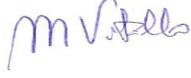


	<b>REGIONE LAZIO</b> <b>ASL ROMA 1</b> DIPARTIMENTO DEI LABORATORI UOC PATOLOGIA CLINICA (direttore ff: M. VITILLO) e UOSD DI GENETICA MEDICA (direttore ff: M.C. Muzi)	 Rev. 0 del 20.06.2019	Pag. 1/9
	<b>PERCORSO DIAGNOSTICO EMOGLOBINOPATIE</b>	codifica	

## INDICE

1. INTRODUZIONE .....	2
2. OBIETTIVO E SCOPO .....	3
3. CAMPO DI APPLICAZIONE .....	4
4. RISULTATI ATTESI .....	4
5. PROTOCOLLO DIAGNOSTICO .....	4
5.1 ACCESSO DELL'UTENTE .....	4
5.2 INDAGINI DI I LIVELLO .....	4
5.3 CONSULENZA GENETICA .....	5
5.4 INDAGINI DI II LIVELLO .....	5
5.5 DIAGNOSI PRENATALE E/O DIAGNOSI PRE-IMPIANTO .....	6
6. INDICATORI .....	7
7. REVISIONE .....	7
8. BIBLIOGRAFIA .....	7
9. DIAGRAMMA DI FLUSSO .....	8
10. SCHEDA INFORMAZIONI (ALLEGATO A) .....	9

REVISIONE	DATA	REDATTO	VERIFICATO UOC PATOLOGIA CLINICA	VERIFICATO UOSD DI GENETICA MEDICA	APPROVATO DIREZIONE DIPARTIMENTO DEI LABORATORI
Rev.0 (Emissione)	20.06.2019	GdL Emoglobinopatie ASL Roma 1	 Dott.ssa M. VITILLO	 Dott.ssa M.C. MUZI	 Dott. M. MELEDANDRI

## Gruppo di Lavoro

### Coordinatori

- UOC Patologia Clinica: Francesca Gabriela Martino – Marina Vitillo
- UOSD di Genetica Medica: Francesca Clementina Radio – Manuela Di Natale

### Componenti

Francesca Gabriela Martino; Marina Vitillo; Manuela Di Natale; Rosetta Lecce; Francesca Clementina Radio; Miriam Iannicelli; Katia Paciaroni; Giampaolo Raccosta

## 1. INTRODUZIONE

Le Emoglobinopatie sono un gruppo di patologie a trasmissione autosomica recessiva (da due genitori portatori sani la malattia si manifesta in media nel 25% dei figli indipendentemente dal sesso), caratterizzate da anomalie della struttura, della funzione o della produzione di emoglobina. Tali condizioni si distinguono in due gruppi principali: (i) le **talassemie** caratterizzate da difetto di sintesi di una o più catene globiniche; (ii) le **emoglobinopatie** caratterizzate da variazioni strutturali delle catene globiniche (es. drepanocitosi, deficit di G6PD, sferocitosi/ellissocitosi, anemie diseritropoietiche, ecc.). In diagnosi differenziale devono essere prese in considerazione tutte quelle situazioni patologiche o parafisiologiche caratterizzate da anemia ipocromica microcitica.

Le **talassemie** rappresentano uno dei disordini genetici più diffusi nel mondo (numero di nuovi nati affetti per anno compreso tra 300.000 e 500.000, pari a 5 casi ogni 10.000 abitanti). In Italia i portatori sani di beta-talassemia sono stimati in circa 2,5 milioni con circa 7.000 affetti da talassemia major. E' stimato inoltre che la frequenza dei portatori di beta-talassemia nella regione Lazio è dell'ordine del 3-4% (circa 200.000 portatori sulla base del censimento 2014 sulla popolazione residente nel Lazio, dei quali circa 100.000 in età riproduttiva). Il modello di trasmissione autosomico recessivo (AR) di queste patologie permette di distinguere il soggetto non affetto eterozigote (portatore sano) ed il soggetto malato omozigote o eterozigote composto. L'espressione fenotipica delle sindromi talassemiche è estremamente eterogenea. I tre quadri clinici più frequenti sono:

