

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Pediatria Salus Pueri

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE
DELLA PROGRAMMAZIONE

INDIRIZZO: GENETICA BIOCHIMICA E MOLECOLARE

CICLO XXIII

TESI DI DOTTORATO

**CRITICITÀ DELLO SCREENING Uditivo Neonatale: Prospettive
Razionali dello Screening Genetico dell'Ipoacusia**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Dott. Maurizio Scarpa

Supervisore :Dott.ssa Eva Orzan

Dottoranda: Dott. ssa Carla Morando

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1. IPOACUSIA.....	7
1.1.1 DEFINIZIONE	7
1.1.2 INCIDENZA.....	7
1.1.3.CLASSIFICAZIONE	8
1.1.4 EZIOLOGIA.....	9
1.2. GLI EFFETTI DELLA PERDITA Uditiva DEL BAMBINO	36
1.3. LE POSSIBILITÀ DI INTERVENTO PRECOCE	38
1.4. LO SCREENING NEONATALE.....	41
1.5. EMISSIONI OTOACUSTICHE	44
1.6. POTENZIALI EVOCATI Uditivi DEL TRONCO ENCEFALICO (ABR).....	46
1.7. LA REALTÀ DELLO SCREENING Uditivo NEONATALE IN ITALIA.....	50
1.8. LO SCREENING GENETICO NEONATALE DI DFNB1.....	51
2. SCOPO DELLA TESI	59
3. MATERIALI E METODI	60
4. RISULTATI.....	63
5. DISCUSSIONE.....	69
6. BIBLIOGRAFIA	75

RIASSUNTO

Introduzione: L'ipoacusia è il deficit neurosensoriale più comune alla nascita, la sua prevalenza è stimata 1-3 ogni 1000 nati vivi. L'evidenza fornita dalla letteratura sul periodo critico per l'acquisizione del linguaggio, ha promosso l'adozione dello screening uditivo neonatale universale (Universal Newborn Hearing Screening, UNHS) in molti paesi degli Stati Uniti d'America. In Italia lo UNHS è stato introdotto per la prima volta nel 1997; nel 2002, alcuni ospedali della regione Veneto hanno aderito a un progetto pilota sullo UNHS e oggi la quasi totalità dei centri nascita veneti lo ha adottato.

Parallelamente all'adozione dei programmi di UNHS e all'identificazione precoce dei casi di ipoacusia, si è verificato un corrispondente ampliamento delle conoscenze nel campo della genetica dell'ipoacusia preverbale. In alcune popolazioni, più della metà dei casi di deficit uditivo è dovuta a mutazioni unicamente a carico di GJB2 e GJB6, poste sul locus DFNB1. Il fatto che mutazioni dei geni GJB2 e GJB6 rendono conto di almeno il 50% delle perdite uditive autosomiche recessive (chiamate DFNB1 sensorineural hearing loss, DFNB1 SNHL), benché con variazioni di prevalenza e variazioni nella frequenza di mutazioni specifiche nelle diverse popolazioni studiate, ha indotto a considerare che l'associazione dello screening genetico di DFNB1 a UNHS può presentare numerosi vantaggi da un punto di vista clinico ed economico-sanitario.

Molti studi hanno valutato l'opportunità di affiancare lo screening genetico di DFNB1 allo UNHS, ma vi sono ancora molte questioni non risolte: che tipo di test andrebbe eseguito: la ricerca delle mutazioni più comuni o il sequenziamento completo di GJB2 e GJB6? Come verrebbero interpretati determinati risultati (nel caso, per esempio lo screening genetico individuasse solo una mutazione di GJB2)? Il rapporto costo beneficio è favorevole?

Scopo: Lo scopo di questa tesi è di analizzare la modalità di esecuzione di UNHS in cinque centri nascita della regione Veneto e di valutare il razionale dell'eventuale attuazione dello screening genetico di DFNB1 SNHL.

Metodi: Tra il 2008 e il 2010, è stata condotta un'indagine in 5 punti nascita della regione Veneto al fine di valutare se le modalità di esecuzione dello UNHS rispondevano ai criteri stabiliti dalle linee guida internazionali redatte dal Joint Committee on Infant Hearing (JCIH) e di identificare le criticità del programma di UNHS. In particolare sono stati valutati i seguenti parametri: copertura dello screening, tipo di protocollo per l'esecuzione dello UNHS, numero di soggetti con ipoacusia neurosensoriale identificati e casi di DFNB1 SNHL, percentuale di pazienti che hanno interrotto l'iter diagnostico terapeutico (lost to follow up). I centri nascita coinvolti nello studio sono stati Padova, Thiene (VI), Castelfranco Veneto (TV), Abano Terme (PD) and Monselice (PD). Il programma di UNHS in questi ospedali è così organizzato: presso ciascun centro di accoglienza neonatale, il personale paramedico esegue lo screening su tutti i neonati mediante le emissioni otocistiche transienti automatiche (A-TEOAEs), coloro che

risultano REFER vengono sottoposti al test dei potenziali evocati uditivi del tronco (A-ABR) presso gli ambulatori della Clinica Pediatrica di Padova entro i tre mesi di vita, se questo test conferma il sospetto di un deficit uditivo, attorno al quinto mese di vita, il bambino esegue una valutazione audiologica presso il servizio di Audiologia pediatrica dell'Ospedale di Padova. I casi di ipoacusia identificati vengono inviati al Laboratorio di Malattie Rare della Clinica Pediatrica di Padova per eseguire il test genetico che consiste nel sequenziamento completo di GJB2 e GJB6.

Risultati: La copertura in tutti i centri raggiunge circa il 100%. Ogni ospedale ha redatto un protocollo per l'esecuzione dello UNHS basandosi sulle linee guida internazionali del JCIH e adattandole alle peculiarità della propria realtà (natalità, personale addetto all'esecuzione dello UNHS, livello di terapia intensiva neonatale). La prevalenza di ipoacusia è stata stimata 0,8%. Circa la metà dei soggetti si è sottoposta al test genetico per mutazioni di DFNB1. La percentuale di pazienti lost to follow up è circa 30% nella popolazione nata presso la Clinica Pediatrica di Padova e circa 46% tra coloro che provengono dai centri di Thiene e Castelfranco Veneto.

Conclusioni: Tutti i centri eseguono lo UNHS secondo le linee guida internazionali di JCIH, la prevalenza di ipoacusia rilevata è nel range di quella riportata da alcuni lavori sulla popolazione italiana. Anche le caratteristiche della perdita uditiva in termini di entità del deficit e bilateralità sono concordi con quanto riportato in letteratura. Per quanto riguarda i soggetti affetti da DFNB1 SNHL, possiamo affermare che, come riportato in numerosi studi vi è variabilità fenotipica per quanto concerne la gravità della perdita. La percentuale di pazienti lost to follow up è importante ma inferiore rispetto a quella rilevata nella realtà americana. L'introduzione dello screening genetico neonatale di DFNB1 SNHL potrebbe ridurre tale percentuale. Tuttavia, poiché le questioni precedentemente sollevate in merito al suddetto screening non hanno ancora ottenuto risposte univoche, sono necessari ulteriori studi prima della sua attuazione.

ABSTRACT

REVIEW OF UNIVERSAL NEWBORN HEARING SCREENING: RATIONAL PROSPECTS OF GENETIC SCREENING FOR DFNB1 RELATED DEAFNESS

Introduction: Hearing loss (HL) is the most common human birth defect occurring in 1 to 3 per thousand infants. Recent evidence for a critical period for language acquisition promoted the adoption of Universal Newborn Hearing Screening (UNHS) in many countries of the United States of America. In Italy UNHS was first introduced in 1997; in 2002, some hospitals of Veneto region were involved in a pilot project on UNHS and now almost all hospital birth centers has adopted it.

Concurrent with the enforcement of UNHS programs, an explosion of knowledge occurred in the field of genetics with the identification of over 100 genes associated with hearing loss. However, more than half of infants with nonsyndromic sensorineural hearing loss have identifiable mutations in only two genes: GJB2 and GJB6, located on DFNB1 locus. As GJB2 and GJB6 mutations are responsible up to 50% of autosomal recessively inherited hearing loss (the so called: DFNB1 sensorineural hearing loss, DFNB1 SNHL), even if with changes in prevalence and in specific mutation frequencies in different populations, the association of genetic screening for DFNB1 SNHL to UNHS may have several clinical and financial advantages.

The use of genetic testing for DFNB1 SNHL as an adjunct to bedside UNHS has been discussed but there are open questions limiting its implementation: what type of testing should be done: common mutations or sequencing the entire genes GJB2 and GJB6? How will the results be explained (e.g. the genetic test finds out a single GJB2 mutation)? What is the cost/benefit ratio?

Purpose: The aim of this thesis is to perform a critical analysis of the UNHS done in five hospitals in the region of Veneto and to discuss the advantages of the possible implementation of genetic screening for DFNB1 SNHL.

Methods: Between 2008 and 2010, a survey of five well-baby nurseries in Veneto region has been conducted to evaluate the progress of the UNHS in achieving goals established by the Joint Committee on Infant Hearing (JCIH) and to identify critical aspects of the UNHS program. Particular, the analysis aims to describe: percentage screening coverage, type of UNHS methodological protocol, number of infants affected by SNHL identified and cases of DFNB1 SNHL, extent of the population "lost to follow up". The hospitals involved were Padova, Thiene (VI), Castelfranco Veneto (TV), Abano Terme (PD) and Monselice (PD). The UNHS program in these centers is organized as follows: the nurseries screened newborns by automated transient evoked otoacoustic emissions (A-TEOAEs), the ones resulted REFER at A-

TEOAEs are evaluated by automated auditory brainstem response (A-ABR) in the Pediatric Clinic of Padova within the first three months of life, if this test confirms the suspicion of hearing loss, at five months of age, the infant undergo the audiological evaluation at the Pediatric Audiology Unit of Padova Hospital. Cases of SNHL identified are addressed to the Rare Disease Laboratory of the Pediatric Clinic of Padova to perform genetic testing consisting of the complete sequencing of GJB2 and GJB6.

Results: .The coverage rate for all the centers is about 100%. Each hospital has his own UNHS protocol based on JCIH guidelines, adapted to the characteristics of the birth center (birthrate, personnel responsible for the UNHS, neonatal intensive care level). The prevalence of HL detected is 0.8%. About a half of patients with SNHL underwent DFNB1 SNHL genetic test. The percentage of patients “lost to follow up” is about 30% for infants born in the Pediatric Clinic of Padova and about 46% for the ones born in Thiene and Castelfranco Veneto.

Conclusions: All the centers perform UNHS according to JCIH guidelines, the prevalence of HL detected is concordant with the one reported in Italian infant population. Characteristics of the HL as the degree of hearing loss and the bilaterality are concordant with literature. Patients affected by DFNB1 SNHL present the phenotypic variability reported by several studies. Percentage of infants “lost to follow up” is considerable but lower in comparison to the American reality of UNHS. Newborn genetic testing for DFNB1 SNHL in this setting may be helpful in reducing the percentage of patients “lost to follow up”. However, as the above mentioned questions on DFNB1 SNHL genetic testing have not yet univocal answers, before its implementation, further studies are needed.

1. INTRODUZIONE

1.1. Ipoacusia

1.1.1 Definizione

La diagnosi di ipoacusia è data dalla dimostrazione di una riduzione dell'acuità uditiva.

L'ipoacusia può essere definita come trasmissiva, neurosensoriale, mista e centrale. Il deficit uditivo di tipo trasmissivo è causato da alterazioni dell'orecchio esterno o dell'orecchio medio, generalmente interessa tutte le frequenze nello stesso modo. L'ipoacusia neurosensoriale è causata da un danno dell'orecchio interno o del nervo acustico. La forma mista è causata da entrambe le situazioni sopra citate. L'ipoacusia centrale è dovuta a un deficit delle vie uditive del tronco fino alla corteccia uditiva. Quest'ultima evenienza si manifesta con un'alterazione del processamento degli stimoli sonori piuttosto che un deficit quantitativo di essi (Behrman, 1997).

Le ipoacusie possono essere ulteriormente divise in stabili e progressive a seconda dell'andamento della perdita nel tempo e in congenite e acquisite in base all'epoca di esordio. L'eziologia permette di distinguere le forme genetiche da quelle acquisite.

1.1.2 Incidenza

Studi condotti negli Stati Uniti stimano che l'incidenza dell'ipoacusia permanente vari da 1 a 3 ogni 1000 nati vivi (Stevens Wrightson, 2007; Centres of Disease Control and Prevention, 2007; The National Institutes of Health Consensus Development Conference on Early Identification of Hearing Impairment, 1993). Per quanto riguarda la situazione globale, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ritiene che nei paesi industrializzati l'incidenza di ipoacusia sia da 2 a 4 ogni 1000 nati vivi mentre nei paesi in via di sviluppo questa aumenti fino a 6 ogni 1000 nati vivi. (World Health Organization, 2006).

La differenza tra le incidenze di ipoacusia alla nascita è dovuta ai diversi criteri diagnostici e alla diversa applicazione dello screening neonatale (Morton et al, 2006).

Uno studio condotto nel Regno Unito ha calcolato che l'incidenza di ipoacusia alla nascita è di circa 1,33 su 1000 nati vivi e che la prevalenza aumenta durante l'infanzia fino a 2,7 ogni 1000 bambini sotto i 5 anni di età e a 3,5 ogni 1000 durante l'adolescenza. A ogni 10 neonati con perdita uditiva diagnosticata alla nascita se ne aggiungerà un numero variabile da 5 a 9 prima dei 9 anni di vita. (Fortnum et al, 2001).

In Italia, un'indagine condotta nel 2007 (Bubbico et al, 2007), ha rilevato che la prevalenza di ipoacusia congenita bilaterale (definita come deficit uditivo neurosensoriale di entità >60 dB HL nella media delle frequenze di 500-1000-2000-4000 Hz nell'orecchio migliore) è di 0,72 per 1000 nati.

Durante le ultime 3-4 decadi, l'incidenza di ipoacusia neurosensoriale acquisita nei bambini nati nei paesi industrializzati è diminuita grazie al miglioramento delle cure neonatali e al potenziamento del programma di vaccinazioni. Questi cambiamenti di incidenza non si possono estendere alla popolazione pediatrica dei paesi in via di sviluppo dove l'alta prevalenza di unioni tra consanguinei tipica di alcune aree e lo stato socio-sanitario sono causa di forme congenite e acquisite di ipoacusia neurosensoriale (Smith et al, 2005).

1.1.3. Classificazione

Per quanto riguarda l'entità dell'ipoacusia sono state pubblicati diversi tipi di classificazioni. In questa tesi ne citiamo due: quella del BIAP (Bureau International di Audiophonologie) e quella della Organizzazione mondiale della Sanità. La prima è stata redatta nel 1997, definisce la soglia uditiva del soggetto normoacusico inferiore a 20 dB, mentre classifica le ipoacusie in lievi, moderate, gravi o profonde a seconda della perdita uditiva che viene calcolata facendo la media delle soglie relative alle frequenze di 500, 1000, 2000 e 4000 Hz. La tabella 1 rappresenta la classificazione BIAP.

Udito normale	< 20 dB
LIEVE	21 dB - 40 dB
MEDIA	1° grado: 41 dB - 55 dB 2° grado: 56 dB - 70 dB
SEVERA O GRAVE	1° grado: 71 dB - 80 dB 2° grado: 81 dB - 90 dB
PROFONDA	1° grado: 91 dB - 100 dB 2° grado: 101 dB - 110 dB 3° grado: 111 dB - 119 dB
COFOSI (PERDITA TOTALE)	= > 120 dB

TABELLA 1: CLASSIFICAZIONE BIAP

La perdita di udito può essere relativa solo ad alcune frequenze. Si parla di ipoacusia per le basse frequenze se corrisponde a stimoli inferiori a 500 Hz, media tra 501 e 2000 Hz, alta superiore a 2000 Hz.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha presentato, in un documento del 2006, un'altra classificazione. La perdita uditiva viene calcolata facendo la media delle soglie relative alle frequenze di 500, 1000, 2000 e 4000 Hz nell'orecchio migliore (World Health Organization, 2006).

1 Grado 0	2 25 dB
3 Grado 1-lieve	4 26-40 dB
5 Grado 2-moderato	6 31-60 dB
7 Grado 3-severo	8 61-80 dB
9 Grado 4-profondo	10 >80 dB

TABELLA 2: CLASSIFICAZIONE SECONDO WHO

1.1.4 Eziologia

L'eziologia del danno uditivo comprende cause genetiche, responsabili di circa il 50% dei casi di menomazione uditiva dell'infanzia di grado da moderato a grave, o da fattori acquisiti (cause esogene). L'ipoacusia di origine genetica può essere suddivisa in due categorie: sindromica e non sindromica. Le forme non sindromiche o ipoacusie isolate sono responsabili di circa il 70% delle ipoacusie di origine genetica, le forme sindromiche sono responsabili del restante 30% (Morton, 1991; Marazita et al, 1993). Sono state identificate più di 300 forme di ipoacusia sindromica (Toriello et al, 2004). Alcune di queste forme sono elencate nella tabella 3.

Ipoacusia sindromica		
Patologia	Quadro clinico	Ereditarietà
Sindrome di Alport	Ematuria con evoluzione verso insufficienza renale, ipoacusia progressiva, lenticono anteriore	X linked o AR
Sindrome di Alström	Obesità sin dall'infanzia, distrofia retinica progressiva, diabete tipo 2, ipoacusia neurosensoriale progressiva, acantosis nigricans, cardiomiopatia	AR
Sindrome di Bartter tipo 4	Polidramnios e prematurità con acidosis metabolica, alti livelli di renina e aldosterone con perdita di sali, insufficienza renale	AR
Deficit di Biotinidasi	sintomi neurologici (convulsioni, ipotonia) alterazioni cutanee (eruzioni esantematiche e alopecia), deficit visivo (atrofia ottica) e uditivo	AR
Sindrome di Jervell e Lange-Nielsen	Ipoacusia neurosensoriale profonda, prolungamento dell'intervallo QT, sincope	AR
Sindrome di Pendred	Ipoacusia neurosensoriale, gozzo	AR
Sindrome di Usher	Ipoacusia neurosensoriale, deficit vestibolare, retinite pigmentosa. 3 forme	AR
Acidosi tubulare renale	acidosi plasmatica, ipercloremia, ipocaliemia, ipercalciuria e nefrocalcinosi, ipocitruria, ritardo di crescita, ipoacusia	AR
Malattia di Refsum	Retinite pigmentosa, neuropatia periferica	AR
Sindrome di Treacher Collins	ipoplasia dei padiglioni auricolari, atresia del condotto uditivo esterno, anomalie della catena ossiculare e sordità trasmissiva, ipoplasia osso malare e zigomatico coloboma della palpebra inferiore mandibolare, palatoschisi	AD
Sindrome di Waardenburg	Ipoacusia neurosensoriale e alterazioni della pigmentazione; 4 forme	AD
Sindrome Brachio-otorenale (BOR)	Deficit uditivo, anomalie degli archi branchiali (schisi, fistole, cisti), malformazioni dei padiglioni auricolari, anomalie renali (da malformazioni delle vie urinarie ad agenesia renale)	AD

Malattia di Fabry	dolori alle estremità, angiocheratomi, ipertrofia ventricolare sinistra, accidenti vascolari cerebrali, ipoacusia, insufficienza renale).	X linked
-------------------	---	----------

TABELLA 3: IPOACUSIA SINDROMICA (MORTON ET AL, 2006, MODIFICATO)

Ipoacusia genetica sindromica

Le forme autosomiche recessive

La sindrome di Pendred

Tra le forme sindromiche, una delle più frequenti è la sindrome di Pendred che è causa del 5% di tutti i casi di ipoacusia autosomica recessiva (Napiontek et al, 2004). La sindrome di Pendred è caratterizzata da un deficit uditivo neurosensoriale e gozzo tiroideo. L'ipoacusia è caratterizzata da esordio nella prima infanzia, è bilaterale, in alcuni casi asimmetrica, fluttuante e spesso progressiva, è causata da un'alterazione strutturale della coclea che può variare dalla malformazione di Mondini (la coclea non è completa nei suoi due giri e mezzo), a un acquedotto vestibolare allargato (in quest'ultimo caso l'ipoacusia può non associarsi a deficit tiroideo). Circa 80% dei soggetti affetti presenta gozzo associato o meno a ipotiroidismo. Tale quadro è spiegato da un deficit di organizzazione dello Iodio. La sindrome di Pendred è causata da una mutazione del gene SLC26A4 posto sul cromosoma 7 (7q22.3-q31.1) che codifica per una proteina composta da 780 aminoacidi chiamata Pendrina (Everett et al, 1997). Tale proteina viene espressa nella tiroide (Everett et al, 1997; Bidart et al, 2000), nei reni (Royaux et al, 2001) e nell'orecchio interno (Everett et al, 1999). Studi in vitro hanno dimostrato che è deputata nel trasporto degli ioni Cloro e Iodio (Scott et al, 1999). I soggetti affetti da sindrome di Pendred generalmente presentano due mutazioni SLC26A4. Tuttavia è stato valutato che il 61% degli individui non sindromici con riscontro radiologico di acquedotto vestibolare allargato è portatore di una singola mutazione di SLC26A4 (Pryor et al, 2005), questo può indurre a pensare che tali casi siano dovuti al sommarsi di due mutazioni: quella di SLC26A4 e un'altra riguardante un secondo gene (Hulander et al, 2003).

La sindrome di Usher

E' una sindrome a trasmissione autosomica recessiva caratterizzata da un duplice deficit sensoriale: gli individui affetti presentano ipoacusia congenita e sviluppano retinite pigmentosa. Generalmente quest'ultimo problema inizia durante la seconda decade di vita con cecità notturna e restrizione del campo visivo per poi progredire successivamente, l'elettroretinogramma (ERG) eseguito dai due ai quattro anni di vita è fortemente alterato e l'oftalmoscopia mostra degenerazione pigmentata della retina. Al deficit uditivo si associa alterazione della funzione vestibolare. La sindrome di Usher ha una prevalenza di circa 3-4/100.000 nati vivi nella popolazione europea (Boughman et al, 1983), ne sono stati descritti tre tipi sulla base del grado di perdita uditiva e di disfunzione vestibolare. La sindrome di Usher tipo I è caratterizzata da ipoacusia neurosensoriale congenita severa o profonda e da alterazione della funzione vestibolare, i sintomi della retinite pigmentosa non si manifestano alla nascita ma l'elettroretinogramma è alterato già nella prima infanzia. Ci sono diverse forme della sindrome di Usher di tipo I ma non è possibile classificarle in base alla clinica. Circa il 75% delle forme di tipo I è causato da una mutazione del gene MYO7A posto sul cromosoma Xq13.5, tale gene codifica per la miosina VIIa, proteina appartenente alla famiglia delle miosine, espressa sulle ciglia dei fotorecettori (Wolfrum et al, 1998) e nel neuroepitelio vestibolare e cocleare dell'embrione (Weil et al, 1996). Altri tipi di mutazione che causano la sindrome di Usher tipo I sono a carico del gene Armonina (USH1C) posto su X11q14.3, il gene Otocaderina (CDH23) posto su 10q2, il gene Protocaderina 15 (PCDH15) posto su 10q11.2-21 (Birgit L et al, 2004).

La forma II, invece, si distingue per deficit uditivo moderato e normale funzione vestibolare, il deficit visivo è caratterizzato da esordio ed entità sovrapponibili al quadro del tipo I, l'elettromiogramma permette la diagnosi differenziale tra le due forme. Sono stati identificati due geni responsabili della sindrome di Usher tipo II: usherina e VLGR1.

La forma III si distingue dalle precedenti per esordio tardivo sia del deficit uditivo e vestibolare che per quello visivo. L'ipoacusia insorge quando il linguaggio si è già sviluppato ed è progressiva. La retinite pigmentosa ha inizio nella seconda decade. E' causata da una mutazione del gene Clarina 1 (USH3) posto su X3q21-25, questo gene codifica per una proteina che è stata identificata su cellule cigliate e ganglio spirale (Adato et al, 2002).

La sindrome di Jervell e Lange-Nielsen

Terza in ordine di frequenza tra le sindromi che causano ipoacusia a trasmissione autosomica recessiva è la sindrome di Jervell e Lange-Nielsen, caratterizzata da ipoacusia

congenita e cardiopatia. Quest'ultima è dovuta a un intervallo QT anormalmente lungo all'elettrocardiogramma (QTc >440 msec) espressione di un'anomalia della ripolarizzazione, frequentemente associato ad alterazioni della morfologia dell'onda T. Spesso la malattia viene diagnosticata in soggetti giovani, nei quali, in determinate circostanze (stress fisico ed emotivo, assunzione di farmaci), si manifestano sincopi per turbe del ritmo ventricolare che possono causare morte improvvisa. In alcuni casi i disturbi si manifestano nei primi mesi di vita, mentre la maggior parte degli episodi si verificano generalmente più tardi. Se la malattia viene diagnosticata dopo la prima sincope, quando non si riveli fatale, il trattamento a base di beta-bloccanti è efficace in più del 90% dei casi. In assenza di una terapia, la mortalità tra i pazienti che presentano sintomi è molto elevata (70%). La sindrome di Jervell e Lange-Nielsen è una delle due forme della sindrome del QT lungo, l'altra, chiamata di Romano-Ward è a trasmissione autosomica dominante e si presenta solo con il quadro cardiaco. Sono stati identificati 5 geni responsabili della sindrome del QT lungo: KCNQ1 e KCNH2 (HERG), che codificano per canali del potassio; SCN5A, che codifica per un canale del sodio; KCNE1, che codifica per la proteina IsK (o minK), che regola il canale del potassio KVLQT1 (KCNQ1); KCNE2, che codifica per la proteina MiRP1 (minK-related peptide 1), che regola il canale del potassio HERG (KCNH2). Dopo assunzione di alcuni farmaci, le manifestazioni sincopali e le aritmie possono rivelare una sindrome del QT lungo definita "acquisita". In realtà, un rilevante numero di questi sintomi corrisponde a forme fruste di QT lungo congenito. Lo studio delle correlazioni fenotipo-genotipo mostrano che alcuni fattori, che causano le alterazioni ritmiche, sono più frequentemente associati ad un gene piuttosto che ad un altro. Inoltre, l'individuazione di alterazioni dell'onda T, all'ECG o all'Holter ECG, permette di orientare la ricerca di mutazioni verso un gene piuttosto che verso un altro. E' realistico pensare che le attuali conoscenze cliniche e molecolari, i progressi legati alla diagnosi e alla valutazione della prognosi produrranno lo sviluppo di terapie appropriate (Hainque, 2002).

