



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

X Convegno
**Recenti acquisizioni
in tema di gravidanza a rischio**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 21 maggio 1999

Atti a cura di D. Taruscio

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

99/31

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

X Convegno
**Recenti acquisizioni
in tema di gravidanza a rischio**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 21 maggio 1999

Atti a cura di *Domenica Taruscio*
Laboratorio di Ultrastrutture

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN
99/31

Istituto Superiore di Sanità

X Convegno. Recenti acquisizioni in tema di gravidanza a rischio. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 21 maggio 1999.

Atti a cura di Domenica Taruscio

1999, 46 p. Rapporti ISTISAN 99/31

Contiene relazioni sui seguenti argomenti: ecografia morfologica nel primo trimestre di gravidanza; markers ecografici di cromosomopatie nel primo trimestre di gravidanza; eziologia delle malformazioni cardiache; valutazione morfologica del cuore fetale in corso di screening ultrasonografico; infezioni virali in gravidanza; standardizzazione ed assicurazione di qualità dei test genetici; la consulenza genetica per la diagnosi delle cromosomopatie; prevenzione delle malattie genetiche; terapia genica.

Parole chiave: Diagnostica prenatale, Fattori di rischio, Test genetici

Istituto Superiore di Sanità

X Congress. Recent advances in high risk pregnancy. Istituto Superiore di Sanità. Rome, May 21, 1999.

Proceedings edited by Domenica Taruscio

1999, 46 p. Rapporti ISTISAN 99/31 (in Italian)

The lectures deal with the following topic: morphological ecography in the 1st trimester of pregnancy; ecographic markers of chromosomal diseases in the 1st trimester of pregnancy; etiology of heart defects; morphological evaluation of fetal heart in the course of ultrasonographic screening; viral infections in pregnancy; genetic tests: standardisation and quality assurance; genetic counselling in the diagnosis of chromosomal diseases; prevention of genetic diseases; genetic therapy.

Key words: Genetic tests, Prenatal diagnosis, Risk factors

Il Congresso è stato organizzato in collaborazione con l'Azienda USL RMA, Dipartimento Materno-Infantile ed il Servizio di Medicina Prenatale dell'Ospedale S. Giacomo - Polo Ospedaliero Roma Centro

Elenco dei relatori e moderatori:

A. Ballabiò, R. Carozzo	TIGEM, Milano
C.M. Bilardo	University of Amsterdam, The Netherlands
A. Bonomo	Azienda USL RMA, Roma
G. Cossu	Università "La Sapienza", Roma
G. D'Ottavio	Istituto per l'Infanzia "Burlo Garofolo", Trieste
N. Gussetti	Azienda Ospedaliera, Padova
E. Maggi	Università "La Sapienza", Roma
B. Marino	Ospedale Pediatrico "Bambin Gesù", Roma
G. Neri	Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
P. Rodinò	Azienda USL RMA, Roma
D. Taruscio	Istituto Superiore di Sanità, Roma

Presidente: G. Benagiano

Segretario: A. Bonomo

Comitato scientifico: D. Taruscio, G. Gelli, A. Morici.

Comitato organizzatore: A. Bonomo, A. Morici, G. Dell'Uomo, D. Taruscio

Segreteria tecnica:

L. Di Marzo, D. Lombardo, N. Mancino, M.C. Quattini, F. Tosto, L. Tranquilli.

Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

Tel. 06/49902805; Fax 06/49387140

E-mail: taruscio@iss.it

INDICE

Introduzione G. Benagiano	pag. 1
Ecografia morfologica nel I trimestre di gravidanza G. D'Ottavio	pag. 5
Spessore della plica nucale (nuchal translucency): marker ecografico delle anomalie del cariotipo fetale in gravidanza precoce C.M. Bilardo	pag. 13
Genetica delle cardiopatie congenite. B. Marino	pag. 17
Infezioni virali in gravidanza: nuove acquisizioni N. Gussetti	pag. 19
Test genetici: standardizzazione ed assicurazione di qualità D. Taruscio	pag. 25
La consulenza genetica per la diagnosi delle cromosomopatie: attualità e prospettive G. Neri	pag. 29
Genetica: nuove strategie di ricerca e nuove prospettive in medicina A. Ballabio	pag. 37
Terapia genica: attualia' e prospettive G. Cossu	pag. 39

Introduzione

Come potete immaginare rientra tra i miei compiti istituzionali dare il benvenuto all'inizio delle decine di Convegni e Conferenze che si svolgono in questo Istituto. E', per così dire, un compito di routine. Ci sono però le eccezioni: ieri ho inaugurato un Convegno sulla Menopausa, argomento che mi sta particolarmente a cuore; ed oggi sono qui ad aprire un Convegno che vede la sua decima edizione, ma che ha oltre quindici anni di età, che mi ha visto - fin dall'inizio ed assieme all'amico Arturo Bonomo - come ideatore e promotore. Quindi due Convegni di mio stretto interesse in due giorni; cosa che mi dà molta soddisfazione.

Sono quindi particolarmente lieto di darVi il più cordiale benvenuto, sia a Voi amici Relatori che a Voi partecipanti tutti. E' il secondo anno che il Convegno si tiene presso l'Istituto Superiore di Sanità e questo mi sembra certamente un segnale chiaro del crescente interesse della istituzione centrale del SSN verso i temi della salute riproduttiva, intesa nel senso più ampio di protezione della fertilità, della gravidanza e del concepito. Tra l'altro mi pare il dovuto, visto che a dirigere l'Istituto c'è oggi un ginecologo!

Una moderna visione del concetto di sanità pubblica e l'affermarsi di valori sociali largamente condivisi attribuiscono grande importanza alla prevenzione, motore primo della riduzione dei rischi legati alla gravidanza, momento in cui esiste questo fenomeno unico e bellissimo dell'unità madre-concepito. L'azione sanitaria deve quindi tutelare sia la salute della madre che quella dell'embrione, del feto e del neonato. Ciò si realizza applicando al feto il complesso di tutte le conoscenze disponibili nel campo della prevenzione, della diagnosi e della terapia. Affinchè tutto ciò non rimanga una semplice affermazione di principio, cosa che in Italia avviene spesso, è necessario incrementare le conoscenze scientifiche e le risorse in diversi settori, con una particolare attenzione allo stimolare la collaborazione interdisciplinare.

Mi sembra proprio questo il contributo migliore che un Istituto, interdisciplinare per eccellenza, può portare sull'argomento che vi interessa. E' indispensabile un incremento delle conoscenze sulla etio-patogenesi delle diverse patologie fetali; una

particolare attenzione va data alle interazioni fra suscettibilità genetica e fattori di rischio ambientali nell'insorgenza di malattie multifattoriali, quali ad esempio numerose malformazioni congenite.

Le conoscenze etiologiche sono indispensabili per indirizzare gli interventi di prevenzione primaria, miranti alla rimozione o alla riduzione della presenza di specifici fattori di rischio (ad esempio contaminanti ambientali, sostanze presenti nei luoghi di lavoro, malattie infettive, qualità dell'alimentazione, farmaci, stili di vita). Inoltre, la conoscenza della etiopatogenesi è necessaria per poter intervenire nell'ambito della prevenzione secondaria; cioè per la rimozione o riduzione delle possibili manifestazioni delle patologie, come nel caso delle gravidanze di madri diabetiche o con difetti del metabolismo dell'acido folico.

Un secondo punto è quello della diagnosi. Per poter intervenire in maniera mirata e con un ottimale rapporto rischio/beneficio sulla gravidanza a rischio occorre, infatti, incrementare le conoscenze sulla diagnosi sia delle patologie che dei fattori di predisposizione.

Migliorare la diagnosi deve significare sia la messa a punto di nuovi test diagnostici, sia la accurata valutazione della loro utilità clinica, sia l'ottimizzazione di sistemi per la assicurazione di qualità, sia infine l'impegno per garantire una omogeneità di prestazioni sanitarie su tutto il territorio nazionale. Questo comporta quindi non solo una mobilitazione di risorse nel campo della ricerca di base ed applicata, ma anche l'elaborazione di linee guida e protocolli diagnostico-terapeutici.

Un ulteriore punto è l'intervento sanitario a livello di popolazione. Per mirare tali interventi e per indirizzare in maniera ottimale le risorse del SSN occorre un adeguato utilizzo degli strumenti forniti dall'epidemiologia. In particolare, va sottolineata la necessità dei Registri di patologia per il ruolo di estrema importanza che essi rivestono nelle azioni di sorveglianza, di prevenzione e di educazione sanitaria. Il Registro di patologia è una struttura epidemiologica che realizza la continua e completa raccolta, registrazione, conservazione ed elaborazione di informazioni relative a soggetti affetti da una data patologia, in una data area geografica ed in un periodo di tempo definito. A questo proposito, per assicurare la qualità dei dati che afferiscono al Registro, è indispensabile assicurare il costante collegamento del Registro stesso con le strutture sanitarie incaricate di operare la diagnosi. Il funzionamento ottimale di un Registro rende

possibile stimare l'incidenza di un evento, studiarne la distribuzione nello spazio e nel tempo, compresa la presenza di eventuali "clusters", ed inoltre verificare l'efficienza e l'efficacia di azioni di prevenzione intraprese o di scelte sanitarie effettuate. Non bisogna dimenticare che il Registro, una volta operativo, potrà avere un ruolo importante nell'identificazione di priorità di ricerca e nella promozione di studi interdisciplinari volti a migliorare le conoscenze relative ad una data patologia.

In particolare, è importante la messa a punto di Registri nazionali; questi, data l'ampiezza della casistica e della rete di collaborazione instaurata, sono uno strumento di estrema efficacia per lo studio di eventi rari, quali la gran parte delle malattie genetiche e delle malformazioni congenite. Io di questo non solo sono convinto, ma promotore accanito; si tratta di un salto di qualità e di conoscenze di cui non possiamo fare a meno. E' vero - e la dott.ssa Taruscio non me ne abbia a male che quest'accento ai registri me l'ha suggerito Lei, visto che è quello di cui si occupa; è anche vero che io l'accento sui registri lo metto volentieri, perchè sono uno strumento molto importante.

Un obiettivo primario dell'approccio epidemiologico in generale dei registri in particolare deve essere, infatti, l'identificazione di sottopopolazioni e/o situazioni ambientali a particolare rischio su cui mirare specificamente degli interventi preventivi.

Da medico, da ginecologo, devo anche sottolineare il fatto che non deve essere dimenticata la necessità di potenziare gli strumenti terapeutici. E' necessario un incremento delle conoscenze, delle risorse e delle energie dedicate alla terapia delle patologie fetali e dei disturbi della gravidanza in modo che, per quanto possibile, tali patologie non vengano considerate come malattie su cui è impossibile un intervento clinico-terapeutico.

Last but not least, vorrei ricordare che viviamo in un'epoca in cui alla settorializzazione, forse inevitabile, delle competenze e dei linguaggi, si contrappone la indispensabile esigenza di distribuire e ricevere informazioni e di stabilire interazioni positive fra energie e saperi diversi.