- forma silente (portatore di talassemia eterozigote)
- forma intermedia (talassemia intermedia)
- forma grave (talassemia major)

Nelle talassemie la riduzione della sintesi delle catene globiniche ed il conseguente aumento di catene libere, conduce ad un quadro di anemia e di eritropoiesi inefficace che può manifestarsi con quadri di differente gravità. Sulla base del tipo di catena mancante o ridotta si distinguono alfatalassemie, beta-talassemie, delta-beta talassemie e Persistenza Ereditaria di Emoglobina Fetale.

**Test diagnostici.** Le emoglobinopatie sono tra le poche patologie recessive monogeniche in cui è possibile identificare lo stato di “portatore sano” con test ematologici e biochimici (test di I livello) piuttosto che con l'analisi del DNA (test di II livello). Le indagini di **I livello** permettono di ottenere una diagnosi in circa il 95% dei casi, che è essenzialmente una diagnosi “presuntiva”.

PERCORSO DIAGNOSTICO EMOGLOBINOPATIE	PG.....	Rev.0 del 20.06.2019	Pag. 2 di 9
--------------------------------------	---------	-------------------------	-------------

I fenotipi dei quadri classici di talassemia possono essere facilmente definiti dal laboratorio di I livello, mentre la contemporanea presenza di difetti emoglobinici differenti può dare origine a fenotipi misti di complessa definizione da parte del laboratorio di I livello. È dunque importante capire come e quando passare da indagini preliminari a studi successivi, in un'ottica di appropriatezza, efficacia economica e sostenibilità del sistema, garantendo il raggiungimento di una corretta diagnosi.

I soggetti diagnosticati sulla base dei dati biochimici come “portatori eterozigoti di tratto talassemico” non necessitano di ulteriori indagini molecolari tranne nel caso di:

- coppie a rischio (due portatori)
- giovani coppie in cui un partner è portatore e l'altro presenti valori ematologici ai limiti della norma
- adulto con tratto talassemico diagnosticato, in cui il fenotipo ematologico si aggrava nel tempo

L'indagine genetica deve essere sempre eseguita, invece, nei pazienti affetti da talassemia major ed intermedia diagnosticata con gli esami biochimici.

In generale si ricorre al laboratorio di II livello:

- nel caso in cui lo studio di I livello non risulti esaustivo (fenotipi complessi)
- nel sospetto di portatore di alfa-talassemia
- per eseguire la Diagnosi Prenatale (DP) e/o la Diagnosi Pre-Implanto (PGD)
- per valutare neonati, nati da coppie a rischio che non hanno eseguito la DP

I geni che codificano per i due diversi tipi di catene globiniche  $\alpha$  e  $\beta$  sono organizzati in due raggruppamenti, detti *cluster* globinici. Sono state descritte in letteratura più di 200 mutazioni che causano beta-talassemia, la maggior parte delle quali costituite da sostituzioni di un singolo nucleotide. Per le alfa-talassemie invece sono riportate più di 80 mutazioni, molte delle quali costituite da delezioni o riarrangiamenti a carico del *cluster* dei geni alfa.

Le diverse mutazioni hanno una distribuzione geografica peculiare, ma il cambiamento delle condizioni epidemiologiche, causato dai continui flussi migratori, ha portato ad un aumento della frequenza di varianti rare non endemiche del nostro territorio.

