



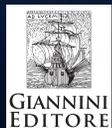
PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

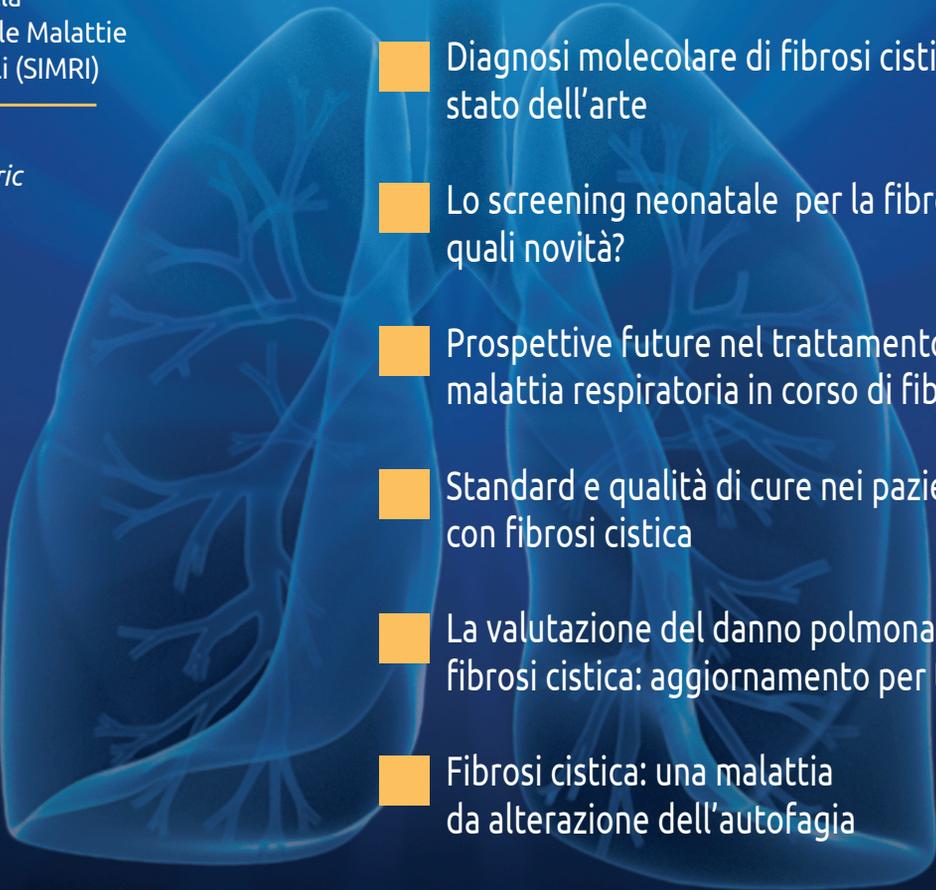
LA FIBROSI CISTICA

Organo ufficiale della
Società Italiana per le Malattie
Respiratorie Infantili (SIMRI)

*Official Journal
of the Italian Pediatric
Respiratory Society*

Volume 15 / n. 57
Rivista trimestrale
Spedizione in A.P.
art.2 comma 20/b
legge 662/96 Pisa
Reg. Trib. PI n.12
del 3 giugno 2002



- 
- Diagnosi molecolare di fibrosi cistica: stato dell'arte
 - Lo screening neonatale per la fibrosi cistica: quali novità?
 - Prospettive future nel trattamento medico della malattia respiratoria in corso di fibrosi cistica
 - Standard e qualità di cure nei pazienti con fibrosi cistica
 - La valutazione del danno polmonare nella fibrosi cistica: aggiornamento per tutte le età
 - Fibrosi cistica: una malattia da alterazione dell'autofagia

INDICE

Editoriale

View point

Francesca Santamaria

5

Diagnosi molecolare di fibrosi cistica: stato dell'arte

Molecular diagnosis of cystic fibrosis: state of the art

Paola Nardiello, Giuseppe Castaldo

6

Lo screening neonatale per la fibrosi cistica: quali novità?

Newborn screening for cystic fibrosis: what news?

