

**"EMOGLOBINE: DIAGNOSTICA,
STANDARDIZZAZIONE,
PROSPETTIVE"**

**Approcci diagnostici e problematiche in relazione
ad uno screening neonatale**

Giovanni Ivaldi
Laboratorio di Genetica - Settore Microcitemia
Ospedali Galliera - Genova



DESENZANO DEL GARDA (BS)

9 maggio 2009

**Principi dello screening raccomandati dalla World Health
Organization**

1. Le linee guida della World Health Organization guidelines riguardo allo screening sono state pubblicate nel 1968, ma sono applicabili ancora oggi.
2. La condizione patologica deve essere un problema importante di salute.
3. Deve esistere una terapia per la condizione rilevata.
4. Devono esistere strutture per la diagnosi e trattamento.
5. Deve esistere uno stadio latente della malattia.
6. Deve esistere un test o esame per accertare la patologia.
7. Il test deve essere bene accetto dalla popolazione.
8. La storia naturale della malattia dovrebbe essere adeguatamente compresa.
9. Deve esistere un accordo sui protocolli terapeutici di terapia e su chi sottoporre a trattamento.
10. Il costo totale della scoperta di un caso dovrebbe essere bilanciato economicamente in relazione alla spesa medica nel suo complesso.
11. Il processo di rilevamento dei casi dovrebbe essere continuo.

Gli screening alla nascita per le emoglobinopatie

- in Italia i difetti dell'Hb non sono mai stati oggetto di screening ufficiali
- quando qualche dato proveniente da screening è stato pubblicato aveva come oggetto prevalentemente l'alfa talassemia
- mai si è presa in considerazione l'Hb S (come negli U.S.A) o la Beta Talassemia

La ricerca di difetti dell'emoglobina su sangue cordonale viene comunque oggi eseguita per:

- **confermare alla nascita il risultato dell'esame eseguito in epoca prenatale**
- **accertare la presenza di emoglobinopatie in neonati, non esaminati in epoca prenatale, e nati da genitori entrambi portatori di tali difetti**
- **accertare precocemente la presenza di particolari difetti dell'Hb, anche allo stato eterozigote, per poter mettere in atto azioni utili a prevenire eventuali conseguenze negative (Hb S, Hb instabili)**
- **stabilire l'incidenza di un qualche difetto dell'Hb, nell'ambito di screening di popolazione mirati e/o in contesti genetici particolari**
- **accertare la presenza di determinate emoglobinopatie su campioni di sangue cordonale destinato alla conservazione nelle banche di cellule staminali**

**INTERNATIONAL STANDARDS FOR
CORD BLOOD COLLECTION,
PROCESSING, TESTING, BANKING,
SELECTION, AND RELEASE**



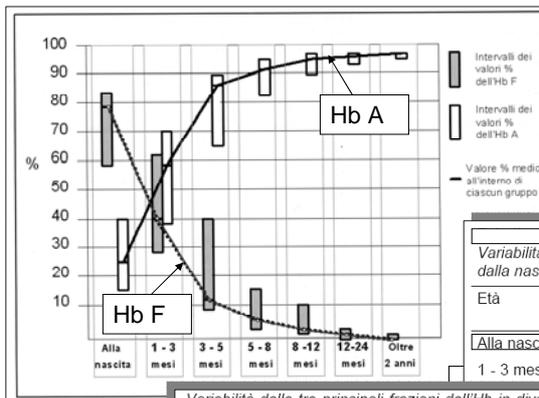
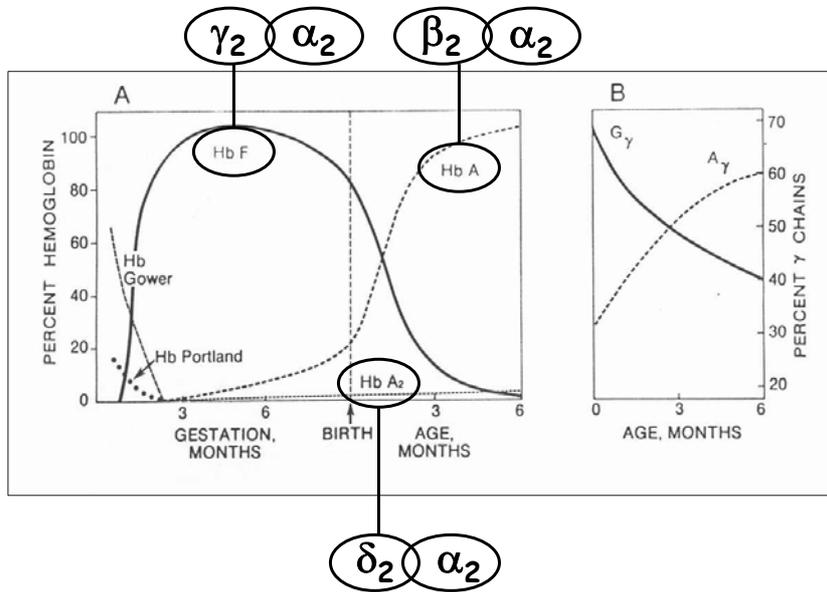
Third Edition
December 2006

