

# **Analisi genetica in Fibrosi Cistica**

## **Consensus 2019**

**A cura di:**

***Società Italiana per lo Studio della Fibrosi Cistica  
(SIFC)***

**Approvato da:**

***Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità  
(SIAMS)***

***Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica  
(SIBioC)***

***Società Italiana di Genetica Umana  
(SIGU)***

# Indice

1 - Premessa, approvazione da parte delle Società scientifiche e partecipanti .....	3
2 - Abbreviazioni e definizioni .....	6
3 - Descrizione generale della malattia .....	11
3.1 - Epidemiologia .....	11
3.2 - Genetica .....	12
3.3 - Clinica .....	14
3.4 - Diagnosi .....	15
3.5 - Terapia .....	16
4 - Consulenza genetica .....	17
5 - Strategie generali di ricerca mutazionale .....	19
5.1 - Indagini di I livello .....	20
5.2 - Indagini di II livello .....	22
5.3 - Indagini di III livello .....	22
5.4 - Indagini di IV livello .....	23
5.5 - Indagini indirette .....	23
5.6 - Appropriatezza .....	23
6 - Analisi mutazionale del gene CFTR nella FC .....	31
7 - Analisi mutazionale del gene CFTR nelle CFTR-RD .....	33
8 - Analisi mutazionale nella diagnosi genetica preimpianto .....	34
9 - Caratterizzazione di varianti nuove, rare o non precedentemente caratterizzate dal punto di vista funzionale .....	35
10 - Strategie specifiche di analisi mutazionale .....	38
10.1 - Screening neonatale .....	38
10.2 - Diagnosi prenatale .....	40
10.3 - Ricerca del portatore (individuale) .....	43
10.4 - Genitori di affetti .....	51
10.5 - Genitori di deceduti con sospetta FC .....	53
10.6 - Genitori di feto con iperrecogenicità intestinale e/o dilatazione delle anse intestinali .....	55
10.7 - Coppie formate da due individui della popolazione generale .....	58
10.8 - Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un eterozigote .....	62
10.9 - Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un affetto con FC .....	64
10.10 - Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un affetto con CFTR-RD .....	67
10.11 - Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un familiare di affetto da FC con variante patogenetica del ramo familiare identificata .....	72
10.12 - Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un familiare di affetto da FC con variante patogenetica del ramo familiare non identificata .....	75
10.13 - Consanguinei .....	78
11 - Assicurazione della qualità .....	80
12 - Referto .....	84
13 - Database, website e link ai principali software di analisi .....	87
14 - Bibliografia .....	88

## **1 - Premessa, approvazione da parte delle Società scientifiche e partecipanti**

### **Premessa**

Questo testo è un documento di consenso (consensus document) come definito dalla corrente letteratura internazionale. Tratta gli aspetti specifici dell'analisi genetica in Fibrosi Cistica e aggiorna il testo "Modelli di analisi genetica per la fibrosi cistica" del 2005 (elaborato dalla Società italiana di genetica medica e dalla Società italiana di pediatria). Per gli aspetti generali relativi ai test genetici si rimanda alle linee guida della Società italiana di genetica umana (SIGU). Nel resto del testo ci si riferirà a questo documento di consenso semplicemente come "documento".

### **Approvazione da parte delle Società scientifiche**

Questo documento è stato approvato dalle seguenti Società scientifiche:

Società italiana per lo studio della fibrosi cistica (SIFC) (Società scientifica promotrice del documento)

Società italiana di andrologia e medicina della sessualità (SIAMS)

Società italiana di biochimica clinica e biologia molecolare clinica (SIBioC)

Società italiana di genetica umana (SIGU)

## Partecipanti

Questo documento è stato redatto dal Gruppo di lavoro per la revisione del documento Consensus 2019 per l'analisi genetica in fibrosi cistica, della Società italiana per lo studio della fibrosi cistica (SIFC). Di seguito è riportata la composizione del Gruppo di lavoro.

**Marco Lucarelli** (Coordinatore), Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma; D.A.I. dei Servizi Diagnostici, A.O.U. Policlinico Umberto I, Roma.

**Adriano Angioni**, Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma.

**Maria Baffico**, U.O.C. Laboratorio di Genetica Umana, I.R.C.C.S. Giannina Gaslini, Genova.

**Cristina Bombieri**, Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Sezione di Biologia e Genetica, Università di Verona.

**Alberto Bonizzato**, Laboratorio analisi, A.O.U. Integrata, Verona.

**Graziella Borgo**, Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica, Verona.

**Giuseppe Castaldo**, CEINGE-Biotecnologie avanzate, Napoli; Dipartimento di Biologia Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II.

**Carlo Castellani**, Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica, I.R.C.C.S. Giannina Gaslini, Genova.

**Claudia Centrone**, S.O.D. Diagnostica Genetica, A.O.U. Careggi, Firenze.

**Alessandra Coiana**, Laboratorio di Genetica e Genomica, Ospedale Pediatrico Microcitemico "A. Cao"- A.O. Brotzu, Cagliari; Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università di Cagliari.

**Maria Rosaria D'Apice**, Laboratorio di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma.

**Caterina Di Girgenti**, U.O.s.d. Genetica Molecolare, Dipartimento di Pediatria, ARNAS Civico G. Di Cristina Benfratelli, Palermo.

**Sarah Egiziano**, U.O.S. Diagnostica Molecolare - U.O.C. Laboratorio Analisi, Dipartimento di Patologia Clinica e Medicina Trasfusionale, Azienda ULSS 3 Serenissima.

**Mosè Favarato**, U.O.S. Diagnostica Molecolare - U.O.C. Laboratorio Analisi, Dipartimento di Patologia Clinica e Medicina Trasfusionale, Azienda ULSS 3 Serenissima.

**Annalisa Ferlisi**, Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica, ISMEP II Pediatria, ARNAS Civico Di Cristina Benfratelli, Palermo.

**Paola Melotti**, Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica, A.O.U. Integrata di Verona.

**Laura Minicucci**, Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica, I.R.C.C.S. Giannina Gaslini, Genova.

**Elisabetta Pelo**, S.O.D. Diagnostica Genetica, A.O.U. Careggi, Firenze.

**Angela Ragusa**, Laboratorio Centralizzato, Sezione di Genetica Molecolare, A.O.U. Policlinico Vittorio Emanuele, Catania.

**Anna Ravani**, Laboratorio di Genetica Molecolare, U.O. Genetica Medica, A.O.U. S. Anna, Ferrara.

**Gianfranco Savoldi**, Sezione Specializzata di Citogenetica e Genetica Medica, U.O. Anatomia Patologica, Spedali Civili, Brescia.

**Manuela Seia**, Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano.

**Lisa Termini**, Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica, ISMEP II Pediatria, ARNAS Civico Di Cristina Benfratelli, Palermo.

## 2 - Abbreviazioni e definizioni

### Abbreviazioni

aCGH = comparative genomic hybridization array

ACMG = American College of Medical Genetics

ACOG = American College of Obstetricians and Gynecologists

ADO = allele drop out

CBAVD = congenital bilateral absence of vas deferens (assenza/atresia congenita bilaterale dei vasi deferenti)

CFSPID = Cystic Fibrosis screening positive, inconclusive diagnosis (positivi allo screening neonatale per Fibrosi Cistica con diagnosi non conclusiva)

CFTR = Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator (regolatore della conduttanza transmembrana nella Fibrosi Cistica)

CFTR-RD = CFTR-related disorders (patologie correlate al CFTR)

CRMS = CFTR related metabolic syndromes

DR = detection rate

EMQN = European Molecular Genetics Quality Network

EQA = external quality assessment

FC = Fibrosi Cistica

FIVET = in vitro fertilization and embryo transfer

HGVS = Human Genome Variation Society

ICSI = intracytoplasmatic sperm injection

IVD = in vitro diagnostic device

IVS = intervening sequence (introne)

IRT = tripsinogeno immunoreattivo

ISS = Istituto Superiore di Sanità

LIFC = Lega Italiana Fibrosi Cistica

MicroTeSE = MICROscopic testicular sperm extraction

MLPA = multiplex ligation dependent probe amplification

mRNA = RNA messaggero

NBD1 = nucleotide-binding domain 1

NGS = Next Generation Sequencing

OMS = Organizzazione Mondiale della Sanità

PAP = pancreatitis associated protein

PGT = preimplantation genetic testing  
PGT-M = PGT per malattie monogeniche  
PMA = procreazione medicalmente assistita  
RIFC = Registro Italiano Fibrosi Cistica  
RT-PCR = reverse transcriptase PCR  
SIFC = Società Italiana Fibrosi Cistica  
SNP = single nucleotide polymorphism  
SSR = servizio sanitario regionale  
STR = short tandem repeats  
TeSE = testicular sperm extraction  
VEQ = valutazione esterna di qualità

## Definizioni

### Confronto tra "e' indicato" e "è auspicabile".

Quando nella trattazione si usa il termine "è indicato" si intende dire che quella è la procedura migliore che secondo questo documento è da seguire.

Quando nella trattazione si usa il termine "è auspicabile" si intende dire che possono esserci varie procedure ma quella "auspicabile" è quella che questo documento ritiene migliore. Le procedure alternative andrebbero nel tempo abbandonate a favore di quella "auspicabile" o "indicata".

### Detection rate.

È la proporzione di alleli con varianti patogenetiche che risultano positivi al test genetico applicato. Corrisponde alla sensibilità diagnostica (= veri positivi / (veri positivi + falsi negativi)), applicata agli alleli. È generalmente inferiore al 100% poiché, di solito, nella popolazione analizzata sono presenti varianti patogenetiche non comprese (per vari motivi) nel test genetico utilizzato.

### Forme cliniche.

In questo documento ci si riferirà alle seguenti definizioni operative delle diverse forme cliniche originate dalle varianti patogenetiche del gene Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Ciò è finalizzato

all'individuazione dei migliori approcci di ricerca mutazionale per ciascuna forma clinica.

**Fibrosi Cistica.** S'intende la Fibrosi Cistica in forma completa come definito dalle più recenti linee guida per la diagnosi. In questa categoria sono comprese tutte le forme cliniche che, comunemente e con terminologia che andrebbe abbandonata, sono anche indicate come Fibrosi Cistica classica, Fibrosi Cistica tipica, Fibrosi Cistica poli-sintomatica, Fibrosi Cistica grave. L'abbreviazione che verrà usata in questo documento è: FC (Fibrosi Cistica).

**Patologie correlate al gene CFTR.** S'intendono quelle forme cliniche associate a disfunzione del CFTR che non rispettano i criteri diagnostici della FC (come definita sopra). In questa categoria sono comprese tutte le forme cliniche che, comunemente e con terminologia che è auspicabile sia abbandonata, sono anche indicate come Fibrosi Cistica non classica, Fibrosi Cistica atipica, Fibrosi Cistica mono- oligo-sintomatica, Fibrosi Cistica lieve. In accordo con la letteratura internazionale, le patologie correlate al gene CFTR per le quali è indicata la ricerca mutazionale nel gene CFTR a scopo diagnostico sono le seguenti: assenza/atresia congenita bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD), pancreatiti idiopatiche e bronchiectasie disseminate. L'abbreviazione che verrà usata in questo documento è: CFTR-RD (CFTR-related disorders).

**Positivi allo screening neonatale per Fibrosi Cistica con diagnosi non conclusiva.** S'intendono i neonati positivi allo screening neonatale biochimico per FC, con due varianti del gene CFTR presenti, almeno una delle quali non riconosciuta come causa di FC (come definita sopra) e test del sudore non positivo; oppure, con test del sudore borderline e una o nessuna variante del gene CFTR riconosciuta come causa di FC (come definita sopra). Queste condizioni vengono chiamate "CFTR related metabolic syndromes" (CRMS) o "Cystic Fibrosis screening positive, inconclusive diagnosis" (CFSPID). L'abbreviazione che verrà usata in questo documento è: CFSPID.

### Portatore.

Individuo eterozigote per una variante patogenetica del gene CFTR. Il portatore è sano (non ha sintomi clinici). In questo documento si usa solo il termine portatore, con lo stesso significato dei termini (ritenuti ridondanti) di portatore sano, portatore di Fibrosi Cistica, portatore sano di Fibrosi Cistica.

## Screening del portatore nella popolazione generale (carrier screening) e test del portatore in famiglie con affetti o portatori già identificati (carrier testing).

Il carrier screening è la procedura di ricerca del portatore nella popolazione generale; cioè, in individui che non hanno un aumentato rischio di essere portatori e per i quali non siano note le varianti patogenetiche familiari; in questo caso, non avendo indicazioni su specifiche varianti patogenetiche da ricercare, saranno ricercate quelle più comuni nella popolazione generale.

Il carrier testing è la procedura di ricerca del portatore in famiglie nelle quali siano già stati identificati individui portatori o affetti, con varianti patogenetiche note; cioè, in individui che hanno un aumentato rischio di essere portatori e per i quali sia già noto quali varianti patogenetiche specifiche ricercare.

## Consulenza genetica e test genetico.

Come definito dalle Linee Guida per la Genetica Medica approvate dalla Conferenza Stato-Regioni il 15/07/2004, la consulenza genetica è parte integrante del test genetico per il quale s'individuano tre fasi: la consulenza genetica pre-test, il processo analitico del campione biologico e la consulenza genetica post-test. Quindi, è necessario che il test genetico per la FC sia sempre preceduto dalla consulenza genetica pre-test e seguito da quella post-test. In nessun caso è indicato eseguire solo l'indagine mutazionale senza la consulenza genetica pre- e post-test.

## Marcatore.

È uno specifico tratto di DNA con sequenza e localizzazione note, per mezzo del quale è possibile individuare univocamente una regione cromosomica o una variante allelica mediante un test di laboratorio. I marcatori possono essere utilizzati per l'individuazione nelle famiglie di alleli patologici del gene CFTR qualora la ricerca diretta delle varianti patogenetiche specifiche non sia informativa.

### Variante patogenetica.

Qualsiasi variazione di sequenza del DNA, rispetto al wild type, con un effetto funzionale accertato di eliminazione o riduzione della quantità e/o dell'attività della proteina. Una variante patogenetica manifesta effetti clinici negativi e, quindi, origina la patologia (nel caso della FC, se in omozigosi o in eterozigosi composta con un'altra variante patogenetica). Questa definizione comprende quelle variazioni di sequenza che erano comunemente indicate come mutazioni. In questo testo, il termine è sempre riferito al gene CFTR.

### Variante non patogenetica.

Qualsiasi variazione di sequenza del DNA, rispetto al wild type, con un effetto funzionale accertato simile al wild type o che, comunque, non produce una significativa riduzione della quantità e/o dell'attività della proteina. Una variante non patogenetica non manifesta effetti clinici negativi e non origina la patologia (nel caso della FC, anche se in omozigosi o in eterozigosi composta con una variante patogenetica). Questa definizione comprende quelle variazioni di sequenza, presenti nella popolazione in esame con frequenza superiore all'1%, comunemente indicate come polimorfismi. In questo testo, il termine è sempre riferito al gene CFTR.

### Variante.

Quando non è specificato se la variante è patogenetica o non patogenetica, ci si riferisce a una qualsiasi variazione di sequenza del DNA, rispetto al wild type, indipendentemente dal suo effetto funzionale. Questa definizione può comprendere sia le varianti patogenetiche sia quelle non patogenetiche (quindi, secondo la precedente terminologia, sia le mutazioni sia i polimorfismi), nonché varianti per le quali non sia accertato l'effetto funzionale (quindi le varianti di incerto significato). In questo testo, il termine è sempre riferito al gene CFTR.

### 3 - Descrizione generale della malattia

#### 3.1 - Epidemiologia

La Fibrosi Cistica (FC) (OMIM 219700) è la più comune malattia genetica a ereditarietà autosomica recessiva con prognosi infausta nelle popolazioni caucasiche. È malattia più rara nelle popolazioni non caucasiche, anche se le stime possono non essere attendibili, perché la FC probabilmente non è sospettata né diagnosticata qualora coesistano altre gravi e frequenti malattie che possono avere sintomi simili e contribuiscono alla mortalità infantile e giovanile. La distribuzione geografica della FC è estremamente eterogenea sia in termini di incidenza che di prevalenza: nel mondo si stimano circa 100 000 affetti e oltre 20 milioni di portatori, con un'incidenza nella popolazione europea compresa tra 1/1353 e 1/25000 nati vivi.

Una fonte di informazioni su prevalenza e incidenza in Italia è il Registro Nazionale di patologia ("Registro Italiano Fibrosi Cistica" (RIFC), coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) con il sostegno incondizionato della Lega Italiana Fibrosi Cistica (LIFC): Rapporto 2015 - 2016, comunicazione personale), pur con due limitazioni: esso copre fino al 95% della popolazione FC italiana (con sottostima quindi della prevalenza) e, inoltre, è verosimile che in Italia come altrove, una quota di pazienti ad espressione clinica lieve-moderata e con emergenza del fenotipo clinico in età adulta non sia diagnosticata (con sottostima quindi dell'incidenza). Tenendo conto di questi limiti, nel Rapporto relativo all'anno 2015 risulta un'incidenza di 1 affetto da FC su 4.176 nati vivi. Su questa base, la presunta prevalenza dei portatori è calcolabile in 1/32 nella popolazione generale italiana. Questi valori sono peraltro contenuti nel range segnalato in studi su popolazioni selezionate e di numero più limitato (incidenza: da 1/4356 a 1/2438; frequenza del portatore da 1/33 a 1/25). Tenendo in considerazione una probabile sottostima dei dati del RIFC, e anche un principio di prudenza, il valore di prevalenza del portatore che sarà utilizzato per il calcolo dei rischi riportati in questo documento sarà di 1/30.

In Italia, la rilevanza sociale della FC è stata riconosciuta con l'istituzione dei Centri Regionali di Riferimento e dei Servizi Regionali di Supporto. La legge 548/1993 riconosce a questi Centri numerose funzioni: assistenziali, di

promozione delle conoscenze cliniche ed epidemiologiche, di coordinamento dei programmi di screening, di ricerca e formazione didattica. I Centri Regionali di Riferimento, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità, hanno istituito il RIFC che rileva i principali dati epidemiologici della malattia in Italia. La società scientifica che in Italia si occupa della FC nel suo complesso è la Società Italiana Fibrosi Cistica (SIFC).

### 3.2 - Genetica

La FC è originata da varianti patogenetiche del gene "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (CFTR) (NM\_000492.3), localizzato nel braccio lungo del cromosoma 7 (7q31.2). Esso codifica per una proteina di membrana costituita da 1480 aminoacidi la cui funzione principale consiste nel trasporto transepiteliale del cloro. Il gene CFTR è costituito da 27 esoni, ha una dimensione di circa 250 kb e genera un trascritto di 6132 basi.

Ad oggi sono state identificate oltre 2000 varianti del gene CFTR, la cui distribuzione e frequenza può variare, anche in modo rilevante, tra i differenti gruppi etnici e aree geografiche. La maggior parte delle varianti patogenetiche del gene CFTR è stata rinvenuta nelle popolazioni di origine europea, tuttavia alcune varianti patogenetiche, seppur rare, sono caratteristiche delle popolazioni africane ed est-asiatiche.

La variante patogenetica più frequente del gene CFTR è la c.1521\_1523delCTT p.Phe508del (nomenclatura HGVS) comunemente conosciuta come  $[\Delta]F508$  o F508del (nomenclatura tradizionale). Questa variante patogenetica consiste in una delezione di tre nucleotidi (CTT) nell'esone 11 (esone 10 in nomenclatura tradizionale) con conseguente perdita di una fenilalanina in posizione 508 nel "nucleotide-binding domain 1" (NBD1). La distribuzione geografica di questa variante patogenetica è eterogenea, rappresentando in Europa circa i 2/3 degli alleli del gene CFTR in pazienti affetti da FC, con prevalenza decrescente dal nord-ovest al sud-est europeo. I restanti alleli del gene CFTR sono eterogenei, con poche varianti patogenetiche frequenti e molte rare. Alcune varianti patogenetiche, inoltre, possono manifestare una frequenza elevata in alcune popolazioni conseguentemente alla presenza di isolati genetici (motivi religiosi, etnici e geografici).

Molte varianti del gene CFTR non sono ancora caratterizzate a livello funzionale. Inoltre, non tutte le varianti comportano un quadro clinico compatibile con la malattia: esiste infatti un numero non trascurabile di varianti nucleotidiche che sono associate a patologie correlate al CFTR (CFTR-RD) o a positività allo screening neonatale per FC con diagnosi non conclusiva (Cystic Fibrosis screening positive inconclusive diagnosis - CFSPID) (vedere Definizioni) per le quali non esistono dati sufficienti a definirne il sicuro ruolo patogenetico.

I difetti a carico del gene CFTR sono stati classificati in sei classi in base ai meccanismi biomolecolari attraverso i quali causano deficit funzionale della proteina e, in linea generale, pazienti con combinazioni nei due alleli di varianti patogenetiche di classe I, II e III manifestano per lo più un fenotipo severo della malattia con caratteristiche cliniche comprendenti insufficienza pancreatica, ileo da meconio alla nascita, malassorbimento e difetto di crescita, broncopneumopatia e compromissione della funzionalità respiratoria con andamento peggiorativo nel tempo, malattia epatica. Varianti patogenetiche di classe IV, V e VI sono in genere associate ad un quadro clinico FC lieve con sufficienza pancreatica, compromissione polmonare più modesta e migliori aspettative di vita, oppure a CFTR-RD. Varianti patogenetiche di classe IV, V e VI sono fenotipicamente dominanti quando associate a varianti patogenetiche di classe I, II e III. Tuttavia, sia la variabilità genetica sia quella ambientale, nonché le terapie, rendono la correlazione genotipo - fenotipo complicata e spesso difficilmente prevedibile. Pertanto, la predizione del decorso della malattia a partire dal genotipo non è una prassi raccomandata. Spesso, infatti, pazienti con il medesimo genotipo possono presentare manifestazioni cliniche differenti, soprattutto per quanto concerne la compromissione polmonare. La presenza di varianti in *cis* del gene CFTR o di varianti in altri geni definiti come "geni modificatori", di cui ancora non è definito il ruolo funzionale, potrebbe spiegare parte di queste discrepanze. Tali variazioni di sequenza sono state infatti associate, in alcuni casi, ad una più frequente insorgenza di specifiche manifestazioni cliniche.

In ogni caso, l'identificazione di una variante patogenetica e/o genotipo mutato del gene CFTR deve essere corredata di un'interpretazione funzionale al meglio delle conoscenze attuali.

### 3.3 - Clinica

La Fibrosi Cistica è caratterizzata da notevole multiformità clinica dovuta sia alla varietà degli organi ed apparati interessati, sia alla variabile entità ed evolutività dell'interessamento degli stessi. La diversa espressività clinica della malattia è solo parzialmente legata al tipo di variante del gene CFTR, essendo il fenotipo modulato anche da altri geni e da fattori ambientali. Questi secondi hanno acquistato nel corso del tempo sempre maggiore importanza e comprendono l'accesso a cure specialistiche precoci, grazie ai programmi di screening neonatale, il regolare follow-up presso centri multidisciplinari dedicati e la possibilità di ricorrere ad un piano nazionale di sanità pubblica adeguato. Nell'ambito della complessa e varia sintomatologia clinica, di particolare rilevanza risulta la malattia polmonare, che condiziona pesantemente la prognosi della malattia con un meccanismo a cascata che comprende alterazioni dell'airway surface liquid, secrezioni bronchiali dense, sovrainfezioni batteriche croniche, destrutturazione del parenchima polmonare ed esito finale in insufficienza respiratoria con indicazione al trapianto bipolmonare. Importanti sono anche l'aumentata concentrazione di sodio e cloro nel sudore, responsabile di crisi di disidratazione da perdita di sali, le manifestazioni cliniche legate all'insufficienza pancreatica (diarrea da malassorbimento, malnutrizione, interessamento pancreatico endocrino e conseguente diabete, ricorrenza di episodi di ostruzione intestinale), l'epatopatia e il quadro di assenza/atresia bilaterale dei dotti deferenti (CBAVD) che determina sterilità da azoospermia ostruttiva. Nelle forme più gravi i sintomi si manifestano fin dai primi anni di vita, mentre nelle forme più lievi i sintomi sono meno importanti e determinano un ritardo anche notevole nella definizione diagnostica, che può essere raggiunta anche nella quinta, sesta decade di vita.

Sono inoltre note in letteratura forme cliniche associate a disfunzione del CFTR che non soddisfano completamente i criteri diagnostici della malattia. Sono definite CFTR-RD e caratterizzate da sintomatologia limitata a singoli organi ed apparati, come ad esempio nei maschi il quadro di CBAVD, alcuni casi di pancreatiti "idiopatiche" croniche o ricorrenti e le bronchiectasie disseminate. I casi di CFSPID sono invece caratterizzati da positività allo screening neonatale, assenza di due varianti a piena espressività clinica e test del sudore negativo o borderline.

Le diverse forme cliniche di CFTR-RD sono prevalentemente ad andamento benigno, ma talora possono, nel corso degli anni, evolvere e assumere caratteristiche diverse dall'originale.

Per quanto riguarda la FC, la prognosi è notevolmente migliorata nel corso degli anni soprattutto grazie al progresso delle cure; incide inoltre sul miglioramento delle caratteristiche epidemiologiche complessive della malattia il riconoscimento, in età pediatrica e in età adulta, di forme clinicamente più lievi. La FC, quindi, considerata in passato unicamente affezione dell'età pediatrica, è diventata anche malattia dell'età adulta, nella quale si concentra la gran parte della morbilità.

La mediana dell'attesa di vita, che risultava di pochi anni negli anni 50, è segnalata di 53 anni nel report del registro Canadese (2016) e di 47 anni nel report del registro U.S.A (2016). La mediana dell'età al decesso nel report del registro U.S.A. è 29 anni (2016) e in quello Italiano di 37 anni (2016). Nei prossimi 10 anni è atteso un incremento del 75% della popolazione di malati adulti nei maggiori paesi europei.

### 3.4 - Diagnosi

La diagnosi di FC si basa su tre elementi fondamentali: l'esistenza di un quadro clinico compatibile con la malattia o screening neonatale positivo, una confermata disfunzione del canale CFTR e l'identificazione di due varianti patogenetiche in *trans*. La funzionalità del canale CFTR è principalmente misurata come alterata concentrazione di cloro misurabile mediante test del sudore. Più raramente, in genere nei casi in cui la diagnosi è dubbia e non come test di prima istanza, vengono valutate le alterazioni nella differenza del potenziale elettrico transepiteliale nelle mucose nasali (mediante il test della differenza dei potenziali nasali) e/o le correnti transepiteliali in biopsie rettali (mediante il test della corrente di cortocircuito).