Valeria Raia, Angela Sepe, Fabiola De Gregorio e Antonella Tosco

12

Prospettive future nel trattamento medico della malattia respiratoria in fibrosi cistica

Therapy for cystic fibrosis lung disease: current status and future perspectives

Valeria Galici, Cesare Braggion

17

Standard e qualità di cure nei pazienti con fibrosi cistica

Standards and quality of care in cystic fibrosis

Elisabetta Bignamini

24

Valutazione del danno polmonare nella fibrosi cistica: aggiornamento per tutte le età

Assessment of pulmonary impairment in cystic fibrosis from childhood to young adults

Giovanna Pisi, Valentina Fainardi

29

Fibrosi cistica: una malattia da alterazione dell'autofagia

Cystic fibrosis: a disease with defective autophagy

Luigi Maiuri, Daniela De Stefano

35

"Aria buona a scuola": un'indagine pilota in Campania

"Good air at school": a pilot study in Campania

Silvia Montella, Angela Orabona, Laida Lisa di Micco e Francesca Santamaria

41

Pneumologia Pediatria

Volume 15, n. 57 - Marzo 2015

Reg. Trib. PI n. 12 del 3 giugno 2002

Direttore Responsabile

Francesca Santamaria (Napoli)

Direzione Scientifica

Stefania La Grutta (Palermo)

Luigi Terracciano (Milano)

Segreteria Scientifica

Silvia Montella (Napoli)

Comitato Editoriale

Angelo Barbato (Padova)

Filippo Bernardi (Bologna)

Alfredo Boccaccino (Misurina)

Attilio L. Boner (Verona)

Mario Canciani (Udine)

Carlo Capristo (Napoli)

Fabio Cardinale (Bari)

Salvatore Cazzato (Bologna)

Renato Cutrera (Roma)

Fernando M. de Benedictis (Ancona)

Fulvio Esposito (Napoli)

Mario La Rosa (Catania)

Massimo Landi (Torino)

Gianluigi Marseglia (Pavia)

Fabio Midulla (Roma)

Luigi Nespoli (Varese)

Giorgio L. Piacentini (Verona)

Giovanni A. Rossi (Genova)

Giancarlo Tancredi (Roma)

Marcello Verini (Chieti)

Editore

Giannini Editore

Via Cisterna dell'Olio 6b

80134 Napoli

e-mail: editore@gianninisp.it

www.giannineditore.it

Coordinamento Editoriale

Center Comunicazioni e Congressi Srl

e-mail: info@centercongressi.com

Napoli

Realizzazione Editoriale e Stampa

Officine Grafiche F. Giannini & Figli SpA

Napoli

© Copyright 2015 by SIMRI

Finito di stampare nel mese di marzo 2015

Paola Nardiello, Giuseppe Castaldo
CEINGE-Biotecnologie avanzate,
Napoli. Dipartimento di Medicina
Molecolare e Biotecnologie Mediche,
Università di Napoli Federico II

Corrispondenza: Giuseppe Castaldo
email: giuseppe.castaldo@unina.it

Diagnosi molecolare di Fibrosi Cistica: stato dell'arte

Molecular diagnosis of Cystic Fibrosis: state of the art

Riassunto La Fibrosi Cistica (FC) è la più frequente malattia autosomica recessiva letale nei caucasici anche se la diagnosi precoce (*screening* neonatale) ne ha migliorato l'*outcome*. Inoltre, sono note forme di FC a prognosi favorevole (*CFTR-Related Disorders*), che si manifestano con pancreatiti ricorrenti, agenesia bilaterale dei dotti deferenti, bronchiectasie, etc. La diagnosi molecolare contribuisce alla conferma di malattia, alla previsione dell'*outcome* (correlazione genotipo-fenotipo) e, poiché sono disponibili farmaci in grado di correggere il difetto causato da specifiche mutazioni, alla guida alla terapia. Inoltre, contribuisce ad identificare le coppie a rischio di generare un figlio affetto attraverso lo *screening* a cascata o lo *screening* di massa del portatore. Infine, alle coppie a rischio può essere offerta la diagnosi prenatale (su DNA da villi coriali o, in casi selezionati, su DNA fetale da sangue materno) o preimpianto nelle coppie che ricorrono alla procreazione assistita. Ad oggi sono note 2000 mutazioni del gene responsabili di malattia e le linee guida suggeriscono di effettuare un I livello di analisi (ricerca delle mutazioni più diffuse, che ha una ridotta sensibilità diagnostica) e poi il sequenziamento del gene nei casi negativi, che può però identificare mutazioni nuove, per le quali è difficile stabilire il carattere patogenetico senza ricorrere a studi *in vitro*. In ogni caso, anche dopo il sequenziamento, circa il 5% degli alleli FC non presenta mutazioni. Negli ultimi anni è emerso il ruolo delle aree non codificanti del gene (promotore, introni, etc.), che potrebbero ospitare mutazioni causative, ma lo studio di queste regioni è limitato ai laboratori di ricerca.