E' necessario costituire reti per la comunicazione e l'interscambio delle informazioni tra chi fa ricerca e chi individua le priorità di intervento sanitario; tra queste due componenti e gli operatori sanitari sul territorio, sia nel settore della prevenzione che

in quello clinico-diagnostico; infine fra il complesso delle strutture che agiscono in campo sanitario e gli utenti del SSN. E' chiaro che un moderno sistema di sanità pubblica deve prevedere l'interscambio di informazioni anche con il pubblico, dialogando con le richieste e gli stimoli che vengono dagli utenti. In tale senso possono avere un ruolo di grande importanza le associazioni dei malati e dei loro familiari.

Possiamo dire che, idealmente, l'educazione sanitaria dovrebbe essere un processo bidirezionale, tra i componenti della sanità pubblica e gli utenti.

Concludo con un cordiale augurio di buon lavoro e con l'auspicio che l'iniziativa abbia pieno successo, non solo dal punto di vista della partecipazione e della qualità scientifica delle relazioni ma anche da quello sempre più necessario della interazione multidisciplinare su problemi prioritari per la sanità pubblica.

Giuseppe Benagiano
Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità

ECOGRAFIA MORFOLOGICA NEL I TRIMESTRE DI GRAVIDANZA

G. D'Ottavio, Y.J. Meir, M.A. Rustico, G. Conoscenti, A. Grasso, L. Fischer-Tamaro, R.Natale

Istituto "Burlo Garofolo" - IRCCS - Trieste

Introduzione

L'Ecografia TransVaginale (ETV), ha aperto nuovi orizzonti nello studio della fisiologia e patologia della gravidanza precoce: la datazione è sicuramente più accurata, non solo per la maggiore precisione nella biometria ma perchè esiste una stretta correlazione tra le misure e gli aspetti sono-embriologici (1, 2). Inoltre, attraverso questa metodica viene dato un contributo fondamentale alla conoscenza della storia naturale delle malformazioni e di quei segni spesso transitori definiti 'marker ecografici' delle anomalie cromosomiche (3).

Molti autori hanno già dimostrato le notevoli possibilità diagnostiche dell'ETV, specialmente nelle mani di operatori altamente specializzati e in popolazioni selezionate di gravide (4, 5, 6, 7). D'altra parte, in vista della larga diffusione della metodica, è parimenti auspicabile una regolamentazione del suo uso routinario.

Lo scopo del nostro lavoro è stata la valutazione dell'accuratezza dell'ETV come test di screening nella diagnosi delle malformazioni fetali in una popolazione non selezionata di gravide, paragonando i risultati ottenuti a 14 settimane con quelli dell'ecografia transaddominale tra 20 e 22 settimane.

Al fine di soddisfare i criteri di un test di screening (che deve essere ben tollerato, condotto in tempi brevi e a basso costo), gli esami sono stati effettuati da vari operatori con diverso grado di esperienza, utilizzando strumenti adeguati in un tempo prefissato, ritenuto generalmente sufficiente per una completa valutazione dell'anatomia fetale.

Materiali e metodi

Fin dal 1982, nel nostro Istituto viene condotto un programma di screening di massa delle malformazioni fetali (8); negli ultimi cinque anni a tutte le gravide presentatesi alla prima visita nei nostri ambulatori è stato offerto un esame ultrasonografico TV addizionale, oltre a quello generalmante effettuato tra la 20-22 settimana.

Sono state così reclutate 5058 gravide per un totale di 5100 feti (42 coppie di gemelli). Gli esami sono stati eseguiti da 5 operatori con una esperienza iniziale, in campo ultrasonografico, di almeno un anno, con la supervisione di 2 esperti, utilizzando due Acuson 128 XP10 e XP4 con sonda TV e TA da 5.0 MHz e un Ansaldo AU 920 con sonda TA da 5.0 MHz.

Durante il tempo massimo di 30 minuti concesso per l'esame, oltre alla valutazione dell'anatomia fetale è stato riempito un protocollo computerizzato, registrando per ciascun organo la visualizzazione e qualunque reperto anomalo incontrato.

L'epoca gestazionale è stata confermata con la misurazione del diametro biparietale e del femore.

Tutte le pazienti tranne 40 (che hanno scelto di interrompere la gravidanza sulla base del risultato del primo screening) hanno eseguito il controllo TA nel secondo trimestre. Gli esiti di tutte le gravidanze sono noti, compresi i riscontri autoptici dei feti malformati abortiti.

Sono, inoltre, stati allestiti 80 cariotipi dei 95 feti malformati (solo 4 colture non sono cresciute), i rimanenti 15 neonati presentavano un fenotipo normale alla nascita.

Risultati

Nei 5100 feti esaminati con ETV, sono state diagnosticate 70 malformazioni mentre 36 non sono state riconosciute, di queste 25 sono state scoperte al rescreeing del secondo trimestre e 11 più avanti in gravidanza o dopo la nascita.

Non ci sono stati casi di falsi positivi, poichè ogni dubbio interpretativo è stato risolto nelle 2 settimane successive al primo esame.

L'edema focale o generalizzato è stata la diagnosi più frequente nello screening precoce (40 casi), le altre malformazioni comprendevano: 8 malformazioni scheletriche inclusa anche una delle diagnosi più precoci riportate in letteratura di Osteogenesi Imperfecta (9), 5 anomalie del tratto urinario (prevalentemente ostruzioni basse associate con malformazioni di altri organi), 5 difetti congeniti del cuore, 5 malformazioni maggiori del sistema nervoso centrale, 5 difetti della parete addominale e diaframma, 1 caso di gemelli toracopaghi.

La sensibilità dello screening transvaginale è stata quindi del 66% (70 malformazioni diagnosticate su un totale di 106) rispetto all'esito finale della gravidanza e del 73.7% nei confronti dello screening TA (70 malformazioni riconosciute su 95 diagnosticate entro la

22 settimana).

Abbiamo inoltre trovato 22 aneuploidie e 54 cariotipi normali: la maggiore associazione tra cariotipo anomalo e malformazione eco-evidenziata è stata riscontrata nel gruppo degli edemi sia focali che generalizzati.

Discussione

Se esaminiamo i falsi negativi dello screening transvaginale (Tabella 1), correttamente riconosciuti al rescreeing TA, notiamo che i difetti cardiaci congeniti rappresentano circa un terzo delle diagnosi mancate (8/25). In quattro casi (stenosi aortica severa, 2 canali AV completi e canale AV incompleto) la visualizzazione delle strutture cardiache era stata definita insufficiente dall'operatore, mentre nelle altre 4 (ventricolo sinistro ipoplasico, canale AV completo, Tetralogia di Fallot e un ampio difetto interventricolare) erano state considerate erroneamente normali. E' quindi possibile che un tempo di osservazione più lungo avrebbe permesso una più accurata valutazione in almeno quattro casi (10).

Negli altri 17 casi di malformazioni extracardiache, nonostante una valutazione dell'anatomia fetale definita soddisfacente, le anomalie non sono state riconosciute all'ETV. Almeno in sei di queste però (ernia diaframmatica destra, 3 idronefrosi monolaterali, piede torto monolaterale) è possibile che la natura progressiva delle malformazioni abbia giocato un ruolo determinante nella mancata diagnosi precoce

Tabella 1 - Risultati dello screening transvaginale nella diagnosi delle malformazioni fetali

APPARATO	DETECTION RATE	VERI POSITIVI	F. NEGATIVI vs ecografia TA	F.NEGATIVI vs nascita
LINFATICO	40 / 40	7 Igromi settati 14 Igromi non settati 19 Edemi nucali		
SCHELETRO	8 / 16	O. Imperfecta Ipofofosfatasia 2 Piede torto 3 Labiopalatoschisi Emispondili mult.	Agnesia radiale Piede torto 3 Labiopalatoschisi Agnesia sacrale	Acondropl. eteroz Piede torto
URINARIO	6 / 14	Megavesicica 3 Megavesicica + 2 Idronefrosi	Rene pelvico 4 Idronefrosi	Estrofia vescicale 2 idronefrosi
S. NERVOSO C.	5 / 8	Exencefalia Iniencefalia Dandy-Walker 2 Spina bifida	Oloprosencefalia Dandy-Walker var. Spina bifida	
CARDIOVASCOL.	5 / 16	2 TOF FEE + St. Aortica Dilatazione VD + DIA VS ipoplasico	TOF St. Aortica 4 CAV (1 inc.) VS ipoplasico Ampio DIV (+ malf)	Stenosi Aortica Coartazione Aortica RVPAT
PARETE ADDOM. GASTR ENTERICO	5 / 9	Gastroschisi 3 Onfalocele Ernia diaframm sn	Ernia diafram. dx	2 Atresie esof. + fist. Atresia anorettale
MISCELLANEA	1 / 3	Gemelli toracopaghi	M. aden. cistica p. Epignatus	
TOTALE	70 / 106	70	25	11

TOF= Tetralogia di Fallot FEE= Fibroelastosi Endocardica CAV= Canale Atrioventricolare VS= Ventricolo Sinistro DIV= Difetto Inter Ventricolare RVPAT= Ritorno venoso polmonare anomalo totale

Per quello che riguarda le mancate diagnosi al recreening TA, escludendo tre casi (estrofia vescicale, stenosi aortica e piede torto) è ragionevole pensare che le restanti anomalie (acondroplasia eterozigote, 2 atresie esofagee con fistola, idronefrosi, atresia anorettale, coartazione aortica) non potessero essere diagnosticate entro la 22^{ma} settimana alla luce delle attuali conoscenze della storia naturale delle malformazioni.

Un altro dato importante emerge, inoltre, dalla valutazione dei risultati del nostro studio e riguarda l'alto tasso di aneuploidie diagnosticate sulla base dell'indicazione ecografica (Tabella 2)

Tabella 2 - Malformazioni fetali diagnosticate con ETV ed ETA e anomalie del cariotipo

APPARATO	N.Diagn. ETV	aneuploidie / cariotipi noti	anomalia cromosomica	N.Diagn. ETA	aneuploidie / cariotipi noti	anomalia cromosomica
LINFATICO						
Igromi settati	7	4/6	2 Trisomie 21 47,xx + 18 45,x			
Igromi non settati	14	4/14	2 trisomie 21 45,x / 46,x + mar 46,xx/46,x + mar			
Edema nucale	19	5/19	4 Trisomie 21 46,xy,11q+			
SCHELETRO						
	8	0/6		6	1/6	Agnesia sacrale 69,xxx
URINARIO						
	6	1/4	Megavesica + * 46,xy/47,xy + 18	5	1/5	Idronefrosi bilat. 46,xx 20q+
S. NERVOSO C.						
	5	0/5		3	0/3	
CARDIOVASC.						
	5	1/4	VD dil + DIA**	8	2/8	2 CHD + cpc 2 trisomie 18
P. ADDOMIN.						
	5	1/5	omfalocele 47,xx + 13	1	0/1	
MISCELLANEA						
	1	1/1	Gemelli toracop. Trisomia 4 (mos.)	2	0/2	
TOTALE	70	17/64 (31.1 %)		25	4/25 (13.0 %)	

ETV= Ecografia TransVaginale, ETA= Ecografia TransAddominale, CAV= Canale AtrioVentricolare, cpc= cisti dei plessi corioidei, *= mani e piedi torti, DIA= Difetto Inter Atriale ** = labiopalatoschisi.

Nessuna delle 10 malformazioni scoperte dopo la 22^{ma} settimana o dopo la nascita era associata ad anomalie cromosomiche

Nella popolazione di feti da noi indagata erano presenti 24 anomalie cromosomiche, 17 riconosciute sulla base dei reperti anomali identificati allo screening transvaginale a 14 settimane, 5 al rescreeing transaddominale e 2 osservati dopo la nascita in neonati senza malformazioni.

