

Modelli di analisi genetica per la fibrosi cistica

**Società Italiana
di Genetica Medica**

**Commissione di studio
sulle modalità
di analisi genetica
per la fibrosi cistica**

**Gruppo di studio
per la fibrosi cistica
della Società italiana
di pediatria**

Data di pubblicazione: dicembre 2005

AUTORI

Commissione di studio sulle modalità di analisi genetica per la fibrosi cistica
Gruppo di studio per la fibrosi cistica della Società italiana di pediatria

Carlo Castellani, Centro fibrosi cistica, Ospedale civile Maggiore, Verona

Faustina Lalatta, Servizio di genetica medica, Istituti clinici di perfezionamento, Milano

Demetrio Neri, Istituto di bioetica, Università di Messina

Giuseppe Novelli, Dipartimento di biopatologia e diagnostica, Sezione di genetica, Università di Tor Vergata, Roma

Andrea Piccinini, Istituto di medicina legale, Milano

Manuela Seia, Laboratorio di genetica molecolare, Istituti clinici di perfezionamento, Milano

Francesca Torricelli, UO citogenetica e genetica AOC, Ospedale Careggi, Firenze

Redazione
Laura Perrotta, Zadig, Milano

Impaginazione
Giovanna Smiriglia

Indice

Riassunto	Pag.	5
Introduzione	»	7
La malattia	»	8
Epidemiologia	»	8
Clinica	»	8
Diagnosi	»	8
Genetica	»	9
Tecniche di analisi genetica molecolare	»	10
Analisi di I livello	»	10
Reverse Dot Blot (RDB)	»	11
Amplification Refractory Mutation Systems (ARMS)	»	11
Oligonucleotide Specific Allele (ASO)	»	11
Oligonucleotide Ligation Assay (OLA)	»	11
Analisi di II livello	»	13
Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	»	13
Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)	»	14
Sequenziamento diretto del DNA	»	15
Analisi di III livello	»	15
Analisi correlate alla diagnostica prenatale	»	16
Analisi genetica per la diagnosi di malattia	»	17
Analisi molecolare in particolari situazioni diagnostiche	»	19
Diagnosi prenatale	»	19
Screening neonatale	»	20
Analisi genetica per la diagnosi di eterozigosi	»	22
Test individuale	»	22
Probabilità a priori uguale alla popolazione generale	»	22
Probabilità a priori superiore alla popolazione generale	»	22
Test di coppia	»	23
Rischio riproduttivo a priori uguale alla popolazione generale	»	24
Rischio riproduttivo a priori superiore alla popolazione generale	»	24

Genitori di affetti	»	24
Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un eterozigote	»	24
Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un affetto da fibrosi cistica	»	25
Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un familiare di affetto con mutazione non identificata	»	25
Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un paziente con forma atipica di fibrosi cistica	»	25
Consanguinei	»	26
Genitori di feto con ipercogenicità intestinale	»	26
Genitori di deceduti con sospetta fibrosi cistica	»	27
Bibliografia essenziale	»	28

Riassunto

- La fibrosi cistica è la malattia **autosomica recessiva** grave più comune nella popolazione italiana. La frequenza dei portatori è compresa tra 1 su 26 e 1 su 30.
- Le **mutazioni** del gene responsabile della malattia superano il migliaio, ma non tutte comportano un quadro clinico compatibile con la malattia. In Italia, le 12 mutazioni più frequenti caratterizzano il 73% degli alleli affetti, con differenze regionali di rilievo.
- Esistono vari **livelli di analisi molecolare**, con diversi tempi di esecuzione, tecnologie e costi. La richiesta di tali analisi è in costante aumento. Il test viene proposto ai familiari di persone affette con rischio di eterozigosi aumentato, a coppie che cercano una gravidanza con tecniche di fecondazione assistita e, talora, a coppie della popolazione generale, soprattutto quelle in attesa di un figlio.
- Analisi di **I livello**: kit commerciale o preparato in laboratorio che includa l'analisi delle mutazioni più frequenti nella regione di riferimento del laboratorio. Le tecniche più utilizzate sono: Reverse Dot Blot, Amplification Refractory Mutation Systems, Oligonucleotide Specific Allele e Oligonucleotide Ligation Assay.
- Analisi di **II livello**: *scanning* di tutti gli esoni e delle regioni limitrofe, riconoscimento di variazioni di sequenza, sequenziamento della specifica regione del gene. Le tecniche più utilizzate sono: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis e Denaturing High Performance Liquid Chromatography. I test di II livello permettono un tasso di individuazione (*detection rate*) migliore, ma il significato fenotipico del risultato molecolare può essere di difficile interpretazione.
- Analisi di **III livello**: ricerca di delezioni e/o di inserzioni; si tratta di indagini molto specialistiche ancora poco utilizzate. Si fa ricorso in questo caso alla Quantitative Multiplex Polymerase Chain Reactions of Short Fluorescent Fragments.
- Il *gold standard* per la **diagnosi di malattia** è il test del sudore e non l'analisi genetica. Se il test del sudore non è eseguibile o risolutivo, possono essere indicate un'analisi genetica di I livello ed eventualmente, dopo giudizio clinico, di II o III livello.
- La **diagnosi prenatale** si esegue tramite analisi molecolare su materiale fetale quando entrambi i genitori sono portatori di una mutazione che causa malattia. Il *testing* fetale, cioè l'analisi molecolare eseguita su DNA fetale estratto da villi coriali o amniociti è da scoraggiare in assenza di un'indicazione specifica, e va sostituito con la ricerca di mutazioni nella coppia.
- L'analisi genetica di I livello può essere integrata nel protocollo di **screening neonatale** di malattia.
- La **probabilità individuale di eterozigosi** può essere efficacemente calcolata con un test di I livello o, in caso di familiarità, con la ricerca della mutazione specifica. Non è indicato un test di II livello.

- Il **rischio riproduttivo di coppia** può essere calcolato con un test di I livello, il cui esito negativo è sufficiente a indicare un rischio significativamente ridotto. L'approfondimento con test di II livello è opportuno solo se uno dei componenti della coppia sia portatore o affetto e l'altro sia negativo al test di I livello; deve sempre essere preventivamente discusso con la coppia durante la consulenza genetica.

Introduzione

Il gene responsabile della patogenesi della fibrosi cistica è stato individuato da ormai 15 anni.^{1,2} Da allora, la crescente disponibilità di metodiche per l'analisi genetica ha cercato di soddisfare le richieste di test genetici per la fibrosi cistica e in parte ne ha anche indotto un costante aumento. Oggi il test viene proposto a familiari di persone affette – che hanno un rischio di eterozigosi aumentato – e in alcune realtà locali anche a coppie della popolazione generale, per lo più durante la gravidanza. Si sta inoltre consolidando la consuetudine di offrire l'analisi alle coppie che cercano una gravidanza con tecniche di fecondazione assistita.³ Appare evidente che l'indicazione al test e il tipo di analisi non possono essere omogenei per un'utenza così diversificata per motivi di tempi, costi e difficoltà nell'interpretazione dei risultati.

Il Gruppo di studio per la fibrosi cistica della Società italiana di pediatria ha elaborato nel 2001 le linee guida sull'uso del test genetico per fibrosi cistica, indicando in dettaglio le categorie di possibili utenti.⁴ A distanza di qualche anno molti addetti ai lavori avvertono la necessità di approfondire questo tema, in particolare di avere indicazioni circa i livelli e le tecniche di analisi più adeguati per i vari gruppi di candidati al test, con l'intento di fornire un servizio adeguato e di tutelare gli operatori da controversie deontologiche e legali. Per alcune categorie di candidati può essere sufficiente un test genetico mutazione specifico perché un esito negativo indicherebbe un rischio di mutazioni apprezzabilmente ridotto; per altre categorie invece potrebbe essere indicato approfondire l'analisi con uno *screening* rapido del gene.

