

Studio osservazionale:
“Registro nazionale della malattia MYH9-correlata”

Background

La malattia MYH9-correlata

L'anomalia di May-Hegglin (MHA; OMIM 155100) e la sindrome di Sebastian (SBS; OMIM 605249) sono disordini ereditari a trasmissione autosomica dominante caratterizzati dall'associazione di trombocitopenia, macrocitosi piastrinica con piastrine giganti e corpi inclusi leucocitari simili ai corpi di Döhle delle infezioni – e per questo denominati inclusi “Döhle-like”.¹⁻⁷ I pazienti presentano spesso diatesi emorragica, che è talora più grave di quanto atteso in base all'entità della piastrinopenia.^{6,7} La distinzione fra le due condizioni si basa su sottili caratteristiche ultrastrutturali degli inclusi leucocitari.⁴⁻⁷ La sindrome di Fechtner (FTNS; OMIM 153640) è un disordine a trasmissione autosomica dominante definito da un complesso quadro sindromico in cui macrotrombocitopenia ed il reperto di inclusi leucocitari con caratteristiche ultrastrutturali analoghe a quelle della SBS si associano a glomerulonefrite cronica interstiziale, deficit uditivo neurosensoriale e cataratta presenile.⁸⁻¹⁰ La glomerulonefrite presenta spesso un carattere progressivo, con evoluzione in insufficienza renale terminale.¹⁰ La sindrome di Epstein (EPTS; OMIM 153650) è definita dall'associazione di trombocitopenia, glomerulonefrite cronica interstiziale e sordità neurosensoriale; si distingue pertanto dalla FTNS per l'assenza delle inclusioni Döhle-like e della cataratta presenile.¹¹⁻¹² Per lungo tempo, la FTNS e la EPTS sono state considerate delle rare varianti a trasmissione autosomica-dominante della sindrome di Alport, e per questo definite “sindromi Alport-like”.^{8,10,12} Nel 2001 il gene responsabile della MHA/SBS e della FTNS è stato dapprima mappato sul braccio lungo del cromosoma 22, e quindi identificato nel gene *MYH9*, che codifica per la catena pesante della miosina non muscolare IIA (NMMHC-IIA).¹³⁻¹⁷ Più recentemente, mutazioni di *MYH9* sono state identificate anche in famiglie con EPTS.^{18,19} Infine, mutazioni di *MYH9* sono state identificate anche in pazienti affetti da macrotrombocitopenia congenita isolata, senza inclusioni basofile leucocitarie Döhle-like né altre manifestazioni cliniche associate.^{20,21} La miosina non-muscolare IIA è una miosina convenzionale citoplasmatica espressa pressochè in tutte le cellule e tessuti, dove è coinvolta in diverse funzioni, quali la citochinesi, la motilità cellulare, il riconoscimento cellulare e il mantenimento della forma della cellula.²²

L'identificazione di *MYH9* come gene responsabile della MHA, della SBS, della FTNS ed della EPTS ha promosso studi volti a chiarire il rapporto esistente fra le mutazioni del gene e le manifestazioni cliniche da esse derivanti. Inizialmente, due gruppi indipendenti hanno analizzato casistiche di famiglie arruolate in base alla pregressa diagnosi di MHA, SBS, FTNS o EPTS, non

riuscendo a dimostrare alcuna correlazione fra il genotipo di *MYH9* e la diagnosi clinica dei rispettivi pedigree.^{20,23} Più recentemente, sono stati presi in esame 49 pazienti appartenenti a 21 famiglie con mutazione di *MYH9* e pregressa diagnosi di MHA, SBS, FTNS o EPTS, effettuando in ciascun caso la rivalutazione clinica delle anomalie ematologiche e delle funzioni renale, uditiva e visiva. L'indagine ha dimostrato una ampia sovrapposizione dei quadri clinici di pazienti appartenenti a famiglie con diagnosi cliniche differenti. In particolare, è stato osservato che: (a) le inclusioni leucocitarie, quando ricercate con metodo immunomorfologico (si veda in seguito), sono presenti in tutti i pazienti con mutazione di *MYH9*, compresi i casi con diagnosi di EPTS; (b) la glomerulonefrite interstiziale cronica, la sordità neurosensoriale e la cataratta presenile possono insorgere anche in pazienti in precedenza diagnosticati come affetti da MHA o SBS; (c) tali manifestazioni extra-ematologiche spesso non insorgono nel corso della vita di familiari affetti di pazienti con diagnosi di FTNS o EPTS.²¹

