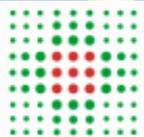


# Emoglobinopatie: screening e gestione clinica

*(e cenni di consulenza genetica...)*

**Comacchio, 1 Aprile 2016**



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE  
EMILIA-ROMAGNA  
Azienda Ospedaliero - Universitaria di Ferrara

**Dott.ssa Stefania Bigoni**  
Servizio di Genetica Medica,  
Azienda Ospedaliera Universitaria,  
Ferrara

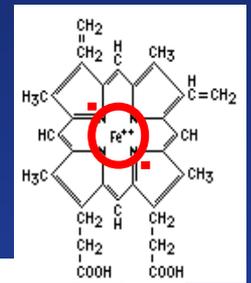


## Emoglobinopatie e talassemie

*“gruppo di disordini ereditari dovuti rispettivamente a difetti qualitativi (emoglobinopatie) o quantitativi (talassemie) della sintesi dell’emoglobina”.*

*Emery and Rimoin, 2007*

# PRINCIPALI CARATTERISTICHE DELL'EMOGLOBINA A

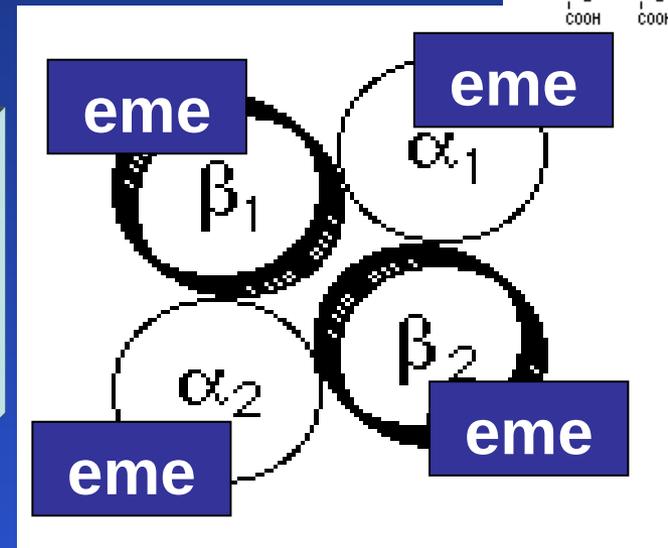


proteina tetramerica di p.m ~ 64.500 daltons

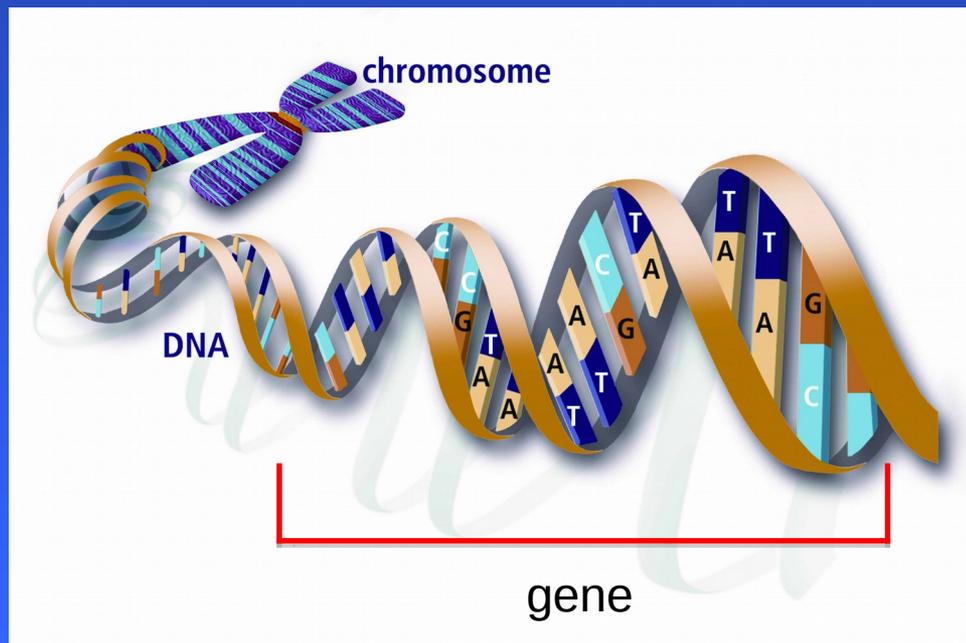
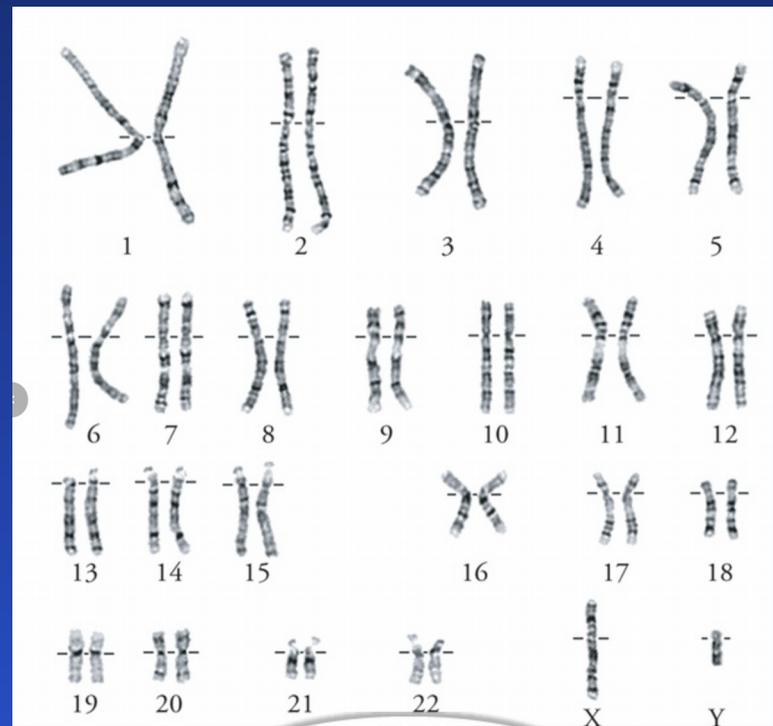
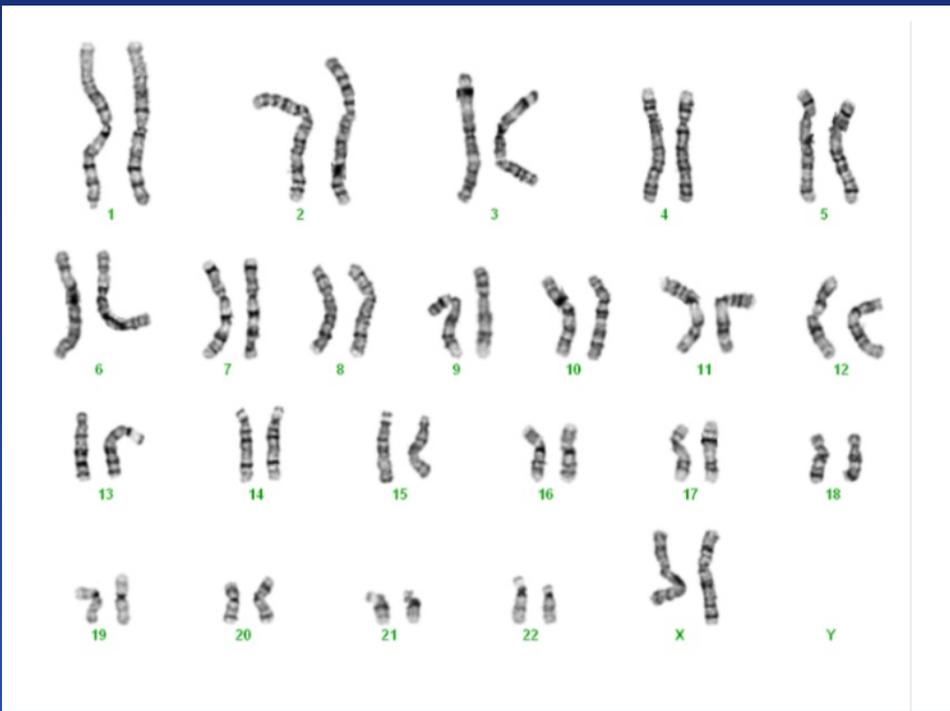
--->2 + 2 catene polipeptidiche

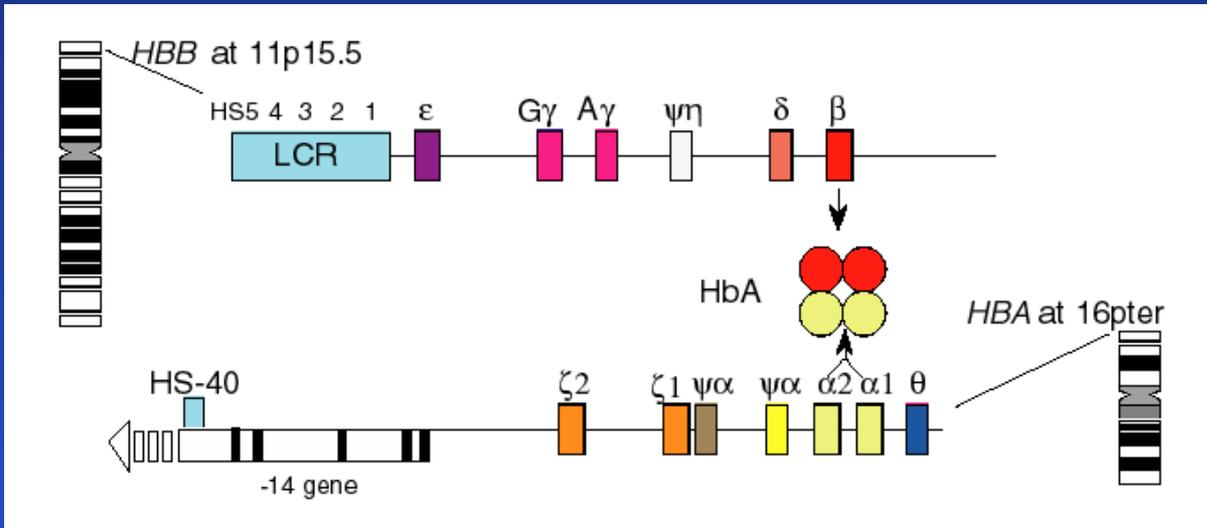
catene  $\alpha$  = 141 Aa

catene  $\beta$  = 146 Aa



Dove si trovano i geni per queste catene polipeptidiche?