In Italia la diffusione dello screening neonatale consente, nella maggioranza dei casi, di effettuare una diagnosi di FC precoce, permettendo l'adozione di un regime terapeutico, anche alimentare, che prevenga la malnutrizione e limiti il danno polmonare.

Il test del sudore rimane a tutt'oggi il "gold standard" per la diagnosi di FC. L'esame trova ampia applicazione e assume elevata specificità diagnostica quando

utilizzato per la diagnosi di FC, caratterizzata dalla presenza di almeno una manifestazione fenotipica compatibile ed un test del sudore positivo ( $Cl^- >60$  mmol/L), ma non assume significato discriminatorio nella diagnosi delle CFTR-RD o CFSPID, nelle quali le concentrazioni di cloruro si attestano in genere nella fascia dubbia (nella quale può comunque essere di ausilio diagnostico) o addirittura negativa.

Dal punto di vista genetico, per la diagnosi è auspicabile la dimostrazione della presenza di due alleli mutati. Quindi, l'analisi molecolare del gene CFTR è sempre indicata. In caso di test del sudore positivo l'analisi molecolare ha un ruolo di conferma. In caso d'impossibilità ad eseguire l'esame del sudore o quando esso risulti di dubbia interpretazione o negativo, ma in presenza di un sospetto clinico, l'analisi molecolare del gene CFTR assume un ruolo dirimente.

Sono disponibili, ad oggi, una grande varietà di metodologie analitiche basate su tecniche molecolari che permettono l'individuazione di varianti del gene CFTR e la cui applicazione e interpretazione richiede abilità ed esperienza, oltre ad approfondite conoscenze della malattia e dei suoi meccanismi patogenetici. E' indicato che l'analisi molecolare del gene CFTR sia offerta, in accordo alle normative vigenti (riportate in bibliografia), da laboratori con adeguate competenze tecniche e interpretative che operino in stretta associazione con servizi di Genetica Clinica, Centri di Riferimento per FC e Servizi di supporto.

### 3.5 - Terapia

Il programma terapeutico dei pazienti affetti da FC viene impostato e monitorato presso Centri di Riferimento e Servizi di supporto specializzati (Legge 548/1993) che dispongono di team multidisciplinari con esperienza specifica e approfondita della patologia.

Ad oggi, l'evoluzione della malattia polmonare rappresenta ancora la principale causa di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da FC e, in caso di malattia molto avanzata con insufficienza respiratoria irreversibile, il trapianto di polmone bilaterale offre la possibilità di allungare le aspettative di vita.

E' necessario distinguere i trattamenti terapeutici di vecchia e nuova generazione.

Lo scopo delle terapie sintomatiche (di vecchia generazione) utilizzate finora è controllare la malattia in tutte le sue manifestazioni, consistendo

principalmente in: antibioticoterapia, aerosolterapia, fisioterapia e riabilitazione respiratoria, terapia enzimatica sostitutiva e approccio nutrizionale; inoltre, attività fisica e sportiva, sostegno psicologico e sociale. In particolare l'antibioticoterapia, per via sistemica e per aerosol, ha lo scopo di trattare gli episodi di infezione respiratoria acuta e prevenire il danno broncopolmonare cronico e l'esito in insufficienza respiratoria.

La conoscenza dei meccanismi attraverso cui le varianti patogenetiche identificate nel gene CFTR conducono alla difettiva funzione della proteina mutata ha aperto la strada alle terapie di nuova generazione, volte alla riparazione del difetto biochimico di base specifico delle diverse varianti patogenetiche (CFTR repairing therapy). I trattamenti terapeutici di nuova generazione sono rappresentati dalla terapia farmacologica che prevede l'utilizzo di molecole in grado di incrementare la funzione della proteina CFTR mutata (potenziatori) e/o di correggere il traffico intracellulare della proteina (correttori). Ad oggi, approcci terapeutici di nuova generazione in grado di modificare sensibilmente il decorso della malattia sono stati sperimentati clinicamente per alcune varianti patogenetiche. Molti altri principi attivi sono in fase di sperimentazione preclinica, con lo scopo di correggere un più ampio numero di varianti patogenetiche.

Inoltre, recenti trials clinici hanno dimostrato l'applicabilità di un approccio di terapia genica mediante utilizzo di vettori non virali nella stabilizzazione della funzione polmonare. Tale approccio è ancora in fase sperimentale.

#### **4 - Consulenza genetica**

La consulenza genetica applicata al test è un processo comunicativo che si propone la finalità di rendere consapevole il richiedente del significato del test che intende eseguire, dei possibili risultati e delle loro implicazioni in riferimento alla trasmissione ereditaria della malattia che il test considera, nonché delle implicazioni clinico-terapeutiche e del rischio di ricorrenza nella prole. Come tale, è parte integrante del test genetico del quale ne costituisce la necessaria premessa e la logica conclusione. Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) la consulenza genetica è un processo di dialogo e interazione fra il consulente e il consultando che aiuta a compiere scelte autonome e consapevoli e ad agire in conformità con le decisioni prese.

La consulenza pre-test (Conferenza Stato Regioni 15/7/2004) si propone l'obiettivo di valutare l'appropriatezza prescrittiva dell'esame in relazione al contesto specifico ed eventualmente di modificarne l'indirizzo; di fornire le più complete informazioni circa le caratteristiche, i limiti e le proprietà del test in termini di sensibilità ed efficienza diagnostica; di esporre le possibili problematiche connesse alle caratteristiche di trasmissione della patologia; di esplorare i percorsi più idonei per conseguire appropriate soluzioni; di raccogliere il consenso informato. Quest'ultimo atto produce un documento, firmato dal richiedente e dallo specialista in genetica medica o di branca che l'ha raccolto, che deve essere allegato alla richiesta del test genetico.

Nella consulenza post-test gli elementi principali sono la comunicazione del risultato del test, della sua accuratezza, delle implicazioni dal punto di vista riproduttivo e delle scelte possibili. La consulenza post-test produce un documento, firmato dal consulente genetista.

Nelle sezioni successive saranno sviluppati in dettaglio i modelli di consulenza genetica in relazione a differenti soggetti/condizioni con rischio aumentato o rischio generico per FC. In generale è opportuno ricordare che nel corso della consulenza vanno fornite anche informazioni sulla malattia FC, sulla sua variabilità fenotipica e sulla difficoltà di correlare il genotipo con il fenotipo, sul miglioramento della prognosi ottenuto negli ultimi decenni, ma anche sull'ampio e importante impegno terapeutico quotidiano, per tutta la vita, che la FC richiede. Va resa nota la disponibilità di nuovi farmaci in grado d'intervenire sul difetto di base e quindi di cambiare la prognosi della malattia. Per ora non è possibile intervenire su tutte le varianti patogenetiche, ma la ricerca internazionale è molto attiva in questo campo e potrebbero esserci ulteriori risultati, anche se in tempi non facilmente prevedibili. Nell'informazione sulla malattia, oltre alla FC va segnalata l'esistenza di CFTR-RD (in riferimento all'interessamento dei vari organi) fornendo anche spunto per eventuali segnalazioni potenzialmente riferibili a queste entità nei consultandi o nei familiari (es. infertilità maschile).

Va sempre considerato che l'eventuale esperienza/percezione/conoscenza della FC da parte dei consultandi può essere molto diversa (es: soggetto della popolazione generale che non ha mai sentito parlare di FC, genitori di portatore identificato attraverso screening neonatale, coppia con familiare affetto) e che il tipo di informazione va sempre modulato in conseguenza. La consulenza genetica deve essere svolta "senza raccomandare" al consultando una particolare linea di

azione o alla coppia una particolare decisione (ad esempio circa la scelta di avere o non avere figli o continuare o interrompere una gravidanza). Il consulente può comunque esprimere la propria opinione attraverso modalità di comunicazione non verbali oppure attraverso il modo in cui presenta la maggiore o minore gravità della malattia e le possibilità di terapie, perciò va posta particolare attenzione al mantenimento di un atteggiamento "non direttivo". Sul piano delle competenze comunicative, al consulente è richiesto di saper usare un linguaggio semplificato rispetto a quello tecnico, di non dare per scontato quanto ritenuto corretto in campo medico-scientifico e di verificare il più possibile la comprensione delle informazioni che fornisce e l'impatto che provocano, anche tenendo conto dei diversi credi religiosi e culturali. Sul piano delle competenze scientifiche è richiesto che abbia informazioni specifiche e aggiornate relative a questa patologia, sia dal punto di vista della diagnostica molecolare che dal punto di vista della conoscenza della clinica.

L'informazione è indispensabile anche quando il test è offerto "in accompagnamento" ad altri test (es: in fase preconcezionale). Quando il test genetico è reso disponibile a popolazioni particolari, e anche dipendentemente dal risultato, le informazioni sul test possono essere acquisite da fonti web o documenti informativi (vedere ad esempio la fonte web "Il test genetico per portatore di Fibrosi Cistica: guida alla scelta" riportato nel Capitolo Database e website). In questi casi, le fonti web devono essere istituzionali, rigorosamente individuate e di comprovata affidabilità; i documenti informativi devono essere largamente condivisi e approvati da società scientifiche. Esempi (non esaustivi) di applicabilità di questa procedura possono essere: 1) in un programma di screening del portatore nella popolazione generale, la consulenza genetica pre-test e la consulenza genetica post-test nel caso di negatività di entrambi i membri della coppia; 2) in un programma di screening neonatale, la consulenza genetica pre-test.

## **5 - Strategie generali di ricerca mutazionale**

I test molecolari devono soddisfare criteri di sensibilità analitica, specificità analitica e riproducibilità elevati. Le tecniche di analisi genetica molecolare di seguito descritte utilizzano DNA genomico (I, II, III livello) o RNA (IV livello) estratti da varie tipologie di campione biologico, quali prelievo di sangue

periferico, tampone buccale, spot di sangue, brushing nasale e distinguono la condizione di omozigote e di eterozigote per ciascuna variante patogenetica analizzata. E' consigliabile che vengano utilizzati metodiche e strumenti con validazione IVD. In ogni caso è richiesta una fase di validazione interna prima che questi metodi siano introdotti nella pratica di laboratorio.

Per tutte le analisi mutazionali bisogna considerare e minimizzare i possibili errori nella genotipizzazione dovuti a diversi fattori come, ad esempio (non esaustivo), il fenomeno ADO (Allele Drop Out, cioè perdita di un allele) che consiste nell'amplificazione o ibridazione di uno solo dei due alleli. Questo fenomeno può essere dovuto alla presenza di polimorfismi nelle zone di riconoscimento dei primers o delle sonde che devono essere tenuti in considerazione.

Il laboratorio deve dotarsi di un sistema di archiviazione dei dati grezzi che tenga conto delle problematiche di privacy.

Un parametro fondamentale che il laboratorio deve prendere in considerazione è la detection rate (DR; vedere in Definizioni). In tutti i casi nei quali siano disponibili i dati in letteratura, per i test molecolari deve essere definita la DR relativa alla FC, che tenga in considerazione l'origine geografica e l'etnia del paziente.

E' auspicabile un'azione volta a migliorare l'uniformità nazionale dell'offerta dei test genetici per FC, sia tecnica sia a proposito dei costi, anche per quanto riguarda la partecipazione dell'utente e delle Regioni alla spesa.

## 5.1 - Indagini di I livello

I test molecolari di I livello indagano pannelli di varianti patogenetiche più frequenti del gene CFTR e utilizzano tecniche semplici e rapide. L'uso di questi test favorisce l'uniformità dei pannelli mutazionali tra i diversi laboratori. Si raccomanda che siano incluse le varianti patogenetiche più frequenti ( $\geq 1\%$ ) dell'area geografica ed etnia dell'individuo in esame. Non è indicato che le indagini di I livello includano l'analisi del tratto polimorfico c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in nomenclatura HGVS), (TG)mTn (in nomenclatura tradizionale), della zona di giunzione IVS9 (introne 9) - esone 10 (in nomenclatura HGVS), IVS8 (introne 8) - esone 9 (in nomenclatura tradizionale). Per l'unica eccezione ammessa vedere i paragrafi 5.6.1.1, 5.6.3 e il capitolo 7. Questi test possono includere varianti

patogenetiche puntiformi, piccole delezioni/inserzioni, nonché macrodelezioni / macroduplicazioni di cui siano noti i breakpoint. Esempi delle più comuni tecniche utilizzate per i test di I livello sono: Reverse Dot Blot (RDB), Amplification Refractory Mutation System (ARMS), Spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight), pannelli in Next Generation Sequencing.

Occorre distinguere i casi di applicazione alla popolazione italiana da quelli ad etnie diverse da quella italiana.

5.1.1 - Nel caso di applicazione alla popolazione italiana, è indicato che i test di I livello abbiano una DR minima dell'85%. In considerazione dei progressi tecnologici relativi alle indagini mutazionali in FC è tuttavia auspicabile che questo valore sia progressivamente innalzato nell'ambito di un processo di miglioramento continuo.

5.1.2 - Se l'applicazione è rivolta ad etnie diverse da quella italiana, occorre distinguere tra i casi descritti di seguito.

5.1.2.1 - Se la frequenza del portatore è nota e paragonabile a quella italiana, è indicato applicare una gestione simile a quella descritta per la popolazione italiana (descritta in 5.1.1).

5.1.2.2 - Se la frequenza del portatore è nota ma diversa da quella italiana e/o con i test di I livello non è possibile raggiungere l'85% di DR (o comunque la probabilità di eterozigosi a posteriori è superiore a quella della popolazione italiana) è indicato operare sulla coppia. In questo caso è indicato applicare un test di I livello ad entrambi i membri della coppia, purché il rischio riproduttivo residuo di coppia sia uguale o inferiore a 1/777 (0,13%) (rischio riproduttivo residuo intermedio per le coppie italiane con un membro portatore e l'altro negativo al test genetico con l'85% di DR, auspicabilmente migliorabile all'innalzamento della DR dei test genetici di I livello - Cap. 5.1.1). Qualora non fosse possibile raggiungere questo livello di rischio di coppia, è indicato eseguire indagini di II e III livello per ridurre il rischio riproduttivo residuo di coppia ai valori minimi ragionevolmente raggiungibili.

5.1.2.3 - Nel caso di frequenza del portatore e/o DR non noti, è indicato applicare direttamente indagini di II e III livello. In questo caso è indicato informare prima del test delle eventuali difficoltà/impossibilità di calcolare il rischio residuo presente anche dopo l'esecuzione del test e, qualora appropriato, riportare la problematica nel referto.

## 5.2 - Indagini di II livello

I test molecolari di II livello, anche detti metodi di scansione, indagano la sequenza di tutti gli esoni, delle zone introniche adiacenti gli esoni, delle regioni del promotore, del 3' non tradotto e delle regioni pienamente introniche sedi di varianti patogenetiche di splicing conosciute del gene CFTR. E' indicato che le indagini di II livello includano l'analisi del tratto polimorfico c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in nomenclatura HGVS), (TG)mTn (in nomenclatura tradizionale) e lo caratterizzino. L'uso di questi test permette di individuare un maggior numero di varianti patogenetiche, anche rare e non note, rispetto ai test di I livello. Questi test includono varianti patogenetiche puntiformi, piccole delezioni/inserzioni e, dipendentemente dalle piattaforme analitiche usate, anche macrodelezioni/macroduplicazioni. Esempi di queste tecniche sono: sequenziamento diretto mediante metodo Sanger e Next Generation Sequencing (NGS). L'indagine delle regioni indicate con questi metodi in genere raggiunge un valore di DR di circa il 95% (comprendendo anche le varianti patogenetiche incluse nelle indagini di I livello, ad eccezione delle macrodelezioni/macroduplicazioni indagabili per sequenziamento solo con alcune piattaforme analitiche). Questo livello di DR può ragionevolmente essere considerato valido anche per etnie diverse da quella italiana.

## 5.3 - Indagini di III livello

I test molecolari di III livello indagano grossi riarrangiamenti (macrodelezioni/macroduplicazioni) del gene CFTR, compresi quelli non evidenziabili ai test di I o di II livello (in questo secondo caso, ad eccezione di alcune piattaforme analitiche in NGS). E' indicato che venga indagato almeno ciascun esone del gene CFTR. Esempi di indagine di III livello sono: multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA), Real Time PCR e Comparative Genomic Hybridization array (aCGH). L'indagine delle regioni indicate con questi metodi in genere raggiunge un valore di DR di circa il 2% (comprendendo anche le macrodelezioni/macroduplicazioni eventualmente incluse nelle indagini di I e, dipendentemente dalle piattaforme analitiche, II livello). Quindi, l'applicazione congiunta di indagini di II e III livello raggiunge una DR di circa il 97% (comprendendo anche le varianti patogenetiche incluse nelle indagini di I livello).

Questo livello di DR totale può ragionevolmente essere considerato valido anche per etnie diverse da quella italiana.

#### 5.4 - Indagini di IV livello

I test molecolari di IV livello indagano varianti patogenetiche non conosciute che interferiscono con la funzione di splicing dell'mRNA del gene CFTR, come ad esempio varianti patogenetiche pienamente introniche. Un esempio di indagine di IV livello è la reverse transcriptase PCR (RT-PCR) ed il relativo sequenziamento del cDNA. L'applicazione congiunta d'indagini di II, III e IV livello raggiunge una DR di circa il 98% (comprendendo anche le varianti patogenetiche incluse nelle indagini di I livello). Questo livello di DR totale può ragionevolmente essere considerato valido anche per etnie diverse da quella italiana.

#### 5.5 - Indagini indirette

E' indicato che le indagini indirette vengano eseguite con marcatori microsatelliti Short Tandem Repeats (STR) e/o Single Nucleotide Polymorphism (SNP) intragenici (all'interno del gene CFTR). Come seconda scelta, le analisi indirette possono essere effettuate con marcatori a monte e/o a valle del gene CFTR, il più vicino possibile e comunque entro 1 Mb da questo, al fine ridurre risultati errati dovuti alla ricombinazione. In tutti i casi, è indicata l'analisi di diversi marcatori. Nel resto del documento, riferendosi alla modalità di indagine indiretta, si parlerà semplicemente di "marcatori".

#### 5.6 - Appropriatezza

Ricerca il maggior numero possibile di varianti non è sempre la soluzione migliore: talora l'identificazione di alcune di esse, pur ben note ma non sufficientemente caratterizzate dal punto di vista delle conseguenze cliniche, può implicare difficoltà interpretative. Pertanto, la scelta della strategia da adottare per eseguire l'analisi molecolare dipende dall'indicazione diagnostica.

Il responsabile del laboratorio è competente anche riguardo alla verifica dell'appropriatezza della richiesta. E' pertanto indicato che, a fronte di richieste difformi dal presente documento, il responsabile del laboratorio interagisca con la struttura richiedente affinché essa tenga conto del presente documento nella

scelta del test più appropriato. Qualora la struttura richiedente persista in richieste difformi dal presente documento, dovrà fornire al laboratorio accettante una dichiarazione di non conformità.

Per l'individuazione delle indagini erogabili in convenzione con il Servizio Sanitario Regionale (SSR) si rimanda alle norme e decreti legislativi delle singole Regioni, che sarebbe comunque auspicabile venissero armonizzati.

Per l'applicazione dei vari livelli di test a specifiche situazioni si vedano i paragrafi successivi.

Il laboratorio che esegue il test genetico, di qualunque livello, è tenuto a partecipare ad almeno un programma esterno di controllo di qualità specifico per FC.

#### 5.6.1 - Appropriatezza dell'analisi dei tratti (TG)mTn.

L'analisi dei tratti polimorfici c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in nomenclatura HGVS), (TG)mTn (in nomenclatura tradizionale), è indicata solo nell'ambito di un percorso diagnostico per CFTR-RD o per FC (come descritto di seguito e Fig. 1). In particolare NON è indicata in programmi di screening neonatale, di ricerca del portatore e di procreazione medicalmente assistita (PMA) (a meno che il partner maschile della coppia abbia CBAVD rientrando, quindi, in un percorso diagnostico per CFTR-RD).

5.6.1.1 - In un percorso diagnostico per CFTR-RD, è indicato eseguire la ricerca dei tratti polimorfici c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in nomenclatura HGVS), (TG)mTn (in nomenclatura tradizionale). E' auspicabile che ciò avvenga nell'ambito di un'indagine di II livello come punto d'ingresso delle indagini genetiche in CFTR-RD. Comunque, qualora fosse applicata un'indagine di I livello, è in questo caso indicato che essa includa l'analisi dei tratti polimorfici c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in nomenclatura HGVS), (TG)mTn (in nomenclatura tradizionale). E' auspicabile che il metodo applicato caratterizzi simultaneamente sia il tratto polimorfico c.1210-34TG[m] (in nomenclatura HGVS), (TG)m (in nomenclatura tradizionale) che il tratto polimorfico c.1210-12T[n] (in nomenclatura HGVS), Tn (in nomenclatura tradizionale), definendo univocamente la loro combinazione su entrambi gli alleli e, quindi, il genotipo c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]];[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in nomenclatura HGVS), (TG)mTn/(TG)mTn (in nomenclatura tradizionale). Comunque, qualora venga

evidenziato un tratto c.1210-12T[5] (in nomenclatura HGVS), T5 (in nomenclatura tradizionale) (o con un minor numero di ripetizioni delle T), è indicata la caratterizzazione del tratto polimorfico c.1210-34TG[m] (in nomenclatura HGVS), (TG)<sub>m</sub> (in nomenclatura tradizionale). In caso non venga evidenziato un tratto c.1210-12T[5] (in nomenclatura HGVS), T5 (in nomenclatura tradizionale) (o con un minor numero di ripetizioni delle T) non è necessario procedere all'analisi del tratto polimorfico c.1210-34TG[m] (in nomenclatura HGVS), (TG)<sub>m</sub> (in nomenclatura tradizionale). In base alla combinazione dei tratti polimorfici c.1210-34TG[m] (in nomenclatura HGVS), (TG)<sub>m</sub> (in nomenclatura tradizionale) e c.1210-12T[5] (in nomenclatura HGVS), T5 (in nomenclatura tradizionale) (o con un minor numero di ripetizioni delle T) rinvenuti (esempi, non esaustivi, sono: c.[1210-34TG[11];1210-12T[5]] (in nomenclatura HGVS), (TG)<sub>11</sub>T5 (in nomenclatura tradizionale), c.[1210-34TG[12];1210-12T[5]] (in nomenclatura HGVS), (TG)<sub>12</sub>T5 (in nomenclatura tradizionale), c.[1210-34TG[13];1210-12T[5]] (in nomenclatura HGVS), (TG)<sub>13</sub>T5 (in nomenclatura tradizionale)), è indicata la ricerca delle altre variazioni note che possono essere presenti in *cis* con i tratti rinvenuti (esempi, non esaustivi, sono: c.[350G>A;1210-34TG[12];1210-12T[5]] (in nomenclatura HGVS), [R117H;(TG)<sub>12</sub>T5] (in nomenclatura tradizionale); c.[14C>T;1210-34TG[11];1210-12T[5]] (in nomenclatura HGVS), [P5L;(TG)<sub>11</sub>T5] (in nomenclatura tradizionale); c.[1210-34TG[13];1210-12T[5];3705T>G] (in nomenclatura HGVS), [(TG)<sub>13</sub>T5;S1235R] (in nomenclatura tradizionale); c.[1210-34TG[11];1210-12T[5];1684G>A;3017C>A] (in nomenclatura HGVS), [(TG)<sub>11</sub>T5;V562I;A1006E] (in nomenclatura tradizionale); c.[227\_228insT;1210-34TG[12];1210-12T[5]] (in nomenclatura HGVS), [359insT;(TG)<sub>12</sub>T5] (in nomenclatura tradizionale); c.[1210-34TG[11];1210-12T[5];3535\_3536insTCAA] (in nomenclatura HGVS), [(TG)<sub>11</sub>T5;3667ins4] (in nomenclatura tradizionale)).

5.6.1.2 - In un percorso diagnostico per FC, è indicato eseguire la ricerca dei tratti polimorfici c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in nomenclatura HGVS), (TG)<sub>m</sub>T<sub>n</sub> (in nomenclatura tradizionale) nell'ambito delle indagini di II livello (qualora eseguite). Rimangono valide le rimanenti indicazioni già descritte per il percorso diagnostico per CFTR-RD (paragrafo 5.6.1.1).

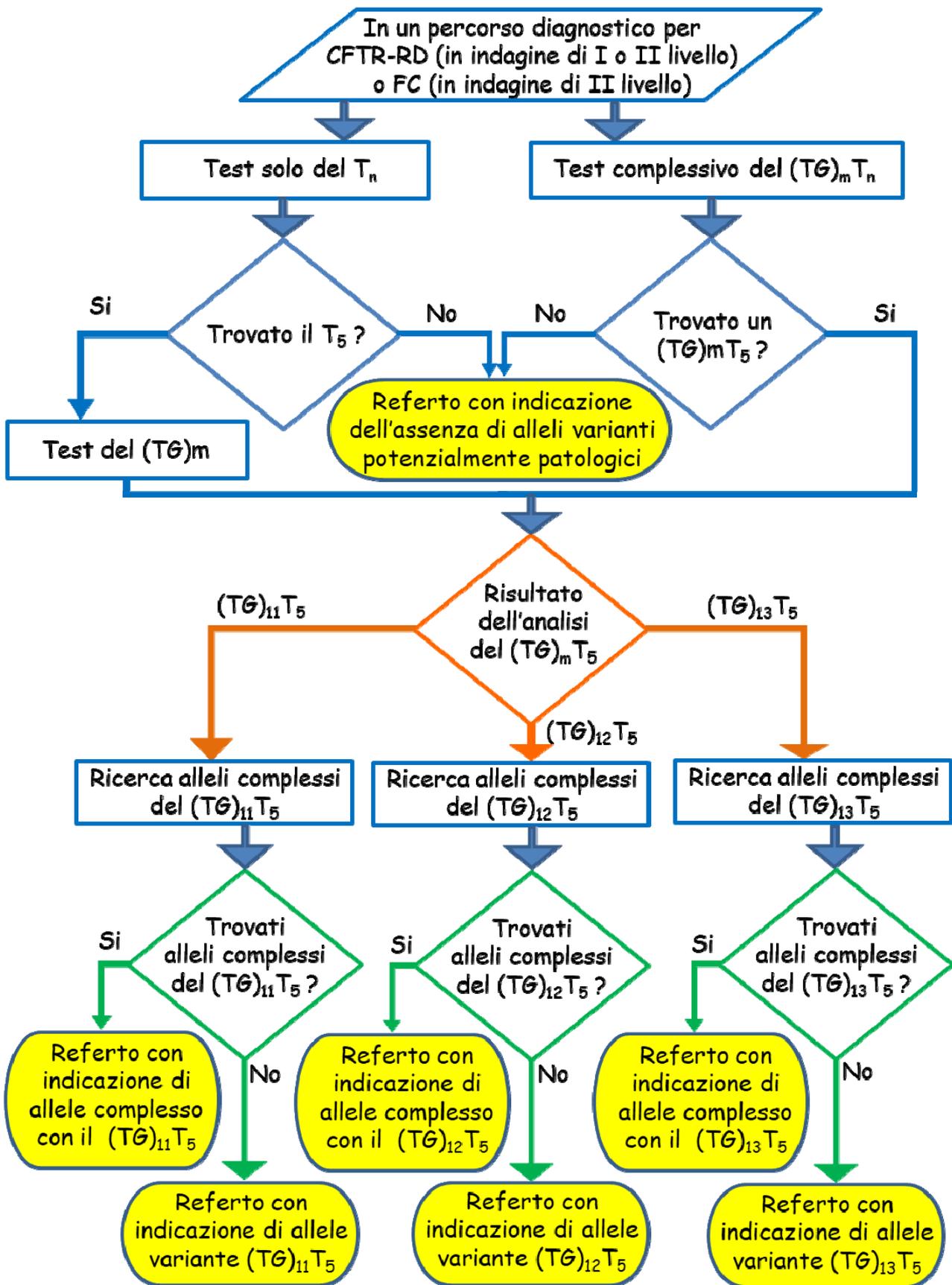


Figura 1 (Capitolo 5.6.1) - Diagramma di flusso per l'analisi dei tratti (TG)mTn.