Le mutazioni di *MYH9* si traducono quindi nella costante presenza alla nascita di anomalie ematologiche, comuni a tutti i pazienti, e nel variabile rischio di sviluppare nel corso della vita alterazione della funzione renale, uditiva e visiva. Queste osservazioni hanno portato alla conclusione che l'attuale classificazione dei disordini derivanti da mutazioni di *MYH9* in MHA, SBS, FTNS e EPTS è da ritenersi superata in quanto non in grado di descrivere l'evoluzione naturale della malattia nei singoli pazienti. E' stato quindi proposta la denominazione di "malattia *MYH9*-correlata" per comprendere tutti i pazienti con piastrinopenia da mutazioni di questo gene, nell'attesa che il progresso delle conoscenze consenta di proporre una nuova classificazione che meglio correli con i meccanismi patogenetici e sia in grado di identificare i soggetti che nel corso della vita svilupperanno insufficienza renale, sordità e/o cataratta.^{21,24} Queste conclusioni sono state recentemente confermate in una casistica indipendente.²⁵

Il riconoscimento di *MYH9* come gene-malattia ha permesso di mettere a punto un test laboratoristico per l'identificazione dei pazienti portatori di mutazione. Il test è basato sull'analisi immunomorfologica della distribuzione della NMMHC-IIA nel citoplasma dei granulociti neutrofili osservabili sullo striscio di sangue periferico.^{21,26,27} L'analisi permette di identificare nei pazienti con mutazione di *MYH9* patologici aggregati leucocitari di NMMHC-IIA che sono alla base della formazione degli inclusi Döhle-like della MHA/SBS e della FTNS.^{21,27} Nei pazienti testati, il metodo immunomorfologico è risultato in grado di riconoscere gli aggregati leucocitari della proteina in tutti i casi con mutazione di *MYH9*, anche quando non era possibile identificare le inclusioni Döhle-like all'esame dello striscio colorato con metodica standard. L'analisi ha inoltre fornito invariabilmente risultati di normalità nei soggetti di controllo sinora analizzati, che

comprendevano alcuni individui con diagnosi clinica di FTNS o EPTS ma normale *MYH9* all'analisi molecolare.^{21,26-28} L'indagine può essere eseguita su strisci di sangue periferico allestiti in maniera standard anche dopo settimane di permanenza a temperatura ambiente; la spedizione dei preparati non compromette l'esito dell'analisi (Pecci, osservazioni personali). Il test eseguito con metodica di immunofluorescenza indiretta è rapido e poco costoso. L'analisi della distribuzione della NMMHC-IIA nei granulociti del sangue periferico viene quindi attualmente utilizzata come test di screening per l'identificazione dei pazienti da sottoporre ad analisi molecolare di *MYH9*.^{28,29}

Problemi aperti: razionale per l'istituzione di un registro nazionale della malattia MYH9-correlata

Le acquisizioni sin qui riportate hanno permesso di definire la malattia *MYH9*-correlata come una nuova entità nosografica che comprende il complesso delle alterazioni derivanti dalla mutazione di *MYH9*. Tuttavia numerose problematiche inerenti gli aspetti diagnostici, clinici e prognostici di tale disordine rimangono ancora da chiarire. Le principali vengono riportate di seguito.

Inquadramento diagnostico e prevalenza della malattia (obiettivo 1) - La diagnosi di malattia *MYH9*-correlata è spesso misconosciuta e la prevalenza del disordine non è nota. La maggior parte dei pazienti con piastrinopenia correlata alla mutazione di *MYH9* giunti alla nostra osservazione avevano ricevuto una precedente diagnosi di porpora trombocitopenia idiopatica e trattamenti non solo inefficaci ma anche potenzialmente dannosi, quali cicli di terapia steroidea, immunosoppressiva e splenectomia.^{6,30} Le difficoltà diagnostiche sono dovute a differenti fattori.

(a) Le mutazioni *de novo* sono frequenti, rendendo conto del 35% dei casi indice (Savoia, osservazioni non pubblicate). L'ipotesi di una malattia genetica può quindi non essere presa in considerazione per la mancanza di familiari affetti.

(b) Il procedimento diagnostico si basa in larga parte sull'identificazione degli inclusi Döhle-like sugli strisci di sangue periferico colorati con metodica standard. La sensibilità dell'esame è grandemente condizionata dall'esperienza dell'operatore. Inoltre, che vi sono numerosi casi in cui gli inclusi leucocitari sono di dimensioni talmente ridotte da non essere riconoscibili all'indagine morfologica convenzionale, per cui il quadro di presentazione della malattia risulta indistinguibile da quello di altre forme di macrotrombocitopenia.