Il deficit di Biotinidasi

E' una sindrome a trasmissione autosomica recessiva causata dal deficit di Biotinidasi (BTD), un enzima che interviene nel metabolismo della Biotina, vitamina idrosolubile, coenzima di quattro carbossilasi implicate nella neoglucogenesi (piruvato carbossilasi), nella sintesi degli acidi grassi (acetil-CoA carbossilasi) e nel metabolismo degli aminoacidi ramificati (propionil-CoA carbossilasi e beta metilcrotonoil-CoA carbossilasi) (Smith et al, 2007). La sua incidenza è stimata circa 1/60.000 nati vivi (Morton et al, 2006), se ne distinguono due forme: un deficit grave quando l'attività plasmatica misurata di tale enzima è tra 0 e 10% dell'attività

normale e un deficit lieve quando l'attività dell'enzima è tra 10 e 30% (Milánkovics et al, 2007). Gli individui non trattati e che hanno un deficit grave generalmente presentano sintomi neurologici (convulsioni, ipotonia) che possono esitare in ritardo psicomotorio e coma, alterazioni cutanee (eruzioni esantematiche e alopecia), congiuntivite ma anche deficit visivo (atrofia ottica) e uditivo. Si tratta di un'ipoacusia neurosensoriale di grado variabile tra moderato e profondo, caratterizzata da una perdita sulle alte frequenze, che si manifesta in circa il 76% degli individui sintomatici (Wolf et al, 2002). Nonostante la maggior parte dei sintomi migliori dopo l'inizio del trattamento con Biotina (5-20 mg al giorno), il deficit uditivo, quello visivo e il ritardo psicomotorio non risultano reversibili (Wolf et al, 2002; Genc et al, 2007). Alcuni autori (Sivri-Kalkanoglu et al, 2007), tuttavia, segnalano un arresto della progressione dell'ipoacusia dopo l'inizio della terapia. E' stato individuato un singolo gene associato al deficit di Biotinidasi, si tratta del gene BTBD9, posto sul cromosoma 3p25 (Cole et al, 1994). Uno studio condotto in Turchia (Sivri-Kalkanoglu et al, 2007), dove la frequenza di tale patologia è più alta per la presenza di unioni tra consanguinei, si è prefisso di trovare una correlazione tra genotipo e fenotipo. Sono state distinte due popolazioni di bambini affetti: quella di omozigoti per una null mutation a carico del gene BTBD9 (la biotinidasi non viene espressa) e quella di omozigoti per una missense mutation (l'enzima viene espresso ma è alterato). Il primo gruppo presentava sintomi neurologici, cutanei, visivi e deficit uditivo, tuttavia, i bambini trattati dalla nascita poiché fratelli di pazienti noti, non hanno sviluppato ipoacusia. Il secondo gruppo presentava tutti i sintomi tipici del quadro sindromico a eccezione del deficit uditivo. Gli autori concludono con questi risultati preliminari affermando che sono necessari ulteriori studi per validare la relazione tra fenotipo e genotipo.

La malattia di Refsum

La forma infantile della malattia di Refsum si manifesta con retinite pigmentosa e neuropatia periferica. Appartiene al gruppo delle malattie perossisomiali, un sottogruppo delle leucodistrofie. Si tratta di una condizione estremamente rara, la cui prevalenza è 1/20.000.000 (Bauman et al, 2006). I sintomi si manifestano alla nascita, spesso con retinite pigmentosa, che esita in cecità, o con grave ipoacusia. Altri sintomi sono atassia cerebellare, nistagmo, ipotonia, ritardo della crescita, deficit cognitivo, dimorfismi facciali lievi, osteoporosi, epatomegalia e ipocolesterolemia. Il deficit uditivo è stato riscontrato nel 80% dei soggetti affetti (Bergsmark et al, 1968; Feldmann et al, 1981), generalmente compare asimmetrico, nella seconda decade e progredisce in severità dalla quarta decade (Djupestrand et al, 1983). Questa malattia autosomica recessiva è causata da un difetto nella biogenesi dei

perossisomi, che causa un aumento dei livelli plasmatici di acido fitanico, acido pristanico e degli acidi grassi a catena molto lunga (VLCFA). Il deficit dei perossisomi e l'alterazione della funzione perossisomiale osservati nei pazienti suggeriscono che la forma infantile sia causata da una mutazione in uno dei geni PEX1, PEX2 o PEX6, il cui prodotto contribuisce alla formazione e al mantenimento dei perossisomi. La prognosi è notevolmente migliorata utilizzando una dieta priva di acido fitanico (prodotti caseari, carne bovina, agnello o alcuni tipi di pesci). Alcuni bambini necessitano regolarmente della plasmateresi. (Bauman et al, 2006).

Acidosi tubulare renale

L'acidosi tubulare distale renale è caratterizzata da aumento del pH urinario e diminuzione del pH plasmatici. La sua prevalenza non è nota (Niaudet, 2007). E' dovuta a un difetto della secrezione degli idrogenioni dalle cellule del tubulo collettore, questo porta a acidosi plasmatica, ipercloremia, ipocaliemia, ipercalciuria e nefrocalinosi, ipocitruria. I soggetti affetti presentano ritardo di crescita e, in alcuni casi, ipoacusia. Se ne riconoscono diverse forme: acidosi tubulare renale tipo I che si trasmette come carattere autosomico recessivo, è dovuta a mutazioni a carico del gene ATP6B1 che codifica per la proteina ATP6V1B1, subunità della pompa protonica. Tale forma si associa a ipoacusia progressiva. Anche l'acidosi tubulare renale tipo II si trasmette come carattere autosomico dominante e anch'essa è causata da mutazioni a carico del gene ATP6B1. In questo caso la proteina alterata è ATP6V0A4, un'altra subunità della pompa protonica, l'ipoacusia può fare parte del quadro clinico ma non è sempre presente. Le forme causate da una mutazione del gene SLC4A1, che codifica per una proteina responsabile dello scambio di anioni, sono a trasmissione autosomica dominante o, meno frequentemente, autosomica recessiva, anch'esse si associano a deficit uditivo progressivo. La diagnosi viene posta mediante il test di acidificazione delle urine con cloruro di ammonio. La terapia consiste nel correggere i livelli plasmatici di bicarbonato, potassio, calcio e supplementare la dieta con potassio e sodio bicarbonato; tale trattamento si è rivelato efficace nel favorire la ripresa della crescita e nel ridurre la calciuria.

La sindrome di Alström

Si tratta di una sindrome estremamente rara, ne sono stati descritti 80 casi al mondo (Robert-Gnansia, 2003). E' caratterizzata da degenerazione retinica progressiva e obesità, dopo la prima decade compaiono anche ipoacusia progressiva, diabete mellito tipo II, insufficienza renale e cardiaca; ci sono notevoli differenze nel quadro clinico anche tra individui della stessa famiglia. La distrofia retinica è progressiva, l'incapacità nella percezione della luce inizia dalla seconda decade. L'ipoacusia neurosensoriale si sviluppa dopo i 20 anni ed è di diversa entità. E' una sindrome trasmessa come carattere autosomico recessivo, è dovuta a una mutazione del gene ALMS1, posto sul cromosoma 2p13.

La sindrome di Bartter (BS)

Trasmessa come carattere autosomico recessivo nelle sue prime quattro forme e come carattere autosomico dominante nel tipo 5, è caratterizzata da alcalosi ipocaliémica e ipercalciuria di diversa entità. E' dovuta a un difetto nella regolazione del riassorbimento del NaCl a livello dell'ansa di Henle. Il quadro clinico è quindi caratterizzato da poliuria, ipocaliémia dovuta a iperattività del sistema renina-angiotensina-aldosterone, ipomagnesemia, bassi livelli plasmatici di bicarbonato, ipercalciuria di diversa entità, tali sintomi esordiscono a età differenti nelle diverse forme. La sindrome di Bartter tipo 4 associa al quadro precedentemente descritto ipoacusia neurosensoriale. Questa forma è infatti dovuta a una mutazione del gene BSND, sito sul cromosoma 1p31, che codifica per la proteina Barttina, espressa a livello del rene e della coclea (Miyamura et al., 2003; Reinalter et al., 2004).

Gli individui affetti da sindrome di Bartter presentano un deficit di crescita staturo-ponderale rispetto alla media. Attualmente la terapia consiste nel correggere le alterazioni elettrolitiche (Colussi, 2005).

Le forme autosomiche dominanti

La sindrome di Waardenburg

Nella sindrome di Waardenburg l'ipoacusia è associata a deficit della pigmentazione. Si stima che la sua incidenza sia di 1 ogni 270.000 (Faivre et al, 2005). Si trasmette come carattere autosomico dominante e se ne riconoscono quattro forme. La prima è caratterizzata da distopia cantorum, alterazioni della pigmentazione (piebaldismo, ciuffi bianchi in ciglia, sopracciglia e peluria del corpo, eterocromia dell'iride e occhi azzurro zaffiro), canizie precoce, sinofria, radice del naso prominente. Tale quadro è dovuto a un'anomalia della migrazione dei melanociti dalla cresta neurale a componenti di alcuni organi quali cute, capelli e peli, iride, stria vascolare del dotto cocleare. La diagnosi molecolare si basa sulla ricerca della mutazione del gene PAX3 nel cromosoma 2q37. A oggi sono state dimostrate circa 50 mutazioni a carico di tale gene, inoltre non è stata dimostrata una correlazione genotipo-fenotipo: delezioni di un intero gene danno luogo a quadri clinici sovrapponibili a quelli dovuti alla mutazione di un paio di basi e al contempo la stessa mutazione a carico di due paia di basi può dare origine a quadri clinici molto diversi. La sindrome di Waardenburg tipo II è meno frequente del tipo I da cui si distingue per l'assenza di distopia cantorum, la presenza di ipoacusia più severa e una maggiore frequenza di eterocromia dell'iride; si distingue in due forme: IIA e IIB. La prima è dovuta a una mutazione del cromosoma 3p13, nel quale si trova il gene MITF (microphthalmia-associated transcription factor) ritenuto responsabile della trascrizione di un fattore che probabilmente interviene nello sviluppo dei melanociti. La diagnosi differenziale con il tipo IIB si basa sull'assenza della mutazione 3p13 in quest'ultimo. La sindrome di Waardenburg III è la più rara, si presenta con alcune caratteristiche tipiche della forma I quali distopia cantorum, alterazioni della pigmentazione e ipoacusia e delle caratteristiche peculiari quali anomalie degli arti: ipoplasia del sistema muscoloscheletrico, contratture in flessione, fusione delle ossa carpali e sindattilia. La diagnosi si basa sulla ricerca della mutazione del gene PAX3 nel cromosoma 2q37 (Faivre et al, 2005). La sindrome di Waardenburg tipo IV o sindrome di Shah-Waardenburg è caratterizzata da un'associazione tra malattia di Hirshprung e il quadro tipico della sindrome di Waardenburg: anomalie della pigmentazione (piebaldismo, ciuffi bianchi in ciglia, sopracciglia e peluria del corpo, eterocromia dell'iride) e ipoacusia neurosensoriale. Quest'ultima si presenta nel 50% casi. Tale sindrome si trasmette come carattere autosomico recessivo se dovuta a mutazioni a carico del gene EDNRB o EDN3 o come carattere autosomico dominante quando causata da mutazioni del gene SOX10 (Touraine, 2001).

La sindrome Brachio-Oto-Renale (BOR)

La sindrome BOR è caratterizzata da anomalie degli archi branchiali (schisi, fistole, cisti), difetti dell'udito (malformazioni dei padiglioni auricolari con fistole preauricolari, sordità di tipo conduttivo o neurosensoriale) e anomalie renali (malformazioni delle vie urinarie, ipoplasia o agenesia renale, displasia renale, cisti renali). La prevalenza è 1/40.000. La patologia a carico dei reni può esitare in un'insufficienza renale cronica. L'espressione della malattia varia nelle diverse famiglie e tra le persone affette della stessa famiglia. Alcune famiglie non presentano anomalie renali o delle vie urinarie. Il gene-malattia, EYA1, è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 8. In circa il 40% delle persone affette sono state identificate mutazioni puntiformi e delezioni. Sono state anche identificate le mutazioni dei geni SIX1 e SIX5, i cui prodotti interagiscono con EYA1 in quanto i complessi formati costituiscono dei fattori di trascrizione. E' possibile la diagnosi prenatale nelle famiglie nelle quali sia stata preventivamente identificata la mutazione responsabile della malattia. Tuttavia la consulenza genetica è complicata dall'eterogeneità clinica presente nei pazienti (Niaudet, 2007).

La sindrome di Treacher Collins

Anche conosciuta come sindrome di Franceschetti-Klein, si trasmette come carattere autosomico dominante con una penetranza del 90% e un'espressività variabile. Si stima che la sua incidenza sia di 1 ogni 50.000 nati vivi (Edery, 2002). Il quadro clinico è caratterizzato da ipoplasia dei padiglioni auricolari (77% dei casi), atresia del condotto uditivo esterno (36%), anomalie della catena ossiculare e sordità trasmissiva (40%), ipoplasia dell'osso malare e zigomatico (80%) con piaga antimongoloide della rima palpebrale, coloboma della palpebra inferiore (69%) e assenza di ciglia nel terzo esterno della palpebra inferiore, ipoplasia mandibolare (78%), palatoschisi (28%). Le malformazioni facciali sono bilaterali e asimmetriche. Gli individui affetti presentano un QI normale. Le difficoltà respiratorie si possono manifestare precocemente a causa del ridotto calibro delle vie aeree. Il gene coinvolto è posto sul cromosoma 5q32-q33.1 (Edery, 2002).

La sindrome di Stickler (Artro-oftalmoplegia ereditaria progressiva)

Si tratta di una vitreo-retinopatia ereditaria, che associa segni oculari, sindrome di Pierre-Robin più o meno completa, coinvolgimento scheletrico e sordità neurosensoriale nel 10%

dei casi. Le anomalie caratteristiche comprendono la cataratta giovanile, la miopia, lo strabismo, la degenerazione vitreoretinica o corioretinica, il distacco della retina, l'uveite cronica. Le anomalie scheletriche consistono in una discreta platispondilia e nel coinvolgimento delle epifisi, che spesso sono grosse. All'iperlassità dell'infanzia subentra con il tempo un'artrosi precoce (Le Merrer et al, 2004). L'ipoacusia neurosensoriale è progressiva. L'espressività della malattia è molto variabile e la sua evoluzione imprevedibile. Se ne riconoscono tre forme in base al gene colpito dalla mutazione: STL1 (*COL2A1*), STL2 (*COL11A1*), e STL3 (*COL11A2*). Le forme dovute a mutazione di STL1 e STL2 sono caratterizzate da miopia severa quadro che non si riscontra nella forma dovuta a mutazione di STL3 (Smith et al, 2007).

La neurofibromatosi di tipo 2 (NF-2)

La NF-2 costituisce il 10% di tutti i casi di neurofibromatosi (Behrman, 1997), ha un'incidenza di circa 1 ogni 50.000 nati vivi (Olschwang, 2002). E' caratterizzata da tre quadri clinici: schwannomi multipli dei nervi cranici (generalmente è coinvolto il VIII nervo cranico), schwannomi e neurofibromi sottocutanei, cataratte lenticolari sottocapsulari posteriori. Il ramo vestibolare del nervo acustico è colpito da schwannomi multipli nel 85% dei casi. L'età di comparsa di tali tumori è può variare da paziente a paziente: l'esordio può avvenire prima dei 10 anni, raramente dopo i 30. L'ipoacusia che ne consegue è generalmente monolaterale e graduale ma sono stati descritti casi in cui compare improvvisamente e bilateralmente (Smith et al, 2007). La neurofibromatosi di tipo 2 si trasmette come carattere autosomico dominante, è causata da una mutazione del gene NF-2 posto sul cromosoma 22q12, codifica per la schwannomina, una proteina citoplasmatica che interagisce con le proteine del citoscheletro e che sembra implicata nella adesione tra cellule (Olschwang, 2002).

Osteopetrosi

Si tratta di un termine generico che descrive una varietà di patologie a carico delle strutture ossee dovute all'assenza o all'alterazione della funzione degli osteoclasti (Fasth et al, 1999; Shapiro et al, 1988; Whyte, 1993). La disfunzione di queste cellule causa inefficiente rimodellamento osseo con tendenza a occludere parzialmente o completamente le cavità midollari e produzione di tessuto osseo che tende a fratturarsi. Le forme che si presentano durante l'infanzia sono generalmente a trasmissione autosomica dominante mentre quelle con esordio in età adulta sono a carattere autosomico recessivo. I sintomi neurologici sono causati dall'accrescimento osseo e dalla restrizione dei forami cranici attraversati da

strutture nervose e vasi. I soggetti affetti svilupperanno quindi neuropatia ottica, facciale o del trigemino, strabismo, ipoacusia, disartria, idrocefalo, atrofia cerebrale e ritardo dello sviluppo (Gerritsen et al, 1994; Klintworth 1963; Lehman et al, 1977). I bambini che presentano un esordio precoce possono diventare ciechi poco dopo la nascita e sviluppare deficit dei nervi cranici e idrocefalo nei primi anni di vita (Steward, 1993).

Le forme X-linked

La sindrome di Alport

Tale sindrome è la più comune tra i diversi tipi di nefrite ereditaria (Behrman, 1997). È descritta una marcata variabilità tra quadro clinico, storia naturale, alterazioni istologiche e pattern genetico. I bambini affetti da sindrome di Alport presentano ematuria microscopica asintomatica e raramente episodi di macroematuria (generalmente durante infezioni delle vie respiratorie), una minoranza dei soggetti presenta ipoacusia neurosensoriale che generalmente insorge dopo la prima decade e inizialmente interessa solo le alte frequenze per poi progredire. Circa il 10% dei pazienti presenta anomalie oculari, le più frequenti sono: cataratta, lenticono anteriore e lesioni maculari. La nefropatia è spiegata da lesioni glomerulari che evolvono in glomerulosclerosi associate a reazione tubulointerstiziale. La microscopia elettronica evidenzia anomalie della lamina densa della membrana basale glomerulare, questo quadro suggerisce che la sindrome di Alport sia dovuta ad un'alterazione genetica della sintesi di componenti del collagene tipo IV. Il quadro renale si complica con proteinuria che può essere di diversa entità ed è generalmente più severa nel sesso maschile fino all'insufficienza renale: si stima che a 25 anni 94% dei soggetti di sesso maschile e il 3% di quelli di sesso femminile ne siano affetti; a lungo termine ne sarà colpita la totalità degli uomini (100%) e il 15% delle donne (Sessa et al, 2003). Accanto all'alterazione della funzionalità renale si può sviluppare ipertensione arteriosa riportata nel 75% dei soggetti di sesso maschile e nel 35% dei soggetti di sesso femminile. L'ipoacusia generalmente si sviluppa durante l'età scolare, generalmente è di entità costante nel tempo, è di grado moderato e colpisce soprattutto le alte frequenze. Anche in questo caso la sua incidenza è maggiore nei maschi (83%) rispetto alle femmine (57%). Il deficit uditivo è dovuto ad un'alterazione della membrana basilare capillare della stria vascolare, simile all'anomalia della membrana basale glomerulare.

La sindrome di Alport si presenta più comunemente come carattere dominante legato al cromosoma X: questo spiega il decorso clinico più grave nei pazienti di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile. Si stima che le forme trasmesse come caratteri X linked rappresentino circa 85% dei casi, le forme autosomiche recessive circa il 15% dei casi, sono

stati descritti rari casi di trasmissione autosomica dominante (Smith et al, 2007). Le forme X linked sono dovute a una mutazione del gene che codifica per la proteina $\alpha 5$ posta sul cromosoma Xq22, tale proteina è una componente del collagene tipo IV che si trova a livello della membrana basale glomerulare. Sono stati evidenziati diversi tipi di mutazione che spiegherebbero le differenze tra quadri clinici. Le forme autosomiche recessive sono dovute a mutazioni dei geni posti sul cromosoma 2 che codificano per le proteine $\alpha 3$ e $\alpha 4$, anch'esse componenti del collagene tipo IV presente sulla membrana basale a livello di renale, cocleare, della retina e del cristallino (Sessa et al, 2003).

La malattia di Fabri

Si tratta di una malattia ereditaria del metabolismo dei glicosfingolipidi, a trasmissione recessiva legata all'X, dovuta a un deficit di un enzima lisosomiale, l'alfa-galattosidasi A. Il difetto enzimatico determina l'accumulo di un substrato non degradato nei tessuti e nel plasma. Nella sua forma classica, la malattia colpisce più gravemente i maschi omozigoti, nei quali i segni clinici insorgono nell'infanzia, con dolori alle estremità e segni dermatologici (angiocheratomi). Successivamente, si sviluppa una malattia da sovraccarico multiviscerale, con sintomi cardiaci (ipertrofia ventricolare sinistra), neurologici (accidenti vascolari cerebrali) e renali (proteinuria, insufficienza renale). A tale quadro si aggiunge un deficit uditivo per le alte frequenze. Sono state recentemente descritte anche forme varianti, i cui sintomi sono limitati al cuore o ai reni. Le donne eterozigoti, portatrici della malattia, sono spesso sintomatiche, ma in modo più variabile e generalmente più lieve, rispetto agli uomini. La diagnosi è definitivamente confermata dal dosaggio dell'attività enzimatica nei maschi e dalla ricerca di mutazioni del gene GLA nelle femmine. Il gene GLA, localizzato in Xq22, è stato clonato e sono state caratterizzate oltre 200 mutazioni (Maire, 1997).

La sindrome di Mohr-Tranebjaerg (MTS)

Nota anche come sindrome di sordità-distonia-atrofia ottica, è una malattia molto rara, a prevalenza non nota. E' una sindrome neurodegenerativa X linked, caratterizzata da ipoacusia neurosensoriale perlinguale o postlinguale, distonia progressiva e disturbi visivi ma possono anche essere presenti sintomi psichiatrici, difetti cognitivi e disturbi del comportamento. L'ipoacusia ad esordio precoce è l'unico sintomo certo, tutti gli altri segni variano per gravità e decorso. Nei soggetti affetti si riscontra tipicamente neurodegenerazione multifocale progressiva che interessa diverse aree del sistema nervoso centrale. La sindrome di Mohr-Tranebjaerg è dovuta a mutazioni del gene TIMM8A/DDP1

localizzato sul cromosoma Xq22. La maggior parte delle mutazioni descritte sono inattivanti ma sono state osservate anche mutazioni dissenso. Il gene colpito codifica per la proteina DPP1 localizzata nei mitocondri, la cui funzione è quella di trasporto delle proteine attraverso la membrana mitocondriale interna. La perdita di DPP1 causa un difetto delle funzioni specifiche mitocondriali e, di conseguenza, la degenerazione delle cellule neuronali (Hofmann et al, 2004).

Ipoacusia genetica non sindromica

La maggior parte dei deficit uditivi di origine genetica sono non sindromici. Attualmente sono stati identificati 46 geni coinvolti nella genesi dell'ipoacusia neurosensoriale non sindromica (Hilgert et al, 2009). Le forme non sindromiche possono essere distinte in base alla modalità di trasmissione, oppure all'età di esordio, alla progressività o meno del deficit uditivo, alle sue caratteristiche o ad altre alterazioni associate (per esempio il deficit vestibolare). E' stato stimato che circa il 75% delle ipoacusie genetiche non sindromiche venga trasmesso come carattere autosomico recessivo, il 20-25% come autosomico dominante, circa 1% è X-linked mentre meno di 1% è da attribuire a mutazioni del DNA mitocondriale di origine materna (Van Camp et al, 1997).

Sono stati utilizzati quattro termini per distinguere le varie forme di deficit uditivo genetico non sindromico. Quelle a trasmissione dominante sono state denominate DFNA, seguite da un numero progressivo. DFNB si riferisce alle forme recessive mentre DFN alle forme X-linked.

Le connessine

L'ipoacusia genetica non sindromica a trasmissione autosomica recessiva più frequente è causata da mutazioni a livello del locus DFNB1 (Lerer et al, 2001; Kenneson et al, 2002; Del Castillo et al, 2002; Del Castillo et al, 2003). Posto sul cromosoma 13q11-12, tale locus contiene i geni GJB2 e GJB6 (Schrijver, 2004). GJB2 codifica per la connessina 26, questa appartiene ad una famiglia di proteine, quella appunto delle Connexine, che, raggruppandosi in esameri formano delle strutture chiamate connessioni. I connessioni che si trovano su cellule contigue, formando legami covalenti, creano canali intercellulari chiamati gap-junctions (Hand et al, 2002; del Castillo et al, 2002). A livello cocleare il sistema delle gap junctions sembra essere coinvolto nel trasporto del Potassio, ione che entra nelle cellule cigliate e dà inizio al processo della depolarizzazione della membrana, creando il potenziale d'azione che attiva il nervo acustico. Per mantenere il gradiente di Potassio tra cellule cigliate ed endolinfa c'è bisogno di un sistema di riassorbimento di tale ione (Battey, 2003).

Questo meccanismo permette di mantenere il potenziale endococleare, di importanza cruciale per la percezione del suono (Kituki T. et al, 2000; Rabionet et al, 2000).

Il contributo assolutamente prevalente delle connesine 26 e 30 all'eziologia dell'ipoacusia neurosensoriale non sindromica (DFNB1 SNHL) si è reso evidente negli ultimi anni, con la documentazione del fatto che mutazioni dei geni GJB2 e GJB6, rendono conto di almeno il 50% delle perdite uditive autosomiche recessive, benché con variazioni di prevalenza e variazioni nella frequenza di mutazioni specifiche nelle diverse popolazioni studiate (Kenneson et al. 2002, del Castillo et al., 2002; Petit 2004).

A tutt'oggi sono riportate nei database specifici (Ballana et al, Connexins and deafness Homepage, 2011) almeno 100 diverse mutazioni patogenetiche del gene GJB2 e numerose varianti il cui significato funzionale viene ancora ritenuto dubbio. Per quanto riguarda le forme patogenetiche, per una larga maggioranza si tratta di mutazioni a trasmissione recessiva ma sono descritte anche forme dominanti. La prima mutazione descritta, 35delG, rappresenta la quota maggiore degli alleli mutati nelle popolazioni dell'Europa settentrionale e meridionale e nelle popolazioni caucasiche dell'America del Nord; la frequenza del portatore sano per questa mutazione nel bacino del Mediterraneo, varia dal 2 al 4% a seconda delle regione considerata (Lucotte, 2007). Altri tipi di mutazioni sono caratteristici di alcune popolazioni, per esempio la mutazione 167delT è frequente nella popolazione degli ebrei askenaziti dove la frequenza di portatore è di 4% (Cohn et al, 1999), mentre nel sud-est asiatico prevale 235delC con una frequenza di portatore di 1:100 (Yan et al, 2003).

Per quanto riguarda il gene GJB6/Cx30, sono state recentemente identificate due grosse delezioni, del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854) rispettivamente di 309 e di 232 Kb, trovate in trans con mutazioni GJB2, in soggetti affetti da ipoacusia profonda (del Castillo et al., 2002). Queste delezioni, che rimuovono gran parte della sequenza codificante del gene GJB6, contribuiscono assieme a GJB2 all'eziopatogenesi di DFNB1; non è ancora stabilito con certezza se ciò avvenga secondo un modello di ereditarietà "digenica" oppure per mezzo dell'alterazione di regioni regolatori comuni ad entrambi i geni, i quali sono evidentemente strettamente correlati sia da un punto di vista strutturale che funzionale.