In altre parole, siamo stati in grado di riconoscere il 70% delle aneuploidie grazie allo

screening precoce TV da solo e l'91.6% in combinazione col rescreeing TA a 20-22 settimane.

Possiamo quindi concludere che utilizzando l'ETV come test di screening è possibile diagnosticare più del 60% delle malformazioni maggiori e minori presenti alla nascita con un'altissima specificità (100%) che permette di evitare inutili interventi.

E' probabile inoltre, che il tasso di diagnosi possa essere sensibilmente migliorato decidendo di ottenere in ogni caso una valutazione completa dell'anatomia fetale a 14 settimane, vuoi prolungando il tempo d'esame o ripetendo l'esame se insoddisfacente. L'esperienza dell'operatore e la qualità delle apparecchiature costituiscono comunque due elementi fondamentali per il miglioramento dell'accuratezza della metodica.

Siamo coscienti tuttavia, che alcune malformazioni, in particolare quelle a carattere progressivo, costituiranno un ostacolo insormontabile almeno finchè non verranno identificati nuovi parametri di valutazione.

L'evidenza, infine, che un'alta percentuale di feti affetti da anomalie cromosomiche, possa essere identificata sulla base di marcatori ultrasonografici, per la maggior parte transitori, sottolinea l'importanza da attribuire ad un programma di screening ecografico precoce.

Riferimenti bibliografici

- 1) KUSTERMANN A, ZORZOLI A, SPAGNOLO D. *et al.*. Transvaginal sonography for fetal measurement in early pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1992, 99:38.
- 2) HADLOCK F.P, YOGESH P.S, KANON D.J. *et al.*. Fetal Crown Rump Length: Reevaluation of relation to menstrual age (5-18 wks) with high resolution real-time US. *Radiology* 1992, 182 (2):501.
- 3) BRONSHTEIN M., BLUMENFELD Z.. Transvaginal sonography detection of findings suggestive of fetal chromosomal anomalies in the first and early second trimester. *Prenat Diagn* 1992, 12:587.
- 4) CULLEN M.T., GREEN J., WHETHAM J. *et al.*. Transvaginal ultrasonographic detection of congenital anomalies in the first trimester. *Am J Obstet Gynecol* 1990, 163:466.

- 5) ROTTEM S., BRONSHTEIN M.. Transvaginal sonographic diagnosis of congenital anomalies between 9 weeks and 16 weeks, menstrual age. *J Clin Ultrasound* 1990, 18:307.
- 6) ACHIRON R., TADMOR O. Screening for fetal anomalies during the first trimester of pregnancy: transvaginal versus transabdominal sonography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1991, 1:186.
- 7) BONILLA - MUSOLES F.M., RAGA F., BALLESTER M.J. *et al...* Early detection of embryonic malformations by transvaginal and color Doppler sonography. *J Ultrasound Med* 1994, 13:347.
- 8) MANDRUZZATO G.P., D'OTTAVIO G., RUSTICO M.A. *Screening with ultrasound in obstetrics*. In: Kurjak A and Chervenak A (eds): *The fetus as a patient*, New York, Parthenon Publishing, 1994. p. 57.
- 9) D'OTTAVIO G., FISCHER TAMARO L., MANDRUZZATO G.P.. Early prenatal ultrasonographic diagnosis of osteogenesis imperfecta: a case report. *Am J Obstet Gynecol* 1993, 169:384.
- 10) JOHNSON P., SHARLAND G., MAXWELL D. *et al..* The role of transvaginal sonography in the early detection of congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1992, 2:248.

SPESSORE DELLA PLICA NUCALE (NUCHAL TRANSLUCENCY): MARKER ECOGRAFICO DELLE ANOMALIE DEL CARIOTIPO FETALE IN GRAVIDANZA PRECOCE

C.M. Bilardo

Accademical Medical Centre Amsterdam, University of Amsterdam, The Netherlan.

Nei Paesi Bassi ci sono ogni anno circa 200.000 nascite. L'unica forma di screening per la sindrome di Down riconosciuta in questo paese è quella basata sull'età materna superiore ai 36 anni. In realtà solo il 50% circa delle donne con un'indicazione per la diagnosi prenatale legata alla loro età ricorre a tale possibilità. Pertanto questa forma di screening porta in realtà alla identificazione di solo circa il 36% della totalità dei feti affetti da sindrome di Down.

Lo screening sierologico (tri-test) non è stato mai introdotto capillarmente nei Paesi Bassi e viene addirittura sconsigliato come test di screening di massa a causa dell'esperienza negativa riportata da due regioni campioni in cui questo test è stato applicato e valutato per un certo numero di anni. Nel 1866 il Dr. Langdon Down osservò che l'apparato cutaneo degli individui affetti da trisomia 21 è ridondante rispetto alla loro massa corporea. Nell'ultimo decennio è apparso un numero crescente di pubblicazioni che indicano che questa peculiarità della sindrome di Down può essere identificata ecograficamente nella prima metà della gravidanza. Più recentemente, e grazie in particolare al notevole contributo del gruppo del King's College di Londra del Prof. Nicolaidis, la misurazione dello spessore nucale o "Nuchal Translucency" (NT) a 10 - 14 settimane di gravidanza si è rivelato un promettente metodo di screening per le anomalie numeriche del cariotipo. Infatti, uno spessore nucale aumentato è un'espressione fenotipica comune a molte trisomie (trisomia 21, 18 e 13), alla triploidia e alla sindrome di Turner.

Nel nostro Centro è stato condotto nel triennio '94 -'97 uno studio volto a testare sulla popolazione ostetrica che veniva sottoposta a diagnosi prenatale la "performance" di questa misurazione ecografica come possibile test di screening precoce delle anomalie cromosomiche. Una prima fase dello studio è consistita nella determinazione della storia naturale di questa entità anatomica transitoria nella gravidanza fisiologica. Lo spessore nucale comincia ad essere apprezzabile a 9-10 settimane (valore medio v.m. 0.7 mm.), raggiunge uno zenith a circa 13 settimane (v.m. 1.7 mm.) per poi declinare e non essere

più rilevabile a 15-16 settimane. Ogni feto dimostra un suo pattern specifico di crescita e riduzione della NT. Il periodo ideale per la misurazione dello spessore nucale è intorno a 11-12 settimane. Infatti, la NT risulta facilmente misurabile a 11 settimane nel 97% e a 12 nel 100% dei feti, rispettivamente. Altri aspetti tecnici analizzati nella prima fase di studio sono stati: il migliore approccio ecografico, la riproducibilità delle misurazioni, l'effetto della posizione fetale, le possibili fonti di risultati falsi positivi e falsi negativi e l'effetto della curva di apprendimento sull'efficacia del metodo di screening. Nel caso di NT aumentate, laddove possibile, sono stati effettuati studi seriati. Questi indicano che NT aumentate che persistono o addirittura aumentano di spessore nel corso di misurazioni successive, effettuate a distanza di meno di una settimana, sono più frequentemente associate ad anomalie del cariotipo che non nel caso di misurazioni successive decrescenti. Nel caso in cui questa osservazione venisse confermata da un numero maggiore di casi, la ripetizione della misurazione e il suo andamento potrebbe servire nella popolazione di donne sotto i 36 anni a contenere il numero di interventi di diagnostica prenatale. Di 1526 pazienti incluse nello studio è noto l'esito della gravidanza e l'outcome neonatale. Uno spessore nucale aumentato è stato osservato in 53 feti (3.6%). Il 34% di questi feti è risultato affetto da anomalie del cariotipo. Una NT aumentata ha identificato il 65% della totalità dei feti affetti da sindrome di Down e il 25% dei feti affetti da altre anomalie cromosomiche (tra cui quattro dei sei feti affetti da trisomia 18 e l'unica triploidia). Combinando la misurazione della NT (LR) con l'età materna (rischio individuale) si è riusciti complessivamente ad identificare circa il 70% delle anomalie del cariotipo con una percentuale di falsi positivi pari al 3.5%. Per quanto riguarda l'effetto della curva di apprendimento sulla performance di questo test di screening abbiamo rilevato che mentre nel primo anno di studio sono stati identificati 4/10 feti affetti da sindrome di Down, nel secondo anno ne sono stati identificati 7/10 e nel terzo anno 9/12. Sebbene questo miglioramento della sensibilità potrebbe essere legato a pura casualità, l'effetto curva di apprendimento sembra essere ulteriormente confermato dal fatto che la performance del test è continuata ad aumentare anche nel corso degli anni seguenti di studio.

Nei feti con NT aumentata e cariotipo normale l'incidenza di anomalie strutturali e specialmente cardiache - identificate ecograficamente o rilevate alla nascita (un caso di atresia esofagea - è risultata essere del 10.6. L'incidenza di sindromi genetiche rare e di alterazioni monogeniche è invece ammontata complessivamente a 13%. L'incidenza di anomalie sia strutturali che genetiche in questo gruppo di feti è dunque nettamente superiore a quella media della popolazione ostetrica generale. L'incidenza di aborti

spontanei e di morti endouterine in questo gruppo di feti con NT aumentata e cariotipo normale risulta anche essere aumentata ed ammonta a un complessivo 8.5%. L'incidenza globale di un esito sfavorevole della gravidanza in questo gruppo di feti è stata del 32%, mentre nel gruppo di feti con NT normale un esito sfavorevole è stato registrato nel 7.5% dei casi.

Prima di intraprendere l'uso di questo test in programmi di screening è essenziale attenersi a stringenti criteri metodologici. La misurazione della NT non è difficile, ma richiede un adeguato training e la presa di coscienza di possibili fonti di errore. Un' introduzione metodologica sia teorica che pratica ai vari aspetti dello screening ecografico del primo trimestre di gravidanza viene fornita dai corsi organizzati dalla Fetal Medicine Foundation di K. Nicolaides. Lo scopo di questi corsi è quello di uniformare il più possibile il metodo di misurazione al fine di poter disporre di un cospicuo pool di dati che possano essere unificati al fine di ulteriormente convalidare o meno l'efficacia di tale metodo di screening. Recentemente la Fetal Medicine Foundation ha pubblicato dati relativi a 100.000 gravidanze screenate con misurazione della plica nucale. E' stato usato un software che integra la misurazione della plica con l'età materna e l'età gestazionale. Nello studio è stato considerato un rischio calcolato di 1:300 come "cut-off" per offrire un test di diagnostica prenatale. Nel gruppo di gravidanze a rischio aumentato si trovano l'82% dei feti con sindrome di Down e il 78% di feti affetti da altre anomalie cromosomiche. Una NT al di sopra del 95^{mo} percentile è stata riscontrata in circa il 4% dei feti. In questo gruppo si trovano il 72% dei feti Down.

Sviluppi molto recenti di questa linea di ricerca verranno ulteriormente discussi durante la relazione.

Riferimenti bibliografici

1. NICOLAIDES K.H., AZAR G., Byne D., MANCUS C., MARKS K.. Fetal Nuchal Translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *Br. Med. J* 1992, 304, 867-869.
2. PANDYA P.P., BRIZOT M.L., KUNN P., SNIJDERS R.J.M., NICOLAIDES K.H.. First trimester fetal nuchal traslucency thickness and risk for trisomies. *Obstet Gynecol* 1994, 84: 420-423.