PERCORSO DIAGNOSTICO EMOGLOBINOPATIE	PG.....	Rev.0 del 20.06.2019	Pag. 3 di 9
--------------------------------------	---------	-------------------------	-------------

## 2. OBIETTIVO E SCOPO

Offrire alle coppie afferenti alla ASL ROMA 1:

- Un programma di screening per l'identificazione del portatore di alfa e beta talassemia nell'ambito dei percorsi di procreazione medicalmente assistita per garantire l'accesso delle coppie ai programmi di diagnosi prenatale, prevenzione, cura e follow-up dei soggetti affetti e portatori di emoglobinopatia.
- Un percorso di prevenzione per le coppie all'inizio della gravidanza (Esami I Livello + consulenza genetica).

## 3. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il Percorso Diagnostico si offre alle coppie afferenti ai Centri PMA della ASL Roma 1 nell'ambito dei programmi di screening. Si offre alle donne in gravidanza afferenti ai Centri Prelievo della ASL Roma 1 che richiedono la ricerca delle Emoglobine patologiche (Esami di I livello + eventuale consulenza genetica). Sono coinvolti gli operatori della UOC di Patologia Clinica, della UOSD di Genetica Medica, della UOSD Procreazione Medicalmente Assistita SFN e CSA, della UOSD Ematologia.

## 4. RISULTATI ATTESI

- Garantire l'accesso sul territorio della ASL ROMA 1 ad un percorso coordinato di diagnosi di I e II livello per le emoglobinopatie
- Offrire alle coppie afferenti ai percorsi di PMA dell'Azienda programmi di diagnosi prenatale, prevenzione, presa in carico e follow-up dedicati.

## 5. PROTOCOLLO DIAGNOSTICO

### 5.1. Accesso dell'utente:

- PMA - L'utente afferisce ai Centri PMA San Filippo Neri (SFN) e Centro Sant'Anna (CSA) per iniziativa personale o invio da servizi territoriali.
- Recup - L'utente afferisce all'Ambulatorio di Genetica Medica attraverso prenotazione Recup.

### 5.2. Indagini di I livello:

La coppia esegue presso il CSA nella stessa mattina il prelievo per gli esami di I livello e la visita genetica (compilazione della Scheda Informazioni – Allegato A).

Gli esami di I LIVELLO sono eseguiti presso il Laboratorio HUB UOC Patologia clinica - PO San Filippo Neri:

PERCORSO DIAGNOSTICO EMOGLOBINOPATIE	PG.....	Rev.0 del 20.06.2019	Pag. 4 di 9
--------------------------------------	---------	-------------------------	-------------

90.62.2	EMOCROMO: Hb, GR, GB, HCT, PLT, IND. DERIV., F. L.	EMOCROMO (Hb, GR, GB, HCT, PLT, IND. DERIV., F. L.)
90.22.3	FERRITINA [P/(Sg)Er]	FERRITINA [P]
90.22.5	FERRO [S]	FERRO [S]
90.42.5	TRANSFERRINA [S]	TRANSFERRINA [S]
90.66.3	Hb - EMOGLOBINA A2	Hb - EMOGLOBINA A2
90.66.4	Hb - EMOGLOBINA FETALE (Dosaggio)	Hb - EMOGLOBINA FETALE (Dosaggio)
90.66.5	Hb - EMOGLOBINE ANOMALE (HbS, HbD, HbH, ecc.)	Hb - EMOGLOBINE ANOMALE (HbS, HbD, HbH, ecc.)

Qualora le indagini di I livello depongano per un sospetto di portatore di talassemia o non giungano a conclusioni il laboratorio di Patologia clinica fornirà indicazioni per procedere ad una valutazione specialistica in consulenza genetica (contatto: [genetica.clinica@aslroma1.it](mailto:genetica.clinica@aslroma1.it)).

### 5.3. Consulenza Genetica:

- Nell'ambito dei percorsi di PMA dell'ASL ROMA 1 le coppie che non siano in possesso di certificazione di assenza dello stato di portatore ottenuto nell'ambito dello screening scolastico o di ulteriori programmi di approfondimento diagnostico verranno inviate in consulenza genetica per la raccolta dei dati anamnestici e biochimici fondamentali per l'interpretazione dei dati biochimici ottenuti con le analisi di I livello.

