

Fibrosi cistica: analisi preconcezionale e prenatale

C. Castellani^a, M. Seia^b

^aCentro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona

^bLaboratorio di Genetica Medica, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Riassunto

La fibrosi cistica è una malattia autosomica recessiva provocata da mutazioni nel gene CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). CFTR codifica per una proteina coinvolta nel trasporto ionico a livello degli epitelii polmonare, pancreatico, epatico, intestinale, e dei dotti sudoripari e deferenti. L'articolo descrive e discute l'analisi di mutazioni nel gene CFTR in contesto prenatale, preconfezionale e preimpianto.

Summary

Cystic Fibrosis: pre-conception and antenatal tests

Cystic Fibrosis is an autosomal recessive inherited disorder caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. This gene codes for a protein which is an ion transport protein in the epithelial surfaces of lungs, pancreas, liver, intestines, sweat ducts and vas deferens. The article describes and discusses prenatal, pre-conception and pre-implantation mutation analysis of the CFTR gene. *Key-words:* Cystic Fibrosis, inherited disorder, CFTR gene.

La fibrosi cistica: cenni di epidemiologia, clinica e genetica

La fibrosi cistica (FC) è la malattia genetica grave ad ereditarietà autosomica recessiva più comune nelle popolazioni di origine europea. In Europa la prevalenza della malattia alla nascita è variabile, compresa tra 1/1350 in Irlanda e 1/25000 in Finlandia, con una frequenza di portatori compresa tra 1/20 e 1/80¹. In Italia l'incidenza è verosimilmente intorno a 1/3000, con una frequenza dei portatori che si attesta su 1/30², con quindi più di 2 milioni di portatori.

La gran parte degli affetti nasce da famiglie nelle quali non è presente una chiara storia familiare positiva per FC, e viene principalmente diagnosticata tramite screening neonatale, più raramente per sintomi. Le principali manifestazioni cliniche della FC sono improntate a malattia polmonare con infezione respiratoria cronica e destrutturazione bronchiectasica diffusa. Nella maggior parte di casi sono presenti anche insufficienza pancreatica esocrina con maldigestione e deficit di crescita

e, nella quasi totalità dei maschi affetti, azoospermia da atresia bilaterale congenita dei dotti deferenti (CBA-VD). Complicanze non rare sono epatopatia cronica, diabete ed osteoporosi. Le modalità di comparsa, l'entità dei sintomi ed il decorso sono variabili. Alcuni malati possono presentare precocemente sintomi respiratori e manifestazioni gastrointestinali quali ileo da meconio alla nascita e sindrome da malassorbimento secondaria ad insufficienza pancreatica; altri hanno sintomi respiratori più contenuti, e funzione pancreatica, se non normale, almeno sufficiente a consentire digestione ed assorbimento adeguati. La variabilità fenotipica è determinata dalla grande eterogeneità delle mutazioni del gene della FC ma anche da numerosi altri fattori, come geni modificatori, regolazione epigenetica, ambiente, terapia³.

La terapia della fibrosi cistica, prevede un ampio utilizzo di antibiotici ed estratti pancreatici, e prolungate sedute quotidiane di fisioterapia respiratoria. Il costante progresso dell'efficacia del trattamento, che è com-

plesso e da eseguirsi quotidianamente, e la centralizzazione delle cure in strutture specialistiche, hanno contribuito ad un sostanziale miglioramento della prognosi della malattia: chi nasce oggi affetto da FC ha un'attesa media di vita non lontana dai 40 anni⁴. Nuovi trattamenti, anche di terapia genica, sono per ora in fase sperimentale, ma potrebbero cambiare drasticamente caratteristiche e prognosi della malattia.

Il gene responsabile della malattia è stato identificato nel 1989, e codifica per una proteina chiamata *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR)⁵⁻⁷. Il gene si trova sul braccio lungo del cromosoma 7, dove copre oltre 250 kilobasi, ed è costituito da 27 esoni. La proteina codificata si esprime nei tessuti epiteliali secernenti di vari organi tra cui le vie aeree, il pancreas, il fegato, l'intestino, e la ghiandola sudoripara, dove media il trasporto del cloro attraverso la membrana cellulare, influenzando lo stato di idratazione delle secrezioni.