Le mutazioni bialleliche di DFNB1 si associano tipicamente ad un difetto uditivo neurosensoriale isolato, presente alla nascita (congenito) e di carattere non progressivo né fluttuante. La funzione vestibolare è normale e i bambini con questo tipo di difetto genetico in genere non presentano problemi di equilibrio e raggiungono le tappe di sviluppo motorio, come ad esempio l'acquisizione della deambulazione autonoma, in tempi normali. L'audiogramma di un individuo con DFNB1 SNHL risulta essere più frequentemente con profilo piatto o lievemente decrescente sulle frequenze acute, questo indica che, nel complesso, i soggetti affetti da DFNB1 SNHL presenterebbero una perdita che tende ad essere simile su tutte le frequenze analizzate. Le prime comunicazioni scientifiche che segnalavano l'importanza del gene GJB2/CX26 nell'ambito delle ipoacusie non sindromiche

descrivono questo difetto genetico come responsabile di deficit uditivi di grado esclusivamente profondo (Estivill et al., 1998). Con l'introduzione del test in ambito clinico si è però presto notato che l'analisi audiologica dei soggetti affetti da DFNB1 SNHL evidenziava una diversificazione nella gravità del danno uditivo, che poteva variare da lieve a profondo, e nell'epoca di insorgenza (Kelley et al., 1999; Murgia et al., 1999; Orzan et al., 2002; Cryns et al., 2004; Snoeckx et al., 2005; Hilgert et al., 2009). È stato recentemente dimostrato come questa variabilità nel grado di ipoacusia sia anche in relazione al tipo di mutazione e all'effetto biologico che ne deriva. Le mutazioni cosiddette "inattivanti", per le quali si può predire la mancata formazione della proteina completa da parte dell'allele mutato (ad esempio mutazioni frame-shift e mutazioni non-sense), sono più frequentemente responsabili di perdite severe o profonde. Al contrario, mutazioni "non-inattivanti", quelle cioè che conservano una funzione proteica da parte dell'allele mutato, sono più spesso associate a ipoacusie lievi o moderate. Questa importante relazione tra genotipo e severità della perdita, tuttavia, non spiega ancora come mai sia possibile che individui con lo stesso tipo di mutazione, anche nell'ambito della stessa famiglia, possano presentare ipoacusie di entità molto diversa. In ambito scientifico risulta ormai abbastanza chiaro che ci debbano essere altre variabili in grado di modulare la gravità finale del deficit: potrebbe trattarsi di fattori ambientali o di fattori genetici, oppure della combinazione di questi. Diversi laboratori sono attualmente impegnati nello studio di questi aspetti, con l'obiettivo di identificare possibili geni modificatori e contribuire alla spiegazione della variabilità residua del deficit uditivo (Snoeckx et al., 2005, Hilgert et al. 2009).

Per quel che riguarda le mutazioni monoalleliche di DFNB1, le conoscenze sono più ristrette, anche se negli ultimi anni, molti studi si sono interrogati (Orzan et al., 2002; Lipan et al., 2011) sulle forme di ipoacusia con eterozigosi per mutazioni di GJB2. La prevalenza di questi soggetti, nella realtà del Nord Italia, non è trascurabile: uno studio che si è proposto di descrivere le mutazioni di GJB2 analizzando la sequenza codificante ed esone 1 non codificante del gene che codifica per Cx26, in una popolazione di 271 individui ipoacusici originari dall'Italia Settentrionale, ha riscontrato che i soggetti con deficit uditivo preverbale presentano una singola mutazione patogenetica di Cx26 in una percentuale variabile da 15 a 30% dei casi (Orzan et al., 2002). Ci si chiede se si tratti di individui con una singola mutazione dominante, o se vi sia una seconda mutazione patogenetica non nota oppure se, vi sono altri fattori genetici in grado di modulare il fenotipo.

Le mutazioni mitocondriali

L'ipoacusia neurosensoriale è presente in una percentuale che varia da 42 a 70% negli individui con patologie mitocondriali e può presentarsi in forma sindromica e non sindromica. Mutazioni a carico del DNA mitocondriale sono state riscontrate in più di 3% dei pazienti con ipoacusia neurosensoriale, ci si aspetta che questa percentuale aumenti grazie al miglioramento dei test genetici (Sinnathuray et al, 2003). Tali mutazioni vengono trasmesse esclusivamente attraverso la linea materna. Circa il 25% degli individui che hanno assunto aminoglicosidi presentano ipoacusia anche se la terapia era stata somministrata a dosi e in tempi adeguati. Circa il 50% di questi individui è portatore di una mutazione nel RNA ribosomiale 12S 1555A>G in MTRNR1. Un'altra mutazione descritta è T445A>G, è a carico del gene che codifica per la serina tRNA e la sua penetranza dipende dall'aplotipo mitocondriale dell'etnia. Alcune mutazioni, come l'inserzione di citosina in posizione 7472 nel gene tRNASer, vedono associarsi all'ipoacusia delle manifestazioni neurologiche. La mutazione 7551T>C in tRNA ser causa un'ipoacusia progressiva con età di esordio variabile (Sue et al, 1999). Le forme sindromiche sono causate da una mutazione puntiforme a carico del gene MTTL1 che codifica per la leucina tRNA; si tratta della sindrome di Kearns-Sayre, dell'encefalopatia mitocondriale con acidosi lattica e episodi stroke-like (MELAS), del diabete e sordità ad ereditarietà materna, dell'oftalmoplegia esterna, cronica e progressiva. La patogenesi di queste forme di ipoacusia è spiegata dall'alterazione della fosforilazione ossidativa mitocondriale, il deficit di ATP a livello della coclea non permette di mantenere il gradiente ionico sopra citato (Schrijver, 2004).

Mutazioni di POU3F4

POU3F4 è un gene che codifica per un fattore di trascrizione (Bitner-Glindzicz et al, 1995). Mutazioni a carico di POU3F4 causano quadri non sindromici a trasmissione X linked di ipoacusia neurosensoriale progressiva e profonda (DFN3) con una componente trasmissiva dovuta a fissità della staffa (Schrijver, 2004).

Ipoacusia acquisita

L'ipoacusia di origine acquisita riconosce diversi fattori eziologici che esplicano la loro azione durante la vita intrauterina, nel periodo peri e neonatale, nell'infanzia e nell'adolescenza.

Le infezioni congenite

Le principali cause di danno uditivo che agiscono durante la gravidanza sono le infezioni congenite da complesso TORCH e da Sifilide. Non sono ancora completamente noti i meccanismi patogenetici che conducono al deficit uditivo, questi possono essere diretti, ossia scatenati dal microrganismo e dalla sua replicazione attiva all'interno degli organi colpiti o indiretti cioè dovuti ai metaboliti prodotti dalla risposta immunitaria dell'ospite. Il processo flogistico può colpire la coclea oppure il nervo acustico (Newton, 2009).

Nei paesi industrializzati l'infezione congenita da CMV è la causa più frequente di ipoacusia congenita acquisita (Schildroth, 1994). Il CMV è un virus a DNA, appartiene alla famiglia Herpes e, in quanto tale, causa un'infezione primaria seguita da una fase di latenza in cui il virus si riattiva periodicamente nell'ospite che ne diventa fonte di contagio. Il CMV causa raramente malattia nell'individuo adulto immunocompetente ma l'infezione che avviene nel periodo pre e perinatale o nel soggetto immunocompromesso è gravata da importanti morbilità e mortalità. Di tutti i bambini nati con infezione congenita da CMV, il 10-15% è sintomatico alla nascita mentre la maggioranza non presenta alcun segno. Di questi ultimi, circa il 10% presenterà sequele tardive, tra queste l'ipoacusia neurosensoriale è la più frequente. I neonati sintomatici presentano quadri clinici molto variabili. Le manifestazioni più severe sono dovute all'azione del virus sulla crescita e sullo sviluppo intrauterino a cui conseguono la nascita pretermine e/o il coinvolgimento multi organo (in particolare del sistema nervoso centrale e di quello reticolo-endoteliale). Molti neonati presentano ittero, petecchie, porpora, epatosplenomegalia e circa due terzi alterazioni neurologiche tra cui microcefalia. Il riscontro di ipoacusia avviene sia nei soggetti sintomatici che negli asintomatici, anche se nei primi è più frequente (22-65%) rispetto ai secondi (6-15%) (Dahle et al, 2000). Il deficit uditivo dovuto a infezione congenita da CMV può essere di grado moderato, severo o profondo, può essere congenito o insorgere nei primi anni di vita, può essere progressivo. Non sono ancora completamente noti i motivi che spiegano come mai in una popolazione di bambini con infezione congenita da CMV alcuni siano normoacusici mentre altri sviluppino ipoacusia e come mai questi ultimi abbiano deficit con caratteristiche diverse. Uno studio ha evidenziato l'importanza della viremia, analizzando due gruppi di bambini con infezione congenita da CMV: uno affetto da ipoacusia e l'altro formato da normoacusici, è stato riscontrato che i primi avevano una carica virale ematica maggiore rispetto ai secondi (Boppana et al, 2005). Un altro studio ha trovato che il deficit uditivo si associa con maggior frequenza alle forme di malattia disseminata (ritardo di crescita

intrauterino, petecchie, epatosplenomegalia) rispetto a quelle che coinvolgevano principalmente il sistema nervoso centrale (Rivera et al, 2002).

Nei paesi in via di sviluppo l'infezione congenita da virus della rosolia è ancora una delle cause di ipoacusia neurosensoriale presente alla nascita. Il virus della rosolia appartiene alla famiglia dei Togavirus, si diffonde per via respiratoria e causa una malattia esantematica di lieve entità, autolimitantesi. Al contrario, l'infezione congenita, contratta nella prima parte della gravidanza (in particolare nelle prime 16 settimane gestazionali) può causare anomalie congenite importanti o l'interruzione spontanea della gravidanza. Oggi, grazie all'introduzione della vaccinazione, la rosolia è considerata una malattia rara in Europa. L'infezione congenita causa una serie di anomalie tra cui le più note sono incluse la triade descritta da Gregg: cataratta, difetti cardiaci, ipoacusia neurosensoriale. I neonati affetti possono manifestare anche ritardo di crescita intrauterino, alterazioni del sistema nervoso centrale, epatosplenomegalia, petecchie e porpora. L'ipoacusia neurosensoriale da infezione congenita da rosolia può presentarsi come unico sintomo, in particolare se l'infezione è stata contratta dopo la 12 settimana gestazionale quando lo sviluppo embrionale dell'occhio e del cuore è già avanzato mentre quello dell'orecchio sta ancora avvenendo. Il deficit uditivo può essere mono o bilaterale, di grado moderato o profondo, può essere presente alla nascita o manifestarsi nella prima infanzia.

L'infezione congenita causata dal protozoo *Toxoplasma gondii* è piuttosto rara, è caratterizzata da corio retinite, calcificazioni endocraniche, idrocefalo e ritardo mentale. La letteratura riporta risultati contrastanti sulla possibilità di sviluppare ipoacusia, alcuni studi hanno riscontrato casi di deficit nei bambini affetti da infezione congenita da *Toxoplasma* mentre altri ne smentiscono l'associazione. Tuttavia, poichè la toxoplasmosi congenita causa alterazioni nello sviluppo neurologico, la possibilità di un danno a livello dell'orecchio interno e del sistema nervoso centrale deve essere considerata in ogni bambino affetto.

La sifilide è una malattia a trasmissione sessuale dovuta alla spirocheta *Treponema pallidum*. La sua evoluzione consta in tre stadi: il primo caratterizzato da una lesione nel sito di inoculo del microrganismo, il secondo dovuto alla diffusione sistemica della spirocheta che causa esantema, febbre, malessere e complicato da vasculite a carico di diversi organi, tra cui anche l'ottavo nervo cranico, il terzo caratterizzato dal coinvolgimento del sistema nervoso centrale e del sistema cardiovascolare. L'infezione congenita da sifilide ha una diffusione maggiore nei paesi in via di sviluppo, in particolare nei paesi dell'Africa sub-sahariana. Generalmente l'infezione avviene quando la madre si trova al primo o al secondo stadio della malattia. Gli effetti sul bambino sono molto gravi: molti nascono morti o decedono nel periodo neonatale, alcuni sono prematuri o di basso peso neonatale, altri presentano un coinvolgimento multi-organo e altri sono inizialmente asintomatici. Il neonato generalmente presenta rinite sierosa, epatomegalia, lesioni cutanee, alterazioni ossee, anemia e trombocitopenia. Tutti gli organi possono essere colpiti ma le manifestazioni più tipiche si

hanno a livello delle ossa, dei denti e del sistema nervoso centrale. L'ipoacusia neurosensoriale è una complicanza rara della sifilide congenita ma può presentarsi in un bambino che non aveva manifestato alcun sintomo e al quale non era stata posta diagnosi. Generalmente non è presente alla nascita e insorge durante l'infanzia, è progressiva, bilaterale e spesso associata anche a deficit vestibolare. Inizialmente la perdita riguarda solo le frequenze acute, in seguito anche le gravi. La perdita uditiva sembra essere causata da un danno dell'ottavo nervo cranico dovuto al processo flogistico reiterato.

Condizioni perinatali associate a deficit uditivo

Il deficit uditivo viene acquisito durante il periodo peri e neonatale riconosce diverse cause quali il basso peso corporeo alla nascita, la prematurità, il ritardo di crescita intrauterina, l'ipossia acuta e cronica, l'iperbilirubinemia, l'assunzione di farmaci ototossici, la sepsi neonatale, la ventilazione meccanica prolungata e il rumore ambientale. Nella maggior parte dei casi il danno uditivo è dovuto alla coesistenza di più di una delle condizioni suddette poiché queste sono spesso legate tra loro: un neonato che nasce pretermine va incontro più facilmente a insufficienza respiratoria e richiede quindi di essere sottoposto ventilazione meccanica, ha un maggior rischio di sviluppare sepsi, di subire un danno centrale da iperbilirubinemia o di essere esposto ad altre condizioni che possono condurre a ipoacusia (Marlow et al, 2000).

Il danno ipossico

L'ipossia è uno dei fattori maggiormente implicati nel danno uditivo, può essere legata al parto oppure insorgere successivamente a causa di un mancato o inadeguato trattamento della sindrome da distress respiratorio, della sindrome di aspirazione di meconio, delle malformazioni cardiache. La letteratura riporta che il danno ipossico si estrinseca a livello cocleare e delle vie uditive centrali. Studi di anatomia patologica eseguiti su neonati che hanno presentato asfissia severa e in seguito sono deceduti hanno dimostrato la presenza a livello cocleare di degenerazione e perdita delle cellule ciliate esterne, edema della stria vascularis. Molti studi hanno descritto l'associazione tra encefalopatia ipossico-ischemica severa e ipoacusia neurosensoriale. È stato inoltre rilevato come l'effetto dell'ipossia cronica sia differente da quello dell'episodio ipossico acuto, il primo si associa a un quadro ascrivibile alla neuropatia uditiva mentre il secondo causa danno delle cellule ciliate esterne e quindi un deficit uditivo di origine cocleare.

Il rumore ambientale

Il danno acustico da rumore è una realtà ben nota. Studi compiuti sull'adulto dimostrano come ci sia una suscettibilità individuale, una predisposizione genetica nella risposta al rumore ambientale e come questo agisca sinergicamente con i farmaci ototossici. È stato dimostrato come la coclea del neonato sia più sensibile al rumore. La letteratura riporta come nelle unità di terapia intensiva ci sia un rumore di fondo che oscilla tra i 60 e 80 dBA e che all'interno delle incubatrici questo sia maggiore rispetto all'ambiente circostante (Kent et al, 2002).

L'iperbilirubinemia

La bilirubina è un prodotto di degradazione dell'emoglobina, rilasciata in forma indiretta, idrofobia, viene coniugata con l'albumina e trasportata al fegato dove viene coniugata e così trasformata nella forma idrofila o diretta. Questa viene escreta nella bile, metabolizzata dalla flora batterica intestinale ed eliminata con le feci, una quantità minore viene riassorbita ed eliminata con le urine. In caso di emolisi (per esempio da incompatibilità ABO o Rhesus) o di immaturità del sistema di glucuroconiugazione a livello epatico, si assiste a un aumento dei livelli ematici di bilirubina indiretta. La barriera ematoencefalica è permeabile alla bilirubina indiretta e in particolare è più immatura e quindi permeabile alle molecole nel neonato pretermine e in alcune condizioni quali l'ipossia e l'acidosi. La bilirubina indiretta ha tropismo per alcune parti del sistema nervoso centrale, come i nuclei della base, ad alta attività metabolica, ove esplica la sua azione tossica. La neurotossicità è determinata dall'accumulo di bilirubina indiretta a livello del sistema nervoso centrale e dalla durata dell'insulto. L'encefalopatia dovuta ad accumulo di bilirubina indiretta a livello dei nuclei della base è chiamata kernicterus, numerosi studi hanno descritto deficit uditivo associato a tale condizione riportando un coinvolgimento dell'ottavo nervo cranico e del nucleo cocleare. Oggi la standardizzazione dei livelli di bilirubina basati sul peso corporeo del neonato che possono essere tossici e le opzioni terapeutiche volte a normalizzarne i valori hanno ridotto notevolmente la possibilità di danno cerebrale. Tuttavia si assiste a casi di ipoacusia nei neonati pretermine con livelli di iperbilirubinemia che richiedano exanguinotrasfusione. Quest'ultima condizione rappresenta un fattore di rischio importante per lo sviluppo precoce e tardivo di deficit uditivo.

I farmaci ototossici

Già da molti anni è ben noto che alcuni tipi di farmaci esplicano un'azione tossica a livello dell'orecchio interno. I più noti sono gli aminoglicosidi, i diuretici dell'ansa, il cisplatino, i salicilati e i macrolidi. Questi causano non solo deficit uditivo ma anche alterazioni a livello vestibolare. Generalmente viene prima colpita la base della coclea e successivamente il

processo prosegue anche se è terminata l'esposizione alla sostanza. Alcuni farmaci ototossici assunti dalla donna in gravidanza attraversano la placenta e raggiungono la circolazione fetale, e causare danno cocleare poiché la coclea del feto è più vulnerabile. Gli aminoglicosidi vengono utilizzati nel trattamento delle sepsi in quanto farmaci efficaci contro i batteri Gram negativi. La loro tossicità a livello delle cellule ciliate esterne è stata largamente descritta, alcune sperimentazioni sugli animali hanno dimostrato che la gentamicina aveva il maggior effetto ototossico, seguita dall'amikacina, dalla streptomina e dalla netilmicina. Tali risultati sono stati confermati da studi condotti su popolazioni di pazienti trattati con aminoglicosidi. In letteratura sono riportati anche gli effetti sulla funzione vestibolare, sono stati descritti casi di danno vestibolare insorti a un anno di distanza dalla terapia con gentamicina e non è stata riscontrata una correlazione tra livelli plasmatici di farmaco ed entità del danno. Per quanto riguarda il meccanismo con cui tali sostanze esplicano la loro azione tossica, negli ultimi anni è stato dimostrato come i radicali liberi dell'ossigeno e le perossidasi, prodotti dal metabolismo cellulare, abbiano un ruolo significativo nella genesi del danno cocleare, questo può spiegare come mai vengono dapprima colpite le alte frequenze. Come già sottolineato, spesso il danno uditivo è dovuto a più fattori che agiscono sinergicamente, la somministrazione di un farmaco ototossico a un soggetto con funzionalità renale alterata ne aumenta la concentrazione plasmatica a causa della ridotta clearance: Il monitoraggio dei livelli plasmatici di farmaco e degli indici di funzionalità renale diventano quindi misure fondamentali per diminuire il rischio di ototossicità.

La terapia intensiva

E' noto che la ventilazione meccanica e il ricovero in terapia intensiva neonatale sono due importanti fattori di rischio per lo sviluppo di ipoacusia così come appare chiaro che queste due condizioni si associano sempre ad altri fattori di rischio. Per tale motivo il Joint Committee on Infant Hearing (Joint Committee on Infant Hearing, 2007) definisce come neonati a rischio di sviluppo di deficit uditivo coloro che hanno subito un ricovero di più di 5 giorni in un reparto di terapia intensiva indipendentemente dalla loro storia e dalle terapie a cui sono stati sottoposti.

Sono molte le condizioni perinatali che possono causare danno uditivo permanente, queste generalmente agiscono insieme e sinergicamente, causando deficit di diversa entità e natura (alcuni sono identificabili come neuropatia uditiva, altri sono dovuti a danno cocleare). Ci si auspica che i progressi nel trattamento del neonato critico portino a minimizzare il rischio di incorrere in condizioni, quali per esempio l'ipossia o l'iperbilirubinemia, che sono correlate allo sviluppo di ipoacusia acquisita e altri deficit neurosensoriali.

Le infezioni dell'infanzia

Tra le principali cause di deficit uditivo insorto nell'infanzia emergono per importanza l'otite media e la meningite batterica.

L'otite media è la più frequente causa di ipoacusia trasmissiva nel bambino. Si tratta di un processo flogistico a carico dell'orecchio medio sostenuto principalmente da tre batteri: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*. Lo *Streptococcus pneumoniae* è l'agente eziologico più frequente e causa un quadro più severo rispetto agli altri batteri. L'introduzione del vaccino pneumococcico ha diminuito l'incidenza di tale infezione, tuttavia l'eliminazione di alcuni sierotipi presenti nel vaccino ha lasciato il campo ad altri che hanno ridotto la potenza di tale risultato.

La meningite batterica è una patologia grave che richiede cure intensive. E' gravata da importanti mortalità e morbilità. Tra sopravvissuti, una percentuale che varia tra 10 e 20% presenta sequele quali epilessia, ritardo mentale e ipoacusia. Sono stati descritti fino a 50 diversi tipi di batteri nell'eziologia della meningite ma più del 90% dei casi di neonati e bambini di età inferiore a 5 anni sono dovuti principalmente a tre agenti: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* ed *Haemophilus influenzae* tipo B. Quest'ultimo è stato l'agente eziologico più frequente fino all'introduzione negli anni '90 del vaccino Hib (Richardson et al, 1997).

Il meningococco è un comune commensale delle mucose delle vie respiratorie del tratto nasofaringeo, si trasmette con le goccioline espirate ed è generalmente innocuo. Tuttavia, può causare sepsi e meningite, quest'ultima è gravata da mortalità che varia dal 9 al 12% ma che può raggiungere in alcuni casi può raggiungere il 40%. Tra le sequele più temibili si annoverano il ritardo mentale, l'ipoacusia, la perdita degli arti. Lo *streptococcus pneumoniae* è un cocco Gram positivo la cui infezione si trasmette per via respiratoria. La meningite causata da questo microrganismo è quella gravata da maggior mortalità: circa il doppio di quella dovuta a meningococco. Fino al 50% dei sopravvissuti sviluppa sequele di cui la più frequente è il deficit uditivo.

La meningite batterica è la principale causa di ipoacusia neurosensoriale acquisita nell'infanzia, è la sequela di circa il 10% di tutti i casi di meningite con un range che varia da 3,5% a 37,2%. Tale variabilità è dovuta sia all'agente eziologico che alla suscettibilità dell'individuo. La meningite streptococcica è più frequentemente associata a deficit uditivo rispetto alle forme dovute a meningococco e da *Haemophilus*. Il bambino è più sensibile dell'adulto all'insulto che porterà all'ipoacusia. Il meccanismo non è ancora completamente noto, si ipotizza che il battere raggiunga la coclea dal liquido cerebrospinale a causa di un'alterazione della barriera emato-labirintica. Il danno avviene precocemente, nelle prime

24-48 ore dall'inizio dell'infezione. Sia studi clinici che lavori condotti su modelli animali hanno dimostrato l'importanza della tempestività dell'inizio della terapia sullo sviluppo di danno uditivo: la somministrazione precoce di terapia diminuisce il rischio di insorgenza di ipoacusia. Il deficit uditivo è permanente, è generalmente severo, può essere mono o bilaterale, può coinvolgere sia le frequenze acute che le gravi.

La meningite batterica è sempre un'emergenza medica che richiede un trattamento antibiotico tempestivo, aggressivo che deve essere iniziato non appena emerge il sospetto di meningite. Poichè si pensa che il danno acustico sia in parte dovuto al microorganismo e in parte alla risposta immune dell'ospite è raccomandata l'associazione della terapia corticosteroidica. Grazie all'introduzione dei vaccini contro i tre principali agenti eziologici di meningite si è assistito a una diminuzione importante dei casi nei paesi industrializzati, molto rimane ancora da fare nei paesi in via di sviluppo.

Ipoacusia e trauma del temporale

Altre cause di ipoacusia sono i traumi cranici, in particolare i traumi a carico dell'osso temporale. Il deficit uditivo che ne consegue è dovuto a un danno che può interessare diversi punti della sistema uditivo e può essere quindi di natura neurosensoriale, trasmissiva o mista. L'ipoacusia trasmissiva può essere dovuta a emotimpano o a dislocazione della catena degli ossicini. La valutazione della funzionalità uditiva può risultare difficoltosa per la presenza di perforazione timpanica, questa generalmente si risolve nell'arco di 3 mesi se non si associa a infezione secondaria. L'emotimpano si riassorbe in alcune settimane. L'ipoacusia neurosensoriale può essere dovuta a diversi meccanismi: il danno della componente membranosa o ossea del labirinto, una concussione a livello dell'orecchio interno senza fratture evidenti a livello del labirinto, una fistola della perilinfia, un danno delle vie uditive centrali. Molti studi affermano che le fratture dell'osso temporale sono molto rare nel bambino. La flessibilità delle ossa del cranio e l'incompleta pneumatizzazione proteggono l'osso temporale dalle fratture e dalle sue complicanze. In realtà tale evenienza è poco frequente ma non così rara: è stato stimato che il 10-20% delle fratture del temporale avvenga in soggetti di età inferiore ai 18 anni. I segni clinici più comuni nei bambini sono: la perdita di coscienza (56% dei casi), l'emotimpano (58%), l'otorrea (47%), l'ipoacusia (34%), la perforazione della membrana timpanica (26%).

Ipoacusia da rumore ambientale

E' noto come l'esposizione all'inquinamento acustico sia una delle principali cause di deficit uditivo nel mondo. Accanto al rumore presente nel luogo di lavoro, che contribuisce al 16% dei casi di ipoacusia nell'adulto, sta aumentando di importanza quello a cui ci si espone nel tempo libero, si tratta dei livelli acustici che si raggiungono in discoteca o con i lettori di musica portatili. Si stima che negli ultimi 20 anni il numero di adolescenti e giovani adulti che sono esposti a questo tipo di rumore sia triplicato rispetto agli anni '80 mentre si è assistito a una diminuzione del rumore in ambito lavorativo. Per ridurre i casi di deficit uditivo da inquinamento acustico, recentemente l'Unione Europea ha stabilito un nuovo livello per il volume di riproduzione dei lettori MP3, iPod e altri lettori di musica portatili. Nella maggioranza dei lettori il livello sonoro varia da 60 a 120 dBA. A 80 dBA si può ascoltare senza problemi la musica anche fino a 40 ore la settimana. Il rischio aumenta se però si alza ancora di poco il volume, il limite massimo che viene raccomandato quindi è di 89dBA per cinque ore la settimana.