## 5.6.2 - Appropriatelyzza delle indagini mutazionali nel gene CFTR in caso di infertilità e PMA.

Ad oggi nessun documento di consenso nell'ambito delle Società Europee di Genetica è stato formulato in merito a programmi di screening FC correlati in caso di infertilità di coppia, dal momento che l'essere portatore di una variante patogenetica del CFTR non da un rischio di infertilità significativamente più alto rispetto alla popolazione generale.

Tuttavia, appare pratica comune (suffragata da alcuni documenti riportati in bibliografia) nell'ambito di un percorso di procreazione medicalmente assistita (PMA) includere test di ricerca mutazionale per l'identificazione del portatore FC in tutte le coppie che intraprendono il suddetto percorso.

Tale percorso potrebbe portare ad un aumento dell'identificazione dei portatori nella popolazione generale nonché all'identificazione di CFTR-RD.

E' necessario distinguere i casi nei quali il partner maschile abbia CBAVD da quelli nei quali l'infertilità abbia cause diverse.

5.6.2.1 - Qualora nella coppia sia presente CBAVD, è indicato procedere ad indagini di II e III livello (ed eventualmente IV) a scopo diagnostico (vedere il capitolo Ricerca mutazionale nelle CFTR-RD) nel partner maschile, ed eventualmente alla ricerca del portatore nel partner femminile (vedere il capitolo Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un affetto con CFTR-RD).

5.6.2.2 - Qualora non sia presente CBAVD, la ricerca del portatore nella coppia infertile ricade nell'ambito della ricerca del portatore in coppie della popolazione generale, ed andrebbe limitata ad indagini di I livello (vedere il capitolo Coppie formate da due individui della popolazione generale, nel quale sono anche riportate le eccezioni alla limitazione ad indagini di I livello).

## 5.6.3 - Appropriatelyzza delle indagini di I livello.

Le indagini di I livello sono indicate per (per la trattazione estesa vedere i capitoli specifici):

- la caratterizzazione genetica d'individui con sospetta FC (punto d'ingresso dell'indagine genetica della FC)
- la caratterizzazione genetica nei programmi di screening neonatale

- l'iniziale caratterizzazione genetica dei genitori con gravidanze con anse intestinali fetali iperecogene
- la ricerca del portatore (carrier screening e carrier testing (sebbene in alcuni casi di carrier testing - come genitori o fratelli di affetto da FC con genotipo conosciuto - sia auspicabile cercare solo la variante patogenetica specifica)) e, in generale, la definizione del rischio genetico, anche finalizzati a procedure di PMA (qualora il partner maschile non abbia CBAVD).

E' auspicabile che le indagini di I livello NON siano utilizzate per:

- la caratterizzazione genetica d'individui con sospetta CFTR-RD, che andrebbero indirizzati direttamente alle indagini di II e III livello; comunque, qualora utilizzate con questa finalità, è indicato che includano l'analisi dei tratti polimorfici c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in nomenclatura HGVS), (TG)mTn (in nomenclatura tradizionale) (con le modalità descritte nel paragrafo 5.6.1).

E' consentito che il laboratorio possa offrire anche solo il test di I livello. Tuttavia, se il test viene eseguito a scopo diagnostico (sospetta FC, anche da screening neonatale), il laboratorio che esegue solo il test di I livello deve avere un laboratorio di riferimento che sia in grado di eseguire la ricerca mutazionale anche di II e III livello. In ogni caso, il laboratorio che esegue solo il I livello deve essere in grado di interpretare correttamente ciascuna variante patogenetica inclusa nel pannello usato. In particolare, varianti con interpretazione controversa non andrebbero inserite nei pannelli mutazionali di I livello. Qualora ciò fosse inevitabile, a causa dell'uso di pannelli commerciali che non rispettano questo requisito, il laboratorio deve essere in grado di commentare ed interpretare correttamente anche tali varianti (si porta ad esempio il tratto polimorfico c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in nomenclatura HGVS), (TG)mTn (in nomenclatura tradizionale) incluso in alcuni pannelli commerciali di I livello).

#### 5.6.4 - Appropriatezza delle indagini di II e III livello.

Le indagini di II e III livello sono indicate per:

- la caratterizzazione genetica d'individui con sospetta FC, per i quali rimanga almeno un allele senza varianti patogenetiche ("unknown") dal I livello

- la successiva caratterizzazione genetica del genitore negativo al test di I livello in una coppia con l'altro genitore portatore e gravidanza con anse intestinali fetali iperecogene (scelta soggetta a valutazione in consulenza genetica)
- la caratterizzazione genetica d'individui della popolazione generale partner di pazienti affetti da FC o da CFTR-RD. Primo caso (di due totali) nel quale, per la definizione del rischio genetico (in popolazione generale) è indicato procedere ad indagini di II e III livello)
- la caratterizzazione genetica d'individui della popolazione generale di etnie diverse da quella italiana, qualora verificate le condizioni precedentemente descritte (capitolo 5.1). Secondo caso (di due totali) nel quale, per la definizione del rischio genetico (in popolazione generale) è indicato procedere ad indagini di II e III livello.

E' auspicabile che le indagini di II e III livello siano utilizzate per:

- la caratterizzazione genetica d'individui con sospetta CFTR-RD, come punto d'ingresso dell'indagine genetica delle CFTR-RD.

Le indagini di II e III livello NON sono indicate per:

- la caratterizzazione genetica nei programmi di screening neonatale
- la ricerca del portatore e, in popolazione generale, la definizione del rischio genetico, in particolare finalizzati a procedure di PMA (qualora il partner maschile non abbia CBAVD; paragrafo 5.6.2); le due eccezioni contemplate sono i partner di pazienti affetti da FC (paragrafo 10.9) o CFTR-RD (paragrafo 10.10) e gli individui di popolazione generale di etnia diversa da quella italiana qualora verificate le condizioni precedentemente descritte (capitolo 5.1, in particolare paragrafi 5.1.2.2 e 5.1.2.3), nei quali i test di I livello darebbero risultati insoddisfacenti anche relativamente al rischio di coppia.

E' indicato che il laboratorio che esegue il test di II e III livello sia in grado di valutare e interpretare qualunque variante trovata (anche se nuova o non caratterizzata funzionalmente) mediante l'uso di letteratura, database e software correnti. E' auspicabile che il laboratorio che esegue il II e III livello abbia anche l'esperienza tecnica e culturale per la caratterizzazione sperimentale delle variazioni di sequenza non note o non caratterizzate dal punto di vista funzionale (vedere Cap. 9), nonché per la definizione dei punti di rottura (breakpoint) delle macrodelezioni/macroduplicazioni. Qualora così non fosse, il

laboratorio che esegue le indagini di II e III livello (senza possibilità di ulteriori caratterizzazioni) deve avere un laboratorio di riferimento che esegua tali caratterizzazioni. E' indicato che il laboratorio che non possa procedere alle necessarie caratterizzazioni funzionali lo dichiari esplicitamente nel referto.

#### 5.6.5 - Appropriatezza delle indagini di IV livello.

Le indagini di IV livello sono indicate per:

- la caratterizzazione genetica d'individui con sospetta FC o CFTR-RD, per i quali sia rimasto almeno un allele senza varianti patogenetiche individuate ("unknown") dai livelli precedenti di indagine (eventualmente con analisi del genitore con l'allele "unknown").

Le indagini di IV livello NON sono indicate per:

- la caratterizzazione genetica nei programmi di screening neonatale (neanche mediante eventuale analisi dei genitori).
- la ricerca del portatore e, in generale, la definizione del rischio genetico, in particolare finalizzati a procedure di PMA.

Il laboratorio che esegue il IV livello deve essere in grado di caratterizzare le eventuali anomalie evidenziate a livello di mRNA individuando la lesione molecolare causativa sul DNA.

Il laboratorio che esegue tutti i livelli d'indagine (I, II, III e IV) deve possedere tutti i requisiti elencati per ciascun livello. E' auspicabile che il laboratorio renda noto quali livelli d'indagine mette a disposizione dell'utente.

5.6.6 - Appropriatezza della ricerca di aplotipi con effetti fenotipici differenziati (comunemente chiamati "alleli complessi").

In tutti i casi nei quali venga individuata una variante patogenetica che è noto, dalla letteratura e database, poter essere presente anche in aplotipo (o "allele complesso"), cioè insieme ad altra/e variante/i in *cis* sullo stesso allele, è indicato ricercare anche le altre variazioni di sequenza potenzialmente presenti in *cis*. Esempi, non esaustivi, sono i seguenti: studio del tratto polimorfico c.1210-34TG[m] (in nomenclatura HGVS), (TG)<sub>m</sub> (in nomenclatura tradizionale) qualora si evidenzi un tratto c.1210-12T[5] (in nomenclatura HGVS), T5 (in nomenclatura tradizionale); studio del tratto polimorfico c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in

nomenclatura HGVS), (TG)mTn (in nomenclatura tradizionale) qualora si evidenzi la c.350G>A p.Arg117His (in nomenclatura HGVS), R117H (in nomenclatura tradizionale) e viceversa; ricerca della c.350G>T p.Arg117Leu (in nomenclatura HGVS), R117L (in nomenclatura tradizionale) qualora si evidenzi la c.2991G>C p.Leu997Phe (in nomenclatura HGVS), L997F (in nomenclatura tradizionale) e viceversa; ricerca di c.220C>T p.Arg74Trp (in nomenclatura HGVS), R74W (in nomenclatura tradizionale) e c.601G>A p.Val201Met (in nomenclatura HGVS), V201M (in nomenclatura tradizionale) e c.3808G>A p.Asp1270Asn (in nomenclatura HGVS), D1270N (in nomenclatura tradizionale) qualora se ne evidenzi preliminarmente una sola tra queste; ricerca di c.[1210-34TG[11];1210-12T[5]] (in nomenclatura HGVS), (TG)11T5 (in nomenclatura tradizionale) e c.1684G>A p.Val562Ile (in nomenclatura HGVS), V562I (in nomenclatura tradizionale) e c.3017C>A p.Ala1006Glu (in nomenclatura HGVS), A1006E (in nomenclatura tradizionale) qualora se ne evidenzi preliminarmente una sola tra queste.

#### 5.6.7 - Appropriatezza delle indagini indirette.

Le indagini indirette mediante analisi di linkage vanno limitate ai casi nei quali non sia possibile procedere all'indagine diretta delle varianti patogenetiche familiari. Sono pertanto appropriate solo nelle famiglie con anamnesi familiare positiva per FC in cui non siano state identificate una o entrambe le varianti patogenetiche del gene CFTR nell'affetto, anche nei casi d'indagine prenatale per conoscere la presenza o assenza di malattia FC nel feto.

## 6 - Analisi mutazionale del gene CFTR nella FC

Sebbene in molti casi la diagnosi di FC possa essere ricavata anche solo dal fenotipo clinico e/o dal valore del test del sudore, la ricerca delle varianti patogenetiche del gene CFTR è comunque sempre indicata. Ciò, oltre che per conferma diagnostica nei casi con chiara indicazione clinica e biochimica, anche quale elemento fondamentale della diagnosi nei casi in cui il test del sudore non abbia valori francamente positivi e/o le manifestazioni cliniche non siano particolarmente evidenti. L'indagine genetica rende anche possibile l'eventuale test del portatore e la diagnosi prenatale all'interno della famiglia del paziente. Determinare il genotipo del paziente serve inoltre a identificare i soggetti che

possono beneficiare di interventi terapeutici mirati essendo portatori di quelle varianti patogenetiche per le quali sono disponibili farmaci specifici.

Esiste una generale correlazione tra il genotipo del gene CFTR e alcune macro-categorie cliniche quali, ad esempio, FC e CFTR-RD. Tuttavia, il genotipo del gene CFTR non è in grado di predire accuratamente l'outcome individuale. Pertanto, evidenziando in maniera opportuna i limiti delle conoscenze attuali, è indicato che il genotipo del gene CFTR venga interpretato in senso diagnostico, soprattutto in relazione allo sviluppo di FC piuttosto che CFTR-RD. Tuttavia, non è indicato il suo uso per la predizione della prognosi al momento della diagnosi di FC o CFTR-RD.

È indicato che la ricerca delle varianti patogenetiche relative alla FC venga eseguita inizialmente mediante dei test di I livello. I sistemi commerciali non sempre comprendono l'intero pannello di varianti patogenetiche specifico della regione di provenienza del paziente, pertanto occorre affiancarli con test non commerciali per aumentare la DR dell'analisi. In genere questo consente di identificare il genotipo in buona parte dei pazienti.

Per la frazione di casi in cui, dopo il test di I livello, rimane ancora una variante patogenetica non identificata, o più raramente entrambe, si ricorre ai test di II, III ed eventualmente IV livello. Quando si effettuano test di II, III e IV livello è possibile riscontrare varianti molto rare o mai identificate in precedenza, per le quali è necessario fare una valutazione del significato clinico. Quando non si trovano informazioni sul significato patologico delle varianti attraverso la consultazione di database o letteratura internazionale, occorre ricorrere a criteri più o meno indiretti per predire il loro potenziale patogenetico. Questo aspetto è trattato nel Capitolo 9 (Caratterizzazione di varianti nuove, rare o non precedentemente caratterizzate dal punto di vista funzionale).

E' sempre indicato analizzare i genitori di affetti ai quali siano stati trovati due alleli mutati. Quest'analisi è finalizzata alla determinazione della fase delle varianti patogenetiche identificate, all'esclusione della presenza di alleli complessi, all'esclusione di false omozigosi dovute alla mancata identificazione di uno dei due alleli mutati, nonché all'esecuzione del testing a cascata del portatore della variante patogenetica specifica nell'appropriato ramo familiare. L'analisi dei genitori di affetti è sempre indicata anche qualora sia stato individuato un solo allele mutato. In questo caso l'analisi è finalizzata all'esecuzione del testing a

cascata del portatore dell'unica variante patogenetica rinvenuta nell'appropriato ramo familiare.

## **7 - Analisi mutazionale del gene CFTR nelle CFTR-RD**

È indicato che la diagnosi clinica di CBAVD, pancreatite idiopatica o bronchiectasie disseminate (eventualmente riconducibili a CFTR-RD come riportato in Definizioni) sia effettuata da Centri altamente specializzati (quali ad esempio i Centri di Riferimento Regionali per FC, i Servizi di Supporto e i Centri clinici specializzati nelle specifiche patologie). È tuttavia indicato che l'eventuale riconoscimento diagnostico di queste patologie come CFTR-RD sia effettuato solo dai Centri di Riferimento Regionali per FC e i Servizi di Supporto. A causa dell'eterogeneità delle presentazioni cliniche delle CFTR-RD, è indicato che la richiesta del test genetico per la ricerca delle varianti patogenetiche del gene CFTR sia ampiamente motivata e filtrata da specialisti e riporti la diagnosi clinica specifica. È auspicabile che la ricerca delle varianti patogenetiche relativa alle CFTR-RD venga effettuata iniziando dai test di II livello. Ciò perché il test di I livello può essere considerato esaustivo solo quando si evidenzia un genotipo eterozigote composto, il che, nelle CFTR-RD, accade raramente al I livello. Solitamente, il completamento del genotipo evidenzia varianti con conseguenze funzionali non gravi in eterozigosi composta con varianti con conseguenze funzionali più gravi (varianti patogenetiche causanti FC). È quindi auspicabile che la ricerca mutazionale nel gene CFTR effettuata a scopo di ausilio diagnostico delle CFTR-RD venga effettuata da laboratori in grado di eseguire le indagini di II e III livello. Comunque, qualora l'indagine venga iniziata con metodi di I livello, è indicato che essi comprendano l'analisi dei tratti polimorfici c.[1210-34TG[m];1210-12T[n]] (in nomenclatura HGVS), (TG)<sub>m</sub>T<sub>n</sub> (in nomenclatura tradizionale) (con le modalità descritte in 5.6.1).

Se al termine dell'analisi di II livello, il soggetto con sospetto diagnostico in esame risulta con uno o entrambi gli alleli senza varianti patogenetiche ("unknown"), sono indicate le analisi di III e, eventualmente, IV livello.

E' indicato che per i pazienti con manifestazioni cliniche sovrapponibili a quelle dei CFTR-RD, per i quali non siano state trovate varianti patogenetiche del gene CFTR in uno o entrambi gli alleli, vengano considerate anche altre ipotesi diagnostiche. E' in particolare indicata l'analisi mutazionale di altri geni, noti per

sostenere le specifiche manifestazioni cliniche. In questi casi, la ricerca mutazionale in altri geni può essere indicata, oltre che contemporaneamente a quella nel gene CFTR, anche prima dell'applicazione del III e IV livello al gene CFTR. Un esempio, non esaustivo, è quello della pancreatite idiopatica cronica o acuta ricorrente. Per questi pazienti, l'analisi mutazionale di un set di geni dell'attivazione del tripsinogeno (compresi SPINK1 e PRSS1, ma non limitati a essi) può essere indicata a seguito di un'indagine di II livello del gene CFTR non diagnostica.

Quando si effettuano analisi del gene CFTR di II, III e IV livello, non è raro riscontrare varianti nuove o molto rare per le quali è necessario fare una valutazione del significato clinico. Questo aspetto è trattato nel Capitolo 9 (Caratterizzazione di varianti nuove, rare o non precedentemente caratterizzate dal punto di vista funzionale).

## **8 - Analisi mutazionale nella diagnosi genetica preimpianto**

La diagnosi genetica pre-impianto ("preimplantation genetic testing", PGT) per malattie monogeniche (PGT-M) costituisce una pratica consolidata e oggi possibile, anche in Italia, per le coppie fertili a rischio per malattie genetiche quali la FC.

Le tecniche di PGT-M consentono di analizzare *in vitro* l'assetto genetico di embrioni ottenuti da un ciclo di "in vitro fertilization and embryo transfer/intracytoplasmic sperm injection" (FIVET/ICSI) prima del loro trasferimento in utero. La diagnosi viene effettuata in genere su una decina di cellule del trofoectoderma prelevate dalla blastocisti. Durante l'analisi genetica gli embrioni rimangono crioconservati e, una volta stabilito quali sono affetti e quali no, questi ultimi vengono scongelati e trasferiti in utero.

Il flusso operativo del percorso di diagnosi preimpianto è preceduto da una fase di fattibilità alla PGT-M, in cui la coppia di portatori che decide di accedere a tecniche di PGT deve inizialmente essere sottoposta a consulenza multi-specialistica, che includa almeno un genetista e un ginecologo di comprovata esperienza, nella quale verrà spiegato il percorso più opportuno al fine di ottimizzare le possibilità di gravidanza a termine di un bambino non affetto da FC. Il Ginecologo, mediante opportune visite ed esami, dovrà stabilire l'idoneità della coppia alla PMA. In questa fase sarà eseguito un prelievo di sangue alla

coppia per verificare la fattibilità dell'analisi genetica: diretta (ricerca delle varianti patogenetiche dei genitori, qualora note) e indiretta (analisi dei marcatori del gene CFTR, utile anche qualora i genitori siano portatori obbligati con una o entrambe le varianti patogenetiche non individuate) per la valutazione dei marcatori informativi (che siano marcatori univoci di 2 alleli diversi) e al loro uso nella ricostruzione del linkage familiare. È indicato includere la coppia in un percorso PGT-M se la diagnosi è fattibile e l'affidabilità della tecnica è elevata. La percentuale di errore della tecnica diagnostica della maggior parte dei Centri di PGT internazionali si attesta intorno all'1% e a tale valore massimo dovrebbero tendere i Centri che intendono lavorare con standard qualitativi elevati. È indicato includere in un percorso PGT-M coppie con infertilità solo se le tecniche di PMA possono superare l'ostacolo riproduttivo. È indicato escludere la coppia da un percorso PGT-M se la diagnosi non è fattibile con le tecnologie disponibili oppure se le percentuali di sensibilità e specificità analitica della tecnica non siano superiori al 99%.

E' indispensabile che l'intero iter diagnostico sia preso in carico nell'ambito di un percorso assistenziale appropriato e altamente specialistico, inclusa un'adeguata informazione circa possibilità e limiti della PGT-M.

Le tecniche PGT-M sono da riservarsi a coppie portatrici di varianti patogenetiche causanti FC. In accordo con un atteggiamento prevalente nella letteratura scientifica e nella pratica diagnostica, nel caso in cui i genitori risultino portatori di varianti del gene CFTR il cui significato clinico sia non noto o incompatibile con una diagnosi di FC, non è indicato ricorrere a PGT-M.

## **9 - Caratterizzazione di varianti nuove, rare o non precedentemente caratterizzate dal punto di vista funzionale**

Il sequenziamento e l'analisi delle copy number variation (CNV) aumenta la DR dell'analisi molecolare garantendo una maggiore sensibilità diagnostica ma, spesso, identifica nuove (o rare) varianti per le quali può essere difficile stabilire l'effetto patogenetico. Quindi, in diversi Centri si preferisce analizzare pannelli estesi di varianti patogenetiche a effetto ben definito (oggi offerti a costi contenuti dalle nuove tecnologie NGS) ottenendo un buon compromesso tra DR e rischio di non poter definire l'effetto di una variante.

Non esistono linee guida univoche su come definire il carattere patogenetico di una variante. Un punto cruciale è la refertazione. E' indicato che, qualora siano trovati polimorfismi e varianti sicuramente non patologici per FC (in accordo con le migliori conoscenze del momento), questi non vengano riportati nel referto. E' indicato che le varianti sicuramente patogenetiche per FC, compatibili con CFTR-RD o ad effetto variabile o non definito, vengano riportate nel referto. Ovviamente, per ciascuna variante identificata è importante chiarire (anche con riferimenti bibliografici) se si tratta di varianti: a) sicuramente causative di FC; b) compatibili con CFTR-RD; c) ad effetto variabile; d) ad effetto non definito.

Nella valutazione delle varianti, il primo punto importante è quello di considerare il genotipo nel suo insieme, ossia se la variante è stata riscontrata da sola o in eterozigosi con altre alterazioni genetiche. In questo caso, trattandosi di varianti poco o per nulla conosciute, è molto importante, se possibile, studiarne la segregazione nella famiglia per determinarne la fase, per escludere che si tratti di un allele complesso. Se la variante nuova è presente in *trans* con una variante sicuramente patogenetica, in un individuo adulto privo di sintomi, è estremamente probabile che la variante non abbia effetto patogenetico. Viceversa, nel caso in cui la variante sia presente in eterozigosi composta con una variante patogenetica causante FC (o CFTR-RD), la forma clinica nella quale viene trovata può aiutare a definirne il possibile ruolo.

Il secondo aspetto è la tipologia della variante: è ragionevole supporre che la variante sia patogenetica se introduce un codone di stop prematuramente (variante patogenetica *nonsense*), crea uno slittamento del registro lettura (variante patogenetica *frameshift*), interessa le posizioni canoniche dello splicing (siti di splicing  $\pm 1$  o  $\pm 2$ ) o se si tratta di un riarrangiamento genico (ad esempio macro-delezioni o macro-duplicazioni), poiché tutte queste alterazioni colpiscono gravemente sintesi e/o funzione della proteina. Viceversa, è difficile definire l'effetto di varianti missenso o introniche più lontane dalla giunzione.

Ulteriore passo è quello di valutare la frequenza della variante in un congruo numero di alleli di soggetti non affetti. Se la variante è presente con una frequenza elevata nella popolazione generale la probabilità che sia patogenetica per FC si riduce. Occorre però tener presente che per escludere che una variante possa causare CFTR-RD, la frequenza è superiore rispetto a quella che si userebbe per la FC. Occorre inoltre tenere presente che un altro dato che può far individuare una variante come possibile causa di CFTR-RD, è la sua frequenza

aumentata, rispetto alla popolazione generale, tra i pazienti con una particolare sintomatologia. Ovviamente questo studio è costoso e pochi laboratori dispongono di banche di campioni biologici. Tra l'altro, i soggetti sani dovrebbero appartenere alla stessa etnia del paziente in cui si è riscontrata la nuova variante, e ciò, nei paesi in cui la globalizzazione ha prodotto una popolazione multietnica è complicato. In alternativa, sono disponibili banche dati nelle quali sono riportate le sequenze di migliaia di soggetti nelle quali si può verificare la frequenza della variante (vedere il capitolo Database e website) nella popolazione generale.

Un altro approccio è rappresentato dall'analisi di predizione, o *in silico*, attraverso tools bioinformatici che calcolano il rischio che la variante sia patogenetica effettuando varie valutazioni: frequenza con cui l'aminoacido o il nucleotide è conservato tra le specie o in proteine a sequenza simile al CFTR nell'uomo (più è conservato, più è probabile che una variante che lo coinvolga sia patogenetica); predizioni su modelli molecolari valutando l'effetto della variante a seconda del tratto di proteina dove si situa l'aminoacido coinvolto o a seconda della regione intronica in cui è localizzata la variante per le varianti patogenetiche di *splicing* (le varianti patogenetiche che interessano le posizioni fondamentali dello *splicing* -1, -2, +1, +2 possono essere considerate causanti FC; anche per le varianti che interessano le posizioni +3, +5 e -8, la probabilità di un effetto patologico per alterato *splicing* è molto elevata, anche se non certa). L'affidabilità dell'analisi *in silico* cresce se più programmi, basati su un diverso tipo di algoritmo, sono concordi tra loro. Questi programmi, tuttavia, non sono di facile gestione, richiedendo spesso la figura professionale del bioinformatico. E' da considerare che questa professionalità può essere disponibile solo nei centri di riferimento. Comunque, la predizione *in silico* da sola non è sufficiente ad assegnare un ruolo funzionale certo a una nuova variante.

