altri Paesi, la necessità di definire regole per la conservazione protratta dei campioni, applicabile in tutti i Centri, per tempi e criteri proporzionati alle finalità che si intendono perseguire.

In questo contesto, una accurata riflessione sui criteri da adottare per una sicura conservazione dei campioni appare opportuna, anche allo scopo di evitare possibili comportamenti abusivi nell'impiego del materiale (¹).

Struttura del documento

Si è ritenuto opportuno ripartire la trattazione in due capitoli.

Il primo raccoglie brevi informazioni generali sugli screening neonatali oggi praticati in molti Paesi e sui criteri di fattibilità che hanno consentito la loro regolare attivazione (1° paragrafo). In un secondo paragrafo viene descritta – succintamente – la situazione italiana oggi vigente.

Il secondo capitolo esamina i problemi specifici connessi con la conservazione nel tempo dei campioni residui degli screening neonatali, per quanto riguarda obiettivi, criteri di tutela sanitaria, giuridica e bioetica dei neonati dai quali sono stati prelevati i campioni, distinguendo le ipotesi della conservazione breve (per finalità prevalente nell'interesse del nato) e conservazione prolungata, nella fattispecie considerando il neonato come “donatore” del campione per possibile utilizzazione dello stesso per finalità di ricerca biomedica.

In “Appendice”, infine, vengono raccolti e illustrati aspetti prevalentemente “tecnici”, che illustrano ipotesi di realizzazione del dispositivo risultante dalle riflessioni compiute dai due Comitati, secondo le rispettive competenze, auspicando che i problemi del riordinamento e del potenziamento di questo settore vengano affrontati nelle sedi decisionali opportune.

¹ Come è noto, è stato segnalato nel Texas un episodio di utilizzazione non concordata di 800 campioni di spot di Guthrie per costruire una base dati sul DNA mitocondriale da parte di un laboratorio della organizzazione militare.

CAPITOLO 1

RICHIAMI GENERALI SUGLI SCREENING NEONATALI

Il termine “screening neonatale” definisce i programmi di medicina preventiva secondaria, attivati su larga scala nei primi giorni di vita, aventi per obiettivo la selezione precoce ed il tempestivo trattamento di neonati ad alto rischio per alcune patologie congenite, curabili, caratterizzate principalmente da un’importante mortalità precoce e/o da una morbilità severa dei soggetti affetti.

1) Esempi dei programmi e relative tecniche

Più di cinquant’anni fa, nel 1963, un ricercatore americano, Robert Guthrie, mise a punto il primo test di laboratorio (che ancora oggi porta il suo nome: “Test di Guthrie”), che consentiva di misurare la concentrazione dell’aminoacido fenilalanina in una goccia di sangue, prelevata mediante una semplice puntura del tallone del neonato, fatta assorbire, e quindi essiccare, su una speciale carta da filtro (Guthrie card o cartoncino per screening neonatale). Questo test, a basso costo ed eseguibile facilmente su larga scala, ha consentito di realizzare le prime campagne di screening neonatale per individuare i neonati affetti da Fenilchetonuria (PKU), il più comune errore congenito del metabolismo, caratterizzato da un grave ritardo mentale.

In una successione temporale ormai storica, alla fenilchetonuria si aggiunse, fra le patologie con indicazione assoluta per lo screening neonatale, l’ipotiroidismo congenito e, nei successivi quarant’anni di sviluppo, altre numerose malattie, principalmente genetiche, quali endocrinopatie, errori congeniti del metabolismo, emoglobinopatie risultarono idonee, per caratteristiche cliniche complessive, ad essere oggetto di screening neonatale.

Tradizionalmente, i programmi di screening neonatale utilizzano, come indicatori biologici di patologia, analiti - principalmente ematici - la cui misura quantitativa o valutazione qualitativa permette, con sufficiente efficienza, la selezione dei soggetti a maggior rischio presenti nella popolazione neonatale. In alcuni programmi, l’analisi di laboratorio è rivolta alla misura di substrati accumulati nei liquidi biologici, con differenti meccanismi: a) alterata

utilizzo o trasformazione, da deficit enzimatico, di un substrato in un processo biochimico (PKU: Fenilalanina; Galattosemia: Galattosio; Iperplasia Surrenalica Congenita: 17-alfa OH Progesterone); b) ostruzione meccanica (Fibrosi Cistica: Tripsina Immunoreattiva); c) attivazione fisiologica di un fenomeno di feedback (Ipotiroidismo: TSH). In altri è la carenza/riduzione di un substrato l'indicatore di una situazione di rischio (Ipotiroidismo: T4) o, ancora, è la presenza di metaboliti anomali, assenti in condizioni normali. (Emoglobinopatie). Infine, lo screening può essere condotto mediante la misura o valutazione qualitativa di una specifica attività enzimatica (Galattosemia: attività dell'enzima Galattosio-1-P-uridiltransferasi). Nei primi giorni di vita esiste una "cronologia" delle concentrazioni dei singoli markers, che risentono fortemente delle modificazioni biologiche che avvengono, con il passare delle ore, nel delicato periodo perinatale d'adattamento biochimico alla vita autonoma: il momento della raccolta del campione per screening neonatale deve essere quindi opportunamente scelto in finestre temporali che garantiscano, in presenza della patologia, livelli ottimali per la misura/valutazione dell'analita, al fine d'ottenere l'efficienza (sensibilità + specificità) massima del sistema.

2) Gli screening neonatali nella "politica di prevenzione" in sanità

Vi è oggi un largo consenso internazionale nel considerare gli screening neonatali di massa come un modello per molti degli screening di popolazione; per valutazione comune, essi rappresentano un intervento essenziale, insieme ai programmi di prevenzione della malnutrizione e delle infezioni, per assicurare il migliore "outcome", in termini di salute, alla popolazione neonatale. Con evidenti ricadute positive per lo sviluppo successivo e la salute del soggetto che - trovato affetto dalla patologia indagata - possa essere tempestivamente curato.

Vi è, poi, sicuramente un parallelismo fra importanza dello screening neonatale ed evoluzione economica e sociale.

Lo screening neonatale è tanto più importante quanto più avanzato è il livello economico e sociale della popolazione: quanto più la struttura familiare evolve da un modello di famiglia di grandi dimensioni, con alta morbilità e

mortalità infantile (tipico dei paesi meno avanzati) a modelli di più ridotte dimensioni (basso indice riproduttivo), tanto più sono stimolati gli interventi preventivi sin dalla nascita, tra cui quelli affidati agli screening metabolici, per assicurare una migliorata sopravvivenza e sviluppo infantile.

3) L'evoluzione della tecnologia e l'ampliamento della potenzialità di screening

I metodi enzimologici, applicati dall'inizio della raccolta agevole e in quantità ridotta dei campioni di sangue dal neonato e veicolati sul supporto cartaceo (a sua volta facilmente conservabile e di limitato ingombro) sono ancora in uso per le diagnosi previste in molti Paesi per fenilchetonuria, ipotiroidismo congenito e fibrosi cistica.

Va sottolineato però che dagli anni '60, l'evoluzione tecnologica ha offerto sempre maggiori possibilità di ampliare le tecniche di laboratorio applicate allo screening neonatale, fornendo la possibilità d'utilizzare – su larga scala - un numero sempre maggiore di biomarcatori per la selezione di malattie. Negli anni '90 si afferma progressivamente la possibilità di superare il concetto “un marcatore, una malattia” per raggiungere il modello tecnico-organizzativo “più marcatori simultanei per molte malattie”: una nuova visione multi-parametrica o di piattaforma analitica nell'esecuzione laboratoristica dello screening, che tende a modificare la struttura dei programmi di screening neonatale. La tecnologia che oggi meglio risponde a questa visione è quella di spettrometria di massa (*tandem mass spectrometry*), che fu sviluppata per merito dei ricercatori della Duke University e del “Newborn Screening Laboratory” (North Carolina, USA), sul finire degli anni '80. La nuova visione dello screening neonatale, introdotta - a livello internazionale nel 2006 dal lavoro congiunto dell'American College of Medical Genetics (ACMG) e dell'American Academy of Pediatrics (AAP) statunitensi - ha di fatto avviato la nuova rivoluzionaria fase del cosiddetto “screening esteso”, ossia la programmazione dinamica di screening neonatali rivolti, in particolare mediante l'uso di tecnologia *tandem mass* e/o di piattaforme “multiplex”, verso un numero sempre maggiore di gruppi di patologie “rare” in cui la diagnosi precoce postnatale rappresenta il cardine fondamentale di un intervento medico e sociale di beneficio per il soggetto affetto, per la famiglia e per la collettività.

L'interesse della segnalazione agli scopi di questo documento, sta nel fatto che la applicazione della *tandem mass spectrometry* può avvenire da campioni eluiti da spot ematici assorbiti su cartoncino di Guthrie come una crescente letteratura analitica va confermando.