- In caso di accertamento dello stato di portatore o di paziente affetto da emoglobinopatia la presa in carico includerà il calcolo del rischio riproduttivo, la valutazione delle opzioni di monitoraggio delle eventuali gravidanze e lo screening a cascata sui familiari di primo grado a rischio personale o riproduttivo.

- L'accesso al servizio di Consulenza Genetica potrà essere richiesto nel caso in cui la presa in carico ematologica e le indagini di I livello vengano effettuate in strutture territoriali o Aziende Ospedaliere differenti rispetto alla struttura di riferimento.

### 5.4. Indagini di II livello:

- In casi specifici, selezionati come riportato nel paragrafo 'test diagnostici', si procederà agli accertamenti di II livello (ricerca di mutazioni puntiformi e/o di riarrangiamenti genici a carico dei cluster alfa e beta globinici mediante Reverse Dot Blot-RDB, sequenziamento diretto del gene HBB, Multiplex Ligation Probe Amplification-MLPA, ecc.).

PERCORSO DIAGNOSTICO EMOGLOBINOPATIE	PG.....	Rev.0 del 20.06.2019	Pag. 5 di 9
--------------------------------------	---------	-------------------------	-------------

Gli esami di II LIVELLO sono eseguiti presso la UOSD Genetica Medica – Centro Sant’Anna:

91.36.5	ESTRAZIONE DI DNA O DI RNA (nucleare o mitocondriale) Da sangue periferico, tessuti, colture cellulari, villi coriali	ESTRAZIONE DI DNA O DI RNA (nucleare o mitocondriale) Da sangue periferico, tessuti, colture cellulari, villi coriali
91.30.1	ANALISI DI MUTAZIONI DEL DNA Con Reverse Dot Blot (da 2 a 10 mutazioni)	ANALISI DI MUTAZIONI DEL DNA. Con Reverse Dot Blot (da 2 a 10 mutazioni)
91.30.2	ANALISI DI POLIMORFISMI (str, VNTR) Con reazione polimerasica a catena ed elettroforesi (per locus)	ANALISI DI POLIMORFISMI (str, VNTR). Con reazione polimerasica a catena ed elettroforesi (per locus)
91.30.3	ANALISI DI SEGMENTI DI DNA MEDIANTE SEQUENZIAMENTO (Blocchi di circa 400 bp)	TIPIZZAZIONE GENOMICA. Inclusa estrazione, amplificazione, sequenziamento

- In caso di conferma del sospetto biochimico mediante indagine genetica verrà eseguita una consulenza genetica per la consegna dei risultati e il rilascio di una certificazione univoca sullo stato di malattia o di portatore, che consentirà l’inserimento in programmi di diagnosi prenatale mirati per il supporto alle scelte riproduttive.

- Nei casi che lo richiedono al paziente sarà consigliata la consulenza ematologica che consentirà, ove necessario, l’inserimento del paziente in piani terapeutici-assistenziali dedicati.

- Questo percorso diagnostico consente di approfondire la diagnosi delle Beta-Talassemie in circa il 98% dei casi (Origina R. Beta-Thalassemia. 2000 Sep 28 [Updated 2018 Jan 25]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1426/>) e delle Alfa- Talassemie in circa il 90% dei casi (Origina R, Moi P. Alpha-Thalassemia. 2005 Nov 1 [Updated 2016 Dec 29]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1435/>) Nei rari casi che non sono diagnosticati in modo definitivo si invia il paziente a Laboratori di riferimento nazionale secondo l’indicazione derivante dai test di II Livello.

### 5.5. Diagnosi Prenatale e/o Diagnosi Pre-Impianto:

PERCORSO DIAGNOSTICO EMOGLOBINOPATIE	PG.....	Rev.0 del 20.06.2019	Pag. 6 di 9
--------------------------------------	---------	-------------------------	-------------

- In caso di aumento del rischio riproduttivo alle coppie verrà messa a disposizione la possibilità di effettuare una diagnostica fetale completa grazie alla collaborazione con i centri di PMA afferenti all'azienda e con il centro di Diagnosi Prenatale del Centro Sant'Anna.