**E4 CORD BLOOD SELECTION FOR UNRELATED ALLOGENEIC, DIRECTED
ALLOGENEIC, AND AUTOLOGOUS CORD BLOOD TRANSPLANTATION**

- E4.1 Prior to release of a CB unit, the CBB shall provide the following processing data, assay results, and infant donor and maternal medical history to the Clinical Transplant Program and, if applicable, to the Registry.
- E4.1.1 HLA Class I and II typing results.
 - E4.1.2 Total nucleated cell count and nucleated red blood cell count from the final CB unit at end of processing prior to cryopreservation.
 - E4.1.3 Viability from the final CB product at the end of processing prior to cryopreservation.
 - E4.1.4 Total number of CD34-positive cells at the end of processing prior to cryopreservation.
 - E4.1.5 For unrelated allogeneic CB units, CFU total number from the final CB unit performed prior to release for transplant.
 - E4.1.6 Communicable disease testing results performed on the maternal sample and, when licensed assays are available, on the CB unit.
 - E4.1.7 Risks of communicable and/or genetic diseases disclosed by the maternal medical and genetic screening or clinical chart review and the results of any investigation or further testing performed.
 - E4.1.8 The method of CB unit processing.

**Alla nascita quale assetto
emoglobinico è possibile
osservare?**

Le Emoglobine fisiologiche



da: Variabilità delle frazioni emoglobiniche dalla nascita all'età adulta in condizioni fisiologiche e patologiche
 G. Ivaldi et. al. *Biochimica Clinica*, 31, 4, 2007

Variabilità delle tre principali frazioni dell'Hb in diversi periodi dalla nascita all'età adulta

Età	n	Hb A %	Hb A ₂ %	Hb F %
Alla nascita	1250	15 - 40	0 - 1	58 - 84
1 - 3 mesi	29	38 - 70	0,5 - 1,5	29 - 61
3 - 4 mesi		65 - 90	1,3 - 2,1	9 - 40
4 - 6 mesi		83 - 95	1,6 - 2,6	3 - 15
8 - 12 mesi		89 - 96	1,8 - 2,9	1 - 10
12 - 24 mesi		94 - 97	1,9 - 3,0	0,5 - 3,0
95 - 98		95 - 98	2,0 - 3,3	0,1 - 1,2

Variabilità delle tre principali frazioni dell'Hb in diversi periodi dalla nascita all'età adulta in soggetti portatori eterozigoti di β-talassemia

Età	n	Hb A %	Hb A ₂ %	Hb F %
Alla nascita	45	5 - 20	0 - 1,0	79 - 95
3 - 4 mesi	38	25 - 64	0,8 - 3,0	30 - 74
4 - 6 mesi	28	76 - 88	1,9 - 4,0	10 - 22
8 - 12 mesi	33	83 - 92	2,1 - 5,0	1 - 15
12 - 24 mesi	116	88 - 93	2,8 - 5,4	0,5 - 7
Oltre i 2 anni	550	92 - 95	2,9 - 6,1	0,1 - 4

Cause principali di variabilità delle percentuali relative delle diverse componenti Hb alla nascita
[Hb F (Hb F*, Hb F₁) e Hb A]

- Età gestazionale
- Gemellarità
- Presenza di Emoglobinopatie allo stato eterozigote / omozigote
- Molte situazioni che possono condizionare l'accrescimento fetale o produrre anemie nel feto
- ...



Evoluzione delle tecniche di identificazione dei difetti dell'Hb

1. Elettroforesi a pH alcalino e/o acido:

- su carta
- su gel d'amido
- su gel d'agar
- su acetato di cellulosa
- Isoelettrofocalizzazione (I.E.F.)
- **capillare**

2. Cromatografia:

- amberlite
- scambio ionico in colonne aperte (o.c.) monouso
- **HPLC (in genere a scambio cationico)**

HEMOGLOBIN, 9(5), 541 (1985)

INTRODUCTION

Because of an almost nationwide interest in newborn testing programs for hemoglobinopathies and thalassemias it was decided that a standard methodology should be devised and a systematic reporting procedure established. As a result, the Center Directors' Subcommittee on Laboratory Procedures met in Cincinnati and developed the following guidelines and recommendations for use in Neonatal Testing Programs. We hope this information will be useful for anyone developing such a program.

Center Directors Working Group
on Laboratory Methodologies

T.H.J. Huisman,
Chairman
B.F. Cameron
O. Castro
W.C. Mentzer

* * *

- Alla fine degli anni '70 iniziano gli screening neonatali
- nel 1985 inizia l'uso della *Polimerase Chain Reaction (PCR)*

**RECOMMENDATIONS FOR UNIFORM PROCEDURES
FOR NEONATAL SCREENING**

1. Development of programs for neonatal hemoglobinopathy testing on a local or state basis is strongly recommended.
2. Testing should be offered for all newborns, with older children or infants being tested as a medical procedure or by parental request.
 - a. For newborn testing a general consent for medical service suffices and a specific informed consent is not required.
3. Minimum methodology for a laboratory doing neonatal testing comprises both cellulose acetate and citrate agar electrophoresis with isoelectric focusing (IEF) or high performance liquid chromatography (HPLC) as preferred alternatives.
4. Laboratory results should not be reported as a diagnosis, but as a reading of laboratory data (i.e. AA, AC, thalassemia, FSS, FAS, etc).
 - a. A uniform recording format for results, using a computer-based system for storage, should be developed. This should include relevant demographic information.
 - b. The race of the tested individual should be obtained from the parent, usually mother.
5. Hb Bart's should be determined in the neonate. Either scanning the acetate sheet or microchromatography is acceptable methodology.
 - a. In the presence of Hb Bart's, an MCV should be determined on the infant.
6. Abnormal hemoglobins should be quantitated by HPLC or IEF in a newborn to establish possible presence

543

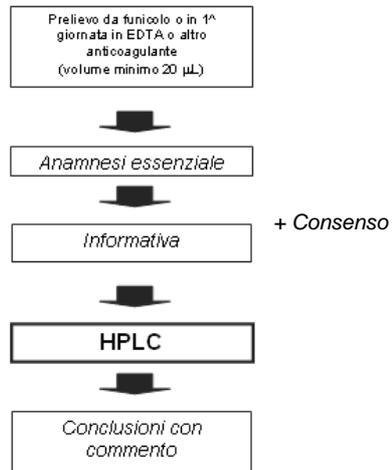
L'accuratezza delle determinazioni è abbastanza relativa in quanto esistono a questo livello molte altre cause di variabilità.

