Diagnostica di I e II livello delle Emoglobinopatie
Buone Pratiche SITE

SOCIETA' ITALIANA TALASSEMIE
ED EMOGLOBINOPATIE

www.site-italia.org

Contatti

Società Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie
e-mail: segreteriascientifica@site-italia.org – segreteriasite@ercongressi.it

Sponsors/Funding

Per la stesura del presente documento non è stato ricevuto alcun finanziamento esterno. Gli autori hanno dichiarato di non avere conflitti di interesse finanziari, professionali o di altro tipo, connessi agli argomenti trattati nel presente documento. Nel caso in cui un autore avesse dichiarato di avere conflitti di interesse rilevanti, era stato previsto di applicare la seguente procedura: piena partecipazione ai lavori, con disclosure pubblica dell'interesse.

Nota per gli utilizzatori

Il presente documento di Buone Pratiche (BP) rappresenta lo strumento attraverso il quale trasferire le conoscenze elaborate dalla ricerca biomedica nell'agire clinico quotidiano.
Le BP si basano sugli standard internazionali di analisi a cui si riferiscono in maniera critica e contestualizzata: tali standard devono potersi esprimere, per ogni singolo caso, sulla base delle informazioni cliniche disponibili, delle preferenze espresse dai pazienti e delle altre circostanze di contesto, accuratamente vagliate alla luce dell'expertise dei professionisti sanitari. Spetta, pertanto, alla competenza e al discernimento dei professionisti, in attento ascolto delle istanze particolari e in considerazione dei valori espressi dai pazienti, stabilire quali procedure o trattamenti siano più appropriati per la gestione dei singoli casi clinici.

Data di pubblicazione:
Luglio 2026

Gruppo di sviluppo

Gian Luca Forni (Coordinatore)
Società Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie - Cagliari
FOndazione per la **R**icerca sulle **An**emie ed **EM**oglobinopatie in **I**tali**A** - **For Anemia** – Genova
Giorgia Mandrile
SSD Microcitemie – AOU S. Luigi Gonzaga – Orbassano (TO)
Silverio Perrotta
Ematologia ed Oncologia Pediatrica
D.A.I. Materno Infantile
AOU Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli" - Napoli
Saverio Scianguetta
Ematologia ed Oncologia Pediatrica
D.A.I. Materno Infantile
AOU Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli" - Napoli
Roberta Russo
Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italia; e CEINGE Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore, Napoli
Immacolata Andolfo
Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italia; e CEINGE Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore, Napoli
Valentina Guida
1) UOC Laboratorio di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini, Roma
2) Genetica Medica, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma
3) Unità di Genetica Medica, Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy.
Antonia Gigante
Società Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie - Cagliari
FOndazione per la **R**icerca sulle **An**emie ed **EM**oglobinopatie in **I**tali**A** - **For Anemia** - Genova

Revisori

Susanna Barella

SSD Talassemia-Ospedale Pediatrico Microcitemico A.Cao- Cagliari

Antonino Giambona

UOC di Ematologia e Malattie Rare del Sangue e degli Organi Emopoietici
A.O.O.R. Villa Sofia-Cervello - Palermo

Michela Grosso

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II; CEINGE Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore, AOU Federico II, Napoli

Con il contributo del Prof. Aurelio Maggio e del Prof. Antonio Giulio Piga.

Dichiarazione di conflitti di interesse

I componenti del GdL dichiarano di non avere interessi economici o non economici in competizione con i contenuti e le finalità del presente documento.

1. Premessa

Il presente documento rappresenta una revisione e un aggiornamento delle raccomandazioni pubblicate nel 2022 dalla Società Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie (SITE), con l'obiettivo di fornire una linea comune su tutto il territorio nazionale per l'identificazione dei portatori di emoglobinopatie e per la diagnosi prenatale di queste patologie.

La revisione è stata condotta alla luce delle più recenti evidenze scientifiche disponibili e delle nuove indicazioni emerse nella pratica clinica, con l'intento di integrare e aggiornare le precedenti raccomandazioni, mantenendone l'impianto metodologico e i principi fondamentali.

Le presenti raccomandazioni si basano sulle precedenti raccomandazioni SITE(1) sulla letteratura disponibile e si configurano come complementari alle principali linee guida internazionali di riferimento, tra cui:

- EMQN (2), Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis (3);
- The ENERCA Recommendations for preconceptional or antenatal screening, prenatal diagnosis and genetic counselling of haemoglobinopathies (4);
- Joint SOGC-CCMG Opinion for Reproductive Genetic Carrier Screening: An Update for All Canadian Providers of Maternity and Reproductive Healthcare in the Era of Direct-to-Consumer Testing (5);
- UK NHS Sickle Cell and Thalassaemia screening programme, UK NHS Sickle Cell and thalassaemia handbook for laboratories (6).

L'approccio basato sull'evidenza del presente documento faciliterà il rapido aggiornamento delle raccomandazioni, le quali saranno aggiornate ogni volta siano disponibili nuove prove.
In ogni caso l'aggiornamento del documento avverrà ogni 3 anni.
La presente BP è organizzata in due grandi sezioni:

- I TEST DI I LIVELLO
- I TEST DI II LIVELLO
- N. 2 Appendici:
    - APPENDICE 1, nella quale sono riportati gli esempi dei percorsi diagnostici dalla nascita e nell'adulto.
    - APPENDICE 2, nella quale è riportata la Tabella di orientamento alla diagnosi prenatale. Per le raccomandazioni di diagnosi prenatale sono stati consultati 5 esperti italiani in questo ambito e per ogni indicazione è stato riportato il grado di concordanza tra gli esperti. Il fenotipo atteso è stato proposto sulla base dei dati presenti in letteratura e gli esperti consultati si sono dichiarati concordi con la definizione proposta.

1. PREMESSA 4

2. METODI 6

2.1 CHI HA ELABORATO LE BUONE PRATICHE BP 6
2.2 FASI DI SVILUPPO DEL DOCUMENTO 6

3. LE EMOGLOBINOPATIE 9

3.1 LE SINDROMI TALASSEMICHE 9
3.2 LE SINDROMI FALCEMICHE 10
3.3 GLI ETEROZIGOTI COMPOSTI 11
3.4 EMOGLOBINE INSTABILI ED EMOGLOBINE AD ALTERATA AFFINITÀ PER L'OSSIGENO 11
3.5 PERSISTENZA DELL'EMOGLOBINA FETALE 11

4. RAZIONALE 12

5. I TEST DI PRIMO LIVELLO 14

5.1 EMOCROMO 16
5.2 SEPARAZIONE DELLE EMOGLOBINE 18
5.2.1 Emoglobina A2 18
5.2.2 Emoglobina Fetale 22
5.2.3 Le varianti Hb 24
5.3 STATO MARZIALE ED EMOGLOBINOPATIE 25

6. I TEST DI SECONDO E TERZO LIVELLO 27

6.1 ANALISI MOLECOLARE 27
6.2 DIAGNOSI PRENATALE (DPN) 32
6.3 VILLOCENTESI 34
6.4 AMNIOCENTESI 35
6.5 CORDOCENTESI 35
6.6 CELOCENTESI 35
6.7 ANALISI MOLECOLARE IN DPN 35
6.8 DNA FETALE CIRCOLANTE (CFFDNA) 36
6.9 DIAGNOSI GENETICA PREIMPIANTO (PGT) 36
6.10 DONAZIONE DI GAMETI 36

7. CONSENSO INFORMATO ALLE INDAGINI 37

8. REFERTAZIONE 37

9. VEQ – AUDIT 38

10. APPENDICE 1: ESEMPI DI PERCORSI DIAGNOSTICI 39

10.1 PERCORSI DIAGNOSTICI DALLA NASCITA 39
10.2 PERCORSI DIAGNOSTICI NELL'ADULTO 41

11. APPENDICE 2: TABELLA DI ORIENTAMENTO ALLA DIAGNOSI PRENATALE 44

12. BIBLIOGRAFIA 46

2. Metodi

La Società Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie (SITE) ha promosso un aggiornamento del presente documento di Buone Pratiche, con l'obiettivo di integrare, mediante un approccio sistematico, le evidenze scientifiche più recenti con le opinioni degli esperti, al fine di mantenere un adeguato grado di consenso sulle raccomandazioni per la pratica clinica. Il presente documento rappresenta quindi una revisione della versione precedentemente pubblicata nel 2022, aggiornata alla luce delle nuove evidenze disponibili.

Si precisa che il presente aggiornamento non ha comportato modifiche sostanziali alle raccomandazioni precedentemente formulate, che restano invariate nei contenuti e nella loro forza. Le modifiche apportate riguardano esclusivamente aspetti formali, editoriali e di aggiornamento della letteratura, inclusa la revisione della punteggiatura, della terminologia e della chiarezza espositiva del testo.

2.1 Chi ha elaborato le Buone Pratiche BP

Il Comitato Direttivo CD SITE ha confermato ed integrato un gruppo multidisciplinare e multi-professionale costituito da esperti in emoglobinopatie, specialisti in genetica medica, ed esperti di laboratorio, affiancati da figure con competenze metodologiche e organizzative, con l'obiettivo di sviluppare raccomandazioni basate sull'integrazione delle evidenze scientifiche disponibili unitamente al parere degli esperti, a supporto della pratica clinica.

Il gruppo di lavoro è stato inoltre integrato con nuovi autori, selezionati tra esperti di riconosciuta esperienza a livello nazionale e internazionale nel campo della genetica delle emoglobinopatie, al fine di rafforzare le competenze scientifiche del panel e garantire un aggiornamento qualificato dei contenuti, in particolare per gli aspetti genetico-molecolari.

2.2 Fasi di sviluppo del documento

Fase 1: scopo, panel, ricerca bibliografica

Il CD SITE ha individuato i membri del panel multidisciplinare. Il progetto ha seguito un approccio sistematico mutuando l'approccio del Manuale metodologico per la produzione di linee guida di pratica clinica, a cura del Centro Nazionale per l'Eccellenza Clinica, la Qualità e la Sicurezza delle Cure (CNEC) (7).

Il metodo alla base del manuale metodologico è il sistema Grade unitamente alla sua evoluzione GRADE-ADOLOPMENT (8) che consente di valutare se è sufficiente un adattamento al contesto o l'adozione di raccomandazioni già esistenti per rispondere a determinati quesiti.

Questo approccio ha permesso al *panel* di utilizzare linee guida già esistenti e di contestualizzarle alla popolazione *target* producendo raccomandazioni formulate specificatamente per le emoglobinopatie.

Nell'ambito dell'aggiornamento è stata condotta una revisione della letteratura con l'obiettivo di identificare eventuali nuove evidenze rilevanti pubblicate successivamente alla versione del 2022.

La ricerca bibliografica è stata effettuata utilizzando strategie di ricerca strutturate, basate su combinazioni di termini MeSH e termini liberi, tra cui: *thalassemia, sickle, hemoglobinopathies, diagnosis, screening, carrier screening, heterozygosis, heterozygotes, heterozygous, HbA2, MCV, false positive, screening limit, limitation, cut off*.

Sono stati applicati filtri per tipologia di studio (revisioni sistematiche, linee guida, review) e lingua (inglese). La ricerca ha incluso la letteratura disponibile fino al 30 giugno 2026, definito come cut-off temporale della ricerca bibliografica.

Le banche dati consultate hanno incluso PubMed/MEDLINE, EMBASE e Cochrane Library. Sono stati inoltre analizzati documenti e raccomandazioni disponibili sui siti istituzionali di WHO, NHS, CDC, ACOG e UpToDate.

La ricerca è stata completata mediante revisione manuale delle referenze degli articoli selezionati e mediante consultazione degli esperti del panel per l'identificazione di eventuali ulteriori contributi rilevanti.

Due autori indipendenti hanno valutato i full-text degli articoli selezionati ed effettuato l'estrazione delle evidenze e delle raccomandazioni pertinenti. Le evidenze identificate sono state confrontate con le raccomandazioni già presenti nella versione del 2022.

La revisione della letteratura non ha evidenziato elementi tali da modificare le raccomandazioni esistenti; pertanto, il panel ha ritenuto di confermare integralmente le indicazioni precedentemente formulate.

Le risultanze della revisione sono state discusse nel corso di riunioni plenarie del panel, svolte in modalità virtuale. Il consenso sulle raccomandazioni è stato mantenuto attraverso un processo informale di discussione e condivisione tra gli esperti.

Fase 2: definizione del testo, revisione, pubblicazione, aggiornamento

Il testo del documento è stato revisionato con l'obiettivo di migliorarne la chiarezza, la coerenza interna e l'uniformità terminologica. Le modifiche hanno riguardato esclusivamente aspetti editoriali, inclusi revisione della punteggiatura, semplificazione sintattica e armonizzazione del linguaggio, senza alterare il contenuto sostanziale delle raccomandazioni.

La versione aggiornata è stata sottoposta a revisione interna ed esterna da parte di esperti indipendenti. I commenti ricevuti sono stati analizzati dal panel degli autori, che ha apportato le modifiche ritenute appropriate.

Il documento sarà aggiornato periodicamente, indicativamente con cadenza triennale o in presenza di nuove evidenze rilevanti. Gli aggiornamenti seguiranno la stessa metodologia adottata nella presente revisione, basata sull'approccio GRADE e GRADE-ADOLOPMENT.

Una volta ritenuto idoneo per la pubblicazione, il documento sarà pubblicato sul sito web SITE, presentato nei principali convegni nazionali e internazionali in ambito di emoglobinopatie e sottoposto per la pubblicazione a riviste peer-reviewed.

3. Le Emoglobinopatie

L'emoglobina è la molecola responsabile del trasporto di ossigeno e anidride carbonica nell'organismo ed è formata da quattro catene proteiche. Nel soggetto adulto l'assetto emoglobinico è composto da HbA (α2β2) che rappresenta il 95%-98% dell'emoglobina totale dell'adulto ed è formata da due catene di tipo alfa (codificate da 4 geni sul cromosoma 16) e due catene di tipo beta (codificate da 2 geni sul cromosoma 11); HbA2 (α2δ2) che rappresenta il 2%-3% dell'emoglobina totale ed è formata da 2 catene di tipo alfa e due di tipo delta e HbF (α2γ2) che rappresenta il 0,5%-2% dell'emoglobina totale dell'adulto ed è formata da due catene di tipo alfa e due di tipo gamma. L'HbF è l'emoglobina prodotta dal feto durante la gravidanza e la sua produzione diminuisce progressivamente dopo la nascita per raggiungere i livelli fisiologici intorno agli 1-2 anni.

Le emoglobinopatie rappresentano le malattie congenite più frequenti su scala mondiale: circa il 7% della popolazione mondiale è portatore di un difetto ereditario dell'emoglobina. La maggior diffusione si aveva nella fascia temperata del mondo là dove era/è presente la malaria in quanto l'essere portatore di alcune forme di Emoglobinopatie quali Talassemia o Falcemia dava una maggior resistenza nei confronti dell'infezione malarica. I flussi migratori hanno poi diffuso le Emoglobinopatie in tutto il mondo. Ogni anno nel mondo nascono circa 60.000 soggetti affetti da beta talassemia e 300.000 da Falcemia. In Italia le Emoglobinopatie sono endemiche con un'originaria collocazione nelle zone ex malariche quali delta del Po, meridione e Isole Maggiori per le talassemie e Sicilia per la Falcemia; sono circa 10.000 le persone affette. Il meccanismo di trasmissione di queste forme è autosomico recessivo. Possiamo suddividere le Emoglobinopatie in forme nelle quali il difetto molecolare causa un deficit quantitativo di sintesi delle catene emoglobiniche, rappresentate principalmente dalle **Sindromi Talassemiche**, e forme nelle quali il difetto molecolare causa un danno strutturale qualitativo, rappresentate principalmente dalle **Sindromi Falcemiche**. Difetti qualitativi sono causa di un numero altissimo di **varianti emoglobiniche** (descritte oltre 1000), la maggior parte senza significato clinico, altre invece possono determinare la sintesi di **emoglobine instabili o emoglobine ad alterata affinità per l'ossigeno**. Inoltre sono note forme causate da difetti molecolari nel cluster genico della beta-globina, che impediscono la normale inattivazione della produzione di emoglobina fetale (HbF) dopo la nascita, chiamate **"persistenza ereditaria di emoglobina fetale" (HPFH).**

3.1 Le Sindromi Talassemiche

Le **Sindromi Talassemiche** sono caratterizzate da anemia cronica di gravità variabile conseguente a un difetto quantitativo nella produzione di emoglobina (9). A seconda di quali catene siano prodotte in difetto si parla di alfa o beta talassemia. I portatori del tratto beta talassemico allo stato eterozigote sono asintomatici e presentano una lieve anemia ipocromica microcitica. Sono state descritte più di 350 mutazioni, per lo più puntiformi, della β-talassemia alle quali viene comunemente assegnato un indice di gravità: β+ che denota mutazioni che causano una relativa riduzione della sintesi delle catene β-globiniche e β0 che si riferisce a mutazioni che causano una completa assenza di sintesi delle catene β-globiniche. Queste mutazioni possono presentarsi nei pazienti in omozigosi o eterozigosi composta ed influiscono sull'espressione fenotipica della

malattia. La mancata produzione di catene beta causa uno sbilanciamento e l'eccesso di catene alfa (emicromi) causa l'apoptosi degli eritroblasti con conseguente eritropoiesi inefficace.

La **beta talassemia** viene distinta a seconda della manifestazione clinica in Talassemia Trasfusione Dipendente (TDT) o Talassemia Major (morbo di Cooley) e Talassemia Non Trasfusione Dipendente (NTDT) o Talassemia Intermedia. Nella TDT si ha una grave anemia cronica trasfusione-dipendente che può manifestarsi fin dai primi mesi di vita (Talassemia Major), che porta a morte nella prima decade se l'anemia non viene corretta tramite regolari trasfusioni di globuli rossi. Nella NTDT, invece, il quadro clinico e l'età di esordio possono variare notevolmente e andare da uno stato simile a quello del portatore eterozigote alla necessità di trasfusioni occasionali a causa di circostanze specifiche (p. es., gravidanza, intervento chirurgico o infezione acuta) o trasfusioni frequenti ma per un periodo limitato. Le trasfusioni e l'aumentato assorbimento intestinale causano un accumulo di ferro che il nostro organismo non è in grado di eliminare. Il ferro in eccesso si accumula prevalentemente nel fegato, pancreas, ghiandole endocrine e cuore e l'effetto tossico su questi organi è causa di gravi complicanze e morte. La terapia trasfusionale associata alla terapia di rimozione del ferro in eccesso tramite farmaci chelanti e la recente approvazione della terapia genica per casi selezionati hanno consentito di evitare le complicanze cambiando la prognosi di queste patologie da rapidamente infausta a prognosi "aperta".