(c) In funzione della eterogeneità del quadro clinico, i pazienti afferiscono a strutture specialistiche differenti (Ematologia, Nefrologia, Otorinolaringoiatria, Oculistica) che a volte

focalizzano solo gli aspetti della malattia di loro competenza senza identificare la complessità del quadro clinico del disordine.

(d) Non da ultimo, il personale medico appare a tutt'oggi scarsamente informato sulla diagnosi di una patologia rara e di recente inquadramento nosografico.

L'attuale disponibilità di un test di screening per le mutazioni di *MYH9* eseguibile sullo striscio di sangue periferico standard rappresenta lo strumento per risolvere molti di questi problemi diagnostici, permettendo di effettuare una semplice e rapida valutazione di tutti i pazienti nei quali l'anamnesi e il quadro clinico siano compatibili con la diagnosi di malattia *MYH9*-correlata. Il registro nazionale fornirà a tutte le strutture afferenti gli strumenti necessari per la diagnosi della patologia (test di screening sullo striscio di sangue periferico, analisi molecolare di *MYH9*). La creazione di un registro nazionale e la sua diffusione presso le strutture specialistiche di competenza crea inoltre i presupposti di conoscenza necessari perché sorga il sospetto diagnostico e vengano quindi adottati i semplici provvedimenti diagnostici in grado di confermarlo o negarlo.

Definizione del fenotipo clinico conseguente alle mutazioni di MYH9 (obiettivo 2a e 2c) - A causa della limitata numerosità delle casistiche sinora analizzate, le caratteristiche cliniche della malattia *MYH9*-correlata sono a tutt'oggi scarsamente definite. Per quanto riguarda la piastrinopenia, non è ben chiara l'incidenza, la gravità ed il decorso della diatesi emorragica ad essa conseguente. Relativamente alla glomerulonefrite, la sordità neurosensoriale e le anomalie del cristallino, rimangono tuttora sconosciute la loro incidenza fra i soggetti affetti, l'età di insorgenza, la gravità e il decorso nel tempo. Infine, esistono in letteratura segnalazioni di manifestazioni cliniche atipiche osservate in pazienti con sindromi correlate a mutazione di *MYH9*. Gershoni-Baruch et al. hanno descritto una famiglia in cui il quadro clinico-laboratoristico di FTNS segregava con il quadro di epatopatia cronica idiopatica.⁹ Una nostra analisi preliminare su 13 pazienti con mutazioni di *MYH9* ha dimostrato che in 10 casi erano presenti alterazioni degli indici di funzionalità epatica (elevazione delle transaminasi sieriche associata o meno ad incremento della fosfatasi alcalina e/o della gamma-GT), di differente entità, non spiegate dalla presenza di malattie associate. In due casi, è stata accertata la presenza di tali anomalie sin dalla prima infanzia (Pecci, osservazioni non pubblicate). Recentemente, abbiamo descritto in letteratura un caso di malattia *MYH9*-correlata associata a trombosi venose ricorrenti in età giovanile;³² un altro caso giunto alla nostra osservazione presentava un quadro di microangiopatia trombotica severa (Balduini, osservazione non pubblicata). Fujita et al. hanno riportato un pedigree in cui la MHA segregava con il quadro della paraplegia spastica familiare;³² Gerver et al. hanno descritto l'associazione di MHA con deficit di secrezione di ormone della crescita.³³ Infine, è stato dimostrato che nei pazienti con

mutazioni di *MYH9* i granulociti neutrofili presentano un grave difetto di espressione della NMMHC-IIA,³⁴ e rare segnalazioni in letteratura descrivono un deficit delle funzioni granulocitarie *in vitro*.³⁵ Per la mancanza di studi osservazionali su casistiche ampie non è tuttavia noto se i pazienti con mutazione di *MYH9* presentino anche un'aumentata incidenza di episodi infettivi da difetto dell'immunità aspecifica. Dato che la NMMHC-IIA è espressa pressochè in tutte le cellule e tessuti dell'organismo, è teoricamente possibile che alcune delle alterazioni sopraelencate rappresentino manifestazioni meno frequenti e sinora misconosciute della mutazione di *MYH9*. Solo la raccolta di una casistica sufficientemente ampia ed omogeneamente studiata per la presenza di eventuali comorbidità permetterà di chiarire se queste alterazioni fenotipiche derivino dall'associazione fortuita con altre malattie o se lo spettro delle manifestazioni indotte dalle mutazioni di *MYH9* sia più ampio di quanto ritenuto in passato.

