

## SPECIFICHE TECNICHE TEST PER LA RICERCA DELLE MUTAZIONI SUL GENE CHE CODIFICA PER LA PROTEINA *CFTR*

### FIBROSI CISTICA

La Fibrosi Cistica (FC) è tra le più comuni malattie genetiche a trasmissione autosomica recessiva, con una frequenza della malattia di circa uno su 2500 nati ed una frequenza di individui portatori stimata in circa uno su 25 individui nella razza Caucasica. Il gene responsabile della malattia è stato identificato sul cromosoma 7 e codifica per una proteina chiamata *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*). I geni vengono ereditati in coppie e derivando uno dal padre ed uno dalla madre. Negli individui malati entrambe le copie del gene per la FC sono alterate. Gli individui che possiedono una sola copia del gene alterato e una normale sono invece privi di ogni sintomo e vengono definiti portatori sani. L'unico modo per identificare i portatori sani è quello di effettuare un test sul DNA alla ricerca di mutazioni nel gene della FC. L'analisi però è complicata dal fatto che esistono numerosissime mutazioni (ad oggi oltre 900) che causano la FC; molte di esse sono rare, molte altre ancora sconosciute. Il test genetico di primo livello non è in grado di identificarle tutte. In casi particolari, adeguatamente valutati dal genetista, può essere eseguito anche un test genetico che prevede l'analisi di mutazione dell'intero gene *CFTR* (secondo livello di analisi), con conseguente ricerca di tutte le mutazioni sinora scoperte (Tab 1)

**Tab.1: Il test per il portatore FC. Probabilità residua di essere portatore e rischio di avere figli affetti da Fibrosi Cistica dopo il test.**

% di mutazioni FC identificabili	Probabilità residua di essere portatore se il test è negativo	Rischio di avere un figlio affetto da FC se	
		uno portatore l'altro negativo al test	entrambi negativi al test
70	1:82	1:331	1:27.400
75	1:99	1:396	1:39.200
80	1:124	1:494	1:61.000
85	1:165	1:661	1:109.200
90	1:246	1:984	1:242.100
95	1:491	1:1964	1:964.400

Frequenza ipotizzata del portatore 1:25. Rischio generico di avere un figlio affetto da fibrosi cistica prima del test 1:2500.

*Lemna W et al, N Engl J Med 1990, 322, 295 e modificato secondo quanto riportato da: Linee Guida Per L'uso Del Test Genetico Per Fibrosi Cistica, Documento elaborato dalla Commissione Genetica del Gruppo di Studio Fibrosi Cistica (GSFC) della Società Italiana di Pediatria (SIP) e approvato dalla Società Italiana di Genetica Umana (SIGU)*

- **Primo livello** (71 mutazioni)

Il test di *screening* per la ricerca delle più comuni mutazioni del gene *CFTR* comprende 71 **mutazioni** + alleli poliT variamente ricorrenti nella popolazione Europea ed è effettuato mediante PCR e tecniche di ibridazione con sonde allele specifiche. Il DNA dei pazienti viene analizzato per 71 mutazioni tra le più frequenti nella popolazione europea. Il protocollo prevede l'estrazione del DNA genomico, l'amplificazione attraverso una reazione di PCR (Polymerase Chain Reaction) con *primers* specifici per il gene che codifica la proteina *CFTR*, successiva reazione ASPE (Allele Specific Primer Extension) dei prodotti amplificati, identificazione e caratterizzazione, con tecnologia xMAP, delle mutazioni e delle varianti.

- **Sensibilità del test:** > 90% nei soggetti della popolazione italiana ed europea caucasica.

- **Secondo livello** (sequenziamento dell'intera regione codificante del gene *CFTR*)

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

Il test prevede il sequenziamento dell'intera regione codificante del gene *CFTR* (Codice del test: CG49).

L'analisi viene condotta operando inizialmente una reazione enzimatica di amplificazione del DNA (Polymerase Chain Reaction, PCR). In tale maniera viene amplificata la regione codificante e parte della regione intronica per ciascuno dei 27 esoni del gene localizzato sul cromosoma 7 che codifica per la proteina *CFTR*. Successivamente, gli amplificati di PCR, della lunghezza di 400 paia di basi, vengono sottoposti ad una reazione di sequenziamento nucleotidico sia per il filamento *forward* che per il filamento *reverse*. Il controllo della presenza delle mutazioni riportate nella Banca Dati del Consorzio Internazionale delle Mutazioni del gene *CFTR*: "The Cystic Fibrosis Mutation Database", [www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/), viene effettuata attraverso l'impiego di un sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer). L'eventuale identificazione di una mutazione viene sempre confermata mediante ripsequenziamento dell'esone o introne corrispondente.

- **Sensibilità del test:** > 90% nei soggetti della popolazione italiana ed europea caucasica.

Per informazioni e chiarimenti contattare la Segreteria del Laboratorio  
dal lunedì al venerdì dalle ore 10 alle ore 14.30 allo 0412906434