L'alfa talassemia può manifestarsi con quadri clinici di varia gravità (10). L'alterazione di 3 dei 4 geni causa una forma denominata Emoglobinosi H che può manifestarsi con un andamento clinico di NTDT o, raramente, TDT. L'emoglobina H è composta da tetrameri di catene beta, che hanno una minor capacità di legare l'ossigeno e sono instabili. La forma più grave e più rara è dovuta all'assenza di tutti e 4 i geni per le catene alfa e causa in genere la morte durante la gravidanza (idrope fetale) o subito dopo la nascita.

Esiste poi la possibilità che i geni alfa globinici siano triplicati o anche quadruplicati. Questa situazione comporta una aumentata sintesi delle catene alfa che, combinata ad una riduzione di sintesi dovuta ad una eterozigosi per beta talassemia, comporta uno sbilanciamento che si manifesta clinicamente con una forma di NTDT (9).

3.2 Le Sindromi Falcemiche

L'anemia falciforme (SCD) è un'alterazione qualitativa dell'emoglobina causata da una mutazione puntiforme nel gene della beta globina che porta alla sintesi dell'emoglobina patologica S (HbS).

In condizioni di scarsa ossigenazione la HbS anomala polimerizza, i globuli rossi si allungano e si incurvano, assumendo la caratteristica forma a falce, e si accumulano fino a ostruire la circolazione, causando crisi dolorose come le crisi vasocclusive (VOC) ed altre possibili conseguenze gravi (11).

I globuli rossi HbS hanno una durata di vita ridotta (~10-20 giorni), con conseguente anemia emolitica cronica. Anche per la SCD è stata recentemente approvata la terapia genica per casi selezionati.

La Sindrome Falcemica può essere causata da omozigosi per HbS o da eterozigosi composte della HbS con Beta Thal o HbC o HbD o altre varianti emoglobiniche.

Gli eterozigoti per HbS, in condizioni estreme, possono avere sintomatologia vasoocclusiva, per cui si raccomandano particolari cautele (12,13).

3.3 Gli eterozigoti composti

Con il termine di eterozigoti composti si intende la presenza di difetti molecolari differenti sui due alleli globinici. I fenotipi clinici associati sono variabili a seconda del difetto, da lievi a gravi, e possono essere diagnosticati in base a comportamenti anomali da un punto di vista funzionale, elettroforetico e/o cromatografico.

L'eterozigosi composta per HbS e beta talassemia, una delle eterozigosi composte più frequentemente osservate, è all'origine di una condizione patologica importante (talassodrepanocitosi o microdrepanocitosi) clinicamente eterogenea anche in rapporto alla mutazione talassemica presente (β+ o β0). Se la mutazione è β0 il paziente ha in circolo solo HbS, e quindi clinicamente sarà del tutto sovrapponibile al paziente omozigote HbS, ma risulterà microcitemico perché ha la mutazione beta talassemica. Se la mutazione invece è β+ il paziente produrrà una quota di HbA e quindi presenterà un quadro clinico più lieve rispetto al paziente Hb SS o HbS/β0 e può risultare microcitemico in base al tipo di mutazione del gene beta.

Sono clinicamente rilevanti anche le eterozigosi composte:

- HbC/beta talassemia: si presenta clinicamente in maniera molto eterogenea, da forme lievi a forme gravi.
- HbS/HbC: di solito determina un quadro clinico di minore gravità rispetto al soggetto omozigote HbSS
- Hb E/beta talassemia: la variante HbE è molto comune nel Sud-Est asiatico, raggiungendo un picco di frequenza del 70% nel nord della Tailandia. Quando un individuo eredita l'HbE da un genitore ed una mutazione del gene beta dall'altro genitore, si ha un quadro clinico di NTDT o TDT.

3.4 Emoglobine Instabili ed Emoglobine ad alterata affinità per l'ossigeno

L'effetto della sostituzione di un amminoacido nell'Hb può essere predetto in base alla localizzazione della sostituzione nella proteina. L'HbS rappresenta un'eccezione a questa regola, ma normalmente un cambio nei residui aminoacidici sulla superficie è innocuo in quanto molti di questi residui non hanno specifici ruoli funzionali. La sostituzione di un residuo interno, viceversa, può destabilizzare la molecola dell'Hb rendendola instabile e causando un'anemia emolitica di varia gravità. Alterazioni del sito che lega l'O_2 eliminano la capacità di legare ossigeno della subunità alterata, causando la formazione di metaemoglobine (indicate con la sigla HbM), responsabili della metaemoglobinemia, caratterizzata da colorito cianotico conseguente alla presenza di deossiHb nelle loro arterie. Le sostituzioni a livello dei contatti α1-β2 comportano modificazioni della struttura quaternaria dell'emoglobina con, in alcuni casi, un'affinità per l'ossigeno aumentata e conseguente minor rilascio ai tessuti. Gli individui portatori di queste varianti emoglobiniche tendono a compensare l'ipossia periferica aumentando la produzione di eritrociti nel sangue con conseguente eritrocitosi.

3.5 Persistenza dell'emoglobina fetale

La persistenza ereditaria dell'emoglobina fetale (HPFH) si caratterizza per livelli elevati di emoglobina fetale (HbF) al di fuori del periodo neonatale. La prevalenza di questa forma non è nota. La HPFH è dovuta a

delezioni nel cluster genico della beta-globina o a mutazioni puntiformi nei geni HBG1 e HBG2 (11p15.5). La diagnosi si basa sulla presenza di un significativo aumento dell'HbF che varia tra 10 e 40% negli eterozigoti, con indici eritrocitari normali o quasi. La differenziazione tra la HPFH e la delta-beta talassemia è difficile: in genere nella HPFH sono presenti un normale MCV e MCH, mentre nella delta-beta talassemia si osserva microcitosi con ipocromia e la diagnosi può essere confermata dall'esame del DNA. La trasmissione della HPFH è codominante. L'associazione tra la HPFH e la beta talassemia attenua i sintomi clinici nei pazienti.

4. Razionale

Nel 2006 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (14) ha invitato gli stati membri a mettere a punto e a rinforzare programmi nazionali per la prevenzione e la cura dei pazienti con emoglobinopatia. Queste raccomandazioni indicano come scopo dello screening l'identificazione dei portatori sani al fine di ridurre il rischio di patologia grave nella progenie, offrendo loro un counselling genetico in cui possano essere discusse le opzioni per evitare la nascita di figli affetti.

Il portatore è definito come "un individuo che possiede in eterozigosi una mutazione in un gene che determina una patologia, individuo che è essenzialmente sano al momento dello studio" (15). Per le emoglobinopatie si tratta quindi di un soggetto sano, che viene sottoposto ad un protocollo di screening per una patologia autosomica recessiva (emoglobinopatia) che ha un'elevata morbilità.

Lo screening per malattie genetiche ha lo scopo di ridurre il carico della patologia sugli individui, riconoscendo i soggetti a rischio, fornendo loro informazioni circa il loro stato di salute e i potenziali rischi per la prole (16). In particolare, nelle emoglobinopatie lo screening consente di identificare soggetti a rischio, a cui verrà proposto un esame diagnostico di conferma, al fine di proporre un intervento (diagnosi precoce) che sia in grado di modificare il decorso clinico della patologia. Lo screening deve essere volontario (17), economicamente sostenibile e garantire un elevato valore predittivo positivo (16). Uno screening efficace è in grado di redistribuire risorse economiche dalla terapia dei malati alla valutazione preconcezionale del rischio riproduttivo; alcuni studi hanno dimostrato che lo screening prenatale per emoglobinopatie è una strategia con un vantaggioso rapporto costo/beneficio (18) (19).

Nella nostra popolazione lo screening per emoglobinopatie è giustificato dall'elevata frequenza di portatori nella popolazione (4% circa) (20), anche a seguito dei recenti fenomeni migratori. L'identificazione dei portatori deve essere seguita dall'indirizzamento degli stessi a una consulenza con uno specialista di settore con documentata esperienza nella cura delle emoglobinopatie (internista, ematologo, pediatra, genetista clinico) per completare le indagini diagnostiche di portatore e fornire le possibili opzioni di prevenzione, al fine di consentire alle coppie una scelta riproduttiva consapevole (16).

La consulenza deve essere offerta seguendo le generali raccomandazioni per la consulenza genetica, secondo le Linee-Guida per le Attività di Genetica Medica della Conferenza Stato-Regioni del 15 luglio 2004.

La spiegazione sul rischio, sulla patologia, sulle possibili opzioni di diagnosi prenatale deve essere chiara, non direttiva ed adeguata al livello socioculturale dei pazienti, al fine di consentire loro di capire i rischi, i limiti e

le potenziali conseguenze delle opzioni disponibili. La decisione finale deve essere della coppia, senza influenze esterne (21).

La diagnosi di portatore dovrebbe essere fatta idealmente in epoca preconcezionale o, al più tardi, nelle prime settimane di gravidanza in tutte le coppie (22), con l'obiettivo di concludere l'intero percorso di screening della coppia entro le 10-12 settimane di gestazione (3) al fine di garantire tutte le possibilità di scelta alla coppia (diagnosi prenatale, interruzione di gravidanza, preparazione alla nascita di un individuo affetto da emoglobinopatia, adeguata sorveglianza di una gravidanza con rischio di idrope fetale) (23).

L'identificazione dello stato di portatore potrebbe essere correlata con la percezione di uno stato di malattia, avere un impatto sul rapporto con il partner ed essere causa di discriminazione e stigmatizzazione. D'altra parte, la conoscenza dello stato di portatore potrebbe essere vissuta come un beneficio che consente la possibilità di compiere scelte riproduttive informate e autonome (23).

Il portatore di emoglobinopatia dovrebbe essere incoraggiato a comunicare ai familiari la possibilità che essi siano portatori e, di conseguenza, l'opportunità di sottoporsi a loro volta a screening (24).

Le emoglobinopatie sono tra le poche malattie genetiche in cui è possibile effettuare lo screening dei portatori con metodiche di laboratorio (ematologiche e biochimiche) relativamente a basso costo, che consentono di riservare la più costosa analisi del DNA solamente a soggetti selezionati.

È importante riconoscere prima della gravidanza o nelle prime settimane di gravidanza donne affette da emoglobinopatia (drepanocitosi, Hb SC, microdrepanocitosi, β-talassemia non trasfusione dipendente-NTDT, malattia da HbH) per controllare adeguatamente lo stato di salute della gestante (3).

Lo screening neonatale potrebbe essere in grado di individuare precocemente i neonati affetti da sindromi drepanocitiche (SCD). Può essere effettuato su campione di sangue derivante dalle cartine per lo screening metabolico o da sangue cordonale mediante HPLC o elettroforesi capillare. Lo screening neonatale sarebbe in grado di identificare anche altre varianti emoglobiniche (es. HbE) e la malattia da HbH, garantendo un adeguato counselling familiare. Alcune condizioni non sono evidenziabili dallo screening neonatale, come i portatori sani di alfa e beta talassemia, mentre altre possono essere sospettate a causa dell'assenza di HbA (3,25). L'emoglobina A è in genere rilevabile dopo le 30 settimane di gestazione; in caso di estrema prematuranza potrebbero non essere rilevabili l'HbA o varianti β-globiniche. In questi casi è necessario valutare la storia familiare.

Ad oggi non è possibile fornire raccomandazioni EBM univoche in merito all'efficacia dello screening neonatale in quanto non vi sono studi clinici che ne dimostrino un beneficio. I dati derivanti da review e analisi economiche suggeriscono che lo screening neonatale consente un precoce inizio dei controlli clinici e della terapia antibiotica preventiva che ha dimostrato di essere cruciale nel ridurre la mortalità per infezioni in SCD (26). Pertanto, si può ritenere utile lo screening neonatale in aree o Regioni ad alta prevalenza di SCD, valutando localmente i rapporti costi/benefici.

RACCOMANDAZIONI:

- Lo screening per emoglobinopatie andrebbe offerto in epoca preconcezionale o alla prima visita

ostetrica per coppie che non l'abbiano effettuato precedentemente (5). Lo screening per emoglobinopatie andrebbe offerto di routine nell'ambito degli esami effettuati per infertilità di coppia/procreazione medicalmente assistita (3). In caso di donazione di gameti sarebbe opportuno sottoporre a screening per emoglobinopatie il donatore (3).

- Coppie in cui sia stata posta diagnosi di portatore di emoglobinopatia in entrambi i partner dovrebbero essere indirizzate a consulenza specialistica il prima possibile, idealmente in epoca preconcezionale, o entro le 10 settimane di gravidanza, al fine di poter consentire alla coppia di accedere, se desiderato, alla diagnosi prenatale (5).
- A tutti i soggetti portatori di emoglobinopatie andrebbe offerta un'adeguata consulenza con uno specialista di settore con documentata esperienza nella cura delle emoglobinopatie (internista, ematologo, pediatra, genetista clinico), in cui possano essere illustrate la probabilità di trasmissione della patologia, la malattia, lo stato dell'arte della cura e le possibilità di diagnosi prenatale (5).

Gli esami di screening per emoglobinopatie (emocromo e assetto emoglobinico) possono essere prescritti in esenzione M00 (esami preconcezionali) ad entrambi i membri della coppia (27). Inoltre, le Linee Guida della Gravidanza fisiologica raccomandano informazioni e screening delle emoglobinopatie in tutte le donne entro le 10 settimane di gravidanza, se non effettuato in precedenza. Nel caso in cui la donna sia una sospetta portatrice, è prevista l'offerta di consulenza genetica e screening del padre biologico, al fine di offrire la diagnosi prenatale ove indicato (28).

Il medico di medicina generale/pediatra di libera scelta può inviare il paziente ad una valutazione specialistica in regime di esenzione dal pagamento delle spese sanitarie con il codice di esenzione R99. Infatti, in caso di malattia rara di origine ereditaria, per arrivare alla diagnosi della malattia del paziente, gli esami genetici eseguiti anche sui suoi familiari sono gratuiti. La talassemia e la drepanocitosi rientrano tra le malattie rare esentate dal SSN (esenzione RDG010: anemie ereditarie), pertanto i soggetti a rischio possono beneficiare dei necessari accertamenti diagnostici in regime di esenzione R99. Maggiori informazioni possono essere reperite su: http://www.iss.it/cnmr.

Il risultato dello screening per emoglobinopatie non si modifica nel tempo, pertanto può essere conservato e non ripetuto nel corso della vita.

5. I test di primo livello

I test di primo livello sono costituiti dalle analisi ematochimiche essenziali all'individuazione di uno stato di portatore o di affetto da una emoglobinopatia. Tali esami prevedono un approccio biochimico e possono, su indicazione dello specialista di settore, essere seguiti da indagini di conferma sul DNA. Spesso non coinvolgono solo il singolo soggetto esaminato ma vengono estese ai genitori e all'intera famiglia.

L'assetto emoglobinico è parte dei test di 1° livello e consente di separare e quantificare tutte le frazioni emoglobiniche presenti, utilizzando diversi metodi separativi di base (ad es. HPLC o CE, si veda di seguito).

Sebbene la diagnostica di 1° livello sia diffusa ormai in molti laboratori generali, la gestione del dato analitico complesso (talassemie allo stato omozigote o in eterozigosi composta, le varianti emoglobiniche rilevanti dal

punto di vista clinico) e la cura dei malati di emoglobinopatie in genere restano appannaggio di pochi centri clinici specialistici e di riferimento.

Per questo è opportuno che il Laboratorio abbia un ruolo centrale: come consulente, per quanto riguarda la parte diagnostica e di prevenzione, nei confronti dei medici prescrittori e di feedback continuo con i clinici dei Centri di cura. Il Laboratorio dunque deve svolgere un ruolo transizionale in quel processo clinico che va dalla diagnostica-prevenzione all'eventuale terapia e follow-up dei pazienti affetti.

Per quesito diagnostico si intende una richiesta formulata dal clinico finalizzata a concretizzare un'ipotesi diagnostica sulla base di elementi esibiti dal paziente (segni e sintomi clinici, indagini strumentali e/o di laboratorio, storia familiare).

Molte sono le ragioni che inducono i clinici a richiedere esami per emoglobinopatie; le più frequenti sono: microcitosi già accertata con indici marziali nella norma, familiarità per tali patologie, conferma di un sospetto clinico in presenza di marcata anemia, valori di ematocrito elevati, anemia emolitica non sferocitica, epoca preconcezionale (anche in percorsi di procreazione medicalmente assistita) o in gravidanza. Lo screening può essere esteso anche a programmi di prevenzione mirati, es. alla nascita in popolazioni a rischio, nei donatori di sangue o di midollo (29).

Ci sono circostanze nelle quali il test di 1° livello per le emoglobinopatie va differito nel tempo. In Tabella 1 sono riportate alcune situazioni che non permettono di procedere ad una richiesta appropriata di tale test; la mancata valutazione di tali condizioni può rendere non appropriati i test eseguiti nonché le relative conclusioni.

Tabella 1

ALCUNE CONDIZIONI NON IDONEE ALL'ESAME DI 1° LIVELLO LA CUI RICHIESTA RISULTEREBBE NON APPROPRIATA

a) Nei tre mesi successivi ad una trasfusione se non destinato al monitoraggio nei politrasfusi
b) In carenza marziale accertata di recente (*)
c) In terapia per grave carenza marziale non risolta (*)
d) In soggetti nei quali è già stata esclusa la beta talassemia e si vuole escludere anche l'alfa talassemia
e) Alla nascita per beta Talassemia eterozigote, Hb Lepore e delta-beta talassemia

(*) Salvo in quei casi in cui il contesto clinico richieda pressantemente l'esclusione di una mutazione di tipo alfa (con HbA2 normale o diminuita) o beta talassemica (HbA_2 aumentata), tenendo ben presente che il dato ottenuto non ha valore definitivo e va valutato criticamente alla fine della terapia ripetendo l'esame soprattutto se l'HbA_2 era normale o ridotta.

La richiesta deve comprendere i seguenti esami: emocromo, assetto marziale, assetto Hb completo con dosaggio HbA2-HbF-Hb varianti e quesito clinico specifico di "Esami specifici di 1° livello per emoglobinopatie". Nelle Regioni in cui è previsto dovranno essere riportati i codici che tale dicitura comprende. In caso di ulteriori approfondimenti sarà necessario produrre ulteriori richieste specifiche e potrebbe essere necessario un secondo prelievo di sangue.

Il paziente deve essere informato sulla possibilità che i test producano un referto non conclusivo; in questi casi potranno essere richieste ulteriori indagini al laboratorio di riferimento su nuovi campioni del paziente stesso.