Mentre le determinazioni nell'adulto(ad es. dell'Hb A₂) dovranno essere molto più accurate

- of thalassemia. If this cannot be done, followup testing of the infant at an appropriate age must be ensured.
7. Quantitation of hemoglobins in the older child or adult by scanning cellulose acetate strips is unsatisfactory. Major hemoglobins may be quantitated by chromatography or HPLC. Hb A₂ by microchromatography or elution from acetate sheets, and Hb F by alkali denaturation.
 8. Prenatal diagnosis should be offered at all Sickle Cell Centers, with a regional referral pattern for the restriction endonuclease mapping.
 9. Special resources should be developed on a regional and shared basis, i.e. gene mapping, sequence analysis of abnormal hemoglobins, immunologic methods for identification, etc.

A questo punto la tecnica HPLC non si era ancora affermata con i sistemi "dedicati" ma era già molto apprezzata per l'analisi quantitativa delle frazioni Hb

1° Livello



Le percentuali relative delle diverse frazioni emoglobiniche sono suscettibili di variazioni anche significative:

- nei gemelli
- quando è presente un difetto talassemico coereditato con una variante e comunque nei casi di omozigosi
- nei soggetti nati prematuri

A quali conclusioni il 1° Livello diagnostico può giungere?

Screening neonatale mediante HPLC su sangue del cordone ombelicale o su sangue prelevato in 1^a giornata

	Diagnosi Certa	Diagnosi Presuntiva	Nessuna Diagnosi possibile	Necessaria l'analisi molecolare
Beta Talassemia Eterozigote		X		

- (a) Hb A < 2%, (b) Hb Bart's > 2%, (c) Hb Bart's > 10%, (d) sickling test positivo
 (e) sickling test positivo e Hb A = 0 (f) sickling test positivo e Hb A = < 3% (g) Hb A < 3%

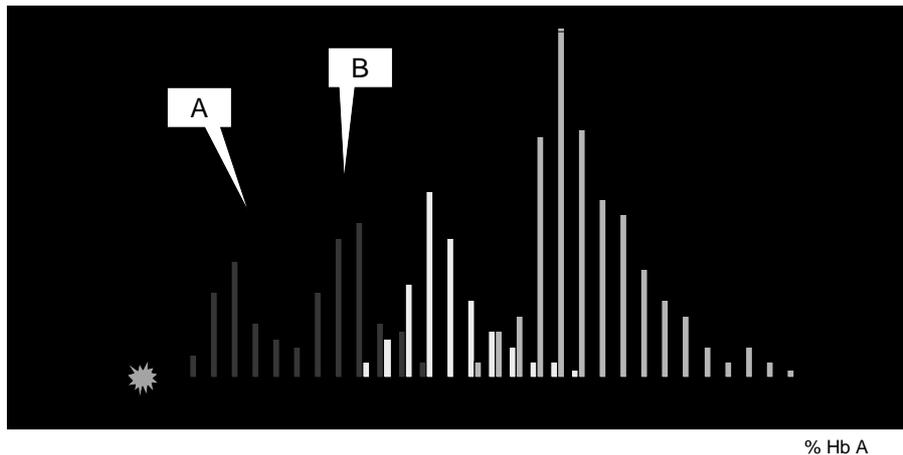
Dosaggio frazioni Hb mediante HPLC "dedicato"

Adulto con Beta Tal. e HPFH				Neonato con Beta Tal. Et.				Neonato normale			
NAME	%	TIME	AREA	NAME	%	TIME	AREA	NAME	%	TIME	AREA
F	4.9	0.96	131.69	F	0.0	0.00	0.00	F	0.0	0.00	0.00
A0	74.1	2.33	1901.30	A0	9.9	2.39	630.83	A0	18.7	2.37	1049.53
A2	4.0	3.01	83.43	A2	0.0	2.98	7.00	A2	0.0	2.98	16.02
D+	0.0	0.00	0.00	D+	0.0	0.00	0.00	D+	0.0	0.00	0.00
S+	0.0	0.00	0.00	S+	0.0	0.00	0.00	S+	0.0	0.00	0.00
C+	0.0	0.00	0.00	C+	0.0	0.00	0.00	C+	0.0	0.00	0.00
TOTAL AREA 2566.81				TOTAL AREA 6414.93				TOTAL AREA 5621.96			
F : 4.9% A2 : 4.0%				F : 0.0% A2 : 0.0%				F : 0.0% A2 : 0.0%			
P00	0.6	0.34	16.27	P00	3.4	0.30	215.76	P00	18.4	0.86	1031.89
P01	1.1	0.52	29.04	P01	22.3	1.08	1433.57	P01	62.3	1.88	3503.62
P02	8.4	1.85	216.10	P02	63.7	1.92	4086.79	P02	5.1	3.80	3.42
P03	3.3	2.08	85.58	P03	0.1	3.80	4.87	P03	0.1	3.92	3.84
P04	0.3	3.81	7.74	P04	0.1	4.00	6.81	P04	0.1	4.23	6.00
P05	1.0	4.02	25.26	P05	0.2	4.23	10.26	P05	0.1	4.63	7.65
P06	1.2	4.29	29.90	P06	0.1	4.63	4.50				
P07	0.4	4.65	11.22	P07	0.1	4.81	7.00				
P08	0.6	4.76	16.53	P08	0.1	5.42	7.70				
P09	0.5	5.36	12.56	AREA HIGH							
								221 F	NOT DETECT	11:32	