I geni per le catene globiniche sono situati sui cromosomi 11 e 16

I geni per le catene  $\epsilon$   $\gamma$   $\delta$   $\beta$  sono linearmente situati sul cromosoma 11

I geni per le catene  $\alpha$  sono situati sul cromosoma 16

La composizione in emoglobina dei lisati eritrocitari può essere quantificata mediante differenti metodiche (elettroforesi in gel di poliacrilamide, IEF, HPLC).

Mediante tali metodiche è possibile identificare differenti emoglobine differenti tra loro per:

- ❖ struttura
- ❖ percentuali
- ❖ condizioni (epoca di sviluppo, patologie) in cui sono incrementate

**TABLE 71-1 Human Hemoglobins**

Hb	Stage of Development	Structure	Percentage in Adults	Conditions in which Increased
A	Adult	$\alpha_2\beta_2$	92	
A <sub>1c</sub>		$\alpha_2(\beta\text{-N-glucose})_2$	5	Diabetes mellitus
A <sub>2</sub>		$\alpha_2\delta_2$	2–3	<b><math>\beta</math>-Thalassemia</b>
H		$\beta_4$	0	Some $\alpha$ -thalassemias
F	Fetal	$\alpha_2\gamma_2$	<1	Newborn, $\delta\beta$ -, $\beta$ -thalassemia, HPFH and marrow stress
Bart's		$\gamma_4$	0	Some $\alpha$ -thalassemias
Gower I	Embryonic	$\zeta_2\varepsilon_2$	0	Early embryos (<8 weeks)
Gower II	Embryonic	$\alpha_2\varepsilon_2$	0	Early embryos (>8 weeks)
Portland	Embryonic	$\zeta_2\gamma_2$	0	(<8 weeks) and $\alpha^0$ -thalassemia (hydrops fetalis)

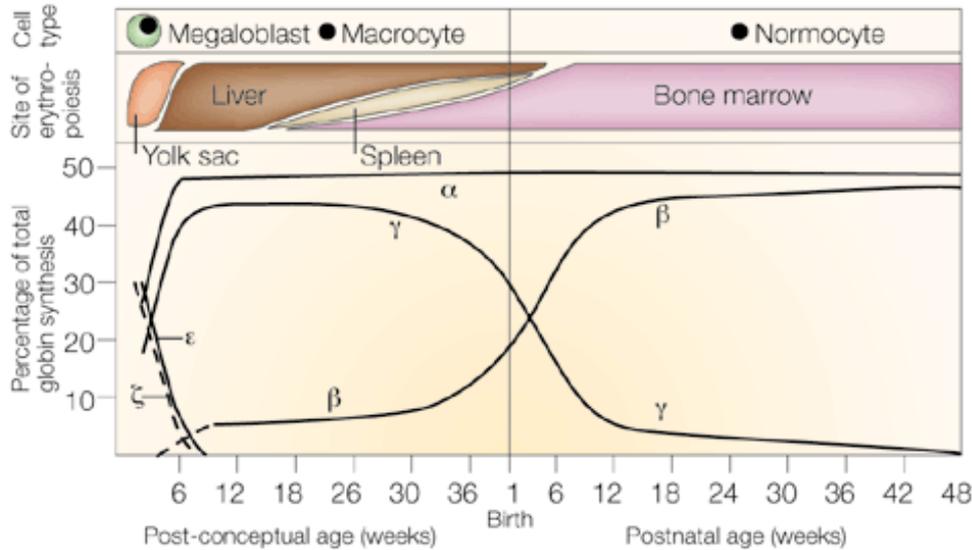
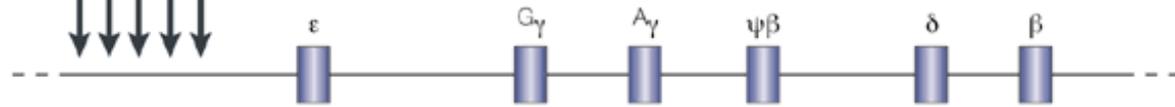
**Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ )** è il maggior componente dell' emoglobina e generalmente può arrivare al 97%

**HbA1c ( $\alpha_2(\beta\text{-N-glucosio})_2$ )** differisce dalla HbA dall' aggiunta di un glucosio a livello dell' NH2 terminale della catena beta. La percentuale di HbA1c è correlata alla concentrazione intracellulare di glucosio ed alla vita media dei globuli rossi. Valori normali fino a 5 %. Nei pazienti diabetici valore all' incirca raddoppiato.

Chromosome 11

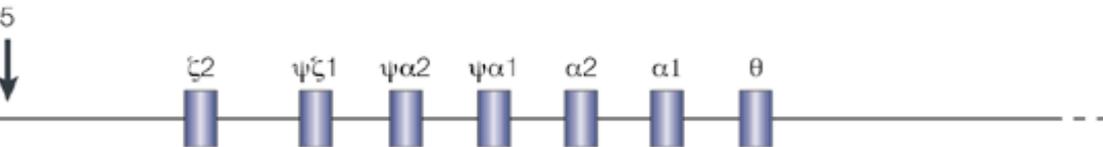
$\beta$ -LCR

5 4 3 2 1



Chromosome 16

HS-40



## HbF ( $\alpha_2 \gamma_2$ ):

- nel neonato 50-85%  
- dopo la nascita  
diminuisce  
rapidamente  
raggiungendo  
concentrazioni di circa  
il 10-15% a 4 mesi di  
vita e poi più  
lentamente verso i 3-4  
anni di età arriva ai  
livelli dell' adulto  
~1%.

Aumento: gravidanza,  
 $\beta$  talassemia,  $\delta\beta$   
talassemia, HPFH,  
drepanocitosi,  
tirotossicosi, anemia  
aplastica e  
megaloblastica,  
leucemia

## HbA2 ( $\alpha_2 \delta_2$ ) circa il 2-3%:

- aumenta in caso di beta talassemia, di anemia megaloblastica, di malattie autoimmuni, di problemi tiroidei, farmaci  
- diminuisce in caso di varianti emoglobiniche (varianti delta globiniche), iposideremia e di anemia sideroblastica