Obiettivo di questo documento è indicare il tipo di test più adatto alle diverse categorie di utenti.

Il documento inizia descrivendo brevemente la malattia e le tecnologie di analisi molecolare in uso per poi indicare le tipologie di analisi più adatte alla diagnosi di malattia e di eterozigosi. Altri aspetti del test genetico, come il consenso informato e la comunicazione dei risultati, non sono qui specificamente trattati, tuttavia gli autori vogliono sottolineare che ogni analisi genetica deve essere accompagnata da una esaustiva informazione all'utente sul significato, le implicazioni e il risultato a cui porterà. Tale processo comunicativo trova applicazione ideale nelle modalità della consulenza genetica.

La malattia

Epidemiologia

La fibrosi cistica è la malattia autosomica recessiva grave più comune nella popolazione italiana. E' verosimile che i dati raccolti nel registro italiano della fibrosi cistica⁵ sottoestimino il numero degli affetti poiché il potenziale diagnostico della malattia è soggetto a un'ampia variabilità regionale. Sembra perciò più affidabile fare riferimento a programmi di *screening* neonatale che riportano un'incidenza compresa tra 1/2.730 e 1/3.170 nati.^{6,7} Da questi dati si può desumere una frequenza di portatori compresa tra 1/26 e 1/30.

Clinica

Le manifestazioni cliniche della malattia sono caratterizzate dalla presenza di secrezioni esocrine mucose dense che portano a una malattia polmonare cronica ostruttiva con evoluzione verso l'insufficienza respiratoria. Nell'ambito di una certa variabilità interindividuale si possono avere anche altre manifestazioni cliniche di rilievo, tra cui insufficienza pancreatica esocrina, epatopatia, diabete e, nella quasi totalità dei maschi affetti, azoospermia da atresia bilaterale congenita dei dotti deferenti (CBAVD).

Le modalità di comparsa, l'entità dei sintomi e il decorso sono molto variabili. Alcuni malati possono presentare precocemente gli aspetti polmonari della malattia (infezioni respiratorie ricorrenti) e manifestazioni gastrointestinali quali ileo da meconio alla nascita e sindrome da malassorbimento secondaria a insufficienza pancreatica; altri hanno sintomi respiratori modesti e contenuti fino all'adolescenza (tosse saltuaria, sinusite, poliposi nasale), con un quadro digestivo normale.⁸ Il continuo miglioramento della qualità del trattamento medico e fisioterapico, che è complesso e da eseguirsi quotidianamente, e la centralizzazione delle cure in strutture specialistiche hanno contribuito a un sostanziale e continuo miglioramento della prognosi.⁹ I dati del Registro nazionale^{10,5} riportano per l'Italia un'età mediana alla morte di 22 anni e un costante incremento della proporzione di pazienti adulti, ora superiore al 40%.

Esistono anche forme atipiche di malattia, caratterizzate da sufficienza pancreatica ed espressione clinica respiratoria per lo più modesta; talora la malattia può interessare quasi esclusivamente un unico organo, come nel caso dell'infertilità maschile dovuta a CBAVD¹¹ oppure, in entrambi i sessi, può manifestarsi con episodi di pancreatite ricorrente.¹² L'evoluzione clinica di tali forme è poco nota, ma la prognosi appare senz'altro più favorevole rispetto alla malattia pienamente espressa.

Diagnosi

La diagnosi si basa sulla presenza di manifestazioni cliniche o biochimiche compatibili con la malattia, in associazione alla positività di almeno uno tra i test diagnostici vali-

dati. Questi comprendono il test del sudore (con cloro e sodio in concentrazioni superiori alla norma), lo studio della differenza di potenziale elettrico transepiteliale nelle mucose respiratorie o intestinali¹³ e l'analisi genetica che si considera positiva quando identifica due mutazioni che causano la malattia.¹⁴

In alcune forme atipiche, nelle quali l'espressione clinica è modesta oppure limitata a un solo organo o apparato, la diagnosi di fibrosi cistica è talora giudicata eccessiva e inappropriata,¹⁵ ma manca ancora un consenso generalizzato sulla definizione nosologica da utilizzare.

Nelle forme classiche della malattia di solito la diagnosi è semplice, ma in quelle atipiche può essere molto complessa. Date le potenziali difficoltà, è indispensabile che la diagnosi venga posta in una struttura specializzata come un centro regionale per la cura della fibrosi cistica.

Genetica

Il gene responsabile della malattia si trova sul braccio lungo del cromosoma 7, si estende per oltre 250.000 basi e contiene 27 esoni. La proteina codificata è chiamata Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), è composta da 1.480 aminoacidi, e la sua funzione principale riguarda il trasporto transmembrana del cloro. Le mutazioni del gene *CFTR* sono molto numerose: a oggi ne sono state individuate più di 1.300.¹⁶ Non tutte le variazioni di sequenza codificante comportano un quadro clinico compatibile con la malattia: c'è un numero non trascurabile di varianti nucleotidiche che sono associate a forme atipiche, o per le quali non esistono dati sufficienti a definirne il ruolo patogenetico.

La frequenza relativa delle mutazioni è quanto mai variabile in relazione all'area geografica: alcune sono molto più rappresentate in particolari popolazioni, altre sono estremamente rare. La più frequente – F508del – si concentra nella popolazione dell'Europa settentrionale più che in quella meridionale. In Italia F508del è la mutazione di gran lunga più frequente (51%); nell'insieme le 12 mutazioni più diffuse caratterizzano il 73% degli alleli responsabili di malattia, con differenze di rilievo tra regioni geografiche limitrofe e addirittura all'interno della stessa regione.^{17,18} La correlazione tra genotipo e fenotipo non è così stretta da consentire giudizi prognostici sulla sopravvivenza e sull'insorgenza di disturbi respiratori. Alcune mutazioni sono associate a insufficienza pancreatica, a livelli normali o quasi normali di cloro nel sudore e a fertilità maschile.¹⁹

Tecniche di analisi genetica molecolare

Possiamo distinguere vari livelli di analisi molecolare che si caratterizzano per diversi tempi di esecuzione, tecnologie e costi. Vale la pena sottolineare che i test di I livello possono vantare una minore copertura ma consentono l'identificazione di mutazioni note, mentre quelli di II livello hanno una maggiore sensibilità, ma portano a risultati di più difficile interpretazione perché possono individuare sia mutazioni che portano alla malattia sia varianti che non sono patologiche.

Ricerca il maggior numero possibile di mutazioni non è sempre un fatto positivo: talora l'identificazione di alcune varianti nucleotidiche, pur ben note, può implicare interpretazioni scorrette del risultato da parte di chi esegue l'analisi. Negli Stati Uniti, dove dal 2001 il test viene consigliato a tutte le donne in gravidanza, vengono utilizzati kit standard che consentono di esaminare la variante genica IVS8-5T. Quando questo polimorfismo è associato ad altre mutazioni sullo stesso allele può causare, in eterozigosi composta o in omozigosi, una forma classica di fibrosi cistica; al contrario, quando è isolato può provocare solo forme atipiche e lievi di malattia. Recentemente è stato segnalato un numero non trascurabile di diagnosi prenatali collegate alla presenza isolata di IVS8-5T.^{20,21} Evidentemente, a fronte del grande numero di esami, non in tutti i casi è stato possibile fornire un'interpretazione adeguata sul risultato dell'analisi.