Correlazioni genotipo-fenotipo (obiettivo 2b) - Gli studi sinora effettuati non sono riusciti ad evidenziare alcuna correlazione genotipo-fenotipo nei pazienti con mutazioni di *MYH9*.^{20,21,23} Questi studi non permettono però di concludere per l'assenza di correlazioni genotipo-fenotipo, in quanto effettuati su casistiche di pazienti piuttosto limitate e con un follow-up di breve durata, non tenendo perciò in considerazione la storia naturale della malattia nel singolo paziente ma solo il fenotipo clinico al momento della diagnosi.²¹ Osservazioni preliminari effettuate dal nostro gruppo su una casistica di 88 pazienti appartenenti a 46 famiglie, molti dei quali osservati per molti anni, suggeriscono invece l'esistenza di correlazioni fra specifiche mutazioni di *MYH9* e caratteristiche cliniche della malattia. In particolare, le mutazioni che coinvolgono la posizione 702 della NMMHC-IIA risultano associate ad una incidenza statisticamente più alta di glomerulonefrite ed insufficienza renale, ad una elevata e più precoce incidenza di sordità neurosensoriale, e ad una conta piastrinica più bassa. Le mutazioni che coinvolgono la posizione 1424 presentano un rischio di sviluppare sordità neurosensoriale più basso rispetto a quelle in posizione 702, ma significativamente più alto rispetto alle mutazioni in posizione 1933. La cataratta presenile risulta significativamente più frequente nei pazienti con mutazione in posizione 1424 (Pecci, osservazioni non pubblicate). Questi dati suggeriscono che il genotipo sia un importante determinante del fenotipo clinico della malattia, ma solo l'arruolamento di una casistica più ampia di pazienti, studiati in maniera omogenea e seguiti nel tempo, permetterà di confermare ed estendere i risultati già conseguiti. In particolare, dallo studio di 130 pazienti è attesa la definizione della storia naturale della malattia per ciascuna delle 5 mutazioni di *MYH9* più frequenti, riscontrate in circa il 90% dei casi della malattia. Casistiche più ampie saranno necessarie per identificare il fenotipo corrispondente alle mutazioni più rare.

Variabilità nell'espressione fenotipica fra pazienti portatori di una stessa mutazione (obiettivo 2d) – I dati preliminari sulla casistica sin qui raccolta suggeriscono che il genotipo sia un importante fattore determinante il fenotipo della malattia, ma che verosimilmente non sia l'unico. E' infatti osservazione comune che, anche dopo un follow-up prolungato, il quadro clinico può essere differente in pazienti portatori della stessa mutazione, anche nell'ambito della stessa famiglia. In particolare, non è chiaro il motivo per cui nell'ambito dello stesso pedigree alcuni soggetti presentano insufficienza renale sin dalla giovane età, mentre in altri tale complicanza non si manifesta mai nell'arco della vita.^{20,21,23} Una delle ipotesi formulate è che questa differenza sia imputabile a polimorfismi di geni che interagiscono con *MYH9*. Recentemente il nostro gruppo ha osservato una famiglia con mutazione D1424H di *MYH9* in cui le anomalie renali erano presenti in cinque casi su dieci membri affetti. Lo studio della distribuzione nella famiglia dei polimorfismi del gene codificante per la podocina, una proteina costitutiva del citoscheletro dei podociti del glomerulo renale, ha suggerito l'ipotesi che questi possano avere un ruolo nell'insorgenza della glomerulonefrite cronica interstiziale.³⁶ Uno screening per la definizione dei principali geni che interagiscono con *MYH9* è attualmente in corso con la metodica del doppio ibrido; dati preliminari hanno permesso di identificare l'isoforma IIB dell'enzima come uno dei principali interattori della NMMHC-IIA.³⁷ La verifica dell'ipotesi del ruolo della podocina, così come l'indagine sul ruolo dei polimorfismi di altri possibili geni interattori di *MYH9*, richiede la disponibilità di famiglie sufficientemente ampie, tali da permettere l'analisi della trasmissione degli aplotipi nelle diverse generazioni. La raccolta su base nazionale di una ampia casistica di pazienti rappresenta il prerequisito essenziale per l'identificazione di pedigree informativi per questo tipo di indagine genetica.

Obiettivi

1. Fornire gli strumenti per un corretto inquadramento diagnostico ed una valutazione clinica completa ed omogenea dei pazienti con mutazione di MYH9.