Rappresentazione delle % di Hb A di 465 neonati esaminati alla nascita mediante HPLC e confermati dall'analisi molecolare

Subjects

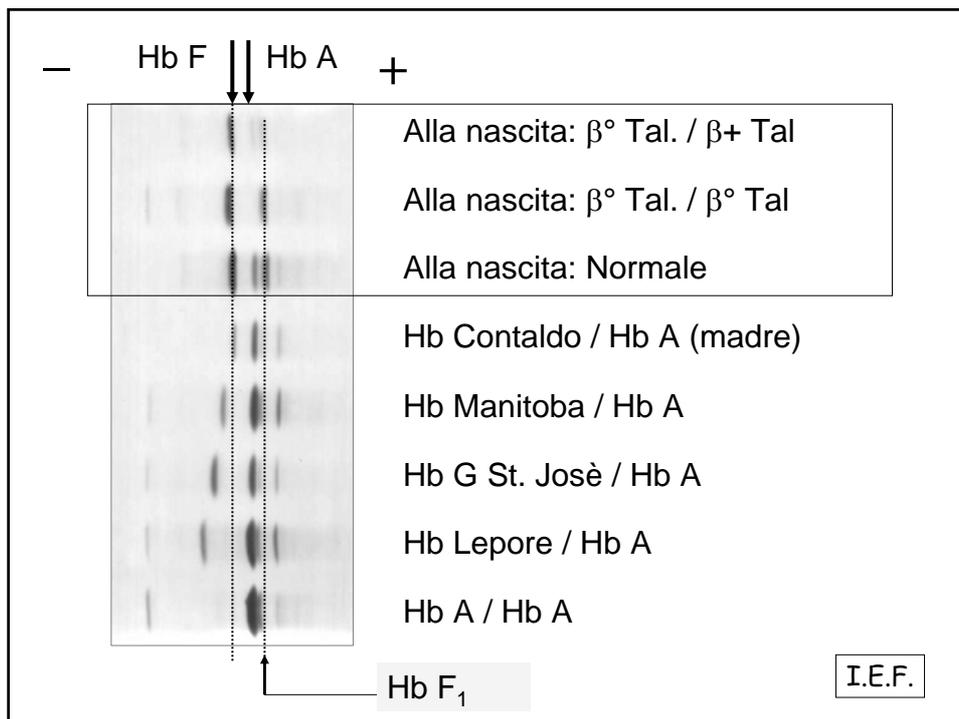
■ Beta Thal. □ Alpha Thal. □ Normal



Screening neonatale mediante HPLC su sangue del cordone ombelicale o su sangue prelevato in 1^a giornata

	<i>Diagnosi Certa</i>	<i>Diagnosi Presuntiva</i>	<i>Nessuna Diagnosi possibile</i>	<i>Necessaria l'analisi molecolare</i>
Beta Talassemia Eterozigote		X		
Beta Talassemia Omozigote	X(a)			

(a) Hb A < 2%, (b) Hb Bart's > 2%, (c) Hb Bart's > 10%, (d) sickling test positivo
 (e) sickling test positivo e Hb A = 0 (f) sickling test positivo e Hb A < 3% (g) Hb A < 3%



Screening neonatale mediante HPLC su sangue del cordone ombelicale o su sangue prelevato in 1^a giornata

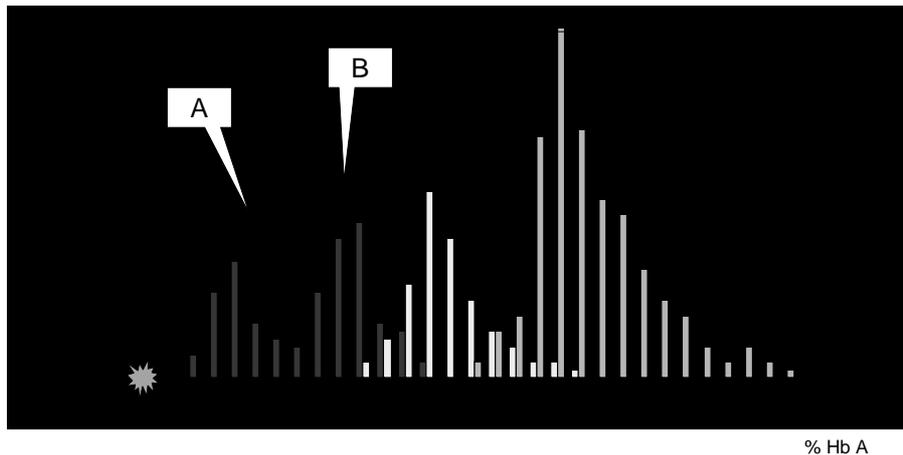
	<i>Diagnosi Certa</i>	<i>Diagnosi Presuntiva</i>	<i>Nessuna Diagnosi possibile</i>	<i>Necessaria l'analisi molecolare</i>
Beta Talassemia Eterozigote		X		
Beta Talassemia Omozigote	X(a)			
Alfa Talassemia 1 o 2		X (b)		X