Ad oggi sono state descritte più di 1600 mutazioni in CFTR⁸, con una distribuzione geografica eterogenea⁹. La mutazione di gran lunga più frequente è F508del, una delezione di 3 paia di basi nell'esone 10 che determina la perdita della fenilalanina in posizione 508, chiamata comunemente "Delta F508". In Italia F508del rappresenta circa la metà degli alleli mutati mentre il restante 50% è composto da mutazioni meno comuni caratterizzate da diversa frequenza interregionale¹⁰ (Tab. I).

Il progressivo ampliamento del numero di mutazioni note e ricercate ha dimostrato che le mutazioni del gene sono all'origine di un ampio spettro di manifesta-

zioni fenotipiche, di cui la FC rappresenta solamente un estremo. Mutazioni del gene CFTR sono state identificate in forme dall'espressione clinica respiratoria anche molto lieve, in soggetti affetti da azoospermia ostruttiva¹¹⁻¹³ o pancreatite cronica o acuta ricorrente isolata¹⁴⁻¹⁶. A tutt'oggi manca ancora un consenso generalizzato sulla precisa definizione nosologica di tali forme, che vengono comunque per lo più definite con il termine *CFTR-related disorders*. L'evoluzione clinica di tali forme è poco nota, ma la prognosi appare sicuramente più favorevole della malattia pienamente espressa.

Quando si identifica una mutazione mai descritta in precedenza o una mutazione molto rara, sulla quale non ci sono informazioni sufficienti, può risultare molto difficile poter prevedere quali saranno gli effetti sul quadro clinico. Infatti, non tutte le mutazioni comportano la completa perdita di funzione della proteina e quindi un quadro clinico compatibile con la malattia classica. Queste mutazioni sono internazionalmente definite *CF-causing*¹⁷. Al contrario, alcune mutazioni consentono la produzione di proteina almeno parzialmente funzionante, o di proteina funzionante in maniera adeguata, ma in quantità ridotta. Infine per un grande numero di varianti nucleotidiche non esistono dati molecolari e clinici sufficienti a definirne l'eventuale ruolo patogenetico. Nel contesto dell'interpretazione del significato clinico delle mutazioni CFTR, è particolarmente critica la valutazione di mutazioni *missense* per le quali manchi un supporto di letteratura e di studi funzionali per attribuire loro un ruolo patogenetico.

Tabella I. Frequenza relativa di alcune mutazioni CFTR in tre regioni italiane. Dati dai programmi di screening neonatale per FC di Lombardia e Veneto Trentino Alto-Adige.

	Lombardia	Veneto Trentino Alto-Adige
Alleli studiati	326	422
F508del	52.14	45.97
G85E	1.22	0.71
R117H	0.3	-
R334W	0.6	-
R347P	0.9	0.47
G542X	6.13	3.55
R553X	1.53	0.71
R1162X	2.62	10.66
W1282X	0.6	-
N1303K	5.82	4.50
711+1G>T	0.6	0.47
1717-1G>A	4.6	2.13
1898+1G>A	0.6	-
2184delA	-	0.47
2789+5G>A	4.6	2.13
3120+1G>A		0.24
3849+10kbC>T	0.6	0.24

Tabella II. Mutazioni FC e fenotipo. Da rif 17, modificato.

Tipo di mutazione	Esempi
Mutazioni che causano fibrosi cistica	F508del, N1303K, G542X, R1162X, 2183AA>G, 1717-1G>A, R553X, 711+5G>A, G85E, I507del, W1282X, 621+1G>T, CFTRdele17a-18, G551D, Q552X, R347P, 2789+5G>A, G1244E, 3849+10kbC>T, 1898+3A>G, T338I, 3272-26A>G, R334W, R1158X, R1066H, 1898+1G>A.
Mutazioni che causano patologie CFTR correlate	R117H, IVS8-(TG)12T5, D1152H, L997F, D110H
Polimorfismi e varianti alleliche senza conseguenze cliniche	M470V, I148T, 125G/C, R31C, R75Q, R1162L, S1235R, 4002A/G, 4521G/A, 2694T/G, 4404C/T, 2752-15G/C, 875+40A>G.