La diagnosi della malattia è spesso misconosciuta, ^{6,30} sia per le difficoltà intrinseche al riconoscimento di questa patologia rara, che per la mancata disponibilità di strumenti diagnostici adeguati. I pazienti con malattia *MYH9*-correlata, inoltre, afferiscono spesso a strutture specialistiche differenti (Ematologia, Nefrologia, Otorinolaringoiatria), a seconda della manifestazione della malattia che di volta in volta domina il quadro clinico; questo spesso ostacola la valutazione omogenea del fenotipo della malattia.

E' atteso che l'istituzione di un registro nazionale e la conseguente attività di informazione e sensibilizzazione sulla patologia presso i medici delle strutture afferenti migliori il riconoscimento precoce di tale patologia. Il registro fornirà inoltre a tutte le strutture afferenti gli strumenti necessari per la diagnosi della malattia (test di screening sullo striscio di sangue periferico, analisi molecolare di *MYH9*). Il registro fornirà infine ai medici delle strutture afferenti gli strumenti per una valutazione clinica accurata e multidisciplinare dei pazienti, consentendo il riconoscimento precoce di tutte le manifestazioni cliniche derivanti dalla mutazione di *MYH9*.

2. Creare una casistica di pazienti studiati in maniera omogenea per la definizione degli aspetti clinici e prognostici della malattia conseguente alla mutazione di MYH9.

La disponibilità di una casistica sufficientemente numerosa di pazienti studiati in maniera omogenea per il genotipo e il fenotipo rappresenta il presupposto essenziale per fare luce su molti aspetti clinici non chiariti di tale patologia.

In particolare vengono identificati i seguenti obiettivi:

2a) definizione delle principali caratteristiche epidemiologiche e cliniche della malattia, quali: stima della prevalenza nella popolazione italiana; frequenza di mutazioni *de novo* di *MYH9*; frequenza relativa, età di insorgenza, gravità e decorso nel tempo delle singole manifestazioni cliniche e/o complicanze conseguenti alla mutazione di *MYH9*;

2b) definizione di eventuali correlazioni fra specifiche mutazioni di *MYH9* e caratteristiche cliniche ad esse conseguenti, che permettano di prevedere in termini probabilistici l'evoluzione della malattia nel singolo paziente sulla base dell'analisi del genotipo;

2c) definizione di possibili manifestazioni cliniche poco frequenti e sinora sconosciute della mutazione di *MYH9*;

2d) identificazione di famiglie suscettibili di analisi genetica volta a identificare i polimorfismi di geni interattori con *MYH9*, che possano spiegare la variabilità del fenotipo della malattia fra individui portatori della stessa mutazione.

3. Creare una base logistica per disporre di casistiche di pazienti per lo studio degli aspetti patogenetici e terapeutici della malattia MYH9-correlata.

Il registro nazionale si propone di rappresentare la base logistica per disporre di casistiche di pazienti studiati in maniera omogenea da sottoporre a studi biologici per l'approfondimento della patogenesi della malattia, nonché per la futura identificazione di gruppi di pazienti selezionati che possano trarre beneficio da specifiche strategie terapeutiche.

Protocollo di studio

1. Criteri di inclusione

Sono arruolabili allo studio i seguenti pazienti:

- (a) pazienti con macrotrombocitopenia, di comprovata natura congenita e/o ereditaria;
- (b) pazienti con macrotrombocitopenia, per i quali la natura congenita e/o ereditaria non può essere esclusa sulla base dell'anamnesi personale e familiare;
- (c) pazienti affetti da glomerulonefrite cronica interstiziale e/o sordità neurosensoriale e/o anomalie del cristallino, nei quali venga rilevata, anche occasionalmente, la presenza di piastrinopenia.

Sono incluse ai punti (a) e (b) sia le **macrotrombocitopenie isolate, non sindromiche**, che le forme in cui la macrotrombocitopenia si associa al rilievo, contestuale o pregresso, di inclusioni basofile leucocitarie e/o anomalie renali e/o disturbi dell'udito e/o anomalie del cristallino.

Sono inclusi al punto (c) i pazienti con diagnosi di **sindrome di Fechtner e sindrome di Epstein**; i pazienti con **sindrome di Alport atipica ("Alport-like")**, per le caratteristiche genetiche o istologiche, nei quali venga rilevata, l'associazione con piastrinopenia o conta piastrinica ai limiti inferiori della norma.