3. PANDYA P.P., KONDYLIOU A., HILBERT L., SNIJDERS R.J.M., NICOLAIDES K.H.. Chromosomal defects and outcome in 1015 fetuses with increased nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1995, 5: 15-19.
4. PAJKRT E., BILIARDO C.M., VAN LITH J.M.M., MOL B.W.J., BLEKER O.P.. Nuchal Translucency Measurement in Normal Fetuses. *Obstet Gynecol* 1995, 86: 994-997.
5. SNIJDERS R.J.M., JOHNSON S., SEBIRE N.J., NOBLE P.L., NICOLAIDES K.H.. First trimester ultrasound screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996, 7: 216-226.
6. BILIARDO C.M., PAJKRT E., DE GRAAF I., MOL B.W.J., BLEKER O.P.. Outcome of fetuses with enlarged nuchal translucency and normal Karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998, 11: 401-406.
7. SOUKA P., SNIJDERS R.J.M., NOVAKOV A., SOARES W., NICOLAIDES K.H.. Defects and syndromes in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 10-14 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998, 11: 391-400.
8. PAJKRT E., VAN LITH J.M.M., MOL B.W.J., BLEKER O.P., BILIARDO C.M.. Screening for Down's syndrome by fetal nuchal translucency measurement in a general obstetrical population. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998 12: 156-162.
9. PAJKRT E., VAN LITH J.M.M., MOL B.W.J., BLEKER O.P., BILIARDO C.M.. Screening for Down's syndrome by fetal nuchal translucency measurement in a general obstetrical population. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998, 12:156-162.
10. SNIJDERS R.J., NOBLE P., SEBIRE N.J., SOUKA A., NICOLAIDES K.H., MULTICENTER U.K.. Project on the assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10-14 week 's gestation. *Lancet* 1998, 351: 343-346.

GENETICA DELLE CARDIOPATIE CONGENITE.

Bruno Marino, Cristina Digilio, Alessandra Toscano, Aldo Giannotti, Bruno Dallapiccola.

Cardiologia Pediatrica, Ospedale Bambino Gesù - Roma; Genetica Umana, Università Tor Vergata - Roma.

Le cardiopatie congenite, con una prevalenza di 5-10% nati vivi rappresentano le più frequenti e le più gravi malformazioni umane. Nella maggioranza dei casi questi difetti cardiaci si presentano in forma isolata, ma in una consistente percentuale dei casi (30%) sono associate ad anomalie extracardiache e/o a complesse sindromi malformative. Classicamente vengono suddivise dal punto di vista eziologico in 4 gruppi: multifattoriali (80-85%), cromosomiche (10-15%), monogeniche (3-5%) e da teratogeni (1-2%).

1) Le cardiopatie multifattoriali sono dovute alla interazione fra una predisposizione genetica poligenica e uno o più fattori ambientali. Queste cardiopatie non-sindromiche possono presentare una ricorrenza familiare che è direttamente proporzionale al numero dei soggetti affetti nella famiglia.

2) Le cardiopatie cromosomiche più frequenti sono quelle associate alla Trisomia (21, 18, 13), alla Sindrome di Turner (X, O) e alle delezioni (22q, 8p, 5p, 4p, 7q).

Alcune cardiopatie cromosomiche quali le trisomie, la sindrome di Turner e alcune delezioni possono essere evidenziate all'esame cromosomico standard, mentre le microdelezioni di grandezza inferiore a 2 megabasi possono essere diagnosticate solo mediante tecnica FISH.

Esempi più significativi delle sindromi causate da microdelezioni sono la sindrome di DiGeorge (del 22q11) e la sindrome di Williams (del 7q11).

3) Le cardiopatie monogeniche sono dovute alla mutazione di un singolo gene e seguono le leggi ereditarie di Mendel.

A volte queste mutazioni causano la sola cardiopatia mentre in altri casi i difetti monogenici causano sindromi malformative come la sindrome di Marfan (15q21), di Noonan (12q22), la sindrome di Ellis-Van Creveld (4p16) e la sindrome di Holt-Oram (12q24).

4) Le cardiopatie da teratogeni possono essere causate da farmaci, (es. acido retinoico,

alcol, anfetamine, idantoina, talidormide etc.), agenti infettivi (es. rosolia) e patologie materne (es. diabete, lupus, fenilchetonuria).

Recentemente è stata riportata una riduzione della prevalenza delle cardiopatie congenite ottenuta in seguito ad assunzione materna in epoca periconcezionale di acido folico.

L'inquadramento diagnostico completo di un paziente affetto da cardiopatia congenita deve includere accanto alla precisa diagnosi cardiaca un accurato raccordo anamnestico ed esame fenotipico. La diagnosi clinica può selezionare i pazienti che necessitano degli esami di citogenetica e di biologia molecolare.

INFEZIONI VIRALI IN GRAVIDANZA: NUOVE ACQUISIZIONI

Nadia Gussetti (a), Giovanna Rampazzo (a), Riccardo Cusinato (b), Vincenzo Suma (c), Paolo Cadrobbi (a),

(a) Divisione di Malattie Infettive e Tropicali (b) Servizio di Microbiologia

(c) Divisione di Ginecologia e Ostetricia

Complesso Convenzionato Ospedale-Università, Azienda Ospedaliera, Padova.

Introduzione

In questi ultimi anni si è assistito ad un progressivo aumento dell'interesse nei confronti delle malattie infettive in gravidanza. Ciò è attribuibile ad una maggiore sensibilizzazione dei ginecologi alle problematiche infettivologiche e ad un più largo utilizzo dei test di screening gestazionali per infezione.

Risulta, tuttavia, complesso rispetto ad alcuni anni fa, affrontare tutti gli aspetti pratici che l'infettivologia moderna impone, alla luce dei sempre più numerosi agenti infettivi in grado di causare embrio-fetopatia e delle sofisticate tecniche diagnostiche oggi disponibili per la diagnosi di infezione in utero.

Alle infezioni virali classicamente ritenute pericolose per la gravidanza (rosolia, infezione da Cytomegalovirus -CMV-, infezione da Herpes Simplex Virus -HSV-), si aggiungono infezioni che, solo recentemente sono state annoverate tra quelle potenzialmente trasmissibili al nascituro (infezione da HIV, epatite B, epatite C, infezioni da Parvovirus B19, Varicella -Zoster Virus -HZV-, Papillomavirus, Epstein-Barr Virus -EBV-, Herpes Virus 6 -HHV6-).

Infezioni in gravidanza: management

Se si eccettuano i pochi casi (10%) in cui l'infezione materna è clinicamente manifesta, i test di screening rappresentano lo strumento che più comunemente viene impiegato per l'identificazione delle gestanti con infezione certa o sospetta.

Mentre per alcune infezioni quali epatite B, epatite C, infezione da HIV, i marcatori sierologici già orientano verso la diagnosi, nella maggior parte dei restanti casi, il sospetto

di infezione gestazionale deriva dalla positività nel siero materno di anticorpi specifici di tipo IgM. Quest'ultima evenienza rappresenta la motivazione più comune di richiesta di consulenza infettivologica in gravidanza (1).

La mancanza pressochè costante di test di riferimento preconcezionali rende difficoltosa la diagnosi differenziale tra infezione primaria in gravidanza ed infezione pregravidica. Ciò accade frequentemente nell'infezione da CMV.

Tuttavia un adeguato studio della dinamica sierologica e dei parametri virologici materni, rapportati all'età gestazionale, può, mediante l'impiego di test di laboratorio più specifici per l'infezione acuta, contribuire a differenziare un'infezione gravidica da un'infezione preconcezionale con persistenza protratta di IgM (2) o da una cross-reazione sierologica tra anticorpi naturali e test per la determinazione di IgM specifiche (3).

La corretta interpretazione dei dati di laboratorio e l'avvio, ove necessario, di test di approfondimento nella gestante rappresentano, pertanto, i presupposti per impostare la diagnosi prenatale e il follow-up successivo sia nella donna che nel bambino.

Diagnosi prenatale di infezione

Paradossalmente, l'approccio infettivologico in gravidanza viene spesso "bypassato" e, la sola positività del test di screening è di per sè sufficiente a motivare l'interruzione di gravidanza o l'utilizzo indiscriminato di test di biologia molecolare su liquido amniotico o sangue fetale. Nella maggior parte di questi casi il "counseling" manca o è inadeguato.

L'impiego di tecniche di amplificazione genica per la ricerca di sequenze genomiche (Polymerase Chain Reaction - PCR -) degli agenti più frequentemente in causa nelle fetopatie, ha sicuramente aumentato il grado di sensibilità e specificità della diagnostica infettivologica prenatale e tuttavia presenta dei limiti, nell'interpretazione dei risultati, che derivano dalla frequente mancanza di test virologici di riferimento (es. colturali) e dall'assenza di standardizzazione delle tecniche impiegate.

Il liquido amniotico, essendo di norma sterile, rappresenta il materiale ideale per la ricerca di sequenze genomiche virali mediante PCR e nested PCR (4).

L'amniocentesi, sicura e facilmente attuabile nel secondo e terzo trimestre di gravidanza, è quindi largamente impiegata nella diagnosi prenatale di infezioni causate da CMV, HZV, HSV e Parvovirus B19.

Accanto alle colture convenzionali esistono metodi di diagnosi rapida in coltura per CMV, HSV e HZV che consentono di identificare precocemente la presenza di virus nel

compartimento fetale. Rispetto a queste tecniche, la PCR virus-specifica è più sensibile e tuttavia identifica sequenze di genoma virale e non necessariamente la presenza di virus attivo come invece evidenzia la coltura virale.

Alla luce di queste considerazioni risulta difficile interpretare esiti discordanti (PCR positiva e coltura negativa) ed è importante, nella gestione di questi casi rapportarsi alla clinica e agli accertamenti preliminari materni (infezione gestazionale certa?).

Interessanti osservazioni, in termini di valore predittivo, sembrano derivare dall'impiego della PCR quantitativa soprattutto nell'infezione da CMV.

Risultati falsamente positivi dei test di PCR possono verificarsi a seguito di contaminazione del campione (4). La possibilità di usufruire di laboratori di riferimento, dotati di attrezzature ed esperienza nell'impiego di queste metodiche, incide significativamente nel ridurre i falsi positivi.

Esiti falsamente negativi dei test di PCR possono derivare da campioni quantitativamente inadeguati o prelevati troppo precocemente. Quest'ultimo aspetto può essere trascurato nell'intento di fornire una diagnosi prenatale precoce. In realtà, come dimostrato, nell'infezione da CMV (5), il passaggio del virus dalla madre al feto può avvenire fino a 6 – 10 settimane dall'infezione acuta materna e quindi un intervallo di almeno 6 – 7 settimane va possibilmente considerato nel programmare la data dell'amniocentesi allo scopo di evitare risultati falsamente negativi.

Le infezioni da HBV, HCV, HIV trasmissibili per via ematogena e al nascituro soprattutto in epoca perinatale, costituiscono un rischio teorico di introdurre l'infezione nel feto attraverso procedure invasive quali l'amniocentesi. Mentre è sconsigliato l'impiego di manovre invasive nell'infezione da HIV, la necessità di eseguire l'amniocentesi, per altre cause (es. cariotipo), va valutato da caso a caso e discusso con la gestante.