Ultimo punto è lo studio sperimentale degli effetti di una variante mediante sistemi *in vitro* o *ex vivo*. Si tratta di studi complessi, costosi, e alla portata di pochi laboratori. In particolare, per le varianti che potenzialmente alterano lo *splicing*, è possibile esprimere la variante *in vitro* in sistemi cellulari, e mediante la tecnica del minigene saggiarne l'effetto sul processo di *splicing*. In alternativa, disponendo di sistemi cellulari *ex vivo* (ottenibili in modo non invasivo dal paziente portatore di quella specifica variante), è possibile ottenere l'RNA dalle cellule, retrotrascrivere l'RNA in cDNA e quindi, mediante elettroforesi e

sequenziamento verificare eventuali anomalie del trascritto, come, ad esempio, ritenzione di eventuali sequenze introniche oppure perdita di esoni o parte di essi. Tra i diversi modelli *ex vivo* disponibili vi sono le cellule di epitelio bronchiale, oppure le cellule di epitelio nasale. Oltre a valutare l'effetto di *splicing*, è possibile studiare l'effetto di varianti patogenetiche di tipo missenso sulla localizzazione della proteina, attraverso l'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati e microscopia confocale, o ancora misurare l'attività di gating del CFTR per stabilire se una variante causi una riduzione dell'attività del canale.

In conclusione, oltre alle banche dati già esistenti ed in continuo aggiornamento che contengono informazioni soprattutto riguardo a varianti patogenetiche frequenti, un possibile contributo sarebbe quello di organizzare dei repository (magari gestiti da Società Scientifiche, meglio se sovranazionali) in cui vengano costantemente depositati i dati clinici di pazienti che portano una variante sicuramente patogenetica ed una variante rara, ad effetto non definito. Se si riesce a raggiungere un sufficiente numero di casi con lo stesso fenotipo (ad esempio FC, CFTR-RD o patologia assente) questo potrebbe essere un criterio fortemente indicativo sulla natura della variante, a disposizione di tutti i Centri.

È anche stato recentemente proposto un approccio standardizzato e integrato che, prendendo in considerazione tutti gli aspetti fin qui esposti, fornisce un punteggio relativo alla patogenicità delle varianti del DNA. Approcci che, in maniera standardizzata ed integrata, prendono in considerazione tutte le informazioni relative ad una variante per definirne la probabilità di patogenicità saranno presumibilmente sempre più utilizzati.

## **10 - Strategie specifiche di analisi mutazionale**

### **10.1 - Screening neonatale**

Lo screening neonatale per FC è una pratica di politica sanitaria che si propone di identificare entro i due mesi di vita i nuovi nati affetti da FC e che si compone di un sistema di analisi a più livelli (step) volti ad individuare una popolazione di neonati con aumentata probabilità di malattia da sottoporre all'iter diagnostico. Il primo step consiste nel dosaggio su cartoncino di Guthrie di un enzima pancreatico, il tripsinogeno immunoreattivo (IRT), che risulta elevato nei

neonati affetti. Pur nell'ambito di una certa variabilità legata al cut-off prescelto, la sensibilità diagnostica dell'IRT è complessivamente buona. Lo è molto meno la specificità diagnostica, anche con cut-off elevati, per cui i neonati con ipertripsinogenemia vengono indagati con un ulteriore step. Questa seconda fase può far uso di un nuovo dosaggio dell'IRT su un campione raccolto a distanza di qualche settimana dalla nascita, o della ricerca di varianti patogenetiche del gene CFTR nel campione originariamente prelevato, od anche del dosaggio sullo stesso campione della pancreatitis associated protein (PAP). Spesso queste opzioni sono utilizzate in associazione, con combinazioni diverse che rendono molto eterogenee le strategie di screening neonatale. Il neonato che risulti positivo anche a questa seconda fase di accertamenti viene richiamato e indirizzato alla fase diagnostica presso i Centri di Riferimento Regionali FC e i Servizi di Supporto sottoponendolo al test del sudore, valutazione clinica ed eventuale test/approfondimento genetico per una conferma o una smentita diagnostica definitiva.

L'integrazione dell'analisi di varianti patogenetiche nei protocolli di screening neonatale permette un miglioramento della sensibilità diagnostica complessiva del sistema ed una maggior precocità di diagnosi.

L'utilizzo dell'analisi genetica nel contesto dello screening neonatale implica però anche alcune ricadute dalle conseguenze problematiche.

La prima è l'individuazione di neonati con IRT positivo, una variante patogenetica e test del sudore negativo, che vengono pertanto identificati come portatori. Questi neonati sono rappresentati tra gli IRT positivi con una frequenza significativamente superiore rispetto a quella attesa nella popolazione generale.

La seconda è l'identificazione di neonati positivi allo screening neonatale per FC con diagnosi non conclusiva (CFSPID o, con stesso significato, CFTR related metabolic syndromes (CRMS)) (vedere Definizioni). C'è a tutt'oggi poca chiarezza sulla possibile evoluzione di queste forme: è ragionevole ipotizzare un coinvolgimento clinico modesto, ma alcuni di questi bambini nel tempo sviluppano sintomi compatibili con una diagnosi di FC.

Lo screening neonatale ha l'obiettivo di identificare precocemente i nuovi casi di FC, ma non condizioni ambigue. E' indicato, quindi, analizzare nel secondo step dello screening neonatale solamente varianti chiaramente patogenetiche per FC. A questo scopo è indicato utilizzare test genetici di I livello, e riservare

eventuali approfondimenti con test genetici di livello superiore a casi mirati e solo nell'ambito della successiva fase diagnostica.

## 10.2 - Diagnosi prenatale

In FC la diagnosi prenatale va intesa come l'analisi molecolare su materiale fetale quando entrambi i genitori siano portatori di una variante patogenetica. Queste coppie hanno un rischio a priori di 1/4 (25%) di concepire un figlio affetto da FC.

L'individuazione di una coppia di portatori può derivare dall'analisi genetica di familiari di affetti, familiari di portatori o anche di individui della popolazione generale, oppure può far seguito alla nascita di un figlio malato. Nella coppia di portatori possono essere note entrambe le varianti patogenetiche dei membri della coppia, oppure può trattarsi di portatori obbligati con una o entrambe le varianti patogenetiche non individuate (Fig. 2).

10.2.1 - Nella coppia di portatori con entrambe le varianti patogenetiche note si procede alla ricerca delle varianti patogenetiche specifiche (analisi diretta). Quest'analisi è da considerarsi quella di prima scelta e, di conseguenza, ogni sforzo deve essere fatto per cercare di individuare le varianti patogenetiche dei genitori.

10.2.2 - Nel caso in cui i genitori siano portatori obbligati con una o entrambe le varianti patogenetiche non individuate si procede alla selezione di marcatori del gene CFTR, valutazione dei marcatori informativi (che siano marcatori univoci di 2 alleli diversi) e al loro uso nella ricostruzione del linkage familiare (analisi indiretta).

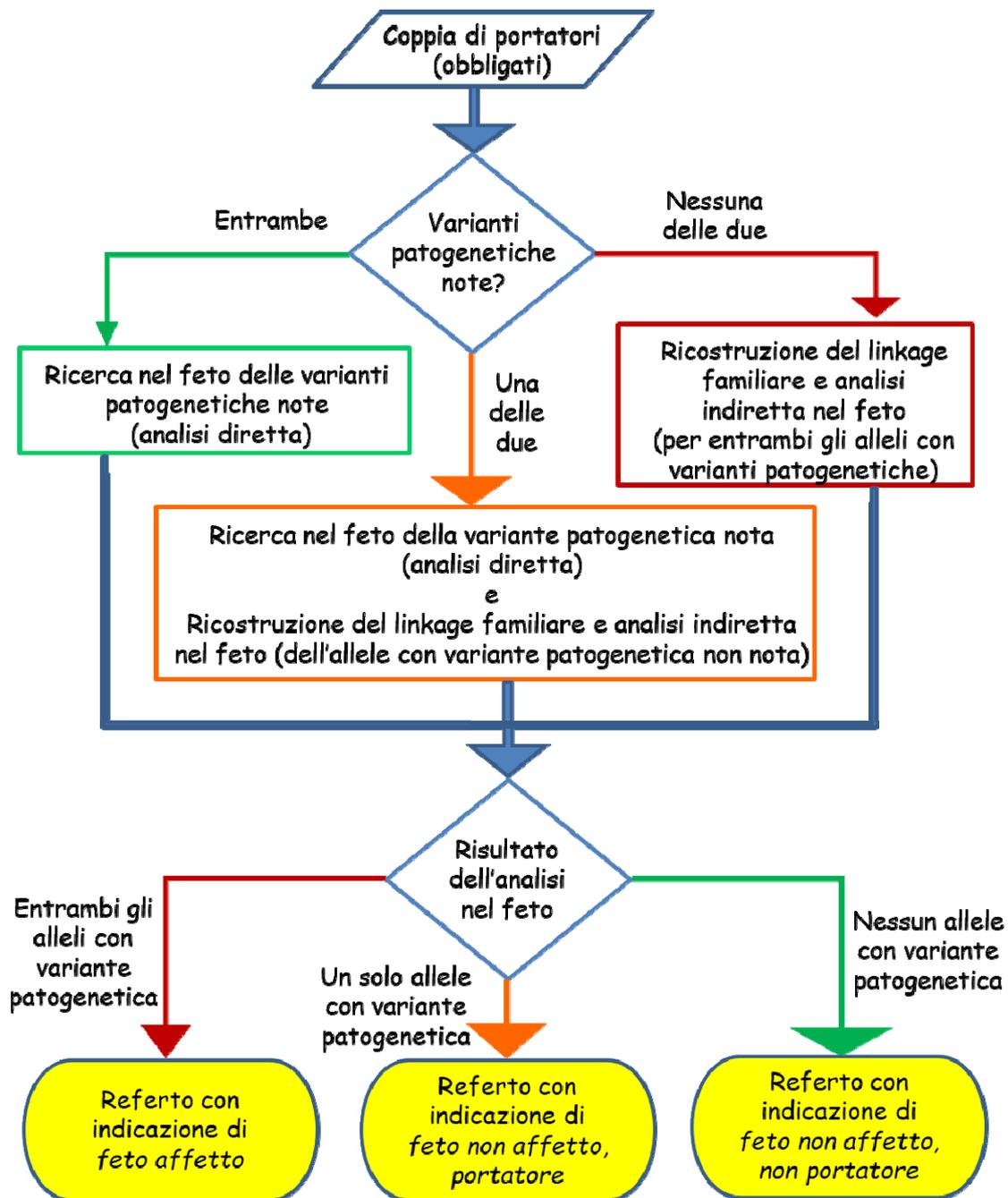
Per evitare errori diagnostici, in diagnosi prenatale è sempre necessario analizzare la possibile contaminazione da tessuto materno mediante comparazione del DNA fetale e materno.

Sia nel caso di analisi diretta che indiretta, la presenza di entrambi gli alleli mutati dei genitori (individuati dalle varianti patogenetiche nel caso dell'analisi diretta e/o dai marcatori nel caso dell'analisi indiretta) individua un feto con un assetto genetico compatibile con lo sviluppo della FC. La presenza di uno solo o entrambi gli alleli wild type esclude ragionevolmente la possibilità di sviluppo della malattia. Nel caso di analisi indiretta per una o entrambe le varianti patogenetiche, anche con sistemi a più marcatori, è da tenere in considerazione

che non potendo essere escluse ricombinazioni, il risultato è probabilistico, sebbene ai fini pratici la correzione del rischio finale risulti trascurabile.

La diagnosi prenatale secondo la definizione qui adottata si differenzia nettamente dalla pratica del testing fetale, vale a dire l'analisi molecolare eseguita su materiale fetale, in assenza d'indicazione specifica. Tale attività diagnostica generalmente riguarda donne che si sottopongono alla determinazione del cariotipo fetale. Queste donne non hanno un rischio aumentato per FC rispetto alla popolazione generale, pertanto il test per FC sul feto viene offerto "in accompagnamento" al cariotipo. Tale pratica non è indicata e andrebbe eventualmente sostituita con indagini di I livello prima della gravidanza, nell'ambito, ove possibile, di un programma di ricerca del portatore nella popolazione generale.

E' indicato offrire la diagnosi prenatale a coppie portatrici di varianti patogenetiche. In accordo con un atteggiamento prevalente nella letteratura scientifica e nella pratica diagnostica, nel caso in cui i genitori risultino portatori di varianti del gene CFTR il cui significato clinico sia non noto o non causa di FC non è indicato ricorrere alla diagnosi prenatale.



**Figura 2 (Capitolo 10.2) - Diagramma di flusso per la diagnosi prenatale.** Nel caso di analisi indiretta per una o entrambe le varianti patogenetiche, anche con sistemi a più marcatori, è da tenere in considerazione che non potendo essere escluse ricombinazioni, il risultato è probabilistico, sebbene ai fini pratici la correzione del rischio finale risulti trascurabile.

### 10.3 - Ricerca del portatore (individuale)

Per test del portatore individuale di FC si intende un'analisi genetica, su base molecolare, eseguita su un singolo individuo, previo consenso informato, mirata a definirne lo stato di eterozigosi o, in caso di negatività all'analisi genetica, la probabilità residua di eterozigosi.

I portatori di varianti patogenetiche a carico del gene CFTR sono del tutto asintomatici e in gran parte identificabili mediante indagini molecolari correntemente disponibili.

Non è indicato eseguire il test del portatore su minori salvo casi particolari.

Nella ricerca del portatore (individuale) si distinguono due situazioni, a seconda che la probabilità a priori di eterozigosi sia superiore o uguale rispetto alla popolazione generale.

10.3.1 - Nel caso di probabilità a priori aumentata rispetto alla popolazione generale, il test del portatore (individuale) trova la sua principale applicazione nello studio dei familiari di un malato o di un eterozigote. Per una valutazione esaustiva del rischio di eterozigosi in presenza di familiarità, è essenziale conoscere la variante patogenetica, del malato o del portatore, che interessa il ramo familiare a cui appartiene il probando.

10.3.1.1 - Se la variante patogenetica familiare è nota (Fig. 3) si procede alla sua ricerca diretta. Se non è presente nel familiare che richiede l'analisi, la probabilità di eterozigosi a posteriori è inferiore a quella della popolazione generale. In caso di negatività alla variante patogenetica familiare è indicata l'applicazione di un test di I livello, salvo casi specifici (ad esempio genitori, fratelli e sorelle di affetto con entrambe le varianti patogenetiche identificate per i quali ci si può limitare alla ricerca delle varianti patogenetiche specifiche). In caso di negatività al test di I livello la probabilità di eterozigosi a posteriori è inferiore alla probabilità di eterozigosi a priori, dipendentemente dalla DR del test di I livello e dalla concomitante assenza della variante patogenetica familiare (per il calcolo dei rischi si può fare riferimento alla Tabella 3 (Capitolo 10.3.2), tenendo comunque in considerazione che, considerata la negatività anche della variante patogenetica specifica del ramo familiare, i rischi saranno inferiori a quelli riportati in tabella).

10.3.1.2 - Se la variante patogenetica familiare non è nota (Fig. 4, Tab. 1 e Tab. 2), è opportuno distinguere tra la situazione in cui non sia nota per

l'impossibilità di effettuare test genetici approfonditi nell'affetto o nei genitori, oppure perché, pur avendo effettuato test genetici approfonditi nell'affetto o nei genitori, non sia stato possibile individuare la variante patogenetica.

10.3.1.2.1 - Se i test approfonditi su affetto o genitori non sono stati eseguiti e non sono eseguibili, è opportuno procedere al test di I livello nel familiare. In caso di negatività del test di I livello, in alcuni casi (da definire in consulenza genetica) può essere indicato procedere a test più approfonditi. In caso di negatività del test applicato, la probabilità di eterozigosi a posteriori è definita dalla probabilità di eterozigosi a priori diminuita in relazione alla DR del test applicato.

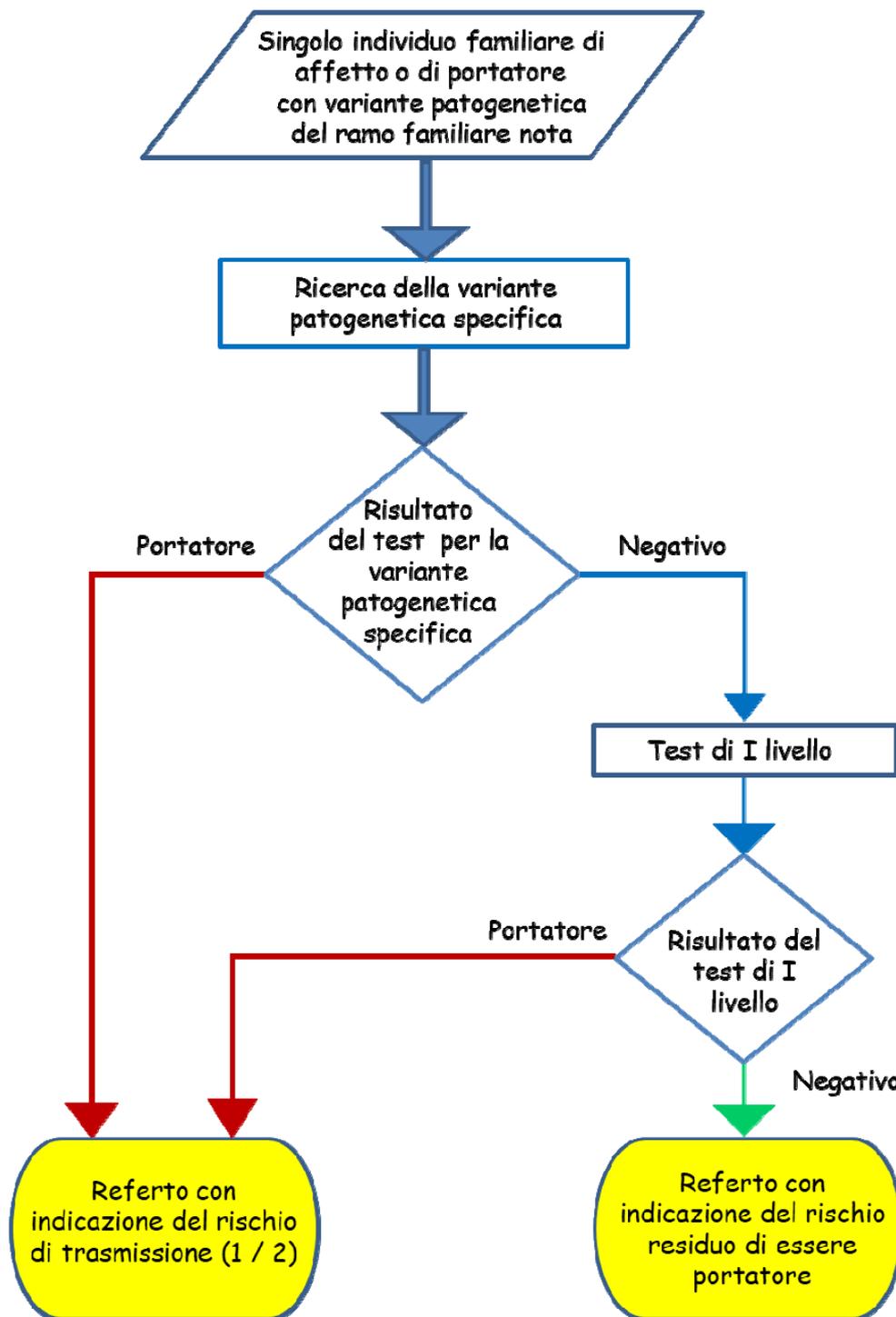
10.3.1.2.2 - Se i test approfonditi su affetto o genitori sono stati eseguiti e sono risultati negativi, è opportuno procedere al test di I livello nel familiare, salvo casi specifici (ad esempio genitori, fratelli e sorelle di affetto al quale il test approfondito sia già stato eseguito e sia risultato negativo). In caso di negatività del test di I livello, in alcuni casi (da definire in consulenza genetica) può essere indicato procedere a test di livello superiore rispetto a quelli già applicati all'affetto o ai genitori. In caso di negatività del test applicato, la probabilità di eterozigosi a posteriori è definita dalla probabilità di eterozigosi a priori diminuita in relazione alla DR del test applicato, tenendo tuttavia in considerazione a quali test approfonditi era stata ottenuta la precedente negatività nell'affetto o genitori.

L'offerta del test del portatore ai familiari di un malato (o di un portatore) per la ricerca delle(a) varianti(e) patogenetiche(a) specifiche(a) della famiglia (carrier testing), è da ritenersi una buona pratica clinica da applicarsi a cascata fino al primo familiare non portatore. Qualora non fosse possibile procedere con metodo a cascata, è indicato applicare il test del portatore ai membri della famiglia che, in relazione al caso indice, hanno un rischio a priori superiore a quello della popolazione generale (ad esempio, in famiglie con origine etnica italiana, ai membri con rischio a priori di 1/16, in quanto il successivo grado di parentela avrebbe un rischio a priori inferiore alla popolazione generale).

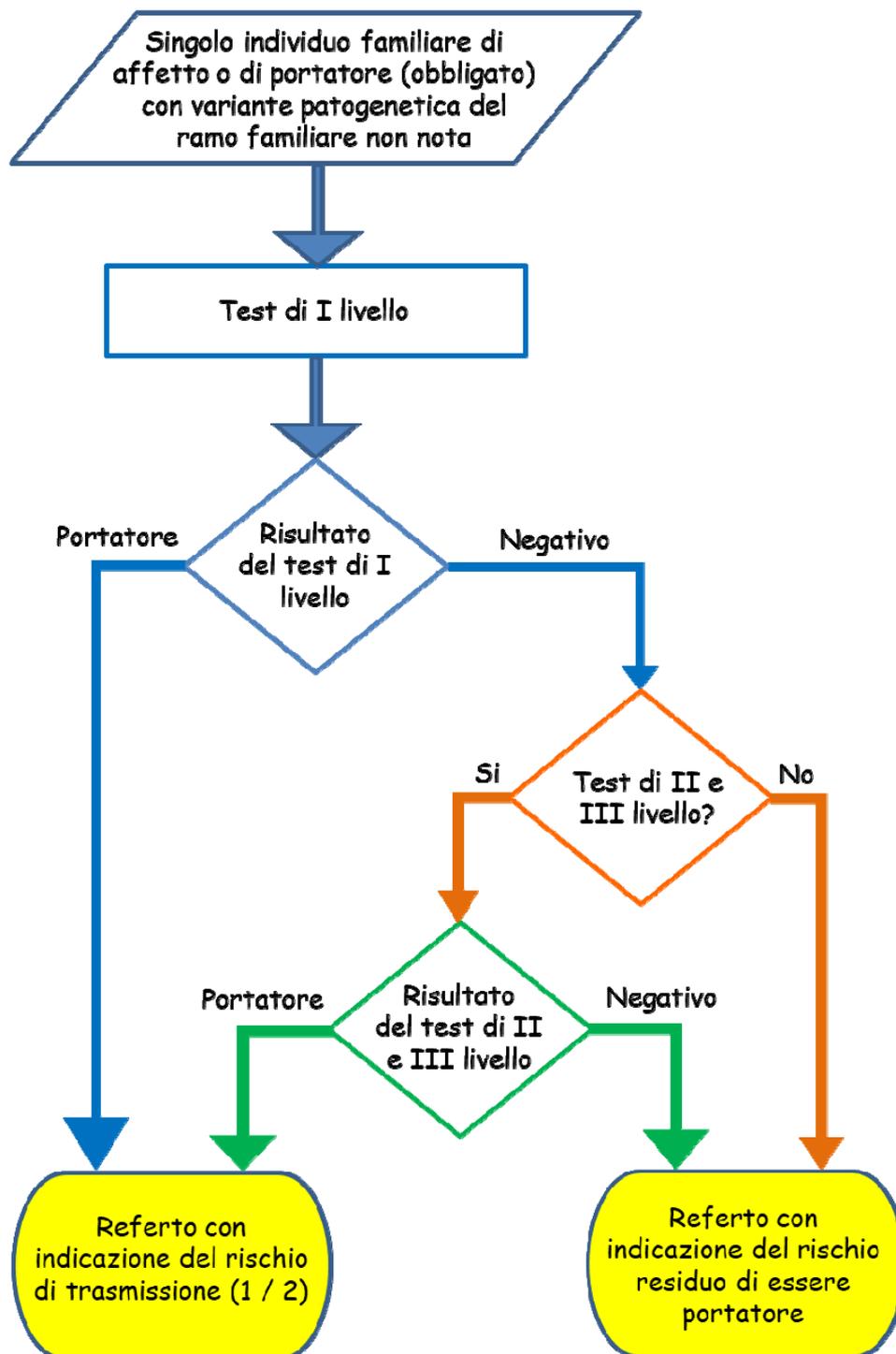
10.3.2 - Nel caso di probabilità di eterozigosi uguale alla popolazione generale (Fig. 5 e Tab. 3), il test del portatore (individuale) è rappresentato dall'applicazione di un pannello di varianti patogenetiche (analisi molecolare di I livello). In caso di negatività, la probabilità di eterozigosi a posteriori (rischio residuo) è definita dalla probabilità di eterozigosi a priori diminuita in relazione

alla DR del test applicato nella popolazione specifica. Per i requisiti di DR ed applicabilità dei test di I livello appropriati alla popolazione italiana, nonché delle eccezioni relative all'applicazione di test di II e III livello ad etnie diverse da quella italiana, vedere il capitolo 5.1.

I casi di test del portatore applicato ad individui della popolazione generale partner di portatore, affetto FC, affetto CFTR-RD o familiare di affetto (con variante patogenetica identificata o non identificata), sono descritti nei rispettivi capitoli (seguenti) relativi alle coppie.



**Figura 3 (Capitolo 10.3.1.1) - Diagramma di flusso per la ricerca del portatore in singolo individuo familiare di affetto o di portatore con variante patogenetica del ramo familiare nota.** Per i rischi residui in caso di doppia negatività del test genetico (sia per la variante patogenetica specifica del ramo familiare sia al test di I livello, ramo di destra del diagramma di flusso) si può fare riferimento alla Tabella 3 (Capitolo 10.3.2), tenendo comunque in considerazione che, considerata la negatività anche della variante patogenetica specifica del ramo familiare, i rischi saranno inferiori a quelli riportati in tabella.