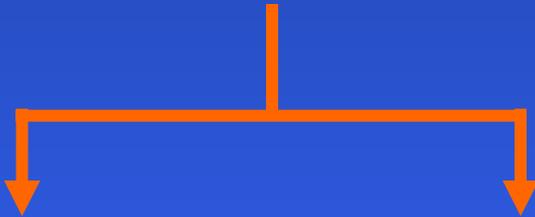
# ALTERAZIONI GENETICHE DELL'EMOGLOBINA



**DISORDINI  
QUANTITATIVI**  
(talassemia)

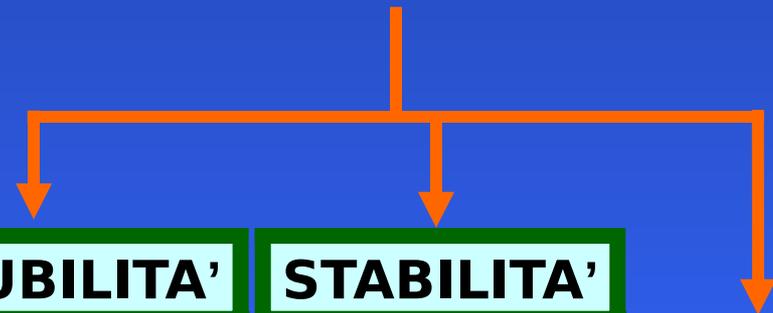


**DISORDINI  
QUALITATIVI**  
(emoglobinopatie)



**$\alpha$ -CATENE**

**$\beta$ -CATENE**

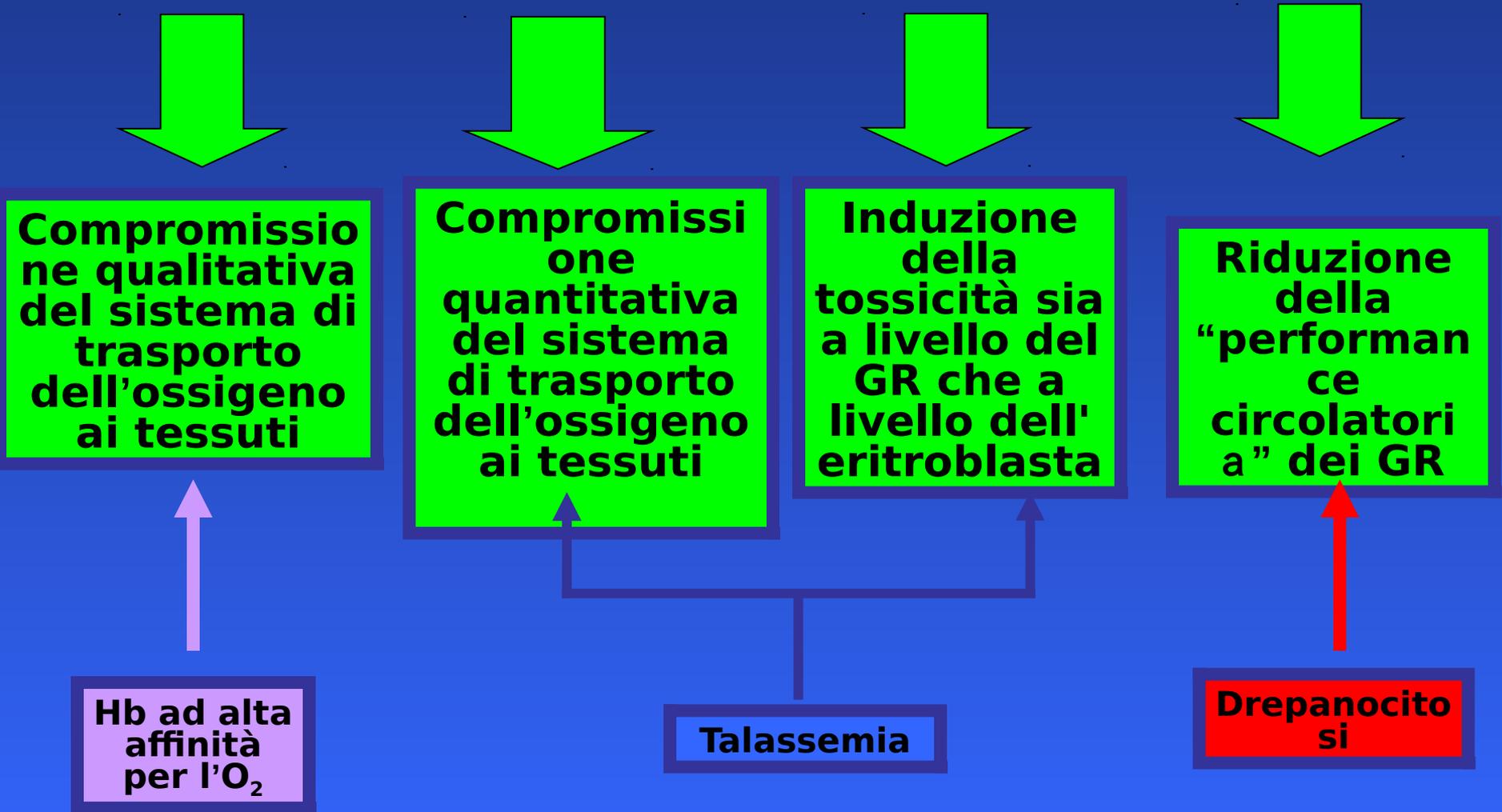


**SOLUBILITA'**

**STABILITA'**

**AFFINITA' PER L'O<sub>2</sub>**

Difetti dell' emoglobina possono causare  
differenti problematiche



# Talassemie

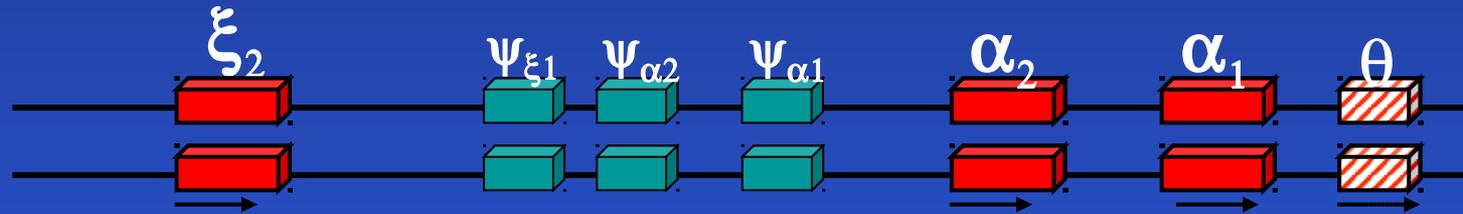
Sono condizioni ad eziologia genetica caratterizzate da una minore od assente produzione di catene globiniche. Vengono classificate principalmente in:

- alfa - talassemie
- beta - talassemie
- delta - talassemie

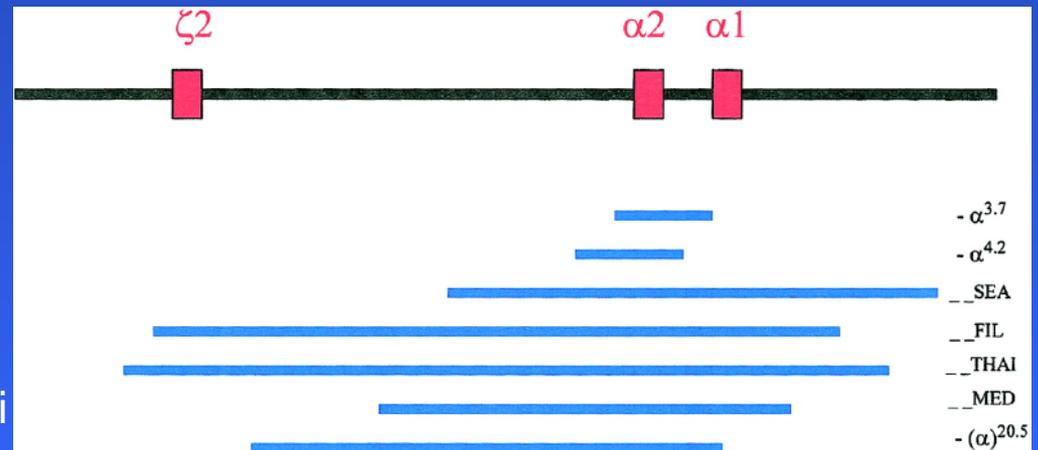
# $\alpha$ -Thalassemia

☞ causata principalmente da delezioni dei geni alfa: su ogni cromosoma sono presenti 2 copie del gene alfa : la delezione puo' riguardare una o due copie, in *cis* o in *trans*