Parole chiave: Fibrosi Cistica, gene, mutazioni, diagnosi molecolare

Key words: Cystic Fibrosis, gene, mutations, molecular diagnosis

INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia genetica ereditaria autosomica recessiva, cronica, evolutiva, che colpisce con uguale frequenza maschi e femmine. È la malattia genetica grave più diffusa nella popolazione caucasica, con un'incidenza di circa 1 neonato malato ogni 2500; in Italia i pazienti stimati sono circa 5.000 (1). Attualmente la sopravvivenza media è di circa 40 anni (2). La malattia (forma classica) è caratterizzata dalla presenza di secrezioni dense che causano malattia polmonare cronica ostruttiva con evoluzione verso l'insufficienza respiratoria; nell'ambito di una grande variabilità interindividuale si possono avere altre manifestazioni cliniche, tra cui insufficienza pancreatica, epatopatia, diabete e, nella quasi totalità dei maschi affetti, azoospermia da agenesia bilaterale congenita dei vasi deferenti (CBAVD). Le modalità di comparsa, la severità ed il decorso della malattia sono variabili. Alcuni pazienti presentano precocemente i sintomi polmonari della malattia (infezioni respiratorie ricorrenti) e manifestazioni gastrointestinali quali ileo da meconio alla nascita e malassorbimento da insufficienza pancreatica; altri hanno sintomi respiratori modesti fino all'adolescenza, con un quadro digestivo normale (3, 4). La discordanza dell'espressione clinica della FC a livello polmonare, epatico

e gastrointestinale è presente anche in pazienti con lo stesso genotipo *CFTR* o addirittura in coppie di fratelli affetti dalla malattia. Ciò ha spinto alla ricerca di geni, ereditati indipendentemente da *CFTR*, che agiscono da modulatori dell'espressione clinica della malattia (5).

Oltre alla forma classica di FC esistono forme a fenotipo attenuato caratterizzate da modesta espressione clinica respiratoria e normale funzione pancreatica, spesso identificate in pazienti adulti (coinvolgendo quindi andrologi, gastroenterologi, pneumologi, etc.); in genere la malattia interessa un unico organo, come i dotti deferenti con la CBAVD che causa infertilità nei maschi oppure il pancreas con episodi di pancreatite ricorrente. Le forme monosintomatiche sono state per lungo tempo definite forme atipiche di FC, mentre oggi si parla di *CFTR-Related Disorders (CFTR-RD)* per indicare le forme cliniche che non soddisfano i criteri per la diagnosi di FC (6). L'evoluzione clinica di tali forme è poco nota, ma la prognosi appare più favorevole rispetto alla forma classica (3).

DIAGNOSI

Per la diagnosi di FC è necessaria la presenza di sintomi tipici o di familiarità (fratelli ammalati) o test di *screening* neonatale patologico, che devono essere associati a test del sudore positivo

o ad identificazione di due mutazioni del gene *CFTR* in trans o ad alterazioni della differenza di potenziale nasale (Tabella 1) (7).

Tab. 1. Criteri diagnostici per FC

Sintomatologia clinica tipica (incluso l'ileo da meconio) Anamnesi familiare positiva (presenza di fratelli affetti) Screening neonatale positivo (IRT elevato)
+
Test del sudore alterato Alterato trasporto ionico a livello dell'epitelio nasale e rettale Analisi genetica positiva (presenza di una mutazione patogenetica su entrambi gli alleli)

Nelle forme *CFTR-RD* con test del sudore negativo o *borderline*, l'analisi molecolare diventa l'unico strumento di aiuto al clinico nella definizione diagnostica (8), anche se a volte sono identificate varianti nuove o di incerto significato patogenetico (9).

SCREENING NEONATALE (NBS)

La diagnosi di FC per sintomi è sempre più rara; infatti, oggi la maggior parte dei soggetti affetti è identificata attraverso lo *screening* neonatale. La FC, infatti, soddisfa pienamente i criteri di applicazione di un programma di *screening* neonatale, in quanto è una malattia cronica evolutiva con un'elevata incidenza le cui manifestazioni cliniche insorgono precocemente nell'infanzia; vi è ormai comune accordo che lo *screening* neonatale della FC è in grado di ridurre la severità della malattia, con riduzione dei costi per l'assistenza. I risultati di numerosi studi condotti a livello internazionale in termini d'impatto clinico ed epidemiologico hanno stabilito che la diagnosi neonatale di FC, se associata ad un trattamento precoce, riduce il rischio di danno polmonare nell'infanzia, migliora la qualità di vita e in definitiva migliora la sopravvivenza; ha inoltre un effetto benefico sullo stato nutrizionale, con il miglioramento della crescita, e può prevenire la malnutrizione da carenza di vitamine liposolubili e di proteine. Infine, la diagnosi neonatale della malattia migliora la reazione psicologica dei genitori, che subiscono uno stress inferiore rispetto a quello che riceverebbero in caso di diagnosi più tardiva, quando siano già comparsi i sintomi clinici caratteristici (10). Esistono molti protocolli diversi in Europa per lo *screening* neonatale di FC; tutti si basano attualmente sul dosaggio del tripsinogeno immunoreattivo (IRT) in terza giornata, come prima analisi, e sul test del sudore come analisi conclusiva, che nella maggioranza dei casi conferma o esclude la diagnosi di FC. Tra questi, si collocano test intermedi, variabili tra i vari protocolli ed utilizzati in varie combinazioni; infatti, i casi di neonati con IRT positivo sono una minoranza (circa 1-2%) della popolazione totale screenata e rappresentano una fascia di popolazione a più alto rischio di FC. Poiché l'IRT risulta elevato, nei primi mesi di vita, negli