(a) Hb A < 2%, (b) Hb Bart's > 2%, (c) Hb Bart's > 10%, (d) sickling test positivo
 (e) sickling test positivo e Hb A = 0 (f) sickling test positivo e Hb A = < 3% (g) Hb A < 3%

Rappresentazione delle % di Hb A di 465 neonati esaminati alla nascita mediante HPLC e confermati dall'analisi molecolare

Subjects

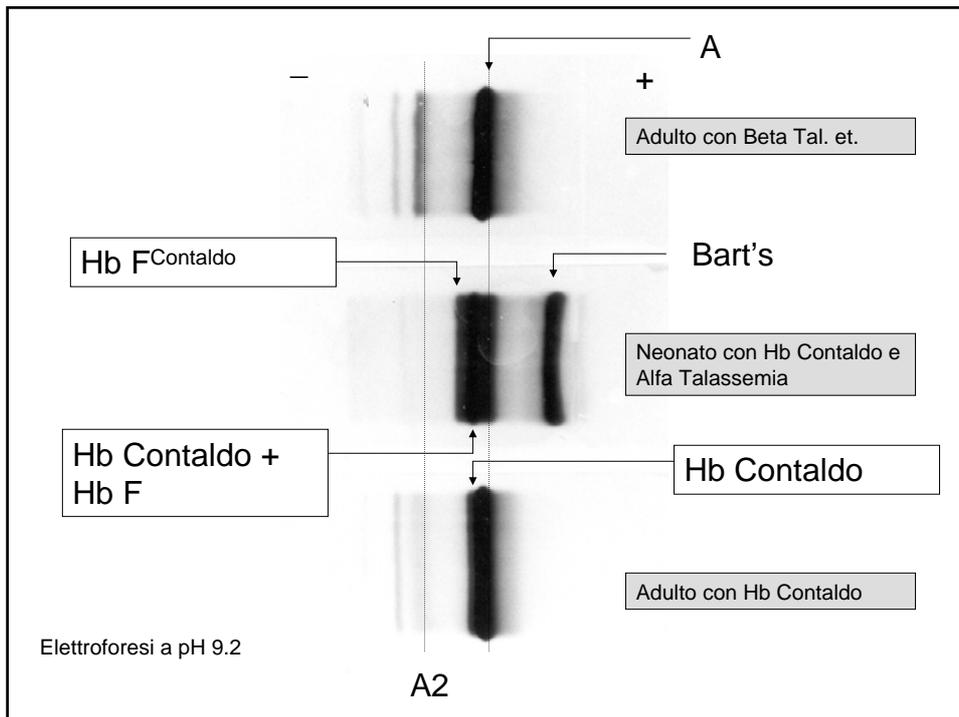
■ Beta Thal. □ Alpha Thal. □ Normal



Screening neonatale mediante HPLC su sangue del cordone ombelicale o su sangue prelevato in 1^a giornata

	<i>Diagnosi Certa</i>	<i>Diagnosi Presuntiva</i>	<i>Nessuna Diagnosi possibile</i>	<i>Necessaria l'analisi molecolare</i>
Beta Talassemia Eterozigote		X		
Beta Talassemia Omozigote	X(a)			
Alfa Talassemia 1 o 2		X (b)		X
Hb H Disease		X (c)		X

