

CONSENSO ALLA DIAGNOSI MOLECOLARE DI FIBROSI CISTICA (I LIVELLO E GENE COMPLETO)

Gentilissimo/a Signore/a,

nel modulo di consenso informato che Le accludiamo troverà alcune informazioni sugli aspetti clinici, sull'analisi genetica di fibrosi cistica, sul trattamento dei dati sensibili, genetici e sulla conservazione del campione biologico.

Aspetti clinici

La fibrosi cistica è una malattia genetica, cronica, evolutiva e colpisce un neonato ogni 2500-2700 nati vivi. Nei pazienti affetti da fibrosi cistica le secrezioni delle ghiandole esocrine, cioè i liquidi biologici come muco, sudore, saliva, sperma, i succhi gastrici, sono molto più dense e viscosi del normale. Le manifestazioni più frequenti sono a carico dell'apparato respiratorio (bronchite cronica), del pancreas (problemi digestivi), più raramente dell'intestino (ostruzione stercorale), del fegato (cirrosi) e dell'apparato riproduttivo (infertilità, soprattutto maschile). Le secrezioni anomale provocano un danno progressivo agli organi coinvolti.

La malattia si manifesta per lo più entro i primi anni di vita, talora più tardivamente, e può esprimersi con maggiore o minore gravità in individui diversi. Il trattamento è esclusivamente sintomatico e consiste nel posizionamento di un drenaggio bronchiale, nella somministrazione di antibiotici per le infezioni respiratorie, negli esami per valutare la funzionalità del pancreas, nella somministrazione di vitamine e integratori energetici per i problemi digestivi e nutrizionali. Il decorso e la prognosi della fibrosi cistica sono notevolmente migliorati negli ultimi decenni, soprattutto per i pazienti diagnosticati precocemente.

Aspetti genetici

La fibrosi cistica è una malattia monogenica che si trasmette con modalità autosomica recessiva, determinata da mutazioni, cioè alterazioni del DNA, che insorgono in un solo gene (monogenica), chiamato CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator); poichè in ciascuno di noi i geni sono presenti in duplice copia (uno di origine paterna e l'altro di origine materna) la malattia si definisce autosomica recessiva perché si manifesta solo negli individui in cui entrambe le copie del gene CFTR, sono alterate e non dipende dal sesso dell'individuo. Gli individui, invece, che possiedono una sola copia del gene alterato e una normale sono asintomatici e si definiscono portatori sani o eterozigoti per la mutazione. La frequenza dei portatori sani nella popolazione italiana è di circa 1 su 30 individui.

Due genitori portatori sani (asintomatici) avranno una probabilità del 25% di avere figli affetti da fibrosi cistica. Dalla stessa unione i figli avranno una probabilità su due (50%) di nascere portatori sani, come i genitori.

Il gene CFTR produce una proteina che regola il trasporto di sali attraverso la membrana cellulare; una mutazione causa la produzione di una proteina anomala che non funzionando al meglio, altera la composizione salina delle secrezioni ghiandolari, che assumono una consistenza densa e viscosa.

L'unico modo per identificare i portatori sani è quello di effettuare un test sul DNA alla ricerca di mutazioni nel gene CFTR. L'analisi però è complicata dal fatto che esistono oltre duemila mutazioni. Generalmente, il test genetico di primo livello permette di identificare il 75% delle mutazioni presenti nella popolazione caucasica. Il test di I livello eseguito nel nostro laboratorio è un pannello costituito da 64 mutazioni, incluse quelle più frequenti nella popolazione italiana, che raggiunge un'efficienza diagnostica dell'82%.

A seguito dell'analisi molecolare del gene CFTR, si possono ottenere tre tipi di risultati:

- 1) presenza di una mutazione a livello di una copia del gene CFTR, mentre l'altra copia è normale. Si dice che il soggetto risulta eterozigote per quella mutazione, ovvero è un **portatore sano**, asintomatico;
- 2) presenza di mutazioni in entrambe le copie del gene CFTR. Si dice che il soggetto è eterozigote composto se le due sono mutazioni diverse o omozigote se le due mutazioni sono uguali ed è **affetto** da Fibrosi Cistica;
- 3) assenza di mutazioni del gene CFTR. Questo risultato "**negativo**" per le mutazioni ricercate significa che il soggetto ha una probabilità diminuita, di essere un portatore. Il test genetico non esclude in assoluto la probabilità di essere un portatore, perché non è possibile escludere la presenza di un'altra delle numerosissime mutazioni del gene CFTR.

E' importante però ricordare che:

- la probabilità di essere un portatore di fibrosi cistica è maggiore per un soggetto che sia parente di un malato o di un portatore.

In questo caso è necessario prima identificare la mutazione del malato o del portatore presente in famiglia (mutazione "familiare") e poi ricercarla nel parente. Se il parente risulta non avere nel suo DNA la mutazione familiare, la sua probabilità di essere portatore diventa estremamente bassa.

- la probabilità di essere portatore di fibrosi cistica è minore nel soggetto che non è parente di un malato o di un portatore. In questo caso, chi si sottopone alla ricerca delle più frequenti mutazioni del gene della fibrosi cistica risulta negativo, ha una probabilità di essere portatore ancora più bassa, anche se non zero.

In epoca postnatale per l'analisi molecolare viene eseguita su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in provette con EDTA o cellule della mucosa orale prelevate mediante tampone cotonato a secco. In diagnosi prenatale, nel caso in cui l'analisi evidenziasse lo stato di portatore in uno o entrambi i genitori, ricorrono le condizioni di rischio aumentato e quindi di eseguire l'indagine anche sul feto analizzando il DNA estratto da villi coriali o coltura di amniociti. Se l'esame è condotto su villi coriali, è opportuno procedere anche con l'esclusione di contaminazione da DNA materno, per cui è richiesto un campione materno di sangue periferico in EDTA o tampone buccale.

