

G.C. Guidi

STANDARDIZZAZIONE
EMATOLOGICA NELLA PREVENZIONE E
NEL TRATTAMENTO DELLE EMOGLOBINOPATIE

SCREENING PRENATALE

Standards per lo Screening

- Lo screening prenatale e lo screening del neonato sono collegati per accrescere il grado di informazione in funzione:
 - dell'interpretazione dei risultati
 - della comunicazione con i genitori

Condizioni della madre che richiedono screening prenatale

- Emoglobinopatie significative della madre
 - HbSS
 - HbSC
 - HbSDPunjab
 - HbSE
 - HbSOArab
 - HbS/Lepore
 - HbS/ β -talassemia
 - β -talassemia intermedia
 - HbH
 - (β -talassemia major)

Condizioni della madre che richiedono screening paterno (1°)

- Emoglobinopatie della madre (come precedente)
 - HbSS
 - HbSC
 - HbSDPunjab
 - HbSE
 - HbSOArab
 - HbS/Lepore
 - HbS/ β -talassemia
 - β -talassemia intermedia
 - HbH
 - (β -talassemia major)

Condizioni della madre che richiedono screening paterno (2°)

- Trait materno
 - HbAS
 - HbAC
 - HbADPunjab
 - HbAE
 - HbAOArab
 - HbA/Lepore
 - Trait β -talassemico

 - Trait $\delta\beta$ -talassemico
 - Trait α^0 talassemico
 - HPFH
- Potenziale malattia fetale
 - HbSS
 - HbSC
 - HbSDPunjab
 - HbSE
 - HbSOArab
 - HbS/Lepore
 - HbS/Lepore; HbS/ β -talassemia
 - HbE/ β -talassemia; β -talassemia major intermedia
 - HbS/ $\delta\beta$ -talassemia
 - Idrope fetale HbBart's
 - HbS/HPFH

Condizioni della madre che richiedono screening paterno (3°)

- Qualsiasi combinazione fra eterozigoti, inclusa una o più delle condizioni precedenti

Condizioni della madre che richiedono screening paterno (4°)

- Qualsiasi stato di omozigosi delle condizioni precedenti

Emoglobina S

definizioni

- “Eterozigoti misti” sono gli individui che presentano una copia di HbS ed una di altra variante, ad es. HbD-Punjab o β -talassemia. Alcune portano a condizioni simili alla sindrome da anemia falciforme
- I “portatori” hanno una singola copia di HbS ed un gene β normale (HbAS), oppure una variante che non provoca sickling (es. HbS/Hb Korle Bu). La condizione è denominata “trait falciforme”

Emoglobina S

caratteristiche cliniche

- Ridotta sopravvivenza RBC
- Vaso-occlusione
 - vasi cerebrali → stroke
- Anemia
- Crisi emolitiche episodiche
- Sequestro ematico
 - splenico, polmonare, epatico
- Tendenza ad infezioni, di gravità varia

Emoglobina S

mortalità

- In Africa mortalità infantile elevata con picco massimo fra 1 e 3 anni di età soprattutto dovuta ad infezioni
- Nelle realtà più progredite sopravvivenza migliore, garantita da:
 - Programmi di screening neonatale
 - Vaccinazioni precoci
 - Penicillina orale come profilassi
 - Migliore trattamento delle infezioni
 - Negli Usa la mediana di vita è 42 a. ♂ 48 a. ♀

α -talassemie – Aspetti generali

- Nelle α -th vi è eccesso di catene β , o γ nel neonato
- Le catene in eccesso formano tetrameri detti HbH, o Hb Bart
- HbH e Hb Bart sono instabili, hanno affinità elevata, precipitano come Heinz Bodies sulla membrana e causano emolisi

α -talassemie – Distribuzione

- Frequenza della α^+ talassemia:
 - 10-20% in parti dell' Africa sub-sahariana
 - 40% o più nel medio oriente e India
 - Oltre 80% in Papua-Nuova Guinea ed in zone dell' India nord orientale
- In Africa si osserva la delezione -3.7
- La α^0 talassemia (delezione di due geni cis) si osserva in Asia SE e nel bacino Mediterraneo

β -talassemie – aspetti generali

- Eccesso di catene α , incapaci di associarsi ed altamente instabili
- Durante l'eritropoiesi le α -globine si associano alle β tramite AHSP (proteina di stabilizzazione delle catene α)
- Le catene α libere sono ossidanti attivi che causano apoptosi e quindi eritropoiesi inefficace
- Perciò le α -th sono malattie emolitiche e le β -th sono malattie diseritropoietiche
- Le β -th sono prevalentemente dovute a mutazione o a brevi inserzioni/delezioni di pochi nucleotidi

β -talassemie – aspetti generali

- Nelle β^+ -th le mutazioni codificano per ridotte quantità di mRNA e quindi di β globina, con ampie variazioni a seconda del tipo di mutazione e con catena normale o anormale (HbE, Hb Knossos)
- Nelle β^0 -th la mutazione impedisce del tutto la codifica di mRNA e quindi vi è assenza di β globina