4) Il cartoncino per la raccolta di sangue neonatale destinato ai test di screening

È utile completare questa succinta analisi degli aspetti tecnici con una breve descrizione del dispositivo che consente la raccolta sia dei dati anagrafici che dei campioni materiali di sangue neonatale. E' atteso, presso i Centri di Screening Italiani, un processo di adeguamento che prevede l'utilizzo di un supporto cartaceo in cui le due parti (dati anagrafici e spots di sangue) siano facilmente separabili. L'utilizzo di tale supporto consentirebbe, successivamente al processo diagnostico, di "anonimizzare" i campioni per la conservazione delle parti non utilizzate (spot residui), secondo le modalità "a breve termine" o "protratte" che più oltre verranno descritte.

Il dispositivo medico (cartoncino) per la raccolta di sangue utilizzato nello screening neonatale è infatti costituito da due componenti principali: a) modulo per la raccolta di dati demografici e sanitari del neonato; b) carta da filtro per la raccolta del campione ematico di sangue capillare, prelevato – usualmente – mediante puntura del tallone. La carta da filtro utilizzata è altamente standardizzata (in particolare, per caratteristiche di capacità e volume d'assorbimento del sangue) e risponde alle specifiche definite dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) statunitense [CLSI, 2007]. In adesione alle specifiche del citato documento, la U.S. Food and Drug Administration ha attualmente registrato due sole tipologie di carta da filtro per la raccolta del sangue neonatale, come dispositivi di Classe II: carta da filtro "Filter Paper Whatman 903" prodotta da Whatman International LTD – UK e "Filter Paper Ahlstrom 226" prodotta da Ahlstrom Corporation, Finland.

I differenti lotti di produzione sono sottoposti a verifiche tecniche comparative dal Center for Disease Control and Prevention (CDC) di Atlanta (USA) e, in Europa, i cartoncini per screening realizzati con le due citate carte da filtro devono ottenere, per l'uso in ambito sanitario come dispositivi medici

per la diagnostica in vitro, il marchio CE previsto dalla direttiva 98/79/EC dell'Unione Europea.

5) Lo screening neonatale in Italia: programmi obbligatori e centri pubblici operanti

In Italia lo screening neonatale (presente con iniziative locali o regionali a partire dal 1972) è obbligatorio dall'anno 1992, ai sensi dell'art.6, comma 2 della Legge 104/1992 e del successivo decreto applicativo DPCM 9/07/1999 (Appendice 1) per le seguenti patologie congenite: ipotiroidismo congenito (IC), fibrosi cistica (FC), fenilchetonuria (PKU). In base all'autonomia di iniziativa conferita alle Regioni, sono attualmente attivi in Italia anche programmi di screening per: Galattosemia, Leucinosi, Deficit di Biotinidasi, Omocistinuria, Iperplasia Surrenica Congenita, deficit di glucosio-6-Fosfato Deidrogenasi, in generale presso strutture universitarie, o istituti di ricerca od alcuni ospedali.

Per quanto riguarda i programmi obbligatori per legge, e come evidenziato dai rapporti annuali della Società Italiana Screening Neonatali – SISN, nel nostro Paese sono attivi complessivamente 32 Centri di Screening neonatale a bacino d'utenza diversificato per estensione (Sub-Regionali, Regionali, Inter-regionali) e numerosità campionaria (da < 5.000 nati/anno a > 100.000 nati/anno), che attualmente eseguono i differenti programmi territoriali, secondo la programmazione definita dall'Autorità regionale di competenza (Appendice 2). Fin dalla metà degli anni '90, il programma nazionale di screening neonatale garantisce la copertura totale dei nati (anno 2007: 580.700) per due delle patologie obbligatorie per legge (PKU, IC), mentre l'indice di copertura per le altre malattie risulta variabile e comunque inferiore al 90% dei nati, incluso il programma per Fibrosi Cistica (obbligatoria a sensi di legge).

L'evoluzione internazionale delle indicazioni per l'attivazione di programmi di screening neonatale (in particolare rivolti non più alla singola patologia ma a gruppi omogenei di patologie, come gli errori congeniti del metabolismo) ha promosso anche in Italia l'avvio di programmi, in massima parte sperimentali o pilota, per lo screening e la diagnosi precoce di nuove malattie.

Questa evoluzione è stata resa possibile soprattutto dall'applicazione allo screening neonatale di metodologie ad alta tecnologie (spettrometria di massa

ESI-LC-MSMS o *tandem mass spectrometry*): attualmente sono già attivi nel nostro paese alcuni programmi integrativi di screening esteso che prevedono l'applicazione per oltre 30 malattie metaboliche rare.

In particolare, le Regioni italiane in cui è attivo un programma di screening neonatale esteso o sono in corso verifiche di progetti di fattibilità sono le seguenti:

Toscana: programma di screening neonatale esteso con bacino d'utenza regionale, in esecuzione di specifico dispositivo legislativo della regione Toscana.

Liguria: programma pilota di screening neonatale esteso con bacino d'utenza regionale, approvato dalle autorità sanitarie regionali, con raccolta di consenso informato parentale.

Lazio: programma pilota di screening neonatale esteso, con bacino d'utenza regionale parziale.

Veneto, Emilia Romagna, Sicilia: promulgazione di delibere regionali per l'attivazione in tempi brevi di programmi di screening esteso.

Lombardia, Marche, Campania: sono in corso verifiche di progetti di fattibilità, non ancora approvati né attivati da parte delle Autorità regionali competenti.

In Appendice a questo documento vengono fornite alcune informazioni sulla consistenza della attività dei Centri per un anno campione.

Osservazioni e proposte ritenute opportune per il potenziamento dell'attività dei Centri verranno fornite nel corso dell'esposizione.

6) I criteri generali applicabili ad ogni screening anche sotto l'aspetto dei costi-benefici

Come è noto per essere praticabili e risultare strumenti efficaci di politica sanitaria, gli screening debbono rispondere a requisiti ormai ben definiti risultanti da una cospicua letteratura internazionale e nazionale ed anche da esperienze pratiche condotte in più Paesi. Questi criteri generali valgono anche

per gli screening neonatali attivati in vari Paesi, ed anche in Italia con modalità universali per tutti i nati e con procedure obbligatorie stabilite dalla legge.

Si ritiene opportuno richiamare in nota quanto è stato di recente previsto in sede di Consiglio d' Europa nel *“Protocollo addizionale alla Convenzione sui diritti umani e la biomedicina concernente i test genetici a scopo medico al capitolo 8 , “Screening genetici: programmi per finalità sanitarie (art.19) (*VEDI NOTA).²*

Si tratta come appare evidente, di norme quadro, che vanno tenute presenti anche nel caso si voglia andare “oltre” l'esecuzione dei test e la consegna del risultato ai genitori dell'interessato, ma si ritenga opportuno attivare la conservazione protratta del campione (come più avanti verrà precisato).

Fra gli aspetti generali da considerare v'è anche la valutazione del parametro costo/beneficio. Infatti non è sufficiente accertare i criteri di validità, di efficienza, di accesso ottimale ai programmi e l'adeguata informazione della popolazione, ma occorre anche verificare la fattibilità economica, con il criterio costo-beneficio, divenuto nel tempo sempre più importante.

Segnaliamo che i criteri richiamati dal Consiglio d'Europa sono adottati in tutti i Paesi che hanno non solamente promosso gli screening con risposte dirette del risultato e successiva distruzione del campione, ma si applicano anche per la conservazione protratta del materiale biologico residuo. Il parametro costo/beneficio è stato valutato favorevole per l'applicazione

² Il capitolo VIII “Screening genetici: programmi per finalità a scopo medico”, recita:

Chapter VIII- Genetic screening programmes for health purposes. Article 19- A health screening programme involving the use of genetic tests may only be implemented if it has been approved by the competent body. This approval may only be given after independent evaluation of its ethical acceptability and fulfilment of the following specific conditions: a) the programme is recognised for its health relevance for the whole population or section of population concerned; b) the scientific validity and effectiveness of the programme have been established; c) appropriate preventive or treatment measures in respect of the disease or disorder which is the subject of the screening, are available to the persons concerned; d) appropriate measures are provided to ensure equitable access to the programme; e) the programme provides measures to adequately inform the population or section of population concerned of the existence, purposes and means of accessing the screening programme as well as the voluntary nature of participation in it.

universale ai nati anzitutto per l'esecuzione dei test, ma negli Stati sanitariamente più avanzati, anche per la conservazione protratta in ragione delle opportunità offerte, come materiali preziosi sia per ricerche di base genetiche che applicate. Si ha notizia che dal materiale conservato nella biobanca natologica danese sono state elaborate una decina di metanalisi GWA, ovviamente sfruttando solo parte del numerosissimo campione. Se questi studi produrranno un reale beneficio in termini di aumento del livello di salute (benessere) di una classe di pazienti (o di singoli cittadini supposti sani) rimane – come per tutti questi studi – da stabilire. Ulteriori dati verranno forniti nell'Appendice a questo documento.