E' stato suggerito di raggruppare le mutazioni di CFTR in quattro gruppi, in relazione alla valutazione della loro azione sul fenotipo: a) mutazioni che danno fibrosi cistica (*CF-causing mutations*); b) mutazioni che danno patologie CFTR correlate (*CFTR-related disorders*); c) polimorfismi e varianti alleliche senza conseguenze cliniche; d) mutazioni le cui conseguenze cliniche siano ignote¹⁷. Un esempio di alcune mutazioni attribuibili ai primi tre gruppi è dato in Tabella II. Purtroppo, non sempre le distinzioni tra i gruppi sono nette, ed alcune mutazioni possono in alcuni casi dare FC ed in altri solo *CFTR-related disorders*, mentre altre possono in alcuni pazienti portare a *CFTR-related disorders*, in altri non avere evidenti conseguenze cliniche.

In considerazione di quanto sopra, risulta di estrema importanza che i kit genetici utilizzati per la ricerca di portatori includano solamente mutazioni chiaramente associate ad FC.

L'analisi del gene CFTR

Si possono distinguere vari livelli di analisi molecolari mirate all'identificazione di mutazioni CFTR, che si caratterizzano per diversi tempi di esecuzione, tecnologie e costi, e che possono essere divise in tre categorie principali: quelle di I livello, volte alla ricerca diretta

di mutazioni, quelle di II livello, che permettono di esaminare ampie porzioni del gene per la ricerca di qualunque tipo di mutazione in esse eventualmente presente, e quelle di III livello che permettono di studiare estese delezioni o duplicazioni nel gene (Tab. III). Attualmente è possibile aggiungere un quarto livello di analisi che si basa sullo studio del RNA messaggero che permette di identificare mutazioni introniche non adiacenti agli esoni e causanti alterazioni dello *splicing*. Questa analisi si esegue abitualmente mediante spazzolamento (*brushing*) della mucosa nasale nei pazienti affetti in cui non si sia riusciti ad identificare il difetto molecolare a livello del DNA (circa il 6%).

Metodiche

Le analisi mutazione-specifiche si basano su svariate metodiche. Tra queste hanno avuto più successo alcune tecniche che consentono l'analisi simultanea di molte mutazioni quali i sistemi *Allele Specific PCR* (ARMS), *Reverse Dot Blot* (RDB), *Oligo Ligation Assay* (OLA). Si tratta in genere di tecniche che hanno buona sensibilità e specificità. Le ultime due sono indicate per eseguire un discreto numero di analisi.

Più in dettaglio:

Amplification Refractory Mutation Systems (ARMS). Pre-

Tabella III. Tipologie di analisi genetica del gene CFTR.

Analisi di primo livello	Analisi multiplex RDB (o OLA, o ARMS) delle mutazioni CF più frequenti Analisi specifica per la mutazione familiare (nel caso in cui la mutazione familiare sia nota e non compresa nel kit) Analisi dei polimorfismi informativi (nel caso in cui la mutazione familiare sia ignota)
Analisi di secondo livello	Analisi D-HPLC (o DGGE, o sequenziamento) dell'intera porzione codificante e delle giunzioni introne-esone del gene CFTR Sequenziamento degli esoni positivi dell'analisi D-HPLC (o DGGE)
Analisi di terzo livello	Analisi MLPA (o QMPSF) per l'identificazione dei riarrangiamenti genici

vede una reazione di PCR con uno dei due *primer* costruito in modo che il nucleotide in posizione 3' sia complementare alla sequenza mutata o a quella normale del gene. Il DNA genomico non verrà amplificato quando si userà il *primer* non perfettamente complementare alla sequenza in esame. La visualizzazione degli ampliconi viene normalmente eseguita mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Reverse Dot Blot (RDB). Prevede una reazione di PCR multipla in grado di amplificare contemporaneamente differenti regioni del gene. A questa fa seguito una reazione di ibridazione colorimetrica allele-specifica, che si basa sull'ibridazione di sonde molecolari oligonucleotidiche complementari alla sequenza normale e mutata con i prodotti di PCR. Il metodo è rapido, affidabile e non prevede l'utilizzo di strumentazioni sofisticate.

Oligonucleotide Ligation Assay (OLA). È basata sull'utilizzo di sonde fluorescenti specifiche e della ligasi termostabile rTth, un enzima per la riparazione del DNA. La reazione di PCR con sonde complementari all'allele mutato e normale è seguita da una reazione di ligasi che unisce le sonde che si sono legate al DNA bersaglio, discriminando tra quelle con complementarietà completa ed incompleta. La visualizzazione dei risultati avviene mediante elettroforesi capillare su sequenziatore automatico.