Per procedere all'assetto Hb viene considerato idoneo un campione ematico prelevato in provetta con anticoagulante EDTA; la maggior parte dei metodi separativi presenta comunque risultati sovrapponibili con Li-eparina e Na-citrato.

Il digiuno non è indispensabile per l'assetto emoglobinico, ma occorre considerare che tra gli esami di 1° livello previsti per le emoglobinopatie rientrano anche quelli relativi alla valutazione dello stato marziale per i quali un eventuale siero lipemico è controindicato. Pertanto è buona norma consigliare il prelievo ematico per il 1° livello diagnostico a digiuno mentre un eventuale prelievo destinato all'approfondimento diagnostico molecolare potrà essere eseguito anche in condizioni di non-digiuno.

Per i test biochimici di conferma o di approfondimento il sangue con anticoagulante EDTA è idoneo. Per la determinazione della P50 occorre ricordare che il sangue arterioso consente una più precisa valutazione, ma anche dal sangue venoso si può ricavare un valore di P50 utile a definire un eventuale aumento o diminuzione dell'affinità per l'ossigeno (30).

È buona norma che l'esame emocromocitometrico e la valutazione degli indici marziali siano eseguiti entro le 12/24 ore dal prelievo. L'esame dell'assetto Hb può essere eseguito entro i sette giorni successivi al prelievo conservando il campione a 4°C. Si sottolinea che alcune varianti instabili dell'emoglobina potrebbero non essere più identificabili in campioni conservati a lungo.

Il settore che si occupa dei test per le emoglobinopatie è quella parte del laboratorio che ha in dotazione uno o più strumenti dedicati all'assetto Hb. La misura degli indici marziali e di quelli emocromocitometrici in un laboratorio di analisi chimico-cliniche è di solito centralizzata ma, se destinati alla diagnosi delle emoglobinopatie, la loro valutazione deve essere affidata al personale dedicato; nell'interesse dei pazienti i risultati devono essere raccolti ed interpretati da medici esperti in emoglobinopatie (31).

Il personale tecnico addetto a gestire la strumentazione dedicata alle emoglobinopatie e il personale dirigente responsabile dell'intero percorso diagnostico devono aver ricevuto un addestramento adeguato e aver frequentato corsi specifici. Spesso, soprattutto nei laboratori di analisi chimico-cliniche, la frequente rotazione del personale tecnico non favorisce il consolidamento delle esperienze; pertanto è auspicabile che il personale dirigente responsabile rappresenti nel laboratorio un riferimento più stabile per la diagnostica delle emoglobinopatie di 1° livello attraverso un controllo continuo sul risultato strumentale, sui controlli di qualità e sui risultati complessivi del percorso diagnostico.

5.1 Emocromo

È raccomandata la misurazione automatizzata del numero totale di eritrociti (Globuli Rossi - GR), degli indici globulari (MCV: volume corpuscolare medio, MCH: contenuto emoglobinico corpuscolare medio, MCHC: concentrazione emoglobinica corpuscolare media), dell'emoglobina (Hb) e della distribuzione globulare (RDW: *red cell distribution width*, deviazione standard della misura del diametro eritrocitario, espresso in percentuale della media o come coefficiente di variazione).

Nei portatori è spesso presente un elevato numero di GR (circa 6-7*10^6/ml), come compensazione della riduzione cronica del MCH, senza un aumento dell'ematocrito. L'eritrocitosi è meno spiccata in alcune

condizioni quali la carenza di acido folico, vitamina essenziale nelle divisioni cellulari. I portatori con carenza di acido folico possono presentare anemia più spiccata e minore microcitosi rispetto all'atteso.

Un aumento del numero di GR si può osservare in pazienti con carenza marziale che rispondono alla terapia con ferro. La conta dei GR può non essere affidabile in gravidanza, a causa dell'emodiluizione.

Il volume degli eritrociti e il contenuto emoglobinico sono ridotti (MCV<80 fL e MCH <27pg nell'adulto, per il paziente pediatrico vedi oltre); condizioni patologiche quali la carenza di vitamina B12 possono causare un MCV falsamente elevato. Una falsa elevazione del MCV si può osservare anche in campioni prelevati oltre 24 ore prima dell'analisi.

Per l'età pediatrica (fino ai 16 anni) non è possibile utilizzare i valori di MCV dell'adulto, ma è necessario utilizzare le tabelle dei percentili per l'Hb e per l'MCV per effettuare la diagnosi di anemia (< 3° centile o -2DS) e microcitemia (< 3° centile o -2DS) (Tabella 2 per il primo anno di vita e Tabella 3 fino ai 16 anni).

Tabella 2

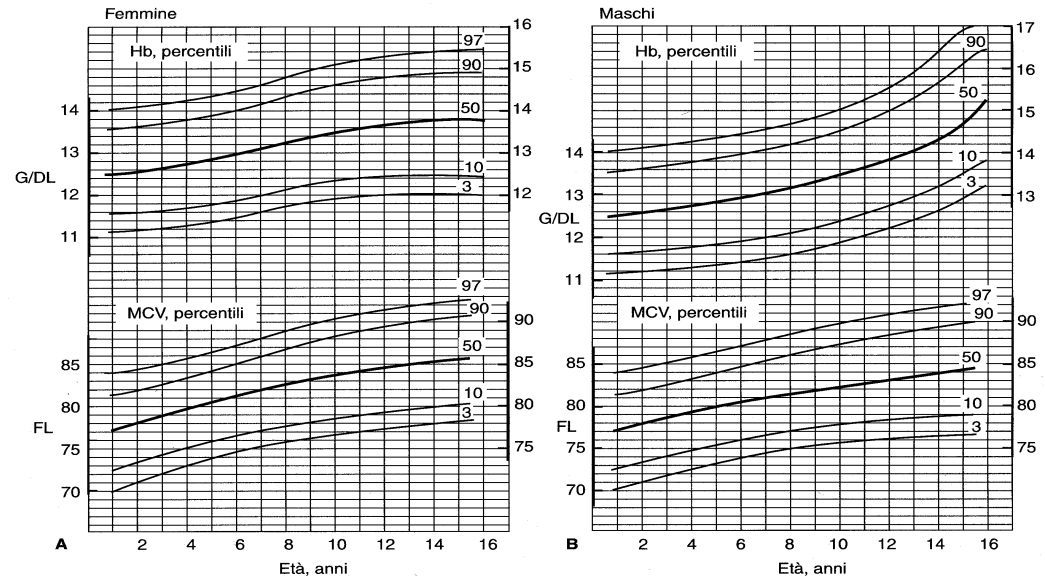
VALORI NORMALI IN BASE ALL'ETÀ DI EMOGLOBINA (g/dl), EMATOCRITO (%), CONTA ERITROCITARIA (10^{12}/litro), EMOGLOBINA CORPUSCOLARE MEDIA (pg), VOLUME CORPUSCOLARE MEDIO (fl) E CONCENTRAZIONE EMOGLOBINA CORPUSCOLARE MEDIA (G/DL)*

n	*Età (mesi)*						
	0.5 (N = 232)	*1 (N = 240)*	*2 (N = 241)*	*4 (N = 52)*	*6 (N = 52)*	*9 (N = 56)*	*12 (N = 56)*
Hgb (mean ± SE)	16.6 ± 0.11	13.9 ± 0.10	11.2 ± 0.06	12.2 ± 0.14	12.6 ± 0.10	12.7 ± 0.09	12.7 ±0.09
–2 SD	13.4	10.7	9.4	10.3	11.1	11.4	11.3
Hct (mean ± SE)	53 ± 0.4	44 ± 0.3	35 ± 0.2	38 ± 0.4	36 ± 0.3	36 ± 0.3	37 ± 0.3
–2 SD	41	33	28	32	31	32	33
RBC (mean ± SE)	4.9 ± 0.03	4.3 ± 0.03	3.7 ± 0.02	4.3 ± 0.06	4.7 ± 0.05	4.7 ± 0.04	4.7 ± 0.04
–2 SD + 2 SD	3.9-5.9	3.3-5.3	3.1-4.3	3.5-5.1	3.0-5.5	4.0-5.3	4.1-5.3
MCH (mean ± SE)	33.6 ± 0.1	32.5 ± 0.1	30.4 ± 0.1	28.6 ± 0.2	26.8 ± 0.2	27.3 ± 0.2	26.8 ± 0.2
–2 SD	30	29	27	25	24	25	24
MCV (mean ± SE)	105.3 ± 0.6	103.1 ± 0.3	94.8 ± 0.3	86.7 ± 0.8	76.3 ± 0.6	77.7 ± 0.5	77.7 ± 0.5
–2 SD	88	91	84	76	68	70	71
MCHC (mean ± SE)	314 ± 1.1	318 ± 1.2	318 ± 1.1	327 ± 2.7	350 ± 1.7	349 ± 1.6	343 ± 1.5
–2 SD	281	281	283	288	327	324	321

*Questi valori sono stati ottenuti da un gruppo di 256 neonati sani a termine seguiti al Helsinki University Central Hospital. I neonati stavano ricevendo supplementazione marziale e avevano normali livelli di saturazione della transferrina e di ferritina sierica.
I valori alle età di 0.5, 1 e 2 mesi sono stati ottenuti dall'intera coorte; alle età superiori sono stati esclusi i soggetti con carenza marziale.
Da Saarinen, U.M., and Silmes, M.A.: Developmental changes in red blood cell counts and indices of infants after exclusion of iron deficiency by laboratory criteria and continuous iron supplementation. J. Pediatr. 92:414, 1978

Tabella 3

CURVE DEI PERCENTILI DEI VALORI DI EMOGLOBINA (Hb) E VOLUME CORPUSCOLARE MEDIO (MCV) NELLE FEMMINE (A) E NEI MASCHI (B) NEI PRIMI 15 ANNI DI VITA



(da Dallman P.R., Siimes M.A., J. Pediatr. 94:28, 1979)

L'RDW è una misura del grado di anisocitosi più rapida e semplice rispetto all'analisi morfologica su striscio, seppur meno completa; può essere utile nel discriminare tra i portatori di talassemia e la carenza marziale. In genere nella carenza marziale si osserva un ampio RDW, mentre nella talassemia è in genere nella norma o con valori solo lievemente discosti dalla norma (32). Il RDW può essere alterato in diverse patologie cardiache e epatiche (33).

Sebbene i portatori di varianti β-talassemiche siano generalmente considerati clinicamente asintomatici, evidenze emergenti indicano che una quota, ancora non quantificata con precisione, può presentare caratteristiche ematologiche e cliniche atipiche, in assenza di carenza marziale. In questi soggetti eterozigoti per varianti a carico del gene *HBB*, sono stati osservati parametri eritrocitari non pienamente compatibili con il fenotipo classico del portatore, quali conta eritrocitaria inferiore alle attese (valore medio $4.9\times10^6/\mu L$) e riduzione dei livelli di emoglobina (valore medio 9.9 g/dL). Inoltre, sono stati riportati reperti clinici non usuali, inclusi splenomegalia e alterazioni degli indici emolitici. Tali osservazioni suggeriscono che, in questa sottopopolazione, possa essere presente un ulteriore difetto intraeritrocitario concomitante, responsabile dell'espressività fenotipica più severa rispetto al classico stato eterozigote β-talassemico (34,35). Per tali individui è suggerito un approfondimento diagnostico di terzo livello (diagnosi molecolare di difetti ereditari del globulo rosso e del metabolismo del ferro).

5.2 Separazione delle emoglobine

5.2.1 Emoglobina A2

L'emoglobina A2 rappresenta una componente minore rispetto all'HbA ma significativamente presente nei globuli rossi di un individuo normale dopo i sei-otto mesi d'età. Valori considerati "normali" per l'Hb A2 sono nella maggior parte dei casi compresi tra 2.5 e 3.2%. È opportuno ricordare che valori compresi tra 2.2 e 2.5 e tra 3.2 e 3.5 possono essere rilevati sia in una bassa quota di soggetti "normali"; inoltre valori tra 3.2 e 3.5

possono essere riscontrati anche in portatori di mutazioni di "beta talassemia lieve ". In nessun caso, comunque, la diagnosi può essere basata sulla singola determinazione dell'emoglobina A2 senza tener conto degli indici eritrocitari.

In alcuni casi il valore dell'Hb A2 può essere sovrastimato senza la presenza di un difetto talassemico (Tabella 4), mentre può risultare nella norma per alcuni rari difetti talassemici "silenti".

La sovrastima dell'Hb A2 è un evento frequente in presenza di varianti "tipo Hb S" a causa dell'interferenza con la frazione glicata della variante stessa: in questi casi se il soggetto esaminato non è stato trasfuso negli ultimi tre mesi e presenta una percentuale relativa della variante inferiore a 48%, con certezza si potrà comunque concludere per la presenza di variante allo stato eterozigote. Nel referto va riportato il valore percentuale ottenuto segnalando però la sovrastima dopo aver escluso che si tratti di paziente trasfuso.

In Tabella 4 sono riportate le principali variabili preanalitiche individuali che possono produrre sovrastima o sottostima delle concentrazioni relative dell'Hb A2.

Tabella 4

PRINCIPALI VARIABILI PREANALITICHE INDIVIDUALI CHE POSSONO MODIFICARE IL VALORE DELL'HbA2

Cause di aumento	Cause di diminuzione
Ipertirodismo	Anemia sideropenica grave
Anemia megaloblastica	Anemia siederoblastica
Terapia retrovirale per HIV	Presenza di Delta Talassemia (b)
Alcune Hb varianti instabili	Presenza di varianti delle catene Delta (c)
Geni alfa sovrannumerari (es. ααα/αα)	Presenza di varianti delle catene Alfa (d)
Componente glicata della beta variante eventualmente presente (a)	Alcune forme di HpFH da difetto del promotore dei geni Gamma (e)
Epatopatia/alcool	Delta-Beta Talassemie
Osteoartropatia ipertrofica	Alfa Talassemie: marginale in Alfa+ o Alfa0 mentre è marcata nell'Emoglobinosi H
Mutazioni del gene *KLF1*	Hb Lepore (f)
	HbD (a) e C (f)

(a) Nel caso di quantificazione con sistemi HPLC
(b) Il valore dell'Hb A2 potrebbe essere normale
(c) Il valore reale dell'Hb A2 equivale a circa il doppio rispetto a quello dosato e definito tale dalla strumentazione. Nel caso in cui l'Hb A2x è rilevata, l'Hb A2 reale è data dalla somma delle due frazioni.
(d) In tale circostanza il valore dell'Hb A2 va sommato al valore dell'Hb A2x.
(e) È ciò che si verifica nella cosiddetta "delta-beta talassemia sarda" con la mutazione -196C>T del promotore del gene Ay.
(f) Rilevabile solo nel caso di quantificazione con CE.

In **Tabella 5** sono riportati gli intervalli di variabilità dell'Hb A2 in presenza di alcuni difetti dei geni globinici allo stato eterozigote.

Tabella 5

INTERVALLI Hb A2

Hb A2 %	Hb F %	MCV fl	MCH pg	Difetto **gene α**	Difetto **gene β**	Difetto **gene δ**	Difetto **gene γ** (promoter)	Fenotipo
1.2 - 2.2	< 1.0	> 78	> 26	NO	NO	δ° - δ^{+}	NO	Delta Talassemie
1.2 - 1.8	< 1.0	≥ 80	> 27	NO	NO	δ^{x}	NO	Delta Varianti
1.2 - 2.3	1.0-12%	< 67	< 26	α-/--	NO	NO	NO	Hb H
1.5 - 2.5	< 1.0	< 80	< 26	NO	NO	NO	NO	IpoFe

2.2 - 2.8	3.0 - 18.0	< 75	< 26	NO	β^{del}	δ^{del}	NO	Delta-Beta Tal.
1.9 -3.1	<1.0	< 75	< 26	αα/-- (α°) α-/α- (α^{+} omo)	NO	NO	NO	Alfa Tal.
2.1 - 3.2	< 1.0	> 76	> 26	α-/αα (α^{+})	NO	NO	NO	Alfa Tal.
< 2.8	> 12.0	< 75	< 26	NO	β°	NO	-196 Aγ	Delta-Beta Tal. Sarda
< 2.8	2.0 - 10.0	< 75	< 26	NO	ibrido δ-β	ibrido δ-β	NO	Hb Lepore
2.8-4	< 2.0	< 75	< 26	NO	β° o β^{+}	δ°, δ^{+}, δ^{x}	NO	δ + β Tal. (36)
2.2 - 3.2	1.0 - 25.0	> 79	> 27	NO	NO	NO	Vari	Varie HPFH
2.5 - 3.2	< 1.0	≥ 79	> 27	NO	NO	NO	NO	Normale
2.8 - 3.5	< 1.5	> 78	> 25	ααα	NO	NO	NO	Gene Alfa Triplicato
2.9 - 3.7	< 1.0	75 - 82	< 28	NO	β^{++}	NO	NO	Beta Tal. silenti
3.0 - 3.7	< 1.0	> 80	> 28	NO	NO	NO	NO	Ipertiroid.
3.0 - 4.2	< 1.0	> 88	> 28	NO	NO	NO	NO	Hiv
3.5 - 5.0	< 1.0	68 - 78	< 27	α^{+} o α°	β° o β^{+}	NO	NO	α + β Tal.
3.6 - 5.5	< 1.5	65 - 78	20 - 27	NO	β^{+}	NO	NO	Beta Tal.
4.1 - 6.5	< 1.5	60 - 72	18 - 26	NO	β°	NO	NO	Beta Tal.

Nei portatori di mutazione di un solo gene α-globinico (αα/-α) si osservano in genere normali livelli di HbA2. Nei portatori di mutazione inattivante/delezione di due geni α-globinici (αα/- -) si osservano in genere livelli di HbA2 ai limiti inferiori della norma o lievemente ridotti. La presenza di una concomitante eterozigosi per mutazione del gene β-globinico può mascherare la presenza di mutazioni dei geni α-globinici agli esami ematochimici (32).

Il metodo oggi più utilizzato per valutare la quantità relativa di Hb A2 nel sangue circolante è la cromatografia liquida ad alta risoluzione (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Per quanto attiene la misura dell'Hb A2 e dell'Hb F, le strumentazioni disponibili in commercio forniscono in genere buone prestazioni e risultati confrontabili per quanto riguarda i risultati patologici, mentre è possibile una maggiore dispersione di valori tra varie strumentazioni per quanto attiene i livelli borderline di HbA2 (circa 3.3%), che possono essere dirimenti per un tratto beta silente. Pertanto, si raccomanda l'utilizzo di calibratori per ottenere un maggior grado di accuratezza del metodo. Diverso e più articolato è l'aspetto che riguarda la capacità di separare e discriminare le varianti emoglobiniche: tra i diversi sistemi disponibili ciò dipende soprattutto dal tipo di gradiente che viene applicato. L'elettroforesi capillare (CE) oggi è impiegata anche per lo screening delle emoglobinopatie, per la quantificazione e la separazione delle frazioni fisiologiche e patologiche dell'Hb: questa tecnica può rappresentare anche uno strumento secondario di conferma nella diagnosi delle varianti più comuni (Tabella 6). Infatti, l'utilizzo di una combinazione di diverse tecniche può consentire una miglior identificazione delle varianti emoglobiniche e riduce la probabilità di artefatti.