La neuropatia uditiva

Nel 1996, Starr e colleghi (Starr et al, 1996) descrissero dieci casi (cinque adulti e cinque bambini) affetti da ipoacusia di grado variabile tra lieve e moderato, che presentavano normale funzionalità delle cellule ciliate esterne (emissioni otoacustiche ipsilaterali evocabili così come l'elettrococleografia) e potenziali evocati uditivi assenti o alterati, riflessi cocleostapediali assenti ed emissioni otoacustiche contro laterali non evocabili. Si pensò che tale condizione fosse dovuta a una lesione del nervo acustico e fu descritta con il termine "neuropatia uditiva".

Attualmente il termine auditory neuropathy/dys-synchrony (AN/AD) si riferisce a una perdita uditiva caratterizzata da una normale funzionalità delle cellule ciliate esterne e da un'alterata risposta neurale e del tronco encefalo (Bamiou, 2009).

Sininger e Oba (Sininger et al, 2001) hanno proposto che la diagnosi di AN/AD possa essere effettuata quando vengono soddisfatti tutti i seguenti criteri:

1. L'alterazione della funzionalità del nervo acustico: potenziali evocati uditivi assenti o gravemente alterati con potenziale microfonico presente e riflessi cocleostapediali assenti sia per stimolazione ipsi che controlaterale.
2. Normale funzionalità delle cellule ciliate esterne: emissioni otoacustiche evocabili, potenziale microfonico cocleare presente. Tuttavia, le emissioni otoacustiche possono scomparire nel tempo per poi ripresentarsi, mentre il potenziale microfonico cocleare persiste.

3. Deficit uditivo anche in presenza di soglia uditiva normale o lievemente alterata. Il quadro di AN/AD si associa a qualsiasi grado di ipoacusia e di profilo audiometrico, ed è caratterizzato da andamento variabile: la soglia può fluttuare nel tempo. All'audiometria tonale può essere riscontrata asimmetria tra i due lati. Sono caratteristici i deficit di percezione della sequenza temporale e del parlato.

Quest'ultimo aspetto indica che vi è un'alterazione del processamento temporale del suono (Orzan, 2009). Mentre i soggetti con udito normale possono rilevare variazioni temporali anche inferiori a 10 ms, i soggetti con neuropatia uditiva potrebbero non rilevare cambiamenti temporali di 100 ms o più. La difficoltà di discriminazione temporale influisce pesantemente sulla percezione verbale se si considera che, per esempio, l'identificazione di una transizione formantica o la rilevazione del tratto sordo-sonoro delle consonanti (capacità indispensabili per la discriminazione delle consonanti) richiede l'abilità di rilevare veloci transizioni temporali di 30-50 ms. Tale aspetto spiega la caratteristica frequente in questi pazienti: capacità di discriminazione del parlato più povere rispetto a quelle attese per la soglia tonale. Questa condizione avviene in particolare in situazioni acustiche non favorevoli come la presenza di rumore in sottofondo. Alla valutazione audiologica, tali soggetti presenteranno quindi un riconoscimento verbale in quiete variabile da lievemente a gravemente compromesso con frequente asimmetria tra i due lati e un riconoscimento verbale in competizione sonora quasi sempre gravemente compromesso.

I risultati dei test strumentali mettono in evidenza come l'interruzione del messaggio sonoro (ossia il disturbo del processamento temporale dell'informazione sonora) sia localizzato in sedi periferiche, non oltre il tronco encefalo: la sede della lesione potrebbe risiedere a livello delle cellule ciliate interne, a livello della giunzione sinaptica tra le cellule ciliate interne e il nervo cocleare, nel nervo stesso, o infine essere una qualsiasi combinazione di queste sedi di lesione. Sono dunque molti i meccanismi e le patologie che potrebbero essere coinvolti nel quadro della AN/AD e questo spiega, almeno in parte, come mai vi sia una così grande variabilità nelle caratteristiche cliniche e psicoacustiche dei pazienti. La diagnosi di AN/AD va posta quando siano soddisfatti i criteri suddetti, escludendo altre cause di neuropatia mediante valutazioni appropriate quali per esempio la risonanza nucleare magnetica per valutare l'integrità nel nervo acustico.

Le cause di AN/AD possono essere genetiche (sindromiche e non sindromiche) e acquisite. Tra le forme genetiche isolate si annovera la forma dovuta a mutazione del gene otoferlina (Varga et al, 2003). Tale gene codifica per una proteina che si trova nella cellule ciliate interne ed è probabilmente coinvolta nel ricircolo delle vescicole sinaptiche. Il danno viene ereditato con modalità autosomica recessiva. Lo stesso autore (Varga et al, 2006) riporta che la mutazione del gene dell'otoferlina può essere responsabile di una forma di neuropatia uditiva che si instaura durante la febbre, descrive alcuni casi di deterioramento della funzionalità uditiva durante l'iperpiressia.

La neuropatia uditiva può inserirsi in un quadro più ampio di altre neuropatie periferiche o altri danni neurologici che non comprendono il sistema uditivo come ad esempio nella neuropatia motorio-sensitiva ereditaria (malattia di Charcot-Marie Tooth), nell'ataxia di Friedreich, nella sindrome di Mohr-Tranebjaerg. In questi casi, la manifestazione di sintomi uditivi tipici di AN/AD può insorgere in tempi diversi dello stadio della malattia e con caratteristiche variabili, così come non comparire mai.

Le forme acquisite di neuropatia uditiva possono essere dovute a diversi fattori, alcuni agiscono nel periodo neonatale: livelli di bilirubina che richiedano l'exanguinotrasfusione, sepsi neonatale, idrocefalo, ipossia e prematurità (Bamiou, 2009); altri in qualsiasi condizione: l'assunzione di carboplatino che altera la funzione delle cellule ciliate interne, e i traumi. Non si è ancora definitivamente compreso quali siano i fattori di rischio specificatamente coinvolti nella genesi di questo disturbo uditivo: alcuni pazienti presentano nella loro storia tali fattori di rischio, per altri non viene rilevato alcun dato anamnestico significativo.

1.2. Gli effetti della perdita uditiva del bambino

Numerosi studi dimostrano l'importanza della precocità della diagnosi di ipoacusia e di intervento nello sviluppo linguistico e cognitivo del bambino. Alcuni autori (Yoshinaga-Itano et al, 1998) hanno riscontrato che i bambini con ipoacusia diagnosticata a 2, 3, 4, 5 e 6 mesi di vita presentavano uno sviluppo del linguaggio adeguato alla loro età. Altri (Calderon et al, 2000) hanno valutato tre gruppi di bambini ipoacusici senza altre disabilità: nel primo la diagnosi è stata effettuata entro i primi 12 mesi di vita, nel secondo tra i 13 e 24 mesi e il terzo tra i 25 e 36 mesi. Questo studio ha dimostrato che coloro che avevano ricevuto una diagnosi e un trattamento precoci avevano migliori capacità di comprensione e di espressione. Un altro studio (Yoshinaga-Itano et al, 1998; 1999) ribadisce la necessità di intervento entro i 6 mesi dato che non si sono osservate differenze significative nello sviluppo linguistico dei bambini identificati tra i 7 e 12 mesi, tra i 13 e 18 mesi, tra i 19 e 24 mesi e tra 25 e 30 mesi. Questi risultati sono in linea con quelli riportati da altri studi (Apuzzo et al, 1995, Moeller, 2000).

La figura sottostante evidenzia il diverso quoziente linguistico nella popolazione individuata e trattata prima dei sei mesi e in quella con intervento tardivo.

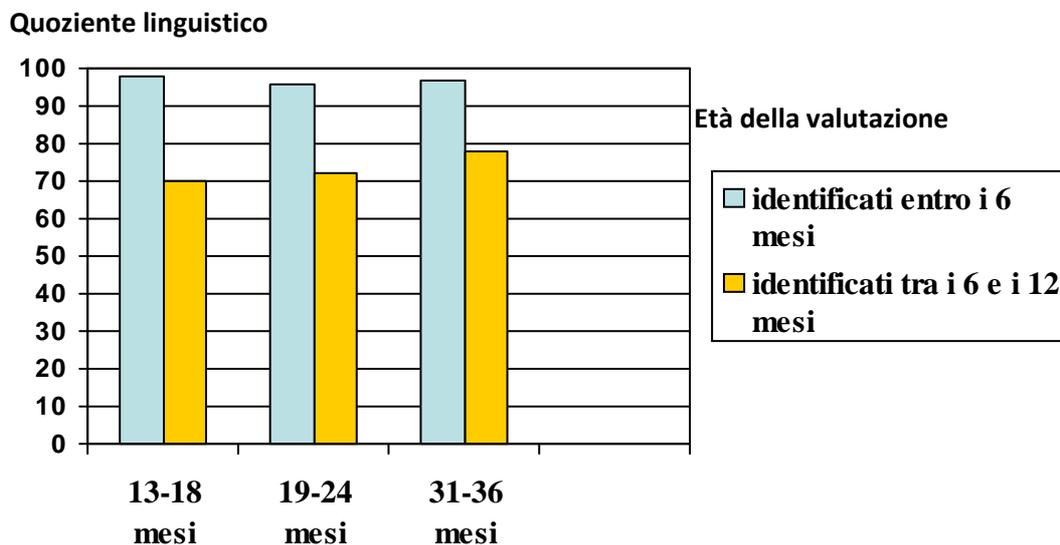


FIGURA1: QUOZIENTE LINGUISTICO (YOSHINAGA-ITANO ET AL, 1999, MODIFICATO)

Sono stati individuati dei fattori predittivi per lo sviluppo comunicativo (Yoshinaga-Itano et al, 2000) quali l'età, lo sviluppo del linguaggio, il grado di perdita uditiva e la modalità di comunicazione.

Un altro aspetto importante è il grado di coinvolgimento dei genitori, tuttavia è stato dimostrato che tra le famiglie meno interessate e partecipi, il miglior outcome linguistico misurato come ricchezza di vocabolario era tra i figli di coppie che erano state prese in carico precocemente (Moeller, 2000).

Alcuni autori (Yoshinaga-Itano et al, 1998) hanno dimostrato che bambini con ipoacusia e una disabilità associata con una diagnosi precoce di ipoacusia ottengono un quoziente di linguaggio simile a quelli con ipoacusia isolata diagnosticata tardivamente (figura 2)

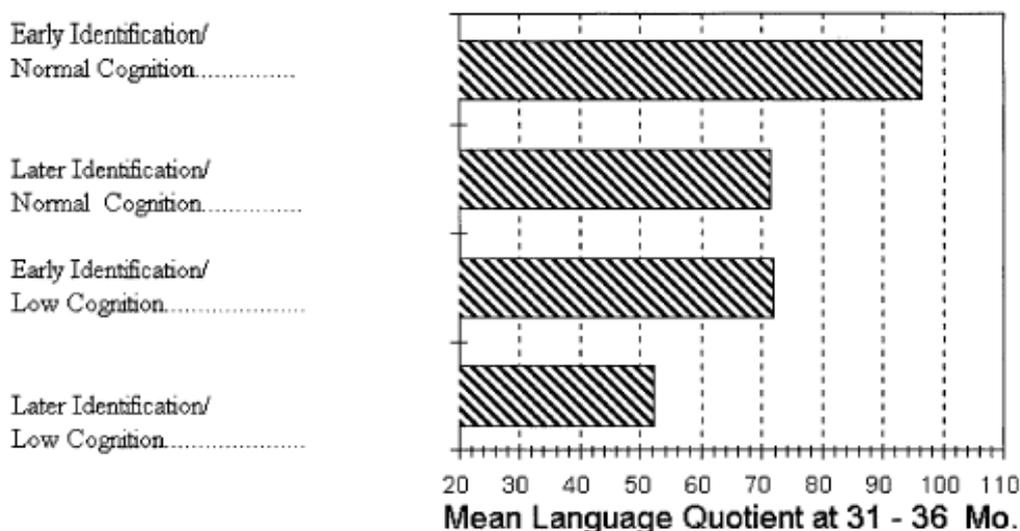


FIGURA 2: QUOZIENTE DI LINGUAGGIO NELLE DIVERSE POPOLAZIONI (YOSHINAGA-ITANO ET AL, 1998)

La letteratura concorda sul fatto che la diagnosi precoce e l'intervento efficace agiscono al meglio sulla plasticità delle vie uditive centrali permettendo al bambino di raggiungere un miglior livello di abilità linguistiche e comunicative in generale, un migliore sviluppo sociale ed emotivo (Yoshinaga-Itano, 2003).

1.3. Le possibilità di intervento precoce

Le protesi acustiche

La protesizzazione acustica nel bambino piccolo ha l'obiettivo di amplificare il suono in modo da renderlo udibile e quindi favorire la comunicazione nel maggior numero di situazioni di ascolto possibili. Le modalità di intervento protesico contemplano l'uso di strumenti quali apparecchi acustici, impianti cocleari, presidi vibrotattili, altri ausili per l'ascolto, sempre associati a counseling familiare ed eventuali terapie riabilitative che favoriscano lo sviluppo di strategie comunicative efficaci.

Una corretta prescrizione protesica acustica non dovrebbe prescindere da una valutazione audiologica valida e completa, con una soglia specifica per orecchio nel range di frequenze compreso tra 250 e 8000 Hz. Nell'ambito dell'attività audiologica infantile, in alcuni casi, è difficile ottenere un profilo audiometrico completo. Per assicurare la validità dei risultati viene utilizzata una batteria di procedure audiologiche differenziate per età: nei primi 5 mesi di vita, il bambino viene sottoposto a procedure di audiometria obiettiva quali potenziali evocati uditivi, emissioni otoacustiche, impedenzometria, tra 6 e 24 mesi alle suddette tecniche di audiometria oggettiva si aggiunge l'audiometria comportamentale con rinforzo visivo, dopo i 25 mesi l'audiometria comportamentale si esegue con il gioco (Orzan et al, 2001).

Gli apparecchi acustici retroauricolari rappresentano lo stile protesico quasi obbligato quando si tratta di bambini piccoli. Si collocano dietro l'orecchio: il suono è trasmesso dal ricevitore a un tubicino di plastica inserito in un auricolare costruito su misura e modellato nel canale uditivo esterno.

Le protesi endoauricolari e cioè poste dentro il canale uditivo hanno un miglior aspetto estetico e offrono vantaggi acustici dovuti alla posizione più naturale del microfono nel meato uditivo esterno. Le protesi endoauricolari non sono però raccomandate nella prima infanzia per le inadeguate dimensioni del condotto uditivo, la necessità di frequente cambio del guscio e il pericolo di rottura del guscio all'interno del canale uditivo (Orzan et al, 2001).

Oggi la tecnologia digitale ha raggiunto anche il campo audioprotesico e molti apparecchi conosciuti come "analogici" vengono sostituiti dai digitali. In questi ultimi il segnale recepito dal microfono viene trasformato in forma digitale da un convertitore analogico-digitale, con notevoli vantaggi nella fedeltà di riproduzione sonora e di trattamento sonoro .

L'impianto cocleare

In alcuni casi di ipoacusia profonda, il residuo uditivo è talmente modesto che anche con le protesi che consentono la massima amplificazione il soggetto non riesce a percepire adeguatamente i suoni. Questi pazienti possono beneficiare dell'impianto cocleare. Tale apparecchio converte il suono in segnale elettrico che andrà a stimolare le fibre del nervo acustico.

Un impianto cocleare ha il compito di convertire il segnale sonoro in un segnale elettrico e trasmetterlo agli elettrodi posti all'interno della coclea. Nonostante esistano diversi modelli di impianto cocleare, tutti sono composti da un processore esterno (a scatola o retroauricolare) con microfono e batterie, e da un ricevitore interno collegato ad una serie di elettrodi. Le diversità sono legate al numero di elettrodi endococleari, alla strategia di processamento del segnale acustico oppure alle dimensioni del ricevitore.

In tutti gli impianti multicanale moderni l'ingresso sonoro viene captato dal microfono e inviato al processore, dove viene suddiviso in canali a seconda della frequenza e/o dell'intensità e trasformato in segnale elettrico di diversa intensità e frequenza e trasmesso, con onde radio, al ricevitore interno e quindi agli elettrodi endococleari, sempre secondo i parametri stabiliti dalla strategia di processamento utilizzata dall'impianto.

Nell'impianto cocleare le diverse frequenze del parlato vengono riprodotte inviando il segnale ai diversi elettrodi rispettando la posizione tonotopica degli elettrodi (segnali acuti → elettrodi basali, segnali gravi → elettrodi apicali), mentre l'intensità viene trasmessa rendendo il segnale elettrico più intenso per i suoni più forti e meno intenso per i suoni meno forti. Le caratteristiche del segnale elettrico costituiscono dunque una rappresentazione del segnale vocale che attiva il nervo cocleare mimando lo stimolo acustico originale e che viene interpretato come sensazione sonora a livello delle aree corticali.

Sono state fatte alcune considerazioni sugli impianti cocleari: le prestazioni che offre sono diverse da individuo a individuo, viene potenziata la capacità di percepire il parlato, gli apparecchi a canale multiplo permettono una migliore percezione del suono.

L'Istituto Americano sulla Sordità e altri Problemi di Comunicazione, sezione dell'Istituto Americano per la Salute Pubblica ha steso un documento aggiornato nel 2011 (<http://www.nidcd.nih.gov/health/hearing/coch.asp>) che afferma l'importanza dell'impianto cocleare in adulti e bambini con sordità profonda, sottolineandone l'importanza in età pediatrica per un corretto sviluppo del parlato, del linguaggio e delle abilità sociali. L'Agenzia per gli Alimenti e i Medicinali (Food and Drug Administration's) nel 2000 ha abbassato l'età minima per l'inserimento dell'impianto cocleare a 12 mesi. Nel 2005 ha reso noto che circa 100.000 persone al mondo porta un impianto cocleare, negli Stati Uniti sono circa 22.000 adulti e 15.000 bambini. In linea di principio vengono considerati candidati ad un impianto cocleare tutti i bambini con una perdita neurosensoriale superiore ai 110 dB HL e anche

molti bambini con un deficit uditivo tra 90 e 110 dB HI di perdita per i quali sia stato correttamente dimostrato uno scarso beneficio protesico. La decisione ultima di un impianto dipende comunque da diversi fattori che non sono limitati alle capacità uditive residue ma che comprendono anche la precocità e la qualità dell'adattamento protesico, la qualità dell'intervento abilitativo che riceve il bambino, la presenza di deficit associati, il coinvolgimento da parte della famiglia e degli educatori (Orzan et al, 2001).

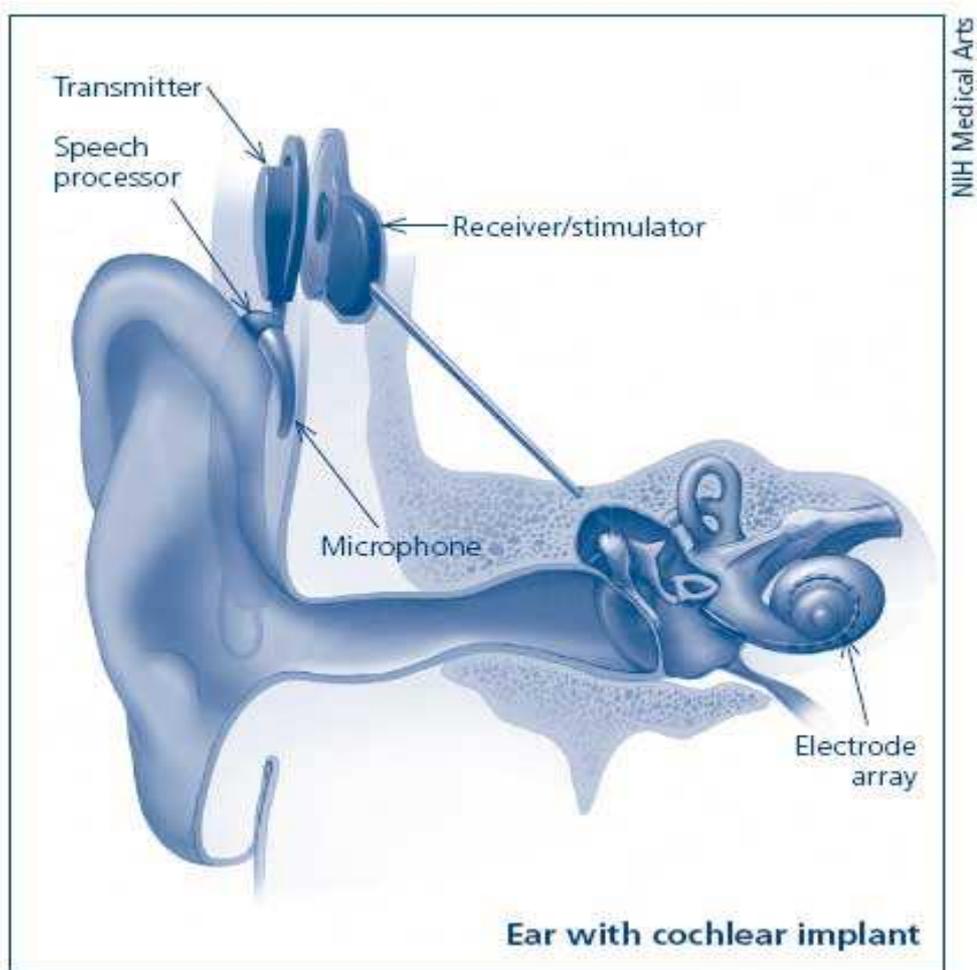


FIGURA 3: IMPIANTO COCLEARE E LE SUE PRINCIPALI COMPONENTI.

Nei casi di atresia del canale uditivo o in alcune patologie di carattere trasmissivo non possibile applicare apparecchi a trasmissione per via aerea ma è indicato un apparecchio che permetta la conduzione attraverso la via ossea. Viene chiamato BAHA (bone anchored hearing aid), ed è composto da un impianto di titanio che viene applicato mediante intervento chirurgico sul processo mastoideo e un processore del suono. Tale sistema amplifica la trasmissione per via ossea permettendo al suono di raggiungere l'orecchio interno saltando il canale uditivo esterno e l'orecchio medio.

Senza lo screening, un deficit uditivo moderato-severo può essere riconosciuto solo tra il primo e il secondo anno di vita, un deficit di minore entità solo in età scolare (National Institutes of Health, 1993; Stein et al, 1990; Gustason et al, 1989; Ross, 1990). Inoltre, poiché solo il 50% dei soggetti ipoacusici presenta dei fattori predisponenti, eseguire lo screening solo sulla popolazione a rischio non permetterebbe di individuare circa la metà degli individui con deficit uditivo (Mehl et al, 1998). Per i motivi suddetti, nel 1993 l'Istituto Americano per la Salute Pubblica ha emesso un Consensus Statement (National Institutes of Health, 1993) che ha valutato nel ritardo della diagnosi di ipoacusia un problema significativo per il Sistema sanitario degli Stati Uniti e ha consigliato lo screening uditivo neonatale universale (UNHS: Universal Newborn Hearing Screening). Agli inizi del 1999 l'Accademia Americana di Pediatria ha prodotto una "task force on newborn and infant hearing (American Academy of Pediatrics, 1999) attraverso la quale ha riconosciuto la necessità di uno screening uditivo neonatale e ha definito delle linee guida per l'applicazione dello stesso. Da allora altre associazioni mediche americane (American Academy of Otolaryngology, American College of Medical Genetics) ma anche canadesi, australiane, britanniche hanno promulgato delle dichiarazioni (position statements) che sottolineano l'importanza della diagnosi e dell'intervento precoce per la sordità infantile. Tutti gli stati nordamericani hanno promosso presso i punti nascita l'esecuzione dello screening uditivo neonatale con metodica oggettiva e, attualmente, la quasi totalità dei bambini nati negli Stati Uniti e del Canada ottiene una valutazione uditiva alla nascita. In ambito europeo alcuni paesi quali Gran Bretagna, Olanda, Danimarca, Polonia e Germania hanno definito dei programmi nazionali di screening uditivo universale. In Italia non esiste una specifica legislazione che promuova lo screening uditivo neonatale.

Le linee guida pubblicate dall'Accademia Americana di Pediatria (Joint Committee on Infant Hearing, 2007) prevedono che lo screening sia universale, cioè che esamini la totalità della popolazione, che si proponga l'identificazione di un deficit uditivo maggiore di 35 dB, che utilizzi le emissioni otoacustiche evocate con stimolo transiente come unico esame o in associazione ai potenziali evocati uditivi del tronco.

Il documento steso dal JCIH (Joint Committee on Infant Hearing, 2007) fornisce i principi su cui si basa lo screening. Questi prevedono che i neonati risultati positivi vengano sottoposti a una serie di esami volti a effettuare una diagnosi entro i primi 3 mesi di vita e inizino un trattamento dai 6 mesi di età. Per coloro che risultano negativi ma che presentano fattori di rischio è previsto un programma di sorveglianza con controlli della funzionalità uditiva e dello sviluppo del linguaggio.

I fattori di rischio identificati da JCIH di pertinenza neonatologica sono:

1. storia familiare di ipoacusia neurosensoriale insorta in infanzia.

2. condizione clinica del neonato che richieda il ricovero di almeno 5 giorni presso un reparto di Terapia Intensiva Neonatale oppure, indipendentemente dalla durata del ricovero, il trattamento con circolazione extracorporea (ECMO), la ventilazione assistita, la terapia con farmaci ototossici (gentamicina e tobramicina, diuretici dell'ansa), la condizione di iperbilirubinemia che richieda exanguinotrasfusione.
3. quadro clinico che riconduce a una sindrome associata a ipoacusia neurosensoriale o trasmissiva permanente.
4. anomalie cranio-facciali, incluse le malformazioni del padiglione, del condotto uditivo esterno, dell'osso temporale, le fossette e le appendici periauricolari.
5. sifilide e infezioni dovute a complesso TORCH contratte nel periodo prenatale.

I soggetti che soddisfano i suddetti criteri dovranno essere valutati nel tempo anche se lo screening neonatale li ha definiti normoudenti.

Quando iniziò il programma di screening uditivo neonatale, la percentuale di errore nell'esito del test si aggirava tra 2 e 4% e circa 85-90% di coloro che risultavano positivi al test dimostravano agli esami successivi di avere un udito normale. Con il tempo le tecniche sono migliorate e oggi, nei centri migliori, la percentuale di fallimento del test è scesa a 0,5% (Morton et al, 2006).

Grazie allo screening uditivo, l'età media della diagnosi è scesa da 24-30 mesi a 2-3 mesi (Harrison et al, 2003).

1.5. Emissioni otoacustiche

La coclea è in grado non solo di ricevere suoni ma anche di produrli. I suoni che vengono ottenuti sono chiamati emissioni otoacustiche (Otoacoustic emissions, OAEs). Kemp (1978; 1979) dimostrò che le OAEs vengono prodotte sia in risposta a stimoli sonori sia spontaneamente. Le emissioni otoacustiche sono il risultato dell'attività biomeccanica microscopica (motilità) tipica delle cellule cigliate esterne dell'organo di Corti.