CAPITOLO 2

LA CONSERVAZIONE PROTRATTA

1) *Premessa*

La conservazione protratta dei cartoncini è ormai riconosciuta, dalla comunità scientifica nazionale ed internazionale, come uno strumento indispensabile per utilizzare a pieno le elevate potenzialità del campione perseguendo due obiettivi:

ai fini di una migliore tutela della salute del bambino in crescita- ove si ritenga necessario integrare con nuovi test il profilo analitico iniziale, o sorga la necessità di utilizzarlo a fini medico-legali, etc.

2) allo scopo di valorizzare un patrimonio biologico insostituibile per l'avanzamento delle conoscenze scientifiche, applicabili alla tutela della salute pubblica.

Come in molti argomenti, i problemi della biomedicina e della bioetica debbono trovare un punto di mediazione soddisfacente tra gli interessi personali e quelli pubblici, secondo l'aforisma del ben noto Codice dell'attività medica e di ricerca riguardante i profili dei diritti dell'uomo che recita:

“L'interesse ed il bene dell'essere umano debbono prevalere sul solo interesse della società e della scienza”³

Sebbene nel caso che andiamo a prospettare non si tratti di azioni dirette sulla corporeità umana ma di utilizzazioni differite nel tempo di campioni dalla stessa corporeità derivanti, è evidente che l'aforisma sopra ricordato ha valenza nella misura in cui è stato tradotto dalla Raccomandazione del Consiglio

³ Si tratta dell'articolo 2 della “Convenzione per la protezione dei diritti dell'uomo e della dignità dell'essere umano a riguardo dell'applicazione della biologia e delle medicina (Oviedo 4/06/1997). La raccomandazione Rec (2006) 4 citata è stata adottata nel corso della 958° Riunione di delegati dei Ministri il 15 Marzo 2006.

d'Europa REC (2006) 4 rivolta dal Comitato dei Ministri agli Stati membri sulla ricerca utilizzando materiale biologico di origine umana.

Ciò premesso, conviene dare uno sguardo anzitutto ai vantaggi espressi in linea generale dalla conservazione protratta per passare poi alla ricognizione dell'applicazione di tale provvedimento in altri Paesi, e parzialmente in Italia, e terminare con l'esposizione dei criteri validi a consentire il rispetto dei diritti della persona e gli interessi della Comunità in merito alla eventuale utilizzazione dei campioni per ricerca biomedica.

2) Vantaggi della conservazione protratta

La conservazione protratta, secondo gli obiettivi generali sopra definiti, può presentarsi in due varianti:

a) conservazione per tempi relativamente brevi ritenuti necessari all'assolvimento dei maggiori impegni precauzionali esclusivamente a favore della salute del neonato.

Tempi suggeriti: 2 anni

Potrà definirsi: CONSERVAZIONE BREVE OBBLIGATORIA.

b) conservazione prolungata, per obiettivi prevalentemente scientifici.

Potrà definirsi: CONSERVAZIONE PROTRATTA VOLONTARIA.

Naturalmente si tratta di uno schema generale, che può essere come di seguito illustrato.

I principali vantaggi derivanti dalla conservazione protratta si possono riassumere nei seguenti punti:

1- Con prevalente ricorso alla conservazione breve:

a) Conferma diagnostica: la conservazione dei cartoncini consente di effettuare test di approfondimento biochimico per la conferma diagnostica delle patologie oggetto di screening, e per necessità di ampliamento diagnostico per esigenze assistenziali sopravvenute, che la conservazione degli spot su cartoncino consenta con appropriata metodologia analitica.

b) Aspetti medico-legali: la conservazione dei cartoncini consente anche di effettuare test analitici in risposta a richieste specifiche di carattere medico-legale, ad esempio a seguito di morte precoce del neonato o di azioni legali intraprese dalla famiglia.

Al riguardo di questi due primi obiettivi si debbono sottolineare i vantaggi derivanti dalla non immediata eliminazione del campione oppure allorché la conservazione sia mantenuta anche per un arco temporale relativamente breve. In casi particolari, questa pratica mette le famiglie di un neonato eventualmente deceduto nel frattempo, nella condizione di disporre di tracce biologiche di potenziale interesse, ad esempio per addivenire a posteriori a una diagnosi clinica non effettuata in vita o per effettuare indagini molecolari familiari di interesse per i genitori nella prospettiva di monitorare future gravidanze a rischio. Queste opportunità sono state sperimentate e utilizzate con successo, a partire dagli anni '90, e sono stati proprio alcuni Centri di Genetica Medica Italiani a dimostrare come un singolo spot di Guthrie poteva essere utilizzato a distanza di mesi o di anni dalla morte di un piccolo paziente, deceduto senza diagnosi, per formulare una diagnosi o validare a posteriore un sospetto clinico e offrire alla famiglia una consulenza genetica mirata in termini di rischio riproduttivo e eventuale controllo delle gravidanze a rischio. Sono illustrativi gli esempi dell'identificazione di mutazioni omozigoti nel gene SMN in neonati morti pochi giorni dopo il parto per atrofia muscolare spinale tipo 1 (malattia di Werdnig-Hoffman) oppure la diagnosi a posteriori di delezione 22q11.2 in neonati morti per sindrome di DiGeorge/velo-cardio-facciale. Un altro esempio – anch'esso ripetutamente sperimentato in Italia – riguarda il rene policistico infantile. Questa malattia rara a eredità autosomica recessiva, viene trasmessa da genitori eterozigoti (portatori sani) in media al 25% dei loro figli, indipendentemente dal sesso. Si tratta di una condizione di solito letale nel periodo perinatale. La diagnosi del gene-malattia è complessa e, come tale, renderebbe problematico lo studio diretto del gene-malattia nelle successive gravidanze dei genitori a rischio. Questa difficoltà può essere aggirata identificando, mediante l'analisi di marcatori polimorfi che fiancheggiano il gene-malattia sul braccio corto del cromosoma 6, il cromosoma parentale che porta la mutazione che, per definizione, presenta polimorfismi diversi dal cromosoma senza mutazione. La ricostruzione della fase di segregazione richiede l'analisi comparativa degli stessi marcatori sui genitori e sul figlio. Nel caso di un neonato deceduto, questa analisi può essere effettuata su uno spot di Guthrie, consentendo alla famiglia di acquisire a posteriori una informazione critica per il futuro monitoraggio delle loro gravidanze a rischio.

2- Con prevalente ricorso alla conservazione per tempi protratti.

Si ricordano due obiettivi fondamentali:

a) Miglioramento della metodologia e sviluppo di nuovi test di screening: la conservazione consente di utilizzare il materiale residuo per il miglioramento dei test di screening già esistenti e per la messa a punto di nuove strategie analitiche finalizzate allo screening.

Va chiarito che, in generale, ogni cartoncino raccoglie un numero variabile (da 4 a 6 o più) macchie (spot) di sangue intero disidratato, ognuna delle quali corrisponde ad un volume ematico di circa 50 -75 microlitri. Generalmente, dopo l'esecuzione dei test di screening, il materiale biologico residuo è rappresentato mediamente da 1-2 spot di sangue. La disidratazione stabilizza gli analiti presenti nel sangue per un tempo di conservazione, variabile da molecola a molecola, che può essere ulteriormente incrementato con conservazione a temperatura refrigerata (-20°C, - 70°C). Come detto precedentemente, sono oggi numerose le metodologie di laboratorio applicabili a tale materiale biologico per la rilevazione e/o la misura di un numero assai vasto di analiti, utilizzati come markers fisiopatologici in numerosi ambiti di medicina di laboratorio (biochimica clinica, endocrinologia, virologia, ematologia, etc.), e gli spot residui sono stati in numerosi casi utilizzati per validare precedenti metodologie o introdurre di nuove e più selettive.

b) Ricerca biomedica. Il campo già attualmente esplorato è vasto, così che se ne darà in questa sede solo alcuni esempi.

Oltre alle specifiche e non comuni potenziali applicazioni di questi campioni residuali per finalità diagnostiche d'interesse per alcune famiglie, la disponibilità di una banca anonimizzata di DNA, per le sue di dimensioni straordinarie, offre opportunità di ricerca scientifica uniche. E' noto che 1-3% del genoma interindividuale è diverso per la presenza di mutazioni, per lo più relativamente comuni (polimorfismi). Queste variazioni spiegano le differenze tra le persone, non solo a livello del fenotipo clinico, ma anche della suscettibilità o della resistenza nei confronti delle malattie comuni e della risposta individuale ai farmaci (farmacogenetica). Una delle acquisizioni più significative prodotte dalla cosiddetta rivoluzione genetica riguarda lo sviluppo di tecnologie in grado di analizzare su larga scala l'intero genoma, alla ricerca

delle variazioni correlate ai fenotipi complessi. Tutte queste ricerche non possono prescindere dalla conoscenza della distribuzione e della frequenza dei singoli polimorfismi all'interno delle popolazioni, a partire dalla quale specifiche deviazioni possono poi essere correlate con le malattie, fornendo le basi alla valutazione dei rischi e delle resistenze individuali, che sono alla base della medicina personalizzata.