È bene sottolineare che non devono essere utilizzati i metodi per la valutazione dell'Hb A1c per la diagnosi di emoglobinopatie in quanto questi metodi sono assolutamente inaffidabili e solo la determinazione con l'applicazione di protocolli specifici e l'utilizzo di programmi dedicati in HPLC o CE può essere oggi impiegata per la diagnostica di 1°livello per le emoglobinopatie.

In particolare, per l'HPLC è fondamentale che l'apparecchio sia a scambio cationico, con gradiente lineare continuo a doppia pompa e con CV<5%.

È opportuno che gli apparecchi vengano periodicamente tarati utilizzando gli opportuni standard di riferimento, secondo le indicazioni generali di accreditamento.

Tabella 6

DIAGNOSTICA VARIANTI COMUNI

Metodo o Test	Test specifici	Test di conferma	Altri test	Commenti
HPLC	X	X		Separazione e quantificazione
CE	X	X		Separazione e quantificazione alternativa
Emocromo	X			Indici eritrocitari valutati: G.R ($X10^3$/pL), Hb (g/dL), NCV (fL), MCH (pg), Ht(%).
Sideremia	X			In alternativa ZnPP.
Transferrina	X			
Ferritina	X			
Reticolociti			X	(%)
P_{50}				Test su sangue arterioso o venoso in presenza di un ematocrito aumentato (<45% nella donna e >50% nell'uomo)
Aptoglobina			X	In presenza di anemia emolitica
Metaemoglobinemia			X	In presenza di cianosi
Bilirubina			X	In presenza di anemia emolitica

L'Hb A2 può in alcuni casi non essere quantificabile in HPLC e/o in CE per interferenza con una variante Hb (Tabella 7 e Tabella 8).

Tabella 7

ESEMPI DI VARIANTI EMOGLOBINICHE CHE COELUISCONO CON O VICINO A HBA2 IN HPLC

Hb Abruzzo	Hb Kenya
Hb Akron	Hb Korle Bu*
Hb Boras	Hb Lepore Baltimore
Hb Bethesda*	Hb Lepore Boston
Hb Chandigarth	Hb Lepore Hollandia
Hb Deer Lodge	Hb Loves Park*
Hb D Iran*	Hb M Saskatoon
Hb Denver*	Hb Muravera
Hb D-Ouled Rabah	Hb Nebraska
Hb E	Hb Ocho Rios
Hb Ethiopia*	Hb Osu Christiansborg*
Hb Fort Worth	Hb Paddington
Hb G Copenhagen	Hb Rocky Mountain
Hb G Coushatta*	Hb San Bruno*
Hb G Ferrara	Hb Santa Juana*
Hb G Galveston	Hb SId (the aged adduct of Hb due to glutathione)
Hb G Honolulu*	Hb Spanish Town
Hb G Taipei	Hb Toulon
Hb Hoshida	Hb Tubingen
Hb Hamadan	Hb Zuri
HPLC, high-performance liquid chromatography.	
*Queste varianti emoglobiniche sono talvolta etichettate come Hb A2 e talvolta non evidenziate a seconda dello strumento e lievi variazioni nei tempi di conservazione. Anche quando la variante non coeluisce esattamente con Hb A2, può comunque interferire con la misurazione dell'Hb A2 e quindi in questa situazione dovrebbe essere utilizzato un metodo diverso per misurare l'Hb A2.	

Tabella 8

ESEMPI DI VARIANTI EMOGLOBINICHE CHE MIGRANO CON O VICINO A HBA2 IN CE

Hb Chad
Hb E-Saskatoon
Hb O-Arab
Hb C Harlem*
*Separazione insufficiente per una quantificazione accurata

5.2.2 *Emoglobina Fetale*

L'emoglobina fetale (HbF) rappresenta la principale frazione emoglobinica durante la vita fetale ed alla nascita costituisce circa l'80% dell'emoglobina totale. L'HbF è prodotta a partire dalla sesta settimana di gestazione e sostituisce le emoglobine embrionali Gower I, Gower II e Portland prodotte nelle prime settimane dal concepimento. Dopo la nascita la sintesi di HbF diminuisce gradualmente e viene sostituita da quella dell'HbA; dalla fine del primo anno di vita in poi appare il caratteristico fenotipo emoglobinico dell'adulto con livelli di HbF inferiori a 1%.

La misura dell'HbF è utile nello studio e nella diagnosi di alcuni importanti disordini a carico dei geni globinici dove i livelli di HbF possono aumentare considerevolmente: nella beta talassemia allo stato omozigote e eterozigosi composta nonché nelle δβ-talassemie allo stato eterozigote. La presenza nella vita adulta di una più o meno elevata HbF può anche essere correlata a condizioni non rare di persistenza di HbF (HPFH), spesso senza segni clinici e di laboratorio. Sono note anche alcune patologie acquisite che possono esprimere un incremento modesto di HbF come neoplasie midollari, anemia di Fanconi, stress eritropoietico e trattamento con agenti citotossici (es. idrossiurea). In Tabella 9 sono riassunte alcune cause di aumento dell'Hb F non riconducibili a mutazioni dei geni globinici.

In gravidanza si può osservare un modesto incremento di HbF (in genere 1-3% circa), rendendo difficile l'interpretazione di valori di HbF di 3-5%; nei casi dubbi si raccomanda di ripetere il dosaggio dopo 6 mesi dal parto. Nelle forme di (δβ)0 talassemia i livelli di HbA2 sono in genere normali/bassi e i livelli di HbF sono aumentati (5-20%), con microcitosi all'emocromo. Queste forme possono essere distinte dalla HPFH sulla base dei normali parametri ematologici nella HPFH (37).

La misura della HbF viene inoltre richiesta per monitorare i pazienti con anemia falciforme durante il trattamento con farmaci in grado di indurne la produzione.

Tabella 9

CONDIZIONI NELLE QUALI SI PUÒ RISCONTRARE UN AUMENTO DELLA HBF NON RICONDUCIBILE A DIFETTI GAMMA GLOBINICI

Anemie congenite o acquisite da primitiva insufficienza midollare con o senza displasia	Neoplasie	Condizioni associate a specifici trattamenti terapeutici	Altre condizioni
Anemia aplastica congenita o acquisita	Epatocarcinoma	Chemioterapie per leucemie	Gammopatia monoclonale di incerto significato
Anemia megaloblastica da carenza vitaminica	Leucemie acute mieloidi	Terapia con idrossiurea, butirrati ed agenti stimolanti dell'eritropoiesi	Gravidanza
Anemia di Diamond-Blackfan	Mielofibrosi primitiva		Insufficienza renale cronica
Alcune forme di anemia normoblastica	Leucemia mielomonocitica cronica giovanile		Ipertirodismo
Anemie sideroblastiche congenite			Trisomia 13
Anemie sideroblastiche acquisite			
Emoglobinuria parossistica notturna			

Attualmente, anche per l'HbF come per le altre frazioni Hb, l'approccio quali-quantitativo utilizza sistemi HPLC a scambio cationico su strumentazioni commerciali dedicate oppure l'elettroforesi capillare (CE). L'HbF quantificata mediante CE può risultare parzialmente sottostimata per valori inferiori all'1.5% mentre in HPLC può risultare sovrastimata se parzialmente sovrapposta alla frazione labile dell'Hb glicata o, con alcuni sistemi, non correttamente quantificata per valori elevati.

Nella maggior parte dei soggetti "normali" l'HbF mediamente risulta inferiore all'1% mentre si conoscono significativi aumenti in presenza di difetti isolati o associati dei geni del cluster "non-alfa" (Tabella 5).

Sono rari i casi noti di interferenza nella valutazione dell'HbF: con i vari sistemi HPLC possiamo osservare una sovrapposizione con le varianti Hb Marseille e Hb J Iran, mentre in CE con l'Hb Richmond, l'Hb G San Josè, l'Hb Presbiterian, l'Hb Porto Alegre.

La valutazione dell'HbA2 e dell'HbF nel primo anno di vita, soprattutto nei primi 6 mesi, richiede la consultazione di tabelle di riferimento adatte all'età (Tabella 10 e Tabella 11).

Tabella 10

VALORI DI HbA2, HbF E ALCUI INDICI ERITROCITARI RILEVANTI IN NEONATI NORMALI E IN PORTATORI DI BETA TALASSEMIA DURANTE IL PRIMO ANNO DI VITA

Età	Soggetti	Quantità	HbA2 (%)	HbF (%)	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)
Alla nascita	β Talassemia	16	0.4 (0.2)	65.1 (7.5)	18.1 (2.3)	101.3 (6.9)	35.1 (3.5)
		31	0.5 (0.2)	73.8 (10.1)	18.3 (2.3)	98.5 (8.1)	33.8 (2.6)
			NS	p<0.05	NS	NS	NS
3 mesi	β Talassemia	8	1.7 (0.3)	18.1 (3.6)	11.0 (0.7)	82.5 (3.6)	27.9 (2.0)
		12	3.2 (0.7)	27.0 (10.5)	10.0 (1.1)	69.9 (5.8)	22.8 (1.8)
			p<0.01	p<0.05	NS	p<0.001	p<0.001
6 mesi	β Talassemia	8	2.5 (0.3)	3.2 (1.1)	11.5 (0.8)	74.7 (2.9)	24.9 (1.4)
		10	4.8 (0.7)	8.2 (4.0)	10.5 (0.8)	59.2 (3.5)	19.2 (1.2)
			p<0.001	p<0.001	p<0.05	p<0.001	p<0.001
9-10 mesi	β Talassemia	6	2.5 (0.4)	2.6 (1.4)	12.5 (1.0)	76.8 (5.2)	25.9 (1.7)
		14	5.1 (0.5)	4.4 (2.1)	11.1 (0.9)	58.7 (1.6)	19.6 (0.9)
			p<0.001	NS	p<0.005	p<0.001	p<0.001
1 anno	β Talassemia	5	2.5 (0.3)	1.4 (0.6)	12.3 (1.0)	74.6 (5.0)	24.8 (2.7)
		8	4.8 (0.4)	4.1 (2.1)	11.2 (0.9)	57.5 (2.4)	18.7 (0.9)
			p<0.001	p<0.02	p<0.005	p<0.001	p<0.001

Tavola adattata da Galanello et al.
I valori sono medie (SD); la significatività statistica tra i soggetti è stata verificata mediante il test t di Student.
Hb, emoglobina; MCH, emoglobina cellulare media, volume cellulare medio; NS non significativo.

Tabella 11

VALORI DI HBA E HBF (± DS) DEI GLOBULI ROSSI PRIMA (GR) E DOPO LA SEPARAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITÀ DI NEOCITI (N) E GEROCITI (G) DURANTE IL 1° ANNO DI VITA

Da: Iolascon A, et al. Developmental changes in HbA2 and HbF on neocytes and gerocytes in normal infants during the first year of life. Acta Haematol. 1983;70(4):278-9)

Età	N.Soggetti	HbA2			HbF		
		N	G	GR	N	G	GR
Alla nascita	30	0.64±0.15	0.42±0.07	0.49±0.12	54.0±8.8	72.0±9.2	66.0±7.6
1 mese	10	0.91±0.25	0.40±0.12	0.72±0.29	44.0±5.7	68.0±6.2	52.0±5.5
2 mesi	6	2.07±0.29	0.96±0.15	1.14±0.32	24.3±6.8	37.5±6.2	33.0±6.5
3 mesi	8	2.13±0.32	1.35±0.19	1.55±0.31	18.5±5.5	25.6±4.8	21.0±6.1

4 mesi	8	2.27±0.26	1.72±0.25	1.93±0.28	8.0±3.3	13.6±3.6	10.5±3.5
5 mesi	6	2.39±0.26	1.86±0.30	2.18±0.21	3.2±1.1	5.6±0.9	4.6±0.9
6 mesi	6	2.50±0.22	2.10±0.32	2.25±0.30	2.6±0.4	3.9±1.1	3.3±0.9
7 mesi	5	2.50±0.28	2.19±0.31	2.28±0.27	21.7±0.5	3.3±1.2	2.8±1.1
8 mesi	5	2.48±0.32	2.25±0.29	2.34±0.36	1.2±0.4	2.3±0.5	1.9±0.7
9-10 mesi	5	2.53±0.26	2.30±0.28	2.24±0.34	1.1±0.6	2.2±0.6	1.7±0.4
11-12 mesi	5	2.61±0.24	2.50±0.28	2.53±0.29	1.0±0.3	2.0±0.5	1.4±0.4
2-12 anni	20	2.64±0.28	2.56±0.24	2.60±0.30	0.4±0.2	0.73±0.3	0.6±0.2

5.2.3 Le varianti Hb

Le varianti emoglobiniche fino ad oggi descritte sono causate prevalentemente da mutazioni nelle catene beta e alfa globiniche e nella maggior parte dei casi differiscono strutturalmente dall'HbA per la sostituzione di un solo amminoacido, conseguenza di una singola base nucleotidica mutata.

Con l'immigrazione è aumentata nei laboratori l'osservazione di alcuni difetti Hb già presenti nella popolazione italiana come l'Hb S, l'Hb C, Hb D Punjab (D Los Angeles) e la segnalazione di rari e nuovi difetti emoglobinici, anche per le alfa talassemie. L'Hb E e l'Hb O Arabia, da tempo già osservate in Italia, ma considerate varianti molto rare, si riscontrano con notevole frequenza soprattutto nel Nord-Est. In questi ultimi anni proprio le regioni del Nord-Est hanno vissuto più di altre il cambiamento della diagnostica di laboratorio orientandola anche alla gestione delle emoglobinopatie (formazione del personale, organizzazione dei flussi diagnostici a diversi livelli, rapporti con i clinici).

La stragrande maggioranza delle varianti emoglobiniche non è associata a parametri ematologici anomali, come ad esempio nel caso dell'emoglobina S (Hb S). Di conseguenza, il dosaggio delle frazioni emoglobiniche è raccomandato per la diagnosi corretta del portatore, in particolare se la provenienza etnica è da aree ad elevata frequenza di queste varianti.

Nei casi in cui la variante sia associata a parametri ematologici anomali (Hb E, Hb Lepore, etc.), la sua presenza può essere sospettata dall'anamnesi familiare o clinica del soggetto in esame e può trovare conferme nell'ambito degli esami di 1° livello. Nella maggior parte dei casi, le varianti Hb si rilevano nel corso di esami richiesti per individuare lo stato di portatore di beta talassemia.

Molte varianti, singolarmente ritenute rare, presentano caratteristiche cliniche rilevanti: si tratta delle emoglobine instabili e di quelle con alterata affinità (soprattutto alta affinità) per l'ossigeno. Il riconoscimento di queste varianti richiede conoscenza di informazioni anamnestiche specifiche e conferma mediante analisi molecolare (2° livello).

Le tecniche separative normalmente in dotazione al laboratorio di 1° livello permettono di distinguere la presenza di circa i 2/3 delle varianti conosciute e tra queste riconoscere con un grado di specificità accettabile ma pur sempre presuntivo le emoglobine anormali rilevanti e più comuni (Hb S, C, E, Lepore). Le numerose varianti dal comportamento cromatografico o elettroforetico meno comune, anche se in apparenza clinicamente asintomatiche, dovranno comunque essere successivamente caratterizzate mediante analisi molecolare. Quando una variante si separa in HPLC o in CE, disponiamo della sua percentuale relativa e del suo tempo di

eluizione: queste informazioni ci consentono di ipotizzare il cambiamento di carica elettrica intervenuto e supporre il tipo di catena globinica coinvolta. La percentuale relativa della maggior parte delle emoglobinopatie strutturali, allo stato eterozigote, varia tra il 15 e il 45 % quando il difetto interessa le catene beta e tra il 5 e il 30% quando interessa le catene alfa globiniche. Tali percentuali dipendono da alcuni fattori quali la stabilità della catena mutata, l'affinità che questa ha nei confronti della catena omologa normale e quindi l'efficienza nel formare un tetramero stabile, la possibile ridotta sintesi della globina variante, il numero di geni strutturali mutati sul totale dei geni presenti (due per le catene beta e quattro per le catene alfa), l'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina mutata o l'associazione con difetti alfa o beta talassemici.

Quando una variante, qualunque essa sia, presenta una quantità relativa superiore al 50%, oppure se sono presenti più varianti la cui quantità totale sommata è superiore al 50%, è certa la presenza di un doppio difetto dello stesso gene su due alleli diversi se il soggetto in esame non è stato trasfuso recentemente. Nella pratica quotidiana una condizione riscontrabile con una certa frequenza è rappresentata dalle SCD: in questi casi l'assetto emoglobinico mostrerà la variante (HbS) in quantità superiore al 50% (se il soggetto non è stato trasfuso). L'ipotesi di un doppio difetto in questo caso sarà corretta e potrà essere riportata nelle conclusioni dell'esame, ma per poter risalire ai difetti presenti (omozigosi per HbS o doppia eterozigosi di HbS con Beta Talassemia) occorrerà affidarsi all'analisi molecolare. Viceversa, la presenza di una mutazione alfa talassemica associata alla HbS riduce la percentuale di HbS rispetto all'atteso (HbS circa 35-40% con genotipo αα/α- e HbS <35% con genotipo αα/-- o α-/α-). Gli strumenti HPLC "dedicati" o la CE, in presenza di varianti, forniscono alcune indicazioni all'operatore: in genere la "finestra" che contiene il picco anomalo segnala le varianti con caratteristiche simili. Tali messaggi devono solo suggerire un'ipotesi diagnostica che non può mai essere considerata certa, e quindi trasferita nel referto, senza la validazione di almeno un test di conferma. Il test di conferma che più frequentemente viene effettuato è l'analisi molecolare, in alcuni casi la conferma della HbS viene effettuata mediante test di falcizzazione.

L'osservazione di una variante rende necessario, come per i difetti talassemici, esaminare il partner del soggetto portatore: la presenza di difetti emoglobinici in entrambi i soggetti della coppia dovrà suggerire una consulenza specialistica presso un centro clinico.

In pazienti con sospetta crisi vasoocclusiva può essere utilizzato un test rapido per screening della drepanocitosi in contesti di emergenza. Tale test è da utilizzarsi unicamente nelle situazioni emergenziali e deve essere seguito da test di conferma di 1° e 2° livello.