Tale scoperta è stata quindi utilizzata per mettere a punto dei tests che permettessero di valutare la funzionalità cocleare, in particolare la funzionalità delle cellule cigliate esterne.

Il test delle OAEs consiste nel porre nel condotto uditivo esterno una sonda inserita in un tappino, questa contiene un dispositivo che produce uno stimolo sonoro e un microfono per registrare i suoni presenti nel canale uditivo, incluse le OAEs.

Si tratta di un test con elevata sensibilità, non invasivo e semplice da eseguire, può misurare le otoemissioni acustiche spontanee o quelle evocate.

Le otoemissioni acustiche spontanee (Spontaneous Otoacoustic Emissions, SOAEs) sono semplici suoni emessi dalla coclea in assenza di stimolazione, presentano una serie di limitazioni dovute al fatto che sono presenti in circa la metà della popolazione sana, hanno un intervallo di frequenze ridotto e la loro ampiezza varia nel tempo (Gelfand, 1997).

Le otoemissioni acustiche evocate sono suoni emessi dalla coclea in risposta a uno stimolo, in particolare le otoemissioni acustiche evocate transienti (Transient Evoked Otoacoustic Emissions TEOAE) sono prodotte in risposta a un segnale sonoro breve, (click). Poiché le emissioni otoacustiche hanno ampiezze molto piccole che vanno distinte dal rumore di fondo, vengono emessi molti clicks in successione, suoni nel canale uditivo vengono monitorati dopo ciascun click.

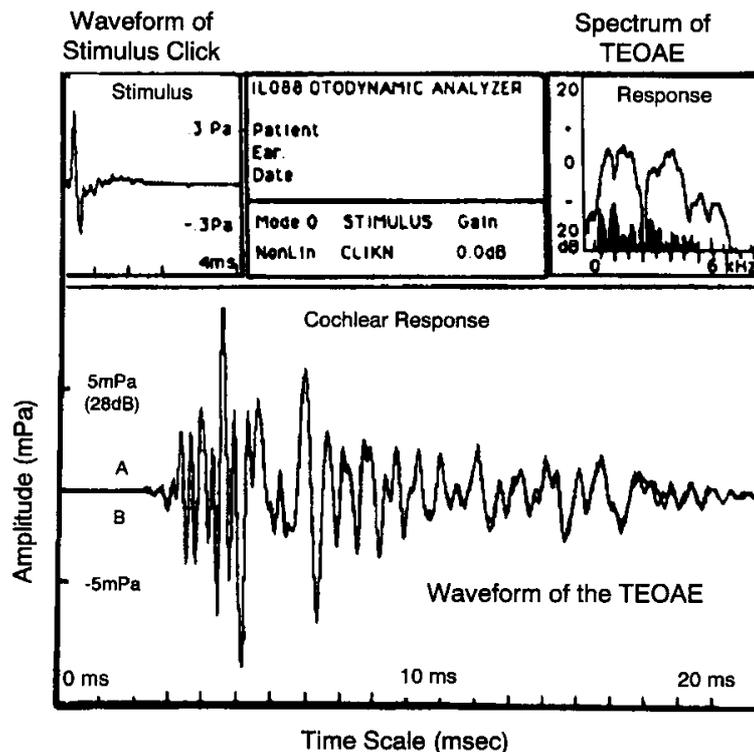


FIGURA 5: RAPPRESENTAZIONE DELLE EMISSIONI OTOACUSTICHE IN UN SOGGETTO NORMOUDENTE (GELFAND, 1997).

La figura 5 mostra la rappresentazione delle emissioni otoacustiche in un soggetto normoudente: l'onda ha una latenza compresa tra 5 e 20 sec., la prima parte (quella con le latenze più brevi) origina dalla base della coclea, dove sono rappresentate le alte frequenze, la parte con le latenze più lunghe origina vicino all'apice, dove sono rappresentate invece le basse frequenze. Le emissioni otoacustiche evocate transienti sono generalmente ottenute con uno stimolo la cui frequenza varia tra i 1000 e 4000 Hz, sono evocate in tutti gli individui normoudenti inclusi i neonati, sono assenti nei soggetti con deficit uditivo da danno cocleare maggiore di 30-50 dB (Gelfand, 1997).

Ogni neonato riceve lo screening uditivo neonatale mediante il test delle emissioni otoacustiche evocate transienti automatiche (Automatic Transient Evoked Otoacoustic Emissions, A-TEOAE) che vengono eseguite grazie ad apparecchi miniaturizzati, automatici, che rivelano la presenza (pass) o l'assenza (refer) delle emissioni otoacustiche. Se il risultato è pass, il neonato, con elevatissima probabilità, non ha una perdita uditiva. Il risultato refer non indica necessariamente la presenza di deficit uditivo ma la necessità di un'ulteriore valutazione. Infatti le cause di falsa positività al test sono l'irrequietezza del bambino durante l'esecuzione dell'esame, un condotto uditivo ancora pieno di vernice caseosa, un versamento sieroso endotimpanico oppure un ambiente d'esame particolarmente rumoroso.

La sensibilità delle emissioni otoacustiche varia da 90 al 100% (Bubbico et al, 2003) e la specificità è pari al 97% (Ministero della Salute, 2007).

1.6. Potenziali evocati uditivi del tronco encefalico (ABR)

L'attività del sistema nervoso produce segnali elettrici che possono essere percepiti da elettrodi posti sulla testa, visualizzati su uno schermo e registrati. Quando il sistema nervoso riceve uno stimolo e reagisce tale attività si modifica. La risposta elettrica a tale segnale è chiamata potenziale evocato. Se si tratta di un stimolo sonoro si parla di potenziale evocato uditivo.

I potenziali evocati uditivi (Auditory Evoked Potentials, AEPs) sono indicativi del funzionamento del sistema uditivo. Vengono rappresentati graficamente secondo una scala temporale chiamata latenza (figura 4), questa indica il lasso di tempo che intercorre dall'emissione dello stimolo alla sua percezione. Ciascuno dei potenziali evocati è composto da picchi e depressioni che si alternano in uno specifico intervallo di latenza, per questo motivo sono distinti in breve, media e lunga latenza.

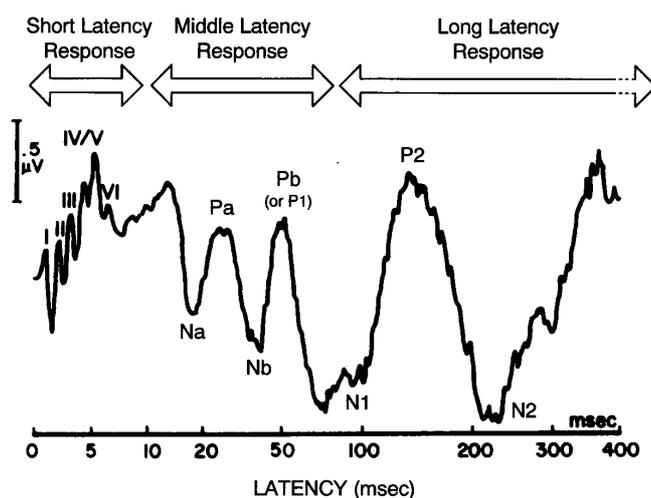


FIGURA 6: POTENZIALI EVOCATI UDITIVI (GELFAND, 1997).

Il gruppo di onde di breve latenza è costituito da 7 picchi che nelle condizioni di normalità si formano entro 8 msec dopo lo stimolo. E' stato ipotizzato che i primi due picchi sono prodotti dal nervo acustico e i successivi dai nuclei delle vie uditive del tronco (Gelfand, 1997). Questi potenziali a breve latenza sono stati quindi chiamati potenziali evocati uditivi del tronco (Auditory Brainstem Response, ABR). Sono indicativi del funzionamento della coclea, del nervo acustico e delle vie uditive del tronco, rappresentano una risposta elettrofisiologica che origina dalla porzione della via uditiva anatomicamente compresa tra il nervo acustico e la regione sotto-talamica. Normalmente la risposta viene ottenuta con un numero di stimoli pari a 1500-2000. L'attività bioelettrica viene raccolta da elettrodi di

superficie (vertice-mastoide) ed elaborata per evidenziare la tipica morfologia costituita da 6-7 onde (Moeller, 1998).

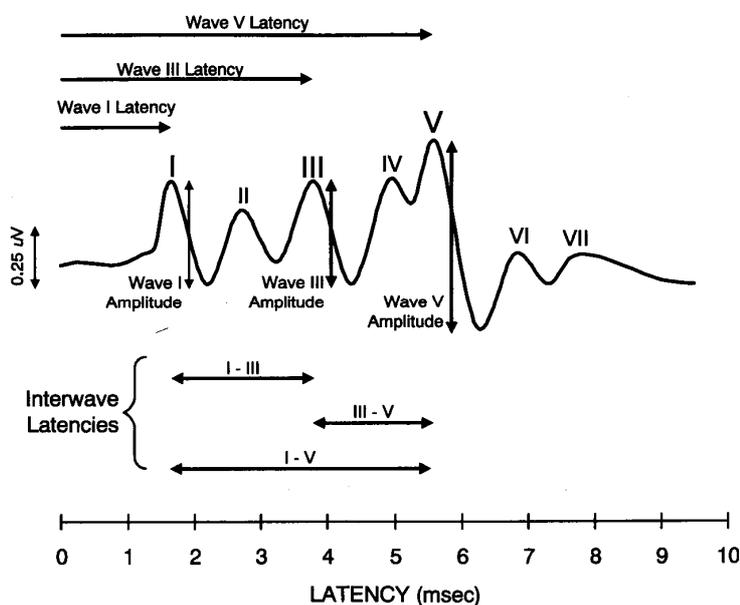


FIGURA 7: POTENZIALI EVOCATI DEL TRONCO (GELFAND, 1997.)

In ambito clinico l'interesse maggiore è per i primi 5 picchi, in particolare per il I, III e V. La descrizione e l'interpretazione si basano sulla misura della latenza e dell'ampiezza dei picchi ma anche sulla loro morfologia. C'è una notevole variabilità tra la morfologia delle onde tra i soggetti normoudenti, questo dipende anche dal fatto che le caratteristiche dei potenziali evocati uditivi del tronco sono differenti a seconda dello stimolo che viene inviato: più questo diminuisce in intensità, più le latenze dei picchi aumentano e le ampiezze rimpiccioliscono.

I potenziali uditivi del tronco possono essere applicati a tutti, anche ai neonati, non sono invasivi e non necessitano di sedazione. I risultati vanno interpretati in base al paziente perché presentano delle differenze a seconda di maturazione del sistema nervoso centrale, del sesso e dell'età. Le caratteristiche dell'onda V sono differenti in caso di udito normale, ipoacusia trasmissiva e ipoacusia neurosensoriale. Nel deficit uditivo trasmissivo c'è una diminuzione dell'intensità del segnale che raggiunge la coclea, per questo motivo latenza e intensità caratteristiche sono misurabili a un livello di stimolo più alto. Mentre nel deficit uditivo da danno cocleare l'onda V ha una latenza aumentata e sopra la soglia, converge verso una normale latenza quando l'intensità dello stimolo è aumentata.

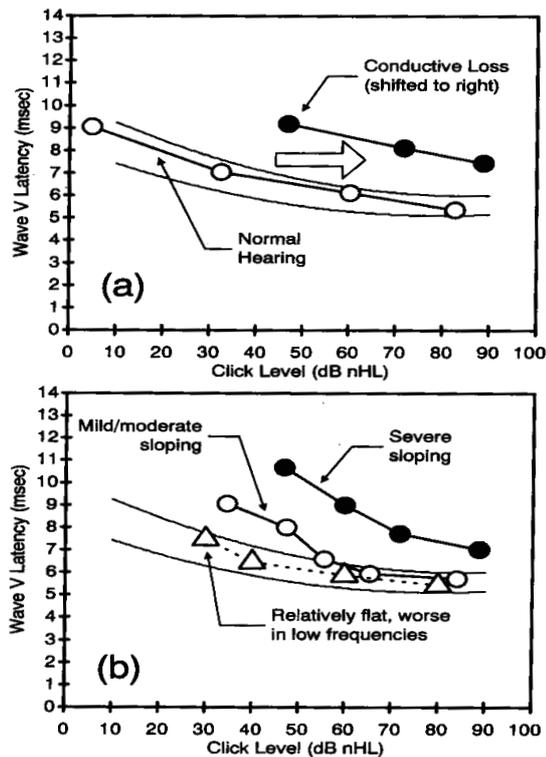


FIGURA 8A: LATENZA DELL'ONDA V IN SOGGETTO NORMOUDENTE (PALLINE BIANCHE) E IN SOGGETTO CON DEFICIT TRASMISSIVO (PALLINE NERE).

FIGURA 8B: LATENZA DELL'ONDA V IN SOGGETTO CON IPOACUSIA PER LE BASSE FREQUENZE (TRIANGOLI BIANCHI) E IN SOGGETTO CON DEFICIT PER LE ALTE FREQUENZE (PALLINE NERE). (GELFAND, 1997, MODIFICATO)

Le caratteristiche dei potenziali evocati del tronco dipendono comunque dal tipo di deficit uditivo, essi sono maggiormente indicativi del funzionamento della base della coclea (deputata alla percezione delle alte frequenze), quindi l'intensità e la latenza dell'onda V sono alterate in caso di perdita uditiva neurosensoriale per le alte frequenze (palline nere del grafico figura 8) ma possono risultare nel range della normalità in caso di deficit per le basse frequenze.

Le ipoacusie di origine retrococleare vengono identificate mediante la valutazione dei picchi e della loro morfologia, i potenziali evocati uditivi hanno in questi casi una sensibilità del 95% (Gelfand, 1997).

L'ABR può essere utilizzato in modo vantaggioso per la stima della soglia psicoacustica. Per la definizione della soglia audiometrica, il parametro più attendibile è rappresentato dall'onda V, che è il potenziale più resistente al decremento di intensità dello stimolo sonoro. Nei soggetti normali, infatti, la sua soglia è intorno ai 10 dB nHL. Va ricordato che inviando clicks si valuta essenzialmente la soglia audiometrica compresa tra 1 e 3-4 kHz a seconda delle caratteristiche del trasduttore (Maurizi, 2000).

Gli strumenti ABR per lo screening uditivo sono oggi disponibili anche in versione automatica. In questo caso lo stimolo consiste in click di intensità 35 dB nHL con frequenza di stimolo di 55 Hz inviato tramite un inserto posto nel meato acustico esterno. Il segnale viene

successivamente amplificato e filtrato (banda 70 Hz-4 KHz). I tracciati vengono analizzati automaticamente dall'apparecchio mediante un algoritmo statistico che esegue un confronto con quelli di riferimento provenienti da un campione di soggetti sani.

1.7. La realtà dello screening uditivo neonatale in Italia

Nel 2008 sono stati pubblicati (Bubbico et al, 2008) i risultati di un'indagine condotta a livello nazionale allo scopo di valutare la realtà dello screening uditivo in Italia e di confrontarla con la situazione vigente nel 2003 (Bubbico et al, 2005). E' stato inviato un questionario a tutti i centri nascita di ospedali pubblici italiani, considerando quindi di ottenere dati riguardanti il 97% di tutta la popolazione neonatale italiana. Nel 2006, lo screening uditivo neonatale universale (UNHS) era attivo in 252 su 607 centri nascita. La percentuale di ospedali che hanno adottato lo screening è quindi aumentata dal 2003 al 2006 passando dal 23,5% al 41,5%. La situazione italiana è risultata eterogenea: lo screening è attuato nel 77,9% dei centri nascita del Nord-Ovest (Valle d'Aosta, Lombardia, Liguria, Piemonte), nel 53,5% nel Nord-Est (Trentino Alto Adige, Veneto, Friuli, Emilia Romagna), nel 29% nel centro (Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Abruzzi), nel 37,3% nel Sud (Molise, Campania, Puglia, Basilicata, Calabria) e nel 11,4% degli ospedali nelle isole di Sicilia e Sardegna. Considerando il numero di nati, la copertura garantita dallo screening è quindi 79,5% nel Nord-Ovest, del 57,2% nel Nord-Est, del 32,0% nel centro, del 42,0% nel Sud e nel 11,3% nelle isole. Considerando le singole regioni, la copertura ottimale, cioè >95% (Joint Committee on Infant Hearing, 2007), è stata raggiunta nelle regioni Piemonte e Valle d'Aosta, in Liguria è 93,6%, in Veneto 89,2%, in tutte le altre regioni è inferiore a 80%.

Tutti i centri hanno organizzato lo screening in due livelli: il primo prevede la valutazione al secondo giorno di vita e un'eventuale ripetizione prima della dimissione, nel caso il risultato sia dubbio per uno o entrambe le orecchie, il neonato viene valutato 3-4 settimane dopo. Coloro che non passano il secondo livello vengono inviati alla valutazione audiologica. Le tecniche di esecuzione dello screening sono risultate essere principalmente tre: A-TEOAE sia al primo che al secondo livello; A-TEOAE in prima battuta ed eventuale A-ABR prima della dimissione, in caso di risultato dubbio, A-TEOAE e A-ABR al secondo livello; solo A-ABR sia al primo che al secondo livello, in tal case la valutazione veniva eseguita dal servizio di Audiologia/Otorinolaringoiatria. Il 92,8% dei centri ha adottato il primo protocollo, il 5,2% il terzo mentre solo il 2% utilizza sia A-TEAOA che A-ABR.

E' stato rilevato che l'implementazione dello screening è avvenuta principalmente nei centri che presentano maggior natalità (>800 nati/anno) e che sorgono nei centri urbani. Nella maggior parte dei casi, lo screening è coordinato da un audiologo.

Dagli studi sopracitati emerge che nell'implementazione dello screening giocano un ruolo fondamentale sia la natalità e la locazione dei centri nascita sia la disponibilità di un medico audiologo nel coordinamento. Si può quindi affermare che il programma di screening neonatale uditivo si sta diffondendo rapidamente nel nostro paese, pur rimanendo ancora poco presente in alcuni distretti regionali.

1.8. Lo screening genetico neonatale di DFNB1

Parallelamente all'adozione di programmi di screening uditivo neonatale e all'identificazione precoce dei casi di ipoacusia, si è verificato un corrispondente ampliamento delle conoscenze nel campo della genetica dell'ipoacusia preverbale: attualmente sono identificati 46 geni coinvolti nella genesi dell'ipoacusia neurosensoriale non sindromica (Hilgert et al, 2009). In alcune popolazioni, più della metà dei casi è dovuta a mutazioni unicamente a carico di GJB2 (Kenneson et al, 2002) e GJB6 (Del Castillo et al, 2002; Del Castillo et al, 2003; Lerer et al, 2001).

Il fatto che mutazioni dei geni GJB2 e GJB6, entrambi localizzati sul cromosoma 13 in regione q12, rendono conto di almeno il 50% delle perdite uditive autosomiche recessive, benché con variazioni di prevalenza e variazioni nella frequenza di mutazioni specifiche nelle diverse popolazioni studiate (Petit 2004; Kenneson et al. 2002, del Castillo et al., 2002), ha indotto a considerare che l'associazione dello screening genetico di DFNB1 allo screening uditivo neonatale può presentare numerosi vantaggi da un punto di vista clinico ed economico-sanitario.

In questa tesi, viene affrontato il tema della possibilità di affiancare allo screening uditivo neonatale lo screening genetico neonatale universale di DFNB1 effettuato mediante l'analisi dello spot di sangue che imbibisce la carta usata per gli screenings metabolici (Guthrie card). Numerosi studi (Matsubara et al, 1992; Carducci et al, 1998; Nagy et al, 2010) hanno dimostrato la validità della metodica di estrazione di DNA da una goccia di sangue seccato equiparandola a quella che ottiene DNA da sangue venoso trattato con l'anticoagulante EDTA.

In letteratura (Schimmenti et al, 2004; Schimmenti et al, 2011; Wang et al, 2011) il tema dello screening genetico neonatale per l'ipoacusia è stato largamente studiato, valutandone pro e contro, argomentando su fronti che risultano in attesa di evidenze scientifiche in grado di validare una presa di posizione così rilevante dal punto di vista clinico, etico, sociale ed economico.

Per analizzare i termini del dibattito si devono richiamare i requisiti generali a cui deve rispondere un programma di screening universale atto a rilevare una determinata patologia. Tali criteri, redatti da Wilson e Junger nel 1968 (Wilson et al, 1968) e successivamente revisionati in base all'evolversi delle conoscenze e dei contesti clinici (Andermann et al, 2008), vengono di seguito sintetizzati:

1 La patologia deve costituire un problema di salute rilevante, devono esservi approfondite conoscenze sulla sua storia naturale, sull'esistenza di una fase latente e il suo passaggio a quella clinica. Tutte le misure di prevenzione primaria devono essere attuate per quanto possibile. Nel caso in cui lo screening identifichi anche i soggetti portatori, devono essere ben note le implicazioni fisiopatologiche che tale stato comporta.

Tale punto viene analizzato e discusso nella seguente tesi nel paragrafo: “Rilevanza e definizione della patologia”

2 Il test di screening deve essere semplice, sicuro, affidabile, validato e accettabile da parte della popolazione. Deve essere nota, nella popolazione oggetto di screening, la distribuzione dei valori identificati dal test per poi definire in modo univoco lo stato di normalità e quello di malattia. Per coloro che risultano positivi al test, devono sussistere protocolli diagnostico-terapeutici definiti. Se il test ha lo scopo di identificare solo alcune mutazioni, il criterio di selezione di queste deve essere stabilito chiaramente, secondo determinate evidenze.

Si è pensato di affrontare il punto 2 con il paragrafo: “Il test di screening”

3 Il trattamento per coloro che vengono identificati deve essere efficace e deve sussistere l’evidenza che la precocità di questo consente un outcome migliore rispetto a un intervento tardivo. L’offerta del trattamento appropriato deve seguire determinati protocolli concordati e comuni. Prima di avviare un programma di screening, tutti gli operatori sanitari devono rendere ottimali le metodologie di trattamento e l’outcome del soggetto che è stato identificato.

Il punto 3 viene discusso nel paragrafo “Efficacia del trattamento”

4 Studi randomizzati e controllati devono fornire evidenze sul fatto che lo screening sia efficace nella riduzione della mortalità e morbilità. L’informazione fornita dal test e le sue conseguenze devono essere chiare ed comprensibili per l’individuo risultato positivo. Deve esserci evidenza che il programma di screening (il test, la diagnostica e il trattamento/intervento) sia accettabile dal personale sanitario e dalla popolazione dal punto di vista clinico, etico e sociale. Il beneficio del risultato dello screening deve superare lo stress fisico e psicologico dovuto al test, agli accertamenti e al trattamento successivi. Lo screening deve avere un rapporto costo/beneficio vantaggioso. Deve esserci un protocollo per l’esecuzione e la valutazione della modalità di esecuzione dello screening mediante indicatori di qualità concordati. Si devono considerare tutte le possibilità diagnostiche e terapeutiche per evitare di avere costi aggiuntivi non previsti nel budget a disposizione. Si devono considerare e validare scientificamente le proposte di allargamento della popolazione valutata e di aumento della sensibilità del test in modo da fornire alla popolazione informazioni corrette e univoche. Nel caso in cui lo screening identifichi mutazioni genetiche, il risultato deve essere accettato da coloro che risultano portatori sani e dalla loro famiglia. Tale punto viene analizzato e discusso nella seguente tesi nel paragrafo: “outcome e sostenibilità”.

Sulla base di tali criteri si può discutere l’appropriatezza dello screening genetico neonatale di DFNB1 in termini di rilevanza della patologia, metodica di screening, efficacia del trattamento, out come e sostenibilità.

Rilevanza e definizione della patologia

Riguardo alla rilevanza clinica dell'ipoacusia di origine genetica e alla sua storia naturale si è discusso nei capitoli precedenti. Entrando nel merito dello screening genetico neonatale che effettui il sequenziamento completo di DFNB1 (entrambi gli esoni di GJB2 e ricerca delle delezioni del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854)), si deve considerare il fatto che questo identifica sia mutazioni bialleliche sia monoalleliche. L'evenienza di individuare un soggetto ipoacusico con mutazione eterozigote non è trascurabile: uno studio che si è proposto di determinare la prevalenza di mutazioni di GJB2 analizzando la sequenza codificante ed esone 1 non codificante del gene che codifica per Cx26, in una popolazione di 271 soggetti ipoacusici ha riscontrato che gli individui con deficit uditivo preverbale presentano una singola mutazione patogenetica di Cx26 in una percentuale variabile da 15 a 30% dei casi (Orzan et al, 2002).

Dall'associazione dell'esecuzione dello screening genetico a quello uditivo sulla popolazione neonatale, possiamo dunque trovarci di fronte a due situazioni non univocamente interpretabili:

se lo screening genetico riscontra una forma di eterozigosi e l'esito dello screening uditivo è PASS ci si deve chiedere se si tratta del caso di un neonato ipoacusico non identificato dal test delle emissioni otoacustiche evocate transienti o se invece il neonato esaminato sia portatore sano oppure normoudente alla nascita ma con possibilità di sviluppare ipoacusia nella prima infanzia in quanto affetto da una seconda mutazione patogenetica non nota. Per quanto riguarda la prima possibilità, l'evenienza che vi sia un soggetto con ipoacusia moderata, severa o profonda che risulti PASS allo screening è rara: l'esame delle emissioni otoacustiche evocate transienti, se eseguito correttamente, ha una sensibilità che può raggiungere il 100% (White et al, 1993); tuttavia un'indagine condotta a livello nazionale sulla modalità di attuazione del test valutati riporta che la sensibilità delle emissioni otoacustiche eseguite nei centri nascita italiani varia da 90 a 100% (Bubbico et al.,2003). E' invece dimostrato che i neonati con ipoacusia lieve e monolaterale possono risultare PASS al suddetto test (Ross et al, 2008). Se invece si considera la possibilità di identificare un portatore sano (carrier), si deve ricordare uno studio recente (Lucotte, 2007) atto a rilevare la prevalenza di carriers della mutazione 35delG (la più frequente nella popolazione caucasica) in alcune regioni del bacino del Mediterraneo: la prevalenza media viene stimata 1/49, quella specifica di alcune popolazioni quali quelle originarie di Napoli, Sardegna e Corsica raggiunge rispettivamente 1/25, 1/29, 1/30. Da ultimo si deve valutare la probabilità che il neonato sia normoudente alla nascita ma con possibilità di sviluppare ipoacusia nella prima infanzia in quanto affetto da una seconda mutazione patogenetica non nota. La letteratura (Orzan et al, 2007) riporta rari casi di ipoacusia ad esordio in epoca periverbale in soggetti con mutazione biallelica, si può ipotizzare che tale condizione sia estendibile ai soggetti eterozigoti affetti da una seconda mutazione patogenetica non nota.