Le possibilità d'estrazione da questo materiale biologico di acidi nucleici (in particolare DNA) consente l'utilizzazione di metodiche di genetica molecolare, sia a scopo diagnostico che di ricerca [Hollegaard 2007].

Inoltre, è stato dimostrato molto recentemente che gli spot di sangue su cartoncino conservati a temperatura ambiente, possono essere utilizzati anche per l'estrazione di RNA rendendo possibile in tal modo, l'analisi quantitativa dell'espressione genica. (Haak 2009).

A titolo esemplificativo, si ricorderà che la conservazione a lungo termine dei cartoncini costituisce certamente una risorsa insostituibile per la realizzazione di "genome-wide associated studies" finalizzati alla ricerca di nuovi marcatori di suscettibilità per le patologie rare oggetto dello screening, ma anche per altre patologie rare per le quali ancora non è disponibile un test di screening, per le patologie più comuni che affliggono la popolazione (sia in età infantile che in età adulta). Infatti, le più attuali tecniche di genotipizzazione e la possibilità di ottenere adeguate quantità di materiale genomico con procedure di amplificazione genomica da DNA estratto da un unico spot, rendono possibile lo studio di molteplici varianti genetiche [Green 2006, Paynter 2006, Sorensen 2007], e consentono di collegare tali dati con le vicende cliniche, offrendo la possibilità di realizzare studi etiologici mirati (Hollegaard, 2009).

La conservazione protratta dei cartoncini consente anche studi di popolazione finalizzati all'approfondimento delle conoscenze sulla "interazione geni-ambiente" nelle patologie multifattoriali, ricercando sia polimorfismi in geni che codificano per enzimi coinvolti nel metabolismo di sostanze chimiche di sintesi la cui esposizione è associata a patologie neonatali [Olshan AF 2005], sia misurando la presenza stessa di tali sostanze sullo spot di sangue. E' stato dimostrato infatti, che gli spot di sangue residui forniscono materiale biologico

adatto e sufficiente alla identificazione e/o quantificazione di marcatori di esposizione (metalli pesanti, residui di pesticidi o dell'attività industriale, interferenti endocrini in genere) potenzialmente coinvolti nell'eziopatogenesi di alcune malattie [Olshan AF 2007]. Utilizzando la cromatografia bidimensionale e la tandem mass spectrometry di assorbimento atomico è possibile documentare anche tracce di metalli, al fine di quantificare esposizioni prenatali nocive avvenute anche molti anni prima, in studi di ricerca ambientale, con effetti sulla salute (Olshan 2007; Chaudury, 2009).

Infine, su spot di sangue conservato a temperatura refrigerata è possibile effettuare con tecniche microanalitiche che utilizzano volumi < 100 nl (Philips 2001), la determinazione di marcatori di natura proteica, o la ricerca di agenti infettivi (Croom 2006, McDade 2007).

E' importante da ultimo sottolineare la grande rappresentatività che tali studi possono avere, dal momento che l'elevato numero dei campioni disponibili rende possibile sia la valutazione dell'esposizione ad una certa sostanza all'interno di una popolazione, sia la valutazione di un trend temporale dell'esposizione analizzando, per un periodo di osservazione sufficientemente rappresentativo, spot di sangue di neonati provenienti dalla stessa area geografica [Spliethoff HM 2008].

3) *Situazione internazionale sulla conservazione protratta del materiale residuo dei test di screening*

Per le sue caratteristiche, il materiale residuo dello screening neonatale rappresenta dunque una fonte biologica di estremo rilievo per le possibilità di una sua utilizzazione in ambito biomedico, tossicologico e forense. Vi è quindi una crescente consapevolezza delle potenzialità di tale materiale anche a fini di nuove ricerche, ciò che determina una sempre maggiore attenzione della comunità scientifica ed una tendenza a realizzare progetti e strutture per una conservazione protratta di tale materiale. Tuttavia, al momento, le procedure amministrative e giuridiche per la sua conservazione non sono ancora definite o, se esistenti, sono fortemente disomogenee nelle differenti Nazioni. In Nuova

Zelanda e in alcuni Stati degli USA, come in Nord Carolina e in Michigan, i cartoncini vengono conservati a tempo indeterminato [www.nsu.govt.nz/index.asp]; nel Regno Unito il tempo di conservazione varia da regione a regione (da 2 mesi a tempo indeterminato), anche se mediamente i cartoncini vengono conservati per 5 anni [<http://newbornbloodspot.screening.nhs.uk/>]; anche in Australia il tempo di conservazione varia da regione a regione (da 2 anni nell’Australia Occidentale ad un tempo indeterminato nello Stato di Victoria) [www.genetics.edu.au]; in Francia vengono conservati per almeno 1 anno, in Olanda per 5 anni [Cousin-Frankel 2009], in Germania almeno per 3 mesi e fino a 5 anni [www.screening-dgns.de/index.php].

A fronte di una situazione internazionale molto diversificata, la più antica e vasta esperienza di conservazione dei materiali residui dello screening neonatale rimane ancora oggi l’esperienza nazionale danese, con la costituzione, avvenuta nel 1982, della “*Danish Newborn Screening Biobank*” che conserva attualmente circa 1.8 milioni di campioni neonatali. In questa biobanca tutti i campioni sono collegati ad un database rappresentato da un Registro Nazionale (*Central Personal Register*) che identifica i soggetti attraverso un codice unico e che, collegandosi ad altri registri nazionali di patologia, consente di risalire ad informazioni sulla occorrenza delle diverse malattie. Tale sistema ha permesso, nel corso degli anni, la realizzazione di numerosi studi eziologici ed epidemiologici, previa approvazione di un comitato etico ed un comitato scientifico ad hoc (Steering Committee for Scientific Use of the NBS-Biobank), [Norgaard-Pedersen 2007]. E’ importante sottolineare, che nella “*Danish Newborn Screening Biobank*” i genitori autorizzano la conservazione dei cartoncini residui. Infatti, prima della raccolta del campione (che viene effettuata tra la quinta e la settima giornata di vita), i genitori ricevono, da parte di personale sanitario deputato, informazioni sul programma di screening e sulle finalità della conservazione protratta del materiale biologico residuo. Queste ultime riguardano fondamentalmente la possibilità di usare i campioni biologici successivamente allo screening per (in ordine di importanza) a) la ripetizione dei test di screening e per un successivo uso diagnostico durante l’infanzia, b) l’assicurazione di qualità ed il miglioramento delle metodiche analitiche, e c) l’utilizzo a scopi di ricerca. Una volta ricevute tali

informazioni, i genitori possono scegliere se firmare l'autorizzazione per la conservazione dei campioni al momento dello screening, o se esprimere il loro consenso successivamente.

Per ciò che riguarda quest'ultimo aspetto, ovvero il rilascio da parte dei genitori di una autorizzazione alla conservazione protratta dei cartoncini residui, non sono molte le informazioni disponibili e -in ogni caso- la posizione dei vari Paesi in merito, sembra fortemente diversificata (TAB.1). Ad esempio, in Australia o nel Regno Unito i programmi di screening non prevedono il rilascio di un consenso da parte dei genitori per la conservazione dei cartoncini, mentre invece in Olanda i cartoncini vengono conservati per 5 anni e ai genitori viene offerta la possibilità di firmare un "non assenso" alla conservazione protratta (*opting out*). Infine, in Nuova Zelanda è stata di recente emanata una proposta di raccomandazioni, da parte del locale Ministero della Salute, che prevedono la conservazione per almeno 16 anni con un consenso alla conservazione da parte dei genitori [NSU, 2008].

Da quanto fin qui esposto appare evidente come si stia diffondendo una sempre maggiore tendenza a realizzare una conservazione protratta di tale materiale. Ciò ha indotto, *l'American College of Medical Genetics*, nell'aprile del 2009, a divulgare proprie raccomandazioni per la conservazione protratta degli oltre quattro milioni di cartoncini relativi ai neonati screenati ogni anno, quale materiale residuale dello screening neonatale negli USA [www.acmg.net].