β -talassemie – epidemiologia

- Ampia distribuzione dal Mediterraneo all' Africa al medio ed estremo Oriente fino al Pacifico in aree corrispondenti alla diffusione malarica
- La maggior parte dei casi sono dovuti a poche mutazioni, con accanto mutazioni più rare
- Gli eterozigoti sono asintomatici, gli omozigoti o i doppi eterozigoti delle zone più povere vivono pochi anni senza trasfusioni
- Trasfusioni e terapia ferrochelante con DFOX o altri chelanti allungano di molto la sopravvivenza

Obiettivo 1° degli Standards per il Programma di screening prenatale

- Facilitare la decisione informata riguardo allo screening:
 - Per tutte le donne che si presentano
 - Per le coppie identificate ad alto rischio
- offrendo copertura fino ad una determinata settimana di gravidanza

Standards per il Programma di screening prenatale (1°)

Minimo essenziale

- 85% delle donne gravide raggiunte dall'informazione
- 50% delle donne e/o coppie ad alto rischio identificate entro i termini stabiliti (11° sett.)
- 50% di tutte le diagnosi prenatali entro la 12° sett.

Ottimale a regime

- 95% delle donne gravide raggiunte dall'informazione
- 60% delle donne e/o coppie ad alto rischio identificate entro i termini stabiliti (11° sett.)
- 60% di tutte le diagnosi prenatali entro la 12° sett.

Standards per il Programma di screening prenatale – Raccolta dei dati (1°)

- Dati da raccogliere (questionario):
 - Origine della famiglia
 - Esami di laboratorio eseguiti
 - Test prenatali di screening già eseguiti su componenti della famiglia
- Luoghi di raccolta dei dati:
 - Reparti di maternità
 - Centri di diagnostica prenatale
 - Laboratori di diagnostica prenatale

Obiettivo 2° degli Standards per il Programma di screening prenatale

- Rilevare accuratamente le gravidanze affette:
 - Accuratezza dello screening nel rilevare portatori/affetti nei laboratori locali, compreso il grado di sensibilità dei questionari nell'identificare i gruppi ad alto rischio
 - Accuratezza (sensibilità e specificità) di diagnosi e processi eseguiti presso i laboratori di riferimento, comprese le procedure di campionamento dei villi

Standards per il Programma di screening prenatale (2°)

Minimo essenziale

- 85% di sensibilità del questionario
- 90% dello screening presso il lab. Locale
- 97% di sens. e specif. per HbSS e SC
- 95% di sens. e specif. per β -talassemia major nelle gravidanze a rischio

Ottimale a regime

- 95% di sensibilità del questionario
- 95% per i test che identificano portatori di talassemia e varianti Hb
- 99% sensibilità e specificità in tutte le gravidanze a rischio

Standards per il Programma di screening prenatale – Raccolta dei dati (2°)

- Dati:
 - Incrocio dei dati del questionario e dei risultati di laboratorio del neonato
 - I risultati della diagnosi prenatale sono paragonati con i test di screening del neonato ed altri risultati utili
- Luoghi di raccolta dei dati:
 - Reparti di maternità

SCREENING NEONATALE

Standards per lo Screening

- Lo screening prenatale e lo screening del neonato sono collegati per accrescere il grado di informazione in funzione:
 - dell'interpretazione dei risultati
 - della comunicazione con i genitori

Screening neonatale

- Emoglobinopatie ricercate nel neonato su spot
 - HbSS
 - HbSC
 - HbSD
 - HbS/ β talassemia (β^+ , β^0 , $\delta\beta$, Lepore),
 - HbSO Arab
 - HbS/HPFH

Obiettivo 1° degli Standards per il Programma di screening neonatale

- Consentire la migliore sopravvivenza possibile con malattia da HbS, valutando:
 - Mortalità espressa in eventi/anno
- Accuratezza nel rilevare tutti i neonati con importanti emoglobinopatie, valutando:
 - I livelli di sensibilità dei processi di screening

Standards per il Programma di screening **neonatale** (1°)

Minimo essenziale

- Mortalità sotto i 5 anni < 4/1000 (2 decessi per 100 bambini affetti)
- 99% sensibilità per HbSS
- 98% per HbSC
- 95% per le altre varianti

Ottimale a regime

- Mortalità sotto i 5 anni < 2/1000 (1 decesso per 100 bambini affetti)
- 99.5% sensibilità per HbSS
- 99% per HbSC
- 97% per le altre varianti

Obiettivo 2° degli Standards per il Programma di screening **neonatale**

- Comunicazione tempestiva dei risultati positivi (sickling), con report della situazione familiare, riportando:
 - Tempi entro cui viene comunicato il referto
- Registrazione e follow-up dei neonati affetti, riportando:
 - Tempi entro cui il neonato è registrato per il follow-up
- Contestuale conferma delle diagnosi positive

Standards per il Programma di screening **neonatale** (2°)