## 6. INDICATORI

- Numero di coppie seguite presso i centri PMA che aderiscono al Percorso/Numero totale di coppie seguite presso gli stessi centri
- Numero di Esami di I Livello + Valutazione Patologia clinica
- Numero di Consulenze genetiche pre-test
- Numero di Esami di II Livello (test genetici)
- Numero di Consulenze genetiche post-test
- Numero di Visite Ematologiche
- Numero di invii a Laboratori di Riferimento Nazionali

## 7. REVISIONE

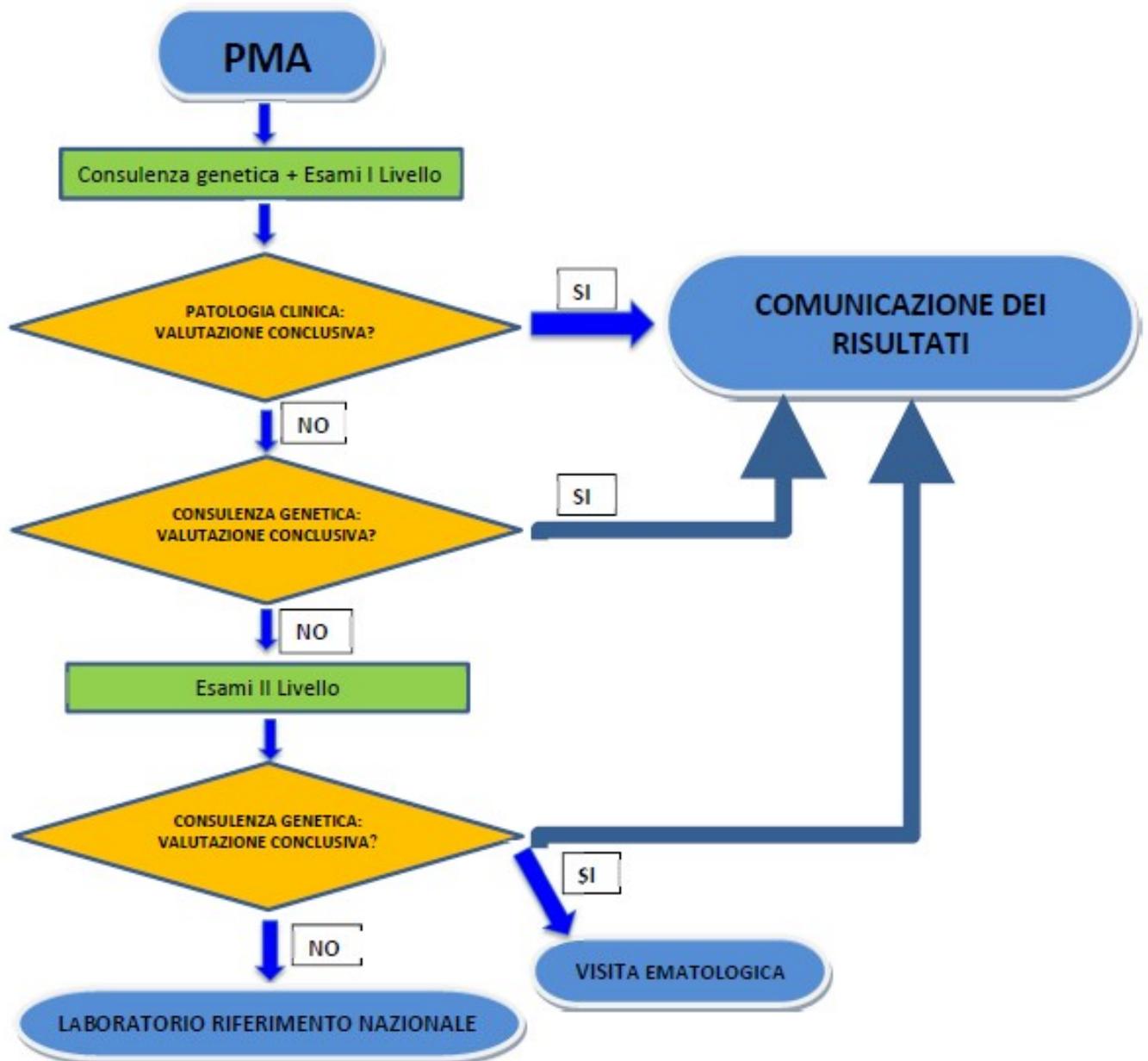
Il Gruppo di Lavoro del Percorso Diagnostico delle Emoglobinopatie (GdL PD-E), multidisciplinare e plurispecialistico, si riunisce con una frequenza bimestrale e valuta, anche con lo strumento dell'audit, eventuali modifiche al documento.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Ivaldi G, Barberio G. Raccomandazione per la diagnostica di primo livello delle emoglobinopatie della Società Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie. Collana Scientifica SITE, N. 1, 2012. [http://www.siteitalia.org/file/collana\\_scientifica/libretto\\_1\\_2014/index.php](http://www.siteitalia.org/file/collana_scientifica/libretto_1_2014/index.php)
- Le emoglobinopatie in Italia. Parte II: Prevenzione e diagnostica di laboratorio Giuseppina Barberio, Giovanni Ivaldi
- Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL, Old JM, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. Eur J Hum Genet 2015;23:426-37.
- Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. Br J Haematol 2010;149:35-49.