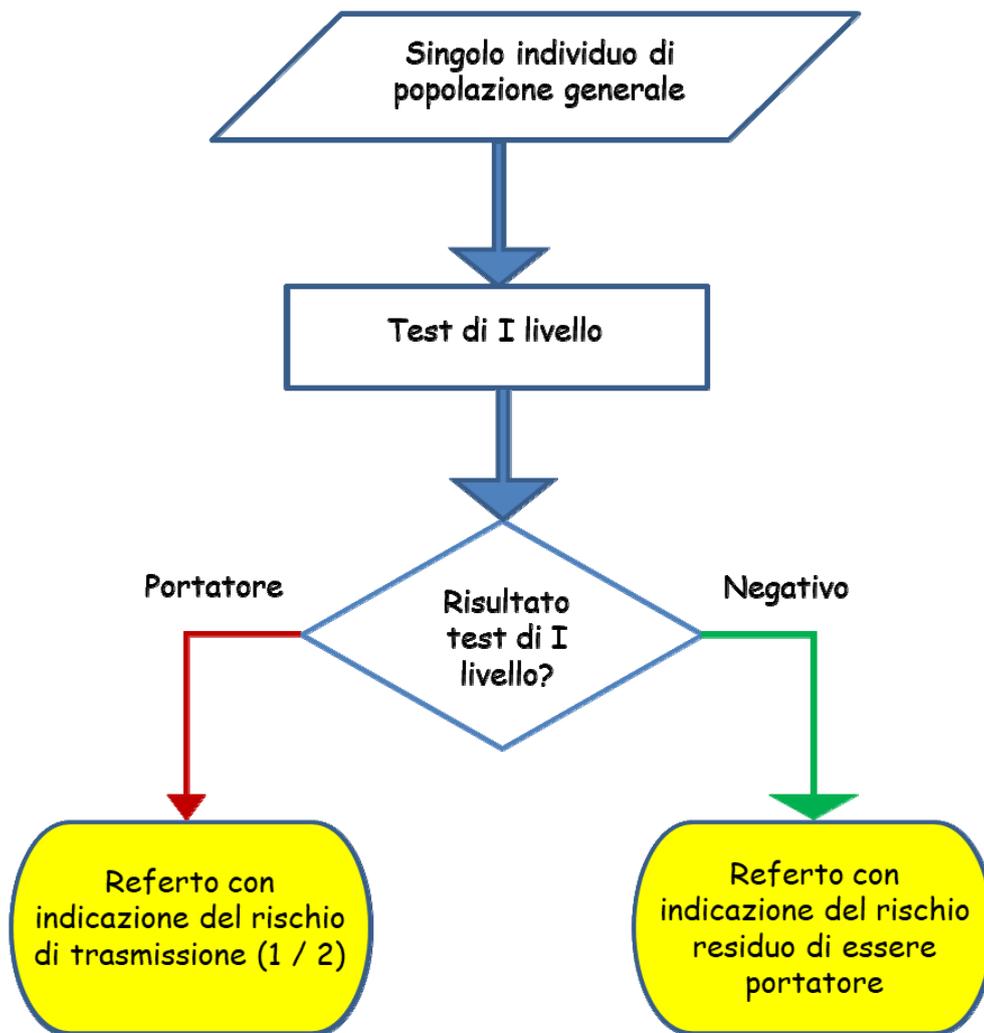
**Figura 4 (Capitolo 10.3.1.2) - Diagramma di flusso per la ricerca del portatore in singolo individuo familiare di affetto o di portatore (obbligato) con variante patogenetica del ramo familiare non nota.** Si rimanda al testo per i casi specifici di genitori, fratelli o sorelle di affetto e per la distinzione tra la situazione in cui la variante patogenetica familiare non sia nota per l'impossibilità di effettuare test genetici approfonditi nell'affetto o nei genitori, oppure perché, pur avendo effettuato test genetici approfonditi nell'affetto o nei genitori, non sia stato possibile individuare la variante patogenetica.

**Tabella 1 (Capitolo 10.3.1.2) – Rischi relativi alla ricerca del portatore in singolo individuo familiare di affetto con variante patogenetica del ramo familiare non nota.** Il rischio a priori di eterozigosi nel familiare di affetto da FC, in relazione alla parentela, è riportato in tabella.

	<b>Fratello di affetto FC</b> (rischio a priori 2 / 3) negativo al test genetico	<b>Zio / Nonno di affetto FC</b> (rischio a priori 1 / 2) negativo al test genetico	<b>Cugino di 1° di affetto FC</b> (rischio a priori 1 / 4) negativo al test genetico	<b>Cugino di 1° e ½ di affetto FC</b> (rischio a priori 1 / 8) negativo al test genetico
Detection rate del test genetico = 85% (I livello)				
Rischio residuo di essere portatore	1 / 4 (23,1%)	1 / 8 (13,0%)	1 / 21 (4,8%)	1 / 48 (2,1%)
Detection rate del test genetico = 91% (I livello)				
Rischio residuo di essere portatore	1 / 7 (15,3%)	1 / 12 (8,3%)	1 / 34 (2,9%)	1 / 79 (1,3%)
Detection rate del test genetico = 97% (II e III livello)				
Rischio residuo di essere portatore	1 / 18 (5,7%)	1 / 34 (2,9%)	1 / 101 (1,0 %)	1 / 234 (0,4%)

**Tabella 2 (Capitolo 10.3.1.2) - Rischi relativi alla ricerca del portatore in singolo individuo in familiari di portatore (obbligato) con variante patogenetica del ramo familiare non nota.** Il rischio a priori di eterozigosi nel familiare di affetto da FC, in relazione alla parentela, è riportato in tabella.

	<b>Fratello / Figlio</b> di portatore FC (rischio a priori 1 / 2) negativo al test genetico	<b>Zio / Nonno</b> di portatore FC (rischio a priori 1 / 4) negativo al test genetico	<b>Cugino di 1°</b> di portatore FC (rischio a priori 1 / 8) negativo al test genetico	<b>Cugino di 1° e ½</b> di portatore FC (rischio a priori 1 / 16) negativo al test genetico
	<b>Detection rate del test genetico = 85% (I livello)</b>			
Rischio residuo di essere portatore	1 / 8 (13,0%)	1 / 21 (4,8%)	1 / 48 (2,1%)	1 / 101 (1,0%)
	<b>Detection rate del test genetico = 91% (I livello)</b>			
Rischio residuo di essere portatore	1 / 12 (8,3%)	1 / 34 (2,9%)	1 / 79 (1,3%)	1 / 168 (0,6%)
	<b>Detection rate del test genetico = 97% (II e III livello)</b>			
Rischio residuo di essere portatore	1 / 34 (2,9%)	1 / 101 (1,0%)	1 / 234 (0,4%)	1 / 501 (0,2%)



**Figura 5 (Capitolo 10.3.2) - Diagramma di flusso per la ricerca del portatore in singolo individuo di popolazione generale.**

**Tabella 3 (Capitolo 10.3.2) - Rischi relativi all'indagine genetica per la ricerca del portatore in singolo individuo di popolazione generale. La frequenza del portatore considerata (a priori, nella popolazione generale) è di 1 / 30.**

	Detection rate del test genetico = 85% (I livello)	Detection rate del test genetico = 91% (I livello)	Detection rate del test genetico = 97% (II e III livello)
Rischio residuo di essere portatore di variante patogenetica FC se negativo al test	1 / 194 (0,51%)	1 / 323 (0,31%)	1 / 968 (0,10%)

## 10.4 - Genitori di affetti

10.4.1 - E' sempre indicato eseguire il test molecolare del gene CFTR nei genitori di un paziente affetto da FC in cui sono state identificate le varianti patogenetiche (Fig. 6). Verranno ricercate nei genitori le varianti patogenetiche identificate nel figlio affetto. La definizione dei difetti molecolari nei genitori permette l'attribuzione degli alleli parentali nel paziente, necessaria per la conferma del genotipo identificato, e permetterà alla coppia, che possiede un rischio di 1/4 (25%) di generare un figlio affetto per ogni gravidanza, di eseguire, se lo desidera, la diagnosi prenatale (o la PGT) per stabilire lo stato del feto (o dell'embrione). La definizione del genotipo nei genitori del paziente permetterà anche di avviare lo screening a cascata nei collaterali (fratelli, etc) allo scopo di definire l'eventuale stato di portatore.

10.4.2 - Nei casi in cui nel figlio clinicamente affetto venga identificata una sola variante patogenetica, o non ne venga identificata alcuna, è indicato eseguire l'analisi della segregazione attraverso lo studio di marcatori del gene CFTR (Fig. 6).

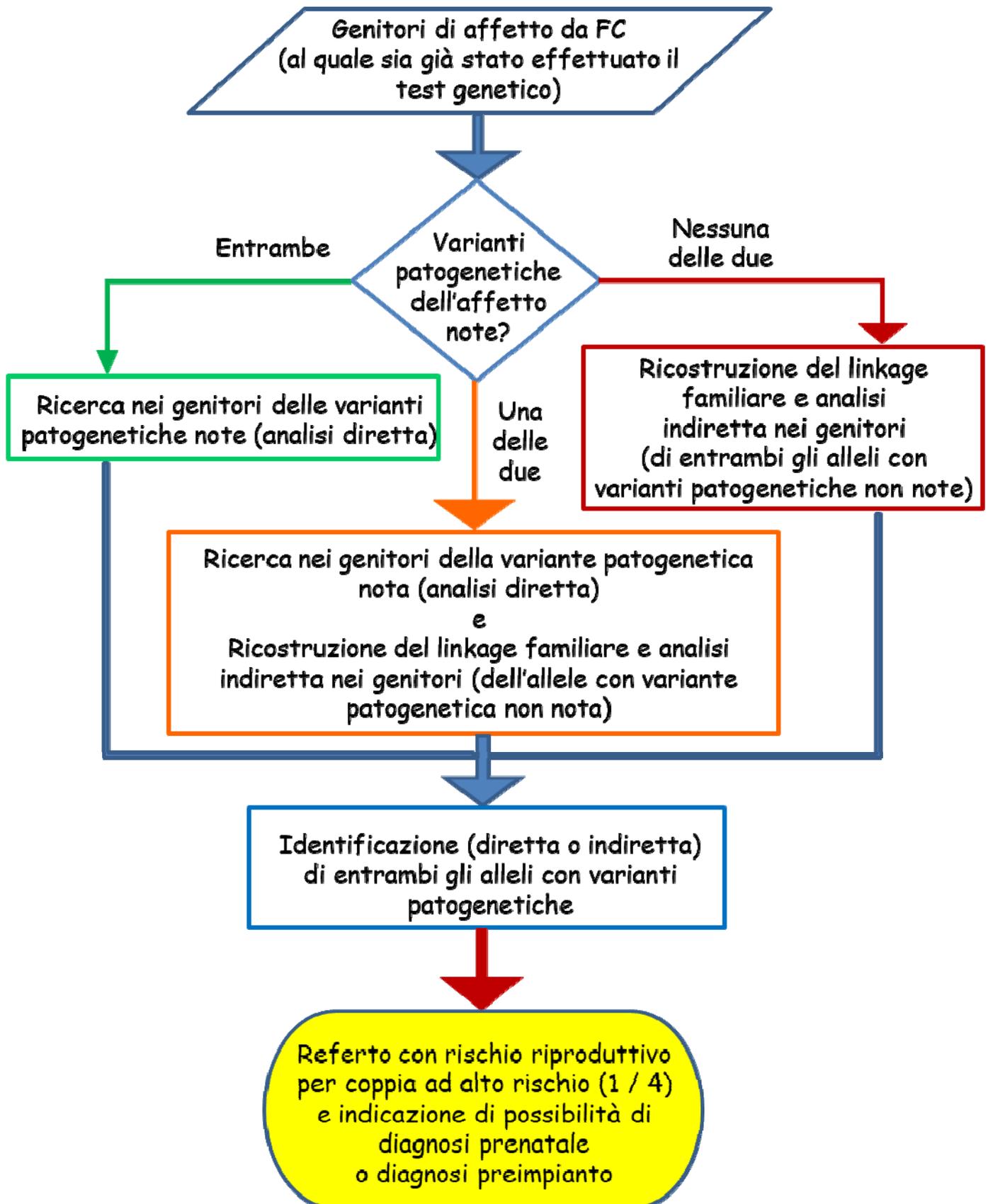
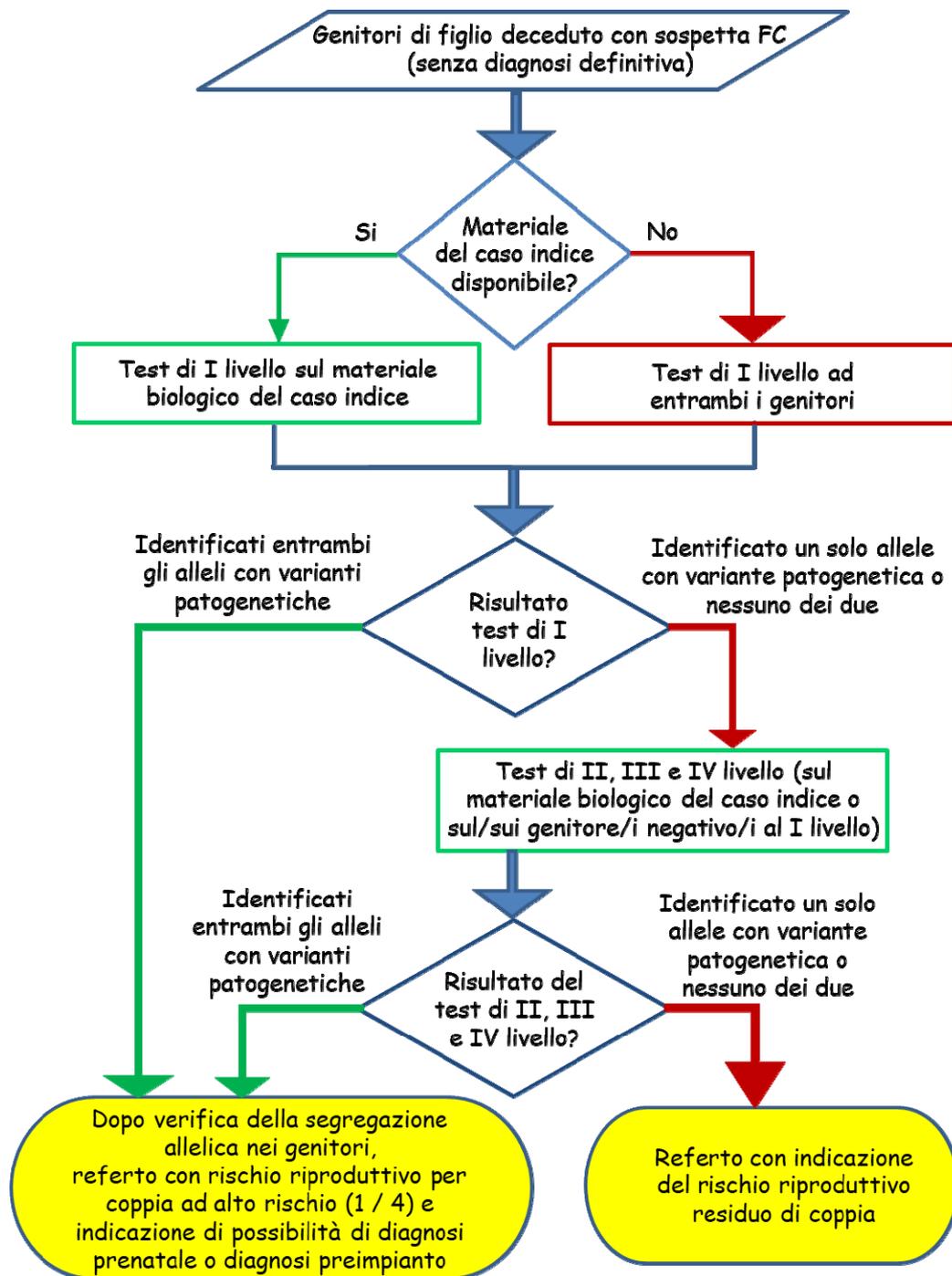


Figura 6 (Capitolo 10.4) - Diagramma di flusso per la caratterizzazione genetica di genitori di affetto.

## 10.5 - Genitori di deceduti con sospetta FC

Per la valutazione del rischio riproduttivo dei genitori di un figlio deceduto con un quadro clinico sospetto per FC ma senza una diagnosi definitiva, si raccomanda di eseguire l'indagine molecolare del gene CFTR nel materiale biologico del caso indice, raccolto e conservato nel rispetto della legislazione vigente. Se tale materiale non dovesse essere disponibile, è indicato eseguire un test di I livello nei genitori e, in caso di negatività, approfondire l'indagine con test di II, III e IV livello (Fig. 7) (per il calcolo dei rischi si può fare riferimento alla Tabella 5 (capitolo 10.7), tenendo tuttavia in debita considerazione il fatto che il sospetto diagnostico per FC, difficilmente quantificabile, può aumentare anche considerevolmente il rischio a priori calcolabile per la popolazione generale).



**Figura 7 (Capitolo 10.5) - Diagramma di flusso per la caratterizzazione genetica di genitori di figlio deceduto con sospetta FC (senza diagnosi definitiva).** In caso di test genetico negativo o con una sola variante patogenetica trovata (ramo di destra del diagramma di flusso), il calcolo del rischio residuo è complicato dall'incertezza della diagnosi. Si può fare riferimento alla Tabella 5 (capitolo 10.7), tenendo tuttavia in debita considerazione il fatto che il sospetto diagnostico per FC, difficilmente quantificabile, può aumentare anche considerevolmente il rischio a priori calcolabile per la popolazione generale.

## 10.6 - Genitori di feto con iperecogenicità intestinale e/o dilatazione delle anse intestinali

L'iperecogenicità intestinale fetale è un segno ecografico diagnosticato nello 0,2-1,8% delle gravidanze della popolazione generale, soprattutto durante il secondo trimestre. Può essere un reperto isolato o essere associato ad altre anomalie ecografiche. Viene classificato secondo un grading che si basa sul confronto tra ecogenicità intestinale e densità ecografica della cresta iliaca fetale. Può essere un reperto transitorio o essere associato ad anomalie cromosomiche, infezioni congenite, malformazioni intestinali, urogenitali, cardiache e a FC.

Diversi studi eseguiti su casistiche europee riportano un'incidenza di FC del 2-3% nei feti con iperecogenicità intestinale di II-III grado sia isolata che associata a dilatazione delle anse intestinali. Questo quadro può essere interpretato come equivalente fetale di un ileo da meconio, spesso associato a FC, con varianti patogenetiche di classe I, II, III, le più frequenti delle quali sono identificabili con un test di I livello. In seguito al riscontro ecografico di iperecogenicità intestinale fetale di II o III grado, oltre al cariotipo fetale e ad indagini virologiche, è indicato eseguire il test genetico di I livello nei genitori (Fig. 8). Se questo test risulta negativo in entrambi i genitori, il rischio di FC nel feto, calcolato con metodi bayesiani, si riduce notevolmente (Tab. 4). Se entrambi i genitori vengono identificati come portatori, il rischio di FC nel feto è superiore a 1/4 ed è indicata la possibilità di diagnosi prenatale. Se uno dei membri della coppia risulta portatore, è indicato che l'opportunità di eseguire indagini di II e III livello al partner negativo al I livello venga attentamente valutata in consulenza genetica, senza automatismi, anche in riferimento alla DR e rischio residuo del test di I livello e tenendo conto dei tempi ridotti di analisi dovuti alla fase avanzata della gravidanza. E' auspicabile che venga resa disponibile la classificazione ecografica dell'iperecogenicità intestinale in I, II e III livello ecografico, in modo da avere più elementi per la valutazione dell'applicazione di test genetici di II e III livello (più auspicabili in caso di II e III livello ecografico).

Se anche in seguito all'approfondimento diagnostico non viene identificata alcuna variante patogenetica nel partner negativo, è indicato sottolineare in consulenza genetica che un'eventuale diagnosi prenatale non sarebbe

completamente informativa e riportare una quantificazione del rischio residuo che il feto, assumendo che abbia ereditato la variante patogenetica identificata nel genitore, sia affetto da FC.

Se il protocollo diagnostico prevede che in caso di feto con iperecogenicità intestinale venga effettuata diagnosi prenatale per motivi diversi dall'indagine di FC (ad esempio, non esaustivo, aumentato rischio di trisomia 21) è indicato che in consulenza genetica venga illustrata la possibilità della ricerca della variante patogenetica nota del gene CFTR su materiale fetale. In caso di negatività di tale ricerca, l'iperecogenicità intestinale del feto può essere attribuita ad altra causa. In caso di positività, si rientra nell'attenta valutazione in consulenza genetica dell'opportunità di esecuzione d'indagini di II e III livello.

Qualsiasi livello di test genetico sia applicato, anche in caso di negatività, è indicato che nel referto sia quantificato il rischio riproduttivo di coppia per la gravidanza in corso, che consideri il rischio a priori introdotto dall'iperecogenicità intestinale fetale.

Nel referto dovrebbe essere riportata una nota in cui sia evidenziata l'opportunità di una valutazione clinica e biochimica postnatale del bambino.

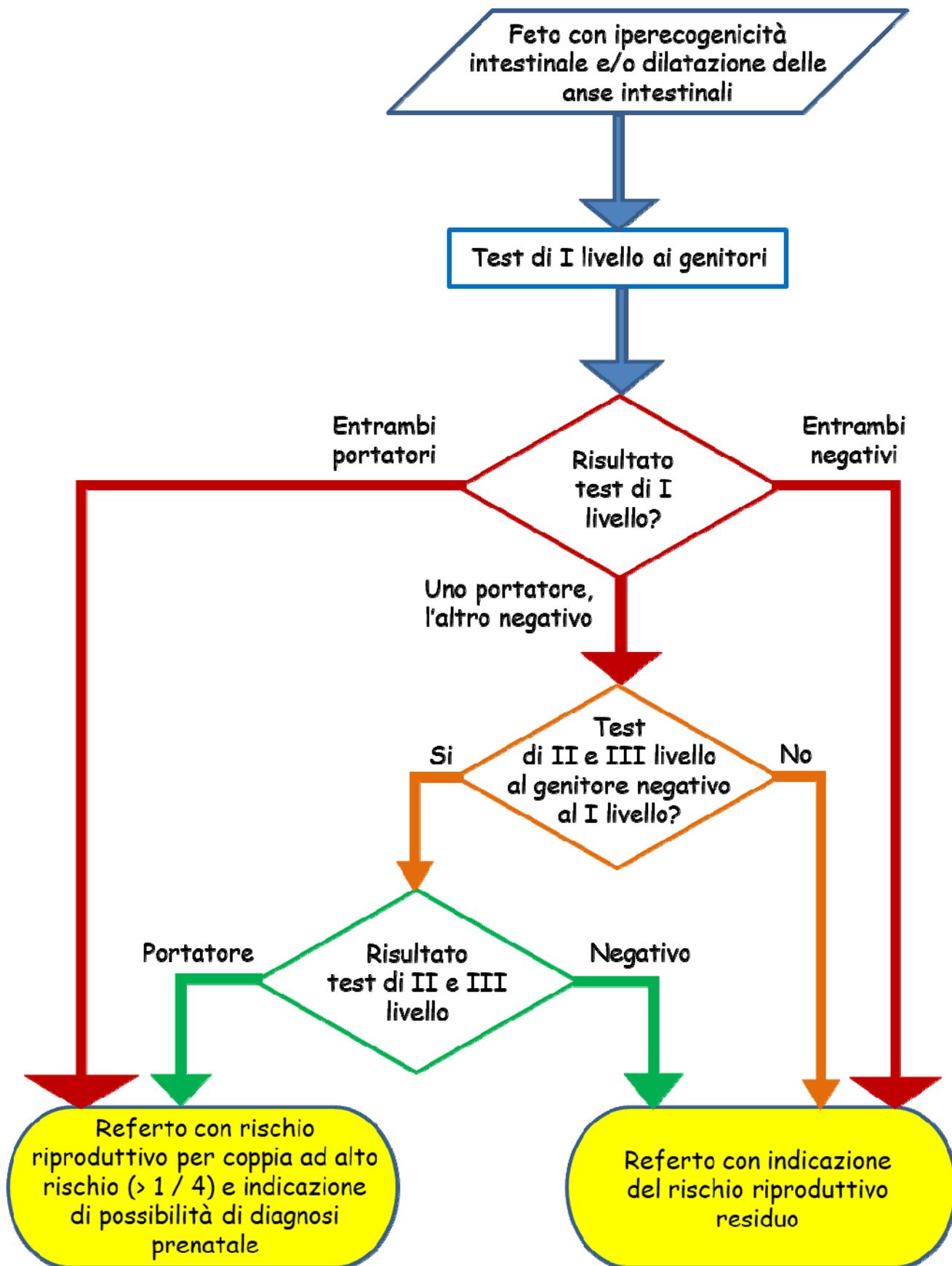


Figura 8 (Capitolo 10.6) - Diagramma di flusso per genitori di feto con iperecogenicità intestinale e/o dilatazione delle anse intestinali.

**Tabella 4 (Capitolo 10.6) - Rischi relativi all'indagine genetica per FC in genitori di feto con iperecogenicità intestinale e/o dilatazione delle anse intestinali.** La frequenza del portatore considerata (a priori, nella popolazione generale) è di 1 / 30.

	Entrambi i genitori portatori	Un genitore portatore, l'altro negativo al test genetico	Entrambi i genitori negativi al test genetico
	Detection rate del test genetico = 85% (I livello)		
Rischio di coppia per FC	> 1 / 4 (> 25%)	1 / 5 (18,6%)	1 / 485 (0,21%)
	Detection rate del test genetico = 91% (I livello)		
Rischio di coppia per FC	> 1 / 4 (> 25%)	1 / 8 (12,1%)	1 / 1337 (0,07%)
	Detection rate del test genetico = 97% (II e III livello)		
Rischio di coppia per FC	> 1 / 4 (> 25%)	1 / 23 (4,4%)	1 / 11938 (0,01%)

### 10.7 - Coppie formate da due individui della popolazione generale

Il test del portatore può essere spontaneamente richiesto da coppie della popolazione generale, che non hanno casi di malattia o portatori in famiglia, al fine di conoscere il rischio di avere figli affetti.

Con l'obiettivo di migliorare la consapevolezza procreativa e/o ridurre l'incidenza della malattia nella popolazione è stato proposto di estendere la ricerca dei portatori anche in assenza di familiarità; infatti negli Stati Uniti, l'American College of Medical Genetics (ACMG) e l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) raccomandano l'estensione del test del portatore alle coppie con progetti riproduttivi.