Minimo essenziale

- Comunicazione ai genitori del 90% dei risultati del sickling test entro 4 settimane di vita
- Registrazione effettiva del 90-95% dei neonati affetti entro 4 settimane di vita
- 90% dei neonati Iniziano il follow-up entro 3 mesi di età
- Conferma diagnostica del 90% dei casi HbSS e HbSC entro 6 mesi

Ottimale a regime

- Comunicazione ai genitori del **95%** dei risultati del sickling test entro 4 settimane di vita
- Registrazione effettiva del **95%** dei neonati affetti entro 4 settimane di vita
- **95%** dei neonati Iniziano il follow-up entro 3 mesi di età
- Conferma diagnostica del **95%** dei casi HbSS e HbSC entro 6 mesi

Obiettivo 3° degli Standards per il Programma di screening neonatale

- Trattamento tempestivo (profilassi con Penicillina e/o immunizzazione vs. pneumococco con Prevenar) ed istruzione ai genitori per i neonati con:
 - HbSS, HbSC, HbSD^{Punjab}, HbS/ β talassemia, HbSO^{Arab}, HbS/HPFH
- Comunicazione diretta agli operatori sanitari:
 - Tempi entro cui il neonato è registrato per il follow-up
- Comunicazione ai genitori

Standards per il Programma di screening **neonatale** (3°)

Minimo essenziale

- 90% di somministrazione di profilassi penicillinica entro i 3 mesi
- 80% di vaccinazione con Prevenar entro i 6 mesi
- 80% degli operatori sanitari informati dei casi positivi entro le 4 settimane
- Comunicazione della diagnosi, degli interventi e del follow-up a 95% delle famiglie

Ottimale a regime

- 95% di somministrazione di profilassi penicillinica entro i 6 mesi
- 95% di vaccinazione con Prevenar entro i 12 mesi
- 95% degli operatori sanitari informati dei casi positivi entro le 6 settimane
- Comunicazione sul trattamento delle infezioni, sulle complicanze (anemia, splenomegalia, ictus) al 95% delle famiglie

EDUCAZIONE SANITARIA

Obiettivo 1° degli Standards per l'Educazione sanitaria **Operatori e Famiglie**

- Sviluppo di programmi di formazione per tutto il personale sanitario coinvolto (Maternità, Pediatria, Laboratorio, Territorio)
- Valutazione del grado di copertura dei programmi di formazione e del loro impatto sulle prestazioni rivolte ai soggetti affetti
- Informazione rivolta alle famiglie prima e dopo lo screening per minimizzare ansietà ed incomprensione dei problemi legati all'emoglobinopatia

Standards per l'Educazione sanitaria

Operatori e Famiglie

Minimo essenziale

- 70% degli operatori coinvolti frequentano i programmi di formazione
- 80% dei genitori e/o pazienti ricevono informazioni in formato accessibile

Ottimale a regime

- 85% degli operatori coinvolti frequentano i programmi di formazione
- 100% dei genitori e/o pazienti ricevono informazioni in formato accessibile

LABORATORIO

Screening prenatale

Standards per il Laboratorio 1°

- Il laboratorio deve essere accreditato
- Presso il laboratorio deve esserci un responsabile con competenze cliniche per il servizio di screening
- Il laboratorio deve procedere secondo l'algoritmo di indagine concordato per il programma di screening
- Il referto di laboratorio deve essere conforme alle linee guida del programma di screening

Screening prenatale

Standards per il Laboratorio 2°

- Il laboratorio deve avere una procedura standard operativa per il servizio di screening prenatale per HbS e talassemie, che descriva il processo dalla ricezione del campione al referto finale
- Deve essere prevista una politica di risk management per gli aspetti di laboratorio del servizio per le Hbpatie, rivolta alla minimizzazione del rischio

Screening prenatale

Standards per il Laboratorio 3°

- Il laboratorio deve partecipare ad un programma VEQ appropriato e deve dimostrare soddisfacente performance
- Deve essere possibile fornire un referto (anche provvisorio) entro tre giorni dalla ricezione del campione.
- Il laboratorio deve partecipare ad audit a livello locale e regionale sull'efficacia del programma

Screening per HbS

Ulteriori standards per il Laboratorio

- Il laboratorio dovrebbe eseguire più di 25000 screening/anno (ideale 50000)
- Lo screening iniziale da blood spot va eseguito in HPLC, confermando con altro metodo i positivi
- Il laboratorio deve possedere un sistema informatico interfacciato con i sistemi delle unità di pediatria per la raccolta dei dati anagrafici e clinici dello screening

Screening per HbS e talassemie

Ulteriori standards per il Laboratorio di Biologia molecolare 1°

- Il laboratorio dovrebbe raccogliere un minima quantità di informazioni per le esigenze di monitoraggio e per un database nazionale
- Il laboratorio deve avere una procedura standard operativa per l'attività su DNA per HbS e talassemie, che descriva il processo dalla ricezione del campione al referto finale