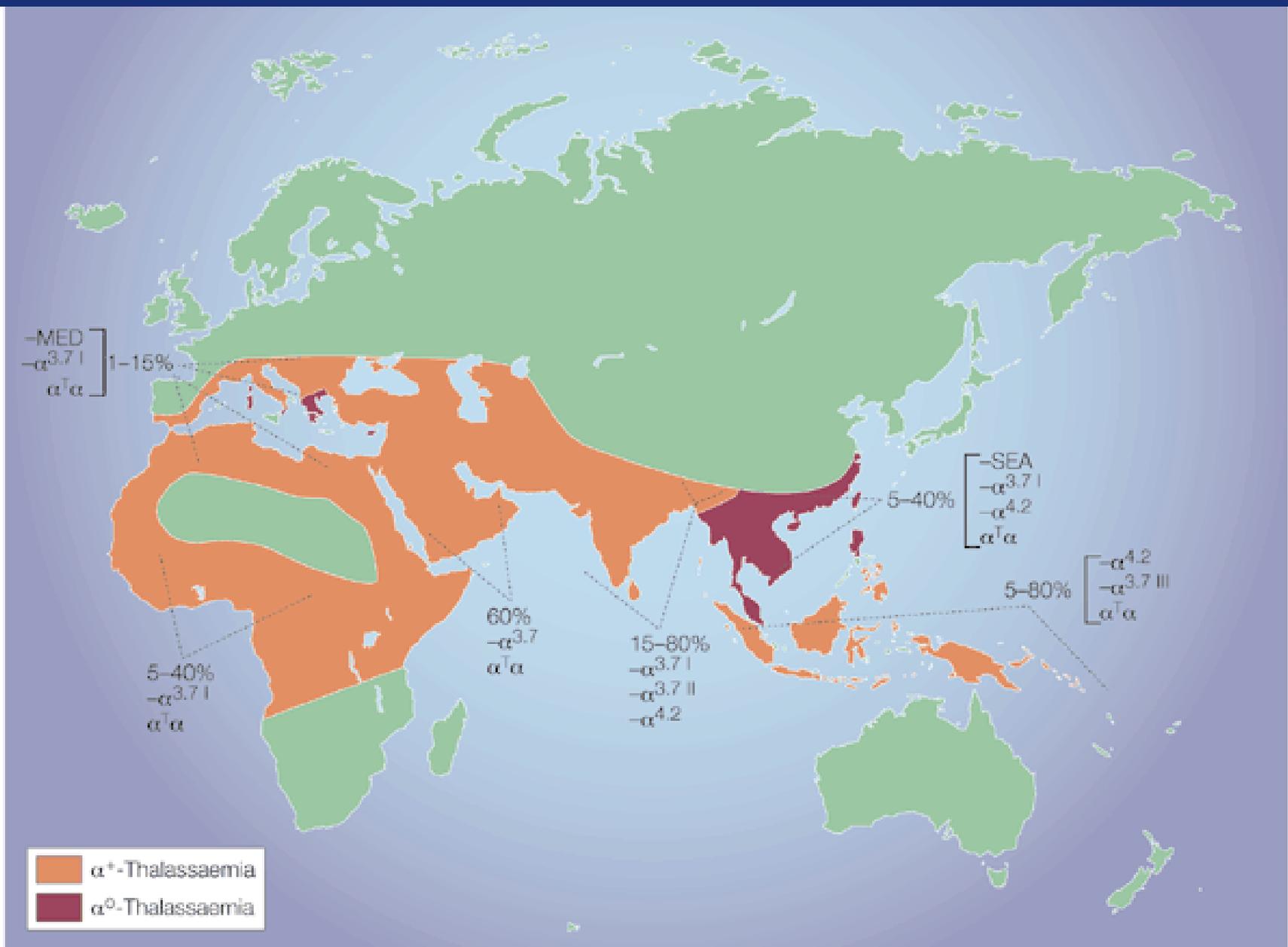
Raggruppamento  $\alpha$ -globine 16p13



☞ Nel sud est asiatico sono presenti entrambi i tipi di delezione (un gene/due geni), mentre in Africa e' praticamente assente l'allele

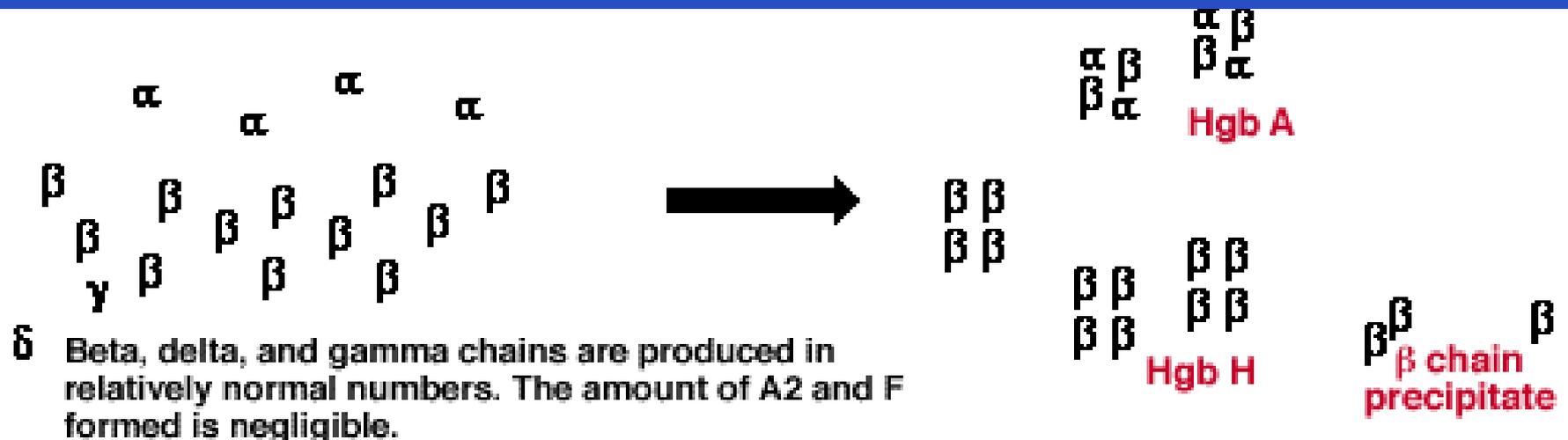


☐ I genotipi possibili sono 6 e i fenotipi sono diversi a seconda delle combinazioni



## Alfa talassemia

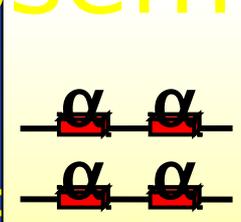
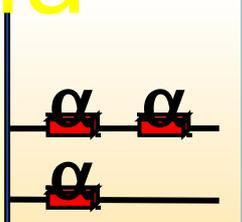
Quando la produzione delle catene alfa è ridotta, l'eccesso di catene beta e gamma può sua volta causare la formazione di tetrameri (Hb H and Hb Barts).



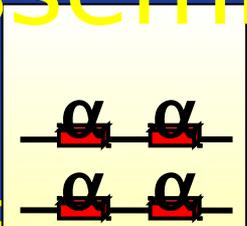
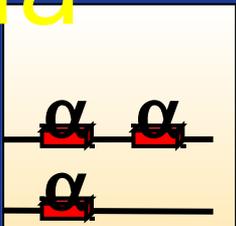
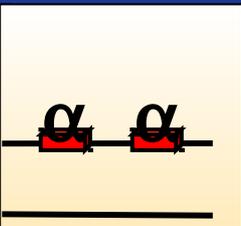
# Genotipi e fenotipi nella a-talassemia

Assetto genomico	
N.Geni $\alpha$	4
Stato	omozigote wild-type
Anemia	nessuna

# Genotipi e fenotipi nella $\alpha$ -talassemia

Assetto genomico			
N.Geni $\alpha$	4	3	
Stato	omozigote wild-type	eterozigote <u>1 allele wild type</u>	
Anemia	nessuna	lieve	

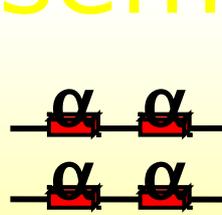
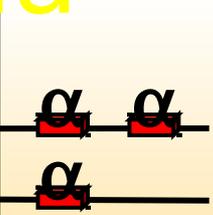
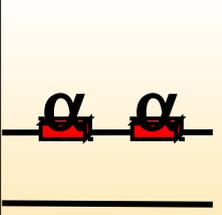
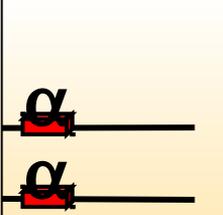
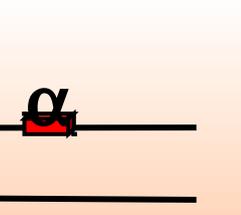
# Genotipi e fenotipi nella $\alpha$ -talassemia

<b>Assetto genomico</b>				
<b>N.Geni <math>\alpha</math></b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	
<b>Stato</b>	<b>omozigote wild-type</b>	<b>eterozigote <u>1 allele wild type</u></b>	<b>eterozigote <u>1 allele wild type</u></b>	
<b>Anemia</b>	<b>nessuna</b>	<b>lieve</b>	<b>lieve</b>	

# Genotipi e fenotipi nella $\alpha$ -talassemia

<b>Assetto genomico</b>					
<b>N.Geni <math>\alpha</math></b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	
<b>Stato</b>	<b>omozigote wild-type</b>	<b>eterozigote <u>1 allele wild type</u></b>	<b>eterozigote <u>1 allele wild type</u></b>	<b>omozigote <u>nessun allele wild-type!</u></b>	
<b>Anemia</b>	<b>nessuna</b>	<b>lieve</b>	<b>lieve</b>	<b>lieve</b>	

# Genotipi e fenotipi nella a-talassemia

<b>Assetto genomico</b>						
<b>N.Geni <math>\alpha</math></b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	
<b>Stato</b>	<b>omozigote wild-type</b>	<b>eterozigote <u>1 allele wild type</u></b>	<b>eterozigote <u>1 allele wild type</u></b>	<b>omozigote <u>nessun allele wild-type!</u></b>	<b>eterozigote <u>nessun allele wild-type!</u></b>	
<b>Anemia</b>	<b>nessuna</b>	<b>lieve</b>	<b>lieve</b>	<b>lieve</b>	<b>grave HbH</b>	

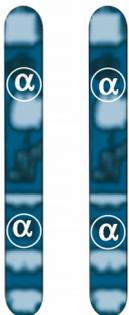
# Genotipi e fenotipi nella a-talassemia

<b>Assetto genomico</b>						
<b>N.Geni <math>\alpha</math></b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Stato</b>	<b>omozigote wild-type</b>	<b>eterozigote <u>1 allele wild type</u></b>	<b>eterozigote <u>1 allele wild type</u></b>	<b>omozigote nessun allele wild-type!</b>	<b>eterozigote nessun allele wild-type!</b>	<b>omozigote</b>
<b>Anemia</b>	<b>nessuna</b>	<b>lieve</b>	<b>lieve</b>	<b>lieve</b>	<b>grave HbH</b>	<b>letale</b>



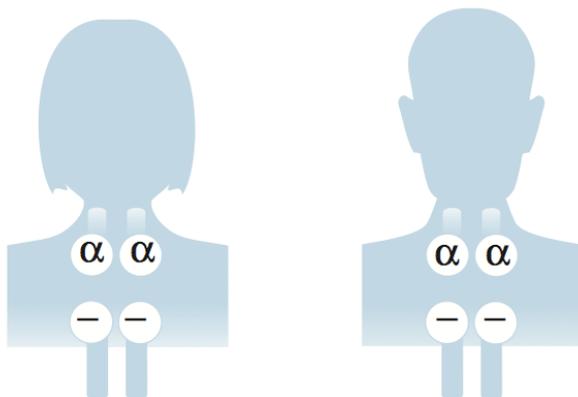
# Parametri ematologici

Genotipo	Hgb (g/dl)	MCV (fl)	RDW
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Normale	Normale	Normale
$\alpha\alpha/-\alpha$	12-14	75-85	Normale
$\alpha-/\alpha-$ or $- -/\alpha\alpha$	11-13	70-75	↑
$- -/-\alpha$	7-10	50-60	↑↑
$- -/- -$	-	-	-



Normal alpha globin genes found on chromosome 16

## Modalità di trasmissione dell'alfa talassemia



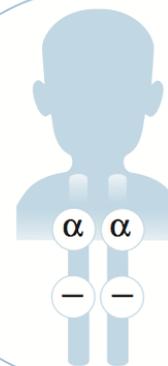
If **both parents** carry **alpha thalassemia trait** in which the two abnormal genes of each parent are on opposite chromosomes, their children will inherit **alpha thalassemia trait**.