In Italia, l'accessibilità al test del portatore con costo a carico del Sistema Sanitario Nazionale non è omogenea. In alcune realtà la prestazione è consentita solamente in presenza di situazioni a rischio (familiarità stretta con un malato) in

altre il test del portatore può essere prescritto alla popolazione generale anche in assenza di familiarità come test pre-concezionale.

In uno studio recente è stato dimostrato che nel Veneto orientale, dove il test del portatore è offerto anche come test pre-concezionale alle coppie della popolazione generale, l'incidenza della malattia negli ultimi vent'anni è sensibilmente diminuita da 1/2730 a circa 1/14200 fenomeno osservato anche in altri paesi (Spagna e Stati Uniti).

Quando finalizzato alla pianificazione familiare, è indicato eseguire il test ad entrambi i componenti della coppia, anche se nessuno dei due componenti ha parenti affetti da FC. In assenza di sospetto clinico o familiarità, non è indicato eseguire il test in soggetti che non sono in età riproduttiva oppure in soggetti minorenni che non sono in grado di utilizzare i risultati perché lontani dal momento della pianificazione familiare (a meno che non si rientri in casi particolari di ricerca del portatore in minori).

In ciascuno dei membri della coppia della popolazione generale, quindi in assenza di particolari fattori di rischio, è opportuno eseguire solo il test di I livello (Fig. 9 e Tab. 5).

10.7.1 - In caso di negatività al test di I livello di entrambi i componenti della coppia, il rischio riproduttivo a posteriori è inferiore rispetto alla popolazione generale e non sono indicati ulteriori approfondimenti. In particolare, la probabilità di eterozigosi a posteriori (rischio residuo) di ciascun membro della coppia è definita dalla probabilità di eterozigosi a priori diminuita in relazione alla DR del test applicato nella popolazione specifica. Conseguentemente viene calcolato il rischio di coppia.

10.7.2 - In caso di positività al test di entrambi gli individui, il rischio riproduttivo a posteriori è quello di una coppia di due portatori e quindi pari a 1/4 (25%) ad ogni gravidanza. In questo caso, la possibilità di eseguire la diagnosi prenatale, o anche la PGT, va presentata e discussa in sede di consulenza genetica, così come l'estensione dell'indagine molecolare ai familiari al fine di identificare la segregazione familiare e i portatori.

10.7.3 - Se uno dei componenti della coppia risulta portatore e l'altro è negativo al test di I livello, il rischio riproduttivo a posteriori della coppia è intermedio (fra quello della coppia della popolazione generale che non ha fatto il test e quello della coppia formata da due soggetti portatori) e non è indicato

procedere al test di II e III livello nel membro della coppia risultato negativo al test di I livello. In questo caso non sussiste l'indicazione alla diagnosi prenatale.

Per i requisiti di DR ed applicabilità dei test di I livello appropriati alla popolazione italiana, nonché delle eccezioni relative all'applicazione di test di II e III livello ad etnie diverse da quella italiana, vedere i paragrafi 5.1, 5.6.3, 5.6.4).

Qualora non sia presente CBAVD, la ricerca del portatore nella coppia infertile ricade nell'ambito della ricerca del portatore in coppie della popolazione generale descritta in questo capitolo. Qualora nella coppia sia presente CBAVD, fare riferimento al capitolo *Appropriatezza delle indagini mutazionali nel gene CFTR in caso di infertilità e PMA*.

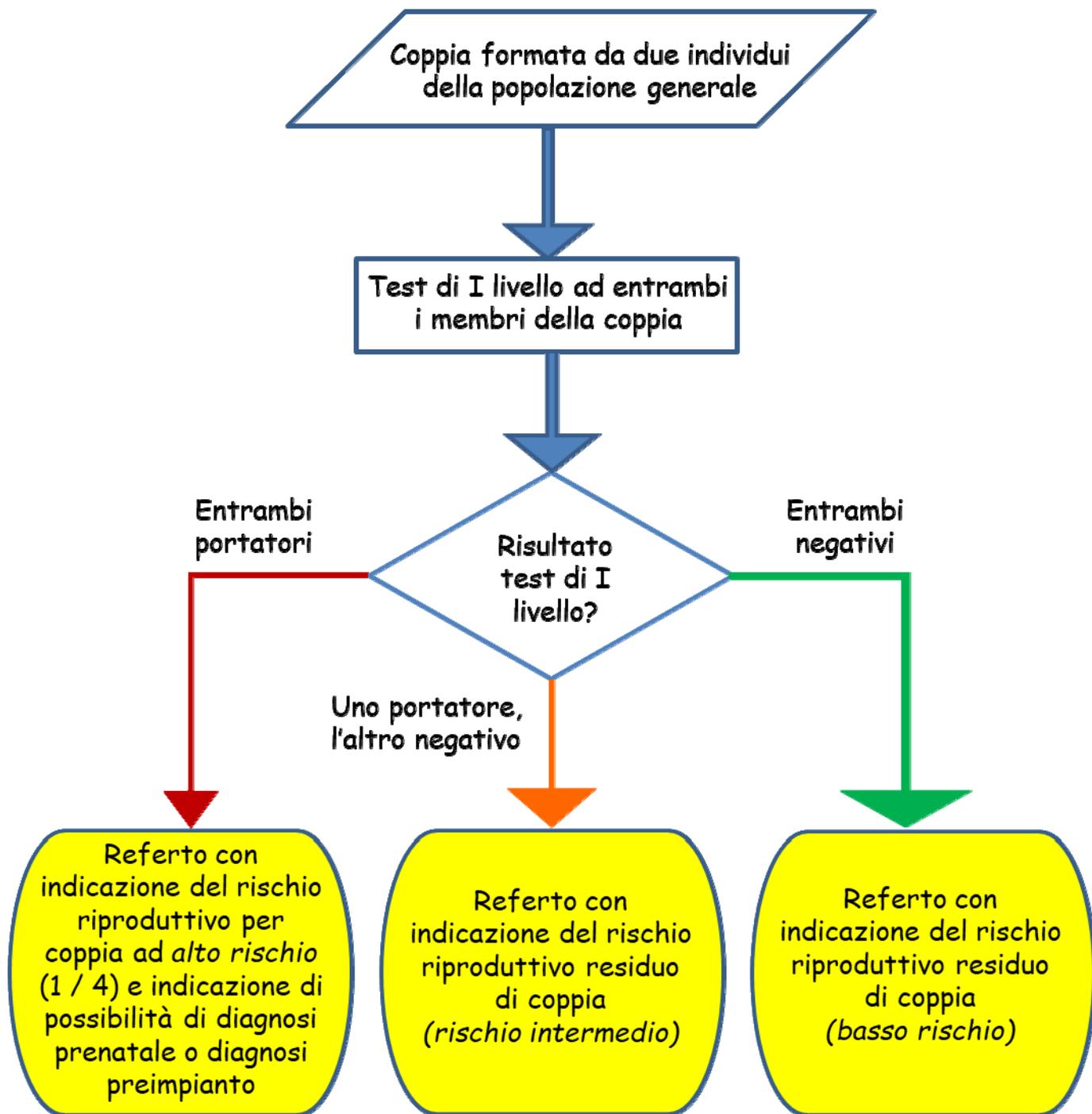


Figura 9 (Capitolo 10.7) - Diagramma di flusso per coppie formate da due individui della popolazione generale.

**Tabella 5 (Capitolo 10.7) - Rischi relativi all'indagine genetica per FC in coppia di individui di popolazione generale.** La frequenza del portatore considerata (a priori, nella popolazione generale) è di 1 / 30.

	Entrambi i membri della coppia portatori	Un membro della coppia portatore, l'altro negativo al test genetico	Entrambi i membri della coppia negativi al test genetico
	Detection rate del test genetico = 85% (I livello)		
Rischio di coppia per FC	1 / 4 (25%)	1 / 777 (0,13%)	1 / 151062 (0,00066%)
	Detection rate del test genetico = 91% (I livello)		
Rischio di coppia per FC	1 / 4 (25%)	1 / 1293 (0,08%)	1 / 417890 (0,00024%)
	Detection rate del test genetico = 97% (II e III livello)		
Rischio di coppia per FC	1 / 4 (25%)	1 / 3871 (0,03%)	1 / 3745515 (0,00003%)

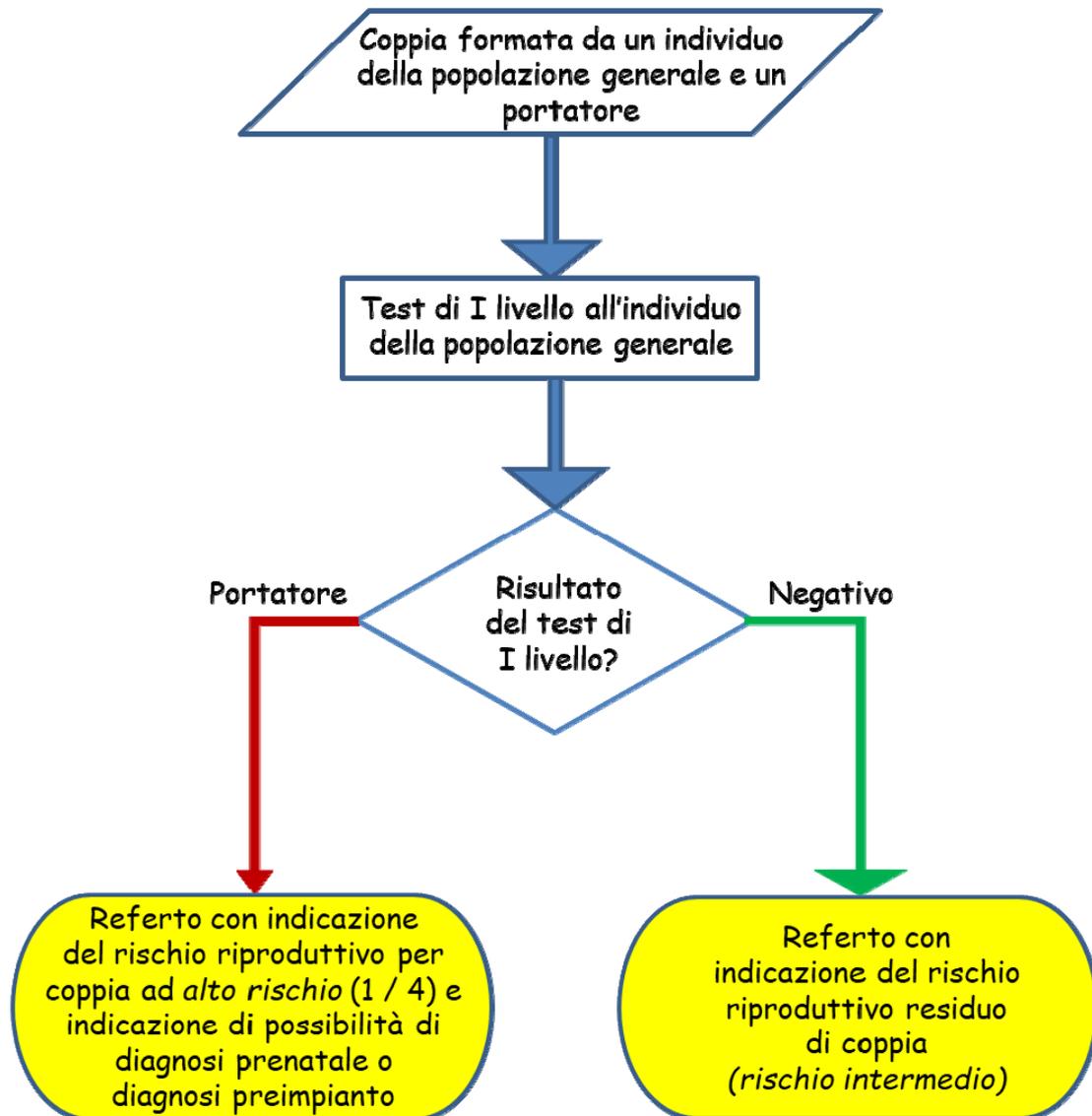
### 10.8 - Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un eterozigote

Nell'individuo della popolazione generale della coppia è indicata l'esecuzione di un test di I livello (Fig. 10).

10.8.1 - Se l'individuo della popolazione generale è negativo all'analisi di I livello, il rischio riproduttivo a posteriori della coppia è intermedio e, nell'individuo negativo al I livello, non è indicato procedere al test di II e III livello. In questo caso non sussiste l'indicazione alla diagnosi prenatale.

10.8.2 - Se l'individuo della popolazione generale è positivo all'analisi di I livello, il rischio riproduttivo a posteriori è quello di una coppia di due portatori e quindi pari a 1/4 (25%) ad ogni gravidanza. In questo caso, la possibilità di eseguire la diagnosi prenatale va presentata e discussa in sede di consulenza genetica, così come l'estensione dell'indagine molecolare ai familiari al fine di identificare la segregazione familiare e i portatori.

Per i requisiti di DR ed applicabilità dei test di I livello appropriati alla popolazione italiana, nonché delle eccezioni relative all'applicazione di test di II e III livello ad etnie diverse da quella italiana, vedere i paragrafi 5.1, 5.6.3 e 5.6.4.



**Figura 10 (Capitolo 10.8) - Diagramma di flusso per coppie formate da un individuo della popolazione generale e un eterozigote.** Per i rischi riproduttivi residui delle coppie formate da un individuo della popolazione generale (negativo al test genetico) e un eterozigote (ramo di destra del diagramma di flusso) si può fare riferimento alla Tabella 5 (Capitolo 10.7).

## 10.9 - Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un affetto con FC

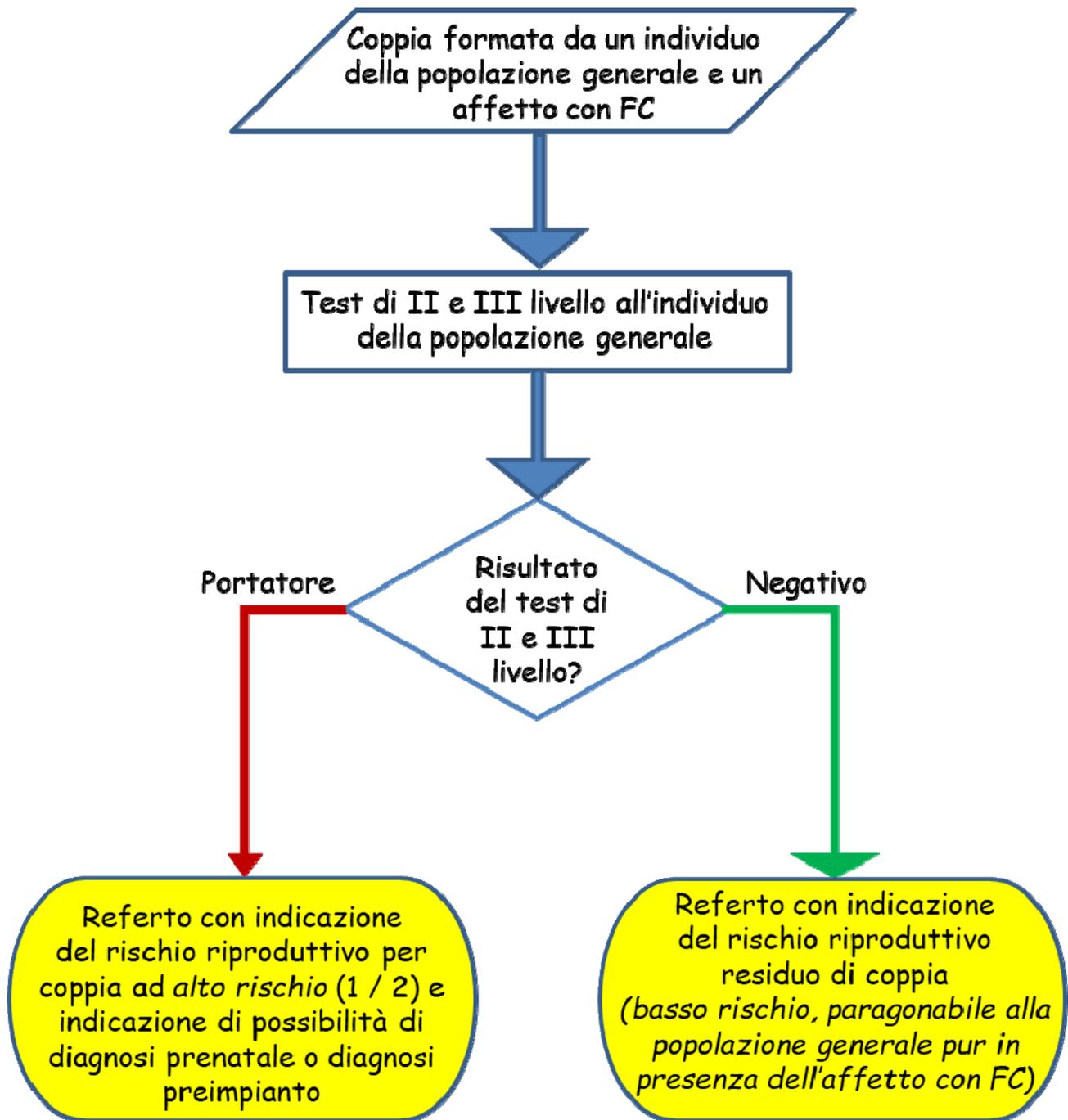
Le donne con FC possono avere figli ed è questo un evento che, grazie ai continui miglioramenti della qualità e dell'attesa di vita, è in costante incremento negli ultimi anni. Una tendenza analoga si sta verificando anche per i maschi affetti che, nonostante siano azoospermici, possono beneficiare di tecniche di PMA che prelevano i gameti a monte dell'ostruzione dei deferenti. Difatti, negli ultimi decenni numerose tecniche di estrazione degli spermatozoi sono state sviluppate. Ad oggi, le tecniche più utilizzate sono: la "testicular sperm extraction" (TeSE) e la "MICROscopic testicular sperm extraction (MicroTeSE). Queste tecniche sono utilizzate anche per l'estrazione degli spermatozoi dai testicoli di soggetti con azoospermia non ostruttiva, mentre nei soggetti con CBAVD può anche essere sufficiente il prelievo degli spermatozoi mediante agoaspirato, poiché in questi soggetti la spermatogenesi e la quantità di spermatozoi intratesticolari sono normali. La TeSE è una tecnica in grado di prelevare spermatozoi mediante biopsia testicolare, eseguita ad occhio nudo dall'operatore, mediante una singola incisione. Secondo i dati forniti dalla letteratura, i tassi di recupero degli spermatozoi, con tecnica TeSE, vanno dal 16,5% all'80%, con un tasso di nati vivi in seguito a TeSE-ICSI del 20% circa in seguito ad un ciclo, 52% dopo tre cicli, 78% dopo 6 cicli. La MicroTeSE prevede la micro-dissezione dei tubuli seminiferi, previo studio microscopico di questi, al fine di individuare e prelevare tubuli con più alta probabilità di avere una spermatogenesi attiva al loro interno. Un ulteriore vantaggio della tecnica è quello di preservare la vascolarizzazione del testicolo. Una recente meta-analisi ha dimostrato come, in termini di "recupero spermatozoi", la MicroTese sia 1,5 volte più efficace della TeSE. Recenti studi hanno evidenziato tassi simili di gravidanza in seguito a PMA in coppie con partner maschile affetto da FC con CBAVD, a dimostrazione del fatto che le varianti patogenetiche del gene CFTR non alterano la funzionalità spermatozoaria, né la spermatogenesi. Tuttavia, il tasso di aborto spontaneo/morte fetale (rispettivamente prima o dopo 20 settimane di gestazione) è stato riscontrato essere più alto nelle coppie con uomini con CBAVD (23,9%) rispetto a quelle con uomini con ostruzione non da CBAVD (12,5%). Il tasso di nati vivi è inferiore negli uomini con CBAVD (70,5%) rispetto a quelli con ostruzione non da CBAVD (84,9%). Pertanto, i pazienti con

CBAVD presentano un aumento significativo del rischio di aborto o di morte fetale.

Nell'individuo della popolazione generale della coppia è indicata l'esecuzione di un test di II e III livello (Fig. 11).

10.9.1 - Se l'individuo della popolazione generale è negativo all'analisi di II e III livello, il rischio riproduttivo a posteriori della coppia è paragonabile a quello della popolazione generale e non sono indicati ulteriori approfondimenti. In particolare, la probabilità di eterozigosi a posteriori dell'individuo di popolazione generale è definita dalla probabilità di eterozigosi a priori diminuita in relazione alla DR del test applicato nella popolazione specifica (Tab. 6). Conseguentemente viene calcolato il rischio di coppia. In questo caso non sussiste l'indicazione alla diagnosi prenatale. Poiché sono già stati applicati test di II e III livello, questo approccio è adatto anche per etnie diverse da quella italiana (vedere anche il Capitolo 5.1, in particolare paragrafi 5.1.2.2 e 5.1.2.3, per caratteristiche e limiti di questo approccio in etnie diverse da quella italiana).

10.9.2 - Se l'individuo della popolazione generale è positivo all'analisi di II o III livello, il rischio riproduttivo a posteriori è quello di una coppia formata da un affetto e un portatore e quindi pari a 1/2 (50%) ad ogni gravidanza. In questo caso, la possibilità di eseguire la diagnosi prenatale, o la PGT, va presentata e discussa in sede di consulenza genetica, così come la possibilità di estensione dell'indagine molecolare ai familiari al fine di identificare la segregazione familiare e i portatori.



**Figura 11 (Capitolo 10.9) - Diagramma di flusso per coppie formate da un individuo della popolazione generale e un affetto da FC.**

**Tabella 6 (Capitolo 10.9) - Rischi relativi all'indagine genetica per FC in coppia formata da un individuo della popolazione generale e un affetto FC.** La frequenza del portatore considerata (a priori, nella popolazione generale) è di 1 / 30. Sebbene sia indicato che all'individuo di popolazione generale venga applicato un test di II e III livello, per completezza vengono riportati i rischi anche nel caso di applicazione di un test di I livello.

	Un membro della coppia affetto da FC, l'altro portatore	Un membro della coppia affetto da FC, l'altro negativo al test genetico
	Detection rate del test genetico = 85% (I livello)	
Rischio di coppia per FC	1 / 2 (50%)	1 / 389 (0,26 %)
	Detection rate del test genetico = 91% (I livello)	
Rischio di coppia per FC	1 / 2 (50%)	1 / 646 (0,15%)
	Detection rate del test genetico = 97% (II e III livello)	
Rischio di coppia per FC	1 / 2 (50%)	1 / 1935 (0,05%)

### 10.10 - Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un affetto con CFTR-RD

Le CFTR-RD possono essere di difficile definizione diagnostica. Si associano a quadri clinici abitualmente più lievi della FC e la loro evoluzione a lungo termine è fondamentalmente sconosciuta, anche se è ragionevole ipotizzare che difficilmente possano giungere al livello di espressione clinica della FC.

Le considerazioni sull'indicazione al tipo di analisi genetica in questo gruppo sono analoghe a quelle espresse nel Capitolo 10.9 (Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un affetto FC), ma sono rese più complesse

dall'ancora più scarsa correlazione tra genotipo e fenotipo nelle CFTR-RD rispetto alla FC, nonché dalla sostanziale assenza di dati prognostici certi. L'obiettivo indicato è quello di conoscere il rischio riproduttivo per FC, e non per CFTR-RD. Comunque, poiché la combinazione di varianti patogenetiche dell'individuo con CFTR-RD e di quelle del partner di popolazione generale potrebbe originare l'insorgenza di genotipi causa di CFTR-RD, è indicato riportare nel referto anche il rischio per tali genotipi. Inoltre, è indicato basare il calcolo dei rischi solo sulle varianti patogenetiche trovate e non anche sugli alleli con varianti patogenetiche non identificate ("unknown") nell'affetto da CFTR-RD. Ciò, diversamente da quanto è indicato negli affetti con diagnosi di FC già effettuata (paragrafo 10.9) nei quali si assume siano presenti 2 varianti patogenetiche causa di FC (anche se non entrambe individuate). E' tuttavia indicato chiarire nel referto la variabilità dell'effetto clinico di tali genotipi e che l'interpretazione è di compatibilità, e non di certezza, per CFTR-RD.

Nell'individuo della popolazione generale della coppia è indicata l'esecuzione di un test di II e III livello (Fig. 12).

10.10.1 - Se l'individuo della popolazione generale è negativo all'analisi di II e III livello, il rischio riproduttivo a posteriori della coppia è paragonabile a quello della popolazione generale e non sono indicati ulteriori approfondimenti. In particolare, la probabilità di eterozigosi a posteriori dell'individuo di popolazione generale è definita dalla probabilità di eterozigosi a priori diminuita in relazione alla DR del test applicato nella popolazione specifica (Tab. 7). Conseguentemente viene calcolato il rischio di coppia. È tuttavia indicato che il calcolo del rischio di coppia tenga in considerazione il numero e il tipo di varianti patogenetiche trovate nell'affetto da CFTR-RD. Infatti, contrariamente al caso della coppia con un affetto da FC (che ha su entrambi gli alleli varianti patogenetiche causa di FC), l'affetto con CFTR-RD può avere più complesse combinazioni di varianti patogenetiche sia causa di FC sia causa di CFTR-RD, nonché di alleli senza varianti patogenetiche individuate ("unknown"). In questo caso non sussiste l'indicazione alla diagnosi prenatale. Poiché sono già stati applicati test di II e III livello, questo approccio è adatto anche per etnie diverse da quella italiana (vedere anche il Capitolo 5.1, in particolare paragrafi 5.1.2.2 e 5.1.2.3, per caratteristiche e limiti di questo approccio in etnie diverse da quella italiana).

10.10.2 - Se l'individuo della popolazione generale è positivo all'analisi di II o III livello, è indicato che nel calcolo del rischio riproduttivo a posteriori, per gli

stessi motivi riportati sopra (paragrafo 10.10.1) si tenga in considerazione il numero e il tipo di varianti patogenetiche trovate nell'affetto con CFTR-RD. In questo caso, la possibilità di eseguire la diagnosi prenatale, o la PGT, esclusivamente per la valutazione della presenza di un genotipo causa di FC, va presentata e discussa in sede di consulenza genetica, così come la possibilità di estensione dell'indagine molecolare ai familiari al fine di identificare la segregazione familiare e i portatori.