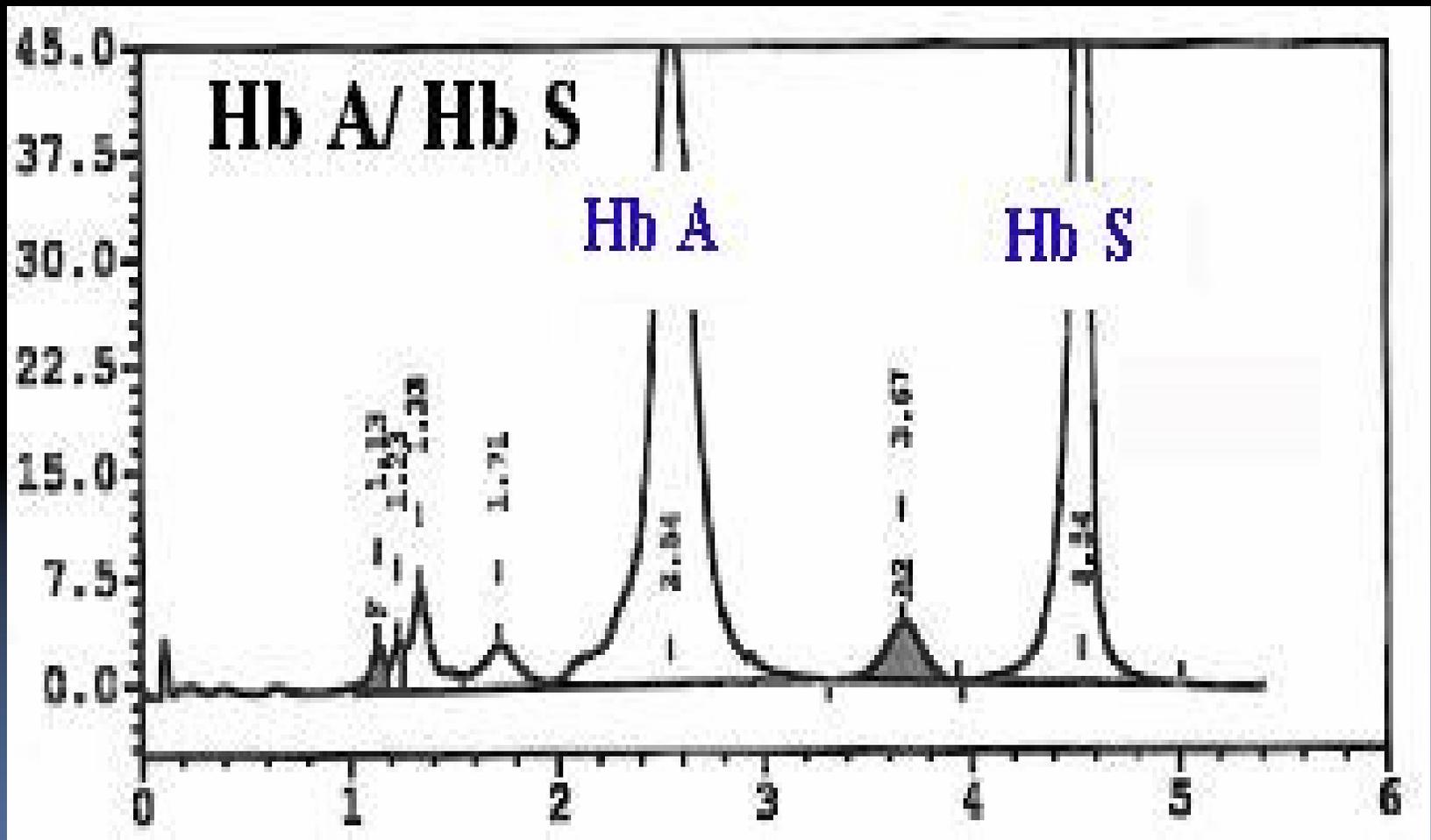
Screening per HbS e talassemie

Ulteriori standards per il Laboratorio di Biologia molecolare 2°

- Il laboratorio deve partecipare ad un programma VEQ appropriato per il DNA riferito ad HbS e talassemie e deve dimostrare soddisfacente performance
- Deve essere possibile fornire un referto (anche provvisorio) entro tre giorni dalla ricezione del campione urgente ed entro tre settimane per il campione non urgente