An individual with two abnormal alpha globin genes is said to have **alpha thalassemia trait**. The two abnormal genes can be on the same chromosome or on each chromosome in the pair.

### Alpha Thalassemia Trait.

In this condition, in which two of the four alpha globin genes are missing or defective, the lack of alpha globin protein is somewhat greater. Both abnormal alpha globin genes may be on the same chromosome (cis position) or one may be on each chromosome in the pair (trans position).

alpha thalassemia trait



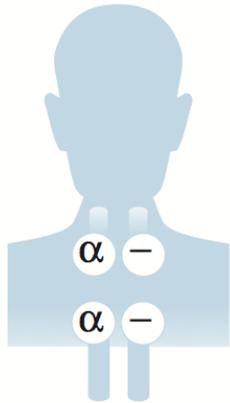
Physicians often mistake alpha thalassemia trait for iron deficiency anemia and incorrectly prescribe iron supplements that have no effect on the anemia. Patients with this condition have smaller red blood cells and a mild anemia, although they do not experience symptoms.



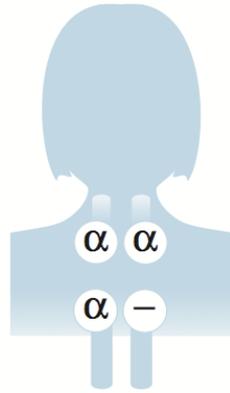
Cooley's Anemia  
FOUNDATION  
Leading the Fight Against Thalassemia

(800) 522-7222 or [info@cooleysanemia.org](mailto:info@cooleysanemia.org)  
[www.cooleysanemia.org](http://www.cooleysanemia.org)

if...



one parent has **alpha thalassemia trait** with two abnormal alpha globin genes on the same chromosome



and the other parent has the **silent carrier state** with a single abnormal alpha globin gene on one chromosome

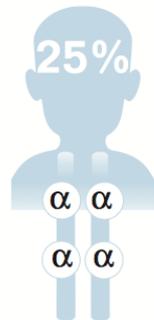
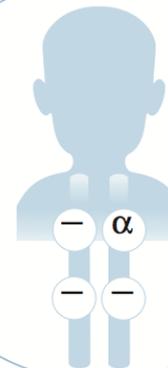
The alpha thalassemia traits combine in different ways to produce blood disorders that range from mild to severe in their effect on the human body.

..then

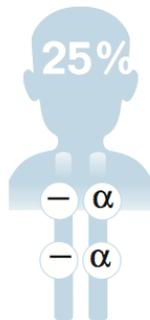
there is a **25%** chance with **each** pregnancy that their child will be born with **hemoglobin H disease** in which three of the four alpha globin genes are abnormal.

In this condition, the lack of alpha protein is great enough to cause moderate to severe anemia and may cause serious health problems such as an enlarged spleen, bone deformities and fatigue.

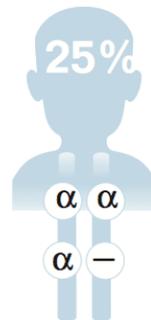
**25%**  
hemoglobin H  
disease



25%  
normal  
hemoglobin

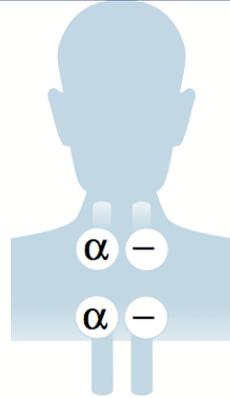
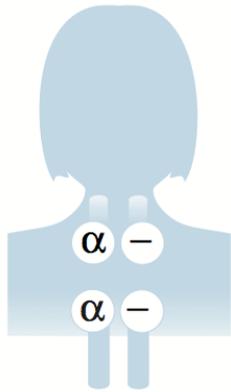


25%  
alpha thal  
trait

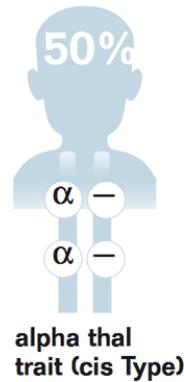
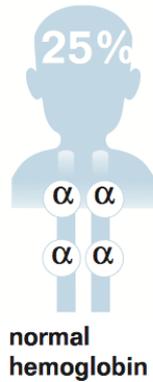


25%  
alpha thal  
silent carrier

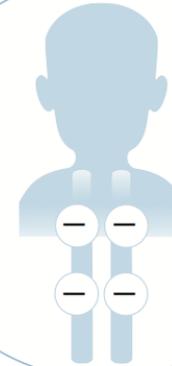
if...



both parents carry alpha thalassemia trait with two abnormal alpha globin genes on the same chromosome



25%  
hydrops fetalis  
(alpha thal major)



..then

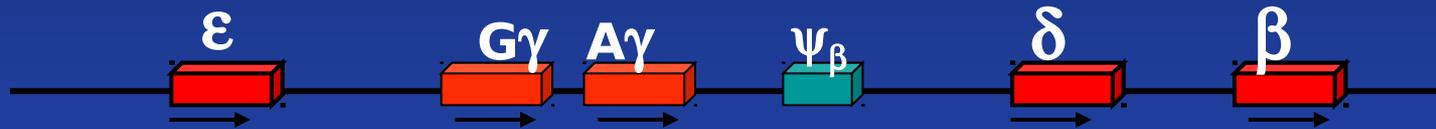
there is a **25%** chance with **each** pregnancy that their child will inherit **hydrops fetalis** or **alpha thalassemia major**, in which all four alpha globin genes are abnormal.

Most individuals with this condition die before or shortly after birth.

In some extremely rare cases, in utero blood transfusions have allowed the birth of children with hydrops fetalis who then require lifelong blood transfusions and extensive ongoing medical care.

# $\beta$ -Talassemia

Raggruppamento  
 $\beta$ -globine 11p15



☹ Originata principalmente da mutazioni il cui effetto, attraverso meccanismi diversi, è quello di avere un deficit di catene  $\beta$ . I siti di mutazione sono caratteristici di una popolazione



1 mutazioni nel promotore

2 mutazioni puntiformi all'interno degli esoni causano sostituzioni aa o fine

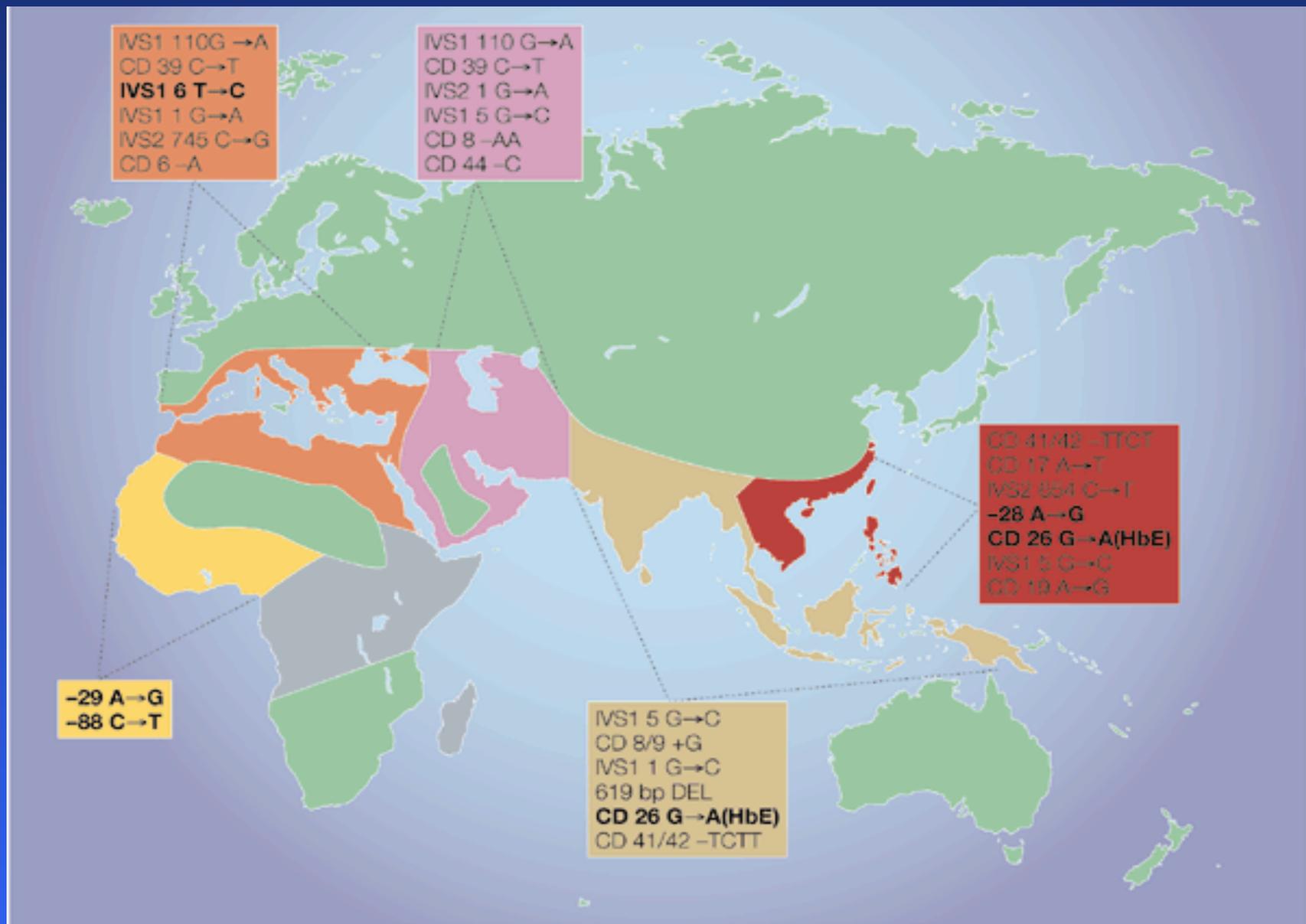
3 mutazioni introni, alterazione splicing