Analisi di I livello

L'analisi genetica di I livello consiste nella ricerca delle mutazioni più frequenti nella popolazione. Le tecniche utilizzate devono soddisfare criteri di sensibilità, riproducibilità e rapidità, quest'ultima in funzione del numero sempre maggiore di analisi richieste. Possono essere utilizzate tecniche prodotte in laboratorio o kit commerciali. Le tecniche artigianali sono di solito meno costose, ma non perfettamente riproducibili; viceversa i kit commerciali, a fronte di un costo più elevato, consentono agli operatori di risparmiare tempo, danno luogo a esperimenti riproducibili e permettono di analizzare un pannello di mutazioni uniforme nei diversi laboratori.

E' essenziale che ogni laboratorio conosca la frequenza relativa delle mutazioni della propria area di utenza, per poter scegliere un pannello di mutazioni che consenta un buon tasso di individuazione (*detection rate*). In Italia, utilizzando i kit commerciali che includono una trentina di mutazioni si ha un *detection rate* del 75% circa. E' inoltre consigliabile la ricerca aggiuntiva di mutazioni specifiche in particolari aree geografiche laddove non siano inserite nei pannelli standard, come a esempio T338I per individui originari della Sardegna. Si raccomanda l'esecuzione annuale di controlli di qualità per la validazione del sistema operativo.

Di seguito sono comunque descritte le tecniche oggi più diffuse.

Reverse Dot Blot (RDB)

La tecnica prevede una reazione polimerasica a catena (PCR) multipla in grado di amplificare differenti regioni del gene. A questa fa seguito una reazione di ibridazione allele specifica tra i prodotti della PCR e le sonde molecolari oligonucleotidiche complementari alla sequenza normale o a quella mutata. Le sonde allele specifiche, che portano un gruppo aminico in posizione 5', vengono fatte aderire stabilmente a una membrana di nylon carica negativamente. Dopo l'ibridazione tra le sonde e il DNA amplificato, nel quale è incorporato dUTP biotinilato, si procede alla visualizzazione colorimetrica con una reazione di tipo biotina-streptavidina-fosfatasi alcalina, o a una visualizzazione in chemio-luminescenza. Il metodo è rapido, affidabile e non richiede strumentazioni sofisticate.

Amplification Refractory Mutation Systems (ARMS)

E' una delle tecniche più utilizzate per la rapidità, l'affidabilità e l'uso di materiali non radioattivi.²² Prevede una reazione polimerasica a catena in cui uno dei due *primer* è costruito in modo che il nucleotide in posizione 3' sia complementare alla sequenza mutata del gene o a quella normale. Il DNA genomico non viene amplificato quando si usa il *primer* non perfettamente complementare alla sequenza in esame. La visualizzazione dei prodotti amplificati avviene con l'elettroforesi su gel di agarosio.

Oligonucleotide Specific Allele (ASO)

I prodotti di una reazione polimerasica a catena multipla vengono denaturati, applicati su una membrana di nitrocellulosa e ibridati con oligonucleotidi marcati complementari alla sequenza normale o a quella mutata.²² E' una tecnica da costruire in laboratorio, non esistono infatti kit commerciali che utilizzino tale principio.

Oligonucleotide Ligation Assay (OLA)

Si basa sull'uso di sonde fluorescenti specifiche e della ligasi termostabile rTth, un enzima che ripara il DNA. La reazione polimerasica a catena utilizza oligonucleotidi complementari all'allele mutato e normale, legati in posizione 5' a modificatori della mobilità (code di ossido di pentaetilene) di diversa lunghezza che permettono la separazione dei prodotti della reazione durante l'elettroforesi; viene inoltre incorporata una sonda legata a una molecola fluorescente in 3' complementare alla sequenza adiacente alla mutazione in esame. La ligasi unisce gli oligonucleotidi complementari all'allele con le sonde fluorescenti, discriminando tra quelli con complementarità completa e incompleta. La visualizzazione dei risultati avviene con elettroforesi capillare su sequenziatore automatico dotato di un programma che riporta il grafico della corsa elettroforetica e di un programma che interpreta i risultati e restituisce la genotipizzazione del campione.²² Il metodo è efficiente e rapido, ma prevede una strumentazione sofisticata.

La **tabella 1** riporta i kit commercializzati che utilizzano le tecniche sopra descritte.

Tabella 1. Analisi di I livello: kit in commercio

	Reverse Dot Blot (RDB)	Oligonucleotide Ligation Assay (OLA)	Amplification Refractory Mutation Systems (ARMS)
Azienda	Innogenetics	Cystic Fibrosis Assay Abbott	Elucigene
Nome Kit	INNOLIPA CFTR 19; INNOLIPA CFTR 17 + Tn update	Cystic Fibrosis v3 PCR ASR	“Elucigene” CF
Mutazioni riconosciute	F508del G542X N1303K W1282X G551D 1717-1G->A R553X CFTRdel 2.3 (21Kb) I507del 711+1G->T 3272-26A->G 3905insT R560T 1898+1G->A S1251N I148T 3199del6 3120+1G->A Q552X 621+1G->T 3849+10Kb C->T 2183AA->G 394delTT 2789+5G>A R1162X 3659delC R117H R334W R347P G85E 1078delT A455E 2143delT E60X 2184delA 711+5G-> Locus TN	F508del G542X N1303K W1282X G551D 1717-1G->A R553X I507del 711+1G->T 3905insT R560T 1898+1G->A I148T 3120+1G->A 621+1G->T 3849+10Kb C->T 2789+5G>A R1162X 3659delC R117H R334W R347P G85E 1078delT A455E 2184delA Locus TN S549N/S549R V520F 3876delA F508C 394delTT REFLEX TEST: I506V, I507T	F508del G542X N1303K W1282X G551D 1717-1G->A R553X 621+1G->T 3849+10Kb C->T R1162X R117H R334W G1244E(G>A)

Analisi di II livello

L'analisi genetica di II livello utilizza sistemi di *scanning* del gene che permettono il riconoscimento di variazioni di sequenza in definite porzioni codificanti e nelle regioni di *splicing* del gene *CFTR*. Tali alterazioni di sequenza vengono successivamente caratterizzate dal punto di vista molecolare mediante reazioni di sequenziamento della regione genica interessata. Di seguito sono descritte le tecniche oggi più diffuse.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

La tecnica sfrutta il principio che la temperatura di denaturazione del DNA (T_m) dipende dalla sua sequenza nucleotidica ed è peculiare per ogni frammento. Le variazioni, sia pure di un singolo nucleotide, modificano la temperatura di denaturazione del frammento e di conseguenza la sua mobilità durante una corsa elettroforetica.

La regione di possibile mutazione viene amplificata, a partire dal DNA genomico del campione da esaminare e da un DNA di controllo, con una reazione polimerasica a catena che generalmente prevede l'utilizzo di un *primer* modificato con l'aggiunta di una coda stabilizzante ricca in guanina e citosina (*GC clamp*) che consente di creare artificialmente un dominio ad alta temperatura di denaturazione. L'amplificato del controllo e del campione vengono miscelati in parti uguali, denaturati e lasciati rinaturare lentamente (*re-annealing*). Una qualsiasi variazione di sequenza tra la molecola normale (*wild type*) e quella mutata porta alla formazione di un eteroduplex, combinazione di due filamenti singoli di DNA non perfettamente complementari per la presenza di un disappaiamento nel punto in cui c'è la mutazione. I prodotti della PCR vengono sottoposti a elettroforesi verticale su gel di poliacrilamide con gradiente denaturante (formamide-urea) crescente, che provoca la parziale apertura della doppia elica del frammento, con conseguente rallentamento della corsa elettroforetica, nel punto in cui il frammento incontra sul gel la concentrazione denaturante equivalente alla sua temperatura di denaturazione. In caso di mutazioni puntiformi allo stato eterozigote l'appaiamento casuale dei filamenti complementari dopo PCR porta alla formazione di eteroduplex contenenti una coppia di basi non appaiate che destabilizza la doppia elica, producendo un *pattern* elettroforetico composto da 4 bande, due più lente (i due diversi eteroduplex) e due più veloci (l'omoduplex normale e quello mutato). Pertanto i frammenti di DNA con sostituzioni nucleotidiche in eterozigosi e/o omozigosi vengono individuati perché danno luogo a *pattern* elettroforetici diversi rispetto al DNA *wild type* (controllo negativo) e verranno successivamente sequenziati per la caratterizzazione molecolare. Tutte le fasi della tecnica possono essere realizzate esclusivamente con metodi artigianali e richiedono una specifica esperienza degli operatori. Data la criticità del sistema è importante inserire in tutte le corse elettroforetiche controlli positivi e negativi per la verifica delle condizioni operative.²³ La combinazione di un'analisi di I livello e di un'analisi di II livello eseguita con la tecnica della DGGE ha un *detection rate* dell'85% circa.

Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Questa tecnica è l'evoluzione del DGGE verso una procedura automatica e permette l'identificazione di varianti nucleotidiche in brevissimo tempo.^{24,25,26} Si tratta di una cromatografia ionica in fase inversa che sfrutta, in condizioni di parziale denaturazione, la diversa ritenzione delle molecole di DNA in assenza/presenza di variazioni di sequenza. L'apparecchiatura dispone di una colonna di separazione riempita con una matrice di particelle non porose (styrene-divinil-benzene) uniformi e di piccole dimensioni che le conferiscono una estesa superficie di interazione e allo stesso tempo piccoli spazi per la diffusione delle molecole di DNA. Grazie al fatto che la fase stazionaria è elettricamente neutra e idrofobica, le molecole di DNA cariche negativamente non vengono assorbite dalla matrice. Il trietil-ammonio-acetato (TEAA) agisce da ponte tra i due perché da un lato le sue cariche positive formano un legame ionico con i gruppi fosfato del DNA (carichi negativamente) e dall'altro i gruppi alchilici interagiscono con la matrice idrofobica della resina. Il fattore eluente è l'acetonitrile (ACN) che rompe il legame tra il DNA e il TEAA, consentendo l'eluizione. Maggiore è la lunghezza del frammento da analizzare, maggiore sarà la forza con cui viene assorbito dalla fase stazionaria (resina) perché è più alto il numero di legami ionici tra i gruppi fosfato del DNA e gli ioni TEAA, di conseguenza i frammenti corti di DNA verranno eluiti più velocemente rispetto a quelli più lunghi. Il tempo di ritenzione dipende anche dalla composizione in basi nucleotidiche del frammento in esame. Tutti questi fattori contribuiscono alla differenziazione dei frammenti di DNA differenti per composizione e numero di basi. Per monitorare le separazioni ottenute in colonna, l'eluato passa attraverso uno spettrofotometro che ne legge l'assorbimento a 260 nm, la lunghezza d'onda assorbita dal DNA. Il risultato si ottiene nel giro di 6-7 minuti, viene registrato da un apposito programma e riportato sotto forma grafica: si riconosce la presenza di un frammento con sostituzione nucleotidica quando il cromatogramma mostra più di un picco di assorbimento.

Come per la DGGE, anche nel caso della DHPLC il campione da esaminare e un controllo vengono amplificati mediante PCR e successivamente miscelati, denaturati e lentamente rinaturati in modo da formare gli eteroduplex in caso di mutazione. L'analisi viene eseguita a temperature sufficientemente elevate da mantenere le molecole parzialmente denaturate. Un frammento che contiene una variante nucleotidica si distinguerà dal controllo negativo perché darà luogo alla formazione di un eteroduplex che produrrà picchi cromatografici aggiuntivi, dal momento che si comporta cromatograficamente in modo diverso dall'omoduplex non mutato, che ha tempi di ritenzione maggiori. Lo strumento infatti rileva la differenza tra la molecola omoduplex, che a una determinata temperatura è ancora sotto forma di doppia elica, e quella dell'eteroduplex, che alla stessa temperatura mostra una parziale denaturazione in corrispondenza del nucleotide non

appaiato. Tale temperatura è detta di «quasi denaturazione». È importante inserire in tutte le corse cromatografiche controlli positivi e negativi per la verifica delle condizioni operative. La combinazione di un'analisi di I livello e di un'analisi di II livello eseguita con la tecnica della DHPLC ha un *detection rate* del 90% circa.

Sequenziamento diretto del DNA

Le tecniche precedentemente descritte permettono all'operatore di riconoscere variazioni di sequenza del DNA la cui caratterizzazione molecolare avviene in seguito per sequenziamento della specifica regione del gene.

L'analisi di sequenza prevede l'impiego di apparecchiature automatiche che, in virtù della loro rapidità, robustezza del sistema e sicurezza per l'operatore, hanno sostituito la tecnica manuale di sequenziamento con isotopi radioattivi. La marcatura attualmente più utilizzata è quella che si avvale di terminatori di catena denominati *big dye terminator* che consistono nei quattro didesossinucleotidi marcati con molecole fluorescenti. I prodotti della reazione di marcatura vengono sottoposti a elettroforesi su sequenziatore, man mano che i frammenti di DNA di diversa lunghezza raggiungono la posizione del *detector*, vengono rilevati e identificati grazie all'emissione di luce alle lunghezze d'onda specifiche dei diversi fluorocromi, eccitati dal laser dello strumento. Le emissioni vengono raccolte e analizzate da una fotocamera digitale CCD (Coupled Charge Device) che riporta la sequenza delle emissioni in un grafico chiamato elettroferogramma, caratterizzato da una successione di picchi di 4 colori differenti che corrispondono alle emissioni fluorescenti dei diversi fluorocromi.

Analisi di III livello

Nel 10-15% dei soggetti affetti non si riesce a identificare la o le mutazioni responsabili della malattia nonostante l'analisi di tutte le porzioni codificanti e le regioni di *splicing* del gene. Poiché a questo tipo di analisi sfuggono i riarrangiamenti genomici che coinvolgono delezioni di più esoni in uno stesso gene, è ragionevole supporre che la presenza di inserzioni o delezioni nel gene *CFTR* sia sottostimata e possa rendere conto di almeno una parte di quel 10-15% di alleli non caratterizzati. A conferma di questa ipotesi, è stato di recente segnalato che una estesa ricerca dei riarrangiamenti in una popolazione selezionata ha consentito di individuare un 16% di alleli precedentemente non identificati.²⁷ Gli autori hanno utilizzato la tecnica semiquantitativa detta Quantitative Multiplex Polymerase Chain Reactions of Short Fluorescent Fragments (QMPSF) che consiste nell'amplificazione simultanea di piccoli frammenti di DNA seguita dalla quantificazione della fluorescenza di ciascun frammento amplificato. Nonostante la segnalazione sia ancora isolata e la tecnologia poco utilizzata, una conferma della sua utilità arriva da studi preliminari sulla popolazione italiana che sottolineano l'opportunità di considerare questo tipo di analisi almeno per alcuni casi selezionati.

IN BREVE

- **Analisi di I livello: kit commerciale o autoprodotta che includa le più frequenti mutazioni dell'area di riferimento del laboratorio.**
- **Analisi di II livello: scanning di tutti gli esoni e regioni limitrofe.**
- **Analisi di III livello: ricerca di delezioni e/o inserzioni.**

Analisi correlate alla diagnostica prenatale

La possibilità di analizzare, mediante la tecnica dell'amplificazione genica, un elevato numero di alleli differenti associati a diversi *locus* genici dà la possibilità di trarre informazioni su alcuni aspetti critici dell'iter analitico della diagnosi prenatale. L'analisi di micro/minisatelliti, normalmente utilizzati nelle indagini di tipo medico legale, è una buona strategia nella procedura della diagnosi prenatale per verificare eventuali fonti di inquinamento del DNA fetale da parte di DNA materno o di altro DNA eterologo, per controllare la corretta correlazione familiare (scambio di campioni) e per il controllo della paternità in caso di dubbio diagnostico.