2. Procedimento diagnostico

Per tutti i pazienti arruolati verrà effettuata l'analisi immunomorfologica sullo striscio di sangue periferico per lo studio della distribuzione della NMMHC-IIA nel citoplasma dei granulociti polimorfonucleati (metodica: immunofluorescenza indiretta).^{21,26-29}

Lo striscio di sangue periferico del paziente verrà allestito presso i Centri Partecipanti mediante prelievo di una goccia di sangue capillare non anticoagulato, essiccato all'aria, e quindi inviato al Laboratorio di Fisiopatologia delle Piastrine, Clinica Medica III, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia (responsabile: prof. Carlo Balduini) ove sarà effettuata l'analisi. Contestualmente allo striscio

di sangue periferico, verrà inviato presso il suddetto Laboratorio un campione di sangue venoso - 3 mL anticoagulati con EDTA - per l'estrazione del DNA genomico. Il DNA genomico estratto verrà congelato e conservato presso il Laboratorio.

Nel caso in cui la distribuzione della NMMHC-IIA risulti compatibile con presenza di mutazione del gene *MYH9*, il DNA del paziente verrà scongelato e inviato ad uno dei due centri responsabili dell'analisi genetica:

- (a) Laboratorio di Genetica Medica, Dipartimento di Scienze della Riproduzione e Sviluppo, Università di Trieste, IRCCS Ospedale Burlo Garofolo, via dell'Istria, (responsabile: prof.ssa Anna Savoia);
- (b) Laboratorio di Genetica Molecolare, Dipartimento di Medicina Interna, Cardioangiologia ed Epatologia, Università degli Studi di Bologna (responsabile: prof. Marco Seri).

Presso questi Centri verrà effettuata l'analisi molecolare del gene *MYH9*, per la conferma della diagnosi di malattia *MYH9*-correlata (metodica: amplificazione degli esoni del gene *MYH9* e sequenziamento diretto dei prodotti di amplificazione).

Nel caso in cui il test di screening risulti negativo, il materiale genetico verrà distrutto.

3. Valutazione clinica alla diagnosi

Tutti i pazienti con diagnosi di malattia *MYH9*-correlata verranno sottoposti presso i rispettivi Centri di arruolamento ai seguenti accertamenti per la caratterizzazione clinica della malattia.

- 3.1 Anamnesi personale e familiare.
- 3.2 Esame fisico.
- 3.3 Esame emocromocitometrico (prelievo di 3 mL di sangue venoso anticoagulato con EDTA), per la determinazione della conta piastrinica automatica e del volume piastrinico medio (mean platelet volume, MPV).
- 3.4 Conta manuale delle piastrine su sangue capillare al microscopio ottico (prelievo di 1 mL di sangue capillare non anticoagulato).
- 3.5 Determinazione del tempo di stillicidio con metodica di Ivy modificata con Template; da effettuarsi solo se la conta piastrinica manuale è superiore a $100 \times 10^9/L$.³⁸

- 3.6 Esame delle urine del mattino, per la ricerca di ematuria microscopica; l'esame delle urine dovrà essere ripetuto due volte nell'ambito di due mesi. Nei casi in cui l'ematuria microscopica si associ a segni di infezione delle vie urinarie, quali leucocituria e batteriuria, l'esame non sarà preso in considerazione e dovrà essere ripetuto dopo la risoluzione dell'episodio infettivo.
- 3.7 Determinazione della proteinuria quantitativa su un campione di urine delle 24 ore;
- 3.8 Determinazione della creatinemia e della clearance della creatinina (prelievo di 5 mL di sangue venoso anticoagulato con eparina e di un campione delle urine delle 24 ore), per la ricerca di alterazione della funzionalità glomerulare;
- 3.9 Esame audiometrico standard, per la ricerca e caratterizzazione di deficit uditivo neurosensoriale;
- 3.10 Visita oculistica per la ricerca di cataratta o altre anomalie del cristallino;
- 3.11 Determinazione dei livelli sierici di transaminasi (AST e ALT), fosfatasi alcalina, gamma-GT e colinesterasi per la ricerca di anomalie nella funzionalità epatica (prelievo di 5 mL di sangue venoso anticoagulato con eparina).

La definizione della gravità della diatesi emorragica sulla base dei dati ricavati dall'anamnesi personale (punto 3.1) verrà effettuata attraverso un sistema di scoring dettagliato in appendice 1 (adattato da Tosetto *et al*³⁹).

Gli esami al punto 3.8 e al punto 3.11 possono essere eseguiti sullo stesso prelievo di 5 mL sangue venoso anticoagulato con eparina.