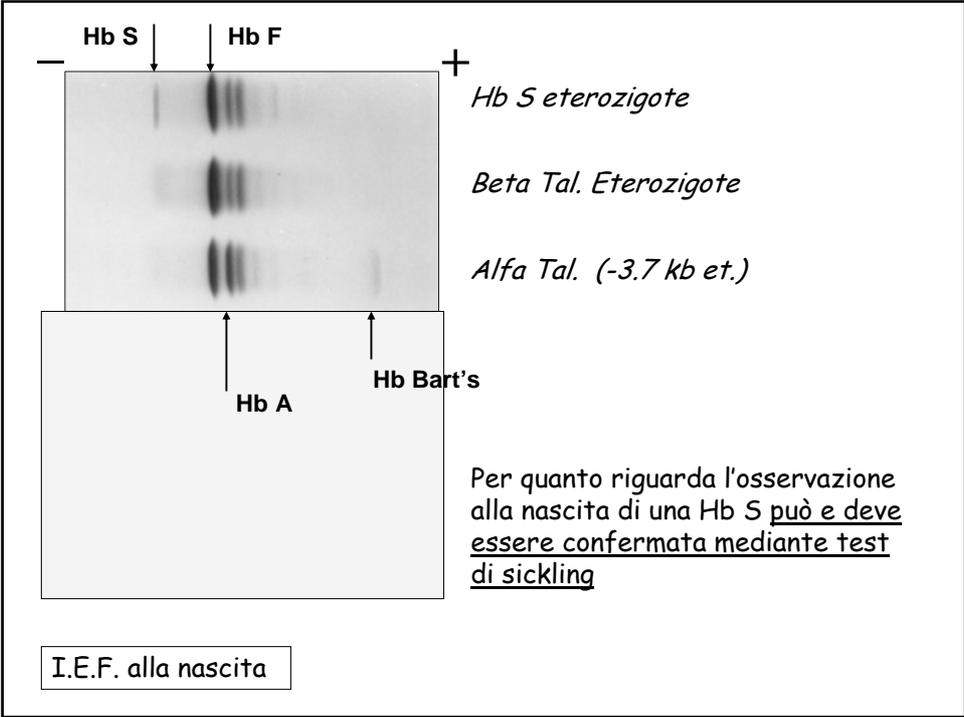
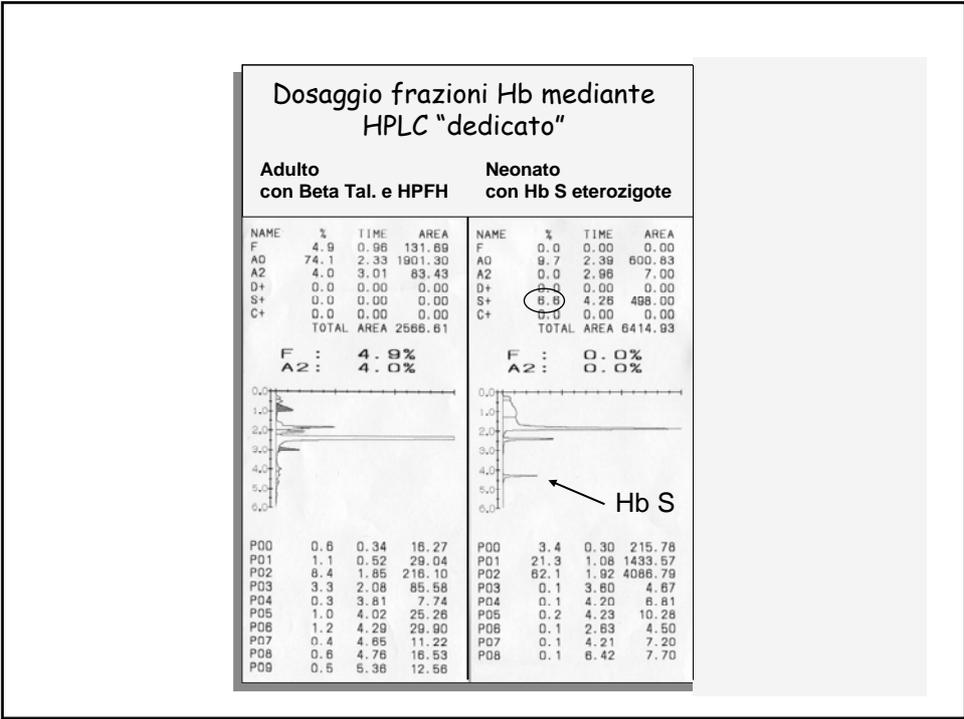
(a) Hb A < 2%, (b) Hb Bart's > 2%, (c) Hb Bart's > 10%, (d) sickling test positivo
 (e) sickling test positivo e Hb A = 0 (f) sickling test positivo e Hb A = < 3% (g) Hb A < 3%



Screening neonatale mediante HPLC su sangue del cordone ombelicale o su sangue prelevato in 1^a giornata

	<i>Diagnosi Certa</i>	<i>Diagnosi Presuntiva</i>	<i>Nessuna Diagnosi possibile</i>	<i>Necessaria l'analisi molecolare</i>
Beta Talassemia Eterozigote		X		
Beta Talassemia Omozigote	X (a)			
Alfa Talassemia 1 o 2		X (b)		X
Hb H Disease		X (c)		X
Hb S Eterozigote	X (d)			

(a) Hb A < 2%, (b) Hb Bart's > 2%, (c) Hb Bart's > 10%, (d) sickling test positivo
 (e) sickling test positivo e Hb A = 0 (f) sickling test positivo e Hb A = < 3% (g) Hb A < 3%



Screening neonatale mediante HPLC su sangue del cordone ombelicale o su sangue prelevato in 1^a giornata

	<i>Diagnosi Certa</i>	<i>Diagnosi Presuntiva</i>	<i>Nessuna Diagnosi possibile</i>	<i>Necessaria l'analisi molecolare</i>
Beta Talassemia Eterozigote		X		
Beta Talassemia Omozigote	X (a)			
Alfa Talassemia 1 o 2		X (b)		X
Hb H Disease		X (c)		X
Hb S Eterozigote	X (d)			
Hb S Omozigote		X (e)		X

(a)Hb A < 2%, (b)Hb Bart's > 2%, (c)Hb Bart's >10%, (d) sickling test positivo
 (e) sickling test positivo e Hb A = 0 (f) sickling test positivo e Hb A = <3% (g) Hb A < 3%

Screening neonatale mediante HPLC su sangue del cordone ombelicale o su sangue prelevato in 1^a giornata

	<i>Diagnosi Certa</i>	<i>Diagnosi Presuntiva</i>	<i>Nessuna Diagnosi possibile</i>	<i>Necessaria l'analisi molecolare</i>
Beta Talassemia Eterozigote		X		
Beta Talassemia Omozigote	X (a)			
Alfa Talassemia 1 o 2		X (b)		X
Hb H Disease		X (c)		X
Hb S Eterozigote	X (d)			
Hb S Omozigote		X (e)		X
Hb S Eterozigote e Beta Talassemia		X (f)		X

(a)Hb A < 2%, (b)Hb Bart's > 2%, (c)Hb Bart's >10%, (d) sickling test positivo
 (e) sickling test positivo e Hb A = 0 (f) sickling test positivo e Hb A = <3% (g) Hb A < 3%