affetti da FC ma anche in alcuni neonati sani, al fine di migliorare la specificità dello *screening* alcuni dei programmi prevedono che i neonati con IRT elevato siano sottoposti ad analisi delle mutazioni più frequenti, che in alcuni programmi è preceduta da un secondo prelievo su spot di Guthrie per esecuzione di un II dosaggio di IRT (il secondo spot di Guthrie è prelevato intorno alla ventesima giornata di vita). La presenza di due mutazioni consente di porre diagnosi di malattia, mentre qualora se ne individui una sola il test del sudore discriminerà tra semplici portatori ed affetti con una sola mutazione identificabile. Infine, alcuni programmi prevedono, per i neonati risultati portatori di una sola mutazione dopo analisi delle mutazioni più frequenti, l'esecuzione di un prelievo di sangue periferico in EDTA per approfondimento dell'analisi molecolare mediante sequenziamento diretto del gene ed analisi di grossi riarrangiamenti.

IMPIEGO DEL TEST GENETICO PER LA DIAGNOSI DI FC

L'analisi molecolare del gene *CFTR* dovrebbe essere sempre associata a un'appropriate consulenza multidisciplinare ed il laboratorio di diagnostica molecolare dovrebbe lavorare in stretta collaborazione con il clinico, in modo da garantire che siano eseguiti i test appropriati per ogni specifica situazione e che siano sempre fornite informazioni corrette e comprensibili al paziente. Infatti, la qualità del risultato finale dipende non solo dalle procedure di laboratorio, ma anche dalle informazioni riguardanti l'anamnesi del paziente, che risultano determinanti affinché il laboratorio possa definire il corretto iter diagnostico, ovvero quali test eseguire e come interpretare i risultati ottenuti. Attualmente, le linee guida suggeriscono l'esecuzione del test molecolare per FC nei seguenti casi (11):

1. sospetto clinico di forma classica di FC (che presenta sintomatologia clinica tipica o fratelli affetti o IRT elevato alla nascita e test del sudore positivo);
2. sintomatologia clinica "atipica" e/o test del sudore *borderline*;
3. infertilità maschile in presenza di agenesia bilaterale congenita dei vasi deferenti (CBAVD);
4. adulti con sospetto di altre forme di *CFTR-RD*;
5. gravidanze in cui il feto presenti intestino iperrecogeno e/o dilatazione delle anse intestinali;
6. diagnosi prenatale;
7. diagnosi di portatore in soggetto con anamnesi familiare positiva.

La diagnosi di portatore in soggetti con anamnesi familiare negativa, così come la diagnosi di portatore nelle coppie infertili, non sono univocamente riconosciute, ma sono regolate dalla politica e dalle specifiche normative adottate a livello di singole nazioni.

METODICHE

Le metodiche utilizzate per la diagnosi molecolare di FC possono essere divise in due gruppi: le prime ad essere sviluppate sono state quelle che

testano la presenza/assenza di specifiche mutazioni; successivamente, sono state utilizzate metodiche più approfondite, definite di *scanning*, poiché rivelano ogni differenza presente nella sequenza genica del paziente analizzato rispetto alla sequenza di riferimento del gene *CFTR* normale (11).

Poiché le mutazioni del gene *CFTR* hanno diversa frequenza nelle specifiche popolazioni, la strategia più idonea per la diagnosi genetica ed il pannello di mutazioni da analizzare viene definita dai singoli laboratori sulla base della popolazione originaria dei pazienti da analizzare (12, 13). Conoscere l'epidemiologia delle mutazioni responsabili della FC in una determinata popolazione è di fondamentale importanza anche per la consulenza multidisciplinare, in quanto rende possibile calcolare il rischio residuo per una coppia di generare un figlio affetto e per il singolo individuo di essere portatore sano dopo un test che sia risultato negativo.