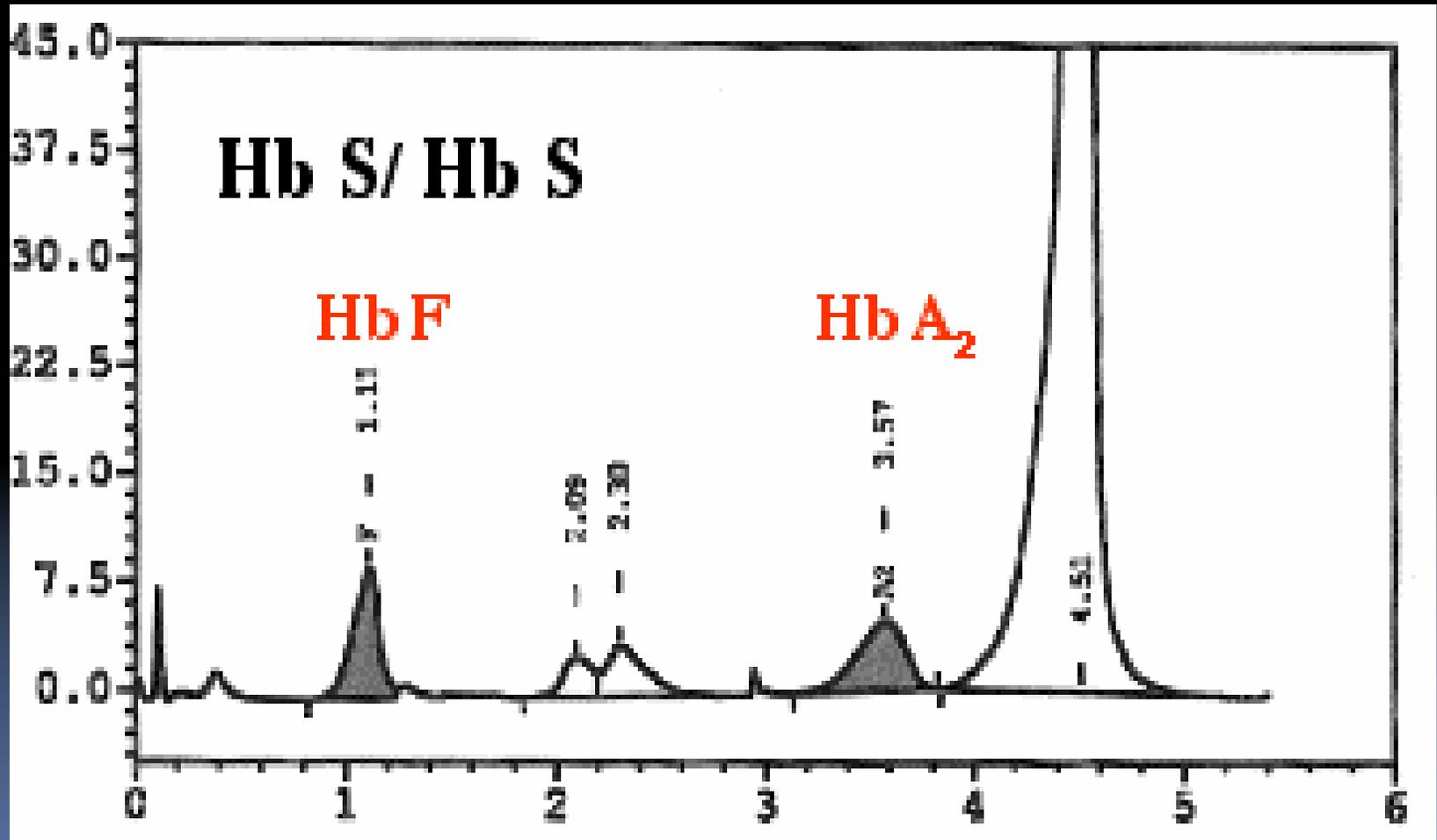
Diagnosi di laboratorio di HbS

HPLC a scambio cationico - HbAS



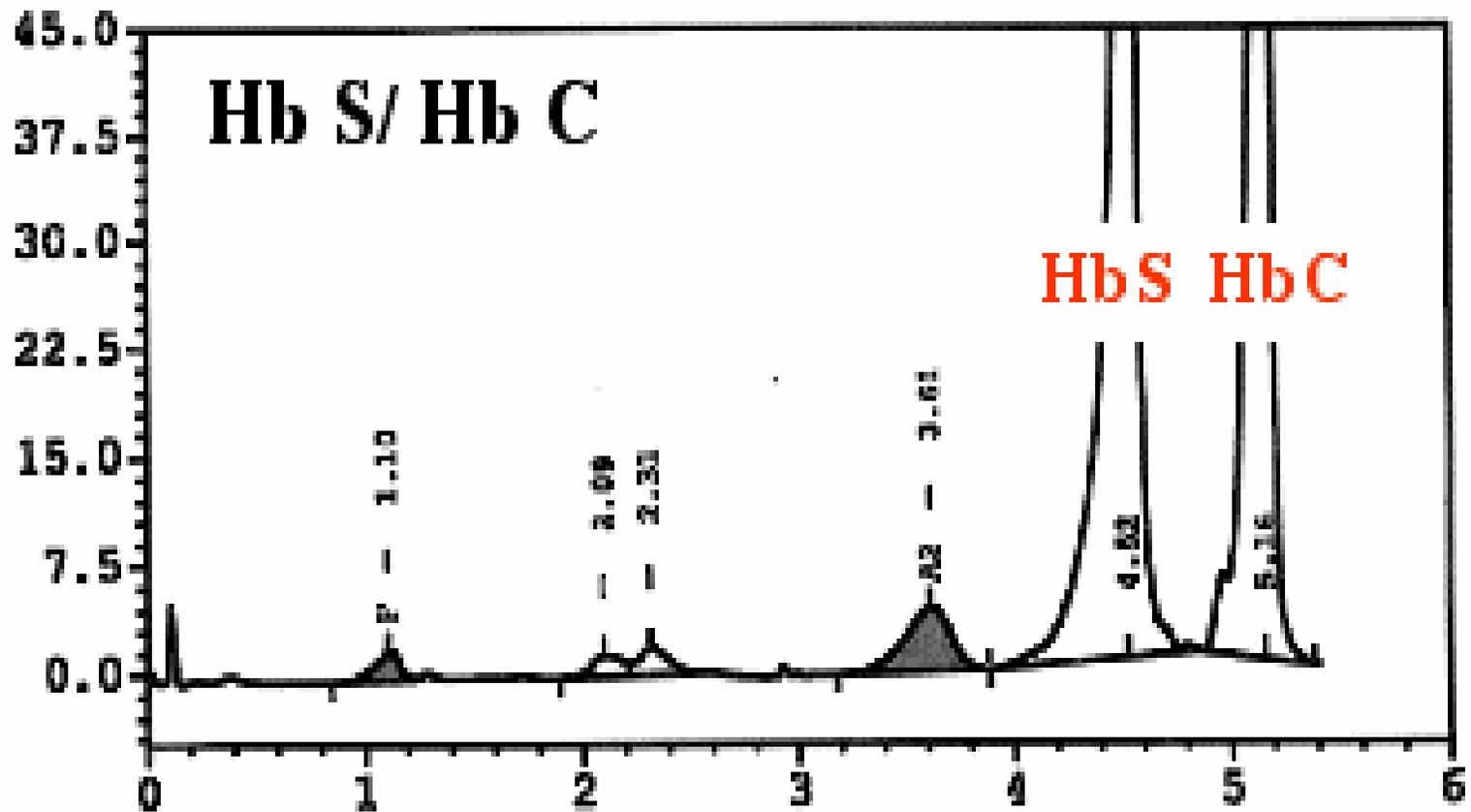
Diagnosi di laboratorio di HbS

HbSS



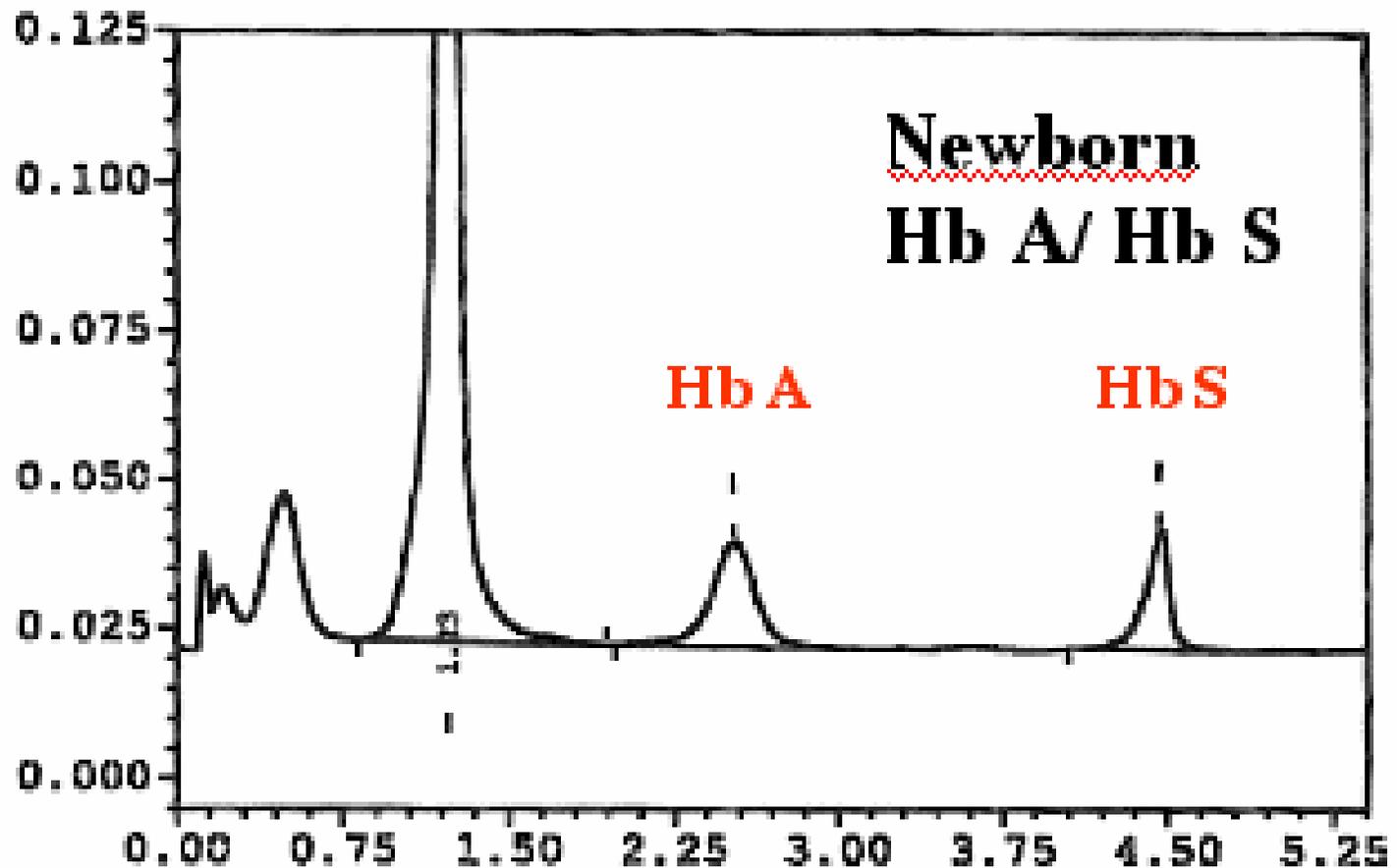
Diagnosi di laboratorio di HbS

HbSC



Diagnosi di laboratorio di HbS

HbAS in neonato