5.3 Stato marziale ed emoglobinopatie

La carenza marziale rappresenta la maggior causa di anemia. Come è noto, il ferro influenza il volume dei globuli rossi (MCV) nonché il contenuto medio in emoglobina nell'eritrocita (MCH) ed ovviamente la quantità totale di emoglobina (Hb), riducendoli come nella talassemia eterozigote ma, contrariamente alla condizione di portatore sano di talassemia, la conta eritrocitaria (RBC) è spesso normale o ridotta e il RDW incrementato. Per questo motivo, contestualmente all'assetto emoglobinico, è opportuno conoscere lo stato marziale del paziente attraverso alcuni parametri specifici (sideremia, ferritina, transferrina e Indice di Saturazione - IS).

Nel caso di carenza di ferro con indici eritrocitari inferiori alla norma, è necessario procedere agli esami di 1° livello per le emoglobinopatie solo dopo correzione dello stato marziale e, se non urgenti, dopo un periodo di tempo adeguato al ripristino della popolazione eritrocitaria. Va ribadito che una marcata carenza di ferro può mascherare la presenza di difetti talassemici. Casi classici sono quelli di madri ~~provenienti dall'Africa~~, portatrici sane di talassemia, originarie di aree geografiche ad alto tasso di crescita demografica, che dopo molte gravidanze possono presentarsi all'attenzione clinica con una marcata anemia ferropriva associata a carenza di acido folico.

La quantificazione dell'Hb reticolocitaria può essere un marcatore affidabile del contenuto di emoglobina e può essere utilizzata per l'identificazione di carenza marziale (26).

Analogamente a quanto osservato per i parametri ematologici, in una quota di portatori di varianti β-talassemiche sono stati riportati reperti clinici atipici, tra cui incremento dei livelli di ferritina sierica (range 40.5-1307 ng/mL), aumento della saturazione della transferrina e sovraccarico di ferro a livello epatico. Tali evidenze suggeriscono che, in questa sottopopolazione, possa essere presente un ulteriore difetto genetico concomitante (34). In questi casi, è indicato un approfondimento diagnostico di terzo livello (diagnosi molecolare di difetti ereditari del globulo rosso e del metabolismo del ferro).

RACCOMANDAZIONI

- Per test di 1° livello si intendono esame emocromocitometrico, stato marziale (sideremia, transferrina, ferritina e indice di saturazione) e HPLC e/o CE dell'Hb.
- Il test di 1° livello per le emoglobinopatie va differito nel tempo se il paziente ha ricevuto una trasfusione di emazie nei tre mesi precedenti oppure se è presente carenza marziale.
- Gli esami di 1° livello per la diagnosi di certezza di alfa+ talassemia non sono sufficienti (la diagnosi di certezza può essere ottenuta solo mediante analisi molecolare).
- Gli esami di 1° livello per la diagnosi di eterozigote di beta talassemia, Hb Lepore o delta beta talassemia effettuati alla nascita non sono sufficienti per una diagnosi di certezza.
- È buona norma che l'esame emocromocitometrico e la valutazione degli indici marziali siano eseguiti entro le 12/24 ore dal prelievo.
- L'esame dell'assetto Hb può essere eseguito entro i sette giorni successivi al prelievo in EDTA conservando il campione a 4°C. In caso di sospetto di variante instabile l'esame deve essere effettuato quanto prima al fine di evitare di non visualizzare la variante a causa della degradazione per instabilità.
- Per il sospetto di microcitemia considerare in genere il valore di MCV <80 fL e MCH<27 pg ma al di sotto dei 16 anni considerare il valore di MCV (< 3° centile o -2DS) nelle tabelle dei percentili (Tabella 2 e Tabella 3).
- L'HPLC dell'Hb e/o l'elettroforesi capillare (CE) sono da ritenersi gli strumenti ottimali per lo screening delle emoglobinopatie, per la quantificazione e la separazione delle frazioni fisiologiche e patologiche dell'Hb. Entrambe le metodiche possono essere utilizzate come test di conferma reciproca.

Per la separazione delle frazioni dell'Hb con HPLC è fondamentale che l'apparecchio sia a scambio cationico, con gradiente lineare continuo a doppia pompa e con Coefficiente di Variazione <5%.

- Nell'interpretazione dell'HbA2 considerare la presenza di fattori che possono sovra- o sotto-stimarla (vedi Tabella 4).
- La presenza di HbF oltre i valori normali e dopo il primo anno di vita deve essere valutata con esami di approfondimento di secondo livello se associata ad anemia microcitica moderata e/o splenomegalia.
- In presenza di un quadro clinico sintomatico, gli esami di primo livello per la diagnosi di eterozigosi per emoglobinopatia - previa esclusione delle più comuni cause acquisite confondenti - non sono da considerarsi sufficienti a confermare la diagnosi. La diagnosi definitiva può essere ottenuta unicamente mediante analisi molecolare.

6. I test di secondo e terzo livello

6.1 Analisi molecolare

L'analisi molecolare è utilizzata in:

- soggetti con esami di primo livello non dirimenti, al fine di poter confermare o smentire la diagnosi di portatore. In particolare, per la diagnosi di portatore di α-talassemia si suggerisce l'esecuzione dell'indagine molecolare per la corretta identificazione dei portatori di α+-talassemia (38). Infatti, in genere i soggetti con la delezione di un solo gene alfa (αα/α-) sono asintomatici e hanno GR, Hb, MCV, MCH e HPLC dell'Hb nei limiti della norma o solo lievemente ridotti. I portatori eterozigoti di mutazioni che consentono una funzione residua del gene della β-globina (mutazioni β+) presentano in genere valori di Hb, MCV e MCH superiori a quelli dei portatori di mutazioni β0 (senza funzione residua) ma comunque inferiori alla norma. Portatori di mutazioni molto lievi o silenti del gene della β-globina, in cui la produzione delle catene è solo minimamente ridotta, possono presentare parametri ematologici normali e sono riconoscibili unicamente mediante analisi molecolare (32);
- sospetto portatore sia di α- sia di β-talassemia per poter correttamente definire il rischio di ricorrenza di talassemia;
- soggetti con esami di 1° livello indicativi per lo stato di portatore, al fine di definire la mutazione responsabile, su indicazione dello specialista di settore;
- nel caso di riscontro di sideropenia in coppie in gravidanza, è preferibile avviare la ricerca di mutazioni dei geni alfa e beta globinici (in caso di partner portatore di beta talassemia), prima della normalizzazione dei livelli marziali, al fine di evitare un accesso tardivo alla diagnosi prenatale, se necessaria (38);
- soggetti già identificati come portatori di varianti nei geni α- o β-globinici, nei quali gli esami di primo livello risultino alterati in maniera non coerente con lo stato di portatore, l'indagine molecolare deve essere estesa ad altri geni responsabili di difetti ereditari del globulo rosso o del metabolismo del ferro.

I difetti ereditari del globulo rosso e del metabolismo del ferro sono un gruppo geneticamente eterogeneo di condizioni rare che influenzano la produzione, la struttura, la funzione degli eritrociti, nonché la gestione

sistemica del ferro. Questi disordini possono essere classificati in quattro principali categorie: (i) difetti enzimatici; (ii) difetti della membrana dei globuli rossi; (iii) difetti dovuti ad alterata eritropoiesi; (iv) disturbi associati al metabolismo del ferro (39):

i) difetti in enzimi essenziali per la sopravvivenza e la funzione degli eritrociti. Tra queste, particolare rilevanza rivestono il deficit di piruvato chinasi (PKD) e il deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDD) (40,41). Il PKD, autosomico recessivo, compromette la produzione di ATP nelle emazie, causando anemia emolitica cronica, spesso con sovraccarico marziale anche in assenza di trasfusioni. La carenza di G6PD, invece, è a trasmissione X-legata; il quadro clinico varia da forme asintomatiche a crisi emolitiche acute o anemia cronica;

ii) le anemie da difetti di membrana eritrocitaria derivano da anomalie di proteine del citoscheletro o di trasporto ionico attraverso la membrana (42). La forma più comune è la sferocitosi ereditaria, che può essere causata da varianti a carico di più geni, generalmente con trasmissione autosomica dominante . La sferocitosi si caratterizza per la presenza di anomalie morfologiche degli eritrociti allo striscio di sangue periferico (sferociti, ellissociti, dacriociti, echinociti, a funghetto), aumento dell'MCHC e reticolocitosi, a differenza della microcitosi ipocromica tipica della talassemia. Tra i difetti del trasporto, la condizione più frequentemente osservabile è la stomatocitosi ereditaria in forma deidrata (DHS) (43), caratterizzata da fenotipo clinico altamente variabile, con anemia da assente a moderata, normo-/macrocitica, presenza di stomatociti allo striscio (<20%), pseudoiperkaliemia, positività agli indici di emolisi, ma non sempre reticolocitosi, e sovraccarico di ferro;

iii) più rare sono le anemie diseritropoietiche congenite (CDA), che derivano da difetti maturativi degli eritroblasti nelle fasi tardive dell'eritropoiesi, per mutazioni in diversi geni (44). Le CDA si manifestano con anemia di grado variabile tendenzialmente macrocitica, reticolocitopenia relativa, ittero, splenomegalia e tendenza al sovraccarico di ferro da anemizzazione cronica, con meccanismo simile a quello osservato nelle talassemie. Più rara è l'anemia di Diamond-Blackfan (DBA), caratterizzata da anemia, spesso macrocitica, con riduzione degli eritroblasti, in cui è presente anche un aumento del rischio di sviluppare alcune neoplasie;

iv) i disturbi del metabolismo del ferro comprendono condizioni come l'emocromatosi ereditaria, dovuta a inappropriatezza nell'assorbimento intestinale del ferro per varianti in geni regolatori della via dell'epcidina. Poiché diverse forme di anemia emolitica o da eritropoiesi inefficace presentano sovraccarico di ferro secondario, esse possono mimare quadri di emocromatosi primaria, complicando il processo diagnostico (43).

In questo scenario, la diagnosi differenziale richiede un approccio integrato che combini valutazione clinica, anamnesi, esami di laboratorio e test funzionali sul globulo rosso e conferma molecolare (43).

La diagnosi molecolare è preferibile mediante Sequenziamento di Nuova Generazione (NGS) (45) con uso di pannelli multigenici specifici o esoma completo con focus *in silico* sui geni di pertinenza.

È preferibile utilizzare DNA estratto da sangue periferico prelevato in EDTA.

È possibile ricorrere ad altre fonti in casi particolari:

- bambini in cui il prelievo di sangue periferico risulti difficoltoso: è possibile estrarre DNA da campione di saliva;
- soggetti sottoposti a trapianto di midollo: è necessario effettuare l'analisi su spazzolato di mucosa buccale (NB: un semplice prelievo di saliva potrebbe non consentire un referto definitivo in quanto i leucociti del donatore presenti nella saliva potrebbero contaminare il campione).

L'attuale tariffazione dei test genetici nel Sistema Sanitario Nazionale e lo sviluppo delle tecnologie di NGS rendono ad oggi competitiva l'analisi dei geni globinici mediante l'utilizzo di sequenziamento NGS. Sebbene sia possibile utilizzare un approccio per pannelli *in silico*, è più consigliato utilizzare pannelli commerciali ad ampliconi certificati CE IVD (46). Questi pannelli hanno un coverage minimo molto elevato (>200X) e consentono di identificare sia varianti a singolo nucleotide (SNV) sia di delezioni/duplicazioni (CNV) nei geni β- e α-globinici. Questi kit presentano comunque alcuni limiti tecnici, alcuni comuni alle tecniche di sequenziamento ad ampliconi, come l'allele-dropout, altri specifici come la difficoltà nell'amplificazione di regioni ad alto contenuto in GC (come i geni α-globinici) con possibili risultati falsi negativi. Inoltre, l'utilizzo di *short reads*, può non essere adeguato nel caso di grandi delezioni o duplicazioni dell'intero cluster α; perciò questa metodica è affiancata nei kit CE -IVD da un sistema di GAP PCR che invece permette di identificare le delezioni più comuni nel cluster alfa globinico. Infine l'elevata omologia dei geni *HBA1* e *HBA2* riduce la possibilità di attribuire con certezza la variante identificata al gene corretto (*HBA1* o *HBA2*). In questi casi, è quindi necessario ricorrere a metodiche di conferma che consentano una specifica assegnazione della variante al gene di origine. Per la classificazione delle varianti identificate se non presenti nei database curati specifici per la patologia, è raccomandato utilizzare la classificazione ACMG/AMP, le sue ulteriori revisioni e le linee VCEP per le varianti emoglobiniche (46,47).

L'avvento della tecnologia di sequenziamento di terza generazione "long reads" potrà in futuro offrire una soluzione a questi problemi sia per quanto riguarda i problemi legati all'amplificazione che al contenuto in GC.

L'uso di pannelli NGS, quindi, è vantaggioso dal punto di vista economico e operativo, soprattutto in contesti ad alta casistica e per analizzare adeguatamente campioni provenienti da altri Paesi con etnie differenti, ma richiede consapevolezza dei limiti tecnici e, laddove necessario, l'integrazione con metodiche complementari (come Gap-PCR, MLPA, Sanger) per garantire una diagnosi completa e affidabile. Dal punto di vista interpretativo, è stato osservato che l'NGS rilevi nuove varianti di significato incerto (VUS), imponendo un'interpretazione e una consulenza accurate (46) che, come già precedentemente indicato richiede l'utilizzo di linee guida ACMG/AMP recentemente aggiornate per l'interpretazione e la refertazione delle VUS.

In caso di indisponibilità della metodica NGS o in caso di necessità di referti urgenti che possono essere più rapidamente prodotti con altre tecniche, rimane in uso l'utilizzo di differenti tecniche di analisi del DNA per la diagnosi molecolare del portatore di emoglobinopatie (Tabella 12 e Tabella 13). Non tutte le tecniche sono in grado di rilevare tutte le mutazioni dei geni globinici (Tabella 12 e Tabella 13) e la scelta della tecnica da utilizzarsi si deve basare sul tipo di mutazione da ricercare, al fine di minimizzare il rischio di falsi negativi.

Nonostante nella nostra popolazione siano presenti mutazioni ricorrenti del gene β globinico, la riduzione dei costi del sequenziamento e le piccole dimensioni del gene *HBB* rendono oggi preferibile utilizzare in tutti i pazienti il sequenziamento del gene *HBB*, in quanto questa tecnica riduce nettamente la possibilità di falsi negativi e consente di identificare mutazioni con frequenza inferiore (48). L'utilizzo di kit per la ricerca di mutazioni ricorrenti del gene β globinico può essere preso in considerazione per la ricerca di mutazioni note familiari qualora economicamente conveniente nella specifica realtà locale.

Il *reverse dot blot* rimane comunque consigliato per:

- casi familiari in cui la mutazione nella famiglia è già nota
- per confermare varianti dell'emoglobina chiaramente identificate all'HPLC/elettroforesi capillare
- come seconda tecnica per confermare le mutazioni (ad es. nella diagnosi prenatale).

Ricordiamo che per la loro struttura biologica, i geni α-globinici sono più suscettibili a riarrangiamenti che inducono delezioni/duplicazioni, mentre il gene β-globinico è più suscettibile a mutazioni puntiformi (49).

Tabella 12

VANTAGGI E SVANTAGGI DI DIVERSE TECNICHE DI ANALISI DEL DNA
(2) (49) (21)

Metodo	Vantaggi	Limiti
Metodi per il rilievo di mutazioni note (Reverse dot blot hybridization, ASO, allele-specific PCR - ARMS PCR, GAP-PCR)	economico di semplice esecuzione rapido possibile utilizzo di kit commerciali	può riconoscere unicamente mutazioni note può non essere standardizzabile per alcune mutazioni specifiche generalmente non "high-throughput' se non si utilizzano kit commerciali deve essere validata internamente rischio di allele drop-out
Sanger Sequencing	economico piattaforma utilizzabile per differenti analisi può rilevare mutazioni in tutta la sequenza del gene	strumentazione con personale dedicato richiede competenza specifica per l'analisi non è in grado di porre diagnosi conclusiva di grandi delezioni
Pyrosequencing	rapido di facile esecuzione	consente l'esecuzione di corte sequenze di DNA (20-50 nucleotidi) strumentazione con personale dedicato richiede competenza specifica in analisi strumentazione poco diffusa
Next-generation sequencing (NGS)	piattaforma utilizzabile per differenti analisi può rilevare mutazioni/delezioni in tutta la sequenza dei geni globinici consente analisi di pannelli di geni	strumentazione con personale dedicato richiede competenza specifica in analisi bioinformatiche
High Resolution Melt Analysis (HRMA)	Rapido sensibile "high-throughput' utilizzabile anche per altre analisi	tecnicamente più difficile disegnare il saggio in alcuni casi è richiesta la conferma diagnostica con un altro metodo strumentazione con personale dedicato, richiede competenza specifica costi elevati dello strumento
Real-Time PCR	consente l'identificazione di variazioni qualitative e quantitative rapida "high-throughput'	richiede competenza specifica costi elevati dello strumento
MLPA	semplice, rapido esistono kit commerciali validati per l'analisi dei geni globinici può rilevare qualunque copy number variant nel locus	La qualità e la concentrazione del DNA sono critiche per la corretta esecuzione dell'analisi strumentazione con personale dedicato richiede competenza specifica in analisi

arrayCGH	può rilevare *copy number variations* nel locus	necessari kit specifici per i loci globinici non consente la caratterizzazione precisa dei punti di rottura di delezioni/duplicazioni strumentazione con personale dedicato richiede competenza specifica in analisi costi potenzialmente elevati

Tabella 13

TIPOLOGIE DI MUTAZIONE IDENTIFICABILI DA DIVERSE TECNICHE DI ANALISI DEL DNA (2,50)

Reverse dot blot hybridization, ASO, allele specific PCR - ARMS PCR	Mutazioni puntiformi/delezioni note geni α e β globinici
GAP-PCR	Delezioni/duplicazioni note geni α e β globinici. NB: può essere difficile l'amplificazione di regioni ricche in GC, rischio di allele drop out: non raccomandato in DPN
Sanger Sequencing/NGS	mutazioni puntiformi nell'intera sequenza dei geni α e β globinici
High Resolution Melt Analysis (HRMA)	mutazioni puntiformi nell'intera sequenza dei geni α e β globinici
MLPA	Delezioni/duplicazioni nell'intero locus dei geni α e β globinici
arrayCGH	Delezioni/duplicazioni nell'intero locus dei geni α e β globinici

Nei casi in cui gli esami di primo livello e dell'anamnesi sono altamente suggestivi per emoglobinopatie, si raccomanda la prosecuzione con indagini ulteriori con differenti metodiche in caso di negatività dei primi esami molecolari eseguiti.