PERCORSO DIAGNOSTICO EMOGLOBINOPATIE	PG.....	Rev.0 del 20.06.2019	Pag. 7 di 9
--------------------------------------	---------	-------------------------	-------------

## Percorso Diagnostico Emoglobinopatie ASL Roma 1



PERCORSO DIAGNOSTICO EMOGLOBINOPATIE	PG.....	Rev.0 del 20.06.2019	Pag. 8 di 9
--------------------------------------	---------	-------------------------	-------------

## Scheda Informazioni (ALLEGATO A)

Medico/Centro di riferimento:.....Contatti:.....

### Partner 1 (♀)

Cognome.....Nome.....Data di Nascita.....

Origine etnica: Padre..... Madre.....

Sottoposto a precedente programma di screening  sì (anno certificazione .....)  no  non so

#### INDAGINI BIOCHIMICHE:

Eseguite il ..... Età .....

GR:.....Mil/mmc Hb:.....g/dl Hct:.....% MCV:.....fl

Sideremia:..... µg/dl Ferritina:.....ng/ml Transferrina:.....mg/dl

Reticolociti:.....Num/mmc

Elettroforesi delle emoglobine:

HbA:..... HbA2:..... HbF:..... Altre Hb:.....

Commenti:.....

### Partner 2 (♂)

Cognome.....Nome.....Data di Nascita.....

Origine etnica: Padre..... Madre.....

Sottoposto a precedente programma di screening  sì (anno certificazione .....)  no  non so

#### INDAGINI BIOCHIMICHE:

Eseguite il ..... Età .....

GR:.....Mil/mmc Hb:.....g/dl Hct:.....% MCV:.....fl

Sideremia:..... µg/dl Ferritina:.....ng/ml Transferrina:.....mg/dl

Reticolociti:.....Num/mmc

Elettroforesi delle emoglobine:

HbA:..... HbA2:..... HbF:..... Altre Hb:.....

Commenti:.....

PERCORSO DIAGNOSTICO EMOGLOBINOPATIE	PG.....	Rev.0 del 20.06.2019	Pag. 9 di 9
--------------------------------------	---------	-------------------------	-------------