Diagnosi di laboratorio di HbS

- Identificazione della mutazione a livello di portatore (HbA/HbS) in genere silente con:
 - Studio elettroforetico
 - Acetato di cellulosa a pH alcalino *oppure*
 - Isoelettrofocalizzazione *oppure*
 - HPLC
 - Conferma con test funzionale
 - Sickling test *e/oppure*
 - Test di solubilità per HbS
 - Test di biologia molecolare

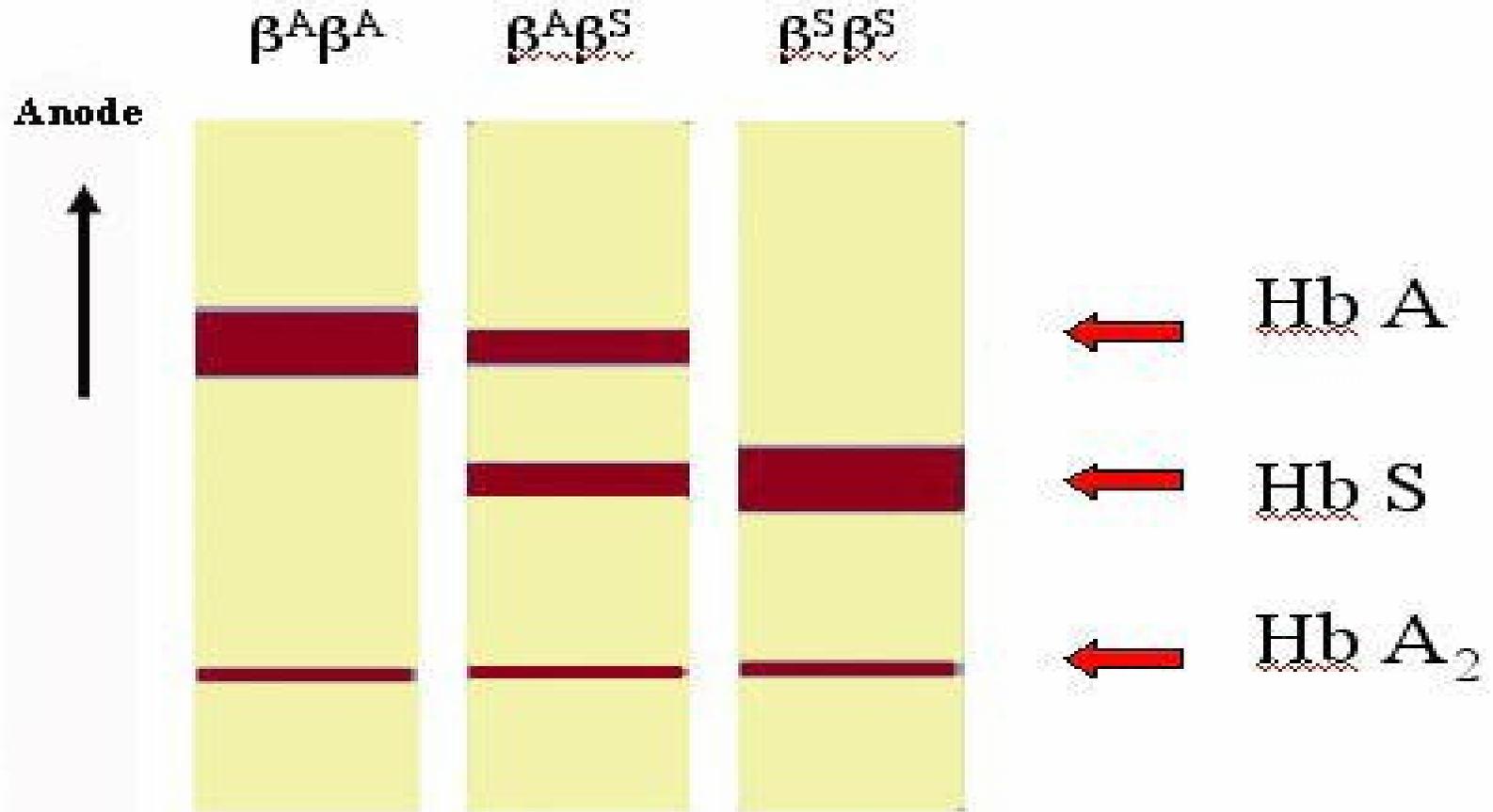
Diagnosi di laboratorio di HbS

elettroforesi a pH alcalino

- A pH 8,5 su acetato di cellulosa HbS migra più lentamente di HbA
- Tuttavia nella stessa posizione migrano altre Hb, come HbD-Punjab che può coesistere con HbS