Se invece il risultato dello screening uditivo fosse REFER ci si deve porre i seguenti interrogativi: il soggetto è normoacusico e il risultato è un falso positivo allo screening uditivo neonatale oppure siamo di fronte a un caso di deficit uditivo poiché il soggetto è affetto da una seconda mutazione patogenetica non nota oppure da una mutazione che abbia un effetto negativo dominante? Infine dobbiamo chiederci se ci possono essere altri fattori genetici, epigenetici o ambientali in grado di modulare o determinare il fenotipo (Orzan et al, 2002). Il fatto che lo screening uditivo dia un risultato falso positivo è sempre da considerare poiché se eseguito correttamente, la percentuale di soggetti positivi alla valutazione che si esegue presso il centro di accoglienza neonatale si aggira sul 4%, mentre la prevalenza di soggetti ipoacusici alla nascita è 0,1-0,3%. L'ipotesi che vi sia una seconda mutazione non nota è sostenuta dal fatto che la frequenza di portatori di mutazione GJB2 è più bassa nella popolazione generale rispetto a quella della popolazione di ipoacusici (Orzan et al, 2002; Del Castillo et al, 2005). Sulla scorta di tali dati, uno studio recente (Lipan et al, 2011) ha descritto i quadri clinici di soggetti affetti da DFNB1 SNHL. In una popolazione di 350 soggetti ipoacusici, l'incidenza di mutazioni bialleliche è 9,1% mentre gli eterozigoti risultano il 7,1%. Vi è differenza statisticamente significativa nell'entità della perdita: ipoacusia di entità severa-profonda è stata riscontrata nel 85% dei soggetti con mutazioni bialleliche e nel 38% degli eterozigoti mentre la progressività, la simmetria, la bilateralità risultano omogenee in entrambi i gruppi. Nella popolazione di eterozigoti il grado di perdita è variabile, lo studio, quindi, ipotizza che i soggetti con deficit profondo abbiano una seconda mutazione non nota mentre gli altri siano portatori sani, ipoacusici per altra causa. Infine se il risultato dello screening uditivo è REFER e il test genetico riscontra una forma di eterozigosi, si deve considerare se questa è tra le poche mutazioni individuate ad effetto negativo dominante (Ballana et al., Connexins and deafness Homepage, 2011).

Il test di screening

Il test di screening genetico di DFNB1 è un test semplice, sicuro, affidabile e validato da numerosi studi riportati in letteratura. E' facilmente accettabile da parte della popolazione in quanto si esegue sullo spot di sangue che viene usato per gli screenings metabolici (Guthrie card), non richiedendo ulteriori indagini invasive sul neonato. Qualora il risultato del test uditivo sia REFER e quello genetico individui mutazioni patogenetiche in omozigosi o eterozigosi composta, si è già in possesso della diagnosi e dell'eziologia e non si deve sottoporre il bambino a ulteriori valutazioni diagnostiche. Tale condizione offre numerosi vantaggi: riduce i costi sanitari, crea un legame di fiducia con la famiglia che viene a conoscere la causa della condizione del figlio rapidamente, evitando di sottoporlo a numerose indagini. Per quanto concerne il caso in cui lo screening genetico individui una eterozigosi si è già discusso nel paragrafo precedente. Nel counseling alla famiglia bisogna comunque considerare la variabilità fenotipica dell'ipoacusia da mutazioni a carico di DFNB1:

inizialmente si pensava che il fenotipo degli individui affetti da mutazioni a carico di GJB2 corrispondesse a una forma di ipoacusia di entità profonda o moderata, congenita e non progressiva né fluttuante (Cohn et al, 1999). Con l'introduzione del test in ambito clinico, l'analisi audiologica dei soggetti portatori di mutazioni a carico di GJB2 si è evidenziata una diversificazione nella gravità del danno uditivo, che può variare da lieve a profondo, e nell'epoca di insorgenza (Kelley et al., 1999; Murgia et al., 1999; Orzan et al., 2002; Cryns et al., 2004; Snoeckx et al, 2005; Hilgert et al, 2009).

Non vi è ancora un accordo unanime, invece, per quanto riguarda quali mutazioni ricercare e come interpretare i risultati dello screening genetico. Vi sono due modalità di esecuzione del test per valutare mutazioni a carico di GJB2/GJB6: il sequenziamento di entrambi gli esoni di GJB2 e la ricerca delle delezioni del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854) (sequenziamento completo) o il test sulle mutazioni più frequenti. Diversi studi hanno valutato la frequenza delle mutazioni di GJB2 in diverse etnie (Orzan et al, 2002; Snoeckx et al, 2005; Hilgert et al, 2009): 35delG rappresenta il 70% delle mutazioni di GJB2 nella popolazione caucasica, 167delT e 235delC sono le più frequenti rispettivamente nei discendenti degli ebrei askenazi e nella popolazione giapponese. In particolare, uno studio italiano effettuato su 271 soggetti originari delle regioni settentrionali, ha individuato circa 20 mutazioni predominanti in questa popolazione (Orzan et al, 2002). La letteratura riporta alcuni lavori in merito allo screening genetico volto a identificare solo alcune mutazioni ritenute più frequenti nella popolazione in oggetto, tra i più significativi vi è una relazione sintetica che dimostra l'attuabilità di quest'ultimo sulla popolazione neonatale multietnica dello stato di New York, USA (Fitzgerald et al, 2004) e uno studio preliminare sui neonati di un centro nascita di III livello a Taipei, Taiwan (Wu et al, 2011). Nell'ipotesi che si restringa il campo di ricerca a 35delG, la mutazione largamente predominante nella popolazione mediterranea (Lucotte, 2007), si rischia di non identificare i neonati con ipoacusia dovuta ad altre mutazioni a carico di DFNB1. Un recente studio atto a descrivere le mutazioni di GJB2 e GJB6 su un'ampia popolazione affetta da deficit uditivo, prevalentemente originaria dal Nord Est d'Italia (Cama et al 2009), ha rilevato che circa il 67% dei casi di deficit uditivo dovuto a mutazione biallelica era omozigote 35delG. Si può quindi ipotizzare che lo screening genetico che ricerchi solo la suddetta mutazione, non identifichi una percentuale di soggetti ipoacusici per altre mutazioni di DFNB1 pari al 33%. D'altro canto il sequenziamento completo risulta più costoso e di difficile interpretazione nel caso vengano individuati nuovi polimorfismi.

Efficacia del trattamento

In merito all'efficacia del trattamento precoce rispetto a quello tardivo e alle opzioni terapeutiche che vengono prospettate ai soggetti con ipoacusia si è discusso nei capitoli precedenti. I risultati dell'applicazione dell'impianto cocleare nei bambini con deficit uditivo profondo da mutazione di GJB2 è ben documentato in letteratura (Culle et al 2004; Green et

al, 2002; Fukushima, 2002), così come l'importanza della precocità dell'inserimento dell'impianto cocleare (Connell et al, 2007; Sharma et al, 2002) se ne deduce che lo screening genetico permetterebbe di individuare i soggetti che trarrebbero il massimo beneficio dall'applicazione precoce dell'impianto cocleare.

Outcome e sostenibilità

L'associazione dello screening genetico neonatale a quello uditivo consente di identificare i casi che sfuggono a quest'ultimo e le forme di ipoacusia non presenti alla nascita ma con esordio tardivo. Per quanto riguarda il primo aspetto, un recente studio caso-controllo ha analizzato la prevalenza delle mutazioni 35delG, 235delC e V37I, 167delT, più comuni rispettivamente nelle popolazioni europea (Snoeckx et al, 2005), asiatica (Abe et al, 2000; Yan et al, 2003) e nei discendenti degli ebrei askenazi (Morrell et al, 1998); sul sangue delle Guthrie cards di 2354 neonati risultati REFER e PASS allo screening: la possibilità di avere una forma di ipoacusia causata dalle mutazioni suddette è bassa nella popolazione PASS analizzata (solo uno spot su 1177 è risultato positivo) (Schimmenti et al, 2011). Da tale lavoro emerge che allo screening uditivo neonatale universale eseguito correttamente e secondo i protocolli internazionali sfugge una minima percentuale di soggetti ipoacusici.

Si deve invece considerare che ci possono essere delle forme di ipoacusia dovuta a mutazioni di GJB2 che non vengono identificate dallo screening uditivo neonatale poiché risultati PASS alla nascita. Sulla base di osservazione di casi clinici, numerosi lavori (Orzan et al, 2007; Green et al, 2000; Salvador et al, 2000), hanno sostenuto l'ipotesi che il deficit uditivo dovuto a mutazioni di GJB2 non sia congenito: in alcuni soggetti, nei primi mesi di vita, la capacità uditiva può essere normale o solo lievemente alterata e successivamente, nell'epoca preverbale, può insorgere il danno uditivo.

Ad avvalorare queste considerazioni vi è un recente studio retrospettivo atto a rilevare la penetranza dell'ipoacusia da mutazioni a carico di GJB2: sono stati descritti i casi di 9 individui che hanno passato lo screening uditivo neonatale e successivamente hanno sviluppato un deficit uditivo a un'età compresa tra 12 e 60 mesi, tutti presentavano due mutazioni patogenetiche di GJB2; la frequenza della non-penetranza alla nascita è stata stimata circa il 3,8% (Norris et al, 2006). In tutti i casi suddetti, lo screening genetico permetterebbe di individuare i soggetti affetti da mutazioni di DFNB1 che non presentano ipoacusia alla nascita ma che possono svilupparla nella prima infanzia.

La tabella sottostante riassume schematicamente i pro e i contro dell'associazione dello screening genetico neonatale a quello uditivo in base ai risultati ottenuti.

Esito screening audiologico	Esito screening genetico DFNB1	Interpretazione	Risultati ottenuti	Questioni sollevate
REFER	Omozigosi/ eterozigosi composta	Soggetto ipoacusico	Conoscenza eziologia, possibilità di valutazione del rischio di ricorrenza	Il counseling deve considerare la variabilità fenotipica
REFER	Eterozigosi	Soggetto ipoacusico o falso positivo	Necessità di eseguire approfondimenti audiologici, qualora la capacità uditiva risultasse normale, follow up	Difficoltà nel counseling dovute all'interpretazione del risultato e le parziali conoscenze sulla capacità uditiva degli eterozigoti
PASS	Omozigosi/ eterozigosi composta	Soggetto con ipoacusia non congenita o falso negativo	Necessità di eseguire approfondimenti audiologici, qualora la capacità uditiva risultasse normale, follow up	Difficoltà nel counseling dovute alle parziali conoscenze su insorgenza e gravità dell'ipoacusia
PASS	Eterozigosi	Soggetto portatore sano o ipoacusico a insorgenza tardiva o a insorgenza precoce con falso negativo	Necessità di eseguire approfondimenti audiologici, qualora la capacità uditiva risultasse normale, follow up	Difficoltà nel counseling dovute alle parziali conoscenze sulla capacità uditiva degli eterozigoti
PASS	negativo	Soggetto normoacusico	Sorveglianza dello sviluppo di linguaggio capacità uditiva ai bilanci di salute.	

TABELLA 4: INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI OTTENUTI E QUESTIONI SOLLEVATE

Il test genetico può quindi essere uno strumento efficace, in grado di aumentare la sensibilità dello screening uditivo neonatale e di completarlo nell'aspetto eziopatogenetico se organizzato in protocolli definiti e dettagliati. Permangono tuttavia molte questioni irrisolte in ambito clinico, epidemiologico, etico ed economico.

2. SCOPO DELLA TESI

In Italia, il Ministero della Salute ha pubblicato nel 2007 un piano di azioni per la promozione e la tutela della salute delle donne e dei bambini nel quale afferma che lo screening audiologico neonatale per l'identificazione precoce delle ipoacusie congenite è in corso di acquisizione nel DPCM (Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri) sui Livelli Essenziali di Assistenza. Tale documento riconosce nelle emissioni otoacustiche transienti (TEOAE) e nei potenziali evocati uditivi automatici del tronco (AABR) gli strumenti per eseguire lo screening. E' quindi prevedibile che anche in Italia lo screening uditivo universale, eseguito con una metodica oggettiva, divenga presto considerato come uno strumento importante, efficace e prossimo a diventare una procedura standard nella gestione del neonato con l'obiettivo di una diagnosi precoce e un'impostazione terapeutica adeguata.

Nel Veneto si stima nascano, ogni anno, circa 40-60 bambini con una perdita uditiva permanente. In termini epidemiologici questo può apparire un numero relativamente piccolo ma le implicazioni degli esiti di un deficit uditivo permanente non identificato e non trattato sono molto importanti per i bambini e le loro famiglie e hanno costi e conseguenze importanti nel tempo in ambito sanitario, riabilitativo e scolastico.

Lo scopo di questa tesi è di valutare le modalità di esecuzione dello screening uditivo neonatale presso 5 centri nascita della regione Veneto, di descrivere i casi di ipoacusia individuati, gli accertamenti diagnostici eseguiti al fine di conoscere l'eziologia delle forme identificate. Si è cercato inoltre, indagando la presenza di mutazioni a carico di DFNB1 nei pazienti identificati, di capire il suo ruolo nell'eziopatogenesi delle forme di ipoacusia neurosensoriale e di discutere l'appropriatezza dello screening genetico nei neonati.

3. MATERIALI E METODI

Sono state valutate le modalità di esecuzione dello screening neonatale presso 5 centri nascita della regione Veneto mediante un questionario volto descrivere la tipologia di centro nascita e le modalità di esecuzione dello screening. Sono stati coinvolti i centri nascita di Padova, Thiene (VI), Castelfranco Veneto (TV), Abano terme (PD) e Monselice (PD). La scelta è stata fatta considerando la diversa natalità e il fatto che alcuni centri avessero adottato lo screening da diversi anni mentre altri lo avessero attuato recentemente. Lo studio ha previsto l'analisi dei dati riguardanti la copertura dello screening, la descrizione dei diversi protocolli svolti, la valutazione del numero di pazienti che esegue a Padova il test ABR per l'identificazione della soglia e di coloro che successivamente necessitano di una valutazione audiologica, dell'entità dei bambini che non si presentano a queste ultime due indagini, dei casi di ipoacusia identificati. Di questi ultimi si è indagata la causa.

Il programma di screening è articolato in primo, secondo e terzo livello: il primo prevede le valutazioni eseguite nel centro di accoglienza neonatale e l'eventuale ripetizione entro un mese di vita, il secondo l'esecuzione dei potenziali evocati uditivi per ricerca soglia da parte di tecnici audiometristi, il terzo la valutazione audiologica. Lo schema sottostante sintetizza i passaggi suddetti:

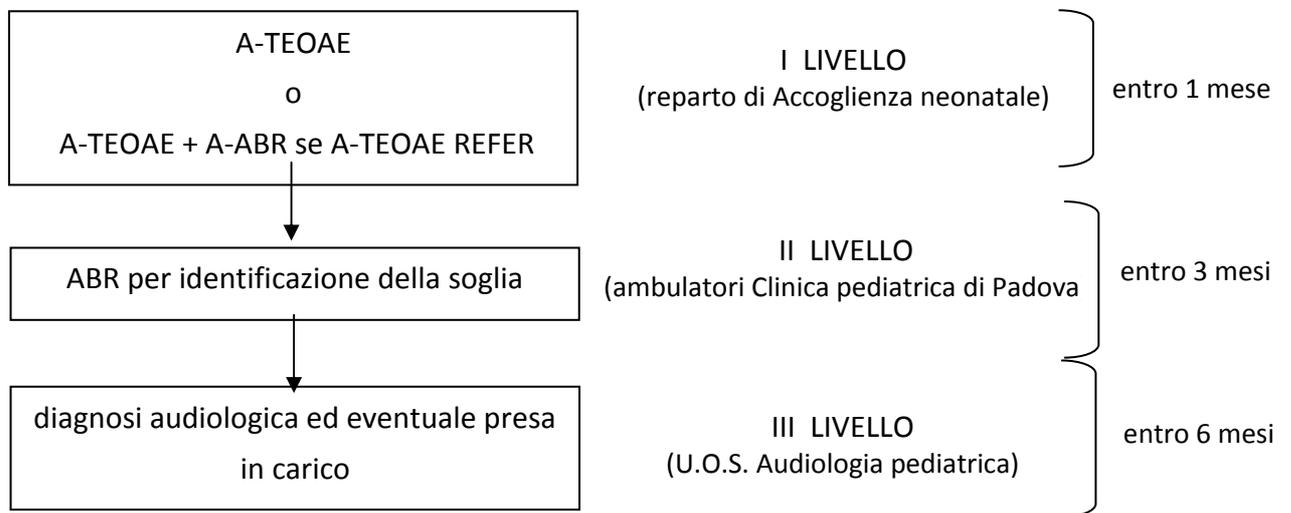


FIGURA 9: ORGANIZZAZIONE DELLO SCREENING UDITIVO NEONATALE

I protocolli scelti hanno le seguenti caratteristiche e modalità di esecuzione:

Padova:

Nel centro nascita a maggior natalità, si prevede l'esecuzione della sola metodica A-TEOAE dopo le prime 24 ore di vita del neonato. In caso di risultato dubbio, il test viene ripetuto fino ad un massimo di 2 volte, prima della dimissione. Le A-TEOAE sono eseguite dal personale paramedico in turnazione che lavora nel centro di accoglienza neonatale. Coloro che risultano REFER anche al secondo tentativo, vengono segnalati al tecnico di audiometria operante presso il servizio di Audiologia Pediatrica del medesimo ospedale che esegue, entro 1 mese dalla nascita gli A-ABR, in modo da concludere il I livello. Il secondo livello prevede l'esecuzione di ABR per identificazione della soglia. Nel caso in cui il neonato risulti PASS allo screening, ma presenti uno o più fattori di rischio audiologici (Joint Committee on Infant Hearing, 2007), il personale infermieristico segnala il caso al tecnico audiometrista che fissa un appuntamento per eseguire A-TEOAE e A-ABR entro 6 mesi di vita e successivamente organizza e consiglia il follow up audiologico alla famiglia.

Thiene:

Il protocollo prevede l'esecuzione di A-TOAE in prima istanza, con un massimo 2 ripetizioni nel caso di risultato positivo. Le A-TEOAE sono eseguite da tutto il personale paramedico in turnazione che lavora nel centro di accoglienza neonatale. In caso di risultato REFER, il neonato verrà sottoposto a A-ABR da parte di un'unica puericultrice, a distanza di qualche settimana. In caso di fallimento dell'A-ABR, il bambino viene inviato presso il centro di Padova. I neonati che presentano uno o più fattori di rischio audiologici (Joint Committee on Infant Hearing, 2007), vengono segnalati al tecnico audiometrista che fissa un appuntamento per eseguire A-TEOAE e A-ABR a 6 mesi di vita e successivamente organizza e consiglia il follow up audiologico alla famiglia.

Castelfranco Veneto:

Anche in questo caso, il protocollo prevede l'esecuzione di A-TOAE in prima istanza, con un massimo 2 ripetizioni nel caso di risultato positivo. Le A-TEOAE sono eseguite da tutto il personale paramedico in turnazione che lavora nel centro di accoglienza neonatale. In caso di risultato REFER, il neonato viene sottoposto ad A-ABR. Per completare il II livello, il paziente viene inviato presso il centro di Padova nel caso anche tale test dia risultato dubbio. Tale centro considera l'eventuale presenza di fattori di rischio audiologici (Joint Committee on Infant Hearing, 2007) e programma il follow up audiologico di conseguenza.

Abano Terme e Monselice:

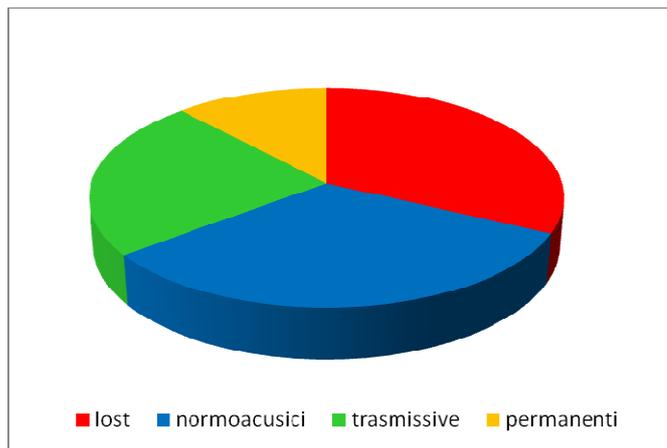
In entrambi i centri nascita, si prevede l'esecuzione della sola metodica A-TEOAE dopo le prime 24 ore di vita del neonato. In caso di risultato dubbio, il test viene ripetuto fino ad un massimo di 2 volte, prima della dimissione. Le A-TEOAE sono eseguite da tutto il personale paramedico in turnazione che lavora nel centro di accoglienza neonatale. Coloro che risultano REFER anche al secondo test, vengono richiamati a eseguirlo a circa 15 giorni di vita, nel caso in cui il risultato sia ancora dubbio, viene contattato il tecnico di audiometria del centro di Padova che eseguirà gli A-ABR per concludere il I livello ed eventualmente passare al II. Presso il centro di Abano, la ripetizione delle A-TEOAE a 15 giorni di vita viene eseguita da personale dedicato. La valutazione dei fattori di rischio audiologici (Joint Committee on Infant Hearing, 2007) è competenza del pediatra che reputa necessario o meno organizzare il follow up audiologico.

Tutti i centri nascita forniscono ai genitori le informazioni riguardo lo screening, il centro di Monselice consegna alla famiglia un documento esplicativo solo in caso di risultato dubbio al test A-TEOAE. Alcuni centri nascita sono dotati di opuscoli informativi in diverse lingue.

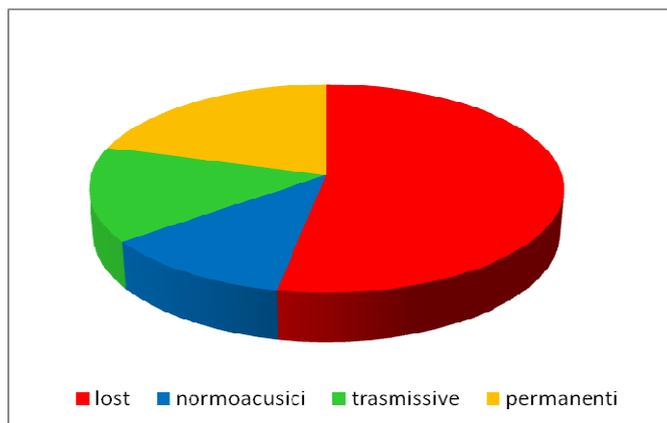
4. RISULTATI

In tutti cinque i punti nascita la copertura raggiunge il 98-100%, risultando dunque entro le raccomandazioni internazionali (Joint Committee on Infant Hearing, 2007). Confrontando il numero di pazienti che vengono sottoposti a potenziali evocati uditivi per ricerca soglia e che successivamente si sottopongono a valutazione audiologica e valutando quanti di questi sia "lost to follow up" ossia non si presenti a una o entrambe le indagini, si nota che presso il centro di Padova, la percentuale è costante nei primi due anni (circa 35%) mentre diminuisce nell'ultimo anno (23%). Per quanto riguarda i pazienti inviati dal centro nascita di Thiene, la percentuale di lost to follow up risulta diminuire nel corso degli anni: 64% nel 2008, 50% nel 2009, 20% nel 2010. Possiamo attribuire tale cambiamento al miglioramento nel corso degli anni, della rete informativa tra il personale dei centri Thiene e Padova. Per il centro di Castelfranco Veneto, invece, coloro che non si presentano al secondo e terzo livello sono il 60% nel 2008, il 30% nel 2009, il 55% nel 2010. Possiamo spiegare tali dati ipotizzando che i pazienti che non si sono presentati presso il servizio di Audiologia pediatrica di Padova, si siano rivolti a un centro di III livello più vicino.

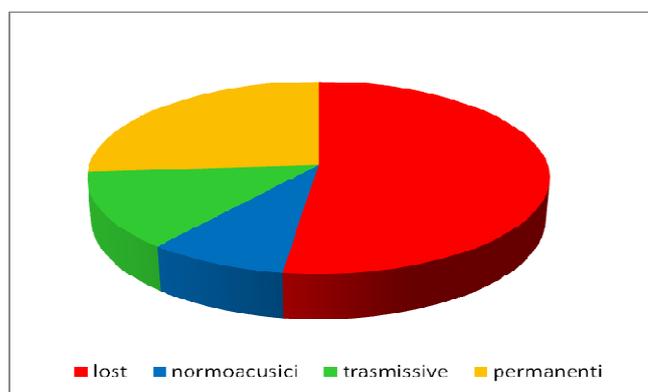
Il numero di casi identificati per ogni centro rientra nella prevalenza di ipoacusia descritta nella popolazione neonatale; tuttavia, si deve considerare che la percentuale di lost to follow up incide in maniera significativa su tale risultato. Gli areogrammi sottostanti dimostrano l'entità della mancanza di aderenza al programma e i risultati principali della valutazione al III livello eseguita presso il servizio di Audiologia pediatrica di Padova. Vi è una visibile differenza tra la percentuale di soggetti "lost to follow up" che provengono dai centri nascita di Thiene e Castelfranco Veneto rispetto ai neonati della Clinica Pediatrica di Padova. Tale discrepanza si può spiegare con la distanza che separa i primi due ospedali (I livello) con il centro di II e III livello di Padova.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 10: GLI AREOGRAMMI DIMOSTRANO LA MANCANZA DI ADERENZA AL PROGRAMMA E I PRINCIPALI RISULTATI OTTENUTI ALLA VALUTAZIONE AUDIOLOGICA DEI NEONATI PROVENIENTI DAI CENTRI DI ACCOGLIENZA NEONATALE DI PADOVA (A), THIENE (B), CASTELFRANCO VENETO (C)

Per quanto riguarda la realtà del centro di Padova, la tabella 4 i risultati ottenuti: Nei 4 casi di ipoacusia permanente identificati nel 2008, due pazienti presentavano quadri sindromici. Il primo è stato ricoverato in terapia intensiva e sottoposto a due interventi cardiocirurgici, i potenziali evocati uditivi per ricerca soglia hanno dimostrato ipoacusia profonda, il bambino

non ha eseguito valutazione audiologica presso la clinica di Padova perché è stato trasferito in un altro centro. Il secondo è risultato affetto da malattia perossisomiale, ABR e valutazione audiologica successiva hanno diagnosticato ipoacusia neurosensoriale moderata-severa, il paziente è deceduto ad 1 anno di vita. Gli altri due casi sono rappresentati da una forma di ipoacusia lieve monolaterale e una moderata bilaterale che è risultata stabile nel tempo, in entrambi non è stato ritenuto utile eseguire il test della Connessione. Nessun bambino affetto da ipoacusia presentava fattori di rischio audiologico.