Come per le analisi mutazione-specifiche, anche le metodiche di II livello che permettono di effettuare lo *scanning* dell'intero gene, alla ricerca di eventuali mutazioni, sono piuttosto numerose. In passato il sequenziamento dell'intero gene CFTR veniva considerato complesso e costoso e quindi applicabile solo a casi molto limitati. Per questo, nel corso degli anni '90, sono nate e si sono diffuse numerose tecniche, che permettono di eseguire uno screening delle variazioni nucleotidiche, per ridurre al minimo le analisi di sequenziamento. Tra queste metodiche ricordiamo quelle che hanno dato i risultati migliori: DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e D-HPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*). In questi ultimi anni, visti i progressi della tecnologia legata al sequenziamento del DNA, i laboratori di genetica molecolare preferiscono procedere al sequenziamento completo del gene CFTR anziché effettuare all'analisi D-HPLC. In particolare:

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Sfrutta il principio che la temperatura di denaturazione del DNA dipende dalla sua sequenza nucleotidica ed è peculiare di ogni frammento. Variazioni di un singolo nucleotide (mutazioni o polimorfismi) modificano la temperatura di denaturazione del frammento e di conseguenza la sua mobilità. La variazione nella T_m di un dato frammento di DNA può essere controllata su un gel di poliacrilammide a concentrazioni di denaturanti crescenti poiché il raggiungimento della temperatura di denaturazione (in questo caso della concentrazione di denaturante ad essa equivalente) comporta una par-

ziale apertura della doppia elica e quindi un rallentamento nella progressione del frammento sul gel. È una tecnica con buona sensibilità (>95%), ma di difficile messa a punto e non automatizzabile.

Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC). Rappresenta l'evoluzione in automatico del DGGE e permette l'identificazione di varianti nucleotidiche in brevissimo tempo^{18,19}. Si tratta di una cromatografia ionica in fase inversa che sfrutta, in condizione di parziale denaturazione, la diversa ritenzione delle molecole di DNA in assenza/presenza di variazioni di sequenza. Ha una buona sensibilità (>95%) ed è semiautomatizzabile.

Sequenziamento diretto del DNA. Le tecniche precedentemente descritte permettono all'operatore di riconoscere variazioni di sequenza del DNA la cui caratterizzazione molecolare avviene per sequenziamento della specifica regione del gene. L'analisi di sequenza prevede la dotazione di specifiche apparecchiature automatiche che hanno sostituito in rapidità, robustezza del sistema e sicurezza per l'operatore la tecnica manuale di sequenziamento con isotopi radioattivi.

Il sequenziamento diretto del DNA vanta una sensibilità vicina al 100%.

La *detection rate* delle altre analisi di secondo livello può raggiungere il 94% - 98%. La percentuale delle mutazioni non identificate dipende dalla frequenza dei riarrangiamenti genici e dalle mutazioni localizzate nelle regioni introniche.

Tra le metodiche che permettono la quantificazione del DNA per rilevare la presenza di riarrangiamenti genici (analisi di III livello), ricordiamo: l'analisi QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments*) e l'analisi MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Entrambe si basano sull'amplificazione simultanea di piccoli frammenti di DNA seguita dalla quantificazione della fluorescenza di ciascun frammento amplificato. In Italia le delezioni/duplicazioni hanno una frequenza pari al 2-3 % e le delezioni più frequenti sono: delezione degli esoni 22-23; delezione esoni 22-24; delezione esone 2; delezione esoni 2-3; delezione esoni 17a - 18; delezione esone 1²⁰.

Recentemente sono stati riportati dei dati ottenuti mediante la ricerca dei riarrangiamenti utilizzando la tecnica dell'*array* CGH che dimostrano una maggiore sensibilità e specificità del sistema e hanno permesso l'identificazione di estese duplicazioni non evidenziabili con le tecniche QMPSF e MLPA²¹.