Tab. 1. Situazione internazionale sulla conservazione protratta del materiale residuo dei test di screening

PAESE	TEMPO DI CONSERVAZIONE	CONSENSO DEI GENITORI ALLA CONSERVAZIONE PROTRATTA	NON CONSENSO DEI GENITORI ALLA CONSERVAZIONE PROTRATTA (<i>opting out</i>)
Danimarca ¹	tempo indeterminato	SI	NO
Nuova Zelanda ²	tempo indeterminato (almeno 16 anni)	SI	NO
Nord Carolina ³	tempo indeterminato	NO	NO
Michigan ³	tempo indeterminato	NO	NO

UK⁴	tempo variabile regione-regione (mediamente 5 anni)	NO	NO
Australia²	tempo variabile regione-regione (2 mesi - t. indeterminato)	NO	NO
Germania^{2,5}	tempo variabile regione-regione (3 mesi – 5 anni)	Informazioni non disponibili	Informazioni non disponibili
Italia⁶	tempo variabile regione-regione	NO	NO
Israele²	1 mese	Informazioni non disponibili	Informazioni non disponibili
Francia³	almeno 1 anno	Informazioni non disponibili	Informazioni non disponibili
Olanda³	5 anni	NO	SI

Referenze

1. J Inherit Metab Dis 2007, 30:530
2. www.nsu.govt.nz/index.asp
3. Science 2009, 324:166
4. <http://newbornbloodspot.screening.nhs.uk/>
5. www.screening-dgns.de/index.php
6. www.sismme.it/sisn

4) Attuale conservazione del materiale residuo dei test di screening neonatale in Italia

Anche se è prassi consolidata di molti Centri Screening conservare per periodi protratti i materiali residui dello screening, non esiste al momento una specifica normativa nazionale, né un atto di indirizzo o linee guida nazionali o regionali, che sia di riferimento vincolante o orientativo per i responsabili dei Centri di Screening Regionali sulle modalità da seguire per tale conservazione protratta.

Nel 2006 la Società Italiana degli Screening Neonatali (SISN) ha proposto la conservazione dei cartoncini per un periodo post-screening di almeno 5 anni [SISN Rapporto Tecnico 2007]. Questa raccomandazione è stata emessa dopo

aver realizzato nello stesso anno una prima indagine conoscitiva nel territorio nazionale per documentare, in base alle dichiarazioni dei Responsabili dei singoli Centri Screening, quanto avvenisse realmente nei differenti Centri italiani relativamente a tale problematica. Su 26 Centri consultati i risultati furono i seguenti:

- 1 Centro eliminava i campioni subito dopo il test di screening
- 4 Centri conservavano per 1-2 anni (in 2 casi per disposizioni aziendali)
- 12 Centri conservavano fino a 5 anni dopo il test
- 3 Centri conservavano fino a 10 anni
- 6 Centri conservavano a tempo indeterminato

Nello stesso anno la SISN effettuò una ulteriore consultazione dei Centri per verificare, tra le altre cose, quanti richiedessero un consenso informato ai genitori per autorizzare la conservazione protratta dei cartoncini. Su 15 Centri che avevano risposto al questionario, risultò che nessuno richiedeva un consenso informato ai genitori, né dichiarava palesemente che i materiali residui sarebbero stati conservati per un periodo protratto.

In considerazione della situazione descritta, anche in Italia- dove esiste un programma di screening neonatale con una copertura totale dei nuovi nati per anno (circa 580.000/anno), sembra necessario attivare un percorso di confronto e ampia discussione sulla possibilità di realizzare la conservazione protratta del materiale residuo dello screening neonatale, pervenendo a soluzioni che affrontino tutte le problematiche di carattere etico e pratico-gestionale connesse e che possano portare a disporre di un patrimonio biologico, strumento unico per la ricerca scientifica a tutela della salute pubblica.

5) Problematiche etico giuridiche connesse alla conservazione protratta dei cartoncini

La conservazione protratta dei cartoncini, inevitabilmente implica la necessità di trovare soluzioni a una serie di problematiche di ordine etico, giuridico e pratico. Se ne riportano a titolo d'esempio alcune, attualmente oggetto di discussione nel mondo scientifico.

I criteri da adottare, comunque, debbono conformarsi alle indicazioni generali promosse dalla Rec(2006) 4 del Consiglio d'Europa (V. NOTA ⁴).

⁴ A titolo indicativo, viene riportato quanto previsto al capitolo IV "Collection of biological materials" nella già citata REC (2006) 4 del Consiglio d'Europa.

CHAPTER IV

Article 14- Principles applicable to all collections of biological materials.

1. The person and/or institution responsible for the collection should be designated.
2. The purpose(s) of a collection should be specified. The principles of transparency and accountability should govern its management including access to and use and transfer of its biological materials and disclosure of information.
3. Each sample of biological material in the collection should be appropriately document, including information on any relevant consent or authorisation.
4. Clear conditions governing access to, and use of, the samples should be established.
5. Quality assurance measures should be in place, including conditions to ensure security and confidentiality during storage and handing of the biological materials.

Article 15 – Right to change the scope of, or to withdraw, consent or authorisation

1) When a person has provided consent to storage of identifiable biological materials for research purposes , the person retain the right to withdraw or alter the scope of that consent. The withdrawal or alteration of consent should not lead to any form of discrimination against the person concerned, in particular regarding the right to medical care.

When identifiable biological materials are stored for research purposes only, the person who has withdrawn consent should have the right to have, in the manner foreseen by national law, the materials either destroyed or rendered unlinked anonymised.

2. where authorisation has been given on behalf of a person not able to consent , the representative, authority, person or body provided for by law should have the rights referred to in paragraph 1 above.

3. Where a person on whose behalf authorisation has been given attains the capacity to give attains the capacity to give consent, that person should have the rights referred to in paragraph 1 above.

Article 16 – Transborder flows

Biological materials and associated personal data should only be transferred to another state ensures an adequate level of protection.

5.1 Tutela della privacy

I cartoncini non sono anonimi ovvero riportano nome, cognome, alcune caratteristiche neonatali essenziali, indirizzo e comune di residenza, affinché i genitori possano essere contattati in caso di positività allo screening.

Nel caso di conservazione protratta dei cartoncini, una delle principali problematiche da affrontare riguarda le procedure da seguire per garantire la tutela della privacy del paziente durante la più o meno prolungata fase di conservazione.

Altro tema sul quale comunità scientifica e comitati etici di tutto il mondo si stanno interrogando, riguarda la domanda se i cartoncini debbano essere resi *definitivamente anonimi* prima del loro utilizzo in successive ricerche scientifiche oppure se sia preferibile assegnare loro un codice che, pur non consentendo l'immediato riconoscimento del paziente, permetta comunque di risalire ad esso per eventuali comunicazioni sui risultati delle future ricerche (*cartoncini temporaneamente anonimizzati*).

A questo aspetto si collega un'altra importante problematica, ovvero la necessità di rispettare il *diritto a conoscere o non conoscere l'esito del test genetico o di qualunque altra ricerca finalizzata a definire/stimare il rischio individuale per una determinata patologia*.

5.2 Informazione, Autorizzazione e Consenso informato

Il Comitato Nazionale di Bioetica congiuntamente al Comitato Nazionale per la Biosicurezza le Biotecnologie e le Scienze della Vita, attraverso la stesura di documenti specifici, hanno già da tempo messo in luce l'importanza della conservazione di materiale biologico in biobanche a fini di ricerca, dal momento che queste, insieme alle informazioni cliniche associate all'individuo, rappresentano uno strumento prezioso per consentire di evidenziare vari aspetti della situazione biomedica alla nascita, confrontandola dopo alcuni anni con quella attuale; oppure la variabilità individuale di assetti genetici, nell'ambito di una determinata popolazione; oppure gli effetti provocati da fattori ambientali ed infine altri parametri ancora interessanti per una più compiuta tutela della salute e per il miglioramento delle cure. (CNBBSV 21/11/2008; CNB 9/6/2006; CNBBSV 19/4/2006).

Queste opportunità vanno tenute presenti – nella valutazione del costo/beneficio connesso alla attivazione di un sistema di conservazione dei campioni per tempi prolungati, come uno dei motivi più convincenti a favore della conservazione protratta.

Più di recente i due Comitati, sottolineando il concetto che i campioni biologici appartengono al donatore, il quale li cede nella formula generale della “concessione di utilizzo”, e confermando in ogni caso il principio della gratuità ed il divieto della discriminazione personale, hanno definito un modello di consenso informato articolato ed esaustivo che, garantendo un adeguato strumento per la tutela dei diritti individuali, promuove allo stesso tempo l’interesse personale con l’interesse della collettività [CNB, CNBBSV: “Raccolta di campioni biologici a fini di ricerca: consenso informato”, 16/02/2009].