Per soggetti con livelli di HbA2 borderline si raccomanda l'esclusione di uno stato di portatore di mutazioni β+ e di triplicazione/quadruplicazione dei geni α globinici. A seguito del riscontro di una mutazione nei geni globinici dovrebbe essere sempre verificata la corrispondenza con il fenotipo clinico.

Nel corso della consulenza deve essere chiaramente specificato che le analisi di primo livello possono escludere unicamente il rischio di talassemia trasfusione dipendente o Sindrome Falcemica, condizioni per le quali è indicata la diagnosi prenatale (DP) (Tabella 14).

Una più completa stima del rischio di ricorrenza di NTDT, condizioni per le quali comunque non è indicata la DP (Tabella 14), si può ottenere tramite analisi di secondo livello, escludendo lo stato di portatore di mutazioni β+ e di triplicazione/quadruplicazione dei geni α globinici nel partner di soggetti portatori di mutazione del gene β globinico.

RACCOMANDAZIONI:

- L'analisi del DNA deve essere sempre effettuata in coppie a rischio (entrambi i partner portatori di emoglobinopatie e/o triplicazione-quadruplicazione geni α globinici), in soggetti con esami di primo livello non dirimenti o in coppie in cui un partner è portatore di alfa e l'altro portatore di beta talassemia, per escludere che il tratto beta possa mascherare un tratto alfa, sottovalutando così il rischio di HbH nel feto.
- Nel caso di riscontro di sideropenia in coppie in gravidanza è preferibile avviare l'analisi molecolare prima della normalizzazione dei livelli marziali, al fine di evitare un accesso tardivo alla diagnosi

prenatale, se necessaria (38).

- È suggerito l'utilizzo di analisi NGS con kit marchiato CE IVD per la conferma molecolare.
- In caso di sospetto di α talassemia, in assenza di diagnosi NGS, è possibile utilizzare come primo livello di screening tecniche quali Reverse dot blot o GAP-PCR per mutazioni ricorrenti dei geni α globinici. In casi risultati negativi, ma con forte sospetto clinico di portatore di α-talassemia, si raccomanda la prosecuzione con indagini di secondo livello, quali NGS o MLPA.
- È raccomandato il sequenziamento del gene *HBB*.
- Per soggetti con livelli di HbA2 borderline si raccomanda l'esclusione di uno stato di portatore di mutazioni β+ e di triplicazione/quadruplicazione dei geni α globinici.
- Si raccomanda la ricerca di triplicazione/quadruplicazione dei geni α-globinici nei soggetti portatori di β-talassemia e nei partner di portatori di β-talassemia per una più completa valutazione del rischio di NTDT/TD.
- A seguito del riscontro di una mutazione nei geni globinici, deve essere sempre verificata la corrispondenza con il fenotipo clinico.
- Laddove il fenotipo clinico/biochimico non risulti coerente con l'assetto mutazionale a carico dei geni globinici, è consigliabile estendere l'analisi molecolare ad altri geni responsabili di difetti ereditari del globulo rosso o del metabolismo del ferro mediante analisi multigenica su base NGS. I disordini da considerare primariamente in tali casi sono difetti di membrana/enzimi eritrocitari.
- Nel corso della consulenza deve essere chiaramente specificato che le analisi di primo livello possono escludere unicamente il rischio di Talassemia Trasfusione Dipendente o Sindrome Falcemica, condizioni per le quali è indicata la Diagnosi Prenatale (Tabella 14).

6.2 Diagnosi Prenatale (DPN)

Tutte le coppie a rischio di emoglobinopatie devono ricevere l'offerta di una consulenza con specialisti del settore, in cui possano essere discusse le differenti opzioni riproduttive e la possibilità di accesso alla diagnosi prenatale.

La consulenza specialistica dovrebbe essere offerta ad ogni gravidanza e dovrebbe prendere in esame non solo gli aspetti medico-scientifici, ma anche quelli psicologici legati alle possibili scelte disponibili per la coppia.

La consulenza dovrebbe essere offerta in epoca prenatale e/o nelle prime settimane di gravidanza, al fine di lasciare tempo alla coppia di effettuare una scelta consapevole e per non precludere la possibilità di accesso ad alcune tecniche di diagnosi prenatale (idealmente la diagnostica prenatale dovrebbe essere completata entro la 12a-14a settimana di gestazione) (51).

Una precoce consulenza è in grado di consentire alle donne di effettuare una scelta informata, senza pressioni causate dalla mancanza di tempo, e consente di poter effettuare un'interruzione di gravidanza in caso di feto affetto, se desiderato.

Nell'ottica di identificare precocemente le coppie a rischio di emoglobinopatia sarebbe utile procedere allo screening simultaneo di entrambi i partner, piuttosto che attuare uno screening sequenziale. La richiesta degli

esami di screening dovrebbe essere effettuata alla prima visita ostetrica, se la coppia non è stata sottoposta alle indagini in precedenza.

La diagnosi precoce dell'eventuale presenza di alfa-talassemia con rischio di idrope fetale è fondamentale per garantire una corretta sorveglianza della gravidanza (terapia trasfusionale in utero – sorveglianza materna per il rischio di edema generalizzato – s. Ballantynes o mirror syndrome, che può porre a rischio di vita la donna (52) – possibile trapianto di cellule staminali in futuro).

Nell'ambito della consulenza devono anche essere discusse e descritte le tecniche di diagnosi prenatale e le loro limitazioni e risultati inattesi (es. non paternità), nonché il rischio di aborto (di circa 1% per villocentesi ed amniocentesi).

Dato il rischio di aborto correlato alla diagnosi prenatale invasiva, questa dovrebbe essere presa in considerazione solo nelle condizioni di rischio di malattia grave ed invalidante. In tutte le altre condizioni l'accesso alla diagnosi prenatale invasiva deve essere approfonditamente discusso con la coppia in un apposito colloquio informativo con uno specialista di settore.

Tabella 14

RIASSUNTO DELLE PIÙ FREQUENTI COMBINAZIONI IN DIAGNOSI PRENATALE (2) (24)

Genitore portatore di	β0	HbS	HbC/ Hb O-Arab/ HbD-Punjab	HbE	δβ0	HbLepore	β+	α0	α+
β0									
HbS									
HbC/ Hb O-Arab/ HbD-Punjab									
HbE									
δβ0									
Hb Lepore									
β+									
α0									
α+									

In rosso le situazioni con indicazione alla diagnosi prenatale, in giallo le situazioni in cui l'indicazione alla diagnosi prenatale è aperta.

In tutte le coppie a rischio in cui non viene effettuata una diagnosi prenatale è raccomandato l'avvio del test di portatore nel neonato entro i 3-6 mesi di vita.

Per coppie che decidono di avvalersi della DPN dovrà essere organizzato un percorso dedicato, con la coordinazione tra ostetricia – laboratorio – centro per le microcitemie per una ottimale gestione del campione e del referto.

In tutti i casi di DPN è necessario disporre di un campione di sangue di entrambi i genitori, al fine di confermare le mutazioni dei geni globinici da ricercare nel feto e per escludere la presenza di contaminazione materno-fetale (21). Si raccomanda di analizzare due campioni di villi coriali o liquido amniotico usando due reazioni separate e con due metodiche differenti (es. sequenziamento diretto e reverse dot blot). Ogni laboratorio dovrebbe determinare periodicamente la sensibilità del metodo scelto per l'esclusione della contaminazione materna (21). Idealmente, la sensibilità del test scelto per l'esclusione della contaminazione materna dovrebbe

essere superiore alla sensibilità del test scelto per effettuare la diagnosi molecolare. Nel caso in cui il genotipo fetale sia lo stesso della madre e l'analisi degli STR non consenta di escludere la contaminazione materna, l'analisi dovrebbe essere ripetuta su un nuovo campione (da coltura o su nuovo prelievo). Nei casi in cui sia impossibile ripetere l'analisi, il referto della diagnosi prenatale deve riportare chiaramente la presenza di contaminazione materna e il possibile rischio nella determinazione del genotipo fetale.

Le Linee guida internazionali raccomandano che, anche se l'indicazione alla DPN è la diagnosi di emoglobinopatia, è raccomandato effettuare anche l'analisi del cariotipo fetale (2,21).

Il referto della DPN deve essere consegnato nel minor tempo possibile nell'ambito di una consulenza in cui possa essere adeguatamente commentato (50).

Nel caso in cui il futuro padre rifiuti di sottoporsi al test di portatore, deve essere specificato che l'analisi del DNA fetale potrebbe indirettamente determinare il suo genotipo per i geni globinici studiati in diagnosi prenatale (53).

Nei casi in cui non sia disponibile il DNA paterno, è possibile accedere a DPN per la valutazione del rischio delle emoglobinopatie maggiori nel feto, dopo consulenza specialistica alla donna, in cui siano spiegati i benefici e i rischi di questo approccio. Nel caso in cui l'analisi del DNA fetale evidenziasse la presenza della mutazione del gene β-globinico materno, è necessario procedere al sequenziamento dell'intero gene al fine di escludere la presenza di una seconda mutazione (21). Nel referto dell'esame deve essere specificato che il genotipo paterno non è noto e che l'analisi genetica fetale non è in grado di escludere la presenza di tutte le emoglobinopatie, indicando preferibilmente il rischio residuo di emoglobinopatie nel feto.

Per gravidanze gemellari è fondamentale ottenere una diagnosi accurata in ogni gemello (es. mediante analisi STR).

6.3 Villocentesi

È la procedura di elezione per la DPN delle emoglobinopatie, in quanto consente di ottenere DNA fetale di buona qualità, tra la 10a e la 12a settimana di gestazione (54). È possibile, nei casi di tardiva identificazione della coppia a rischio, effettuare la villocentesi in un'epoca gestazionale più avanzata (circa a 14 settimane), se la placenta è idonea al prelievo.

Un campione di villo coriale di circa 2 mg è in genere sufficiente per ottenere materiale idoneo alla ricerca delle mutazioni nei geni globinici.

In tutti i casi deve essere effettuata un'accurata dissezione al microscopio ottico dei villi coriali da ogni tessuto materno e dalla decidua prima dell'estrazione del DNA, al fine di ridurre il rischio di contaminazione materna (21).

Il rischio di contaminazione materna dopo separazione della decidua è piuttosto basso; il rischio aumenta in caso di coltura del campione, ma tale procedura non è in genere necessaria per ottenere DNA per la ricerca di mutazioni globiniche note in famiglia.

6.4 Amniocentesi

Viene proposta qualora la villocentesi non sia praticabile per problematiche tecniche (es. placenta posteriore) o in gravidanze che giungano all'osservazione in epoca avanzata (l'amniocentesi viene effettuata dopo le 16 settimane di gestazione). La quantità del DNA ottenuta dagli amniociti è in genere inferiore a quella ottenuta da villi coriale, ma è solitamente sufficiente per ottenere una diagnosi di emoglobinopatia, se vengono prelevati circa 10 ml di liquido amniotico (21). Si può procedere alla coltura degli amniociti per 10-14 giorni, al fine di ottenere un quantitativo maggiore di DNA.
Il rischio di contaminazione materna è superiore a quanto osservato nella villocentesi.

6.5 Cordocentesi

Il prelievo di sangue funicolare può essere utilizzato sia per indagini biochimiche (emocromo – separazione delle frazioni emoglobiniche) sia per indagini molecolari. È eseguibile in epoca avanzata di gravidanza (dopo le 18-20 settimane) ed è gravata da un rischio di aborto (circa 2%) superiore alle altre tecniche di DPN; per questo motivo tende ad essere utilizzata molto meno rispetto al passato.
Anche nella diagnostica dell'idrope fetale è oggi poco usata in quanto oggi la diagnosi viene più frequentemente effettuata mediante indagine molecolare nel primo trimestre o mediante diagnosi ecografica, che rileva cardiomegalia e placentomegalia a partire dal secondo trimestre. Esperti ecografisti possono riconoscere questa condizione già a 11-13 settimane (21).

6.6 Celocentesi

È possibile effettuare l'indagine molecolare dopo aspirazione di liquido celomatico a partire dalla 8 settimana; l'indagine viene effettuata su DNA estratto da eritroblasti fetali presenti nel liquido celomatico (55). Tale tecnica non è diffusa e viene effettuata da un unico centro al mondo.

6.7 Analisi molecolare in DPN

Le tecniche di analisi molecolare disponibili sono le medesime in uso per la diagnosi postnatale; il laboratorio adotterà la tecnica più idonea alla ricerca della mutazione parentale tra quelle disponibili localmente.
Si ritiene utile confermare il risultato della DPN dopo la nascita, su sangue cordonale o con prelievo dedicato nel primo anno di vita in caso di feto non affetto; in caso di feto affetto si raccomanda l'esame nel paziente entro i 3 mesi di vita (20).

Coppie a rischio di idrope fetale che rifiutino o per le quali non sia possibile la diagnosi molecolare devono essere indirizzate al monitoraggio ecografico per la determinazione dell'indice cardiotoracico, dello spessore placentare o del picco di velocità sistolica dell'arteria cerebrale media (5,50,52,53,55). Il rapporto cardiotoracico sembra essere il metodo più affidabile per il riconoscimento precoce di alfa talassemia con rischio di idrope fetale. La diagnosi di feto affetto è suggerita da un rapporto cardiotoracico >0.5 prima delle 17 settimane, uno spessore placentare >18 mm prima delle 15 settimane o >30 mm a ≥18 s.g. o superiore alla

media di più di 2 SD per l'età gestazionale, o un picco di velocità sistolica dell'arteria cerebrale media >1.5 multipli di mediana (MoM) per l'età gestazionale dopo le 15 settimane (56).

6.8 DNA fetale circolante (cffDNA)

Il DNA fetale circolante (cffDNA) è oggi comunemente utilizzato nello screening prenatale non invasivo delle anomalie cromosomiche fetali.

Al momento non vi sono evidenze di una sensibilità e specificità tali da consentire l'utilizzo di questa tecnica nella diagnosi prenatale di malattie recessive (57). Sono in corso studi per la diagnosi di malattie recessive su cffDNA mediante la ricostruzione dell'aplotipo dell'allele mutato ma tali tecniche non sono ancora state validate per diagnostica. Qualora la coppia effettui l'analisi per emoglobinopatie sul cffDNA, tale test non può essere attualmente considerato diagnostico e si deve procedere alla conferma tramite diagnosi prenatale invasiva secondo quanto sopra descritto (22). Al momento attuale, l'analisi del cffDNA in presenza di genitori portatori può essere diretta unicamente alla conferma/esclusione della presenza della mutazione paterna.

6.9 Diagnosi Genetica Preimpianto (PGT)

La diagnosi genetica preimpianto costituisce un argomento altamente specialistico per cui vengono qui fornite unicamente alcune indicazioni generali.

I metodi per effettuare la PGT devono essere altamente stringenti ed ottimizzati a garantire il trasferimento unicamente di embrioni sani (58).

Sia a causa delle tecniche di procreazione assistita sia a causa della PGT la probabilità della nascita di un bambino sano è in genere non superiore al 30-50%; tale dato deve essere chiaramente discusso con coppie normofertili, in quanto la probabilità di gravidanza naturale con successiva DPN di feto sano è superiore alla probabilità offerta dalla PGT (50).

Per coppie che decidano di intraprendere un percorso PGT, dopo una consulenza genetica con uno specialista in emoglobinopatie, è raccomandato un colloquio esplicativo con un centro di fecondazione assistita esperto, in cui possa essere illustrato il percorso di PGT, con i suoi benefici e rischi. Qualora la coppia opti per la PGT, dopo l'ottenimento della gravidanza è comunque raccomandata l'effettuazione di DPN o il successivo follow-up del neonato (50).

Per le indicazioni generali sulla PGT si faccia riferimento alle "Raccomandazioni SIGU sulle buone pratiche di diagnosi prenatale genetica dopo esecuzione di Test Genetico Preimpianto (PGT)".

6.10 Donazione di gameti

In caso di donazione di gameti si raccomanda di sottoporre a screening per emoglobinopatie la coppia richiedente. Se si identifica un portatore o un quadro sospetto, è necessario estendere lo screening del portatore al donatore dei gameti. Più in generale, sarebbe sempre preferibile definire lo stato genetico del donatore prima dell'utilizzo dei gameti.

RACCOMANDAZIONI:

- Le coppie a rischio devono effettuare una consulenza mirata con uno specialista di settore con documentata esperienza nella cura delle emoglobinopatie (internista, ematologo, pediatra, genetista clinico).
- Coppie per cui non sia stata possibile la consulenza in epoca prenatale dovrebbero essere informate circa il rischio di ricorrenza e le possibilità di DPN in future gravidanze (5).
- E' preferibile effettuare la DPN mediante CVS nel primo trimestre di gestazione.
- Prima di accedere alla DPN, deve essere determinato il genotipo dei due genitori.
- Se non è disponibile il genotipo paterno devono essere chiaramente spiegate le limitazioni della DPN (possibile mancato rilevamento di una seconda mutazione del gene β-globinico a causa di limitazioni tecniche).
- Anche se è stata effettuata la DPN, è preferibile sottoporre il nato al test del portatore, idealmente entro il primo anno di vita qualora il quadro prenatale indicasse un soggetto non affetto. In caso di sospetto di patologia conclamata (soggetto affetto), si raccomanda l'esecuzione del test diagnostico entro i 3 mesi di vita."
- In tutte le coppie a rischio in cui non viene effettuata una diagnosi prenatale è raccomandato l'avvio del test di portatore nel neonato entro i 3-6 mesi di vita.
- In caso di donazione di gameti/Diagnosi genetica preimpianto (PGT) è raccomandata una consulenza specifica presso un centro esperto.
- Con le metodiche diagnostiche attualmente disponibili, l'analisi del DNA fetale libero nel sangue materno (cffDNA) non è sufficiente per formulare una diagnosi di certezza di emoglobinopatia.

7. Consenso Informato alle Indagini

In tutti i casi di analisi del DNA (pre- e post-natale) deve essere ottenuto il consenso scritto del paziente o del tutore come da normativa vigente (59).

8. Refertazione

La refertazione deve essere effettuata unicamente quando sono disponibili i risultati di tutti gli esami di screening. Il referto deve essere scritto in maniera chiara, con un breve commento sul risultato e il suggerimento a riferire a consulenza specialistica i soggetti portatori. Il referto deve riportare il dato tecnico e, alla fine, un commento discorsivo con eventuali raccomandazioni.

Nel referto deve essere chiaramente riportato se sono state effettuate trasfusioni di sangue nei 4 mesi precedenti, in quanto la trasfusione recente potrebbe causare una falsa interpretazione del dato di laboratorio (3).