4 mutazione in siti di poliadenilazione

# $\beta$ -Talassemia

☞  $\beta^0$  talassemia: tutte le forme in cui manca la catena  $\beta$ .  
l'mRNA puo' mancare completamente, degradato o inattivo

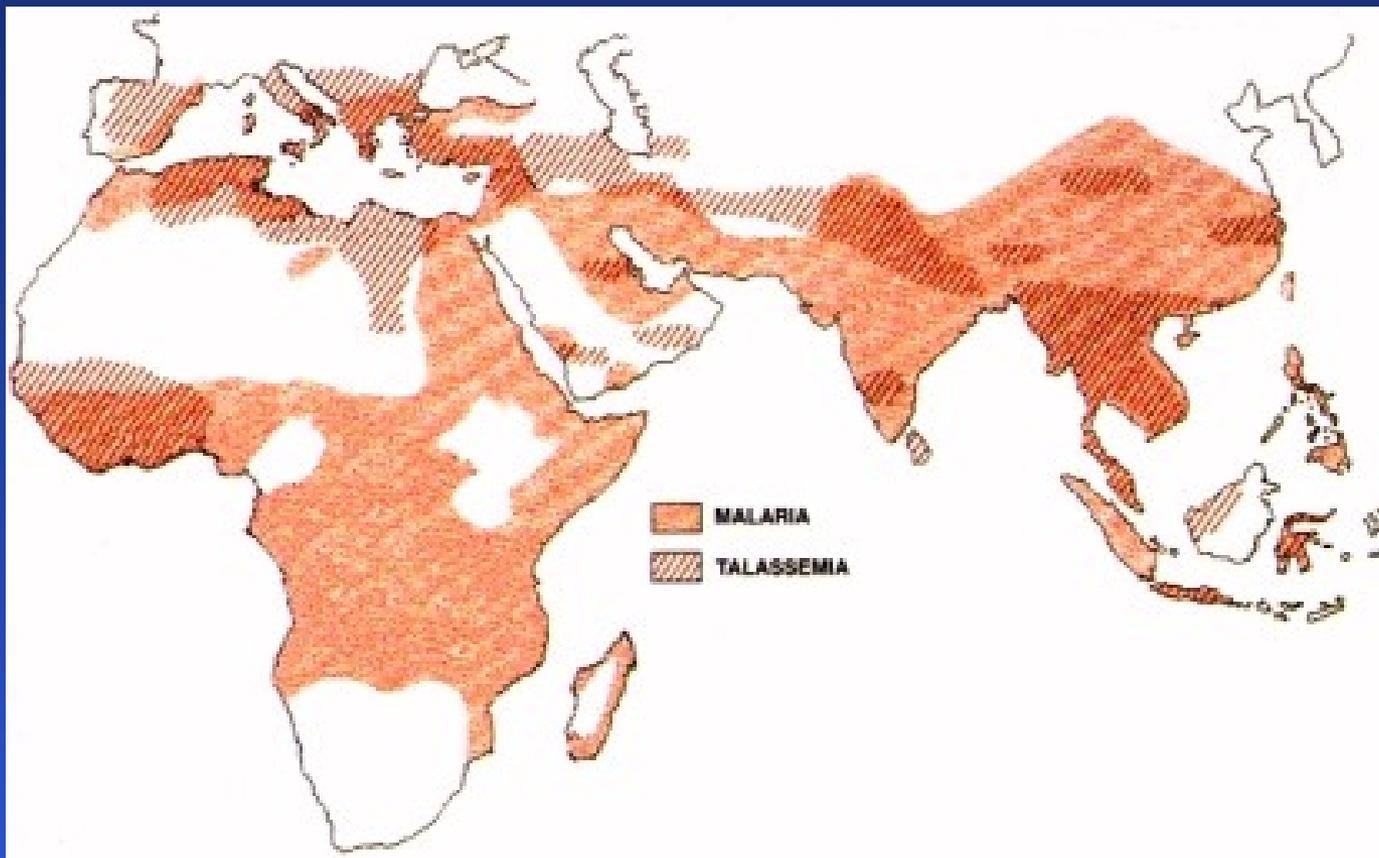
☞  $\beta^+$  talassemia: tutte le forme la catena  $\beta$  e' sottorappresentata  
l'mRNA puo' non venire processato in maniera corretta o essere  
poco rappresentato.



# Le mutazioni della $\beta$ -Talassemia nelle diverse popolazioni

<b>Sardegna:</b>	codone 39	da glutamina a stop	proteina tronca	95 %
	codone 6	perdita di una base	frameshift	2.1% $\beta^0$
	codone 76	perdita di una base	=	0.7% $\beta^0$
	introne1 110	G $\rightarrow$ A	splicing alterato	0.5% $\beta^+$
	introne2 745	C $\rightarrow$ G	==	0.4% $\beta^+$

<b>Grecia:</b>	codone 39	da glutamina a stop	proteina tronca	17.4 %
	introne1 1	G $\rightarrow$ A	splicing alterato	13.6 % $\beta^0$
	introne1 6	T $\rightarrow$ C	splicing alterato	7.4 % $\beta^+$
	introne1 110	G $\rightarrow$ A	==	43.7 % $\beta^+$
	introne2 745	C $\rightarrow$ G	==	7.1% $\beta^+$

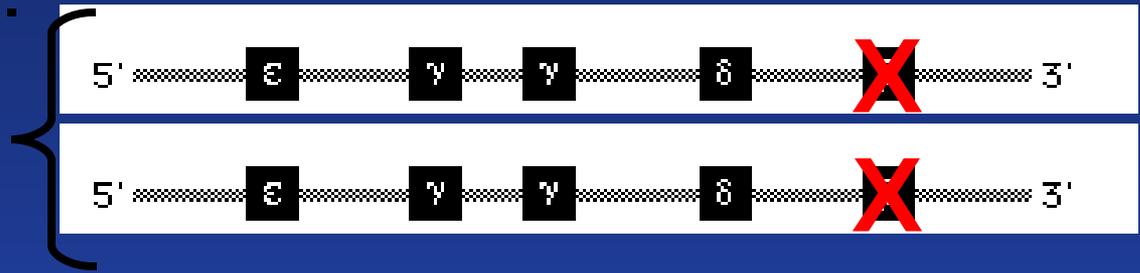


*La malattia si è diffusa quasi esclusivamente nelle zone in cui era presente la malaria, in quanto le caratteristiche anomale dei globuli rossi degli individui affetti da microcitemia impediscono o ostacolano il completamento del ciclo di vita del plasmodium, l'agente infettivo della malaria.*