L'analisi molecolare di I livello utilizza kit commerciali o metodica *home made* che prevedono l'analisi delle mutazioni più frequenti nella regione di riferimento del laboratorio; le metodiche utilizzate per il I livello devono soddisfare criteri di sensibilità, riproducibilità e rapidità.

Il *detection rate* dell'analisi molecolare di I livello è legato al pannello di mutazioni ricercato ed all'origine etnica del paziente analizzato; ma in linea di massima è intorno all'80%.

L'analisi molecolare di II livello: utilizza sistemi di *scanning* che consentono il riconoscimento di variazioni di sequenza nelle porzioni codificanti e nelle regioni di *splicing* del gene.

La tecnica attualmente più utilizzata è il sequenziamento diretto con l'impiego di strumentazioni automatizzate. I test di II livello raggiungono una *detection rate* migliore (circa 92%), ma il significato fenotipico del risultato molecolare non è sempre di semplice interpretazione.

Infine, in alcuni pazienti possono essere presenti macroriarrangiamenti genici, quali macrodelezioni, inserzioni e duplicazioni, che non sono evidenziabili con le metodiche descritte precedentemente; la frequenza di tali riarrangiamenti è stimata essere circa il 2% in alleli da pazienti affetti da FC e circa l'1% in pazienti affetti da CBAVD.

Nei pazienti affetti da *CFTR-RD* le mutazioni presenti sono spesso diverse da quelle rilevabili per mezzo dei kit commerciali, per cui un'analisi di I livello ha una sensibilità minore rispetto ai pazienti con FC classica (8); in questi pazienti è quasi sempre necessario l'approfondimento con *scanning* del gene. Sono, tuttavia, numerosi i casi di forme classiche di FC (con test del sudore francamente patologico) nelle quali, anche dopo un'analisi di II livello, non è possibile identificare entrambe le mutazioni; infatti, mutazioni causative possono essere localizzate in regioni del gene non analizzate (promotore, introni e 3'UTR) o in geni diversi da *CFTR*.

DEFINIZIONE DEL CARATTERE CAUSALE DI MALATTIA DELLE VARIANTI DEL GENE *CFTR*

Lo sviluppo di nuove metodiche consente un'a-

nalisi sempre più approfondita del gene *CFTR* e risulta nell'identificazione di un numero sempre maggiore di varianti; la difficoltà attualmente maggiore dell'analisi molecolare della FC, così come delle altre malattie genetiche, non è quella di identificare le alterazioni presenti nella sequenza genica, ma quella di stabilire il significato patogenetico delle mutazioni identificate. Infatti, con il passaggio dall'utilizzo dei kit per mutazioni note alle metodiche di *scanning* del gene *CFTR*, ci si è trovati di fronte non solo a varianti già descritte, ma anche a varianti nuove, mai descritte precedentemente (9).

Alcune varianti sono ben classificate come mutazioni causali di malattia (associate ad FC o a *CFTR-RD*), poiché sono già note come tali o poiché sono nuove ma verosimilmente compatibili con il fenotipo di malattia per caratteristiche proprie della variante (mutazioni *nonsense*, *splice-site*, *frameshift*, grosse delezioni); altre varianti sono già note e classificate invece come polimorfismi non causali di malattia (varianti che non hanno effetto sul fenotipo clinico). Ma per tutte le altre, nonostante lo sviluppo di diversi approcci mirati a definirne il carattere causale o non causale di malattia, il significato resta dubbio, e le linee guida per la refertazione le indicano come varianti probabilmente non patogenetiche o varianti di incerto valore patogenetico (14, 15). Alcuni esempi sono rappresentati dalle varianti *missense* esoniche che ricadono in domini non funzionali della proteina, dalle varianti nucleotidiche sinonime, dalle varianti localizzate in regioni introniche che potrebbero alterare i meccanismi di *splicing* del RNA messaggero, dalle varianti nel promotore (16) e nella regione non tradotta al 3' del gene che, con meccanismi differenti, potrebbero alterare l'efficienza della trascrizione del gene (17).

Per stabilire il carattere causativo o non causativo di malattia di una variante sono oggi possibili due tipi di approcci: i primi sono basati su software informatici, mentre i secondi sono basati sulle sperimentazioni *in vitro*.

Nel primo caso, si tratta di sistemi di predizione informatizzati che forniscono risultati riguardo il grado di conservazione filogenetica dell'aminoacido sostituito, riguardo l'impatto delle mutazioni *missense* sull'attività della proteina canale e riguardo l'eventuale effetto della variante identificata sullo *splicing* dell'RNA messaggero (9).

Questi sistemi di predizione forniscono risultati immediati, ma talvolta contrastanti e non definitivi; pertanto, è sempre necessario utilizzarne un minimo di tre per la valutazione di ogni variante e, in ogni caso, tali risultati non sono utilizzabili in fase di refertazione, ma solo come indicazione a proseguire o meno con successivi approfondimenti *in vitro*.