Quale metodica e quando

I test di I livello possono vantare una minore copertura ma consentono l'identificazione di mutazioni note, mentre quelli di II livello permettono una migliore *detection rate*, ma il risultato molecolare può essere di difficile interpretazione in quanto si possono indifferentemente individuare mutazioni causanti malattia o varianti fenotipicamente non patologiche. Ricercare il maggior numero possibile di mutazioni quindi 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, per cui la scelta della strategia da adottare per eseguire l'analisi molecolare dipende dall'indicazione della richiesta. Ad esempio, negli Stati Uniti, dove dal 2001 il test viene consigliato a tutte le donne in gravidanza, vengono utilizzati kit standard, che possono contenere una variante polimorfica del gene, IVS8-5T. Questo polimorfismo, se associato ad altre mutazioni sullo stesso allele, può causare in eterozigosi composta od in omozigosi una forma lieve di malattia. Sono stati segnalati un numero non trascurabile di diagnosi prenatali collegate alla presenza isolata di IVS8-5T²². Questo fenomeno viene osservato attualmente in Italia, dove molti laboratori eseguono la ricerca non giustificata dell'allele 5T.

Analisi prenatale

Diagnosi prenatale

Si intende per diagnosi prenatale l'analisi molecolare su materiale fetale quando entrambi i genitori siano portatori di una mutazione che causa malattia. L'individuazione di una coppia di portatori può derivare dall'analisi genetica di familiari di affetti od anche di individui della popolazione generale, o far seguito alla nascita di un malato. In quest'ultimo caso, anche se la diagnosi prenatale può comunque essere abitualmente eseguita tramite marcatori genici, è preferibile utilizzare l'analisi diretta delle mutazioni presenti nella famiglia. 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.

In ogni caso tuttavia, la possibilità di analizzare, mediante la tecnica dell'amplificazione genica, un elevato numero di alleli differenti associati a diversi loci genici dà la possibilità di potere trarre informazioni su alcuni aspetti "critici" associati all'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 od eterologo, per controllare la corretta correlazione familiare (scambio di campioni) e per il controllo della paternità in caso di dubbio diagnostico.

Testing fetale

La diagnosi prenatale come qui definita si differenzia nettamente dalla pratica del *testing* fetale, vale a dire l'analisi molecolare direttamente eseguita su DNA fetale estratto da villi coriali o amniociti, in assenza di indicazione specifica (genitori noti come portatori). Tale attività diagnostica prevede abitualmente l'offerta, poco prima dell'esecuzione di un prelievo per la determinazione del cariotipo fetale, del test per FC. Le coppie

prendono atto attraverso una consulenza o un opuscolo informativo dell'esistenza di alcune condizioni patologiche, tra cui FC, per le quali si potrebbe, se desiderato, procedere ad un test molecolare sul materiale fetale prelevato. Le circostanze in cui si realizza questa offerta sono di partenza svantaggiose per la coppia: presa visione in breve tempo del tipo di analisi e del quadro clinico corrispondente, pressione data dai tempi immediati del prelievo, stato di ansia maggiore legato alla procedura ostetrica imminente, discussione degli aspetti economici dell'ampliamento dell'indagine inizialmente richiesta²³.

Diagnosi Genetica Preimpianto

In Italia, le procedure della Diagnosi Genetica Preimpianto (PGD) sono state interrotte a seguito della promulgazione della Legge 40 del 19 febbraio 2004 e delle relative linee guida che, nel tentativo di regolare le attività di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA), hanno posto dei veti che la rendono inapplicabile. Al di là della possibilità attuale di eseguire la PGD, ancora molto dibattuta e per la quale i pareri non sono univoci, una importante limitazione alla PGD per le coppie portatrici di malattie genetiche come la fibrosi cistica è rappresentata dal fatto che l'accesso alle tecniche di PMA è consentito solo alle coppie infertili,

La diagnosi preconcezionale limitata al I Globulo Polare (GP), è stata recentemente proposta perché eviterebbe la manipolazione e l'eventuale selezione degli embrioni e i problemi giuridici ed etico-religiosi ad essa legati; presenta un rischio di errore diagnostico molto elevato, che si riduce considerevolmente se viene seguita dall'analisi del II Globulo Polare. Questo però viene prodotto una volta che l'ovocita prescelto è già stato fertilizzato, e presenta pertanto gli stessi problemi giuridici ed etici dell'analisi postconcezionale.