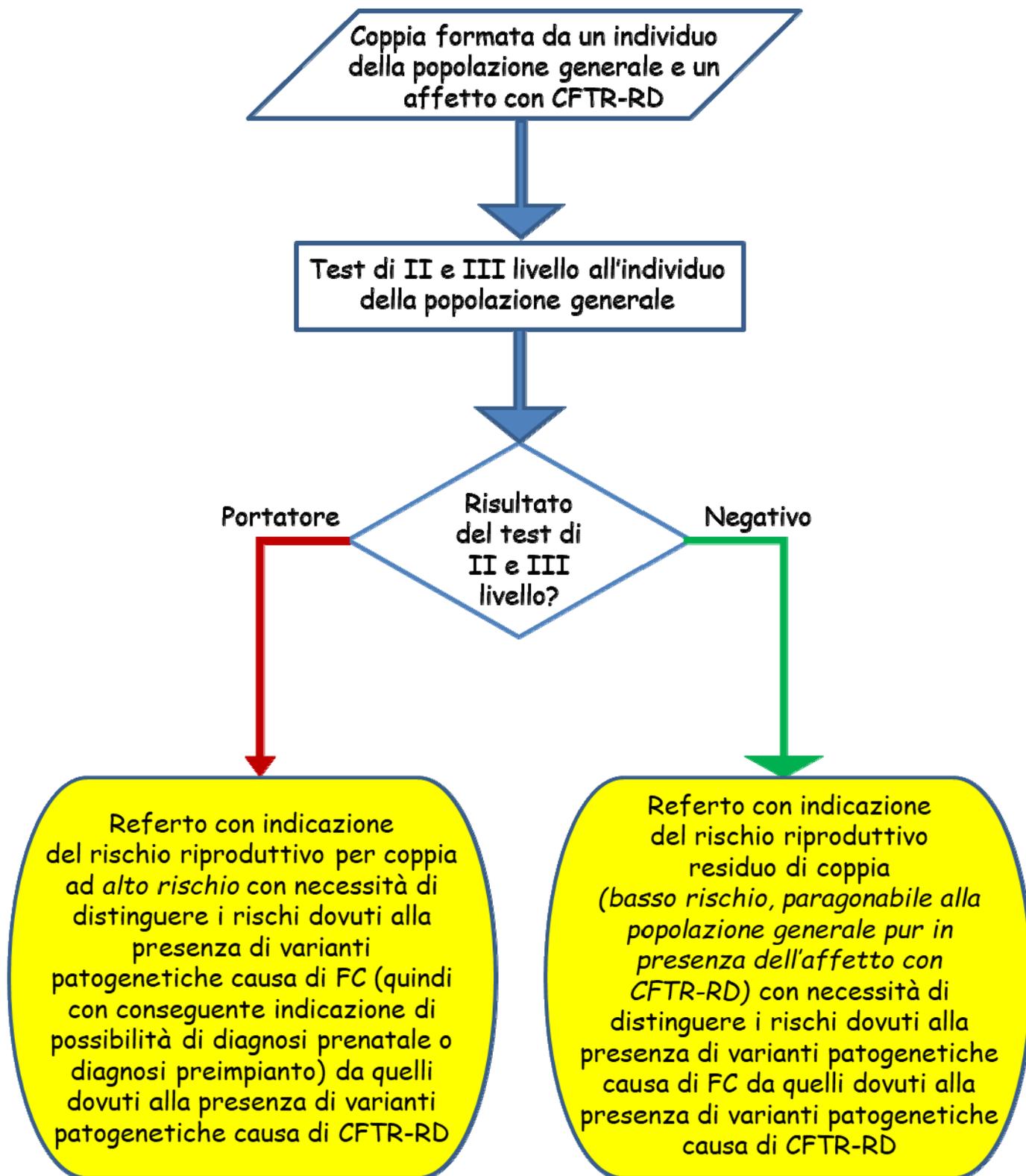


Figura 12 (Capitolo 10.10) - Diagramma di flusso per coppie formate da un individuo della popolazione generale e un affetto con CFTR-RD.

**Tabella 7 (Capitolo 10.10) - Rischi relativi all'indagine genetica per FC (e CFTR-RD) in coppia formata da un individuo della popolazione generale e un affetto con CFTR-RD.** La frequenza del portatore considerata (a priori, nella popolazione generale) è di 1 / 30. Sebbene sia indicato che all'individuo di popolazione generale venga applicato un test di II e III livello, per completezza vengono riportati i rischi anche nel caso di applicazione di un test di I livello.

	<i>Membro della coppia affetto da CFTR-RD con:</i>			
	Una variante patogenetica per FC e una per CFTR-RD		entrambe le varianti patogenetiche per CFTR-RD	
	<i>L'altro membro della coppia (di popolazione generale), dopo test genetico:</i>			
	portatore	negativo	portatore	negativo
	Detection rate del test genetico = 85% (I livello)			
Rischio di coppia per FC	1 / 4 (25%)	1 / 777 (0,13%)	vedi nota*	vedi nota*
Rischio di coppia per CFTR-RD	1 / 4 (25%)	1 / 777 (0,13%)	1 / 2 (50%)	1 / 389 (0,26%)
	Detection rate del test genetico = 91% (I livello)			
Rischio di coppia per FC	1 / 4 (25%)	1 / 1293 (0,08%)	vedi nota*	vedi nota*
Rischio di coppia per CFTR-RD	1 / 4 (25%)	1 / 1293 (0,08%)	1 / 2 (50%)	1 / 646 (0,15%)
	Detection rate del test genetico = 97% (II e III livello)			
Rischio di coppia per FC	1 / 4 (25%)	1 / 3871 (0,03%)	vedi nota*	vedi nota*
Rischio di coppia per CFTR-RD	1 / 4 (25%)	1 / 3871 (0,03%)	1 / 2 (50%)	1 / 1935 (0,05%)

Nota\*: sebbene in questo caso il rischio di FC possa essere teoricamente posto a zero, ciò dipende da quanto univocamente entrambe le varianti possano essere considerate patogenetiche solo per CFTR-RD; poiché questo livello di certezza non è sempre possibile (anche se la variante è comunemente ritenuta patogenetica solo per CFTR-RD), è indicato che la tematica sia discussa in consulenza genetica, chiarendo che l'impossibilità di insorgenza di FC è condizionata dalla reale conoscenza dell'effetto funzionale delle varianti.

### **10.11 - Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un familiare di affetto da FC con variante patogenetica del ramo familiare identificata**

Il test per il portatore è consigliato a tutti quelli che hanno nella storia della propria famiglia persone malate di FC, perché essi hanno maggiore probabilità, rispetto ai soggetti della popolazione generale, di essere portatori di variante patogenetica del gene CFTR. In caso di variante patogenetica familiare nota è indicato procedere alla sua ricerca diretta nel familiare in studio (Fig. 13). Si ha la possibilità di avere un risultato definitivo del test, che può distinguere con certezza i "portatori" dai "non portatori".

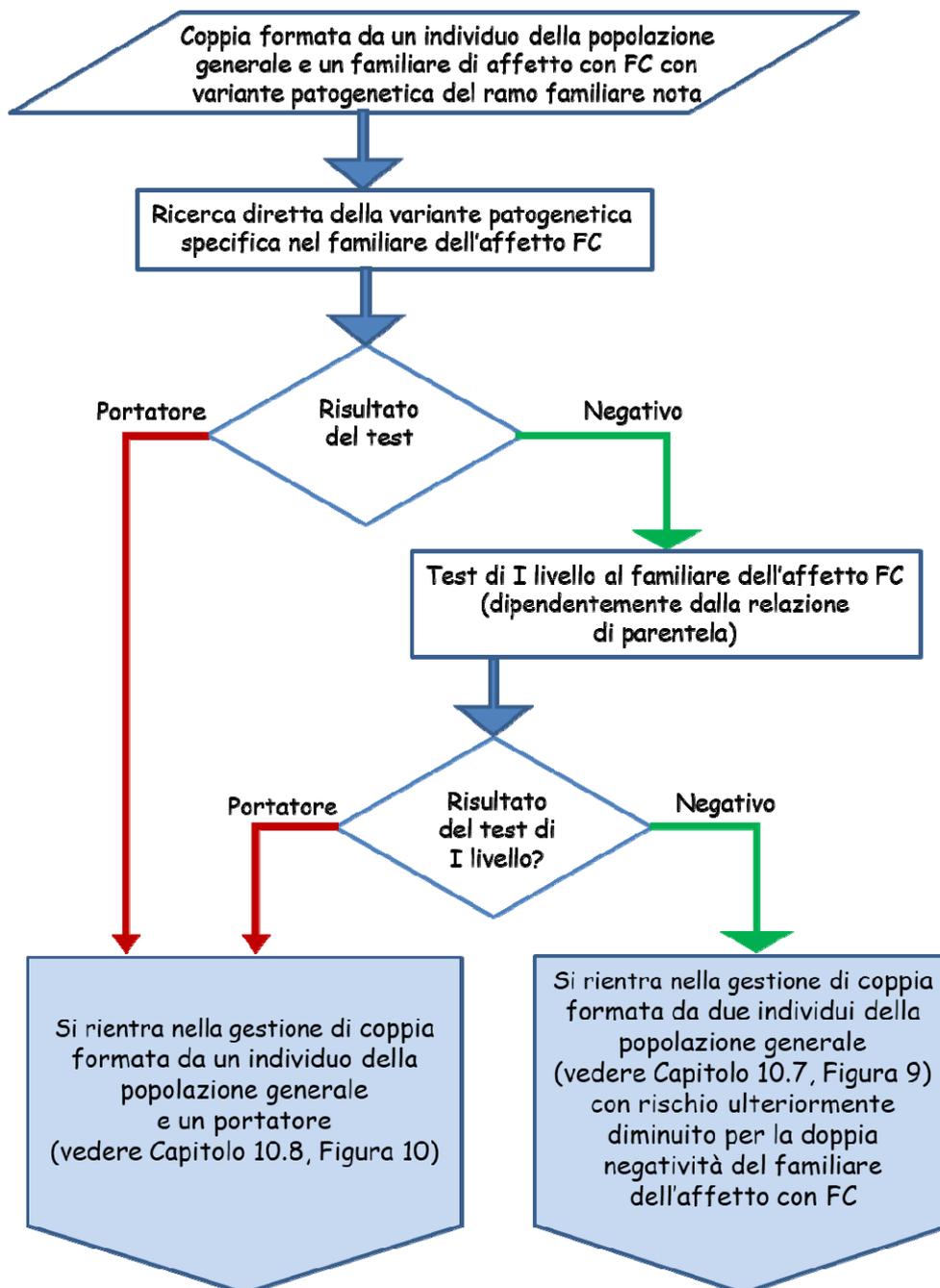
10.11.1 - Nel caso di test positivo per la variante patogenetica specifica nel familiare, si rientra nella gestione delle coppie formate da un individuo della popolazione generale e un portatore.

10.11.2 - Nel caso di test negativo per la variante patogenetica specifica nel familiare, in alcuni casi (dipendentemente dalla relazione di parentela) può essere indicata l'esecuzione di un test di I livello (qualora verificate le condizioni precedentemente descritte, e considerate le eccezioni, nel capitolo 5.1).

10.11.2.1 - Se il test di I livello nel familiare è positivo (per una variante patogenetica che può essere diversa da quella familiare) si rientra nella gestione delle coppie formate da un individuo della popolazione generale e un portatore.

10.11.2.2 - Se il test di I livello nel familiare è negativo, l'assenza sia della variante patogenetica familiare che di quelle comprese nel test di I livello diminuisce notevolmente il rischio di eterozigosi e si rientra in una gestione di

coppia formata da 2 individui della popolazione generale con rischio ulteriormente diminuito a causa del familiare doppiamente negativo.



**Figura 13 (Capitolo 10.11) - Diagramma di flusso per coppie formate da un individuo della popolazione generale e un familiare di affetto da FC con variante patogenetica del ramo familiare identificata.** Per i rischi residui in caso il familiare dell'affetto da FC risultasse portatore (ramo di sinistra del diagramma di flusso), si può fare riferimento alla Tabella 5 (Capitolo 10.7). Per i rischi residui in caso di doppia negatività del test genetico (sia per la variante patogenetica specifica del ramo familiare sia al test di I livello, ramo di destra del diagramma di flusso) si può fare riferimento alla Tabella 5 (Capitolo 10.7), tenendo comunque in considerazione che, considerata la negatività anche della variante patogenetica specifica del ramo familiare, i rischi saranno inferiori a quelli riportati in tabella.

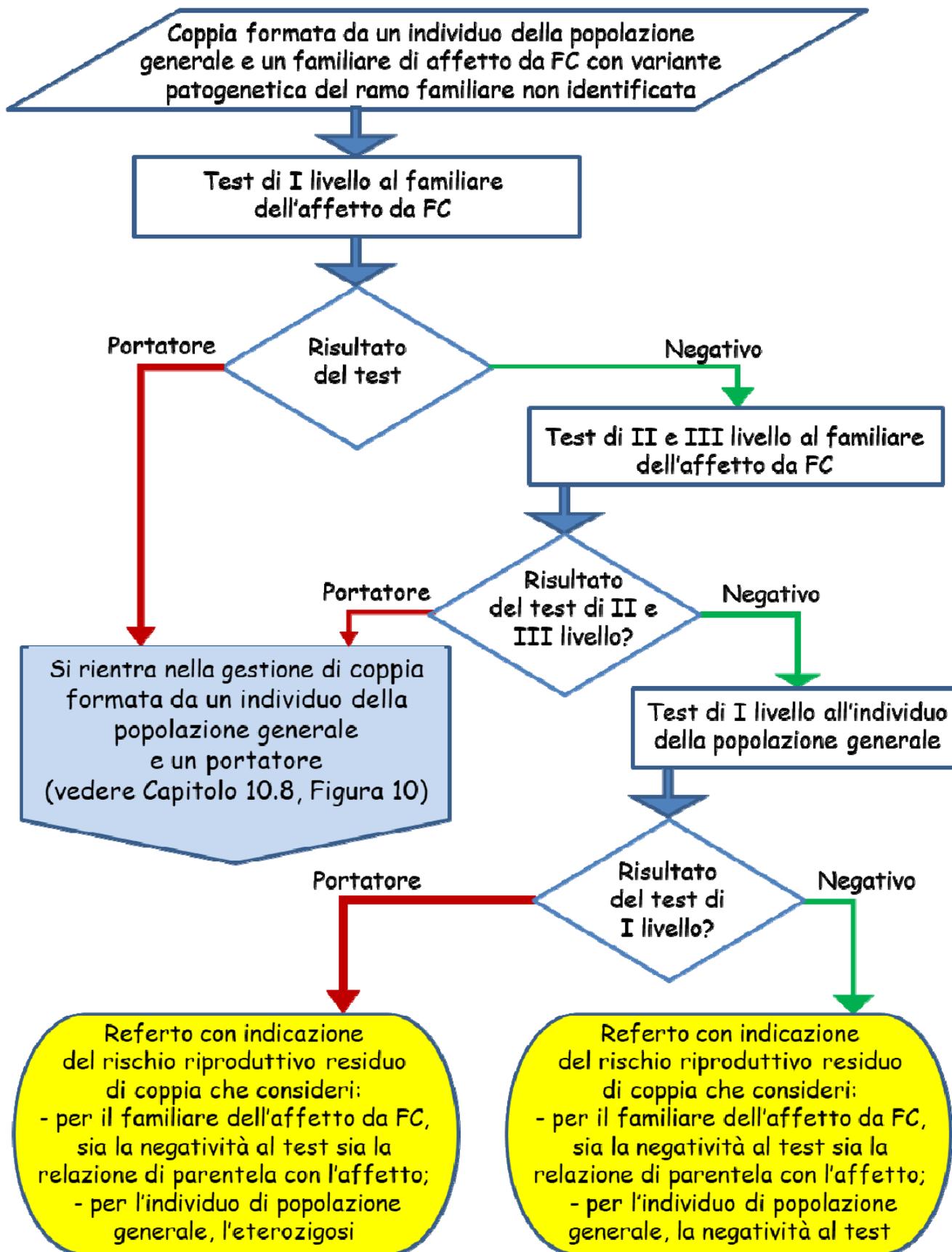
## **10.12 - Coppie formate da un individuo della popolazione generale e un familiare di affetto da FC con variante patogenetica del ramo familiare non identificata**

L'impossibilità di identificare la variante patogenetica familiare implica che la probabilità da conteggiare a priori per il familiare è quella di eterozigosi opportunamente modificata per il grado di parentela. La probabilità che la persona parente di un affetto da FC ha di essere portatore è tanto più alta quanto più la parentela con il malato è stretta.

Al familiare di affetto da FC con variante patogenetica non identificata è indicato applicare inizialmente un test di I livello e, qualora negativo, continuare l'indagine con test di II e III livello (Fig. 14). Occorre distinguere i casi nei quali, a seguito di queste indagini, la variante patogenetica familiare venga individuata oppure no.

10.12.1 - Se la variante patogenetica del familiare di affetto da FC con variante patogenetica non identificata è stata trovata mediante le indagini nel familiare, si rientra in una gestione di coppia formata da un portatore e un individuo della popolazione generale.

10.12.2 - Se la variante patogenetica del familiare di affetto da FC con variante patogenetica non identificata non è stata trovata mediante le indagini nel familiare, la probabilità di eterozigosi a posteriori del familiare è definita dalla probabilità di eterozigosi a priori, in relazione alla distanza di parentela dall'affetto FC, diminuita in relazione alla DR del test applicato nella popolazione specifica (Tab. 8). Nell'individuo della popolazione generale della coppia è indicata l'esecuzione di un test di I livello (qualora verificate le condizioni precedentemente descritte, e considerate le eccezioni, nel capitolo 5.1). La probabilità di eterozigosi a posteriori dell'individuo di popolazione generale è definita dalla probabilità di eterozigosi a priori diminuita in relazione alla DR del test applicato nella popolazione specifica. Conseguentemente viene calcolato il rischio di coppia.



**Figura 14 (Capitolo 10.12) - Diagramma di flusso per coppie formate da un individuo della popolazione generale e un familiare di affetto da FC con variante patogenetica del ramo familiare non identificata.**

**Tabella 8 (Capitolo 10.12.2) - Tabella dei rischi relativa alle coppie formate da un individuo della popolazione generale e un familiare di affetto da FC con variante patogenetica del ramo familiare non identificata.** Il primo membro della coppia è l'individuo di popolazione generale; il secondo membro della coppia è il familiare di affetto da FC con varianti patogenetiche non identificate. La frequenza del portatore considerata a priori nella popolazione generale è di 1 / 30; il rischio a priori di eterozigosi nel familiare di affetto da FC, in relazione alla parentela, è riportato in tabella. Sebbene sia indicato che all'individuo di popolazione generale venga applicato un test di I livello, per completezza vengono riportati i rischi anche nel caso di applicazione di un test di II e III livello.

	<i>Primo membro della coppia (individuo di popolazione generale) negativo al test genetico</i>			
	<i>Secondo membro della coppia (con la relazione di parentela indicata di seguito), negativo al test genetico</i>			
	<b>Fratello</b> di affetto da FC (rischio a priori 2 / 3)	<b>Zio</b> di affetto da FC (rischio a priori 1 / 2)	<b>Cugino di 1°</b> di affetto da FC (rischio a priori 1 / 4)	<b>Cugino di 1° e ½</b> di affetto da FC (rischio a priori 1 / 8)
	Detection rate del test genetico = 85% (I livello)			
Rischio di coppia per FC	1 / 3368 (0,0297 %)	1 / 5960 (0,01678%)	1 / 16324 (0,00613 %)	1 / 37053 (0,00270%)
	Detection rate del test genetico = 91% (I livello)			
Rischio di coppia per FC	1 / 8476 (0,0118%)	1 / 15658 (0,00639%)	1 / 44389 (0,00225 %)	1 / 101851 (0,00098%)
	Detection rate del test genetico = 97% (II e III livello)			
Rischio di coppia per FC	1 / 68382 (0,0015%)	1 / 132893 (0,00075%)	1 / 390937 (0,00026%)	1 / 907026 (0,00011%)

### 10.13 - Consanguinei

E' indicato che sia abitualmente indagata nel corso della consulenza genetica l'eventuale presenza di consanguineità. Essa infatti, favorendo la possibilità di condividere alleli di origine comune, incrementa il rischio di malattie autosomiche recessive.

Considerando:

- ✓ l'incidenza della malattia ( $q^2$ )
- ✓ la frequenza allelica ( $q$ )
- ✓ il coefficiente di inincrocio ( $F$ )

la probabilità che una coppia di consanguinei generi figli omozigoti per un allele di un comune antenato risulta pari a:  $q^2 + q \cdot (1-q) \cdot F$ .

Il rischio, ovviamente, si riduce per gradi di consanguineità meno stretti; persiste comunque superiore a quello della popolazione generale anche per una coppia di cugini di terzo grado.

Ai consanguinei è indicato applicare un test di I livello (qualora verificate le condizioni precedentemente descritte, e considerate le eccezioni, nel capitolo 5.1) (Fig. 15). In caso di negatività del test applicato, la probabilità di eterozigosi a posteriori è definita dalla probabilità di eterozigosi a priori (calcolata anche in base alla consanguineità) diminuita in relazione alla DR del test applicato nella popolazione specifica.

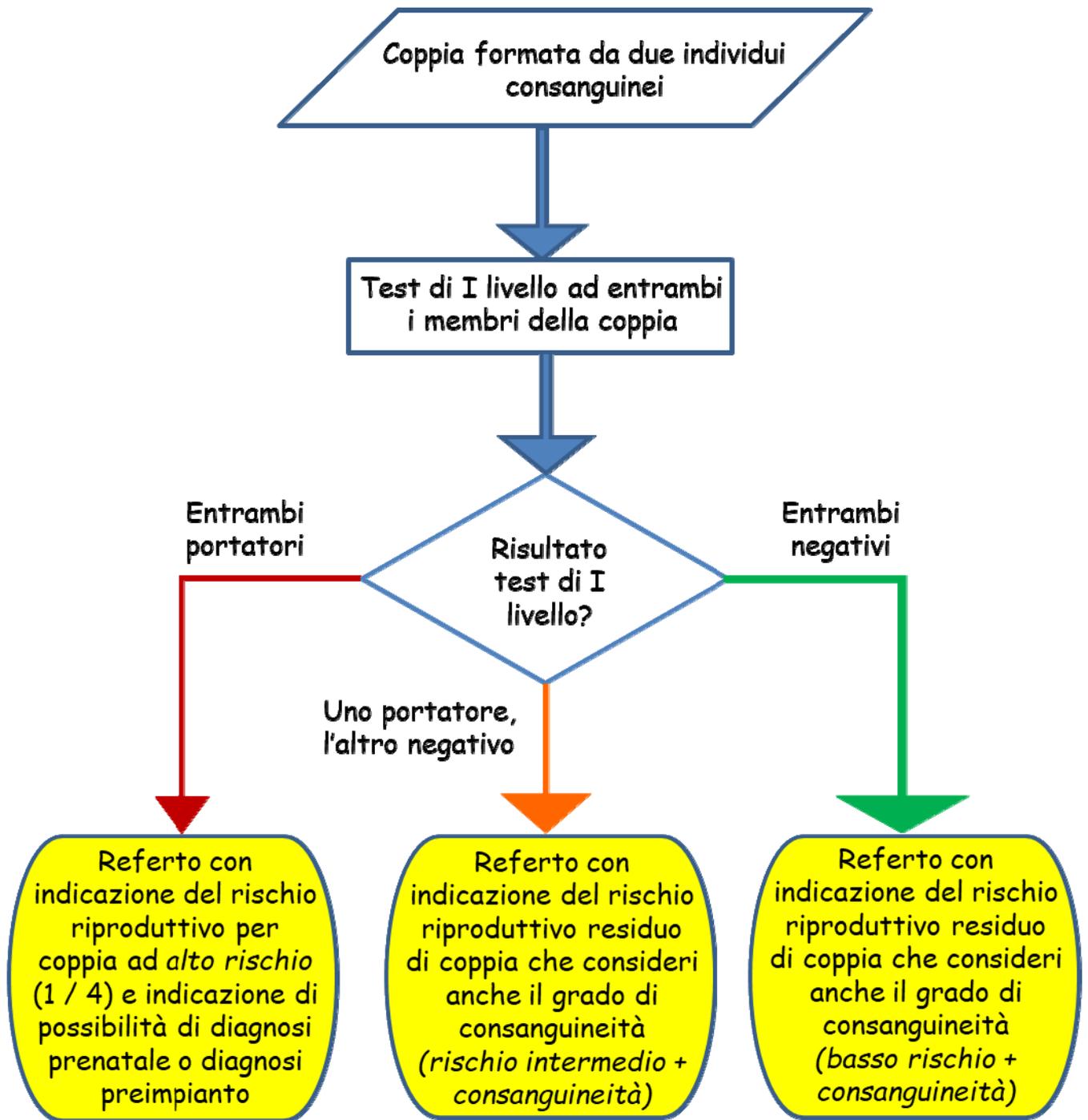


Figura 15 (Capitolo 10.13) - Diagramma di flusso per coppie formate da individui consanguinei.

## 11 - Assicurazione della qualità

L'assicurazione della qualità rappresenta uno strumento indispensabile per promuovere il miglioramento del livello delle prestazioni del laboratorio, l'accuratezza e la riproducibilità dei metodi analitici utilizzati, al fine di garantire l'attendibilità dei risultati ottenuti. Tutti i servizi di diagnostica in genetica molecolare devono rispettare un sistema di qualità (accreditamento e/o certificazione); l'assicurazione della qualità adegua il laboratorio agli standard locali, nazionali e internazionali. Offre inoltre garanzie per il trattamento del paziente.

Nell'ambito del miglioramento della qualità del laboratorio, è indicato prevedere un'attività regolare di formazione e aggiornamento del personale.

I laboratori clinici, nelle loro varie specializzazioni, devono far riferimento a programmi di certificazione o di accreditamento, riferendosi a specifiche linee guida, al fine di garantire e dimostrare la qualità del dato prodotto. Per quanto riguarda i criteri generali di assicurazione di qualità per i servizi di diagnostica in genetica molecolare è indicato far riferimento ai seguenti documenti:

1. Sistema di gestione per la qualità nei laboratori di genetica medica (SIGU 2013 rev 28.07.2013)
2. Linee guida per i test genetici (ISS Comitato per la biosicurezza e le biotecnologie 1998)
3. Orientamenti bioetici per i test genetici (comitato nazionale per la bioetica 1999)
4. Test genetici di suscettibilità e medicina personalizzata (comitato nazionale per la bioetica (2010).

Da un punto di vista generale molto utile risulta il documento pubblicato da EuroGentest (cytogenetic guidelines and quality assurance) nel quale viene declinata puntualmente la logica di gestione del sistema qualità.