Tale modello potrebbe essere utilizzato anche nel caso di conservazione protratta del materiale residuo dello screening neonatale. Questa procedura, come mostrano le esperienze internazionali maturate in questi ultimi anni, assume un particolare rilievo per la tutela della salute dei minori nell’ipotesi di impreviste patologie (ad esempio nei primi 2-5 anni di vita) così da renderla in molti Stati obbligatoria; ma la conservazione protratta è anche estremamente utile per la costituzione di biobanche che potrebbero fornire importanti supporti agli sviluppi della ricerca scientifica. Va tenuto presente che l’esecuzione del prelievo e l’effettuazione dei test al momento della nascita sono imposti dalle legge ed è quindi sufficiente un’opportuna informazione ai genitori che illustri le ragioni della previsione legislativa in relazione alla tutela della salute del neonato per le malattie screenate, tutela potenzialmente valida per i primi due anni. Diverso è il caso della conservazione protratta per fini diagnostici che non rientrano nello screening, pur essendo collegati all’interesse del minore o per fini di ricerca. In questa ipotesi, per i principi già esposti nei summenzionati Documenti del CNB e del CNBBSV, deve essere fornita, da parte dei rappresentanti legali del minore, esplicita autorizzazione scritta in cui siano chiaramente indicate le finalità per cui viene consentita la “concessione d’uso” del materiale biologico e la durata del periodo di conservazione. Devono essere assicurati, oltre alla tutela privacy e di tutte le garanzie imposte dall’anonimizzazione, la possibilità di controllare la corretta gestione dei campioni conservati e dell’uso delle relative informazioni, il diritto di recedere,

in qualsiasi momento e per qualsiasi motivo, dall'autorizzazione inizialmente prestata.

CONCLUSIONI

Prima di passare ad illustrare nell'Appendice di questo documento un'ipotesi per realizzare quanto fin qui illustrato sembra opportuno formulare alcune conclusioni:

1) Necessità di superare alcune criticità organizzative attuali dello screening neonatale in Italia.

Come evidenziato dai rapporti annuali della Società Italiana Screening Neonatali – SISN, confluita oggi nella nuova Società Scientifica SIMMESN (Società Italiana per lo Studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie e lo Screening Neonatale), nel nostro Paese sono attivi complessivamente ben 32 Centri di Screening neonatale a bacino d'utenza molto diversificato per estensione (Sub-Regionali, Regionali, Inter-regionali) e numerosità campionaria (da < 5.000 nati/anno a > 100.000 nati/anno), che attualmente eseguono i differenti programmi territoriali, secondo una programmazione locale, definita dall'Autorità regionale di competenza.

Pur riconoscendo che l'attuale organizzazione costituisce un importante presidio di medicina preventiva secondaria, essenziale per la tutela della salute infantile, non si può non sottolineare la forte disomogeneità dei modelli regionali di screening oggi applicati. Questi, per le profonde diversità di costituzione del pannello di patologie oggetto di screening, determinano nella popolazione neonatale italiana (in possibile violazione dei criteri universali di uguaglianza del cittadino) differenze macroscopiche in ambito di tutela sanitaria, di fatto principalmente diversificata in funzione del luogo di nascita del neonato.

E' importante rilevare inoltre, come l'attenta lettura della documentazione scientifica prodotta dalle Società SISN-SISMME faccia emergere anche una notevole, ulteriore disomogeneità a carico dell'organizzazione e della conduzione tecnica dei singoli programmi regionali di screening, con numerosi

indicatori (dimensioni del bacino d'utenza, valori di cut-off utilizzati, indici di richiamo, strategie analitiche di selezione, indici di efficienza, ecc.) che presentano una variabilità discrezionale non sempre giustificata da evidenze scientifiche o da stringenti motivazioni d'ordine economico-organizzativo.

2) In questo contesto, vanno considerate norme per la conservazione obbligatoria di breve – medio periodo dei campioni, nella finalità dell'interesse medico – giuridico del nato.

Al riguardo valgono le considerazioni espresse in più punti del testo, per le quali un coefficiente positivo di costo/beneficio – individuabile nel ridotto impegno economico della conservazione per due anni – sembra sufficiente a venire incontro alle esigenze di carattere etico-giuridico (forse addirittura prevalenti rispetto al fabbisogno medico-diagnostico) che lo sviluppo dei diritti del bambino - coerenti anch'essi con il quadro fondamentale del diritto alla salute fissato dall'art. 32 della Costituzione nazionale e promosso dalle solenni Dichiarazioni internazionali - ha ormai fatto "maturare" non solo in Italia ma in vari Paesi con realizzazioni concrete, come avvenuto anche in Italia per moto spontaneo dei gestori e degli amministratori dei Centri di screening attivati.

3) L'istituzione di raccolte per tempi prolungati del materiale residuo dagli screening neonatali obbligatori, da utilizzare per attività di ricerca e da organizzare rispettando le regole internazionali già individuate – ad esempio dal Consiglio d'Europa, dall'Unione Europea o da altre Istituzioni internazionali (vedi precedente nota 4) – è da considerarsi nell'opinione espressa dal CNB e dal CNBBSV – ormai "matura" sotto l'aspetto dello sviluppo della normativa non solo internazionale ma anche in Italia. Tali raccolte dovranno essere disciplinate con norme riguardanti la numerosità e scelta dei campioni, la durata di conservazione, le condizioni materiali della stessa, l'utilizzazione scientifica nel rispetto della autonomia del soggetto, della confidenzialità e della privacy.

4) Si ritiene opportuno salvaguardare, attraverso adeguate norme e in attesa delle soluzioni previste per nuove acquisizioni di materiale

biologico neonatale – le attuali collezioni esistenti presso alcuni Centri di screening neonatale, sottraendole al degrado od alla distruzione.

Tale provvedimento sembra ormai urgente, almeno per taluna delle sedi interessate.

5) Particolare cura nell'opinione del CNB e del CNBBSV dovrebbe essere riservata a occasioni di formazione periodica del personale operante nei diversi centri, a cura e iniziativa delle Regioni competenti, per quanto si riferisce non solo alla tutela "tecnica" dei campioni (corretta raccolta, corretta utilizzazione, accurata conservazione, etc.), ma anche dei diritti spettanti al neonato, bambino e alla famiglia, inerenti a appropriata informazione, tutela della confidenzialità dei dati e della privacy.

APPENDICE

RIFLESSIONI SUL RIORDINAMENTO DEI CENTRI PER GLI SCREENING NEONATALI E PER L'ISTITUZIONE E IL COORDINAMENTO IN RETE DI RACCOLTE VOLONTARIE A TEMPI PROLUNGATI DI MATERIALE BIOLOGICO RESIDUO AGLI SCREENING OBBLIGATORI NEONATALI

1) *Premessa*

Senza alcuna pretesa di elaborare modelli per una regolamentazione legislativa, la cui competenza esula dai compiti istituzionali del CNB e del CNBSV, i due Comitati ritengono opportuno tuttavia proporre alcune delle riflessioni - svolte nel corso dei lavori - in merito ai problemi organizzativi che si propongono per la costituzione di una rete di strutture, atte alla conservazione protratta del materiale biologico di origine neonatale.

2) *Problemi pratico-gestionali*

Non meno importanti dei risvolti etici, descritti nel Documento in esame, sono le problematiche di ordine pratico/gestionale ed economico che i Centri di Screening si trovano a dover affrontare per garantire una corretta conservazione soprattutto protratta dei cartoncini. A tale proposito va tenuto presente che nel nostro Paese *non tutti i Centri di Screening sono strutture dotate di "facilities" rispondenti alle norme vigenti e tali da garantire la possibilità di conservare, in maniera adeguata e per lungo tempo, un elevato numero di cartoncini*. I diffusi e annosi problemi tecnico-strutturali dei Centri, pertanto, potrebbero costituire un impedimento pratico non trascurabile per realizzare, in un breve-medio termine, la conservazione protratta dei cartoncini sull'intero territorio nazionale.

Un altro problema di ordine pratico da tenere in considerazione riguarda *l'elevato numero dei Centri di Screening presenti sul territorio nazionale* che, per i motivi sopra esposti e per le dimensioni ridotte di alcune strutture, potrebbe non favorire le adeguate procedure necessarie alla conservazione protratta dei cartoncini.

Infine, va ricordato che al momento, pur in presenza di documenti scientifici di carattere nazionale promossi da SISN e SISMME per lo screening neonatale ed il follow-up delle iperfenilalaninemie genetiche, dell'ipotiroidismo congenito, dell'iperplasia surrenalica congenita e per lo screening neonatale esteso [Balsamo 1998, Antonozzi 2000, Romano 1997, SISMME-SISN 2008], non esiste una visione organizzativa uniforme dei centri screening, che anche nei dispositivi di raccolta del materiale ematico (cartoncino) utilizzano modelli e formati differenti, con tipologia di raccolta di dati demografici e sanitari del neonato variabili da centro a centro ed a volte non completamente aderenti alle indicazioni normative contenute nel DPCM 9/7/1999, documento unico d'indirizzo organizzativo per l'esecuzione dei programmi di screening nel territorio nazionale. Questa difformità di base determina una completa disomogeneità nella organizzazione della conservazione dei materiali residui, nella tipologia di registrazione e custodia sia dei materiali stessi sia dei dati demografici e sanitari ad essi connessi ed infine nei sistemi informatici di gestione dei laboratori.