Per la refertazione delle indagini di genetica molecolare è raccomandato utilizzare la classificazione ACMG/AMP, le sue ulteriori revisioni e le linee VCEP per le varianti emoglobinche (46,47) e "Linee Guida per la Refertazione in Genetica Molecolare Diagnostica del GdL Genetica molecolare SIGU", indicando le

mutazioni rilevate secondo la nomenclatura HGVS e secondo la nomenclatura tradizionale quando disponibile (HbVar Globin Gene Server – Ithagenes).

Nella consulenza specialistica si raccomanda la stesura di una relazione in cui siano riportati i risultati salienti degli esami effettuati e le conclusioni sullo stato di portatore, con le relative raccomandazioni per lo screening di coppia o per la diagnosi prenatale o pre-impianto ove indicato. La relazione dovrebbe utilizzare una terminologia facilmente comprensibile al paziente.

9. VEQ – AUDIT

Sia per la diagnostica biochimica sia per la diagnostica molecolare devono essere seguite le buone pratiche di laboratorio atte a ridurre l'errore umano, secondo quanto raccomandato da società di laboratorio (60) (61) e dalla Società Italiana di Genetica Umana (SIGU).
Si raccomanda l'esecuzione di controlli esterni di qualità e di audit periodici al fine di mantenere elevati standard diagnostici e consentire la comparazione di risultati ottenuti con strumenti diversi (3).
La partecipazione a VEQ è necessaria per ottenere l'accreditamento della struttura.

10. APPENDICE 1: esempi di percorsi diagnostici

La ricerca di difetti talassemici o di varianti dell'emoglobina può presentarsi in diverse circostanze e a diverse età (in epoca prenatale, alla nascita e in età adulta) con motivazioni e conseguenze diverse.

10.1 Percorsi diagnostici dalla nascita

Alla nascita di solito è meno frequente la necessità di procedere ad esami specifici per le emoglobinopatie, ma in determinate popolazioni alcuni difetti dell'emoglobina possono presentare una particolare frequenza e rilevanza sociale; può essere quindi giustificato un impegno diagnostico utile a far conoscere precocemente particolari assetti emoglobinici, suggerendo all'occorrenza trattamenti preventivi idonei, come accade in alcuni Paesi europei e negli Stati Uniti per l'HbS. Gli strumenti e il percorso diagnostico per poter individuare anomalie nella sintesi delle frazioni normali dell'Hb alla nascita sono sintetizzati in Tabella 15. Occorre considerare che l'esame da sangue adsorbito su carta può dare risultati non sovrapponibili a quelli ottenuti su prelievo fresco e in tali circostanze occorrerebbe considerare valori di riferimento adeguati.
In Tabella 16 sono riportate alcune tipologie di casi con i relativi parametri emoglobinici e le possibili conclusioni. In maggior dettaglio le possibilità diagnostiche alla nascita per i difetti globinici più frequenti sono riportate in Tabella 17.

Tabella 15

PERCORSO DIAGNOSTICO IN EPOCA NEONATALE

Prelievo venoso	Informazioni pre-test Consenso informato Informativa sui limiti del test	Raccolti dal laboratorio direttamente di genitori o ricevute dal clinico Fornita dal laboratorio
Assetto Hb	Mediante HPLC Elettroforesi capillare	I due metodi risultano parzialmente sovrapponibili nella valutazione dell'HbF, dell'HbA e delle varianti più frequenti
Indici emocromocitometrici	Alla nascita sono parzialmente utilizzati	
Eventuali altri test	Esami dei genitori	
Conclusione certa o presuntiva	Eventuale coinvolgimento del clinico e del Laboratorio di II livello	In caso di conclusione presuntiva, nella maggior parte dei casi, si rimanda l'esame almeno a dopo i sei mesi di vita
Referto	Va riportato il valore dell'HbA oltre a quello dell'HbF e delle eventuali altre frazioni HB	Alla nascita il valore dell'HbA2, anche se può essere presente in tracce, non ha significato diagnostico e non va riportato

Tabella 16

POSSIBILI CONCLUSIONI DIAGNOSTICHE SULLA BASE DEI LIVELLI DI HbA E HbF

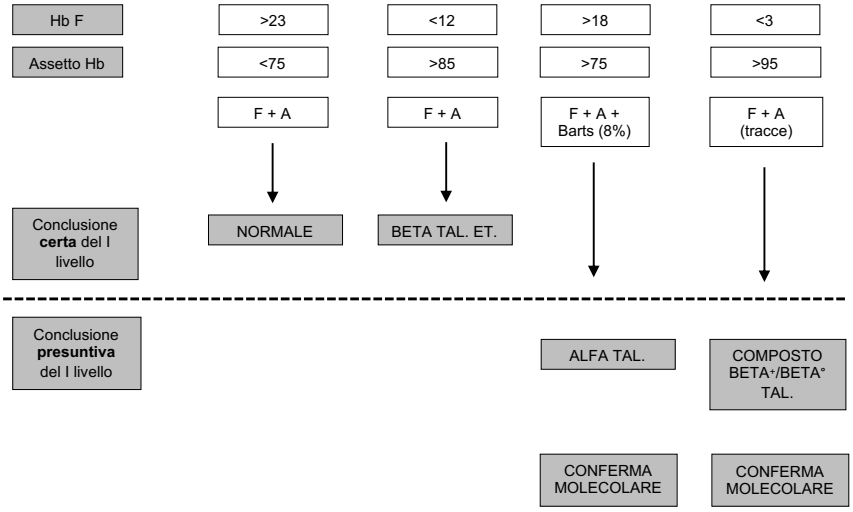


Tabella 17

POSSIBILITÀ DIAGNOSTICHE ALLA NASCITA PER LE VARIANTI GLOBINICHE PIÙ FREQUENTI

	Hb A %	Hb F %	Hb S %	Hb C %	Hb E %	Hb D %	Hb Bart's %	Hb Lepore %	Hb Hasharon %	Diagnosi
Normale	23±8	71±15	-	-	-	-	-	-	-	Certa (per Hb A>23%)
β° o β+ Talassemia eterozig.	13±7	84±9	-	-	-	-	-	-	-	Presuntiva (per Hb A<12%)
β° o β° Talassemia	0	100	-	-	-	-	-	-	-	Certa (a)
β°/β+ o β+/β+ Talassemia	< 5	> 95	-	-	-	-	-	-	-	Certa (a)
α+ Talassemia	21 ± 8	> 65	-	-	-	-	< 3	-	-	Presuntiva
α° Talassemia	20 ± 7	> 65	-	-	-	-	2 - 6	-	-	Presuntiva
Hb H	18 ± 6	> 65	-	-	-	-	> 8	-	-	Presuntiva
Hb S eterozigote	15 ± 7	73 ± 16	10 ± 5	-	-	-	-	-	-	Certa (b)
Hb S omozigote	0	> 85	< 15	-	-	-	-	-	-	Presuntiva (b)
β°/βs (Talassodrepanocitosi)	0	> 85	< 15	-	-	-	-	-	-	Presuntiva (b)
β+/βs (Talassodrepanocitosi)	< 5	> 82	< 12	-	-	-	-	-	-	Certa (b)
Hb C eterozigote	< 20	70 ± 10	-	10 ± 5	-	-	-	-	-	Certa (c)
Hb C omozigote	0	> 80	-	< 20	-	-	-	-	-	Presuntiva
Hb E eterozigote	< 20	75 ± 10	-	-	8 ± 3	-	-	-	-	Certa (c)
Hb E omozigote	0	> 85	-	-	< 15	-	-	-	-	Presuntiva
Hb D Punjab eterozigote	< 20	> 65	-	-	-	< 20	-	-	-	Presuntiva
Hb Lepore eterozigote	12 ± 7	> 80	-	-	-	-	-	0	-	Presuntiva (a)
Hb Lepore / β° Tal.	0	100	-	-	-	-	-	0	-	Presuntiva (a)
Hb Lepore / β+ Tal.	< 5	> 95	-	-	-	-	-	0	-	Presuntiva (a)
δ - β Tal. eterozigote	12 ± 7	86 ± 9	-	-	-	-	-	-	-	Presuntiva (a)
δ - β Tal. omozigote	0	100	-	-	-	-	-	-	-	Certa (a)
Hb Hasharon eterozigote	< 25	> 60 (d)	-	-	-	-	-	-	< 8	Presuntiva

(a) Se si conoscono i difetti dei genitori.
(b) Dopo conferma del test di sickling.
(c) Dopo conferma mediante CE.
(d) È compresa la quota variabile di Hb F con le catene alfa mutate.

10.2 Percorsi diagnostici nell'adulto

In generale, di fronte a normali valori di MCV e MCH e delle frazioni emoglobiniche non è richiesto nessun esame di secondo livello per emoglobinopatie.

Gli individui con MCV <80 fL o MCH < 27 pg (valori di riferimento per età maggiore di 16 anni) devono effettuare la valutazione dello stato marziale (sideremia, transferrina, IS e ferritina). Ovviamente questo tipo di approccio non consente di effettuare diagnosi di portatore di HbS, HbC o HbD o di doppia eterozigosi alfa/beta talassemia o nelle mutazioni lievi perché tali individui hanno valori normali di MCV e MCH. Pertanto, per una valutazione completa del portatore sano di talassemia e di altre emoglobinopatie è fortemente raccomandato che si esegua anche la separazione delle frazioni dell'emoglobina (es. mediante HPLC).

In Tabella 18 è riportato il percorso base che consente di poter giungere ad una conclusione certa o presuntiva di 1° livello in epoca preconcezionale e in gravidanza.

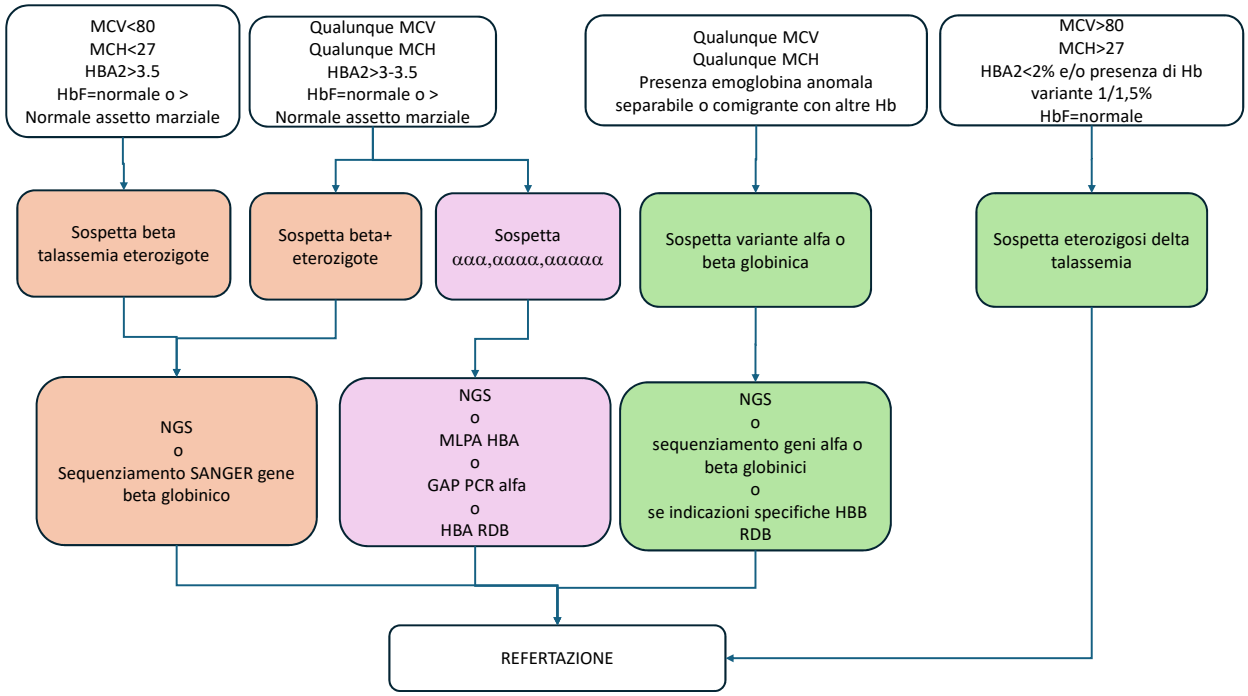
Tabella 18

PERCORSO DIAGNOSTICO PER L'IDENTIFICAZIONE DEL PORTATORE DI EMOGLOBINOPATIA

Prelievo venoso	Informazioni pre-test Informativa sul test e i limiti del percorso diagnostico di I livello	Raccolti direttamente dal paziente o ricevute dal clinico Fornita dal laboratorio
Assetto Hb	Mediante HPLC Elettroforesi capillare	I due metodi risultano parzialmente sovrapponibili nella valutazione dell'HbF, dell'HbA e delle varianti più frequenti
Indici emocromocitometrici	Relativamente a G.R., Hb, Ht, MCV, MCH, Reticolociti (in presenza di varianti)	
Assetto marziale	Sideremia, transferrina, ferritina, IS	
Eventuali altri test di conferma	Elettroforesi capillare	
Altri possibili test	Aptoglobina, bilirubina, P50, metHb	
Conclusione certa o presuntiva	Eventuale coinvolgimento del clinico o del Laboratorio di II livello	In gravidanza eventuali esami ai partner possono essere previsti contemporaneamente ad esami si conferma molecolare
Referto	Per quanto riguarda l'assetto Hb va riportato il valore dell'HbA2 oltre a quello dell'HbF e delle eventuali altre frazioni HB	L'HbA va riportata come dato dell'assetto qualitativo ma non va riportato il valore quantitativo

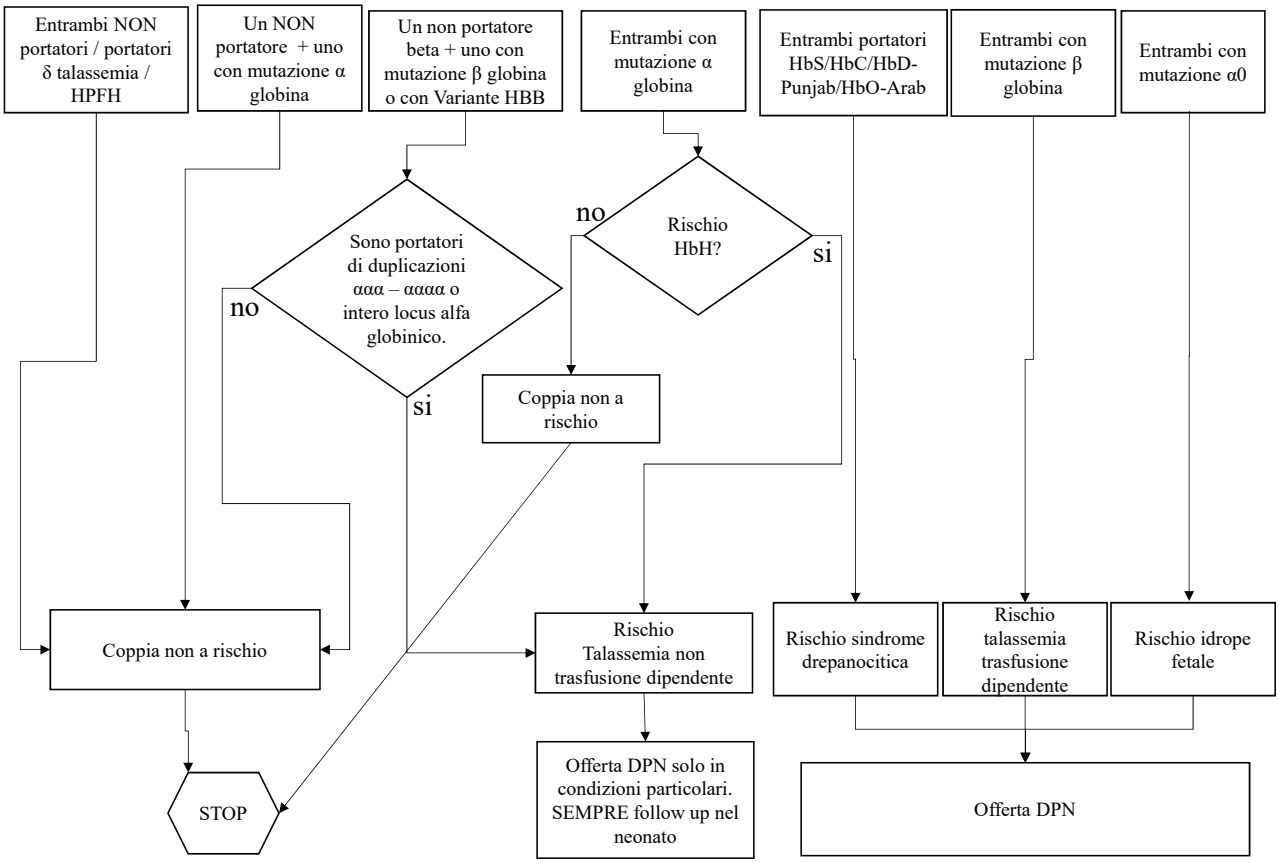
In gravidanza può essere chiesto al laboratorio di concludere il percorso analitico con urgenza e soprattutto che si concluda in modo definitivo e certo in tempo utile per eventuali esami fetali: nell'eventualità di una conclusione presuntiva il laboratorio di 1° livello dovrà porre le premesse per un rapido coinvolgimento del partner se non esaminato in precedenza, del clinico ed eventualmente del laboratorio di 2° livello. In primis, il partner deve eseguire un esame emocromocitometrico, una valutazione dello stato marziale e l'analisi delle frazioni dell'emoglobina mediante HPLC.

Algoritmo diagnostico e percorso di laboratorio nelle β -Talassemie



Si ringrazia la dott.ssa Marzia Scognamiglio per il suo supporto nella strutturazione del diagramma di flusso

Algoritmo di consulenza genetica e valutazione del rischio riproduttivo nelle emoglobinopatie ereditarie



Si ringrazia la dott.ssa Marzia Scognamiglio per il suo supporto nella strutturazione del diagramma di flusso

11. APPENDICE 2: TABELLA DI ORIENTAMENTO ALLA DIAGNOSI PRENATALE

Per le raccomandazioni di diagnosi prenatale sono stati consultati 5 esperti di 5 centri italiani.
Il fenotipo atteso è stato proposto sulla base dei dati presenti in letteratura e gli esperti consultati si sono dichiarati concordi con la definizione proposta (2,25). Per ogni indicazione è stato indicato il grado di concordanza tra gli esperti.