In Italia l'analisi del solo I Globulo Polare è stata proposta come soluzione ai limiti posti all'esecuzione di procedure classiche di diagnosi preimpianto dall'attuale legislazione. Lo studio genetico del I GP può fornire per via indiretta informazioni sul patrimonio genetico dell'ovocita: la diagnosi si effettua sul contenuto genetico del I GP, che è "complementare" a quello dell'ovocita. Se il I GP presenta la mutazione materna ne consegue che l'ovocita ne risulterà invece privo (quindi normale). La diagnosi sul I GP può portare a selezionare pertanto gli ovociti utili a generare solo embrioni privi della mutazione materna.

Tuttavia, esistono limiti tecnici importanti intrinseci alla Diagnosi Genetica su Primo Globulo Polare. Uno di questi è la ricombinazione genetica dovuta allo scambio di porzioni cromosomiche (*crossing over*), che avviene regolarmente tra due cromosomi omologhi durante la prima divisione meiotica. In tal caso la diagnosi genetica sul I GP risulterà non informativa e l'ovocita da cui esso proviene non potrà essere considerato utile per la fertilizzazione. Il fenomeno della ricombinazione attraverso *crossing over* ha una frequenza pari al 50-

60% degli ovociti, rendendo inutilizzabile ai fini diagnostici più della metà di questi. Inoltre non tutti gli ovociti producono un globulo polare di qualità utile per essere analizzato. Per queste ragioni, perché l'indagine abbia successo si rende necessario sottoporre la donna ad un trattamento di stimolazione ovarica che consenta di ottenere un numero elevato di ovociti. Una bassa risposta alla stimolazione ovarica incide sul numero di ovociti disponibili per l'analisi genetica, e quindi una buona riserva ovarica è un requisito importante per il successo della procedura. Un altro limite è dato dal fatto che, come per tutte le analisi su singola cellula esiste un rischio di circa il 5% di ADO (*Allele Drop Out*, cioè perdita di un allele), che consiste nell'amplificazione casuale di uno solo dei due alleli con conseguente errata genotipizzazione dell'embrione. Altro limite associato alla diagnosi su I GP è la difficoltà di eseguire l'intera procedura (isolamento del I GP e analisi genetica) nei tempi richiesti per evitare l'invecchiamento dell'ovocita (4-6 ore dal prelievo).

Iperecogenicità intestinale

L'aumentata ecogenicità intestinale fetale può associarsi, in una minoranza di casi, a FC^{24,25}. Il quadro viene spesso interpretato come l'equivalente fetale di un ileo da meconio, anche se non sempre c'è ostruzione intestinale alla nascita in casi precedentemente diagnosticati per iperecogenicità intestinale, 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 incluse in kit standard di I livello. In caso quindi di riscontro incidentale di iperecogenicità nel feto, è indicata un'analisi di I livello nei genitori, che se negativa in entrambi con *detection rate* del 75% abbassa il rischio di fibrosi cistica nel feto al di sotto del 2 per mille; l'individuazione di uno stato di portatore in uno dei genitori costituisce indicazione ad un approfondimento di II livello, spesso complicato dai tempi molto stretti dettati dalla fase avanzata della gravidanza; la diagnosi prenatale viene prospettata quando entrambi i genitori siano portatori (rischio di malattia 50%).

Analisi preconcezionale nei soggetti a rischio di eterozigosi aumentato

L'utilizzo di elezione del test del portatore trova spazio nei familiari di un malato o di un eterozigote, che hanno probabilità aumentata di essere portatori. In questo contesto è essenziale conoscere la mutazione che interessa il ramo familiare a cui appartiene chi richiede l'analisi. Al fine di individuare tale mutazione è giustificato, previo informato consenso dell'interessato, approfondire quando necessario con accertamenti di II od eventualmente anche III livello il genotipo dell'affetto o del genitore dell'affetto parente del consultando. Se la mutazione familiare è nota e non presente nel familiare che richiede l'analisi, la probabilità di

eterozigosi viene ricondotta a percentuali inferiori a quelle della popolazione generale. Se la mutazione familiare non viene identificata neppure con approfondimento d'analisi, e se non siano possibili analisi indirette con marcatori genici, la probabilità di eterozigosi del familiare resta immutata e definita sulla base del calcolo teorico legato alla distanza genetica dal soggetto affetto/eterozigote della famiglia²³.