Analisi genetica per la diagnosi di malattia

L'analisi molecolare può costituire uno strumento prezioso per diagnosticare la fibrosi cistica. Il suo utilizzo e la sua interpretazione in questo contesto devono comunque sempre far seguito a precise indicazioni cliniche: non vi è motivo, in assenza di un giustificato sospetto di malattia, di eseguire un test molecolare a fini diagnostici. Sintomi e segni che possano meritare un approfondimento diagnostico di questo tipo non sono qui discussi, ma certamente il *setting* ideale per un'appropriate valutazione clinica sembra essere il centro regionale di riferimento.

Vale la pena ricordare che in Italia il test diagnostico più sensibile per una forma classica di fibrosi cistica non è l'analisi molecolare, ma il test del sudore. La determinazione del livello di cloro nel sudore è da preferirsi al test genetico anche per il costo più contenuto e per l'assenza di effetti collaterali (non identificazione di portatori). Il test del sudore è quindi da considerarsi l'analisi diagnostica di prima scelta in presenza di sospetto clinico di malattia, e in questo contesto la sua positività consente di porre diagnosi senza ulteriori approfondimenti. L'identificazione delle mutazioni nulla aggiunge alla diagnosi, anche perché l'unico tratto fenotipico correlato al genotipo – la funzionalità pancreatica esocrina – può essere valutato con maggiore affidabilità attraverso l'esame biochimico delle feci.

Quando è impossibile eseguire il test del sudore, quando il risultato è di dubbia interpretazione o quando è negativo ma associato a un forte sospetto clinico, è indicato eseguire un'analisi genetica di I livello. La sensibilità diagnostica di questo tipo di analisi è limitata. Se ipotizziamo che in Italia un kit standard per mutazioni in *CFTR* abbia un *detection rate* medio del 75%,¹⁷ la capacità di identificare entrambe le mutazioni è poco più del 50% e quindi la diagnosi sarà possibile per poco più della metà degli affetti; nel 37% dei casi verrà individuato un solo allele mutato, addirittura nessuno in 6 affetti su 100. Nelle realtà locali favorite da una distribuzione allelica più omogenea l'analisi genetica di I livello può giungere a una copertura del 90%: in questo caso sono 18 su cento i pazienti in cui viene identificata una sola mutazione, l'1% quelli in cui entrambe sfuggono all'analisi.

Chi richiede l'analisi deve essere consapevole della sensibilità diagnostica del test prescelto, per decidere se proseguire in caso di negatività parziale (una mutazione rilevata) o totale, con approfondimenti di II livello. E' bene che la scelta di approfondire l'analisi non venga assunta autonomamente dal laboratorio, ma che sia discussa con il medico o con il genetista medico che ha richiesto l'esame, che in alcuni contesti clinici potrebbe considerare sufficientemente basso il rischio di malattia associato a un esito negativo del I livello di analisi, o potrebbe voler ricorrere ad analisi elettrofisiologiche. In casi sele-

zionati, qualora persista un forte sospetto di malattia anche dopo negatività a un'analisi di II livello, è giustificata la ricerca di delezioni e/o inserzioni del gene *CFTR*.²⁷

Possono comunque esistere forme classiche di fibrosi cistica nelle quali, anche dopo un'analisi di III livello, non viene individuato un genotipo *CFTR* mutato. Si tratta di situazioni rare, che hanno fatto ipotizzare che anche nella fibrosi cistica possa essere presente il fenomeno dell'eterogeneità genetica e che sottolineano come la diagnosi di malattia sia prevalentemente clinica.²⁸

Quanto detto finora sull'uso dell'analisi genetica per la diagnosi di fibrosi cistica è valido per le forme classiche di malattia. Nella forme atipiche è possibile seguire un percorso analogo, rammentando che le mutazioni presenti in questi casi sono spesso diverse da quelle classiche rilevabili per mezzo dei kit convenzionali, per cui un'analisi di I livello ha sensibilità ancora minore; in questo contesto trova spesso una specifica indicazione l'approfondimento con *scanning* del gene.

IN BREVE

➔ **Il *gold standard* per la diagnosi di malattia è il test del sudore, non l'analisi genetica. Se il test del sudore non è eseguibile o non è risolutivo, possono essere indicate un'analisi genetica di I livello ed eventualmente, su giudizio clinico, anche di II o di III livello.**

Analisi molecolare in particolari situazioni diagnostiche

Diagnosi prenatale

In questo contesto la diagnosi prenatale è intesa come l'analisi molecolare su materiale fetale quando entrambi i genitori siano portatori di una mutazione che causa la malattia. L'individuazione di una coppia di portatori può derivare dall'analisi genetica di familiari di affetti o anche di individui della popolazione generale, oppure può far seguito alla nascita di un figlio malato. In quest'ultimo caso è preferibile l'analisi diretta delle mutazioni presenti nella famiglia, piuttosto che l'abituale diagnosi prenatale eseguita tramite marcatori genici. E' quindi giustificato, quando vi sia un progetto di gravidanza, indagare il nucleo familiare con ogni livello di analisi che possa consentire l'identificazione del genotipo completo.

La diagnosi prenatale secondo la definizione qui adottata si differenzia nettamente dalla pratica del *testing* fetale, vale a dire l'analisi molecolare eseguita su DNA fetale estratto da villi coriali o amniociti, in assenza di indicazione specifica. Tale attività diagnostica viene esercitata esclusivamente presso strutture non convenzionate, ed è rivolta alle donne che si affidano a tali strutture per la determinazione del cariotipo fetale. Le utenti, poco prima dell'esecuzione del prelievo, prendono atto attraverso una consulenza o un opuscolo informativo dell'esistenza di alcune patologie, tra cui la fibrosi cistica, per le quali si può richiedere un test molecolare sul materiale fetale prelevato. Le circostanze in cui si realizza questa offerta sono di partenza svantaggiose per la coppia che si trova a dover esaminare troppo rapidamente il tipo di analisi e il quadro clinico corrispondente in un momento in cui è sottoposta alla pressione dei tempi immediati del prelievo e a uno stato di ansia legato alla procedura ostetrica imminente, a questo si aggiunge il dover valutare gli aspetti economici dell'ampliamento dell'indagine inizialmente richiesta.

In caso di esito negativo del test, la donna/coppia percepisce un grosso vantaggio nell'essersi sottoposta al test. Suppone di aver abbattuto significativamente la probabilità di avere una prole con malattie genetiche, si sente giustificata nella spesa sostenuta, rinforza il modello presso altri potenziali utenti. I difetti congeniti eventualmente rivelati da successive indagini prenatali (come l'ecografia morfologica) o neonatali producono un effetto devastante sulla capacità di adattamento alla patologia, in quanto questa è stata minimizzata dalla precedente assicurazione. In realtà, considerando un rischio riproduttivo generico del 3% comune a tutte le coppie della popolazione generale, la negatività di due o tre indagini molecolari riduce in modo impercettibile tale probabilità. Qualora invece venga individuata una sola mutazione emerge il problema dell'impossibilità di escludere la presenza di una seconda mutazione e di definire correttamente la condizione fetale. Le con-

sequenze per la coppia possono essere pesanti, con un grave carico d'ansia e rammarico per aver avviato il test che talora portano addirittura alla scelta di interrompere la gravidanza a causa dell'inatteso aumento di rischio. Molto spesso la coppia cerca rassicurazione attraverso molteplici consulenze ed estensione di analisi a costi elevati, in genere effettuate a carico del Servizio sanitario nazionale da strutture che accolgono la richiesta di test, fornendo una specifica consulenza genetica e assumendosi un onere assai gravoso.