3) *Le indicazioni del quadro di riferimento nazionale per la costituzione e il coordinamento di biobanche ai fini dello sviluppo in rete delle raccolte a tempi protratti di materiale biologico neonatale*

Già nel Piano Sanitario Nazionale (PSN) 2006-2008, poi ripreso come riferimento dall'Accordo Conferenza Stato-Regioni del 25 marzo 2009, veniva individuato come prioritario il tema dell'implementazione e coordinamento delle "biobanche", quale uno degli obiettivi da raggiungere per attuare la garanzia costituzionale del diritto alla salute e degli altri diritti sociali e civili in ambito sanitario.⁵

⁵ Come riportato nel sopra citato documento, "le biobanche sono unità di servizio situate all'interno di strutture sanitarie pubbliche o private, senza fini di lucro diretto, finalizzate alla raccolta, alla lavorazione, alla conservazione, allo stoccaggio e alla distribuzione di materiale biologico umano, a scopo di indagine diagnostica, ricerca e uso terapeutico ... In ambito sanitario possono essere distinte due diverse tipologie di biobanche:

1.

b

biobanche di materiale biologico umano utilizzato per la diagnosi, studi sulla biodiversità e ricerca;

Data la rilevanza di tale obiettivo e riconoscendo nella realizzazione di biobanche un fattore determinante per lo sviluppo dell'assistenza e della ricerca, nell'anno corrente il Ministero della Salute – nell'ambito del programma di attività del Centro Nazionale per la Prevenzione ed il Controllo delle Malattie (CCM), alla cui definizione hanno avuto un ruolo attivo anche le stesse Regioni – ha promosso il supporto al coordinamento ed alla integrazione di *biobanche di popolazione* attraverso il sostegno a progetti strategici di interesse nazionale e individuando in queste ultime un'importante risorsa per la diagnosi e la ricerca. Pertanto, la costituzione di una biobanca di ricerca che raccolga il materiale residuo dello screening neonatale (altrimenti destinato a distruzione) derivante e rappresentativo della popolazione neonatale italiana (*biobanca neonatale*), rientrerebbe pienamente tra gli obiettivi prioritari del Ministero della Salute e delle stesse Regioni e consentirebbe di trasformare l'insieme dei Centri di Screening, che in molti casi già attuano la conservazione protratta del materiale residuo dello screening neonatale in assenza di regole definite e di omogeneità operativa, in una *Rete Nazionale di Biobanche Neonatali Regionali*. Queste ultime dovrebbero essere in grado di conservare un elevato numero di campioni in modo standardizzato e di renderli disponibili per diagnostica e ricerca secondo modalità uniformi e condivise.

La realizzazione di un tale progetto implica necessariamente il raggiungimento dei seguenti obiettivi:

1. regolamentare le modalità di conservazione e utilizzo, a scopi di ricerca, di materiale residuo dello screening neonatale;
2. definire gli elementi della Rete in numero non superiore ad uno per Regione*, verificando che ciascuno di essi operi secondo criteri standardizzati sia in termini di acquisizione e rilascio dei campioni, che di qualità e sicurezza;
3. definire un sistema di *governance* della Rete che individui nelle autorità competenti (Ministero della Salute e Istituto Superiore di Sanità) gli organi di coordinamento delle attività di raccolta, conservazione ed utilizzo del materiale

2.

b

biobanche a scopo terapeutico nelle quali il materiale biologico conservato è destinato ad applicazioni sull'uomo."

residuo dello screening neonatale, e di valutazione del raggiungimento degli obiettivi prefissati e finalizzati alla tutela della salute pubblica, grazie all'utilizzo di un patrimonio biologico preziosissimo dal punto di vista delle potenzialità della ricerca.

Non ci si nasconde certamente la necessità di valutare la realizzazione di tale progetto anche sotto l'aspetto dei costi/benefici.

In merito ai benefici, reali a breve termine e potenziali in prospettiva, sono state già fornite esaurienti indicazioni nel testo del documento. Tuttavia, non si è in possesso al momento nemmeno di una valutazione complessiva dei costi per l'attività attuale dei vari Centri di screening nelle varie Regioni. In attesa dell'auspicabile comunicazione di tali dati (vedi nota⁶), va però ricordato che l'attivazione della conservazione protratta sotto forma di Rete nazionale di biobanche neonatali regionali non dovrebbe essere particolarmente costosa trattandosi di cartoncini la cui conservazione richiede unicamente ambienti normali a bassa umidità. Alcuni dati di cui oggi si dispone, comunicati da Georges Dagher (georghes.dagher@inserm.fr) nella fase preparatoria del progetto di infrastruttura europea *Biobanking and Biomolecular Research* - dati presentati informalmente al *Working Group 7 Funding* - hanno messo in evidenza che i costi di 73 biobanche europee (20 italiane, 24 francesi, 7 tedesche, 17 olandesi) raggiungono un costo medio di 440.000 euro annue, con il 44% dei costi dovuti al personale, il 17% alla annotazione dei campioni, l'8% al funzionamento. Si tratta tuttavia di biobanche che conservano campioni in congelatore o in azoto liquido; di conseguenza i costi a temperatura ambiente degli spot di Guthrie possono essere stimati a meno di un decimo di quello di una biobanca tradizionale.

4) Aspetti particolari nella costituzione, coordinamento e gestione di una rete nazionale di biobanche neonatali regionali per la conservazione del materiale dello screening neonatale.

⁶ E' disponibile attualmente il dato della Regione Piemonte che indica a circa 40-50 euro il costo medio per lo stoccaggio, la conservazione e lo studio di alcuni analiti di ogni campione biologico.

- a) La Rete Nazionale di Biobanche Neonatali Regionali vedrà, come partners paritetici l'Istituto Superiore di Sanità ed i diversi Centri di Screening Regionali individuati, dalle autorità regionali competenti, come strutture idonee a divenire sede di conservazione del materiale residuo dello screening neonatale sulla base di requisiti minimi di struttura. L'Istituto Superiore di Sanità potrà rappresentare la struttura centrale di coordinamento della Rete rendendosi disponibile, laddove necessario, a conservare il materiale biologico proveniente da quei Centri che, per deficienze strutturali intrinseche risulteranno non idonei alla conservazione protratta del materiale residuo dello screening neonatale, o per quei Centri che opteranno per una centralizzazione volontaria, in accordo con le autorità regionali.
- b) Al fine di garantire la tutela della privacy per il neonato e per la sua famiglia, ma anche per utilizzare le informazioni neonatali raccolte presso i Centri di Screening attivi sul territorio nazionale, nonché collegare i campioni biologici a registri di patologia eventualmente esistenti, i cartoncini dovranno essere utilizzati in forma *anonimizzata*. In tal caso i Centri di Screening, che saranno i custodi dei dati neonatali che verranno conservati nell'osservanza delle normative vigenti in tema di tutela dei dati personali, assegneranno un codice ad ogni campione che in questa forma identificativa verrà conservato nella biobanca.
- c) La conservazione protratta dei cartoncini, in ogni caso, dovrà essere effettuata sulla base di definiti requisiti organizzativi e gestionali. Inoltre, la conservazione a lungo termine dei campioni biologici dovrà garantire la disponibilità di un'aliquota minima di materiale residuo per i genitori, o per chiunque eserciti la potestà parentale sul neonato, i quali in qualunque momento potranno farne richiesta. Inoltre, è fatta salva la volontà del genitore che, in qualunque momento, vorrà ritirare la propria autorizzazione e chiedere che il campione donato venga distrutto.
- d) Il tempo di conservazione verrà stabilito dal tavolo tecnico di cui al successivo punto i) con lo scopo di.

1) fissare un tempo obbligatorio di conservazione necessario ad assicurare le finalità dirette di tutela della salute del neonato (ad esempio ripetizione di esami, esami complementari resi necessari dal decorso clinico, esigenze medico-legali ecc...), valido per tutti i centri.