Infezioni in gravidanza: terapia

L'acyclovir, ai dosaggi convenzionali, viene normalmente impiegato nella terapia delle infezioni da Herpes Simplex e nella varicella, a partire dalla 16^a – 18^a settimana gestazionale.

Non è a tutt'oggi disponibile alcun protocollo terapeutico da attuare nella gravida con infezione fetale documentata da CMV. Per contro, nel neonato con segni clinici di malattia citomegalica è possibile attuare il trattamento mirato con ganciclovir che, pur essendo poco maneggevole e discretamente tossico, ha dimostrato di migliorare il decorso della

fetopatia da CMV.

Nell'infezione da HIV, la terapia materna con zidovudina associata a taglio cesareo ha significativamente ridotto l'incidenza di infezione perinatale da HIV.

Follow-up neonati

I dati relativi ai controlli clinici e virologici nel neonato di madre con infezione gestazionale sono indispensabili per il controllo di qualità del lavoro svolto durante la gravidanza.

Il declino graduale fino alla scomparsa definitiva degli anticorpi specifici di tipo IgG passivamente trasmessi dalla madre al neonato, rappresenta il criterio sierologico classico per escludere l'infezione connatale. Ciò prevede un follow-up variabile tra 12 e 15 mesi. Viene attuato, parallelamente ai test virologici (PCR) nei nati di madre con infezione da HIV e HCV.

L'isolamento in coltura del CMV su campioni di urina prelevata sterilmente è un test pratico e dotato di elevata sensibilità nella diagnosi di infezione connatale. Il test va effettuato nelle prime due settimane di vita; il riscontro di viruria in epoca successiva può infatti essere dovuto ad infezione acquisita in epoca peri o post-natale.

Poichè il 90-95% dei neonati con infezione connatale da CMV è asintomatico pur potendo sviluppare nel 8-15% sequele a lungo termine (deficit intellettivo, ipoacusia, sordità) è importante l'identificazione dei neonati infetti allo scopo di avviare ulteriori accertamenti e l'eventuale terapia.

Conclusioni

Le moderne tecniche di biologia molecolare hanno notevolmente allargato gli orizzonti della diagnostica infettivologica prenatale. Si tratta di metodiche altamente sensibili, non standardizzate e proprio per questo non ancora del tutto sicure.

Il loro impiego, in laboratori di riferimento, prevede l'esecuzione, in parallelo, dei test convenzionali di riferimento.

Nuovi agenti infettivi sono comparsi all'orizzonte e sono aumentate le conoscenze sui rapporti virus-ospite e sulla dinamica della risposta immune ai vari microrganismi.

L'approccio multidisciplinare e il counseling alla gestante con infezione sono dunque i presupposti fondamentali per programmare una diagnostica infettivologica mirata nel feto,

impostare l'eventuale terapia e il follow-up nella gravida e nel neonato.

Riferimenti bibliografici

1. GUSSETTI N. *Organizzazione di un servizio ospedaliero per la diagnosi e la terapia delle infezioni materno-fetali*. A.M.O.I XXVII Congresso Nazionale Sorrento 10-12 giugno 1998. 257-60 p.
2. ISADA N.B. TORCH.. Infections. Diagnosis in the Molecular Age. *The Journal of Reproductive Medicine* 1992, 37(6): 499-507.
3. GUSSETTI N.. 1359-60 Natural immunoglobulin M against *Toxoplasma gondii* during pregnancy. *The Am J Obst Gynecol* 1989, 165(5) ;
4. ALANEN A.. Polymerase Chain Reaction in the detection of microbes in amniotic fluid. *Ann Med* 1998, 30 : 288-95.
5. REVELLO M.G.. Polymerase Chain Reaction for prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 1995, 47 : 462-6.

TEST GENETICI: STANDARDIZZAZIONE ED ASSICURAZIONE DI QUALITÀ

Domenica Taruscio

Istituto Superiore di Sanità, Roma

I progressi delle tecniche di genetica molecolare e gli sviluppi del Progetto Genoma Umano condotto su scala mondiale, hanno portato all'identificazione di molti geni responsabili di malattia o di aumentata suscettibilità di malattia. Ciò ha condotto allo sviluppo di numerosi test genetici, molti dei quali sono già correntemente in uso nella pratica clinica ed utilizzati per diagnosticare una determinata malattia in un soggetto sintomatico o predire il rischio di malattie ad esordio tardivo in soggetti ancora asintomatici. È prevedibile che la gamma dei test genetici si allarghi fino a modificare profondamente il panorama della diagnostica e della clinica attuali. Questo sviluppo richiederà cautela e verifiche sperimentali perché i test genetici utilizzati nella pratica clinica derivano da ricerche recenti, spesso non mirate a questa finalità. Pertanto, le numerose varianti metodologiche riportate in letteratura devono, essere sottoposte ad un'attenta validazione inter-laboratorio, allo scopo di individuare i protocolli più affidabili e più efficienti. Inoltre, occorre che i metodi selezionati siano resi più idonei all'uso clinico attraverso protocolli standardizzati, che ne siano valutati il valore predittivo e i criteri di applicazione e che vengano definiti -così come accade in altre indagini analitiche- i criteri per la realizzazione di un sistema di assicurazione di qualità.

Tale problema è stato già posto a livello di Unione Europea attraverso lo sviluppo di Azioni Concertate nell'ambito del Progetto Biomed 2 e del Research and Technological Development Framework Programme. Da tali studi, è emersa l'esistenza di una grande eterogeneità di situazioni tra gli Stati Membri o al loro interno. Studi collaborativi europei sulla diagnostica molecolare di una malattia genetica molto diffusa quale la fibrosi cistica indicavano l'esistenza di discrepanze analitiche non accettabili, per superare le quali è stato suggerito di creare centri per la standardizzazione e l'assicurazione di qualità a livello nazionale in modo da pervenire, attraverso sperimentazioni collegiali, all'armonizzazione prima nei singoli Paesi e, successivamente con il raccordo comunitario, all'interno dell'U.E. (1).

In tale contesto, l'Istituto Superiore di Sanità coordina il **"Progetto nazionale per la standardizzazione e l'assicurazione di qualità dei test genetici"** (Responsabile Scientifico: Dr.ssa D. Taruscio); questo progetto si colloca tra le linee prioritarie del Piano

Sanitario Nazionale 1998-2000, che nell'obiettivo V "Portare la sanità italiana in Europa" pone l'accento sulla necessità di interventi finalizzati all'adeguamento della rete dei laboratori diagnostici ai principi di qualità, efficacia ed efficienza.

Al momento, in Italia esiste un certo divario a livello nazionale, fra i laboratori che eseguono test genetici. Tale divario potrebbe ulteriormente accentuarsi nel tempo, anche per il continuo e veloce sviluppo delle tecnologie, generando profonde differenze fra le Regioni rispetto alla disponibilità di test sicuri ed efficaci. A questo si aggiunge la distribuzione non omogenea dei laboratori sul territorio nazionale e quindi la diversa possibilità di accesso da parte di utenti di Regioni differenti (2).

I principali obiettivi di questo Progetto, che è il primo studio di controllo di qualità dei test genetici realizzato su larga scala a livello nazionale in Italia e che permette di effettuare il confronto fra le diverse esperienze maturate nel nostro Paese in questo settore, includono:

- a) realizzare uno studio-pilota, centrato principalmente sul controllo esterno di qualità, come prima fase di un modello nazionale per la standardizzazione e l'assicurazione di qualità per i test genetici, sulla base delle raccomandazioni riportate nelle "Linee guida per test genetici" (<http://www.iss.it>), elaborate in Italia ed approvate dall'Istituto Superiore di Sanità e dal Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie, al fine di assicurare un uso appropriato di test genetici sicuri ed efficaci e la loro esecuzione in laboratori con elevati standard di qualità;
- b) lo studio-pilota intende contribuire all'elaborazione di raccomandazioni per un programma permanente di assicurazione di qualità dei test genetici (3). In particolare, tale programma dovrà prevedere la diffusione di un'informazione tecnica adeguata, la disponibilità di standard idonei, l'armonizzazione dei metodi utilizzati nei laboratori diffusi sul territorio nazionale e l'implementazione di un sistema di assicurazione di qualità (4);
- c) il Progetto intende, inoltre, avere una ricaduta a breve termine sulla implementazione della qualità dei test genetici effettuati in Italia; a questo scopo sono stati arruolati nel Progetto circa 50 laboratori per la diagnosi molecolare e citogenetica, distribuiti in quasi tutte le Regioni italiane.

Riferimenti bibliografici

- 1) DEQUEKER E., CASSIMAN J.J.. Evaluation of CFTR gene mutation testing methods in 136 diagnostic laboratories: report of a large European external quality assessment. *European Journal of Human Genetics* 1998, 6: 165-175.
- 2) DAGNA BRICARELLI F., DALLAPICCOLA B.. Genetic Services in Italy. *European Journal of Human Genetics* 1997, 5(suppl 2): 112-115.
- 3) Neumaier M. et al.. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry* 1998, 44:1 12-26.
- 4) EUCROMIC..Quality Guidelines and Standards for Genetic Laboratories:Clinics in Prenatal Diagnosis on Fetal Samples Obtained by Invasive Procedures. *European Journal of Human Genetics* 1997, 5: 342-350.

LA CONSULENZA GENETICA PER LA DIAGNOSI DELLE CROMOSOMOPATIE: ATTUALITA' E PROSPETTIVE

Giovanni Neri e Maurizio Genuardi

*Istituto di Genetica Umana, Facoltà di Medicina e Chirurgia "A. Gemelli",
Università Cattolica del S. Cuore, Roma*

Nella diagnostica prenatale precoce di malattia genetica, la richiesta di gran lunga prevalente è quella di esame cromosomico delle cellule fetali, nella maggior parte dei casi motivata dal maggior rischio di sindrome di Down per le gestanti di età avanzata. Questo esame è diventato ormai routinario ed è eseguibile presso numerosi laboratori pubblici e privati e proprio tale larga diffusione richiama la necessità che venga sempre accompagnato da una appropriata consulenza genetica.

La consulenza genetica per questo tipo di diagnosi prenatale si svolge di norma in due fasi. La prima fase è quella della raccolta dati e della informazione dei richiedenti, ed ha le seguenti finalità: 1) verificare che la situazione presentata dai richiedenti corrisponda ad una patologia effettivamente diagnosticabile *in utero*; 2) verificare che l'entità del rischio genetico effettivamente sussistente sia tale da giustificare il ricorso alla diagnosi prenatale; 3) informare in maniera esauriente i richiedenti circa le possibilità e i limiti, i benefici e i rischi della diagnosi prenatale in modo che i richiedenti, resi edotti, possano esprimere un consenso informato alla esecuzione della medesima.