IN BREVE

➔ **Il testing fetale è da scoraggiare e va sostituito con la ricerca di mutazioni nella coppia.**

Screening neonatale

Lo *screening* neonatale per fibrosi cistica si compone di un sistema di analisi a più livelli (*step*). Il primo consiste nel dosaggio del tripsinogeno immunoreattivo (IRT) in tutti i neonati. Nei neonati con valori di IRT superiori al 98° centile viene eseguita l'analisi molecolare delle mutazioni più rappresentate localmente (secondo *step*). La presenza di due mutazioni consente di porre diagnosi di malattia, qualora se ne individui una sola il neonato viene richiamato e sottoposto al test del sudore (terzo *step*) per una conferma o una smentita diagnostica definitiva.²⁸ In alcune regioni la sensibilità dei kit standard per l'analisi di mutazioni è troppo limitata, si sceglie quindi di integrare il protocollo di *screening* con un secondo dosaggio dell'IRT, eseguito dopo un mese di vita nei neonati positivi al primo *step*.⁶

L'integrazione dell'analisi di mutazioni nei protocolli di *screening* neonatale permette un miglioramento della sensibilità complessiva del sistema, il contenimento dell'ansia dei genitori e la tempestività di una diagnosi definitiva.

Un effetto collaterale è invece l'individuazione di portatori che hanno un IRT positivo, una mutazione e il test del sudore negativo, con una frequenza significativamente superiore rispetto a quella attesa per le mutazioni valutate.⁷ Alcuni di questi neonati sono eterozigoti composti, in cui la seconda mutazione è una mutazione rara e, pur essendo negativi al test del sudore, possono essere affetti da forme atipiche di fibrosi cistica o da altre patologie correlate ad anomalie del gene *CFTR*³⁰. C'è a tutt'oggi poca chiarezza sulla possibile evolutività di queste forme, ma è ragionevole ipotizzare un coinvolgimento clinico modesto che non giustifica una diagnosi precoce perché costituirebbe una notevole fonte di inquietudine, trattandosi di una diagnosi eseguita in epoca neonatale per una condizione non ben definita. E' indicato, quindi, analizzare nel secondo *step* dello *screening* neonatale solamente mutazioni che causano forme classiche di malattia, e riservare eventuali approfondimenti di analisi genetica a casi mirati, di difficile definizione diagnostica (ipertripsinemia persistente, test del sudore dubbio).

IN BREVE

- **L'analisi genetica di I livello può essere integrata nello screening neonatale di malattia. Lo *screening* neonatale per fibrosi cistica si compone infatti di un sistema di analisi a più livelli:**
- 1. dosaggio del tripsinogeno immunoreattivo;**
 - 2. analisi molecolare delle mutazioni più rappresentate localmente;**
 - 3. test del sudore.**

Analisi genetica per la diagnosi di eterozigosi

Test individuale

Per test individuale si intende un'analisi genetica eseguita su un singolo, mirata a definire la probabilità di eterozigosi. Per i calcoli seguenti ci si è basati su una prevalenza di eterozigoti nella popolazione generale italiana di 1/27. Si distinguono due situazioni, a seconda che la probabilità di eterozigosi a priori (prima del test) sia uguale o superiore a quella della popolazione generale.

Probabilità a priori uguale alla popolazione generale

Il test genetico può essere richiesto da individui della popolazione generale con rischio standard di eterozigosi (1/27), in questo caso l'analisi genetica indicata è quella di I livello. In caso di negatività all'analisi, la probabilità di eterozigosi è intorno all'1% (1/105). Non è indicato un test di II livello; un'eventuale richiesta di approfondimento può essere gestita sottoponendo a test anche il partner e calcolando il rischio di coppia. Se viceversa il soggetto risultasse portatore, va proposta l'analisi del partner.

Probabilità a priori superiore alla popolazione generale

I familiari di un malato o di un eterozigote hanno una probabilità maggiore di essere portatori (vedi **tabella 2**) in questo caso, per una valutazione del rischio di eterozigosi è essenziale conoscere la mutazione che interessa il ramo familiare a cui appartiene chi richiede l'analisi. Per individuare tale mutazione può essere necessario ed è giustificato approfondire l'analisi con accertamenti di II o anche III livello sul genotipo dell'affetto/eterozigote o del genitore dell'affetto/eterozigote parente del consultando, previo consenso informato dell'interessato.

Se la mutazione familiare è nota e non è presente nel familiare che richiede l'analisi, la probabilità di eterozigosi è inferiore a quella della popolazione generale e può essere ulteriormente e significativamente ridotta con l'utilizzo di un kit standard di I livello, di solito usato se comprende la mutazione familiare.

Se la mutazione familiare non viene identificata neppure dopo indagini approfondite, e se non sono possibili analisi indirette dei marcatori genici, la probabilità di eterozigosi resta immutata e definita sulla base del calcolo teorico legato alla distanza genetica dal familiare affetto/eterozigote.

Se non è disponibile il materiale biologico per identificare la mutazione familiare (paziente e genitori del paziente deceduti, non rintracciabili o non collaboranti), la probabilità di eterozigosi del familiare può essere indagata da un'analisi di I livello e il rischio di coppia viene sostanzialmente ridotto in caso di negatività dell'analisi del partner.

Tabella 2. Familiarità con malati e portatori di fibrosi cistica e probabilità di eterozigosi

Grado di parentela	Condizione	Probabilità di eterozigosi
genitore di:	malato	1
	portatore	1/2
figlio/a di:	malato	1
	portatore	1/2
fratello/sorella di:	malato	2/3
	portatore	1/2
fratellastro/sorellastra di:	malato	1/2
	portatore	1/4
nonno/a di:	malato	1/2
	portatore	1/4
zio/a di:	malato	1/2
	portatore	1/4
primo cugino/a di:	malato	1/4
	portatore	1/8
primo cugino/a e 1/2 di:	malato	1/8
	portatore	1/16
secondo cugino/a di:	malato	1/16
	portatore	1/32

IN BREVE

- **La probabilità individuale di eterozigosi può essere efficacemente calcolata con un test di I livello o, in caso di familiarità, con la ricerca della mutazione specifica.**
- **Non è indicato un test di II livello.**

Test di coppia

Si intende per test di coppia l'insieme dei test individuali eseguiti su entrambi i componenti di una coppia; la combinazione delle probabilità di eterozigosi consente di calcolare il rischio riproduttivo per fibrosi cistica della coppia.

Si distinguono due situazioni a seconda che il rischio riproduttivo a priori (prima del test) della coppia sia uguale o superiore a quello della popolazione generale.

Rischio riproduttivo a priori uguale alla popolazione generale

Il test genetico può essere richiesto spontaneamente da coppie della popolazione generale oppure, in alcune aree o nazioni, può essere offerto attivamente alle coppie che abbiano una gravidanza in corso o che la stiano pianificando.³¹ Inoltre, presso i centri di fecondazione assistita,³ è pratica comune richiedere un'analisi genetica per fibrosi cistica a tutte le coppie che intraprendono un percorso di riproduzione assistita.

Una coppia della popolazione generale ha per ogni gravidanza un rischio a priori di generare un figlio affetto dalla malattia approssimativamente compreso tra 1/2.500 e 1/3.000 ($1/27 \times 1/27 \times 1/4$).

In assenza di fattori di rischio (familiarità per malattia o eterozigosi, atresia bilaterale congenita dei dotti deferenti del maschio nelle coppie che ricorrono alla fecondazione assistita), è indicato un test di I livello in uno o entrambi i componenti della coppia.