Tabella 19

Genotipo	Fenotipo atteso	Grado di incertezza nel predire il fenotipo	Concordanza tra esperti	Indicazione a rendere disponibile la DPN	Concordanza tra esperti
2 mutazioni β0 o β+ gravi	talassemia major	basso	100%	forte	94%
Hb Lepore + mutazione β0 o β+ gravi	talassemia major	basso	100%	forte	94%
δβ0 + mutazione β0 o β+ gravi	talassemia intermedia ad andamento grave/talassemia major	basso	100%	forte	94%
HbE + mutazione β0 o β+ gravi	talassemia intermedia ad andamento grave/talassemia major	medio	100%	forte	94%
Hb O-Arab + mutazione β0 o β+ gravi	talassemia intermedia/talassemia major	medio	94%	forte	94%
Hb Lepore omozigote	talassemia intermedia/talassemia major	basso	100%	forte	94%
HbS omozigote	sindrome drepanocitica	alto	96%	chiara	90%
HbS eterozigote + HbC/ Hb O-Arab/ HbD-Punjab	sindrome drepanocitica	medio	100%	chiara	94%
α0 talassemia omozigote	idrope fetale	basso	100%	assoluta	100%
2 mutazioni β+ lievi	talassemia intermedia	medio	84%	aperta	98%
δβ0 talassemia omozigote	talassemia intermedia	basso	100%	aperta	100%
δβ0 + mutazioni β+ lievi	talassemia intermedia	alto	88%	aperta	98%
δβ0 + Hb Lepore / HbE / Hb O-Arab	talassemia intermedia	medio	88%	aperta	100%
HbC + mutazione β0 o β+ gravi	talassemia intermedia	medio	88%	aperta	100%
HbC /HbE / HbD Punjab / Hb O-Arab omozigote	talassemia intermedia	alto	88%	bassa	98%
Hb D-Punjab/Hb O-Arab + mutazione β0 o β+ gravi	talassemia intermedia	alto	94%	chiara	88%
HbS/HbE	sindrome drepanocitica ad andamento intermedio	medio	88%	aperta	94%
HbS + mutazione β0 o β+ grave	sindrome drepanocitica	basso	88%	chiara	100%
HbS + mutazione β+ lievi	sindrome drepanocitica ad andamento intermedio	medio	100%	aperta	92%
HbS +δβ0 o Hb Lepore	sindrome drepanocitica ad andamento intermedio	medio	100%	aperta	100%

HbS + HbD Punjab	sindrome drepanocitica	alta	100%	chiara	100%
α0 + α+ talassemia (--/-α)	malattia da HbH	medio	94%	aperta	100%
ααα o αααα + mutazione β0 o β+ gravi	talassemia intermedia con quadro clinico variabile	medio	86%	aperta	94%
ααα o αααα + mutazione β+	talassemia intermedia lieve	medio	82%	bassa	100%
2 mutazioni β+ silenti	talassemia intermedia molto lieve	basso	100%	bassa	96%
HbC + mutazione β+ lievi	talassemia intermedia lieve	medio	84%	bassa	92%
HPFH	non clinicamente rilevante	basso	100%	nessuna	100%
α+ talassemia omozigote	non clinicamente rilevante	basso	100%	nessuna	100%
ααα omozigote	non clinicamente rilevante	basso	100%	nessuna	100%

12. BIBLIOGRAFIA

1. Mandrile G, Barella S, Giambona A, Gigante A, Grosso M, Perrotta S, et al. First and Second Level Haemoglobinopathies Diagnosis: Best Practices of the Italian Society of Thalassemia and Haemoglobinopathies (SITE). J Clin Med. 2022 Sep 15;11(18):5426. doi:10.3390/jcm11185426

2. Traeger-Synodinos J, Harteveld CL, Old JM, Petrou M, Galanello R, Giordano P, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. Eur J Hum Genet EJHG. 2015 Apr;23(4):426–37. doi:10.1038/ejhg.2014.131 PubMed PMID: 25052315; PubMed Central PMCID: PMC4666573.

3. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):35–49. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08054.x

4. Recommendations for preconceptional or antenatal screening, prenatal diagnosis and genetic counselling of haemoglobinopathies [Internet]. Available from: http://www.enerca.org

5. Wilson RD, De Bie I, Armour CM, Brown RN, Campagnolo C, Carroll JC, et al. Joint SOGC–CCMG Opinion for Reproductive Genetic Carrier Screening: An Update for All Canadian Providers of Maternity and Reproductive Healthcare in the Era of Direct-to-Consumer Testing. J Obstet Gynaecol Can. 2016 Aug;38(8):742-762.e3. doi:10.1016/j.jogc.2016.06.008

6. Sickle cell and thalassaemia screening programme: standards [Internet]. Available from: https://www.gov.uk/topic/population-screening-programmes/sickle-cell-thalassaemia

7. Manuale metodologico per la produzione di linee guida di pratica clinica [Internet]. Available from: https://snlg.iss.it/wp-content/uploads/2021/08/MM_v1.3.2_apr_2019.pdf

8. Schünemann HJ, Wiercioch W, Brozek J, Etxeandia-Ikobaltzeta I, Mustafa RA, Manja V, et al. GRADE Evidence to Decision (EtD) frameworks for adoption, adaptation, and de novo development of trustworthy recommendations: GRADE-ADOLOPMENT. J Clin Epidemiol. 2017 Jan;81:101–10. doi:10.1016/j.jclinepi.2016.09.009

9. Taher AT, Musallam KM, Cappellini MD. β-Thalassemias. Longo DL, editor. N Engl J Med. 2021 Feb 25;384(8):727–43. doi:10.1056/NEJMra2021838

10. Piel FB, Weatherall DJ. The α-Thalassemias. Longo DL, editor. N Engl J Med. 2014 Nov 13;371(20):1908–16. doi:10.1056/NEJMra1404415

11. Kavanagh PL, Fasipe TA, Wun T. Sickle Cell Disease: A Review. JAMA. 2022 Jul 5;328(1):57. doi:10.1001/jama.2022.10233

12. Pinto V, De Franceschi L, Russo R, Graziadei G, Sainati L, Lombardini L, et al. MANAGEMENT DEL SICKLE CELL TRAIT, Buone Pratiche SITE [Internet]. 2020. Available from: https://www.site-italia.org/file/collana_scientifica/management_sct/index.php

13. Naik RP, Smith-Whitley K, Hassell KL, Umeh NI, De Montalembert M, Sahota P, et al. Clinical Outcomes Associated With Sickle Cell Trait: A Systematic Review. Ann Intern Med. 2018 Nov 6;169(9):619–27. doi:10.7326/M18-1161

14. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO EXECUTIVE BOARD 118th SESSION GENEVA, 29-31 MAY 2006 [Internet]. Available from: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EBSS-EB118-2006-REC1/english/Res/res-eb118_2006_rec1-en.pdf

15. Harper PS. Practical genetic counselling. 7th ed. London: Hodder Arnold; 2010. 407 p.

16. Cousens NE, Gaff CL, Metcalfe SA, Delatycki MB. Carrier screening for Beta-thalassaemia: a review of international practice. Eur J Hum Genet. 2010 Oct;18(10):1077–83. doi:10.1038/ejhg.2010.90

17. Proposed International Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and Genetic Services (Part II). World Health Organization, Human Genetics Programme. Rev Derecho Genoma Hum Law Hum Genome Rev. 1998 Dec;(9):239–51. PubMed PMID: 10335346.

18. Davies SC, Cronin E, Gill M, Greengross P, Hickman M, Normand C. Screening for sickle cell disease and thalassaemia: a systematic review with supplementary research. Health Technol Assess Winch Engl. 2000;4(3):i–v, 1–99. PubMed PMID: 10840658.

19. Zeuner D, Ades AE, Karnon J, Brown J, Dezateux C, Anionwu EN. Antenatal and neonatal haemoglobinopathy screening in the UK: review and economic analysis. Health Technol Assess Winch Engl. 1999;3(11):i–v, 1–186. PubMed PMID: 10516927.

20. Global epidemiology of beta thalassemia – Thalassemia International Federation.

21. Li DZ, Yang YD. Invasive prenatal diagnosis of fetal thalassemia. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2017 Feb;39:41–52. doi:10.1016/j.bpobgyn.2016.10.011

22. Yates A.M., Prenatal screening and testing for hemoglobinopathy. In UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. [Internet]. Available from: https://www.uptodate.com/contents/prenatal-screening-and-testing-for-hemoglobinopathy

23. Hussein N, Weng SF, Kai J, Kleijnen J, Qureshi N. Preconception risk assessment for thalassaemia, sickle cell disease, cystic fibrosis and Tay-Sachs disease. Cochrane Cystic Fibrosis and Genetic Disorders Group, editor. Cochrane Database Syst Rev. 2018 Mar 14. doi:10.1002/14651858.CD010849.pub3

24. Committee Opinion No. 691: Carrier Screening for Genetic Conditions. Obstet Gynecol. 2017 Mar;129(3):e41–55. doi:10.1097/AOG.0000000000001952

25. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. Scand J Clin Lab Invest. 2007 Jan;67(1):71–86. doi:10.1080/00365510601046466

26. Lees C, Davies SC, Dezateux C. Neonatal screening for sickle cell disease. Cochrane Cystic Fibrosis and Genetic Disorders Group, editor. Cochrane Database Syst Rev. 2000 Jan 24;2010(11). doi:10.1002/14651858.CD001913

27. Supplemento ordinario alla “Gazzetta Ufficiale„ n. 65 del 18 marzo 2017 - Serie generale.

28. Istituto Superiore di Sanità. Gravidanza fisiologica. Seconda parte [Internet]. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2025 [cited 2026 Mar 25]. Report SNLG n. 1/2025. Available from: https://www.iss.it/documents/20126/9184367/SNLG+1_2025+Gravidanza-fisiologica+Parte-2.pdf/ea027f55-c33b-dff5-bda4-674c5d6cad28?version=1.0&t=1750690577078

29. Baronciani D, Casale M, De Franceschi L, Graziadei G, Longo F, Origa R, et al. Selecting β-thalassemia Patients for Gene Therapy: A Decision-making Algorithm. HemaSphere. 2021 May;5(5):e555. doi:10.1097/HS9.0000000000000555

30. Annals of Internal Medicine. 1976:517–20.

31. Forni GL, Barella S,m Cappellini, MD, Maggio A, Piga A. Architettura. Architettura della Rete Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie. 2018. Available at: [Internet]. Available from: http://www.siteitalia.org/forza_download.php?file=Architettura_Rete_Italiana.pdf. Accessed May 2, 2021

32. Brancaleoni V, Di Pierro E, Motta I, Cappellini MD. Laboratory diagnosis of thalassemia. Int J Lab Hematol. 2016 May;38:32–40. doi:10.1111/ijlh.12527

33. Buch AC, Karve PP, Panicker NK, Singru SA, Gupta SC. Role of red cell distribution width in classifying microcytic hypochromic anaemia. J Indian Med Assoc. 2011 May;109(5):297–9. PubMed PMID: 22187759.

34. Pinto VM, Russo R, Quintino S, Rosato BE, Marra R, Del Giudice F, et al. Coinheritance of PIEZO1 variants and multi-locus red blood cell defects account for the symptomatic phenotype in beta-thalassemia carriers. Am J Hematol. 2023 Jun;98(6):E130–3. doi:10.1002/ajh.26901 PubMed PMID: 36882369.

35. Karimi M, Yavarian M, Afrasiabi A, Dehbozorgian J, Rachmilewitz E. Prevalence of beta-thalassemia trait and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Iranian Jews. Arch Med Res. 2008 Feb;39(2):212–4. doi:10.1016/j.arcmed.2007.09.001 PubMed PMID: 18164966.

36. Giambona A, Passarello C, Ruggeri G, Renda D, Teresi P, Anzà M, et al. Analysis of delta-globin gene alleles in the Sicilian population: identification of five new mutations. Haematologica. 2006 Dec;91(12):1681–4. PubMed PMID: 17145605.

37. Trent RJ, Webster B, Bowden DK, Gilbert, A, Joy Ho P, Lindeman R, et al. Complex phenotypes in the haemoglobinopathies: recommendations on screening and DNA testing. Pathology (Phila). 2006 Dec;38(6):507–19. doi:10.1080/00313020601027634

38. Lee SY, Yap ES, Lee EY, Goh JH, Liu TC, Yip C. Evaluation of Thalassaemia Screening Tests in the Antenatal and Non-Antenatal Populations in Singapore. Ann Acad Med Singapore. 2019 Jan;48(1):5–15. PubMed PMID: 30788489.

39. Russo R, Marra R, Rosato BE, Iolascon A, Andolfo I. Genetics and Genomics Approaches for Diagnosis and Research Into Hereditary Anemias. Front Physiol. 2020;11:613559. doi:10.3389/fphys.2020.613559 PubMed PMID: 33414725; PubMed Central PMCID: PMC7783452.

40. Luke N, Hillier K, Al-Samkari H, Grace RF. Updates and advances in pyruvate kinase deficiency. Trends Mol Med. 2023 May;29(5):406–18. doi:10.1016/j.molmed.2023.02.005 PubMed PMID: 36935283; PubMed Central PMCID: PMC11088755.

41. Nannelli C, Bosman A, Cunningham J, Dugué PA, Luzzatto L. Genetic variants causing G6PD deficiency: Clinical and biochemical data support new WHO classification. Br J Haematol. 2023 Sep;202(5):1024–32. doi:10.1111/bjh.18943 PubMed PMID: 37415281.

42. Iolascon A, Andolfo I, Russo R. Advances in understanding the pathogenesis of red cell membrane disorders. Br J Haematol. 2019 Oct;187(1):13–24. doi:10.1111/bjh.16126 PubMed PMID: 31364155.

43. Andolfo I, Iolascon A, Russo R. The evolving landscape of hereditary stomatocytosis. Blood. 2025 Jun 26;145(26):3089–100. doi:10.1182/blood.2024024294 PubMed PMID: 40233304.

44. Iolascon A, Andolfo I, Russo R. Congenital dyserythropoietic anemias. Blood. 2020 Sep 10;136(11):1274–83. doi:10.1182/blood.2019000948 PubMed PMID: 32702750.

45. Roy NBA, Da Costa L, Russo R, Bianchi P, Mañú-Pereira MDM, Fermo E, et al. The use of next-generation sequencing in the diagnosis of rare inherited anaemias: A Joint BSH/EHA Good Practice Paper. Br J Haematol. 2022 Aug;198(3):459–77. doi:10.1111/bjh.18191 PubMed PMID: 35661144.

46. Mighton C, Abu-El-Haija A, Aggarwal V, Akkari YMN, Astbury C, Best DH, et al. Points to consider for the reporting of variants of uncertain significance in germline genetic and genomic testing: A statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med Off J Am Coll Med Genet. 2026 Jul;28(7):102583. doi:10.1016/j.gim.2026.102583 PubMed PMID: 42287277.

47. Kountouris P, Stephanou C, Lederer CW, Traeger-Synodinos J, Bento C, Harteveld CL, et al. Adapting the ACMG/AMP variant classification framework: A perspective from the ClinGen Hemoglobinopathy Variant Curation Expert Panel. Hum Mutat. 2022 Aug;43(8):1089–96. doi:10.1002/humu.24280 PubMed PMID: 34510646; PubMed Central PMCID: PMC9545675.

48. Ip HW, So CC. Diagnosis and prevention of thalassemia. Crit Rev Clin Lab Sci. 2013 Nov;50(6):125–41. doi:10.3109/10408363.2013.847236

49. Traeger-Synodinos J, Harteveld CL. Preconception carrier screening and prenatal diagnosis in thalassemia and hemoglobinopathies: challenges and future perspectives. Expert Rev Mol Diagn. 2017 Mar 4;17(3):281–91. doi:10.1080/14737159.2017.1285701

50. Vrettou C, Kakourou G, Mamas T, Traeger-Synodinos J. Prenatal and preimplantation diagnosis of hemoglobinopathies. Int J Lab Hematol. 2018 May;40:74–82. doi:10.1111/ijlh.12823

51. Dormandy E, Gulliford M, Bryan S, Roberts TE, Calnan M, Atkin K, et al. Effectiveness of earlier antenatal screening for sickle cell disease and thalassaemia in primary care: cluster randomised trial. BMJ. 2010 Oct 5;341(oct05 2):c5132–c5132. doi:10.1136/bmj.c5132

52. Lal A. Alpha thalassemia major: Prenatal and postnatal management. In UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. [Internet]. Available from: https://www.uptodate.com/contents/alpha-thalassemia-major-prenatal-and-postnatal-management?search=course-and&source=search_result&selectedTitle=7~150&usage_type=default&display_rank=7

53. Skirton H, Goldsmith L, Chitty LS. An easy test but a hard decision: ethical issues concerning non-invasive prenatal testing for autosomal recessive disorders. Eur J Hum Genet. 2015 Aug;23(8):1004–9. doi:10.1038/ejhg.2014.238

54. Ghi T, Sotiriadis A, Calda P, Da Silva Costa F, Raine-Fenning N, Alfirevic Z, et al. ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis. Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol. 2016 Aug;48(2):256–68. doi:10.1002/uog.15945 PubMed PMID: 27485589.

55. Giambona A, Makrydimas G, Leto F, Damiani G, Jakil MC, Picciotto F, et al. Feasibility of DNA diagnosis of haemoglobinopathies on coelocentesis: DNA Diagnosis of Haemoglobinopathies on Coelocentesis. Br J Haematol. 2011 Apr;153(2):268–72. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08621.x

56. Li X, Zhou Q, Zhang M, Tian X, Zhao Y. Sonographic Markers of Fetal α-Thalassemia Major. J Ultrasound Med. 2015 Feb;34(2):197–206. doi:10.7863/ultra.34.2.197

57. Cell-free DNA to Screen for Single-Gene Disorders [Internet]. Available from: https://www.acog.org/clinical/clinical-guidance/practice-advisory/articles/2019/02/cell- free-dna-to-screen-for-single-gene- disorders?utm_source=redirect&utm_medium=web&utm_campaign=otn

58. ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho F, Coonen E, Goossens V, Kokkali G, Rubio C, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT†. Hum Reprod Open. 2020 Mar 1;2020(3):hoaa021. doi:10.1093/hropen/hoaa021

59. Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici n. 8/2016 GU Serie Generale n.303 del 29-12-2016 - Suppl. Ordinario n. 61.

60. Recommended quality control for antenatal screening for sickle cell disease [Internet]. Available from: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/740616/Recommended_quality_control_for_antenatal_screening_for_sickle_cell_disease.pdf

61. Lobitz S, Telfer P, Cela E, Allaf B, Angastiniotis M, Backman Johansson C, et al. Newborn screening for sickle cell disease in Europe: recommendations from a Pan-European Consensus Conference. Br J Haematol. 2018 Nov;183(4):648–60. doi:10.1111/bjh.15600