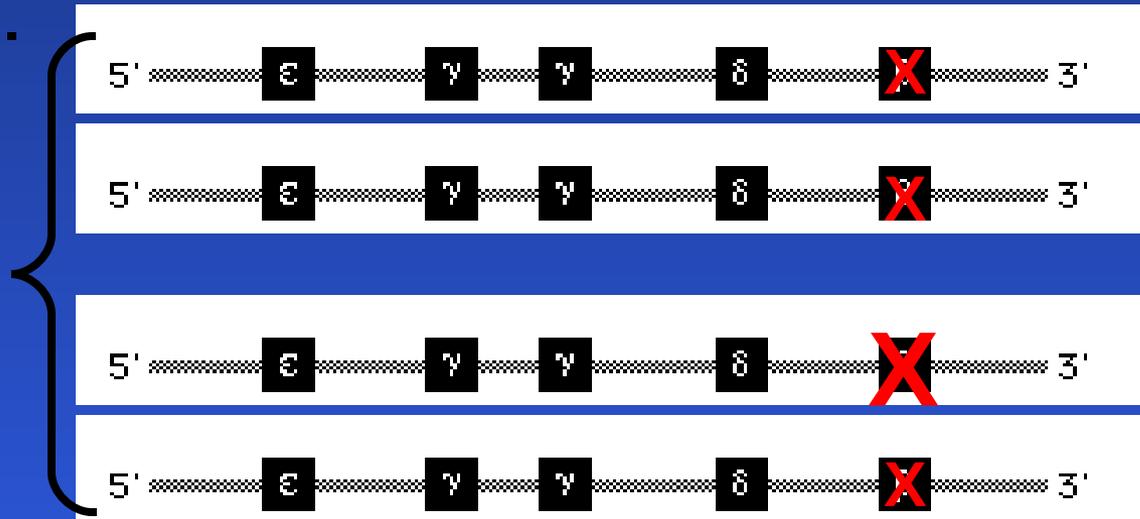
*In seguito i flussi migratori hanno portato la microcitemia a diffondersi anche in altre zone.*

*In Italia le zone di maggior diffusione sono il Delta del Po, la Sardegna e la Sicilia con un'incidenza tra il 9 e il 14% della popolazione, per un totale di circa 7000 pazienti, ma si sta diffondendo anche in altre regioni quali Calabria, Puglia, Lombardia, Liguria e Piemonte.*

$\beta$  -talassemia major

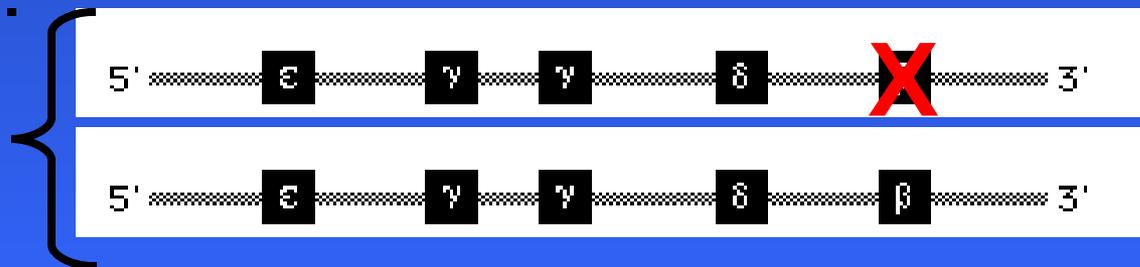


$\beta$  -talassemia intermedia



$\beta$  -talassemia minor  
tratto  $\beta$ -talassemico

$\beta$  -talassemia eterozigote

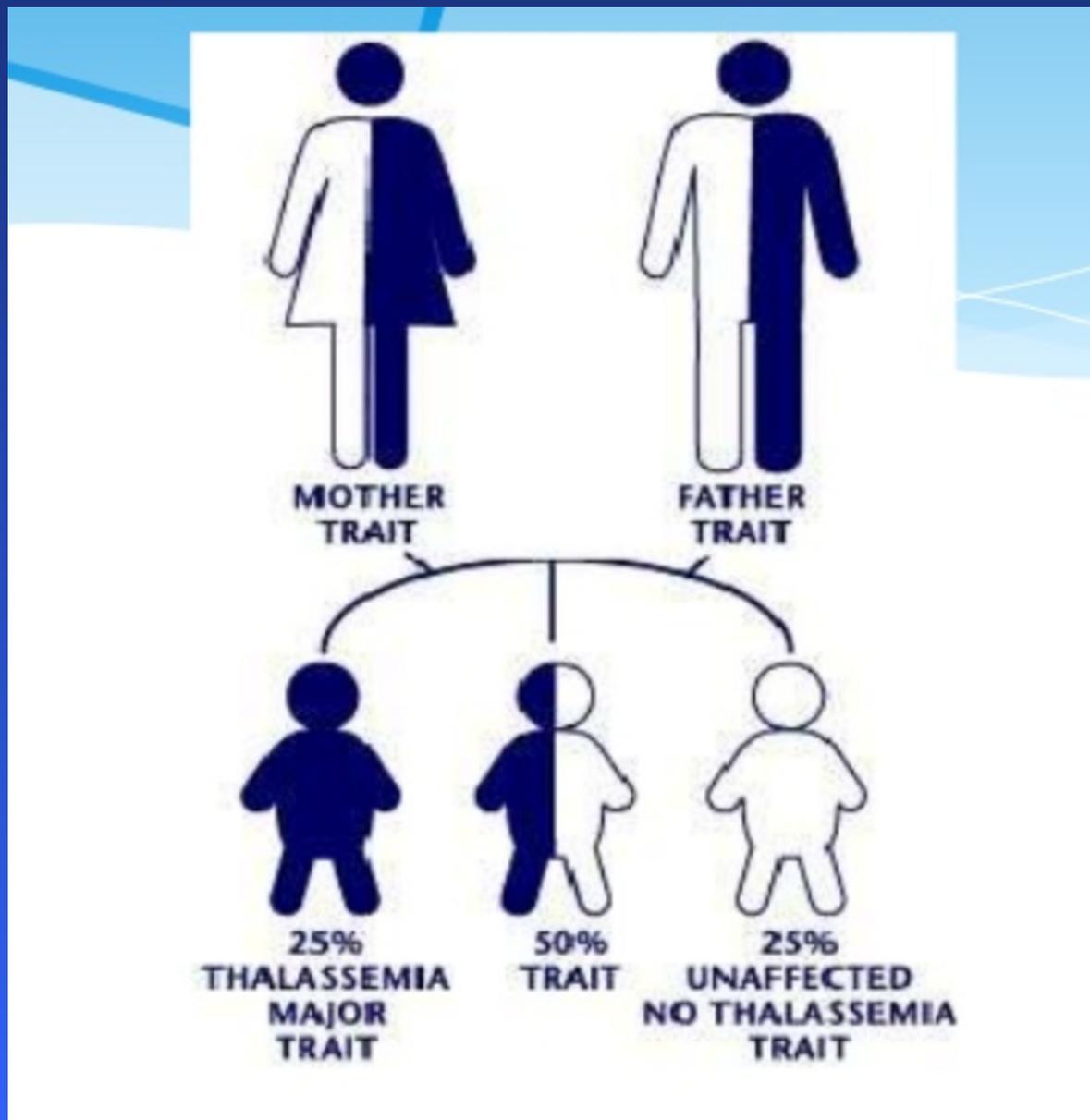


# Clinical Phenotypes of $\beta$ Thalassaemia

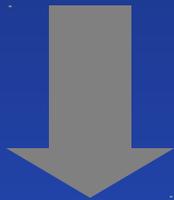
---

- **Thalassaemia Major / Cooley's anaemia**
  - profound anaemia, total transfusion dependence
- **Thalassaemia Intermedia**
  - moderate to severe anaemia, occasional transfusion required
- **Thalassaemia trait / carrier**
  - clinically asymptomatic
  - very mild or no anaemia
  - hypochromic, microcytic red blood cells