Nel caso che entrambi risultino negativi al test, il rischio riproduttivo a posteriori è molto basso, inferiore a uno su 40.000 ($1/105 \times 1/105 \times 1/4$), e non sono indicati ulteriori approfondimenti. Nel caso che entrambi risultino positivi al test, il rischio riproduttivo a posteriori è quello di una coppia di portatori, e quindi del 25%; in tal caso va presentata la possibilità di ricorrere alla diagnostica prenatale, discutendo i pro e i contro nel corso di una o più sedute di consulenza genetica. Se uno dei componenti della coppia è portatore e l'altro è negativo al test di I livello, il rischio riproduttivo a posteriori è compreso tra 1/400 e 1/500 ($1 \times 1/105 \times 1/4$). Questa ipotesi è discussa più avanti.

Rischio riproduttivo a priori superiore alla popolazione generale

Genitori di affetti

Disomie uniparentali e mutazioni *ex novo* sono eventi molto rari nella fibrosi cistica e pertanto il rischio per una coppia che abbia già avuto un figlio affetto è considerato 1/4. In queste situazioni il test genetico è utilizzabile per eseguire la diagnosi prenatale, se richiesta dai genitori. Le problematiche riguardanti l'analisi molecolare e diagnostica prenatale sono state già discusse.

Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un eterozigote

Il rischio riproduttivo è intorno all'1% ($1 \times 1/27 \times 1/4$), ulteriormente riducibile a 1/400-500 se il non portatore è negativo a un'analisi di I livello. L'interpretazione personale di tale frazione di rischio è estremamente variabile, in funzione anche dell'eventuale vissuto familiare di malattia. Una consulenza genetica specialistica servirà a

illustrare alla coppia la possibilità di approfondimento con analisi di II livello, con i potenziali vantaggi (riduzione del rischio intorno a $1/1.000$, cioè $1 \times 1/261 \times 1/4$, o individuazione del secondo portatore) e svantaggi (sensibilità non assoluta, difficoltà nell'interpretazione di varianti di sequenza dalle incerte conseguenze cliniche, scelte riproduttive più complesse) che comporta. Non è accettabile eseguire un'analisi di II livello che non sia stata preceduta da un colloquio specialistico di consulenza genetica che abbia illustrato il significato dell'analisi.

Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un affetto da fibrosi cistica

Le donne con fibrosi cistica possono avere figli ed è questo un evento che, grazie ai continui miglioramenti della qualità e dell'attesa di vita, è in costante incremento negli ultimi anni. Una tendenza analoga si sta verificando anche per i maschi affetti che, nonostante siano abitualmente azoospermici, possono beneficiare di tecniche di riproduzione assistita che prelevano i gameti a monte dell'ostruzione dei deferenti.

Il rischio di generare figli malati in una coppia in cui uno dei due membri sia affetto è di circa il 2% ($2 \times 1/27 \times 1/4$); con un test di I livello di esito negativo tale rischio può ridursi allo 0,5% ($2 \times 1/105 \times 1/4$). Procedendo a un eventuale test di II livello, sempre offerto e discusso in sede di consulenza genetica, il rischio può approssimarsi a $1/500$ ($2 \times 1/261 \times 1/4$).

Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un familiare di affetto con mutazione non identificata

L'impossibilità di identificare la mutazione familiare implica che la probabilità da conteggiare a priori per il familiare è quella di eterozigosi. Per esempio una coppia composta da un primo cugino di affetto e un individuo della popolazione generale corre un rischio riproduttivo di circa $1/400$ ($1/4 \times 1/27 \times 1/4$); dopo un'analisi di I livello negativa nel partner non familiare, il rischio diventa inferiore a $1/1.500$ ($1/4 \times 1/105 \times 1/4$). Nonostante una tale consistente riduzione, il vissuto familiare di malattia può rendere desiderabile per la coppia procedere a un'analisi di II livello. Anche in questo caso l'opzione va discussa con personale medico competente.

Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un paziente con forma atipica di fibrosi cistica

Come ricordato in precedenza, le forme atipiche di fibrosi cistica possono essere di difficile definizione diagnostica. Si associano a quadri clinici abitualmente più lievi delle forme classiche di malattia e la loro evoluzione a lungo termine è fondamentalmente sconosciuta, anche se è ragionevole ipotizzare che difficilmente possano giungere al livello di espressione clinica di una fibrosi cistica classica. In questa sede intendiamo per for-

me atipiche quelle in cui le manifestazioni cliniche compatibili con la diagnosi di malattia sono accompagnate da positività agli accertamenti diagnostici specifici come il test del sudore, lo studio della differenza di potenziale nasale, la presenza di due mutazioni del gene *CFTR* (inclusa IVS8 5T). Pur nell'ambito di un certo grado di ambiguità nosologica, i pazienti con atresia bilaterale congenita dei dotti deferenti dovuta ad alterazioni del gene *CFTR* sono compresi in questo gruppo.

Le considerazioni sull'indicazione al tipo di analisi genetica in questo gruppo sono analoghe a quelle espresse in precedenza, ma sono rese più complesse dalla scarsa correlazione tra genotipo e fenotipo e dalla sostanziale assenza di dati prognostici certi. L'obiettivo resta comunque quello di conoscere il rischio riproduttivo per forme classiche, non atipiche, di malattia. In questo gruppo, più ancora che nei precedenti, è indispensabile la consulenza di un genetista esperto in questi temi per la scelta del tipo di analisi genetica da eseguire.

Consanguinei

La presenza di consanguineità implica la possibilità di condividere alleli di origine comune e pertanto aumenta il rischio di malattie autosomiche recessive. Conoscendo l'incidenza della malattia (q^2), la frequenza dei portatori (q) e il coefficiente di inincrocio (F) – cioè la probabilità che un figlio di una coppia di consanguinei sia omozigote per un allele ereditato da un antenato a un dato locus autosomico – si può calcolare la probabilità che l'unione tra consanguinei generi figli affetti: $q^2 + q \cdot (1-q) \cdot F$. Ipotizzando un'incidenza di fibrosi cistica in Italia di $1/2.700$ e di eterozigosi pari a $1/27$, la probabilità per una coppia di secondi cugini senza storia familiare di malattia ($F = 1/64$) di generare un figlio affetto da fibrosi cistica è di poco inferiore a $1/1.000$. Il rischio è naturalmente superiore per gradi di consanguineità più stretti.

L'esito negativo di un'analisi di I livello, anche per un solo membro della coppia, è sufficiente a riportare il rischio riproduttivo per fibrosi cistica a soglie inferiori alla popolazione generale.

Genitori di feto con iperecogenicità intestinale

L'aumentata ecogenicità intestinale fetale può associarsi, in una minoranza di casi, a fibrosi cistica.^{32,33} Il quadro viene spesso interpretato come l'equivalente fetale di un ileo da meconio, anche se non sempre in casi di iperecogenicità intestinale c'è ostruzione intestinale alla nascita, come non sempre c'è un reperto anamnestico ecografico compatibile nei neonati con ileo da meconio. Solitamente l'ileo da meconio si associa a mutazioni di classe I, II o III, le più frequenti delle quali sono rilevabili con un kit standard di I livello. In caso quindi di riscontro incidentale di iperecogenicità nel feto è indicata un'analisi di I livello nei genitori. Considerando un *detection rate* del 75%, l'esito negativo per entrambi i genitori abbassa il rischio di fibrosi cistica nel feto al di

sotto del 2 per mille; quando uno dei genitori è identificato come portatore è indicato un approfondimento di II livello, spesso complicato dai tempi molto stretti dettati dalla fase avanzata della gravidanza; quando entrambi i genitori siano portatori (rischio di malattia pari al 50%) viene prospettata loro la diagnosi prenatale. In casi selezionati, è possibile effettuare lo studio degli enzimi microvillari, che pur non essendo un test specifico per la diagnosi di fibrosi cistica, può aiutare nell'inquadramento diagnostico dell'osservazione ecografica.