Quest'ultimo punto è particolarmente delicato per diversi motivi. Innanzi tutto bisogna considerare il momento in cui si svolge la consulenza genetica. A seconda che questo momento corrisponda ad una fase più o meno avanzata della gravidanza, varia la gamma delle possibili opzioni, ad esempio villocentesi piuttosto che amniocentesi. Se la consulenza avviene in un periodo precoce della gravidanza, quando entrambe le opzioni sono possibili, è necessario che il consulente fornisca informazioni accurate su vantaggi e svantaggi dell'una e dell'altra, soprattutto in termini di rischio di aborto conseguente alla procedura di prelievo e di attendibilità dei risultati. Si tratta di un passaggio delicato, in quanto le opinioni degli esperti in materia non sempre coincidono. Poi c'è la questione del consenso informato, anch'essa molto delicata. Il consenso informato è non solo un atto

dovuto, ma anche uno strumento di tutela sia per coloro che richiedono la diagnosi prenatale, ma anche per gli operatori sanitari che concorrono ad eseguirla. Dovrà essere espresso in forma scritta, utilizzando moduli parzialmente strutturati nei quali siano indicati, oltre ai nomi dei richiedenti e alle motivazioni della richiesta, il significato e i limiti dei risultati di tali test, nonché i rischi connessi (abortività, possibilità di ripetizione del prelievo, eventualità di diagnosi dubbia o errata).

Le modalità di raccolta e di presentazione del consenso informato sono in realtà piuttosto eterogenee, e dipendono anche dall'interpretazione personale del significato e dell'utilità della consulenza genetica. Troppo spesso la consulenza genetica non viene svolta in maniera adeguata o addirittura non viene svolta affatto. Un simile approccio superficiale può comportare effetti non desiderati, come è stato verificato in una serie di donne alle quali sono state chieste dopo il parto le motivazioni per cui era stata eseguita (o non eseguita) una diagnosi prenatale. E' stato riscontrato che, con una informazione più adeguata, una quota di questo campione di donne non si sarebbe sottoposta a diagnosi prenatale, mentre un'altra l'avrebbe eseguita (8).

Tra le motivazioni di queste carenze della consulenza prenatale prevale la scarsa informazione degli operatori sanitari coinvolti nel trattamento delle gravidanze a rischio su argomenti molto specifici, come le problematiche tecniche della diagnosi citogenetica prenatale, insieme alla limitatezza del tempo per loro disponibile a questo scopo. E' pertanto auspicabile che vengano promosse iniziative volte a migliorare la fase di consulenza prenatale.

La seconda fase della consulenza genetica è imperniata sulla comunicazione ai richiedenti del risultato dell'esame cromosomico. Si possono configurare degli scenari fra loro molto diversi. Il primo è quello della comunicazione di un risultato di normalità ed è uno scenario semplice, nel quale il consulente dovrà tener conto di alcuni obblighi minimi, quale quello di far comprendere ai consultanti che normalità cromosomica non è sinonimo di normalità del neonato. Un secondo scenario, di solito drammatico e carico di tensioni, è quello che si realizza quando, per fortuna raramente, si deve comunicare un risultato patologico. La circostanza più frequente è quella di una diagnosi di trisomia 21, cui corrisponde la sindrome di Down. Questa condizione è di solito nota anche ai non medici, ma ciò non può esimere il consulente dallo spiegare comunque in maniera chiara ed

esauriente in che cosa consiste la sindrome di Down, quali problemi può comportare per il soggetto affetto e per la famiglia, ma anche quali risorse la medicina riabilitativa è in grado di offrire e quali opportunità esistono oggi per una persona Down. E' evidente che questa comunicazione debba svolgersi in un ambiente adatto e confortevole, riservato, con tutto il tempo necessario, e con ampia disponibilità da parte del consulente ad ascoltare, a comprendere e, se necessario, a confortare. Una situazione meno drammatica, ma non meno difficile, è quella in cui si comunica una diagnosi di aneuploidia gonosomica, ad esempio 45,X o 47, XXY. La sindrome di Turner e la sindrome di Klinefelter non comportano di norma ritardo mentale, né altre significative disabilità, ma la semplice esistenza del difetto cromosomico può essere percepita dai genitori come una menomazione, ed è importante che il consulente compia ogni sforzo per fornire ad essi un quadro esatto della situazione.

Infine c'è lo scenario in cui i risultati dell'esame cromosomico sono di incerta interpretazione.

Vale la pena citare brevemente alcuni esempi, primo fra tutti il mosaicismismo cromosomico che si può riscontrare, pur con diversi significati, sia dopo amniocentesi che dopo villocentesi. Nel caso delle cellule amniotiche è la stessa coltura in vitro che può indurre delle mutazioni cromosomiche a mosaico (pseudomosaicismismo) ed esistono precisi criteri per distinguere un mosaicismismo insorto in vitro da un mosaicismismo vero (5, 6, 9). Qualora permangano dei dubbi, si può consigliare una ripetizione dell'amniocentesi e/o proporre la funicolocentesi. Qualora vi sia la conferma che si tratti di un mosaicismismo vero, cioè presente

nel feto, non è facile stimarne le conseguenze fenotipiche. Vi sono delle situazioni dove la prognosi è sicuramente favorevole, come nel caso della trisomia 20 a mosaico, mentre se si trattasse di una trisomia 21 a mosaico sarebbe estremamente difficile stabilire una correlazione precisa fra il grado di mosaicismismo osservato ed il grado di manifestazione attesa della sindrome di Down.

Nel caso di cellule ottenute mediante villocentesi, la presenza di aberrazioni cromosomiche, specie se si tratta di trisomie non compatibili con lo sviluppo fetale e quindi con la nascita di un neonato vivo, c'è sempre da chiedersi se non si tratti di un mosaicismismo confinato alla placenta, con un feto citogeneticamente normale. Questo è stato dimostrato in diversi casi specie per i cromosomi 2, 7, 15 e 16 (10, 2, 4). Peraltro, la

normalità dell'assetto cromosomico del feto non è garanzia di normalità in senso assoluto. Infatti il mosaicismo confinato alla placenta origina di solito da una non disgiunzione cromosomica post-zigotica che "salva" uno zigote trisomico, portandolo ad una condizione

di apparente euploidia. Ciò può però risultare in una disomia uniparentale del cromosoma che è trisomico nel trofoblasto, con possibili conseguenze fenotipiche (ad esempio: sindrome di Prader-Willi nel caso che vi sia disomia uniparentale materna del cromosoma 15) (7).

Si tratta comunque di condizioni molto particolari che devono essere vagliate caso per caso.

Relativamente comune è anche il riscontro nel feto di una traslocazione reciproca apparentemente bilanciata insorta de novo. Non si può escludere in un simile caso che i punti di rottura che hanno generato questo riarrangiamento abbiano intaccato sequenze geniche, con possibili conseguenze fenotipiche. In una simile situazione la prognosi è difficile se non impossibile da formulare, salvo fare ricorso a stime empiriche derivate da studi epidemiologici di prevalenza di traslocazioni bilanciate de novo in pazienti con ritardo mentale (3).

Altra situazione di dubbio prognostico si realizza quando sia presente un piccolo cromosoma marcatore sovranumerario de novo (1). In questi casi prima di esprimersi si dovrà cercare di stabilire da quale o quali cromosomi origini il marcatore facendo ricorso a tutte le possibili tecniche di citogenetica classica e molecolare. In taluni casi si potrà pervenire ad una esatta definizione citogenetica del marcatore, e quindi ad una più o meno precisa valutazione delle conseguenze fenotipiche. In altri casi potrebbe rivelarsi molto difficile se non impossibile giungere ad una corretta diagnosi citogenetica con conseguente impossibilità di stabilire una esatta prognosi.

In ogni caso le risultanze degli accertamenti prenatali dovranno essere refertate per iscritto sia che si tratti di situazioni di interpretazione semplice ed univoca sia che si tratti di casi che lasciano un margine di dubbio. In questa ultima circostanza si dovrà dare una descrizione chiara ed esauriente dei risultati ottenuti indicando i limiti di interpretazione degli stessi.

La conclusione di questa breve nota è che la consulenza genetica è parte integrante ed essenziale della diagnosi citogenetica prenatale. Naturalmente, come ogni consulenza genetica, deve essere informativa e non direttiva, precisando però che la non direttività non può e non deve esimere il consulente dal supportare, per quanto sia possibile, i genitori che vengano a trovarsi in un frangente drammatico, confrontati con scelte dolorose e difficili. A nostro avviso, il consulente non può nè deve esimersi da un altro importante compito, cioè quello di agire nell'interesse non solo della gestante ma anche del feto. Egli/ella è e deve sentirsi medico di entrambi e quindi deve tutelare gli "interessi di entrambi".

Il che ci porta ad un'altra, ultima considerazione. E' ormai giunto il momento in cui si affermi definitivamente il concetto del feto come "paziente". Genetisti, ginecologi e pediatri debbono collaborare affinché si stabilisca e si consolidi una nuova specialità medica, la "Fetologia", alla quale si deve applicare tutto l'armamentario diagnostico e terapeutico oggi disponibile. Per quanto riguarda lo specifico della diagnosi prenatale, ciò significa che i test genetici dovranno essere supportati da rilievi "clinici" (ecografici ed altro) che vadano ad integrare una diagnosi il più possibile completa e comprensiva. La sola diagnosi di laboratorio è di per sè monca, in quanto non dà informazioni sulla prognosi individuale del singolo caso. Ciò è vero per le patologie ben note, come la sindrome di Down: il riscontro prenatale di trisomia 21 non ci dice se quel particolare paziente avrà o no cardiopatia o altre malformazioni e tanto meno quale sarà il suo grado di ritardo mentale. A maggior ragione è vero per patologie rare, non ben conosciute e di difficile interpretazione prognostica. La medicina fetale o fetologia deve dunque intervenire con altri strumenti per fare della diagnosi prenatale una vera e propria diagnosi clinica, e non solo laboratoristica. Lo strumento ultrasonografico è già disponibile e negli ultimi anni si è molto affinato. Altri strumenti dovranno essere trovati e/o perfezionati, così come sarebbe auspicabile che di pari passo venissero sviluppati i necessari strumenti di terapia.

Riferimenti bibliografici

1. BLENNOW E. *et al.*. Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 1995, 2:55(1): 85-94.
2. DELOZIER-BLANCHET C.D., ENGEL E., EXTERMANN P., PATORI B.. Trisomy 7 in chorionic villi: follow up studies of pregnancy, normal child and placental clonal anomalies. *Prenatal Diagn* 1998, 8:281-286.
3. FUNDERBURK S.J., SPENCE M.A., SPARKES R.S.. Mental retardation associated with "balanced" chromosome rearrangements. *Am J of Hum Genet* 1997 29:136-141.
4. HASSOLD T.J., MERRILL M., ADKINS K., FREEMAN S., SHERMAN S.. Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular study of trisomy 16. *Am J of Med Genet* 1995, 57:867-874.
5. HSU L.Y.F., KAFFE S., JENKINS E.C., ALONSO L., BENN P.A., DAVID K., HIRSCHHORN K., LIEBER E., SHANSKE A., SHAPIRO L.R., SCHUTTA E., WARBURTON D.. Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. *Prenatal Diagn* 1992, 12:555-573.
6. HSU L.Y.F., YU M.T., RICHKIND K.E., VAN DYKE D.L., CRANDALL B.F., SAXE D.F., KHODR G.S., MENNUTI M., STETTEN G., MILLER W.A., PRIEST J.H.. Incidence and significance of chromosome mosaicism involving an autosomal structural abnormality diagnosed prenatally through amniocentesis: A collaborative study. *Prenatal Diagn* 1996, 16:128.
7. KALOUSEK D.K., BARRETT I.. Genomic imprinting related to prenatal diagnosis. *Prenatal Diagn* 1994, 14:1191-1201.
8. MARTEAU T.M.. Towards informed decision about prenatal testing: a review. *Prenatal Diagn* 1995, 15:1215-1226.