Nei soggetti a rischio di eterozigosi non aumentato

Il test genetico può anche essere spontaneamente richiesto da individui o coppie della popolazione generale (prevalenza stimata nella popolazione generale 1/30, in base a dati veneti². Inoltre, è pratica comune presso i centri di fecondazione assistita²⁶, richiedere in tutte le coppie che intraprendono un percorso di fecondazione assistita un'analisi genetica per fibrosi cistica.

In assenza di particolari fattori di rischio (familiarità per malattia od eterozigosi, atresia bilaterale congenita dei dotti deferenti nel maschio nelle coppie da fecondazione assistita), è indicato un test di I livello in uno o entrambi i componenti della coppia. In caso di negatività al test di entrambi, il rischio riproduttivo a posteriori è molto basso, e non sono indicati ulteriori approfondimenti. In caso di positività al test di entrambi, il rischio riproduttivo a posteriori è quello di una coppia di due portatori, e quindi del 25%. La possibilità di diagnostica prenatale va presentata e discussa nel corso di una o più sedute di consulenza genetica. Se uno dei componenti della coppia risulta portatore e l'altro è negativo al test di I livello, il rischio riproduttivo è intermedio tra i due precedenti. Una consulenza genetica specialistica servirà ad illustrare alla coppia la possibilità di approfondimento con analisi di II livello, con i potenziali vantaggi (riduzione del rischio od individuazione del secondo portatore) e svantaggi (sensibilità non assoluta, difficoltà nell'interpretazione di varianti di sequenza dalle incerte conseguenze cliniche, scelte riproduttive più complesse) di una tale scelta. 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'analisi²³.

Screening del portatore

Gli anni successivi alla scoperta del gene sono stati caratterizzati da un atteggiamento molto cauto nei confronti della possibile offerta dello screening del portatore alla popolazione generale, in attesa dei risultati di studi pilota. Più recentemente tuttavia ci sono stati segnali di un'inversione di questa tendenza, in particolare negli Stati Uniti, dove un *Consensus Statement* degli autorevoli *National Institutes of Health* suggerisce di offrire il test genetico per FC alle coppie che intendano avere figli²⁷.

La crescente disponibilità di varie modalità di analisi genetica ha cercato di soddisfare ed in parte ha anche indotto un costante aumento di richieste di test genetici

co per fibrosi cistica. Oggi il test viene non di rado proposto non solamente a familiari di affetti con rischio di eterozigosi aumentato, ma, in alcune realtà locali, anche a coppie della popolazione generale, spesso in gravidanza.

Uno studio osservazionale recentemente pubblicato su JAMA² descrive gli effetti di due diversi approcci allo screening dei portatori di mutazioni CFTR. In Veneto e in Trentino Alto-Adige da molti anni è attivo lo screening neonatale per fibrosi cistica, ed è quindi possibile monitorarne efficacemente l'incidenza. L'obiettivo dello screening neonatale, cioè diagnosticare precocemente i malati, è concettualmente molto diverso da quello dello screening del portatore, che prevede un esame genetico per individuare tra gli adulti in età riproduttiva i portatori sani. Nella parte occidentale del Veneto ed in Trentino Alto-Adige il test del portatore è stato tradizionalmente utilizzato con cautela, ed offerto principalmente a coloro che hanno già un caso di fibrosi cistica in famiglia, sempre in associazione ad un colloquio individuale di consulenza genetica. A partire dalla metà degli anni novanta il Veneto orientale ha adottato una diversa linea, offrendo attivamente il test del portatore alla popolazione generale. Si sono quindi eseguite decine di migliaia di test, individuando migliaia di portatori della mutazione e decine di coppie in cui entrambi sono eterozigoti, e quindi a rischi di avere figli malati. A seguito di questa attività, nella parte orientale della regione il numero di nuovi nati con la fibrosi cistica è sceso anno dopo anno sino quasi ad annullarsi: il numero era attorno a 4 ogni 10.000 neonati agli inizi degli anni '90 ed è ora inferiore a 1 ogni 10.000. Ciò non è avvenuto nella parte occidentale del Veneto e in Trentino-Alto Adige, dove il test continua a essere offerto solo alle famiglie a rischio. Non è chiaro quali scelte riproduttive abbiano compiuto le coppie di eterozigoti, ma certamente l'informazione è stata usata per limitare le nascite di bambini malati.