2) fissare il tempo massimo di conservazione per quei centri che aderiranno a programmi di conservazione protratta a scopo di ricerca biomedica. Ad esempio al fine di consentire la realizzazione di studi per la ricerca di biomarcatori di patologie ad insorgenza tardiva.

e) La costituzione della biobanca prospettica dovrà avvenire per donazione del campione biologico da parte dei genitori. Affinché l'atto di donazione avvenga nella piena consapevolezza dello stesso, oltre ad una congrua informazione orale dovrà essere offerta ai genitori una nota esplicativa sull'importanza della conservazione a lungo termine in cui venga acclusa la modulistica necessaria per esprimere l'autorizzazione alla conservazione protratta e all'utilizzo a scopi di ricerca del materiale biologico del proprio bambino (vedi Appendice 3).

f) Appositi protocolli operativi stilati anche con la partecipazione di esperti che operano nell'ambito dello screening neonatale, definiranno a livello nazionale univoche modalità e procedure da seguire per la conservazione protratta dei materiali residui allo screening, comprendendo fra le procedure le modalità per l'esercizio della facoltà di ritiro per motivati ragioni (o per trasferimento ad altra idonea struttura sanitaria per analisi) del campione residuo, o per il cessare prestabilito della conservazione oppure allorché si raggiunga la piena capacità decisionale del titolare del campione.

g) Appare utile, inoltre, la costituzione di un Gruppo di Coordinamento scientifico interdisciplinare della biobanca, che stabilirà le priorità di utilizzo dei cartoncini e di piani di ricerca prioritari sulla base di criteri prestabiliti.

h) In riferimento alle collezioni storiche presenti presso numerosi Centri di Screening italiani e che raccolgono materiale biologico già esistente in assenza di autorizzazione da parte dei genitori, è necessario che tale materiale venga utilizzato in forma esclusivamente "anonima", ovvero con l'impossibilità di risalire ai dati del soggetto cui appartiene il campione biologico. Tale modalità

consentirà di realizzare ampi studi epidemiologici di utilità sociale e socio-sanitaria (studi di epidemiologia genetica con ricerca di polimorfismi nella popolazione generale, ricerca di nuovi biomarcatori, ecc.) che non richiedono alcun cross-link con dati relativi alla presenza di una eventuale patologia.

i) Si raccomanda l'istituzione di un Tavolo Tecnico presso il Ministero della Salute finalizzato al monitoraggio delle attività connesse al coordinamento, da parte dell'Istituto Superiore di Sanità della rete nazionale di biobanche regionali, e per stabilire le modalità di accesso dei ricercatori alle collezioni pregresse o a quelle implementate con nuovi apporti, ed infine per decidere su quanto altro è necessario per la corretta realizzazione del progetto.

l) Appare, infine opportuno un periodo congruo di sperimentazione affidato ad un numero molto ridotto di Regioni per il "rodaggio" del dispositivo previsto.

BIBLIOGRAFIA

American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. *Newborn Screening: toward a uniform panel and system. Executive Summary* Pediatrics 2006;117:S296-307.

American College of Medical Genetics. *Position Statement on Importance of Residual Newborn Screening Dried Blood Spot*. 2009. Consultabile su: www.acmg.net

Antonozzi I. et al. *Proposte di linee guida per lo screening dell'ipotiroidismo congenito*. Riv Ital Ped (IJP) 2000, 26: 731-736.

Balsamo A et al. *Screening e accertamento diagnostico della sindrome adreno-genitale congenita da deficit di 21-idrossilasi*. Riv Ital Ped (IJP) 1998, 24: 861-869.

Chaudhuri SN, Butala SJ, Ball RW, Braniff CT, Rocky Mountain Biomonitoring Consortium. *Pilot study for utilization of dried blood spots for screening of lead, mercuri and cadmium in newborns*. J Expo Sci Environ Epidemiol 2009, 19: 298-316.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) *"Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard" – Fifth Edition*. LA4-A5 vol. 27, n.20, 2007.

Comitato Nazionale per la Biosicurezza le Biotecnologie. *Linee guida per la certificazione delle biobanche*. Presidenza del Consiglio dei Ministri 19/04/2006.

Comitato Nazionale di Bioetica (CNB). *Biobanche e ricerca sul materiale biologico umano. Parere del CNB su una Raccomandazione del Consiglio d'Europa e su un documento del Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie*. Presidenza del Consiglio dei Ministri 09/06/2006.

Comitato Nazionale per la Biosicurezza le Biotecnologie e le Scienze della Vita (CNBBSV). *Biobanche e Centri per le risorse biologiche di campioni umani, istituiti a fini di ricerca. La necessità di una programmazione regionale e di un coordinamento nazionale. Linee guida per il riconoscimento/accreditamento*. Presidenza del Consiglio dei Ministri 21/11/2008.

Comitato Nazionale di Bioetica, Comitato Nazionale per la Biosicurezza le Biotecnologie e le Scienze della Vita. *Raccolta di campioni biologici a fini di ricerca: consenso informato*. Presidenza del Consiglio dei Ministri 16/02/2009.

Corbetta C. *Informazione, Consenso e Conservazione del materiale biologico residuo*, Congresso Nazionale 2006 SISMME-SISN-GENCLI, Pesaro 2006, Volume degli Abstract.

Corbetta C. *Le nuove frontiere dello screening neonatale: l'era della "tandem mass"* Biochimica Clinica, 2009,33:205-212J.

Couzin-Frankel J. *Science Gold Mine, Ethical Minefield*. Science 2009, 324: 166-168.

Croom HA, Richards KM, Best SJ, Francis BH, Johnson EI, Dax EM et al. *Commercial enzyme immunoassay adapted for the detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots*. J Clin Virol 2006, 36: 68-71.

Deutschen Gesellschaft für Neugeborenen-Screening (DGNS) National Screening Report 2006 consultabile su: www.screening-dgns.de/index.php

Friedman Ross L. *Ethical and Policy Issues in Pediatric Genetics*. Am. J Med Gen. 2008, 148C:1-7.

Green NS, Pass KA. *Neonatal screening by DNA microarray: spots and chips*. Nat Rev 2006, 6: 147-151.

Haak PT, Busik JV, Kort EJ, Tiknonenko M, Paneth N, Resan JH. *Archived unfrozen neonatal blood spots are amenable to quantitative gene expression analysis*. Neonatology 2009, 95: 210-216.

Hollegaard MV, Soresen KM, Petersen HK, Arnardottir MB, Norgaard-Pedersen B, Thorsen P, Hongaard DM. *Whole-genome amplification and genetic analysis after extraction of proteins from dried blood spots*. Clin Chem 2007, 53: 1161-1162.

Hollegaard MV, Graunholm J, Borglum A, Nyegaard M, Norgaard-Pedersen B, Orntoft T, et al. *Genome-wide scans using archived neonatal dried blood spot samples*. BMC Genomics 2009,10:297.

International Society of Neonatal Screening. www.isns-neoscreening.org

McCarthy M.I. et al. *Genome-Wide Association Studies for Complex Traits: Consensus, Uncertainty and Challenges*. Nat. Rev. Genetics 2008, 9:356-369.

McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. *What a drop can do: dried blood spots as minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research*. Demography 2007, 44: 899-925.

(NSU) National Screening Unit, Ministry of Health. Draft policy options on the secondary use and retention of newborn metabolic screening programme blood spot cards. Consultabile su: www.nsu.govt.nz/index.asp

Norgaard-Pedersen B. et al. *Storage policies and use of the Danish Newborn Screening Biobank* J Inher Metab Dis 2007, 30:530-536

Olshan AF, Shaw GM, Millikan RC, Laurent C, Finnell RH. *Polymorphism in DNA repair genes as risk factors for spina bifida and orofacial clefts*. Am J Med Genet A 2005, 135: 268-273.

Olshan A.F.. *Meeting Report: The use of Newborn Blood Spots in Environmental Research: Opportunities and Challenges*. Environ Health Persp. 2007,115: 1767-1769.

Paynter RA, Skibola DR, Skibola CF, Buffler PA, Wiemels JL, Smith MT. *Accuracy of multiplexed Illumina platform-based single nucleotide polymorphism genotyping compared between genomic and whole genome amplified DNA collected from multiple sources*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006, 15: 2533-2536.

Phillips TM. *Multi-analyte analysis of biological fluids with a recycling immunoaffinity column array*. J Biochem Biophys Methods 2001, 49:253-262.

Romano C et al. *Accertamento diagnostico, nosografia, principi di trattamento delle iperfenilalaninemie*. Riv Ital Ped (IJP) 1997, 23: 1040-1044.

SISMME – SISN 2008. *Linee guida per lo Screening Neonatale esteso e la conferma diagnostica*. Consultabile su: www.sismme.it

SISN *Rapporto Tecnico sui Programmi di Screening Neonatale In Italia-Anno 2007 a cura di R.Cerone e U.Caruso*. Consultabile su: www.sismme.it/sisn/

Sorensen KM, Jespersgaard C, Vuust J, Hongaard DM, Norgaard-Pedersen B, Andersen PS. *Whole genome amplification on DNA from filter paper blood spot samples. An evaluation of selected systems*. Gen Test 2007, 11:65-71.

Spliethoff HM, Tao L, Shower SM, Aldous KM, Pass KA, Kannan K, Eadon GA. *Use of newborn screening program blood spots for exposure assessment: declining levels of perfluorinated compounds in New York State infants*. Environ Sci Technol 2008, 15: 5361-5367.

The President's Council on Bioethics. *The Changing Moral Focus of Newborn Screening*. Washington, DC. December 2008. www.bioethics.gov