Genitori di deceduti con sospetta fibrosi cistica

Per valutare il rischio riproduttivo nei genitori di un individuo deceduto con un quadro clinico sospetto per fibrosi cistica, ma senza una diagnosi definitiva, e qualora non sia disponibile materiale biologico valutabile del caso indice, è indicato eseguire un'analisi di I livello nei genitori, da approfondire al II e III livello se il sospetto clinico è molto forte, o se uno dei due risultasse portatore. La consulenza genetica in queste situazioni è fortemente raccomandata.

IN BREVE

- **Il rischio riproduttivo di coppia può essere calcolato con un test di I livello, il cui esito negativo è sufficiente a certificare un rischio significativamente ridotto.**
- **L'approfondimento con test di II livello è opportuno solo in una minoranza di casi e deve sempre essere preventivamente discusso con la coppia in sede di consulenza genetica.**

Bibliografia essenziale

1. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
2. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Bukwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-65.
3. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 303-12.
4. Borgo G, Lalatta F, Cantù-Raynoldi A, Castellani C, Ferrari M, Giunta AM, Iapichino L, Lucci M, Scarpa M. Linee guida per l'uso del test genetico per fibrosi cistica. *Aggiornamenti di fisiopatologia e terapia in pediatria* 2001; 11: 5-17.
5. Viviani L, Padoan R, Giglio L, Bossi A. The Italian registry for cystic fibrosis: what has changed in the last decade. *Epidemiol Prev* 2003; 27: 91-96.
6. Corbetta C, Seia M, Bassotti A, Ambrosioni A, Giunta A, Padoan R. Screening for cystic fibrosis in newborn infants: results of a pilot programme based on a two tier protocol (IRT/DNA/IRT) in the Italian population. *J Med Screen* 2002; 9: 60-63.
7. Castellani C, Bonizzato A, Cabrini G, Mastella G. Newborn screening strategy for cystic fibrosis: a field study in an area with high allelic heterogeneity. *Acta Paediatr* 1997; 86: 497-502.
8. Castellani C. Dieci anni dalla scoperta del gene della fibrosi cistica: implicazioni cliniche. *Aggiornamenti di fisiopatologia e terapia in pediatria* 2000; 10: 14-21.
9. Frederiksen B, Lanng S, Kock C, Hoiby N. Improved survival in the danish center-treated cystic fibrosis patients: results of aggressive treatment. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21: 153-58.
10. Bossi A, Battistini F, Braggion C, Celia Magno E, Cosimi A, De Candussio G, Gagliardini R, Giglio L, Giunta A, Grzincich GL, La Rosa M, Lombardo M, Lucidi V, Manca A, Mastella G, Moretti P, Padoan R, Pardo F, Quattrucci S, Raia V, Romano L, Salvatore D, Taccetti G, Zanda M. Registro Ita-

- liano Fibrosi Cistica: 10 anni di attività. *Epid Prev* 1999; 23: 5-16.
11. Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, White T, Milunsky A. Congenital absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 1992; 267: 1704-7.
 12. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339: 635-8.
 13. Alton EFWF, Currie D, Logan-Sinclair R, Warner JO, Hodson ME, Geddes DM. Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1990; 3: 922-6.
 14. Rosenstein BJ, Cutting GR, for the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998; 132: 589-95.
 15. Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9: 498-503.
 16. Cystic Fibrosis Genetic Consortium. *Cystic Fibrosis Genetic Data Base*. URL: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>.
 17. Rendine S, Calafell F, Cappello N, Gagliardini R, Caramia G, Rigillo N, Silvetti M, Zanda M, Miano A, Battistini F, Marianelli M, Taccetti G, Diana MC, Romano L, Romano C, Giunta A, Padoan R, Pianaroli A, Raia V, De Ritis G, Battistini A, Grzincich G, Iapichino L, Pardo F, Antonelli M, Quattrucci S, Lucidi V, Castro M, Santini B, Castello M, Guanti G, Leoni GB, Cao A, Toffoli C, Lucci E, Vullo C, Torricelli F, Sbernini F, Romeo G, Ronchetto P, Seia M, Rossi A, Ferrari M, Cremonesi L, Salvatore F, Castaldo G, D'Alcamo E, Maggio A, Sangiuolo F, Dallapiccola B, Maceratesi P, Bisceglia L, Gasparini P, Carbonara A, Bonizzato A, Cabrini G, Bombieri C, Pignatti PF, Borgo G, Castellani C, Villani A, Arduino C, Salvatore D, Mastella G, Piazza A. Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. *Ann Hum Genet* 1997; 61: 411-424.
 18. Bonizzato A, Bisceglia L, Marigo M, Nicolis E, Bombieri C, Castellani C, Borgo G, Zelante L, Mastella G, Cabrini G, Gasparini P, Pignatti PF. Analysis of the complete coding region of the CFTR gene in a cohort of CF patients from Northeastern Italy: identification of 90% of the mutations. *Hum Genet* 1995; 95: 397-402.
 19. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 329: 1308-13.
 20. Concar D. Test blunders risk needless abortions. *New Scientist* 2003; 178: 4-6.

21. Vastag B. Cystic fibrosis gene testing a challenge. *JAMA* 2003; 289: 2923-34.
22. Tomaiuolo R, Spina M, Castaldo G. Molecular diagnosis of cystic fibrosis: comparison of four analytical procedures. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 26-32.
23. Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Meth Enzymol* 1987; 155: 501.
24. Le Marechal C, Audrezet MP, Quere I, Raguenes O, Langonne S, Ferec C. Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC): major implications for genetic counselling. *Hum Genet* 2001; 108: 290-8.
25. Ravnik-Glavac M, Atkinson A, Glavac D, Dean M. DHPLC screening of cystic fibrosis gene mutations. *Hum Mut* 2002; 19: 374-383.
26. D'Apice MR, Gambardella S, Bengala M, Russo S, Nardone AM, Lucidi V, Sangiuolo F, Novelli G. Molecular analysis using DHPLC of cystic fibrosis: increase of the mutation detection rate among the affected population in Central Italy. *BMC Med Genet* 2004; 14; 5(1): 8.
27. Audrezet MP, Chen JM, Raguenes O, Chuzhanova N, Giteau K, Le Marechal C, Quere I, Cooper DN, Ferec C. Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum Mutat* 2004; 23: 343-57.
28. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR. Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med* 2003; 347: 401-7.
29. Ranieri E, Ryall RG, Lewis BD, Geraece RL, Morris CP, Nelson PV, Carey WF, Pollard AC, Robertson EF. Neonatal screening for cystic fibrosis using immunoreactive trypsinogen and direct gene analysis. *BMJ* 1991; 302: 1237-40.
30. Castellani C, Benetazzo MG, Tamadini A, Begnini A, Mastella G, Pignatti PF. Analysis of the entire coding region of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in neonatal hypertrypsinemia with normal sweat test. *J Med Genet* 2001; 38: 202-5.
31. Richards CS, Bradley LA, Amos J, Allitto B, Grody WW, Maddalena A, McGinnis MJ, Prior TW, Popovich BW, Watson MS, Palomaki GE. Standards and guidelines for CFTR mutation testing. *Genet Med* 2002; 4: 379-91.

32. Scotet V, De Braekeleer M, Audrezet MP, Quere I, Mercier B, Dugueperoux I, Andrieux J, Blayau M, Ferec C. Prenatal detection of cystic fibrosis by ultrasonography: a retrospective study of more than 346 000 pregnancies. *J Med Genet* 2002; 39: 443-8.
33. Simon-Bouy B, Satre V, Ferec C, Malinge MC, Girodon E, Denamur E, Leporrier N, Lewin P, Forestier F, Muller F, French Collaborative Group. Hyperechogenic fetal bowel: a large French collaborative study of 682 cases. *Am J Med Genet* 2003; 121: 209-13.

Finito di stampare nel mese di novembre 2005 presso Geca - Cesano Boscone, Milano