Un documento di consenso europeo, elaborato nell'ambito delle società scientifiche europee della fibrosi cistica²⁸ riassume i vantaggi e gli svantaggi dello screening dei portatori e presenta gli standard di qualità per condurre un programma in maniera efficace, sicura ed etica, ma esplicitamente non affronta la domanda se lo screening debba essere attuato o meno, una scelta più politica che tecnica o scientifica.

Bibliografia

- Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros* 2008; 7:450-3.
- Castellani C, Picci L, Tamanini A, Girardi P, Rizzotti P, Assael BM. Association between carrier screening and incidence of cystic fibrosis. *JAMA* 2009; 302:2573-9.
- Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000; 67:117-33.
- <http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/2008-Patient-Registry-Report.pdf> (data di consultazione: 6.4.2010).
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245:1059-65.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066-73.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245:1073-80.
- <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html> (data di consultazione: 6.4.2010).
- Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002; 19:575-606.
- <http://spazioinwind.libero.it/laboratoricf/frequenze.htm> (data di consultazione: 6.4.2010).
- Dumur V, Gervais R, Rigot JM, Lafitte JJ, Manouvrier S, Biserte J, et al. Abnormal distribution of CF delta F508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet* 1990; 336:512.
- Augarten A, Yahav Y, Kerem BS, Halle D, Laufer J, Szeinberg A, et al. Congenital bilateral absence of vas deferens in the absence of cystic fibrosis. *Lancet* 1994; 344:1473-4.
- Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995; 332:1475-80.
- Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339:645-52.
- 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; 339:653-8.
- Castellani C, Bonizzato A, Rolfini R, Frulloni L, Cavallini GC, Mastella G. Increased prevalence of mutations of cystic fibrosis gene in idiopathic chronic and recurrent pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:1993-5.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Kerem E, Durie P, Tullis E, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008; 7:179-96.
- Le Maréchal C, Audrézet MP, Quéré I, Raguénès O, Langonné S, Férec 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.
- Ravnik-Glavac M, Atkinson A, Glavac D, Dean M. DHPLC screening of cystic fibrosis gene mutations. *Hum Mutat* 2002; 19:374-83.
- Paracchini V, Seia M, Coviello D, Porcaro L, Costantino L, Capasso P, et al. Molecular and clinical features associated with CFTR gene rearrangements in Italian population: identification of a new duplication and recurrent deletions. *Clin Genet* 2008; 73:346-52.
- Saillour Y, Cossée M, Leturcq F, Vasson A, Beugnet C,

- Poirier K, et al. Detection of exonic copy-number changes using a highly efficient oligonucleotide-based comparative genomic hybridization-array method. *Hum Mutat* 2008; 29:1083-90.
22. Vastag B. Cystic fibrosis gene testing a challenge. *JAMA* 2003; 289:2923-34.
 23. Castellani C, Lalatta L, Neri D, Novelli G, Piccinini A, Seia M, et al. Modelli di analisi genetica per fibrosi cistica. Programma Nazionale Linee Guida 1, Dicembre 2005. Disponibile su: http://www.snlg-iss.it/lgss_analisi_genetica_fibrosi_cistica (data di consultazione: 6.4.2010).
 24. Scotet V, De Braekeleer M, Audrézet MP, Quéré I, Mercier B, Duguépéroux I, et al. Prenatal detection of cystic fibrosis by ultrasonography: a retrospective study of more than 346000 pregnancies. *J Med Genet* 2002; 39:443-8.
 25. Simon-Bouy B, Satre V, Ferec C, Malinge MC, Girodon E, Denamur E, et al. Hyperechogenic fetal bowel: a large French collaborative study of 682 cases. *Am J Med Genet A* 2003; 121:209-13.
 26. 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.
 27. NIH Consensus Statement. Genetic testing for cystic fibrosis. *Arch Intern Med* 1999; 159:1529-39.
 28. Castellani C, Macek M Jr, Cassiman JJ, Duff A, Massie J, ten Kate LP, et al. Benchmarks for cystic fibrosis carrier screening: a european consensus document. *J Cyst Fibros* 2010 (in stampa).