Nel 2009 i casi di ipoacusia riscontrati sono stati 5. Si deve considerare due casi di bambini che hanno ABR patologico e che non si sono presentati alla valutazione audiologica. Come già considerato, tale situazione ha un certo peso nella valutazione dell'efficacia dello screening. Un lattante è risultato affetto da ipoacusia neurosensoriale profonda bilaterale, i test genetici volti a individuare mutazioni mitocondriali e a carico di GJB2 e GJB6 e gli altri accertamenti sono risultati negativi. Attualmente il bambino porta impianto cocleare bilaterale con buoni risultati per quanto riguarda la comprensione del parlato e lo sviluppo del linguaggio. Altri due pazienti sono risultati affetti da ipoacusia neurosensoriale di entità moderata-severa bilateralmente, uno è risultato negativo al test genetico, mentre l'altro è positivo per mutazione [35delG]+[W24X]. In quest'ultimo caso, pur trattandosi di una mutazione inattivante, il grado della perdita uditiva non è profondo e la soglia è risultata stabile nel tempo. Gli altri due casi sono rappresentati da un lattante con ipoacusia neurosensoriale bilaterale di entità moderata che è risultato negativo ai test genetici e un altro che presenta anacusia sinistra, non è stato ritenuto opportuno eseguire test genetici. Solo un paziente ipoacusico presentava fattori di rischio audiologico.

Nel 2010 sono stati identificati due casi: uno è affetto atresia auris monolaterale e quindi presenta ipoacusia trasmissiva di entità moderata, l'altro da anacusia destra dovuta a infezione congenita da CMV. In quest'ultimo caso la soglia a sinistra risulta stabile ai controlli, non è stato eseguito il test genetico. Il centro nascita ha segnalato 10 casi di neonati con fattori di rischio audiologico, entrambi i lattanti ipoacusici ne presentavano uno. La segnalazione dei neonati con fattori di rischio è diventata più accurata ed efficiente nel corso degli anni.

	2008	2009	2010
Nati	4020	4028	4015
REFER II livello	37 (0,9%)	29 (0,7%)	26(0,6%)
Lost to follow up	14	10	11
Diagnosi ¹	4	5	2
Fattori di rischio ²	0	1	2
Esecuzione indagine genetica	0	4	0
Risultato positivo		1: [35delG][W24X]	

TABELLA 5A: PRINCIPALI RISULTATI DELLO SCREENING E DELLA VALUTAZIONE AUDIOLOGICA DELLA POPOLAZIONE PROVENIENTE DAL CENTRO NASCITA DI PADOVA

1. *DIAGNOSI DI IPOACUSIA NEUROSENSORIALE O TRASMISSIVA PERMANENTE*

2. *FATTORI DI RISCHIO SEGNALATI DA JCIH 2007, PRESENTI NEI CASI DI IPOACUSIA IDENTIFICATI*

Tra i pazienti inviati dal centro di Thiene, nel 2008 è stata diagnosticata un'anacusia destra, la soglia di sinistra è risultata stabile nel tempo, non sono state eseguite ulteriori indagini. Nel 2009, sono stati identificati 4 casi di deficit uditivo. In due casi si trattava di ipoacusia profonda bilaterale: un bambino affetto da malattia mitocondriale che è deceduto a 1 anno di vita, l'altro sano, con test genetico e indagini radiologiche e infettivologiche negative. Una lattante con ipoacusia moderata bilaterale presentava invece mutazioni a carico di GJB2: [35delG]+[L90P], mutazione non inattivante. L'ultimo caso è una forma di ipoacusia moderata monolaterale che non è progredita nel tempo, non sono state eseguite indagini eziopatogenetiche. Nell'ultimo anno sono state diagnosticate due forme di ipoacusia: una moderata trasmissiva, dovuta ad atresia auris destra, l'altra profonda, neurosensoriale, dovuta a infezione congenita da CMV. In quest'ultimo caso è stato eseguito test genetico su Connessina 26 e 30 che è risultato negativo.

	2008	2009	2010
Nati	2286	2189	2087
REFER II livello	14 (0,6%)	12 (0,5%)	9 (0,4%)
Lost to follow up	10	6	2
Diagnosi ¹	1	4	2
Fattori di rischio ²	0	0	2
Esecuzione indagine genetica	0	3	1
Risultato positivo		1: [35delG][L90P]	0

TABELLA 5B: PRINCIPALI RISULTATI DELLO SCREENING E DELLA VALUTAZIONE AUDIOLOGICA DELLA POPOLAZIONE PROVENIENTE DAL CENTRO NASCITA DI THIENE

1. *DIAGNOSI DI IPOACUSIA NEUROSENSORIALE O TRASMISSIVA PERMANENTE*
2. *FATTORI DI RISCHIO SEGNALATI DA JCIH 2007, PRESENTI NEI CASI DI IPOACUSIA IDENTIFICATI*

Per quanto riguarda la realtà di Castelfranco Veneto, nel 2008 sono stati identificati 2 casi di ipoacusia permanente: un bambino presenta deficit moderato e l'indagine genetica è negativa mentre nel secondo caso, anacusia destra, questa non è stata eseguita. Entrambi i pazienti vengono seguiti nel centro di Padova, il loro quadro è stabile. Nel 2009 sono stati identificati due casi di perdita uditiva bilaterale: uno lieve e uno moderato, quest'ultimo è risultato negativo al test genetico. Nel 2010 è stata posta diagnosi di ipoacusia bilaterale moderata in un lattante che ha presentato successivamente mutazione inattivante [35delG][35delG], i controlli audiometrici eseguiti fino ad oggi hanno rilevato che il quadro è stabile. L'altro caso identificato è un'anacusia sinistra.

	2008	2009	2010
Nati	1010	1097	1152
REFER II livello	8 (0,8%)	6 (0,5%)	9 (0,8%)
Lost to follow up	5	2	5
Diagnosi ¹	2	2	2
Fattori di rischio ²	0	0	1
Esecuzione indagine genetica	1	1	1
Risultato positivo	0	0	1: [35delG][35delG]

TABELLA 5C: PRINCIPALI RISULTATI DELLO SCREENING E DELLA VALUTAZIONE AUDIOLOGICA DELLA POPOLAZIONE PROVENIENTE DAL CENTRO NASCITA DI PADOVA

- 1. DIAGNOSI DI IPOACUSIA NEUROSENSORIALE O TRASMISSIVA PERMANENTE*
- 2. FATTORI DI RISCHIO SEGNALATI DA JC1H 2007, PRESENTI NEI CASI DI IPOACUSIA IDENTIFICATI*

Per quanto riguarda il centro nascita di Abano Terme, negli anni 2008, 2009 e 2010, sono stati identificati 3 casi di ipoacusia neurosensoriale profonda: una neonata con sofferenza ipossico-ischemica perinatale, una bambina figlia di genitori sordi, una senza alcun fattore di rischio. In entrambi i casi i genitori non hanno ritenuto opportuno sottoporre le figlie a indagine genetica.

Tra i neonati inviati dall'Ospedale di Monselice sono stati identificati due casi: una forma ipoacusia moderata dovuta a mutazione di DFNB1 ([35delG]+[269T>C]) e una forma lieve che attualmente è in corso di accertamenti.

5. DISCUSSIONE

Modalità di esecuzione dello screening

L'analisi della modalità di screening uditivo neonatale rivela che tutti i centri nascita garantiscono una copertura ottimale e seguono protocolli concordi con le raccomandazioni internazionali (JCIH, 2007).

La segnalazione dei soggetti con fattori di rischio audiologico (JCIH, 2007) è migliorata nel corso degli anni in studio grazie ai corsi di formazione tenuti presso la clinica pediatrica e alla sensibilizzazione del personale che esegue e coordina lo screening nei punti nascita considerati. Solo una minoranza di pazienti con ipoacusia neurosensoriale o trasmissiva permanente presenta fattori di rischio. Tale dato ribadisce la fondamentale importanza dello screening universale.

La percentuale di pazienti lost to follow up risulta elevata ma è paragonabile a quella rilevata dalle recenti revisioni sulla realtà dello screening uditivo neonatale negli Stati Uniti d'America (USA) (Choo et al, 2010; Shulman et al, 2010). Un'attenta valutazione sulle modalità di esecuzione dello screening uditivo neonatale negli USA (Shulman et al, 2010) rileva che i motivi che spiegano l'alta percentuale di lost to follow up sono da rintracciare in quattro ambiti principali: il servizio che eroga la prestazione, il personale che la esegue, l'utente nella figura delle famiglie dei bambini ipoacusici e l'informazione fornita in merito al risultato dello screening e alle possibilità terapeutiche.

Per quanto concerne il primo ambito, la carenza di strumentazione adeguata, l'esigua disponibilità di personale assunto e il parallelo aumento del numero di pazienti che viene identificato grazie all'introduzione dello screening, la mancanza di programmi per sostenere le famiglie dei bambini ipoacusici da parte dello Stato sono problematiche che spesso impediscono allo screening di essere efficace.

L'altro campo in cui è necessario operare è la formazione del personale: lo screening e il successivo iter del bambino non sempre seguono protocolli definiti e concordati, in alcuni centri la casistica è molto bassa e quindi non è possibile maturare l'esperienza necessaria per seguire adeguatamente i pazienti, talvolta i pediatri non prestano la dovuta attenzione ai risultati dello screening perché ne sottovalutano le conseguenze e/o perché la comunicazione del centro che esegue lo screening non è esaustiva, spesso gli stessi pediatri e audiologi non conoscono a sufficienza i centri che eseguono interventi precoci. E' stato rilevato da circa la metà dei programmi di screening americani che alcuni pediatri hanno un atteggiamento definito "wait and see" cioè di attesa nei confronti dei neonati che non passano lo screening: questo rappresenta il maggior ostacolo alla realizzazione di un corretto follow up.

L'analisi, effettuata sul territorio americano, in merito all'accessibilità al servizio da parte del paziente rileva che le famiglie dei bambini ipoacusici hanno difficoltà nel trasporto sia per le distanze da percorrere sia per il complesso sistema di assicurazione sanitaria americano; in alcuni casi si tratta di pazienti stranieri e quindi anche la lingua può rappresentare un ostacolo. Ultimo ma non per questo meno importante è l'aspetto della comunicazione tra il servizio che eroga lo screening e i pediatri che seguiranno il paziente: la mancanza di un sistema informatizzato unico e le leggi sulla privacy attuate da alcuni stati americani impediscono il dialogo fondamentale perché il bambino e la sua famiglia si sentano seguiti nell'iter diagnostico terapeutico.

Nella realtà valutata in questo studio, si può affermare che tutti i centri sono dotati di strumentazione adeguata ma il personale che lavora negli ospedali con maggior natalità presenta difficoltà nel gestire un numero così elevato di neonati.

Per quanto riguarda la formazione del personale si sono tenuti dei corsi per illustrare le linee guida internazionali e per sottolineare l'importanza di protocolli definiti e concordati; sulla base delle evidenze scientifiche trasmesse, ogni centro nascita ha elaborato un documento applicabile alle caratteristiche dell'ospedale che eroga il servizio. Considerando la comunicazione tra ospedale e pediatra di famiglia si può affermare che questa risulta un punto critico in quanto, alla dimissione dal centro di accoglienza neonatale, il paziente nella maggior parte dei casi non ha ancora scelto un pediatra di base. Risulta quindi di fondamentale importanza il documento di dimissione dal centro nascita contenente il risultato dello screening e la data dell'appuntamento successivo, in occasione del bilancio di salute, il pediatra curante può quindi sollecitare la famiglia a seguire il percorso indicato. Dal presente studio emerge l'importanza di un programma di sorveglianza; come già menzionato, molte forme di ipoacusia sono caratterizzate da insorgenza tardiva, risulta quindi fondamentale la comunicazione tra pediatra neonatologo, audiologo e pediatra di base in merito a coloro che sono risultati PASS allo screening e che presentano ipoacusia nella prima o seconda infanzia.

Anche nella realtà analizzata in questa tesi, la lontananza tra i centri che eseguono il I livello e il II livello e le barriere culturali spiegano l'alta percentuale di lost to follow up. Lo stato italiano garantisce la valutazione di secondo livello a un costo accessibile ma non è previsto un rimborso per le spese di viaggio. Le famiglie immigrate non sempre hanno disponibilità a spostarsi e in alcuni casi il fatto di non parlare l'italiano ha rappresentato un ostacolo alla comprensione dell'esito dello screening e dell'importanza del follow up.

Fino al 2010, la modalità di comunicazione con servizio di Audiologia di Padova e' stata molto eterogenea: in alcuni casi il pediatra responsabile dello screening contattava telefonicamente o mediante posta elettronica l'audiometrista mentre in altri casi i genitori del paziente chiamavano gli ambulatori di Padova per fissare un appuntamento. E' quindi necessaria una rete informatizzata unica che permetta una comunicazione univoca tra

centro nascita e centro di audiologia di Padova. La legge italiana per la tutela della privacy, a differenza della realtà degli USA, non è un ostacolo in quanto permette lo scambio di informazione tra personale medico e paramedico in merito ai pazienti valutati.

Casistica

Il numero di casi identificati per ogni centro rientra nella prevalenza di ipoacusia descritta nella popolazione neonatale generale europea (Fortnum et al, 1997) e italiana (De Capua et al, 2007; Bubbico et al, 2007). Anche le caratteristiche della perdita uditiva in termini di entità del deficit e bilateralità, illustrati nell'areogramma sottostante (figura 11), sono concordi con quanto riportato in letteratura (Fortnum et al, 1997).

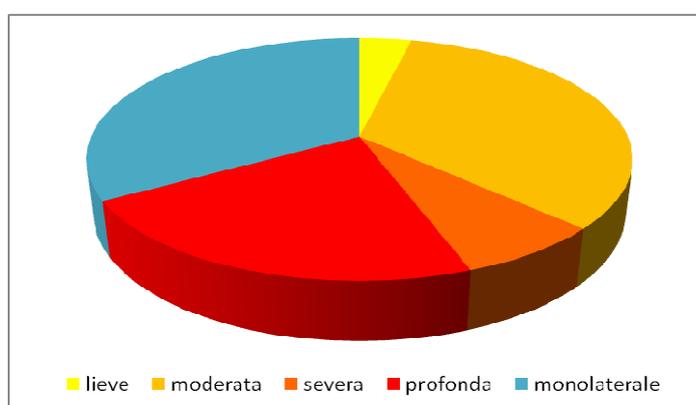


FIGURA 11: L'AREOGRAMMA ILLUSTRRA I RISULTATI DELLA VALUTAZIONE AUDIOLOGICA DEI NEONATI PROVENIENTI DAI CENTRI NASCITA DI PADOVA, THIENE, CASTELFRANCO VENETO, MONSELICE E ABANO TERME, ESEGUITA PRESSO IL SERVIZIO DI AUDIOLOGIA PEDIATRICA DI PADOVA.

Circa la metà dei soggetti con deficit uditivo si è sottoposto al test genetico per la valutazione di mutazioni a carico di DFNB1. Considerando i soggetti positivi, possiamo affermare che, come riportato in letteratura (Kelley et al., 1999; Murgia et al., 1999; Orzan et al., 2002; Cryns et al., 2004; Snoeckx et al., 2005; Hilgert et al., 2009), vi è variabilità fenotipica per quanto concerne l'entità della perdita mentre non vi sono differenze nella simmetria, nel profilo audiometrico e nella progressione. Sia i pazienti con mutazioni non inattivante che quelli con mutazioni inattivanti presentano ipoacusia moderata. Per quanto riguarda i pazienti che hanno proseguito le cure presso il centro di Padova, possiamo affermare che tale quadro si è mantenuto stabile fino ai controlli più recenti. Poichè solo la metà dei soggetti ipoacusici ha eseguito indagine genetica non è possibile discutere l'epidemiologia dell'ipoacusia da mutazione di DFNB1.

paziente	genotipo	categoria di mutazione	Entità di ipoacusia a 6 mesi	progressione
Z.G.	35delG/35delG	T/T	moderata	Lost to follow up
J.A.	35delG/L90P	T/NT	moderata	stabile
M.G.	35delG/L90P	T/NT	moderata	stabile
B.L.G.	35delG/W24X	T/T	moderata	stabile

TABELLA 6: ENTITÀ E DECORSO DEI CASI DI DFNB1 SNHL IDENTIFICATI

I pazienti con ipoacusia moderata bilaterale o monolaterale, infezione congenita da CMV, atresia auris seguiti dal servizio di Audiologia pediatrica di Padova non si sono sottoposti a valutazione genetica. Nella maggior parte dei casi, i genitori hanno accolto con diffidenza la proposta di eseguire un ulteriore prelievo al proprio figlio avendo già affrontato accertamenti infettivologici e neuroradiologici. Vi è invece ampio consenso in letteratura sull'importanza del test genetico per cercare mutazioni di DFNB1 nei pazienti con ipoacusia moderata (Orzan et al, 2007; Hilgert et al, 2009), così come in coloro che presentano deficit uditivo e infezione congenita da CMV. Uno studio recente (Ross et al, 2007), ha eseguito il test genetico di DFNB1 su un'ampia popolazione americana di origine africana affetta da infezione congenita da CMV: le mutazioni di GJB2 risultano più frequenti nei soggetti ipoacusici rispetto ai normoudenti con differenza statisticamente significativa. Poiché attualmente la patogenesi della perdita uditiva nei soggetti affetti da infezione congenita da CMV rimane spiegata solo in parte e data la frequenza delle mutazioni a carico di DFNB1 nella popolazione italiana e nell'area mediterranea già menzionata nei capitoli precedenti, risulta importante indagare le cause genetiche nei casi di ipoacusia attribuita al Cytomegalovirus.

Lo screening genetico

Ferme restando le considerazioni sull'appropriatezza dello screening genetico esposte nel relativo capitolo, la sua attuazione nella realtà analizzata, potrebbe risolvere alcuni punti critici dell'iter diagnostico terapeutico del bambino ipoacusico. Tra questi vi è la suddetta diffidenza dei genitori all'esecuzione di un prelievo ematico per eseguire il test genetico quando l'entità della perdita è moderata o vi sono altre condizioni che possono spiegare l'ipoacusia. Lo screening genetico, essendo eseguito su Guthrie card utilizzata per lo

screening metabolico, può ovviare tale problema perché permette di avere una diagnosi genetica mediante una tecnica non invasiva. Tale aspetto presenta anche un altro risvolto: con una diagnosi genetica i genitori si sentirebbero più supportati, avrebbero un counseling genetico precoce e quindi sarebbero maggiormente motivati a seguire l'iter clinico proposto. Le suddette considerazioni sostengono l'introduzione dello screening genetico di DFNB1 nella nostra realtà. Tuttavia si devono affrontare diverse problematiche: la modalità di esecuzione dello screening in termini di mutazioni da ricercare e la conseguente valutazione del rapporto costo/beneficio, la complessità del counseling alle famiglie dovuta alla difficoltà di interpretazione del risultato nei casi di eterozigosi e nei casi in cui lo screening uditivo sia PASS e il test genetico riscontri un quadro di mutazioni in omozigosi o eterozigosi composta. Tali problematiche si potrebbero ovviare se si proponesse lo screening genetico di DFNB1 con sequenziamento completo solo a coloro che risultano REFER allo screening uditivo di II livello. Questi, qualora i test vengano eseguiti correttamente, rappresentano circa 1% della popolazione neonatale poiché l'associazione di A-TEOAE e A-ABR raggiunge migliori livelli di sensibilità e specificità rispettivamente del 92% e 98% (Kennedy et al, 2005). Nel caso in cui il soggetto risultasse omozigote o eterozigote composto allo screening genetico (nella nostra popolazione ci si aspetta che si tratti di un caso su quattro circa) si otterrebbe già l'eziologia dell'ipoacusia, la comunicazione ai genitori risulterebbe più semplice e affidabile in quanto il risultato dello screening genetico sarebbe diagnostico e non predittivo. Se invece il soggetto risultasse eterozigote, il counseling ai genitori risulterebbe complesso ma grazie all'associazione dello screening genetico a quello uditivo, ci sarebbero maggiori evidenze che sostengano l'importanza di ulteriori valutazioni audiologiche. Se invece il test genetico desse esito negativo e la valutazione audiologica al III livello confermasse l'ipoacusia, si procederebbe nella valutazione di altre cause come quelle infettivologiche o malformative. Eseguendo quindi lo screening genetico solo ai neonati risultati REFER allo screening uditivo di II livello, l'impegno economico sarebbe maggiormente sostenibile e si aumenterebbero le conoscenze sulle forme di ipoacusia da mutazioni di DFNB1. Si deve considerare tuttavia che tale proposta non permetterebbe di identificare i rari casi di soggetti ipoacusici risultati PASS allo screening uditivo in quanto falsi negativi o con ipoacusia lieve o monolaterale e di coloro che sono normoudenti alla nascita che sviluppano deficit uditivo nell'epoca periverbale. Dallo studio condotto risulta quindi opportuno rendere lo screening uditivo neonatale efficace ossia rispondente ai criteri e agli indici di qualità esposti dal Joint Committee on Infant Hearing (JCIH, 2007) e seguito da un programma di sorveglianza coordinato da neonatologi, audiologi e pediatri di base. Raggiunto questo obiettivo, si potrà avviare uno studio pilota che affianchi allo screening uditivo quello genetico per capire l'efficacia di quest'ultimo in termini di precocità di identificazione dei casi, di miglioramento della comunicazione e rapporto con la famiglia, di maggior adeguatezza di trattamento e

intervento terapeutico. Tale studio fornirebbe inoltre ulteriori conoscenze sull'ipoacusia dovuta a mutazione di DFNB1.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abe S., Usami S., Shinkawa H. et al.: "Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese" *Journal of Medical Genetics*, 2000; 37:41-43
- Adato A., Vreugde S., Joensuu T., et al.: "USH3A transcripts encode clarin-1, a four-transmembrane-domain protein with a possible role in sensory synapses" *European journal of human genetics* 2002; 10:339-350.
- American Academy of Pediatrics: "Task Force on Newborn Infant and Hearing. Newborn infant and hearing loss: detection and intervention", *Pediatrics*, 1999; 103:527-530.
- Andermann A., Blanquaert I., Beauchamp S., et al.: "Revisiting Wilson and Jungner in the genomic era: a review of screening criteria over the past 40 years" *Bull WHO*, 2008; 86: 317, 319
- Apuzzo M., Yoshinaga-Itano C.: "Early identification of infants with significant hearing loss and the Minnesota Child Development Inventory." *Seminars in Hearing*, 1995; 16:124-139.
- Bale J.F. Jr.: "Congenital infections." *Neurologic Clinics*, 2002; 20:1039-60.
- Ballana E, Ventayol M, Rabionet R, et al. : "Connexins and deafness Homepage" World wide web URL: <http://davinci.crg.es/deafness> last update 11.11.2011 (consultato 11.11.2011)
- Bamiou D.: "Paediatric Audiological Medicine" II edition, 2009, capitolo 12
- Banatvala J.E., Brown D.W.: "Rubella" *Lancet* 2004; 363:1127-1137.
- Battey J.R. J.F.: "Using genetics to understand auditory function and improve diagnosis." *Ear and Hearing* 2003, 24:266-269
- Bauman N., Turpin J.C.: "Malattia di Refsum, forma infantile", creation date: 2006, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Bergsmark J., Djupesland G.: "Heredopathia atactica polyneuritiformis (Refsum's diseases). An audiological examination of two patients" *European neurology*, 1968; 2:122-130.
- Behrman R.E., Kliegman R.M., Arvin A.M.: "Nelson, Trattato di Pediatria" ed Minerva Medica, 1997; p1441; 1651-1652; 1747.
- Bidart J.M., Mian C., Lazar V., Russo D., Filetti S., Caillou B., Schlumberger M.: "Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues". *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2000; 85:2028-2033

- Birgit L., Preising M.: "Usher syndrome", creation date: 2002, updated 2004, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Bitner-Glindzicz M., Turnpenny P., Hoglund P., Kaariainen H., Sankila E.M., van der Maarel M., de Kok Y.J., Ropers H.H., Cremers F.P., Pembrey M., Malcolm S.: "Further mutations in Brain 4 (POU3F4) clarify the phenotype in the X-linked deafness, DFN3." *Human molecular genetics*, 1995; 4:1467–1469
- Booy R., Moxon E.R.: "Immunisation of infants against *Haemophilus influenzae* type B in the UK." *Archives of Disease in Childhood*, 1991; 66:1251–1254.
- Boppana S.B., Fowler K.B., Pass R.F., et al.: "Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss", *Journal of Pediatrics*, 2005; 146: 817-823
- Boughman J.A., Vernon M., Shaver K.A.: " Usher syndrome: definition and estimate of prevalence of two high-risks populations" *Journal of chronic diseases*, 1983; 36:595-603.
- Bregman J., Farrell E.E.: "Neurodevelopmental outcome in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Clinics in perinatology*, 1992; 19:673–94
- Brookhouser P.D.: "Sensorineural hearing loss in children" *Pediatric clinics of North America*, 1996; 43:1195-1216.
- Brown C.W., Levy M.L., Flaitz C.M., Reid B.S., Manolidis S., Hebert A.A., Bender M.M., Heilstedt H.A., Plunkett K.S., Fang P., Roa B.B., Chung P., Tang H.Y., Richard G., Alford R.L.: "A novel GJB2 (connexin 26) mutation, F142L, in a patient with unusual mucocutaneous findings and deafness." *The Journal of investigative dermatology*, 2003, 121:1221–1223.
- Bubbico L., Broglio D., Bartolucci M.A.: "Lo screening uditivo universale in Italia. Censimento 2003" in "La sordità infantile" Istituto Italiano di Medicina Sociale. p 50.
- Bubbico L., Bartolucci M.A., Broglio D.: "Screening neonatale dell'udito. Indagine in Italia." *Rivista Italiana di Pediatria*, 2005; 31:290-292.
- Bubbico L., Rosano A., Spagnolo A.: "Prevalence of prelingual deafness in Italy", *Acta Oto-Laryngologica*, 2007; 27: 17-21.
- Bubbico L., Tognola G., Greco A., Grandori F.: "Universal newborn hearing screening programs in Italy: survey of year 2006", *Acta Oto-Laryngologica*, 2008; 128: 1329-1336.
- Calderon R., Naidu S.: "Further support for the benefits of early identification and intervention for children with hearing loss." *The Volta review*, 2000; 100:53–84.
- Carducci C., Ellul L., Antoniozzi I., Pontecorvi A.: "DNA evaluation and amplification by polimerasi chain reaction from dried spots" *Biotechniques*, 1992; 13: 735-737.