9. NICOLAIDES K., DE LOURDES BRIZOT M., PATEL F., SNIJDERS R.. Comparison of chorionic villus sampling and amniocentesis for fetal karyotyping at 10-13 weeks' gestation. *Lancet* 1994, 334:435-439.

10. SHAFER L.G., LANGLOIS S., MC CASKILL C., MAIN D.M., ROBINSON W.P., BARRETT I.J., KALOUSEK D.K.. Analysis of nine pregnancies with a confined placental mosaicism for trisomy 2. *Prenatal Diagn* 1996, 16:889-905.

GENETICA: NUOVE STRATEGIE DI RICERCA E NUOVE PROSPETTIVE IN MEDICINA

Romeo Carrozzo (a), Andrea Ballabio (b)

(a) Servizio di Genetica Medica, Ospedale San Raffaele, Milano

(b) Istituto Telethon di Genetica e Medicina, Milano

L'identificazione dei geni di un organismo vivente e l'analisi della loro funzione costituisce uno strumento importante per lo studio delle basi biologiche dello sviluppo. In quest'ottica, tutti i geni devono essere considerati interessanti. L'analisi del genoma umano ha presentato negli ultimi dieci anni un sensibile progresso grazie alle continue innovazioni in campo biotecnologico ed alla crescente importanza biomedica attribuita al Progetto Genoma Umano (HGP). Tra gli scopi di tale progetto è quello del mappaggio di tutti i geni, ed il completamento del sequenziamento dell'intero genoma umano, previsto per il 2003. Il mappaggio di un gene e la definizione della sua sequenza costituiscono, tuttavia, solo il punto di partenza per la sua caratterizzazione funzionale. Per quest'ultimo scopo si rendono necessarie un grosso numero di differenti tecniche, che forniscano informazioni sul trascritto di un gene, sul suo pattern di espressione, sul prodotto proteico, sull'interazione del prodotto proteico con altre proteine, e su molti altri aspetti fenotipici, compresi quelli derivanti dalle osservazioni su altri organismi.

Dal punto di vista medico, le nozioni derivanti dalla ricerca sul genoma hanno già avuto una ricaduta pratica, che diverrà sempre più rilevante nel corso dei prossimi anni. (1) Lo HGP continuerà a fornire gli strumenti per la individuazione di nuovi geni-malattia per sindromi monogeniche attraverso un approccio di "positional cloning" o di "candidate gene". (2) Lo studio della variabilità genetica, e la crescente densità dei marcatori utilizzabili per analisi di linkage o di linkage disequilibrium permetterà una più agevole identificazione di geni coinvolti nei cosiddetti "tratti complessi" e la identificazione di polimorfismi predisponenti all'insorgenza di patologie di tipo multifattoriale. (3) La struttura tridimensionale di una proteina e la predizione della sua struttura verranno progressivamente chiarite negli studi di "functional genomics". (4) L'accumulo dei dati su mutazioni in pazienti affetti da tratti monogenici permetterà di identificare mutazioni specifiche per disordini e popolazioni, e permetterà la costituzione

di data-base specifici per patologia. (5) L'identificazione di un numero crescente di mutazione somatiche nei tumori renderà possibile l'identificazione di qualsiasi tipo di neoplasia sulla base di un certo set di alterazioni genomiche sottostanti.

Da quanto di sopra indicato risulta chiaro che il principale contributo dello HGP in medicina è legato all'incremento delle conoscenze sulla eziopatogenesi e sulla fisiopatologia delle malattie, così come al miglioramento nella sensibilità delle procedure diagnostiche. La conoscenza delle basi biologiche delle malattie potrà permettere la formulazione di nuovi farmaci o consentirà l'introduzione di nuovi presidi terapeutici. Uno dei più ambiziosi scopi pratici del HGP sarà quello di consentire una regolazione dell'espressione genica che permetta un appropriato "gene transfer".

TERAPIA GENICA: ATTUALIA' E PROSPETTIVE

Giulio Cossu

Dipartimento di Istologia ed Embriologia Medica, Università "La Sapienza", Roma.

Introduzione

La terapia genica è una nuova disciplina biomedica che cerca di curare, o per lo meno di migliorare il quadro clinico di alcune malattie mediante l'introduzione di uno o più geni nelle cellule somatiche di uno o più tessuti del paziente. Data la sua natura sperimentale, viene considerata rilevante solo per patologie gravi per cui non esistono al momento soddisfacenti terapie convenzionali.

Data la rapidità impressionante con cui si evolve questa disciplina, ogni trattazione generale è di necessità superficiale e diviene presto obsoleta. Ci si propone qui di fornire soltanto un quadro generale dell'argomento, rinviando per approfondimenti a recenti rassegne specifiche (1, 2, 3, 4)

Inizialmente sviluppata per curare malattie genetiche dovute alla mancata produzione o al mancato funzionamento del prodotto di un singolo gene (tipo talassemie, distrofie muscolari o dislipidemie), la terapia genica è stata in seguito considerata anche nell'ambito di malattie acquisite quali l'AIDS o il cancro. La relativa rarità delle malattie genetiche e il conseguente moderato interesse dell'industria farmaceutica, in confronto alla grande diffusione di malattie come AIDS e cancro ha fatto sì che nel giro di pochi anni il numero di laboratori impegnati nella ricerca pre-clinica ed il numero di "clinical trials" effettuati nel campo di queste ultime patologie abbia sopravanzato drammaticamente le prime. All'inizio del 1998, di 200 trials clinici in corso in USA o in Europa 138 erano per patologie tumorali, 29 per AIDS o patologie cardiovascolari, e solo 33 per malattie genetiche di cui 16 solo per fibrosi cistica. Il primo trial clinico di terapia genica fu iniziato nel settembre del 1990 e da allora più di 3000 pazienti hanno cellule geneticamente modificate (contenenti cioè un gene inserito grazie alla terapia genica) nel loro organismo. Le prime conclusioni sono che questa procedura comporta un rischio minimo per i pazienti ma purtroppo la sua efficacia è ancora estremamente limitata. Cio' con ogni probabilità dipende da una serie di motivazioni tecniche che si ritiene di risolvere in un futuro prossimo.

Due protocolli di terapia genica

Generalmente si considerano due tipi di terapia genica: *ex vivo* ed *in vivo*.

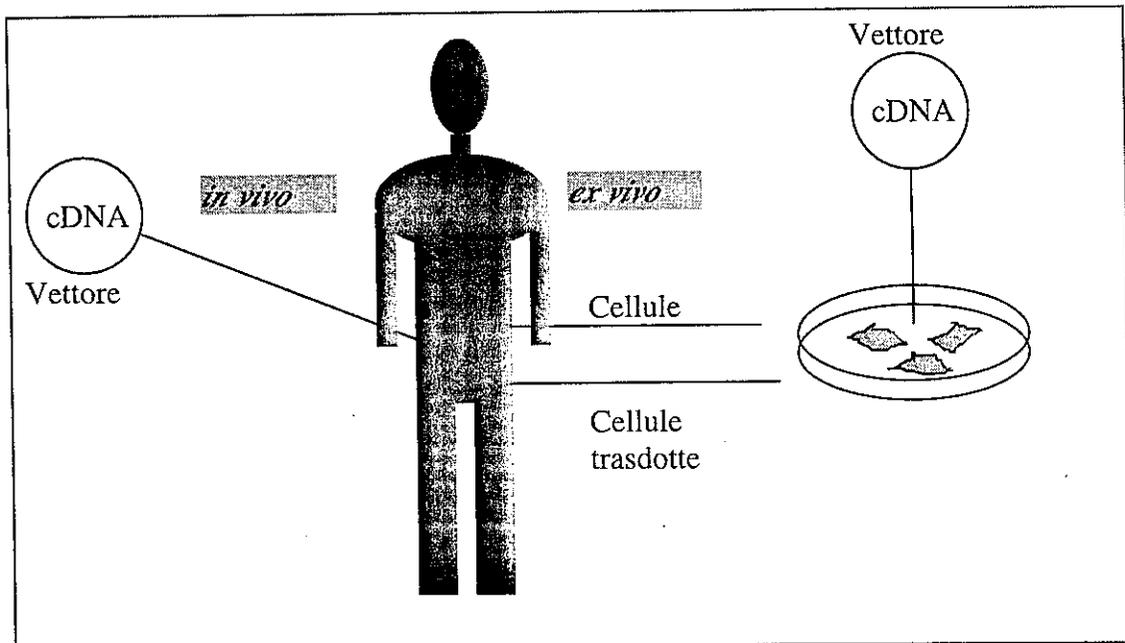


Figura 1. - Schema illustrante le due modalità di terapia genica.

1. Terapia *ex vivo*

Nella terapia genica *ex vivo* le cellule del paziente sono isolate e coltivate in vitro. Durante questo periodo il gene terapeutico è inserito nel genoma delle cellule che sono infine reinsertite nello stesso paziente da cui erano state prelevate. Questa procedura è stata finora principalmente impiegata con le cellule emopoietiche che sono ovviamente le più facili da isolare e da reinsertire nel paziente. Il vantaggio di questo approccio è rappresentato dalla ridotta probabilità di indurre una risposta immune contro il vettore necessario per veicolare il gene (vedi sotto), ma è ovviamente più laboriosa e costosa, anche perché l'intera procedura va effettuata ogni volta per ogni singolo paziente. Il che è ancora più problematico nel caso di tessuti non emopoietici, anche se il notevole sviluppo di terapie cellulari quali ad esempio l'autotrapianto di epidermide offre l'opportunità di utilizzare complesse procedure già in pratica clinica.

2. *Terapia in vivo*

Nella terapia genica *in vivo*, il gene terapeutico è inserito direttamente nelle cellule del paziente (Figura 1). In linea di principio questo approccio è più semplice ed una volta ottimizzato, può essere applicato ad un numero illimitato di pazienti che presentino la stessa patologia. Questo è il motivo che lo rende attualmente l'approccio preferito nella sperimentazione pre-clinica e clinica. Tuttavia, occorre considerare che: 1) è spesso difficile trasferire il gene terapeutico in modo quantitativamente significativo in alcuni tipi cellulari come ad esempio gli epatociti che si dividono raramente in vivo mentre possono farlo in coltura. In generale infatti, e cio' vale anche per la terapia *ex vivo*, è più difficile trasferire geni in cellule normalmente post-mitotiche, quali fibre muscolari scheletriche e neuroni, o in cellule staminali che si dividono raramente; 2) è difficile evitare di trasferire il gene terapeutico in altri tipi cellulari dove la sua espressione potrebbe essere controproducente; 3) il vettore per il trasferimento del gene va inserito direttamente in vivo ed ha quindi maggiori probabilità di causare una risposta immune di quando il gene è trasferito *ex vivo*. Va comunque ricordato che in ogni caso il prodotto proteico normale del gene terapeutico (o un suo dominio) non è mai stato presente nell'organismo del paziente che pertanto può riconoscerlo come un nuovo antigene.