Le sperimentazioni *in vitro* misurano direttamente l'attività di *gating* del canale *CFTR* (nello studio di varianti esoniche di tipo *missense*) o la quantità di messaggero prodotto (nello studio di varianti nel promotore o nella 3'UTR) o verificano la correttezza del risultato dello *splicing* del mRNA di *CFTR* (18) ed utilizzano metodiche quali: clonaggio genico in vettori, sistemi

reporter che utilizzano geni come luciferasi e GFP (per lo studio sia di elementi cis che trans di regolazione della trascrizione) e sistemi di rivelazione di bioluminescenza e di fluorescenza, trasfezione *in vitro*, colture cellulari, RT-PCR e sequenziamento diretto.

Le sperimentazioni *in vitro* forniscono risultati importanti e definitivi, ma lo fanno in tempi molto più lunghi, cosa che li rende lontani da un utilizzo routinario.

NEXT GENERATION SEQUENCING

L'orizzonte della diagnostica molecolare della FC e di tutte le malattie genetiche e multifattoriali è destinato a modificarsi completamente nei prossimi anni grazie allo sviluppo recente di tecniche di sequenziamento massivo, definite *Next Generation Sequencing* (NGS); tutte le piattaforme NGS oggi disponibili presentano una caratteristica tecnologica comune: il sequenziamento parallelo massivo di molecole di DNA amplificate in modo clonale (sequenziamento di II generazione, *Next Generation*) o di singole molecole di DNA separate spazialmente in una cella a flusso (sequenziamento di III generazione) (19). Poiché la procedura è parallela e massiva, tali piattaforme consentono di sequenziare da centinaia di milioni di paia di basi fino a miliardi di paia di basi di DNA in un'unica seduta analitica, a seconda del tipo di tecnologia NGS utilizzata. Complessivamente, le piattaforme NGS hanno il vantaggio di sequenziare in tempi e con costi enormemente ridotti rispetto al metodo Sanger, rendendo possibile il completamento in alcune settimane di analisi mentre che con il metodo Sanger avrebbero impiegato anni; sono stati necessari circa 3 miliardi di dollari e 17 anni (dal 1990 al 2007) per il completamento del Progetto Genoma Umano, mentre per rifequenziare il genoma con una piattaforma NGS sono stati necessari due mesi a costi 100 volte inferiori.

L'avvento della tecnologia NGS ha aperto importanti prospettive nella diagnostica molecolare e rappresenta un potente mezzo per l'analisi simultanea di un gran numero di regioni geniche. L'applicazione di questa tecnologia nella diagnostica molecolare della FC consentirà in primo luogo la riduzione dei tempi necessari alla diagnosi genetica nei pazienti affetti portatori di mutazioni rare e la ricerca immediata di mutazioni non esoniche; inoltre, l'utilizzo delle piattaforme NGS consentirà la ricerca immediata di mutazioni in pannelli di geni già noti come geni modulatori dell'espressione fenotipica della malattia (attualmente realizzata principalmente mediante l'uso di *microarray*) ed abatterà i tempi necessari all'esecuzione di studi di ricerca volti all'identificazione più rapida di nuovi geni modulatori. Il problema principale, come già accaduto in precedenza con l'avvento del sequenziamento tradizionale, sarà l'interpretazione dei risultati ottenuti per ogni paziente, poiché il laboratorista ed il clinico si troveranno di fronte ad un gran numero di varianti nuove in assenza di strumenti utilizzabili in *routine* che ne possano definire il carattere causale o non causale

di malattia. Il primo supporto sarà sicuramente rappresentato dalla consultazione di database, quali ad esempio "1000 Genomes", realizzati attraverso studi di NGS su grandi popolazioni, che contengano tutte le variazioni, comuni e rare, dell'intero genoma umano; altrettanto fondamentale sarà la collaborazione di esperti in bioinformatica.

FLOW CHART PER LA DIAGNOSI GENETICA

Il percorso diagnostico da seguire nella diagnosi molecolare della FC è strettamente dipendente dalla motivazione della richiesta di indagine (quale sospetto di malattia, familiarità, diagnosi di portatore nelle coppie infertili, intestino iperecogeno fetale, consanguineità, diagnosi prenatale), dalla anamnesi clinica del paziente da analizzare e dai valori di eventuali test precedentemente eseguiti (quali dosaggio dell'IRT e test del sudore) (11). Nella condizione di "sospetto clinico" possiamo includere i soggetti con sospetto di forma classica di FC, quelli con sintomatologia clinica "atipica", con infertilità maschile in presenza di CBAVD o con sospetto di altre forme di *CFTR-RD*; la seconda condizione è quella dei soggetti con familiarità per FC e delle diagnosi prenatali (20); la terza condizione è quella di assenza di familiarità ed è il caso delle diagnosi di portatore nelle coppie infertili, delle gravidanze con riscontro di intestino iperecogeno fetale e delle consanguineità.