Polimorfismi IVS8-poly-T IVS8-poly-TG

In una regione del gene CFTR, chiamata introne 8, si trova una breve sequenza costituita dalla successione della base azotata timina (T) definita poly-T. Il numero di T regola il processo di maturazione di RNA messaggero e quindi la produzione di proteina CFTR ed è soggetto a variabilità individuale, per cui si parla di polimorfismo. La T può essere ripetuta 5, 7 o 9 volte. Da studi effettuati, si è potuto stabilire che il poly-T 5T è associato ad una ridotta quantità di proteina. In presenza della variante T5 l'efficienza dello splicing e quindi la quantità di mRNA e di proteina, è influenzata anche da un'altra variante, chiamata poly-TG che precede nella sequenza dell'introne 8 il tratto del poly-T. Il numero di ripetizioni del poly-TG è variabile nella popolazione tra 9 e 13 ripetizioni. Come da linee guida italiane ed europee l'analisi del poly-T e del poly-TG viene eseguita solo in presenza della mutazione R117H o nei casi di azoospermia o agenesia congenita bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD) o forme atipiche di fibrosi cistica o forme classiche in cui non sono state identificate mutazioni (Dequeker et al. Eur J Hum Genet – 2009 – 17,51-65).

Il risultato dell'analisi di I livello è disponibile entro 7 giorni dall'arrivo del campione in laboratorio.

Analisi II livello del gene CFTR

L'analisi di II livello del gene CFTR che consiste nel sequenziamento dell'intera regione codificante del gene CFTR e regioni fiancheggianti gli esoni permette di identificare il 95% delle mutazioni. Il test viene condotto su DNA estratto da linfociti di sangue periferico raccolto in provette con EDTA o da cellule della mucosa orale prelevate mediante tampone cotonato a secco. Il risultato dell'analisi è disponibile dopo 30 giorni dall'arrivo del campione in laboratorio. In diagnosi prenatale, qualora fosse necessario estendere la ricerca delle mutazioni al DNA fetale, attraverso il sequenziamento dell'intera regione codificante del gene, i tempi di risposta potrebbero allungarsi, pertanto è possibile che il risultato dell'indagine prenatale, su liquido amniotico, non sia disponibile nei tempi previsti per l'applicazione della legge 194/78 (interruzione terapeutica della gravidanza).

Gli studi sul DNA non sono esenti da possibilità di errore diagnostico. Tali errori possono derivare da limiti di sensibilità delle metodiche applicate, tracce di contaminazione nelle reazioni di amplificazione (PCR), rare varianti genetiche che possono interferire con l'analisi e, in diagnosi prenatale, contaminazione materna dei campioni fetali.

Il materiale biologico residuo viene conservato per 6 mesi dalla conclusione dell'analisi

Letta e compresa l'informativa, di cui mi è stata consegnata copia,

Il/la sottoscritto/a _____ nato/a il ____/____/____

a _____ (Prov _____) residente a _____ (Prov ____)

via _____ n° ____ CAP _____ tel _____

A nome proprio

In qualità di: genitore coniuge tutore **in caso di minore o di persona non in grado di esprimere il proprio consenso, compilare anche la parte sottostante** *(nel caso di un minore, il consenso deve essere manifestato da chi esercita legalmente la potestà ovvero nel caso di un soggetto incapace di agire da chi esercita la curatela o la tutela)*

Nome e Cognome _____ nato/a il ____/____/____

a _____ (Prov _____) residente a _____ (Prov ____)

via _____ n° ____ CAP _____ tel _____

richiede che venga eseguita/o

l'analisi genetica di I livello (64 mutazioni)

il sequenziamento dell'intera regione codificante il gene CFTR

E dichiara di essere consapevole dei limiti diagnostici legati alla tecnica

Data: ____/____/____

Firma del/la paziente/genitore/tutore _____

Nome di chi ha raccolto il consenso _____

Firma di chi ha raccolto il consenso _____

Inoltre,

1) ACCONSENTE NON ACCONSENTE

A che i risultati delle analisi sui campioni biologici siano comunicati a:

Cognome e Nome _____

Cognome e Nome _____

2) ACCONSENTE NON ACCONSENTE

A che i suoi campioni biologici siano conservati e trattati per finalità di ricerca medico-scientifica **e/o per attività volte al miglioramento della qualità dei risultati delle analisi di laboratorio**

3) ACCONSENTE NON ACCONSENTE

A che i suoi dati anonimizzati ed i relativi risultati genetici siano condivisi con altri centri in attività di collaborazione.

4) ACCONSENTE NON ACCONSENTE

Ad essere informato in merito ad eventuali nuovi risultati o possibilità diagnostiche derivanti dai suddetti studi o ricerche.

5) ACCONSENTE NON ACCONSENTE

Ad essere informato in merito a eventuali risultati inattesi rispetto a quelli per le quali erano state effettuate le analisi richieste

Data: ____/____/____

Firma del/la paziente/genitore/tutore _____

Nome di chi ha raccolto il consenso _____

Firma di chi ha raccolto il consenso _____

REVOCO il consenso sopra espresso al punto [1], al punto [2], al punto [3], al punto [4], al punto [5]

Data: ____/____/____

Firma del/la paziente/genitore/tutore _____

Firma di chi ha raccolto la revoca _____