I vettori e le modalità di trasferimento genico

La membrana plasmatica delle cellule è impermeabile al DNA che viene eventualmente fagocitato e degradato nel compartimento lisosomale. Questo è il motivo per cui l'efficienza di trasferimento del gene terapeutico all'interno della cellula bersaglio rappresenta il primo ostacolo da superare con ogni procedimento di terapia genica. Una volta che ciò sia avvenuto (vedi sotto) il DNA straniero potrà permanere nella cellula in forma episomale o integrarsi nel genoma dell'ospite. Nel primo caso la durata della sua permanenza e di conseguenza della sua espressione sarà limitata nel tempo, anche se in cellule che non si dividono o si dividono raramente questa durata può raggiungere mesi. Nel secondo caso il DNA integrato sarà espresso in linea di principio per tutta la vita della cellula e se questa cellula è o diviene post-mitotica, per tutta la vita del paziente. Tuttavia, il genoma dei vertebrati si è evoluto anche per proteggersi da sequenze di DNA estraneo che frequentemente vengono rimosse o perlomeno silenziate, limitando così l'efficacia del

procedimento nel tempo. Esiste infine la probabilità che il vettore si inserisca nel genoma attivando un oncogene o inattivando un anticoncogene e quindi causi una trasformazione neoplastica. Questa possibilità grandemente paventata in passato è però un evento estremamente raro, non è mai stato osservato in clinica o in laboratorio, ed è probabilmente il meno rilevante dei tanti problemi che attualmente sono da affrontare per rendere efficace un protocollo di terapia genica.

Per ovviare a tutti questi problemi numerose strategie sperimentali sono state tentate con diverso successo. Finora si può affermare che il sistema di gran lunga più efficiente è costituito dai vettori virali, i quali sfruttano la capacità dei virus di penetrare all'interno delle cellule eucariotiche e, nel caso di alcuni, quali i retrovirus, di inserire il loro DNA all'interno del genoma dell'ospite. La gran parte dei trials clinici in corso utilizza vettori derivati da retrovirus o adenovirus, mentre sono in fase di sperimentazione pre-clinica vettori derivati da altri virus quali ad esempio adeno-associati, herpes, lentivirus. Tutti questi vettori virali presentano il problema di indurre nell'ospite una reazione immune che porta alla distruzione del vettore stesso ma anche delle cellule trasdotte. Tra i vettori non virali, i liposomi rappresentano quelli di maggiore successo: si tratta in genere di lipidi anfipatici che formano col DNA micelle o altri complessi in grado di attraversare più o meno efficacemente la membrana plasmatica depositando quindi il DNA nel citoplasma della cellula invece che nel compartimento lisosomale. Occorre poi menzionare altri metodi che dopo un'iniziale entusiasmo non godono attualmente di grande considerazione: la biolistica prevede l'uso di particelle d'oro, rivestite dal DNA in questione, che vengono sparate ad alta velocità direttamente nei tessuti (di solito epidermide). L'iniezione diretta di cDNA plasmidico permette l'espressione in certi tessuti quali il cuore ed il muscolo scheletrico. L'efficienza è però bassa e in più l'iniezione di DNA induce una forte risposta immune, probabilmente dovuta all'assunzione del DNA da parte di cellule presentatrici di antigene quali i macrofagi (5). Come conseguenza questo metodo è oggi sviluppato per produrre vaccini a basso costo e di grade stabilità (vaccinazione genetica).

Le miopatie primitive come modello per un approccio di terapia genica.

La sindrome da immunodeficienza congenita dovuta a carenza di adenosina deaminasi (ADA) fu la prima malattia genetica oggetto di protocolli sperimentali di terapia genica e fino ad oggi l'unico successo. La mancata produzione di ADA, enzima pur ubiquitario, comporta un danno selettivo a carico dei linfociti con conseguente grave immunodeficienza. Vettori retrovirali che esprimono ADA umano sono stati usati per trasdurre linfociti periferici e cellule del midollo di questi pazienti, con conseguente straordinario miglioramento del quadro clinico, di fatto una guarigione, legata però alla persistenza in circolo delle cellule geneticamente modificate (6). Più alto il precursore emopoietico trasdotto, più lunga la remissione clinica. La trasduzione di una cellula staminale emopoietica porterebbe a guarigione definitiva. Altre sindromi da immunodeficienza congenita dovute a carenza di altri enzimi sono attualmente trattate con simile strategia.

Nel caso di malattie genetiche che colpiscono selettivamente altri tessuti le prospettive di successo sono strettamente legate alle caratteristiche istogenetiche e rigenerative dello specifico tessuto. Forse le distrofie muscolari rappresentano la patologia più difficile da trattare con terapia genica. In realtà non esistono terapie, la forma più frequente (Distrofia Muscolare di Duchenne: DMD) è relativamente frequente e spesso non diagnosticabile in periodo prenatale perché un caso su tre rappresenta una nuova mutazione. Mutazioni di proteine che collegano il citoscheletro della fibra muscolare alla matrice (tipo distrofina o sarcoglicani) causano diverse forme di distrofia muscolare in cui la aumentata fragilità della membrana plasmatica porta a morte le fibre muscolari (7). Queste sono inizialmente sostituite da cellule satelliti, cellule miogeniche capaci di formare nuove fibre che però esprimono lo stesso difetto genetico delle fibre che sostituiscono e che quindi ne condividono il destino. Col tempo la capacità proliferativa delle cellule satelliti si esaurisce ed il tessuto viene progressivamente sostituito da tessuto fibroso. E' possibile trasdurre ex vivo le cellule satelliti che però, a differenza dei cheratinociti, non sono capaci di dividersi a lungo neanche in coltura e quindi vanno presto in senescenza. D'altro canto la trasduzione diretta delle fibre post-mitotiche pone considerevoli problemi dato che l'iniezione diretta (in situ) permette la trasduzione in un'area di pochi mm e che la maggior parte dei virus non passa facilmente dal circolo sanguigno ai tessuti (8).

Attualmente sono in corso tre diversi tentativi di sviluppare una terapia per le miopatie: 1) un approccio farmacologico, basato sulla ricerca di molecole che possano

aumentare la trascrizione dell'utropina, una proteina correlata alla distrofina la cui aumentata produzione può revertire il fenotipo distrofico in modelli di distrofia murina (9); 2) un approccio di terapia genica *in vivo*, mirata a sviluppare nuovi vettori virali capaci di trasdurre con la copia sana del gene mutato i nuclei post-mitotici delle fibre muscolari. (10, 11); 3) un approccio *ex vivo* basato sul tentativo di iniettare cellule satelliti del paziente, geneticamente corrette in coltura (12).

Il nostro gruppo ha dimostrato efficiente trasduzione di cellule satelliti umane con vettori retrovirali (13). Per ovviare al problema della limitata capacità proliferativa delle cellule satelliti abbiamo sviluppato due strategie alternative: 1) immortalizzazione reversibile mediante l'antigene T di SV40, rimuovibile con una specifica ricombinasi (14); 2) conversione miogenica di fibroblasti del derma mediante espressione transiente del gene MyoD (15). Entrambe le strategie hanno avuto successo in laboratorio e la seconda è attualmente in analisi per un possibile trial clinico di fase I. Tuttavia, la persistente mancanza di vettori adatti a contenere il gene della distrofina e la limitata sopravvivenza delle cellule iniettate *in vivo* rappresentano ancora problemi difficili da risolvere per portare questo approccio verso un possibile successo clinico.

Un risultato inatteso che apre diverse prospettive per la terapia delle miopatie è rappresentato dalla osservazione che cellule di diversi tessuti possono differenziare in muscolo scheletrico se si trovano in presenza di cellule miogeniche in via di differenziamento. Quando cellule del midollo di topi geneticamente marcati sono trapiantate in topi letalmente irradiati, esse partecipano alla rigenerazione del muscolo scheletrico (16). Questa è la prima dimostrazione dell'esistenza nel midollo osseo di un precursore circolante che può differenziare in muscolo ma solo all'interno di un particolare micro-ambiente. Esperimenti di trapianto di midollo sono in corso in topi distrofici.

Riferimenti bibliografici

1) ANDERSON W.F.. Human gene therapy. *Nature* 1998, 392 (suppl. 30 April) 25-30.

2) KAY M.A., LIU D., HOOGERBRUGGE P.M.. Gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 12744-12746.

3) VERMA I., SOMIA N.. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 1997, 389 239-242.

- 4) VILE R. G.. Gene therapy. *Curr Biol* 1998, 8: 873-875.
- 5) MOELLING K.. Naked DNA- the poor man's gene therapy? *Gene Therapy* 1998, 5: 573-574.
- 6) BORDIGNON C. et al.. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1995, 270: 470-475.
- 7) NAWROTZKI R., BLAKE D.J., DAVIES K.E.. The genetic basis of neuromuscular disorders. *Trends in Genetics* 1996, 12: 294-298.
- 8) MARSELL D.J., LEIDEN J.M.. Recent advances in skeletal muscle-based gene therapy. *Curr Op Genet Develop* 1998, 8: 360-365.
- 9) DECONINCK N., TINSLEY J., DE BACKER F., FISHER R., KAHN D., PHELPS S., DAVIES K., GILLIS J-M.. Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nature Medicine* 1997, 3: 1216- 1221.
- 10) CHEN H.H., MARCK L.M., KELLY R., ONTELL M., KOCHANEK S., CLEMENS P.R.. Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks viral genes. in press. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 1654-1650.
- 11) DECROUY A., RENAUD J.M., DICKSON G., JASMIN B.J.. Mini- and full-length dystrophin gene transfer induces the recovery of nitric oxide synthase at the sarcolemma of mdx skeletal muscle fibres. *Gene Therapy* 1997, 5: 59-64.
- 12) PARTRIDGE T. A.. Myoblast Transplantation. Yearbook of Cell and Tissue Transplantation 1996/1997. ed. R.P. LANZA, W.L.Chick, Kluwer Academic Publishers, *Netherlands* 1996, p. 53-59.
- 13) SALVATORI G., FERRARI G., MEZZOGIORNO A., SERVIDEI S., COLETTA M., TONALI, GIAVAZZI R., COSSU G., MAVILIO F.. Retroviral vector-mediated gene transfer into human primary myogenic cells leads to expression in muscle fibers invivo. *Human Gene Ther* 1993, 4: 713-723.

14) BERGHELLA L., DE ANGELIS L., COLETTA M., BERARDUCCI B., SONNINO C., SALVATORI G., ANTHONISSEN C., COOPER R., BUTLER-BROWNE G.S., MOULJ V., FERRARI G., MAVILIO F., and COSSU G.. Reversible immortalization of human myogenic cells by site-specific excision of a retrovirally-transferred oncogene. *Human Gene Therapy* 1999 (in stampa).

15) LATTANZI L., SALVATORI G., COLETTA M., SONNINO C., CUSELLA DEANGELIS M. G., GIOGLIO L., MURRY C.E., KELLY R., FERRARI G., MOLINARO M., CRESCENZI M., MAVILIO F., COSSU G. 1998. High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies. *J Clin Invest* 1998, 101: 2119-2128.

16) FERRARI G., CUSELLA DE ANGELIS M.G., COLETTA M., STORNAIOUOLO A., PAOLUCCI E., COSSU G., MAVILIO F. 1998. Skeletal muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science* 1998, 279:1528-1530.

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità
e Responsabile scientifico: Giuseppe Benagiano*

Direttore responsabile: Vilma Alberani

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, dicembre 1999 (n. 4) 11° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*