Screening neonatale mediante HPLC su sangue del cordone ombelicale o su sangue prelevato in 1^a giornata

	<i>Diagnosi Certa</i>	<i>Diagnosi Presuntiva</i>	<i>Nessuna Diagnosi possibile</i>	<i>Necessaria l'analisi molecolare</i>
Beta Talassemia Eterozigote		X		
Beta Talassemia Omozigote	X(a)			
Alfa Talassemia 1 o 2		X (b)		X
Hb H Disease		X (c)		X
Hb S Eterozigote	X (d)			
Hb S Omozigote		X (e)		X
Hb S Eterozigote e Beta Talassemia		X (f)		X
Presenza di Varianti Hb (Alfa o Beta o Gamma)	X			

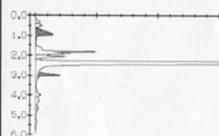
(a)Hb A < 2%, (b)Hb Bart's > 2%, (c)Hb Bart's >10%, (d) sickling test positivo
 (e) sickling test positivo e Hb A = 0 (f) sickling test positivo e Hb A = <3% (g) Hb A < 3%

Dosaggio frazioni Hb mediante HPLC "dedicato"

Adulto
con Beta Tal. e HPFH

NAME	%	TIME	AREA
F	4.9	0.96	131.69
A0	74.1	2.33	1901.30
A2	4.0	3.01	83.43
D+	0.0	0.00	0.00
S+	0.0	0.00	0.00
C+	0.0	0.00	0.00
TOTAL AREA 2586.61			

F : 4.9%
A2 : 4.0%

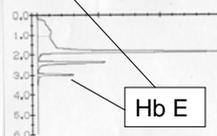


P00	0.6	0.34	16.27
P01	1.1	0.52	29.04
P02	6.4	1.85	216.10
P03	3.3	2.08	85.56
P04	0.3	3.81	7.74
P05	1.0	4.02	25.26
P06	1.2	4.29	29.90
P07	0.4	4.65	11.22
P08	0.6	4.76	16.53
P09	0.5	5.36	12.56

Neonato
con Hb E eterozigote

NAME	%	TIME	AREA
F	0.0	0.00	0.00
A0	13.7	2.36	1009.03
A2	5.7	3.02	416.02
D+	0.0	0.00	0.00
S+	0.0	0.00	0.00
C+	0.0	0.00	0.00
TOTAL AREA 5621.96			

A2 : 0.0%
A2 : 5.7%



P00	17.2	0.86	1031.89
P01	61.3	1.88	3503.62
P02	0.1	3.86	3.42
P03	0.1	2.92	3.84
P04	0.1	4.23	6.20
P05	0.1	2.63	7.65
221 F	NOT DETECT	11:32	

Screening neonatale mediante HPLC su sangue del cordone ombelicale o su sangue prelevato in 1^a giornata