- Calevo M.G., Mezzano P., Zullino E., Padovani P., Scopesi F., Serra G., Stern group: “Neonatal hearing screening model: An Italian regional experience”, *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2007; 20:441-448.
- Centres of Disease Control and Prevention, National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities. Hearing loss, accessed in 2007, at: <http://www.cdc.gov/ncbddd/dd/ddhi.htm>.
- Choo D., Meinzen-Derr J.: “Universal newborn hearing screening in 2010” *Current opinion in Otorlaryngology & Head and Neck surgery*, 2010; 18:399-404.
- Cohn E.S., Kelley P.M.: “Clinical phenotype and mutations in connexin 26 (DFNB1/GJB2), the most common cause of childhood hearing loss” *American Journal of Medical Genetics*, 1999; 89:130-136.
- Cole H., Reynolds T. R., Buck G.B., Lockyer J.M., Denson T., Spence J.E., Hymes J., Wolf B.: “Human serum biotinidase: cDNA cloning, sequence, and characterization”, *The Journal of biological chemistry*, 1994; 269:6566–6570.
- Cole H., Weremowicz H., Morton C.C., Wolf B.: “Localization of serum biotinidase (BTD to human chromosome 3 in band p25)”. *Genomics*, 1994; 22:662–663.
- Colussi G.: “Bartter syndrome”, creation date: 2001, updated 2003-2005, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Connell S.S., Angeli S.I., Suarez H. et al.: “Performance after cochlear implantation in DFNB1 patients” *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 2007; 137: 596-602.
- Cooke R.W.I.: “Annual audit of three year outcome in very low birthweight infants.” *Archives of Disease in Childhood*, 1993;69:295–298.
- Cryns S, Orzan E., Murgia A., et al.: “ A genotype-phenotype correlation for GJB2 (Connexin 26) deafness” *Journal of Medical Genetics*, 2004; 41: 147-154.
- Dahle A.J., Fowler K.B., Wright J.D. et al: “Longitudinal Investigation of hearing disorders in children with congenital CMV” *Journal of American Academy of Audiology* 2000, 11: 283-290
- De Capua B., Costantini D., Martufi C., et al.: “Universal neonatal hearing screening: the Siena (Italy) experience on 19,700 newborns” *Early Human Development*, 2007; 83: 601-606.
- Del Castillo F.J., Rodriguez-Ballesteros M., Alvarez A., et al: “A novel deletion involving the connexin 30 gene del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin 26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment” *Journal of Medical Genetics*, 2005; 42: 588-594.

- Del Castillo I., Villamar M., Moreno-Pelayo M.A., del Castillo F.J., Alvarez A., Tellería D., Menéndez I., Moreno F.: "A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment." *New England Journal of Medicine*, 2002; 346:243–249.
- Del Castillo I., Moreno-Pelayo M.A., del Castillo F.J., Brownstein Z., Marlin S., Adina Q. et al.: "Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing impaired subjects: a multicenter study" *American Journal of Human Genetics*, 2003; 73:1452-1458
- Djupesland G., Flottorp G., Refsum's S.: "Phytanic acid storage disease: hearing maintained after 15 years of dietary treatment", *Neurology*, 1983;33:237–240.
- Edery P.: "Le syndrome de Franceschetti-Klein", creation date:1998, updated 2002, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Estivill X., Fortina P., Surrey S., et al.: "Connexin 26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness" *Lancet*, 1998; 351: 394-398
- Everett L.A., Glaser B., Beck J.C., Idol J.R., Buchs A., Heyman M., Adawi F., Hazani E., Nassir E., Baxevanis A.D., Sheffield V.C., Green E.D.: "Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS)". *Nature genetics*, 1997; 17:411–422.
- Everett L.A., Morsli H., Wu D.K., Green E.D.: "Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (Pds) suggests a key role for pendrin in the inner ear." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999; 96:9727–9732.
- Faivre L., Vekemans M.: "Waardenburg syndrome I, II, III", creation date:1997, updated 2005, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Fasth A., Porras O.: "Human malignant osteopetrosis: pathophysiology, management and the role of bone marrow transplantation." *Pediatric Transplantation*, 1999; 3 :102–7
- Feldmann H.: "Refsum's syndrome, hereditary ataxia polyneuritic form in the view of the otolaryngologist", *Laryngologie Rhinologie Otologie*, 1981; 60:235–240.
- Fitzgerald T., Duva S., Ostrer H., Pass K., Oddoux C., Ruben R., Caggana M.: "The frequency of GJB2 and GJB6 mutations in the New York State newborn population: feasibility of genetic screening for hearing deficits" *Clinical Genetics*, 2004; 65(4):338-342.
- Fortnum H., Davis A.: "Hearing impairment in children after bacterial meningitis: incidence and resource implications." *British journal of audiology*, 1993; 27: 43–52.
- Fortnum H. M., Summerfield A. Q., Mashall D. H., Davis A. C., Bamford J. M.: "Prevalence of permanent childhood hearing impairment in the United Kingdom and implication on

universal neonatal hearing screening: questionnaire based ascertainment study” *British Medical Journal*, 2001; 323:536-540

- Fowler K.B., McCollister F.P., Dahle A.J., Boppana S., Pass R.F.: “Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection” *Journal of Pediatrics*, 1997; 130:624-630.
- Gelfand S.A.: “Essentials of Audiology”, ed Thieme, 1997; cap 11:345-366.
- Genc G.A., Sivri-Kalkanoglu H.S., Dursun A., Aydyn H. I., Tokatli, Sennaroglu L., Belgin E., Wolf B, .A. Coksun T.: “Audiologic findings in children with biotinidase deficiency in Turkey” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2007; 71:333-339.
- Gerritsen E.J., Vossen J.M., Fasth A., Friedrich W., Morgan G., Padmos A., Vellodi A., Porras O., O’Meara A., Porta F.: “Autosomal recessive osteopetrosis: variability of findings at diagnosis and during the natural course.” *Pediatrics*, 1994; 93:247–253
- Gorlin R., Toriello H, Cohen Jr M.C.: “Hereditary hearing loss and its syndromes” Oxford University press, New York; 1995.
- Green G.E., Smith R.J., Bent J.P., Cohn E.S.: “Genetic testing to identify deaf newborns” *Journal of the American Medical Association*, 2000; 284 (10): letter to the editor 1245.
- Grifa A., Wagner C.A., D’Ambrosio L., Melchionda S., Bernardi F., Lopez-Bigas N., Rabionet R., Arbones M., Monica M.D., Estivill X., Zelante L., Lang F., Gasparini P.: “Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus.” *Nature genetics*, 1999; 23:16–18
- Gustason G.: “Early identification of hearing impaired infants: a review of Israeli and American progress” *The Volta review*. 1989; 291-295
- Hainque B.: “Sindrome del QT lungo” creation date: 2002, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Hand G.M., Muller D.J., Nicholson B.J., Engel A., Sosinsky G.E. “Isolation and characterization of gap junctions from tissue culture cells.” *Journal of molecular biology*, 2002; 315:587–600.
- Harrison M., Roush J., Wallace J.: “Trends in age of identification and intervention in infants with hearing loss.” *Ear and hearing*, 2003;24:89-95.
- Hayashida T., Hiel H., Dulon D., Erre J.P., Guilhame A., Aran J.M.: “Dynamic changes following combined treatment with gentamicin and ethacrynic acid with and without acoustic stimulation.” *Acta oto-laryngologica*, 1989;108:404–13.

- Hereditary hearing loss homepage, <http://hereditaryhearingloss.org>, last update: settembre 2011, consultato Novembre 2011
- Hilgert N., Huentelman MJ, Thorburn AQ, et al: "Phenotypic variability of patients homozygous for GJB2 mutation 35delG cannot be explained by the influence of one major modifier gene" *European Journal of Human Genetics*, 2009; 17: 517-524
- Hille E.T.M., van Straaten H.L.M., Verkerk P.H., the Dutch NICU neonatal hearing screening working group: "Prevalence and independent risk factors for hearing loss in NICU infants", *Acta Paediatrica*, 2007; 96:1155-1158.
- Hofmann S., Bauer M.: "Sindrome di Mohr-Tranebjaerg" creation date: 2004, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Hulander M., Kiernan A. E., Blomqvist S.R., Rodrigo Blomqvist S., Carlsson P., Samuelsson E. J. , Johansson B. R., Steel K. P. and Enerbäck S. "Lack of Pendrin expression leads to deafness and expansion of the endolymphatic compartment in inner ears of Foxi1 null mutant mice", *Development*, 2003; 130:2013-2015.
- Joint Committee on Infant Hearing. Year 2007 position statement: Principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. *Pediatrics* 2007; 120: 898-921
- Kelley PM, Harris DJ, Comer JW et al.: Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *American Journal of Human Genetics* 1999; 62:792-799.
- Kemp D.T.: "Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system" *The Journal of the Acoustical Society of America*, 1978; 64: 1386-1391.
- Kemp D.T.: "Evidence of mechanical non-linearity and frequency selective wave amplification of the cochlea". *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 1979; 224:37-45.
- Kennedy C., McCann D., Campbell M.J. et al.: " Universal newborn hearing screening for permanent childhood hearing impairment: an 8-year follow up of a controlled trial" *Lancet*, 2005; 366: 660-662.
- Kenneson A., Van Naarden Braun K., Boyle C.: "GJB2 (connexin26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review" *Genetics in Medicine*, 2002; 4:258-274
- Kent W.D., Tan A.K., Clarke M.C. et al: "Excessive noise levels in the neonatal ICU: potential effects on auditory system development" *Journal of Otolaryngology*, 2002,31: 355-360.

- Kikuchi T., Adams J.C., Miyabe Y., So E., Kobayashi T. "Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness." *Medical Electron Microscopy*, 2000; 33:51–56.
- Klintworth G.K.: "The neurologic manifestations of osteopetrosis (Albers-Schonberg disease)." *Neurology*, 1963; 13:512–519
- Koomen I., Grobbee D.E., Roord J.J., Donders R., Jennekens-Schinkel A., van Furth A.M.: "Hearing loss at school age in survivors of bacterial meningitis: assessment, incidence, and prediction." *Pediatrics*, 2003; 112:1049–1053.
- Lehman R.A., Reeves J.D., Wilson W.B., Wesenberg R.L.: "Neurological complications of infantile osteopetrosis." *Annals of Neurology*, 1977; 2:378–384
- Le Merrer M., Roche O.: "Stickler syndrome" creation date: 2004, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Lerer I., Sagi M., Ben-Neriah Z., Wang T., Levi H., Abeliovic D.: "A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: a novel founder in Ashkenazi jews" *Human Mutation* 2001; 16:502-508
- Lifschitz M.H., Seileimer D.K., Wilson G.S., Williamson W.D., Thurber S.A., Desmond M.M.: "Neurodevelopmental status of low birth weight infants with bronchopulmonary dysplasia requiring prolonged oxygen supplementation." *Journal of perinatology*, 1987; 7:127–132.
- Lipan M., Ouyang X., Yan D., Angeli S., et al.: "Clinical comparison of hearing impaired patients with DFNB1 against heterozygote carriers of Connexin 26 mutations" *The Laryngoscope* 2011; 121: 811-814
- Lucotte G., Bathelier C., Champenois T.: "PCR test for diagnosis of the common GJB2 (connexin26) 35delG mutation on dried spots and determination of the carrier frequency in France" *Molecular and Cellular Probes*, 2001; 15:57-59
- Lucotte G.: "High prevalence of carriers of the 35delG mutation of connexin 26 in the Mediterranean area" *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2007; 71: 741-746.
- Maire I. "Maladie de Fabry" creation date: 1997, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Makin G.J.V., Coates R.K., Pelz D., Drake C.G., Barnett H.J.M.: "Major cerebral arterial and venous disease in osteopetrosis." *Stroke*, 1986; 17: 106–110

- Marazita M. L., Ploughman L.M., Rawlings B., Remington E., Arnos K.S., Nance W.E.: "Genetic epidemiological studies of early onset deafness in the U.S. school age population" *American Journal of Medical Genetics*, 1993; 46:486-491.
- Marlow E.S., Hunt L.P., Marlow N. : "Sensorineural hearing loss and prematurity" *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal ed*, 2000; 82: 141-144
- Matsubara Y., Ikeda H., Endo H., Narisawa K.: "Dried blood spot on filter paper as a source of mRNA" *Nucleic Acids Research*, 1992; 20:1998
- Maurizi M.: "Audiovestibologia clinica" ed Idelson Gnocchi, 2000; p 221-222.
- Maxon AB, White KR, Vohr BR, Behrens TR. "Using transient evoked otoacoustic emissions for neonatal hearing screening" *British Journal of Audiology*. 1993 Apr;27(2):149-53.
- Mehl A.L., Thompson V.: "Newborn hearing screening: the great omission", *Pediatrics*, 1998; 101:E4
- Miyamura N., Matsumoto K., Taguchi T., Tokunaga H., Nishikawa T., Nishida K., Toyonaga T., Sakakida M., Araki E.: "Atypical Bartter syndrome with sensorineural deafness with G47R mutation of the α -subunit for CIC-Ka and CIC-Kb chloride channels, Barttin." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2003; 88:781-786.
- Milánkovics I., Kámory E., Csókay B., Fodor F., Somogyi C., Schuler A.: "Mutations causing biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in Western Hungary" *Molecular Genetics and Metabolism*, 2007; 90:345–348
- Ministero della Salute: "Verso un piano di azioni per la promozione e la tutela della salute delle donne e dei bambini" 8 Marzo 2007, p 21.
- Moeller A.: "Neural generators of the brainstem auditory evoked potentials", *Seminars in hearing*, 1998; 19:11-40.
- Moeller M. P.: "Early intervention and language development in children who are deaf and hard of hearing." *Pediatrics*, 2000; 106:E43.
- Morrell R.J., Kim H.J., Hood L.J. et al.: "Mutations in connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness" *New England Journal of Medicine*, 1998; 339: 1500-1505.
- Morton C. C., Nance W. E.: "Newborn Hearing Screening- A Silent Revolution." *New England Journal of Medicine*, 2006; 354:2151-2164.
- Morton N. E. "Genetic epidemiology of hearing impairment" *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1991; 630:16-31.

- Mulheran M., Harpur E.S.: “The effect of gentamicin and furosemide given in combination on cochlear potentials in the guinea pig”. *British journal of audiology*, 1998; 32:47–56.
- Murgia A., Orzan E., Polli R., Martella M., Vinanzi C., Leonardi E., Arslan E., Zacchello F.: “Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability.” *Journal of Medical Genetics*, 1999; 36:829-832.
- Nagy A. L., Csaki R., Klem J., Rovò L. et al.: “Minimally invasive genetic screen for GJB2 related deafness using dried blood spots” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2010; 74: 75-81.
- Nance W.E., Lim B.G., Dodson K.M.: “Importance of congenital Cytomegalovirus infections as a cause for pre-lingual hearing loss” *Journal of clinical virology*, 2006; 35: 221-225
- Napiontek U., Borck G., Müller-Forell W., Pfarr N., Bohnert A., Keilmann A., Pohlenz J.: “Intrafamilial variability of the deafness and goiter phenotype in Pendred syndrome caused by a T416P mutation in the SLC26A4 gene.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004; 89:5347–5351
- National Institutes of Health, NIH Consensus Statement: “Early identification of Hearing Impairment in Infants and Young Children”, 1993; 11:1-24
- National Institute on Deafness and Other Communication Disorders: “Cochlear implants” NIH Publication No.00-4798, updated: 2007, accessed in 2007 at: <http://www.nidcd.nih.gov/health/hearing/coch.asp>
- Newton V.E. in “Paediatric Audiological Medicine” II edition, 2009, chapter 8 e 9
- NHS Newborn Hearing Screening Programme “Care Pathways”, creation date 2007, update 2008, accessed in 2008 at: “<http://hearing.screening.nhs.uk/carepathways>.”
- Niaudet P.: “BOR syndrome”, creation date: 2007, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Niaudet P., “Renal tubular acidosis, distal”, creation date: 2007, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Norris V.W., Arnos K.S., Hanks W.D. et al: “Does universal newborn hearing screening identify all children with GJB2 (Connexin 26) deafness? Penetrance of GJB2 deafness” *Ear and hearing*, 2006; 27:732-741
- Olschwang S.: “Neurofibromatosis type II” , creation date: 1997, update: 2002, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.

- Orzan E., Bonaconsa A., Giacomelli C., Turato R., De Benedittis M., De Santi R., Turrini M., Babighian G.: "La protesizzazione acustica delle ipoacusia infantili severe e profonde", *Rivista Italiana di Pediatria*, 2001; 27:1-8.
- Orzan E., Murgia A., Polli R., et al.: "Connexin 26 preverbal hearing impairment: mutation prevalence and heterozygosity in a selected population" *International Journal of Audiology*, 2002; 41: 120-124.
- Orzan E., Murgia A.: "Connexin 26 deafness is not always congenital" *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2007; 71: 501-507.
- Orzan E., Morando C. in "Impianti Cocleari" a cura di D. Cuda, 2009, capitolo "Gli aspetti clinici della neuropatia uditiva"
- Peckham C.S., Stark O., Dudgeon J.A., Martin J.A., Hawkins G.: "Congenital cytomegalovirus infection: a cause of sensorineural hearing loss." *Archives of disease in childhood*, 1987; 62:1233-1237.
- Pereira P. K. S., Martins A. S., Vieira M. R.; Azevedo M. F. de.: "Newborn hearing screening program: association between hearing loss and risk factors" *Pró-Fono Revista de Atualização Científica*, 2007; 19:267-278.
- Petit C. "Memorial lecture: hereditary sensory defects: from genes to pathogenesis." *American Journal of Medical Genetics*, 2004; 130A: 3-7.
- Pryor S.P., Madeo A.C., Reynolds J.C., N J Sarlis, K S Arnos, W E Nance, Y Yang, C K Zalewski, C C Brewer, J A Butman, A J Griffith: "SLC26A4/PDS genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities" *Journal of Medical Genetics*, 2005; 42:159-165.
- Rabionet R., Gasparini P., Estivill X. "Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins." *Human mutation* 2000; 16: 190–202.
- Reinalter S.C., Jeck N., Peters M., Seyberth H.W.: "Pharmacotyping of hypokalaemic salt-losing tubular disorders". *Acta physiologica Scandinavica*, 2004; 181:513-521.
- Richardson M.P., Reid A., Tarlow M.J., Rudd P.T.: "Hearing loss during bacterial meningitis" *Archives of Disease in Childhood*, 1997; 76: 134-138
- Rivera L.B., Boppana S.B., Fowler K.B. et al.: "Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection" *Pediatrics*, 2002; 110: 762-727.
- Robert-Gnansia E.: "Alström syndrome", creation date: 2003, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>

- Robertson C., Sauve R.S., Christianson H.E.: "Province based study of neurologic disability among survivors weighing 500 through to 1249 g at birth." *Pediatrics*, 1994;636–640.
- Roos K.L.: "Dexamethasone and non-steroidal anti-inflammatory agents in the treatment of bacterial meningitis." *Clinical Therapeutics*, 1990; 12:290–296.
- Ross D.S., Holstrum W.J., Gaffney M et al.: "Hearing screening and diagnostic evaluation of children with unilateral and mild bilateral hearing loss" *Trends in Amplification*, 2008; 12: 27-34.
- Ross M.: "Implications of delay in detection and management of deafness" *The Volta review*. 1990; 69-79.
- Ross S.A., Novak Z., Kumbla R.A., et al.: "GJB2 and GJB6 mutations in children with congenital Cytomegalovirus infection" *Pediatric Research*, 2007; 61(6): 687-691.
- Royaux I.E., Wall S.M., Karniski L.P., Everett L.A., Suzuki K., Knepper M.A., Green E.D.: "Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001; 98:4221–4226
- Russell N.J., Fox K.E., Brummett R.E.: "Otoxic effects of the interaction between kanamycin and ethacrynic acid". *Acta oto-laryngologica*, 1979; 88:369–81.
- Rovers M.M., Schilder A.G.M., Zielhuis G.A., Rosenfeld R.M.: "Otitis media." *Lancet*, 2004; 363:465–473.
- Salvador M.Q., Fox M.A., Schimmenti L.A.: "Homozygosity for the connexin 26 167delT mutation in an Askenazy jewish family" *American Journal of Medical Genetics*, 2000; 67 (suppl 2): abstract n 1079.
- Sauve R.S., Singhal N.: "Long-term morbidity of infants with bronchopulmonary dysplasia." *Paediatrics*, 1985; 76:725–33.
- Schildroth A.N.: "Congenital cytomegalovirus and deafness" *American Journal of Audiology*, 1994; 3: 27-38
- Schimmenti L.A., Warman B., Schleiss M.R., Daly K.A.: "Evaluation of newborn screening bloodspot-based genetic testing as second tier screen for bedside newborn hearing screening" *Genetics in Medicine*, 2011; Oct 11. [Epub ahead of print]
- Schrijver I.: "Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss", *Journal of Molecular Diagnostics*, 2004; 6:275-284.
- Scott D.A., Wang R., Kreman T.M., Sheffield V.C., Karniski L.P.: "The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein." *Nature genetics* 1999; 21:440–443

- Sessa A, Meroni M.: "Alport's syndrome" creation date: 2001, update: 2003, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB>.
- Shapiro F., Key L.L., Anast C.: "Variable osteoclast appearance in human infantile osteopetrosis." *Calcified Tissue International*, 1988; 43: 67–76
- Sharma A., Dorman M.F., Spahr A.J.: "A sensitive period for the development of the central auditory system in children with cochlear implants: implication of age of implantation" *Ear and Hearing*, 2002; 23: 532-539.
- Shulman S., Besculides M., Saltzman A. et al.: "Evaluation of the universal newborn hearing screening and intervention program" *Pediatrics*, 2010; 126: S19-S27.
- Sininger Y., Oba S.: "Patients with auditory neuropathy: who are they and what they hear?" In Sininger Y., Starr A. *Auditory Neuropathy*. San Diego: Singular, 2001: 15-35.
- Sinnathuray A.R., Raut V., Awa A., Magee A., Toner J.G.: "A review of cochlear implantation in mitochondrial sensorineural hearing loss." *Otology & Neurotology* 2003; 24:418–426
- Sivri-Kalkanoglu H.S., Genc G.A., Tokatli A., Dursun A., Coksun T., Aydyn H. I., Sennaroglu L., Belgin E., Jensen K., Wolf B.: "Hearing Loss in Biotinidase Deficiency: Genotype-Phenotype Correlation" *Journal of Pediatrics*, 2007; 150:439-442
- Smith R. J. H.: "Sensorineural hearing loss in children" *The Lancet*, 2005, 365:879-889
- Smith R. J. H., Van Camp G.: "Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview" *Gene Reviews* creation date 1999, update 2007, accessed in 2007 at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>.
- Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldmann D et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *American Journal of Human Genetics* 2005; 77 (6): 945-957
- Starr A., Picton T.W., Sininger Y., et al.: "Auditory neuropathy" *Brain*, 1996; 119: 741-753.
- Stein L., Jabaley T., Spitz R., Stoakley D., McGee T.: "The hearing impaired infants: patterns of identification and habilitation revisited". *Ear and Hearing*, 1990; 11:201-205.
- Stevens Wrightson A.: "Universal Newborn Hearing Screening" *American Family Physician*, 2007; 75:1349-1352.
- Steward C.G.: "Review, Neurological aspects of osteopetrosis" *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2003; 29: 87–97
- Sue C.M., Tanji K., Hadjigeorgiou G., Andreu A.L., Nishino I., Krishna S., Bruno C., Hirano M., Shanske S., Bonilla E., Fischel-Ghodsian N., Di-Mauro S., Friedman R.: "Maternally

inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN) gene.” *Neurology*, 1999; 52:1905–1908

- Teberg A.J., Pena I., Finello K., Aguilar T., Hodgman J.E.: “Prediction of neurodevelopmental outcome in infants with and without bronchopulmonary dysplasia”. *The American journal of the medical sciences*, 1991; 301:369–74.
- The National Institutes of Health Consensus Development Conference on Early Identification of Hearing Impairment, accessed in 2007 at: <http://consensus.nih.gov/1993/1993HearingInfantsChildren092html.htm>
- Toriello H. V., Reardon W., Gorlin R. J.: “Hereditary hearing loss and its syndromes” Oxford, England: Oxford University Press, 2004.
- Touraine R: “Le syndrome de Shah-Waardenburg” creation date:2000, update 2001, accessed in 2007 at: <http://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-SW4.html>
- Van Camp G., Willems P. J., Smith R. J. H.: “Nonsyndromic hearing impairment: Unparalleled heterogeneity.” *American Journal of Human Genetics*, 1997; 60:758-764.
- Varga R., Kelley P.M., Keats B.J., et al.: “Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene” *Journal of Medical Genetics*, 2003; 40:45-50.
- Varga R., Avenarius M.R., Kelley P.M., et al.: “OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele” *Journal of Medical Genetics*, 2006; 43: 576-581.
- Victorian Infant Collaborative Study Group: “Eight year outcome in infants with birth weights of 500–999 g: continuing regional study of 1979 and 1980 births.” *Journal of Pediatrics*, 1991; 118:761–767.
- Wang Q.-J., Zhao Y.-L., Rao S.-Q., et al.: “Newborn hearing concurrent gene screening can improve care for hearing loss: a study on 14,913 newborns” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2011; 75: 535-542
- Weil D., Levy G., Sahly I., Levi Acobas F., Blanchard S., El Amraoui A., Crozet F., Philippe H., Abitbol M., Petit C.: “Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996; 93:3232-3237.
- West B.A., Brummett R.E., Himes D.L.: “Interaction of kanamycin with ethacrynic acid: severe cochlear damage in guinea pigs”. *Archives of otolaryngology*, 1973; 98:32–37.

- Whyte M.P.: "Osteopetrosis and the heritable forms of rickets." *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Medical Genetic, and Molecular Aspects*. Eds B Steinmann, PM Royce. New York: Wiley Liss, 1993; 563–568
- Wilson J.M.G., Yungner G.: "Principles and practice of screening for disease" *Public Health Paper Number 34*. Geneva: WHO, 1968.
- Wolf B., Spencer R., Gleason T.: "Hearing loss is a common feature of symptomatic children with profound biotinidase deficiency" *Journal of Pediatrics*, 2002; 140:242-246.
- Wolfrum U., Liu X., Schmitt A., Udovichenko I.P., Williams D.S.: "Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli." *Cell motility and the cytoskeleton*, 1998;40:261-271.
- World Health Organization (2006): "Primary ear and hearing care training resource." Advanced level. Geneva: World Health Organization.
- Wu C.-C., Hung C.-C., Lin S.-Y., et al: "Newborn genetic screening for hearing impairment: a preliminary study at a tertiary center" *PlosOne*, 2011; 6: e22314
- Yan D., Park H.J., Ouyang X.M., et al: "Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of GJB2 (connexin 26) in east Asians" *Human Genetics*, 2003; 114: 44-50.
- Yoshinaga-Itano C.: "Benefits of early intervention for children with hearing loss." *Otolaryngologic Clinic of North America*, 1999; 32:1089-1102.
- Yoshinaga-Itano C.: "From screening to Early Identification and Intervention: Discovering Predictors to Successful Outcomes for Children With Significant Hearing Loss" *Journal of Deaf Studies and Deaf Education*, Winter 2003; 8:11-26.
- Yoshinaga-Itano C., Apuzzo M.: "The development of deaf and hard-of-hearing children identified early through the high risk registry." *American Annals of the Deaf*, 1998a; 143:416–424.
- Yoshinaga-Itano C., Apuzzo, M.: "Identification of hearing loss after 18 months is not early enough." *American Annals of the Deaf*, 1998b;143:380–387.
- Yoshinaga-Itano C., Sedey A.: "Speech development of deaf and hard-of-hearing children in early childhood: Interrelationships with language and hearing." In C. Yoshinaga-Itano & A. Sedey (Eds.): "Language, speech and socialemotional development of children who are deaf or hard of hearing: The early years." *The Volta Review*, 2000; 100:181–211.