Sospetto clinico: In presenza di sintomi (incluso l'ileo da meconio) o dati clinici (test del sudore o IRT alterato) sospetti per FC classica o *CFTR-RD* ed in caso di infertilità maschile in presenza di CBAVD è indicata l'esecuzione del test genetico. Qualora l'analisi di I livello identifichi entrambe le mutazioni, dopo conferma del genotipo mediante analisi dei genitori, la diagnosi di affetto da FC viene confermata; qualora l'analisi di I livello identifichi una sola o nessuna mutazione è necessario ridiscutere il caso con i clinici per valutare l'utilità di un approfondimento di II livello. Qualora l'approfondimento molecolare si fermi all'identificazione di una sola mutazione in un paziente sospetto per FC classica o di una mutazione ed una variante di incerto significato in un paziente sospetto per forma lieve o *CFTR-RD*, le linee guida suggeriscono l'esecuzione di test funzionali quali test dei potenziali nasali (NPD) e misura della corrente intestinale (ICM).

Familiarità e diagnosi prenatale: Nei soggetti che presentino familiarità per FC (o per mutazioni nel gene *CFTR*), in caso di mutazioni note è indicata la ricerca di tali mutazioni seguita dall'analisi di I livello in caso di negatività; qualora il soggetto risulti portatore è indicata l'esecuzione del test genetico anche nel partner. In caso di familiarità ma con mutazioni non identificate, è indicata l'analisi molecolare di I livello direttamente nel soggetto e nel partner. L'identificazione di coppie di portatori (con un rischio di 1:4 di avere figli malati) deve essere seguita da una consulenza multidisciplinare che offra l'opportunità di scelta tra tutte le opzioni dispo-

nibili in virtù degli enormi e continui progressi nella diagnostica di laboratorio (villocentesi e diagnosi prenatale su sangue materno) e delle legislazioni vigenti (diagnosi preimpianto).

La diagnosi prenatale si esegue tramite analisi molecolare su materiale fetale quando entrambi i genitori sono portatori di una mutazione; l'analisi molecolare sul feto è da evitare in assenza di un'indicazione specifica e deve essere preceduta dalla ricerca di mutazioni nei genitori (20).

Assenza di familiarità: Nelle coppie infertili, in caso di consanguineità o di gravidanze con riscontro di intestino iperecogeno fetale, la diagnosi di portatore consiste nell'analisi molecolare di I livello in entrambi i componenti della coppia; l'identificazione di un portatore sano in una coppia è seguita, in caso di feto con intestino iperecogeno, da analisi molecolare di II livello nel partner risultato negativo al I livello. Negli altri casi, e riguardo la diagnosi di portatore come *screening* preconcezionale in assenza di rischio aumentato (*screening* nella popolazione generale), la situazione è eterogenea e non esiste ad oggi un consenso Europeo.

In conclusione, sebbene la diagnosi della forma classica di malattia sia affidata alla clinica e mantenga tuttora come *gold standard* l'esecuzione del test del sudore, l'analisi molecolare riveste un ruolo prioritario in diverse situazioni quali ad esempio la diagnosi nei pazienti affetti da forme lievi e da CFTR-RD e lo *screening* a cascata nelle famiglie dei soggetti affetti e portatori. L'analisi molecolare è, inoltre, l'unica opzione esistente in alcune importanti situazioni di rischio aumentato, quali gravidanze con riscontro di intestino iperecogeno fetale e coppie di soggetti portatori che scelgano di sottoporsi a diagnosi prenatale. La diagnosi molecolare consente oggi di intervenire in tutte le fasi della malattia ed anche prima che la malattia stessa

si manifesti (con lo *screening* neonatale) ed ha grande importanza nella formulazione prognostica (Tabella 2). Inoltre, con lo sviluppo di terapie farmacologiche per la correzione del difetto di base, la definizione del genotipo del paziente affetto è diventata di fondamentale importanza non per la diagnosi di malattia, ma per la definizione della terapia (Tabella 2). Questo nuovo approccio terapeutico utilizza particolari molecole che, a seconda del difetto funzionale indotto dalle mutazioni causative di FC, agiscono sulla sintesi, il processamento e la funzionalità della proteina CFTR. Attualmente, si stanno sviluppando tre tipi di farmaci: farmaci per i quali è stata riconosciuta la capacità di bypassare codoni di stop prematuri causati da una mutazione, consentendo la traduzione di proteine wild type; farmaci detti correttori, che hanno dato risultati promettenti nel miglioramento del processamento di CFTR, farmaci detti potenziatori che attivano la proteina CFTR, che sia già correttamente posizionata sulla membrana apicale. In fase di studio sono anche molecole che agiscano sul trascritto di *CFTR* e sulla sua stabilità, determinando un incremento del livello di RNA correttamente processato (21).