4. Follow-up

Nel caso di **assenza di manifestazioni extra-ematologiche della malattia e/o di diatesi emorragica**, gli accertamenti di controllo saranno effettuate con la seguente cadenza:

- 4.1 Anamnesi; esame fisico; esame emocromocitometrico; conta manuale delle piastrine su sangue capillare al microscopio ottico; esame urine standard, proteinuria quantitativa delle 24 ore, creatinemia e clearance della creatinina (ricerca complicanze renali); determinazione dei livelli plasmatici di transaminasi, fosfatasi alcalina, gamma-GT e colinesterasi (ricerca delle complicanze epatiche): **una volta ogni anno**, a meno che non intervengano significative variazioni del quadro clinico o non si verificano condizioni che comportano un aumento del rischio emorragico (quali necessità di interventi chirurgici, gravidanza, necessità di assunzione di farmaci anticoagulanti o antiaggreganti).

4.2 Esame audiometrico e visita oculistica: **una volta ogni tre anni.**

Nel caso di **presenza alla diagnosi (o di successivo rilievo) di manifestazioni extra-ematologiche** (glomerulonefrite cronica interstiziale, deficit uditivo neurosensoriale, cataratta presenile, anomalie della funzione epatica), la cadenza dei controlli per la specifica complicità dovrà essere valutata dal medico di riferimento in relazione alla natura, gravità ed evolutività delle anomalie renali, del deficit uditivo, visivo o delle anomalie epatiche. Gli accertamenti di base per il follow-up della malattia di cui al punto 4.1 e 4.2 dovranno comunque essere effettuati con la cadenza soprariportata.

Nel caso di **presenza di diatesi emorragica**, la cadenza dei controlli per la piastrinopenia e diatesi emorragica dovrà essere valutata dal medico di riferimento in relazione alla natura e gravità degli episodi emorragici. Gli accertamenti di base per il follow-up della malattia di cui al punto 4.1 e 4.2 dovranno comunque essere effettuati con la cadenza soprariportata.

5. Privacy

Ciascun paziente verrà identificato sulle etichette poste sui campioni biologici e sulle schede raccolta dati mediante un codice. Il codice rimanda ad un database dei dati anagrafici, clinici e genetici conservato presso il Centro Coordinatore: Clinica Medica III, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia (Responsabile: prof. Carlo Balduini). Tutti i dati raccolti saranno considerati riservati e solo il personale specializzato aderente allo studio potrà prenderne visione.

6. Analisi statistica

Verrà calcolata la prevalenza e l'intervallo di confidenza al 95% per la malattia *MYH9*-correlata e per i singoli genotipi associati. L'analisi delle correlazioni fra genotipo e fenotipo clinico verrà effettuata applicando l'appropriato test standard a due code (test t di Student, test Chi-quadro, Fisher exact test). La casistica verrà analizzata anche in relazione all'età di insorgenza delle manifestazioni non congenite della malattia mediante il log-rank test. Infine, verrà effettuata una analisi multivariata per controllare le correlazioni genotipo-fenotipo per l'effetto di fattori di confondimento.

Bibliografia

1. May R. Leukozyteneinschlusse. Dtsch Arch Klin Med 1909; 96:1-6.
2. Hegglin R. Gleichzeitige konstitutionelle verandenugen an neutrophilen und thrombocyten. Helv Med Acta 1945; 12:439-40.
3. Greinacher A, Mueller-Eckardt C. Hereditary types of thrombocytopenia with giant platelets and inclusion bodies in the leukocytes. Blut 1990; 60:53-60.
4. Greinacher A, Nieuwenhuis HK, White JG. Sebastian platelet syndrome: a new variant of hereditary macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions. Blut 1990; 61:282-8.
5. Young G, Luban NL, White JG. Sebastian syndrome: case report and review of the literature. Am J Hematol 1999; 61:62-5.
6. Noris P, Spedini P, Belletti S, Magrini U, Balduini CL. 1998. Thrombocytopenia, giant platelets, and leukocyte inclusion bodies (May-Hegglin anomaly): clinical and laboratory findings. Am J Med 1998; 104:355-360.
7. Mhaweck P, Saleem A. Inherited giant platelet disorders: classification and literature review. Am J Clin Pathol 2000; 113:176-90.
8. Peterson LC, Rao KA, Crosson JT, White JG. Fechtner syndrome: a variant of Alport syndrome with leukocyte inclusions and macrothrombocytopenia. Blood 1985; 65:397-406.
9. Gershoni-Baruch R, Baruch Y, Viener A, Lichtig C. Fechtner syndrome: clinical and genetic aspects. Am J Med Genet 1988; 31:357-67.
10. Rocca B, Laghi F, Zini G, Maggiano N, Landolfi R. Fechtner syndrome: report of a third family and literature review. Br J Haematol 1993; 85:423-6.