Diagnosi di laboratorio di HbS

elettroforesi a pH alcalino



Migration of Hb S on cellulose acetate electrophoresis at pH 8.5

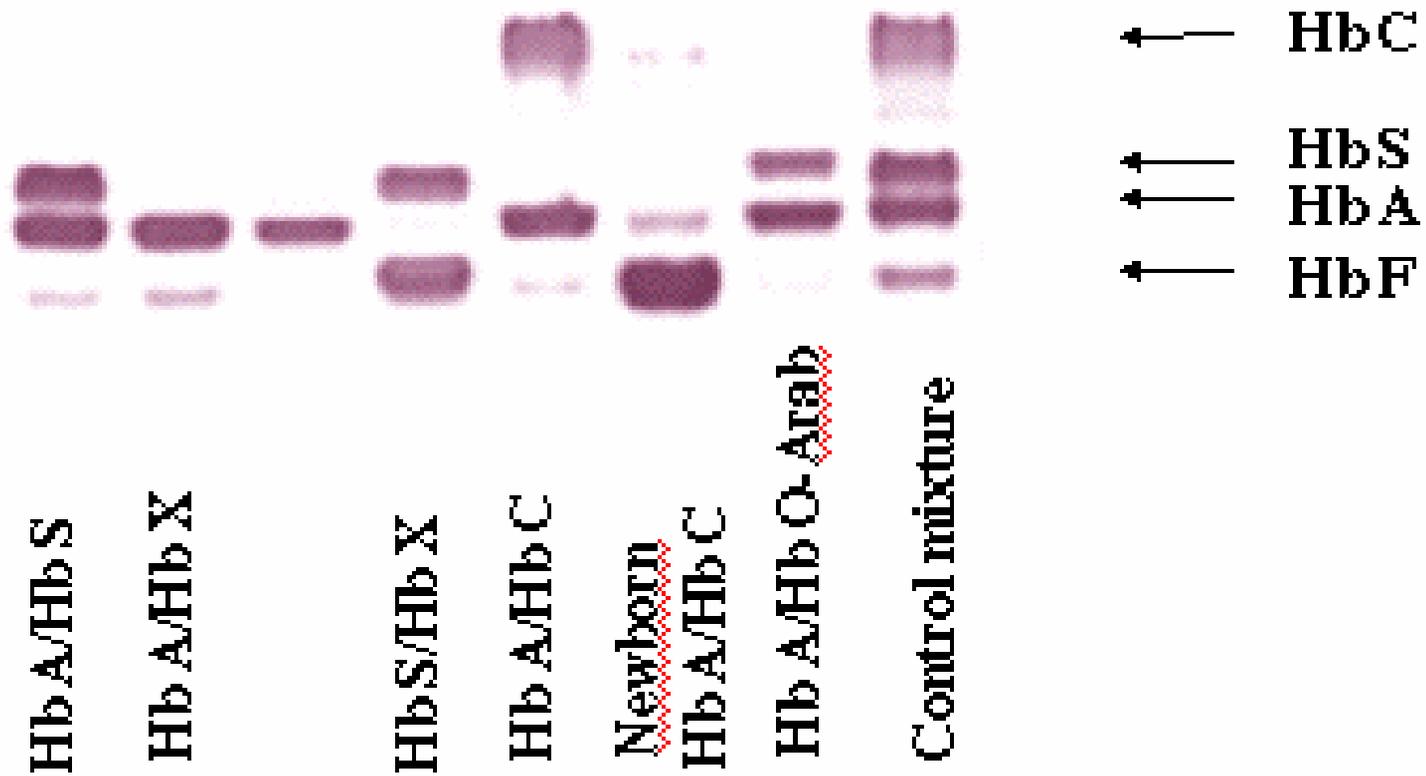
Diagnosi di laboratorio di HbS

elettroforesi in agarosio citrato a pH acido

- Sensibile alle modificazioni strutturali della regione a carica positiva di Hb che interagisce con agaropectina
- La posizione $\beta 6$ ove sono le mutazioni HbS e HbC fornisce quadri specifici di migrazione
- HbS migra fra HbA e HbC

Diagnosi di laboratorio di HbS

elettroforesi in agarosio citrato a pH acido



Conclusioni

- Le Hbpatie rappresentano un problema non trascurabile di salute pubblica, in progressiva accentuazione
- L'incremento e la varietà riflettono l'elevata incidenza delle Hbpatie nelle minoranze etniche
- La prevenzione delle forme più gravi richiede accurata pianificazione e collaborazione fra medicina del territorio ed ospedali (reparti materno-infantili)
- I laboratori, tramite screening ed approfondimenti, giocano un ruolo essenziale nella prevenzione e nella diagnosi