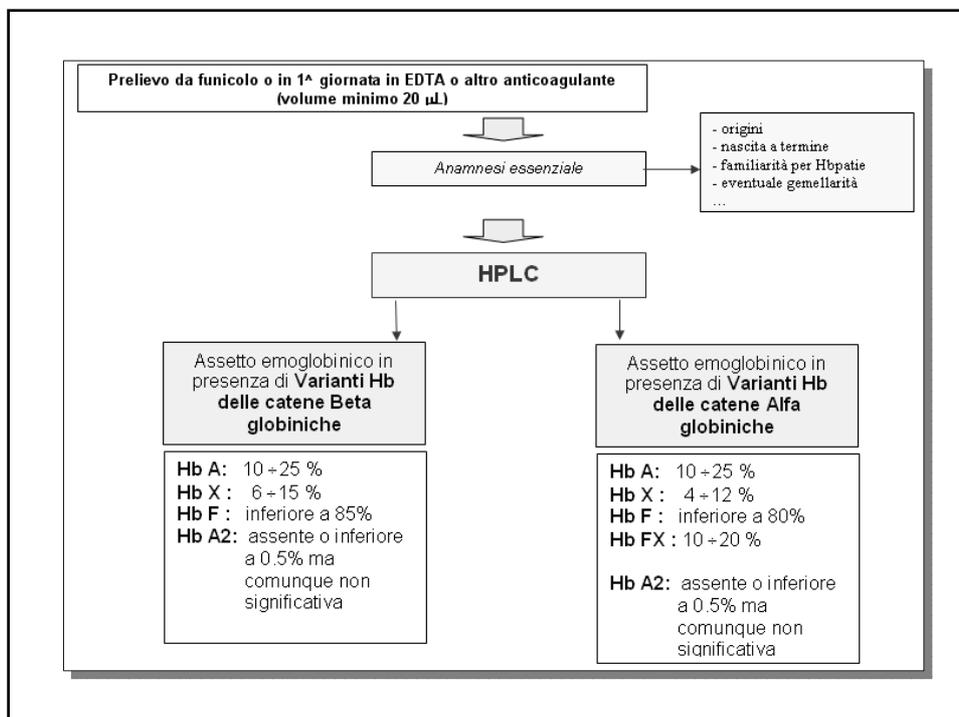
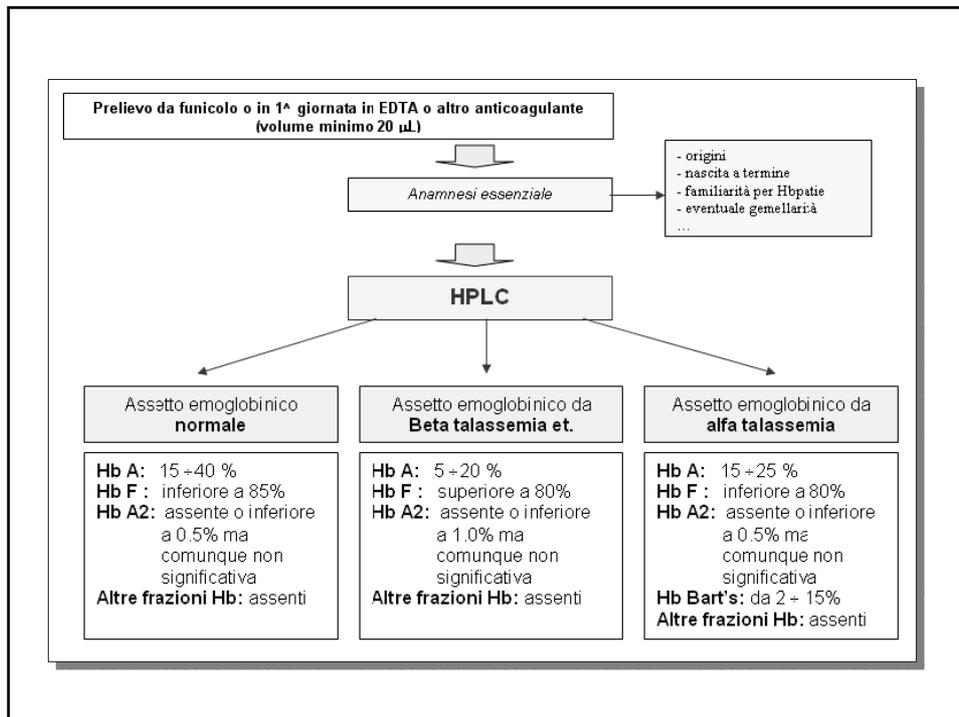
	<i>Diagnosi Certa</i>	<i>Diagnosi Presuntiva</i>	<i>Nessuna Diagnosi possibile</i>	<i>Necessaria l'analisi molecolare</i>
Beta Talassemia Eterozigote		X		
Beta Talassemia Omozigote	X(a)			
Alfa Talassemia 1 o 2		X (b)		X
Hb H Disease		X (c)		X
Hb S Eterozigote	X (d)			
Hb S Omozigote		X (e)		X
Hb S Eterozigote e Beta Talassemia		X (f)		X
Presenza di Varianti Hb (Alfa o Beta o Gamma)	X			X
Composti Eterozigoti per Varianti Beta e Beta Talassemia		X (g)		X

(a)Hb A < 2%, (b)Hb Bart's > 2%, (c)Hb Bart's >10%, (d) sickling test positivo
 (e) sickling test positivo e Hb A = 0 (f) sickling test positivo e Hb A = <3% (g) Hb A < 3%

Screening neonatale mediante HPLC su sangue del cordone ombelicale o su sangue prelevato in 1^a giornata

	<i>Diagnosi Certa</i>	<i>Diagnosi Presuntiva</i>	<i>Nessuna Diagnosi possibile</i>	<i>Necessaria l'analisi molecolare</i>
Beta Talassemia Eterozigote		X		
Beta Talassemia Omozigote	X(a)			
Alfa Talassemia 1 o 2		X (b)		X
Hb H Disease		X (c)		X
Hb S Eterozigote	X (d)			
Hb S Omozigote		X (e)		X
Hb S Eterozigote e Beta Talassemia		X (f)		X
Presenza di Varianti Hb (Alfa o Beta o Gamma)	X			X
Composti Eterozigoti per Varianti Beta e Beta Talassemia		X (g)		X
Presenza di Varianti Hb Delta			X	X
Hb Lepore Eterozigote		X		X
HPFH			X	X
Delta-Beta Talassemie		X		X

(a)Hb A < 2%, (b)Hb Bart's > 2%, (c)Hb Bart's >10%, (d) sickling test positivo
 (e) sickling test positivo e Hb A = 0 (f) sickling test positivo e Hb A = <3% (g) Hb A < 3%



CONCLUSIONI

La ricerca di Emoglobinopatie su sangue cordonale
mediante HPLC:

Consente una diagnosi certa di esclusione nel caso di omozigosi per:

- Beta Talassemia
- Varianti Hb più comuni
e nel caso di Composti tra Beta Tal. e Varianti Hb

Consente una diagnosi presuntiva nel caso di eterozigosi per:

- Alfa Talassemia (Bart's)
- Beta Talassemia
- Varianti Hb più comuni appartenenti alle catene alfa e beta

Consente una diagnosi certa nel caso di eterozigosi per:

- Hb S

CONCLUSIONI

Può essere giustificato oggi uno screening alla nascita
per i difetti dell'emoglobina?

- certamente la situazione prodotta dall'immigrazione in parte ha mutato il quadro della prevenzione

- oggi si inizia a considerare la possibilità di screening neonatali per le varianti delle catene beta clinicamente significative e quindi di "screening mirati"

- è opportuno che oltre al consenso venga sempre data una informativa adeguata per definire gli obiettivi e i limiti delle indagini eseguite

- rimane comunque sempre importante eseguire indagini alla nascita in quelle situazioni, sempre più frequenti, in cui non sono noti i fenotipi ematologici dei genitori