11. Epstein CJ, Sahud MA, Piel CF, et al. Hereditary macrothrombocytopenia, nephritis and deafness. *Am J Med* 1972; 75:299-310.
12. Eckstein JD, Filip DJ, Watts JC. Hereditary thrombocytopenia, deafness and renal disease. *Ann Intern Med* 1975; 82:639-45.
13. Martignetti JA, Heath KE, Harris J, et al. The gene for May-Hegglin anomaly localizes to a <1 Mb region on chromosome 22q12.3-13.1. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1449-54.
14. Toren A, Amariglio N, Rozenfeld-Granot G, et al. Genetic linkage of autosomal-dominant Alport syndrome with leukocyte inclusions and macrothrombocytopenia to chromosome 22q11-13. *Am J Hum Genet* 1999; 65:1711-7.
15. Cusano R, Gangarossa S, Forabosco P, et al. Localization of the gene responsible for Fechtner syndrome in a region <600 kb on 22q11-13. *Eur J Hum Genet* 2000;8:895-9.
16. Seri M, Cusano R, Gangarossa S, et al. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet* 2000; 26:103-5.
17. Kelley MJ, Jawien W, Ortel TL, Korczak JF. Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly. *Nat Genet* 2000; 26:106-8.
18. Seri M, Savino M, Bordo D, et al. Epstein syndrome: another renal disorder with mutations in the nonmuscle myosin heavy chain 9 gene. *Hum Genet* 2002; 110:182-6.
19. Arrondel C, Vodovar N, Knebelmann B, et al. Expression of the nonmuscle myosin heavy chain IIA in the human kidney and screening for MYH9 mutations in Epstein and Fechtner syndromes. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:65-74.
20. Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-

- Hegglin Anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet* 2001; 69:1033-45.
21. Seri M, Pecci A, Di Bari F, et al. MYH9-related disease: May Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82:203-15.
 22. Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1496:3-22.
 23. Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, et al. Identification of six novel MYH9 mutations and genotype-phenotype relationships in autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions. *J Hum Genet* 2001; 46:722-9.
 24. Inherited thrombocytopenias: toward a molecular understanding of disorders of platelet production. *Curr Opin Pediatr* 2004; 16:15-22.
 25. Dong F, Li S, Pujol-Moix N, et al. Genotype-phenotype correlation in MYH9-related thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2005; 130:620-7.
 26. Pecci A, Noris P, Invernizzi R, et al. Immunocytochemistry for the heavy chain of the non-muscle myosin IIA as a diagnostic tool for the MYH9-related disorders. *Br J Haematol* 2002; 117:164-7.
 27. Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, et al. Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations. *Lab Invest* 2003; 83:115-122
 28. Noris P, Pecci A, Di Bari F, et al. Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica* 2004; 89:1219-25.
 29. Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F, et al. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica* 2003; 88:582-92.

30. Balduini CL, Iolascon A, Savoia A. Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy. *Haematologica* 2002; 87:860-880.
31. Heller PG, Pecci A, Glembotsky AC, et al. Unexplained recurrent venous thrombosis in a patient with *MYH9*-related disease. *Platelets* 2006, in press.
32. Fujita Y, Fujii T, Nishio A, Tuboi K, Tsuji K, Nakamura M. Familial case of May-Hegglin anomaly associated with familial spastic paraplegia. *Am J Hematol* 1990; 35:219-21.
33. Gerver WJ, Neucker AV, Schrandler-Stumpel CT. A patient with pituitary growth hormone deficiency and May-Hegglin anomaly: a distinct entity? *Genet Couns* 1994; 5:307-10.
34. Pecci A, Canobbio I, Balduini A, et al. Pathogenetic mechanisms of hematological abnormalities of patients with *MYH9* mutations. *Hum Mol Genet* 2005; 14:3169-78.
35. Cabrera JM, Fontan G, Lorente F, et al. Defective neutrophil mobility in the May-Hegglin anomaly. *Br J Haematol* 1981; 47:337-43.
36. Ghiggeri GM, Caridi G, Magrini U, et al. Genetics, clinical and pathological features of glomerulonephritis associated with mutations of nonmuscle myosin IIA (Fechtner syndrome). *Am J Kidney Dis* 2003; 41:95-104.
37. Marini M, Bruschi M, Pecci A, et al. Non-muscle myosin heavy chain IIA and IIB interact and co-localize in living cells: relevance for *MYH9*-related disease. *Int J Mol Med* 2006; 17:729-36.
38. *Diagnostic and Laboratory Hematology*. 4th Ed. New York; Grune and Stratton, 1968.
39. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost* 2006; 4:766-73.