E' importante sottolineare ancora come la continua evoluzione delle tecnologie renda necessario l'aggiornamento costante dei parametri di valutazione della qualità.

Possono essere distinti sistemi di assicurazione della qualità interni ed esterni al laboratorio.

### 11.1 - Assicurazione della qualità interna al laboratorio.

Viene gestita dal laboratorio. Deve essere rigorosa, regolare e applicata nelle varie fasi del test. Nella verifica di qualità è indicato che il laboratorio adotti sistematicamente dei controlli di qualità interni.

I test di genetica molecolare di solito generano risultati qualitativi e non numerici, pertanto è opportuno adottare anche criteri di controllo di qualità basati sul processo, intendendo come processo la successione degli stati attraversati da un sistema per ottenere un particolare risultato. In un sistema analitico il controllo di processo coincide con il controllo delle fonti della variabilità analitica, quindi l'uso del controllo di qualità in questi casi consiste nel predisporre, applicare e documentare le azioni necessarie per mettere sotto controllo le fonti di variabilità analitica allo scopo di garantire un risultato finale accurato. E' necessario utilizzare opportuni indicatori scelti per monitorare il processo analitico, e mediante i quali si riconoscono nelle diverse fasi del processo gli scostamenti dal valore atteso in grado di influenzare il risultato delle analisi. Fonti di variabilità che necessitano di costante controllo originano nelle seguenti fasi della lavorazione.

#### 11.1.1 - Fase preanalitica.

Viene garantita l'identificazione univoca del campione (possibilmente mediante barcoding).

È indicato che sia effettuata la verifica dell'integrità e coerenza del campione biologico e quindi del misurando (misurando = target analitico). E' indicato far riferimento a linee guida specifiche come ad esempio MM13-A CLSI (Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline) e QMS12-A CLSI (Development and use of quality indicators for process improvement and monitoring of laboratory quality; approved guideline).

#### 11.1.2 - Fase analitica.

Viene effettuato il controllo e la manutenzione delle apparecchiature analitiche, nonché la standardizzazione e l'aggiornamento delle metodiche.

In questo documento è già stato indicato che la ricerca delle varianti patogenetiche a carico del gene CFTR deve essere eseguita impiegando materiali diagnostici e presidi (kit) commerciali che abbiano conseguito marcatura CE (IVDD 98/79/EC) per l'uso di diagnostica in vitro (CE-IVD). Tuttavia, è buona

pratica di laboratorio, prima di introdurre qualsiasi kit, eseguire dei test di verifica del kit stesso in relazione a quanto dichiarato dalla casa produttrice, e in particolare nei termini di sensibilità, ripetibilità e riproducibilità. A tale scopo esistono linee guida di orientamento che possono aiutare a eseguire una corretta verifica all'interno del laboratorio (GP31-A, CLSI - Laboratory instrument implementation, verification and maintenance, approved guidelines; EP15A2E CLSI - User verification of performance for precision and trueness, approved guidelines) oppure può essere fatto riferimento alla norma UNI EN ISO 15189:2013 per i Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza.

Nel caso in cui fosse necessario sviluppare un particolare test o un vero e proprio kit per indagare varianti patogenetiche del gene CFTR, per un qualsiasi livello di approfondimento, il laboratorio dovrà procedere a una validazione completa del metodo, al fine di ottenere evidenze oggettive che i requisiti per l'uso specifico siano soddisfatti. A tal proposito si deve far riferimento allo standard stabilito dalla norma UNI EN ISO 15189.

E' indicato predisporre campioni di controllo. Come in tutte le tecniche laboratoristiche è necessario: allestire sia controlli positivi (in omozigosi ed eterozigosi) che controlli negativi (wild type), per evidenziare eventuali falsi negativi e falsi positivi, certificati o forniti da altri laboratori o generati internamente; verificare l'integrità del DNA estratto; approntare il "bianco di PCR" (un campione senza DNA al suo interno che deve essere trattato fino alle ultime fasi di lavorazione restituendo sempre una negatività analitica); usare marcatori di peso molecolare interni o esterni, dipendentemente dalla metodica applicata; verificare e riportare in NGS profondità (coverage) e percentuale di copertura del target.

È indicato che il laboratorio abbia disponibili test di conferma da applicare nei casi dubbi.

### 11.1.3 - Fase postanalitica.

Viene effettuata l'interpretazione del risultato, la verifica della correttezza del report, della conservazione dei risultati e dei documenti di registrazione della qualità.

È indicato che i risultati siano validati dal personale responsabile del test, che il referto sia completo e coerente con il quesito diagnostico e i dati clinici forniti

dall'utente, nonché che sia scritto utilizzando un linguaggio facilmente comprensibile sia all'utente che al medico richiedente.

I risultati che non siano trasferiti al sistema informativo in modo automatico (inserimento manuale), è indicato che siano validati in doppio (ovvero tramite la verifica di due persone), al fine di evitare sia errori macroscopici di inserimento sia errori di battitura o ortografici. E' auspicabile che nel referto vengano riportate eventuali anomalie riscontrate nel campione che potrebbero compromettere l'accuratezza del risultato.

#### 11.2 - Assicurazione della qualità esterna al laboratorio.

L'assicurazione/valutazione della qualità esterna (external quality assessment (EQA), valutazione esterna di qualità (VEQ) o "proficiency testing"), condotta da organismi riconosciuti a livello nazionale e/o internazionale, ha come scopo fondamentale la valutazione dell'intero processo analitico: ricezione del DNA, genotipizzazione, interpretazione e stesura di un referto scritto. Inoltre, queste procedure consentono una stima dell'uniformità dei risultati ottenuti in laboratori differenti e la valutazione comparativa di metodi differenti.

La valutazione esterna di qualità rappresenta un confronto interlaboratorio che ha finalità formative e di miglioramento continuo della qualità. L'obiettivo del programma di valutazione esterna di qualità è quello di garantire una valutazione oggettiva e indipendente della qualità del referto prodotto e non solo del dato analitico. E' indicato che il laboratorio partecipi ad almeno un programma esterno di qualità, riconosciuto a livello nazionale o internazionale, che comprenda la valutazione di tutte le fasi del processo. E' indicato che i campioni dei controlli di qualità siano analizzati allo stesso modo dei campioni clinici.

Per la FC sono disponibili:

- EQA Nazionale: Controllo esterno di qualità dei test genetici organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS);
- EQA Europeo: Cystic Fibrosis External Quality Assessment organizzato dall'European Molecular Genetics Quality Network (EMQN).

## 12 - Referto

E' indicato che il referto contenga tutte le informazioni, direttamente correlate ai risultati del test, utili a una corretta consulenza genetica. Nessuna informazione relativa al risultato dell'analisi di un individuo può essere comunicata a terzi, anche parenti, senza specifica autorizzazione dell'interessato o del tutore.

È indicato che il referto sia redatto nella forma più esauriente e interpretabile possibile, in modo da consentire anche al medico richiedente non-genetista una corretta interpretazione e modalità di comunicazione dell'esito del test all'individuo che si è sottoposto al test o ai genitori nel caso in cui questi sia minorenne.

Nel referto è indicato riportare una frase che consigli la consulenza genetica.

Nel caso in cui il referto sia emesso nell'ambito di un percorso di consulenza genetica è indicata una nota specifica.

È indicato che il referto risponda al quesito diagnostico del medico specialista inviante e che sia redatto in riferimento all'indicazione diagnostica.

Tutte le varianti riportate nel referto devono essere denominate secondo la più recente nomenclatura della "Human Genome Variation Society" (HGVS), allo scopo di dare una definizione univoca di posizione e caratteristiche.

Per tutte le varianti riportate nel referto, è auspicabile utilizzare, per favorire l'interpretazione, anche la nomenclatura tradizionale, secondo la versione più aggiornata del database CFTR1 (Cystic Fibrosis Mutation Database del Consorzio Internazionale Fibrosi Cistica (<http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html>)).

A titolo esemplificativo, si riporta di seguito uno schema di referto.

### Schema di referto

Nel referto è indicato siano presenti:

a) informazioni generali:

- Intestazione del Laboratorio che redige il referto, con indirizzo e riferimenti di contatto
- Titolo del test (Analisi molecolare per Fibrosi Cistica/Analisi molecolare del gene CFTR) con indicazione del riferimento MIM della patologia

(MIM\*219700) e della sequenza di riferimento del gene (es. NM\_000492.3). Deve essere segnalato anche a questo livello se si tratta di diagnostica prenatale.

- Data di stampa/completamento del referto
- Nome e affiliazione dello specialista inviante
- Indicazione all'esame (quesito diagnostico)
- Esame richiesto
- Nome e firma dell'esecutore dell'analisi e nome e firma del responsabile del servizio
- Numero di pagine in cui è redatto il referto; è altamente consigliato limitarsi ad una sola pagina
- Dichiarazione, in accordo con le indicazioni del gestore del programma, di aver partecipato a controlli esterni di qualità nazionali e/o internazionali.

b) dati del paziente:

- Nome e cognome
- Data di nascita (o Codice Fiscale)
- Sesso
- Origini etnico/geografiche

c) caratteristiche del campione:

- Data di arrivo
- Tipologia del campione (DNA, sangue periferico, villi coriali, amniociti coltivati ecc.)
- Se si tratta di DNA estratto presso altro laboratorio
- Numero identificativo del campione dato dal Laboratorio

d) caratteristiche delle metodiche:

- Metodiche utilizzate
- In caso di utilizzo di kit commerciali, tipo di kit e produttore (eventualmente anche il lotto di produzione)
- Elenco delle varianti patogenetiche ricercate e/o degli esoni analizzati del gene CFTR con indicazione della prima e ultima base analizzata per ciascun introne/esone; è indicato l'uso della nomenclatura HGVS; è opportuno che la nomenclatura HGVS sia ancora affiancata da quella tradizionale
- Sensibilità e specificità analitiche di ogni metodica utilizzata

e) risultato/interpretazione/conclusione:

- Varianti patogenetiche identificate e genotipo attribuito al paziente; in caso di omozigosi o eterozigosi composta, indicare l'opportunità dell'analisi dei genitori per la definizione/conferma del genotipo; in caso di risultato negativo, evidenziare l'assenza di varianti con significato patogenetico.
- DR (detection rate / sensibilità diagnostica) del test genetico per la FC; deve essere sempre indicata e riferita all'origine etnica dell'individuo analizzato
- Significato clinico delle varianti identificate (variante patogenetica, variante di significato funzionale non noto o controverso, ecc.)
- Interpretazione del risultato, che deve essere correlata al motivo dell'indagine (test del portatore, diagnosi prenatale, tipizzazione molecolare di un affetto, ecc)
- Quando appropriato, indicazione del rischio residuo (es. nel test del portatore individuale e di coppia, nelle coppie a rischio intermedio, nelle coppie ad alto rischio, ecc...).
- In caso di risultato positivo di entrambi i componenti di coppia a rischio, è opportuno indicare nel referto, oltre al rischio procreativo della coppia anche la possibilità di un'eventuale diagnosi prenatale e PGT.
- In caso di risultato positivo, è opportuno indicare l'analisi molecolare a familiari e eventuale partner.
- Raccomandazione per l'esecuzione della consulenza genetica (se il referto è solo di laboratorio) o indicazione che è allegata (se il referto viene consegnato nell'ambito della consulenza genetica post-test).

## 13 - Database, website e link ai principali software di analisi

### Database

- Central Mutation and SNP databases, <https://www.hgvs.org/central-mutation-snp-databases#main-content>
- CFTR1 - Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium database, [www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr)
- CFTR2 - Clinical and Functional Translation of CFTR, <https://www.cftr2.org/>
- ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
- EXAC - Exome Aggregation Consortium, <http://exac.broadinstitute.org/>
- gnomAD - Genome Aggregation Databases, <https://gnomad.broadinstitute.org/>
- IGSR and the 1000 Genomes Project, <http://www.internationalgenome.org/>
- Varsome, <https://varsome.com/>

### Software

- AlaMut - Interactive Biosoftware, <https://www.interactive-biosoftware.com/>
- CLUSTALW - Multiple Sequence Alignment, <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>
- HSF - Human Splicing Finder, <http://www.umd.be/HSF/>
- Panther - Classification system, <http://pantherdb.org/>
- PolyPhen-2 - Prediction of Functional Effect, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- SIFT - Sorting Intolerant from Tolerant, <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>
- TESS - Transcription Element Search System, <https://www.hsls.pitt.edu/obrc/index.php?page=URL1101824594>
- TFSEARCH - Searching Transcription Factor Binding Sites, <http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/TFSEARCH.html>

## 14 - Bibliografia

### **Premessa**

- Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) - *Genetica: linee guida per l'attività medica*. 2004.
- De Boeck K, Castellani C, Elborn JS; on behalf of the European Cystic Fibrosis Society (ECFS) Board. Medical consensus, guidelines, and position papers: a policy for the ECFS. *J Cyst Fibros* 2014;13:495-498.
- Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) - *Le 5 pratiche a rischio d'inappropriatezza di cui medici e pazienti dovrebbero parlare*. 2015.
- Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) - *Test genetici nel percorso di procreazione medicalmente assistita (PMA)*. 2016.
- de Souza DAS, Faucz FR, Pereira-Ferrari L, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. *Andrology* 2018; 6:127-135.

### **Definizioni**

- Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) - *Genetica: linee guida per l'attività medica*. 2004.
- Dequeker E, Stuhrmann M, Morris MA, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders - updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009;17:51-65.
- Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011;10:S86-S102.
- Ooi C, Castellani C, Keenan K, et al. Inconclusive diagnosis for cystic fibrosis after newborn screening. *Pediatrics* 2015;135:e1377-85.
- Farrel PM, Whiete TB, Ren CL et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus guidelines from the Cystic Fibrosis foundation. *J Pediatr* 2017; 181S:S4-15.

### **Capitolo 3**

- Estivill X, Bancells C, Ramos C; For the BIOMED CF mutation analysis consortium. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat* 1997;10:135-154.
- Castellani C, Benetazzo MG, Tamanini A, et al. Analysis of the entire coding region of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in neonatal hypertrypsinemia with normal sweat test. *J Med Genet* 2001;38:202-205.
- Narzi L, Lucarelli M, Lelli A et al. Comparison of two different protocols of neonatal screening for cystic fibrosis. *Clin Genet* 2002;62:245-249.

- Conferenza Stato-Regioni G.U. n.224 del 23.09.2004.
- Monaghan KG, Feldman GL. Stato attuale dei test genetici per la fibrosi cistica. *JCLA* (Ed. italiana) 2004;27:5-13.
- Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, et al; Gene Modifier Study Group. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005;353:1443-1453.
- Blackman SM, Deering-Brose R, McWilliams R, et al. Relative contribution of genetic and nongenetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 2006;131:1030-1039.
- De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al; on behalf of the Diagnostic Working Group. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006;61:627-635.
- Decreto Ministero della Salute (DM 8.05.2007).
- Bonizzato A, Castellani C. La diagnostica molecolare della fibrosi cistica e delle malattie correlate a mutazioni del gene CFTR. *Biochim Clin* 2008;32:77-83.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008;7:179-196.
- Dorfman R, Sandford A, Taylor C, et al. Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 2008;118:1040-1049.
- Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros* 2008;7:450-3.
- Conferenza Stato Regioni "Attuazione delle linee guida per le attività di Genetica Medica" n. 241 del 26.11.2009.
- Dequeker E, Stuhrmann M, Morris MA, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders - updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009;17:51-65.
- O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009;373:1891-1904.
- Becq F, Mall MA, Sheppard DN, et al. Pharmacological therapy for cystic fibrosis: From bench to bedside. *J Cyst Fibros* 2011;10:S129-S145.
- Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011;10:S86-S102.
- Conese M, Ascenzioni F, Boyd AC, et al. Gene and cell therapy for cystic fibrosis: From bench to bedside. *J Cyst Fibros* 2011;10:S114-S128.
- Rogan MP, Stoltz DA, Hornick DB. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Intracellular Processing, Trafficking, and Opportunities for Mutation Specific Treatment. *Chest* 2011;139:1480-1490.

- Lucarelli M, Pierandrei S, Bruno SM, Strom R. The genetics of CFTR: genotype - phenotype relationship, diagnostic challenge and therapeutic implications. In "Cystic Fibrosis - Renewed hopes through research", Intech open access publisher 2012 Chap. 5, 91 - 122.
- Rowe SM, Verkman AS. Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Correctors and Potentiators. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3(7).
- Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Gen Rev* 2014;16:45-56.
- Alton EW, Armstrong DK, Ashby D. et al. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial". *Lancet Resp Med* 2015;3:684-691.
- Burgel PR, Bellis G, Olesen HV, et al; ERS/ECFS Task Force on Provision of Care for Adults with Cystic Fibrosis in Europe. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *Eur Respir J* 2015;46:133-41.
- Lucarelli M, Bruno SM, Pierandrei S, et al. A genotypic-oriented view of CFTR genetics highlights specific mutational patterns underlying clinical macro-categories of cystic fibrosis. *Mol Med* 2015;21:257-275.
- Castellani C, Picci L, Tridello G, et al; Veneto CF Lab Network. Cystic fibrosis carrier screening effects on birth prevalence and newborn screening. *Genet Med* 2016;18:145-151.
- Mall MA. Unplugging Mucus in Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann Am Thorac Soc* 2016;13:S177-S185.
- Farrell PM, White TB, Howenstine MS et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis in screened populations. *J Pediatr* 2017;181S:S33-44.
- Sosnay PR, Salinas DB, White TB et al. Applying Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator genetics and CFTR2 data to facilitate diagnoses. *J Pediatr* 2017;181S:S27-32.
- Sosnay PR, White TB, Farrell PM et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis in nonscreened populations. *J Pediatr* 2017;181S:S52-57.
- Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, et al., VX17-445-102 Study Group. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a single Phe508del Allele. *N Engl J Med*. 2019; 381:1809-1819.

## **Reports**

- Report of a joint meeting of WHO/IECFMN/ICF(M)A/ECFS; WHO Genova: Human Genetics Programme; The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. WHO/HGN/CF/WG/04.02. 2002.
- European Cystic Fibrosis Society (ECFS) Patient registry, Report 2013.
- Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2014 Annual Data Report Bethesda, Maryland Cystic Fibrosis Foundation. 2015.
- Registro Italiano Fibrosi Cistica (RIFC), Rapporto 2015 - 2016 (comunicazione personale).
- Registro Italiano Fibrosi Cistica (RIFC), Sintesi 2016.

## **Capitolo 4**

- Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) - Genetica: linee guida per l'attività di genetica medica. 2004.

## **Capitolo 5**

- Stuppia L, Antonucci I, Binni F, et al. Screening of mutations in the CFTR gene in 1195 couples entering assisted reproduction technique programs. *Eur J Hum Genet* 2005;13:959-64.
- Lucarelli M, Bruno SM, Pierandrei S, Ferraguti G, Testino G, Truglio G, Strom R, Quattrucci S. The impact on genetic testing of mutational patterns of CFTR gene in different clinical macrocategories of cystic fibrosis. *J Mol Diag* 2016;18:554-565.
- Test genetici nel percorso della procreazione medicalmente assistita (PMA). Documento SIGU, Tavolo di consenso 22/11/2016.
- Felício V, Ramalho AS, Igreja S, Amaral MD. mRNA-based detection of rare CFTR mutations improves genetic diagnosis of Cystic Fibrosis in populations with high genetic heterogeneity. *Clin Genet* 2017;91:476-481.

## **Capitolo 6 e 7**

- Castellani C, Cuppens H, Macek M et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008;7:179-196.
- Rosendahl J, Landt O, Bernadova J, et al. CFTR, SPINK1, CTSC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut* 2013;62:582-92.
- Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet* 2013; 45:1160-1167.

- Lucarelli M, Bruno SM, Pierandrei S, et al. A genotypic-oriented view of CFTR genetics highlights specific mutational patterns underlying clinical macro-categories of cystic fibrosis. *Mol Med* 2015;21:257-275.

## **Capitolo 8**

- Molecular Testing for Cystic Fibrosis Carrier Status Practice Guidelines: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. Langfelder-Schwind E. *J Genet Counsel* 2014;23:5-15.
- Girardet A, Ishmukhametova A, Willems M, et al. Preimplantation Genetic Diagnosis for Cystic Fibrosis: the Montpellier centre's 10-year experience. *Clin Genet* 2015;87:124-132.

## **Capitolo 9**

- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008;7:179-96.
- Dequeker E, Stuhrmann M, Morris MA, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders - updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009;17:51-65.
- 1000 Genomes Project Consortium et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491:56-65.
- Aissat A, de Becdelièvre A, Golmard L, et al. Combined computational-experimental analyses of CFTR exon strength uncover predictability of exon-skipping level. *Hum Mutat* 2013;34:873-81.
- Masvidal L, Igreja S, Ramos MD, et al. Assessing the residual CFTR gene expression in human nasal epithelium cells bearing CFTR splicing mutations causing cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2014;22:784-91.
- Sharma N, Sosnay PR, Ramalho AS, et al. Experimental assessment of splicing variants using expression minigenes and comparison with in silico predictions. *Hum Mutat* 2014;35:1249-59.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-424.
- Karbassi I, Maston GA, Love A, et al. A standardized DNA variant scoring system for pathogenicity assessments in Mendelian disorders. *Hum Mutat* 2016;37:127-34.
- Terlizzi V, Castaldo G, Salvatore D, et al. Genotype-phenotype correlation and functional studies in patients with cystic fibrosis bearing CFTR complex alleles. *J Med Genet* 2017;54:224-225.

## Capitolo 10.2

- Castellani C, Picci L, Scarpa M, et al. Cystic fibrosis carriers have higher neonatal immunoreactive trypsinogen values than non-carriers. *Am J Med Genet* 2005;135A:141-144.
- Narzi L, Ferraguti G, Stamato A, et al. Does cystic fibrosis neonatal screening detect atypical CF forms? Extended genetic characterization and 4-year clinical follow-up. *Clin Gen* 2007;72:39-46.
- Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report *J Pediatr* 2008;153:S4-S14.
- Castellani C, Southern KW, Brownlee K, et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros* 2009;8:153-73.
- Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, et al. Defining the disease-liability of mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Gen* 2013;45:1160-7.
- Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *J Cyst Fibros* 2014;13:S23-S42.
- Ooi C, Castellani C, Keenan K, et al. Inconclusive diagnosis for cystic fibrosis after newborn screening. *Pediatrics* 2015;135:e1377-85.

## Capitolo 10.3

- Slotnick R, Abuhamed A. Prognostic implications of fetal echogenic bowel. *Lancet* 1996;347:85-87.
- Foster Bosco A, Norton ME, Lieberman E. Predicting the risk of cystic fibrosis with echogenic fetal bowel and one cystic fibrosis mutation. *Obstet Gynecol* 1999;6:1020-23.
- Muller F, Simon-Bouy B, Girardon E, et al. and the French collaborative group. Predicting the risk of cystic fibrosis with abnormal ultrasound signs of fetal bowel: results of a french molecular collaborative study based on 641 prospective cases. *Am J of Med Genet* 2002;110:109-115.
- Simon-Bouy B, Satre V, Ferec C, et al. and the French Collaborative Group. Hyperechogenic fetal bowel: A large French collaborative study of 682 cases. *Am J Med Genet* 2003;121A:209-213.
- Ogino S, Wilson RB, Gold B, et al. Bayesian analysis for cystic fibrosis risks in prenatal and carrier screening. *Genet Med*. 2004;6:439-49.
- Ogino S, Wilson RB, Grody WW. Bayesian risk assessment for autosomal recessive disease: fetal echogenic bowel with one or no detectable CFTR mutation. *J Med Genet* 2004;41:e70.

- Patel Y, Boyd PA, Chamberlain P, Lakhoo K. Follow up of children with isolated fetal echogenic bowel with particular reference to bowel-related symptoms. *Prenatal Diag* 2004;24:35-37.
- De Becdelieve A, Costa C, Jouannic JM, et al. Comprehensive description of CFTR genotypes and ultrasound patterns in 694 cases of fetal bowel anomalies: a revised strategy. *Hum Genet* 2011;129:387-96.
- Il test genetico per portatore di Fibrosi Cistica: guida alla scelta - <http://testfibrosicistica.org/>  
<http://www.fibrosicisticaricerca.it/wp-content/uploads/2015/03/Test-portatore-sano.pdf>

### **Capitolo 10.7**

- Abeliovich D, Quint A, Weinberg N, et al. Cystic fibrosis heterozygote screening in the orthodox community of Ashkenazi Jews: the Dor Yeshorim approach and heterozygote frequency. *Eur J Hum Gen* 1996;4:77-82.
- Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med* 2004;6:387-391.
- Hale JE, Parad RB, Comeau AM. Newborn screening showing decreasing incidence of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2008;358:973-974.
- Massie J, Petrou V, Forbes R, et al. Population-based carrier screening for cystic fibrosis in Victoria: the first three years experience. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2009;49:484-489.
- Zlotogora J. Population programs for the detection of couples at risk for severe monogenic genetic diseases. *Hum Genet* 2009;126:247-253.
- American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. ACOG Committee Opinion No. 486: Update on carrier screening for cystic fibrosis. *Obstet Gynecol* 2011;117:1028-1031.
- Grody WW, Thompson BH, Gregg AR, et al. ACMG position statement on prenatal/preconception expanded carrier screening. *Genet Med* 2013;15:482-483.
- Castellani C, Picci L, Tridello G, et al. and the Veneto CF Lab Network. Cystic fibrosis carrier screening effects on birth prevalence and newborn screening. *Genet Med* 2016;18:145-151.
- Gartner S. Comunicazione personale sulla diminuzione dell'incidenza della FC in Spagna, nelle regioni dove viene offerto il test del portatore. 2018.

## **Capitolo 11**

- ISS - Comitato per la biosicurezza e le biotecnologie. Linee Guida per i test genetici. 1998.
- Comitato nazionale per la bioetica. Orientamenti bioetici per i test genetici. 1999.
- CLSI. MM13-A - Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. 2005.
- CLSI. EP15A2E - User verification of performance for precision and trueness; approved guideline. 2006.
- CLSI. GP31-A - Laboratory instrument implementation, verification and maintenance; approved guideline. 2009.
- CLSI. QMS12-A - Development and use of quality indicators for process improvement and monitoring of laboratory quality; approved guideline. 2010.
- Comitato nazionale per la bioetica. Test genetici di suscettibilità e medicina personalizzata. 2010.
- Norma UNI EN ISO 15189:2013 per i Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza. 2013.
- SIGU. Sistema di gestione per la qualità nei laboratori di genetica medica. 2013 (rev 28.07.2013).

## **Capitolo 12**

- Autorizzazione n. 8/2014 - Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici - 11 dicembre 2014 (Pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n. 301 del 30 dicembre 2014).