Tab. 2. Applicazioni diagnostiche della diagnosi molecolare in FC

• <i>Screening</i> neonatale (dopo IRT)
• Conferma diagnostica (nei pazienti sospetti)
• <i>Screening</i> familiare a cascata (ricerca dei portatori)
• <i>Screening</i> del portatore (di massa)
• Formulazione prognostica (correlazione genotipo-fenotipo)
• Guida alla terapia (ricerca di mutazioni sensibili a terapia molecolare)
• Diagnosi prenatale
• Diagnosi preimpianto

BIBLIOGRAFIA

- (1) Farrell PM. *The prevalence of Cystic Fibrosis in the European Union*. J Cyst Fibros 2008; 7: 450-453.
- (2) O'Sullivan BP, Freedman SD. *Cystic fibrosis*. Lancet 2009; 373: 1891-1904.
- (3) De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. *Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms*. Thorax 2006; 61: 627-635.
- (4) Salvatore D, Buzzetti R, Baldo E, et al. *An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 4: update 2011*. J Cyst Fibros 2012; 11: 480-493.
- (5) Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. *Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes*. Am J Med Genet 2002; 111: 88-95.
- (6) Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. *Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders*. J Cyst Fibros 2011; 10 2: 86-102.
- (7) Rosenstein BJ, Cutting GR. *The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement*. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. J Pediatr 1998; 132: 589-595.
- (8) Amato F, Bellia C, Cardillo G, et al. *Extensive molecular analysis of patients bearing CFTR-related disorders*. J Mol Diagn 2012; 14: 81-9.
- (9) Poulou M, Fylaktou I, Fotoulaki M, et al. *Cystic Fibrosis genetic counseling difficulties due to the identification of novel mutations in the CFTR gene*. J Cyst Fibros 2012; 11: 344-348.
- (10) Castellani C, Southern KW, Brownlee K, et al. *European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening*. J Cyst Fibros 2009; 8: 153-173.
- (11) Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, et al. *Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendation*. Eur J Hum Genet 2009; 17: 51-65.
- (12) Castaldo G, Rippa E, Sebastio G, et al. *Molecular epidemiology of cystic fibrosis mutations and haplotypes in southern Italy evaluated with an improved semiautomated robotic procedure*. J Med Genet 1996; 33: 475-479.
- (13) Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, et al. *Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations. Correlation With Incidence Data and Application to Screening*. Hum Mutat 2002; 19: 575-606.
- (14) Wallis Y, Payne S, McAnulty C, et al. *Practice Guidelines for the Evaluation of Pathogenicity and the Reporting of Sequence Variants in Clinical Molecular Genetics. Original guidelines ratified by the UK Clinical Molecular Genetics Society and the Dutch Society of Clinical Genetic Laboratory Specialists (Vereniging Klinisch Genetische Laboratoriumspecialisten, VKGL), and updated by the Association for Clinical Genetic Science (ACGS) and the Dutch Society of Clinical Genetic Laboratory Specialists*, pag. 1-16, September 2013.
- (15) Castellani C, Cuppens H, Macek Jr. M, et al. *Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice*. J Cyst Fibros 2008;7:179-196.
- (16) Giordano S, Amato F, Elce A, et al. *Molecular and functional analysis of the large 5' promoter region of CFTR gene revealed pathogenic mutations in CF and CFTR-related disorders*. J Mol Diagn 2013; 15: 331-340.
- (17) Amato F, Seia M, Giordano S, et al. *Gene mutation in microRNA target sites of CFTR gene: a novel pathogenetic mechanism in cystic fibrosis?* PLoS One 2013; 8: e 60448.
- (18) Raynal C, Baux D, Theze C, et al. *A classification model relative to splicing for variants of unknown clinical significance: application to the CFTR gene*. Hum Mutat 2013; 34: 774-784.
- (19) Liu L, Li Y, Li S, et al. *Comparison of next-generation sequencing systems*. J Biomed Biotechnol 2012;2012:251364.
- (20) Tomaiuolo R, Nardiello P, Martinelli P, et al. *Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: an experience of 181 cases*. Clin Chem Lab Med. 2013; 51: 2227-2232.
- (21) Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. *New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls*. Pharmacol Ther. In press.