## Modalità di trasmissione della beta talassemia



# GLOBALIN-DISORDERS



**QUANTITATIVE  
DISORDERS**  
(thalassemia)



**QUALITATIVE  
DISORDERS**  
(structural  
hemoglobinopathies)

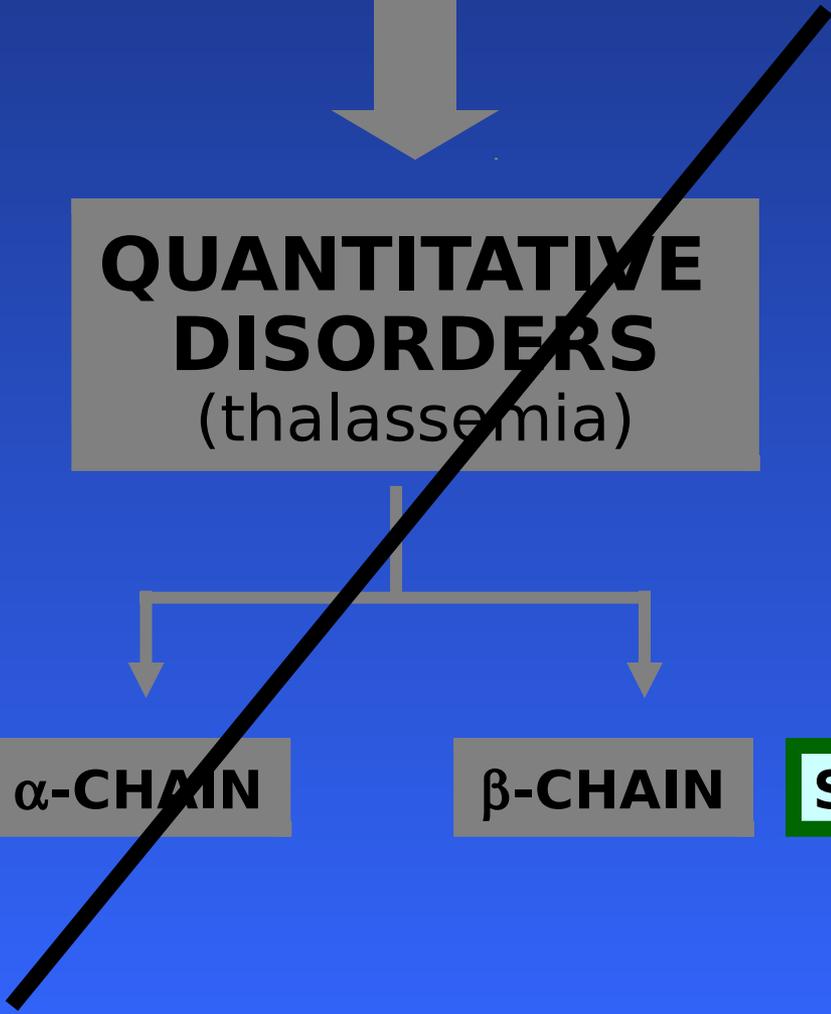
**$\alpha$ -CHAIN**

**$\beta$ -CHAIN**

**SOLUBILITY**

**STABILITY**

**Oxygen  
AFFINITY**

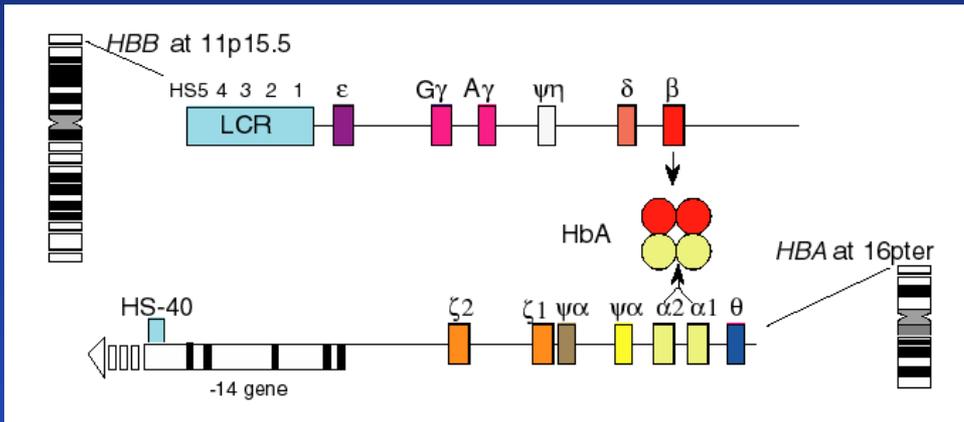


# DREPANOCITOSI (HBS)

L' emoglobinopatia più nota che compromette la solubilità dell' Hb è la Drepanocitosi

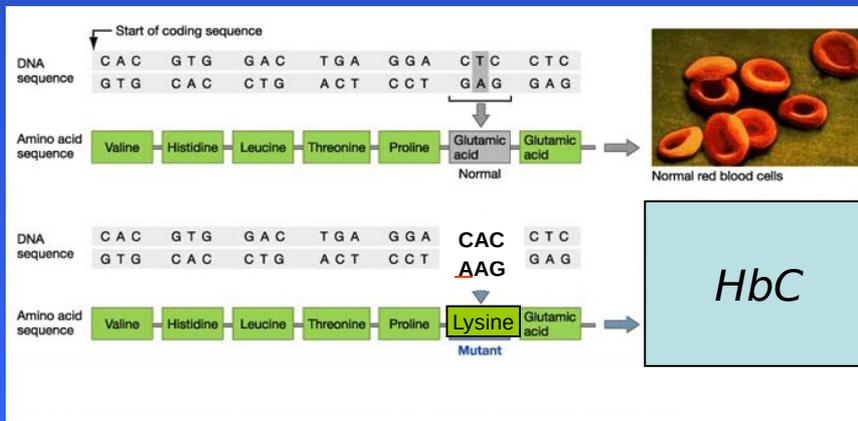
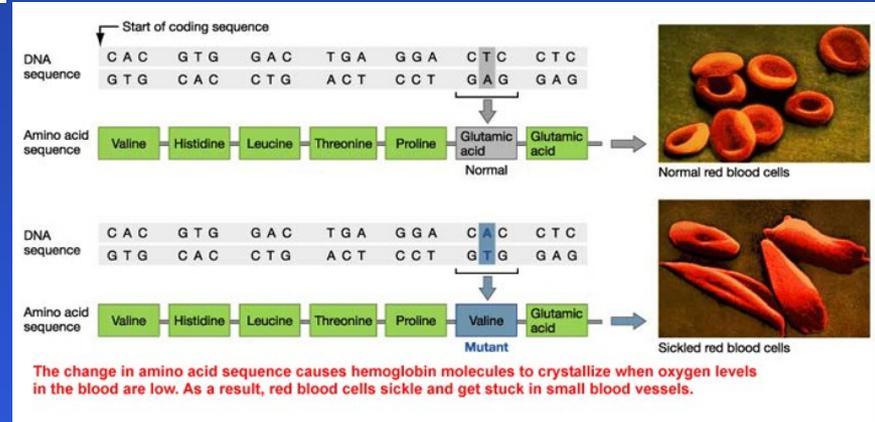


# Drepanocitosi: il gene...



## Beta globin cluster region

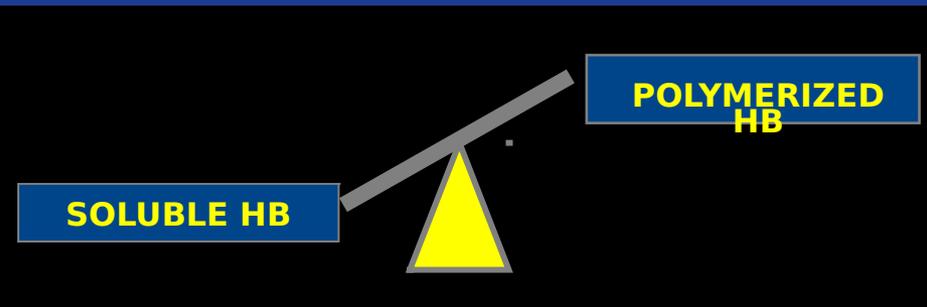
Gene Beta globinico  
Mutazione responsabile di  
HbS  
 $GAG > GTG$



Gene Beta globinico  
Mutazione responsabile di HbC  
 $GAG > AAG$

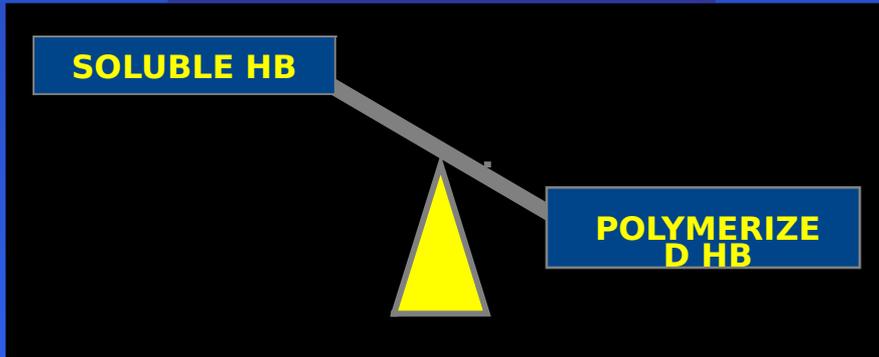
# Drepanocitosi: il gene, la proteina...

## The sickling balance



OXY-state, high PH, good hydration

## The sickling balance



DEOXY-state, low PH, dehydration, fever

Normal hemoglobin

Sickle Cell hemoglobin forms long, inflexible chains

Normal Red

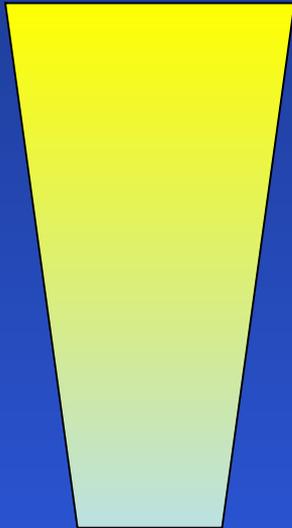
Sickled Red

OXY-STATE ↔ DEOXY-STATE

Normal red blood cells are compact and flexible, enabling them to squeeze through small capillaries

Sickled red blood cells are stiff and angular, causing them to become stuck in small capillaries

## ***Drepanocitosi: il fenotipo o diversi fenotipi...***



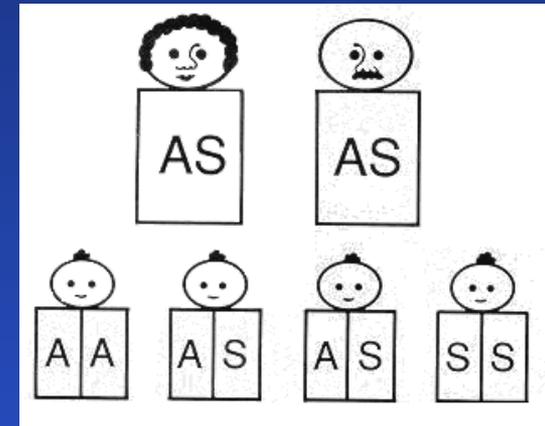
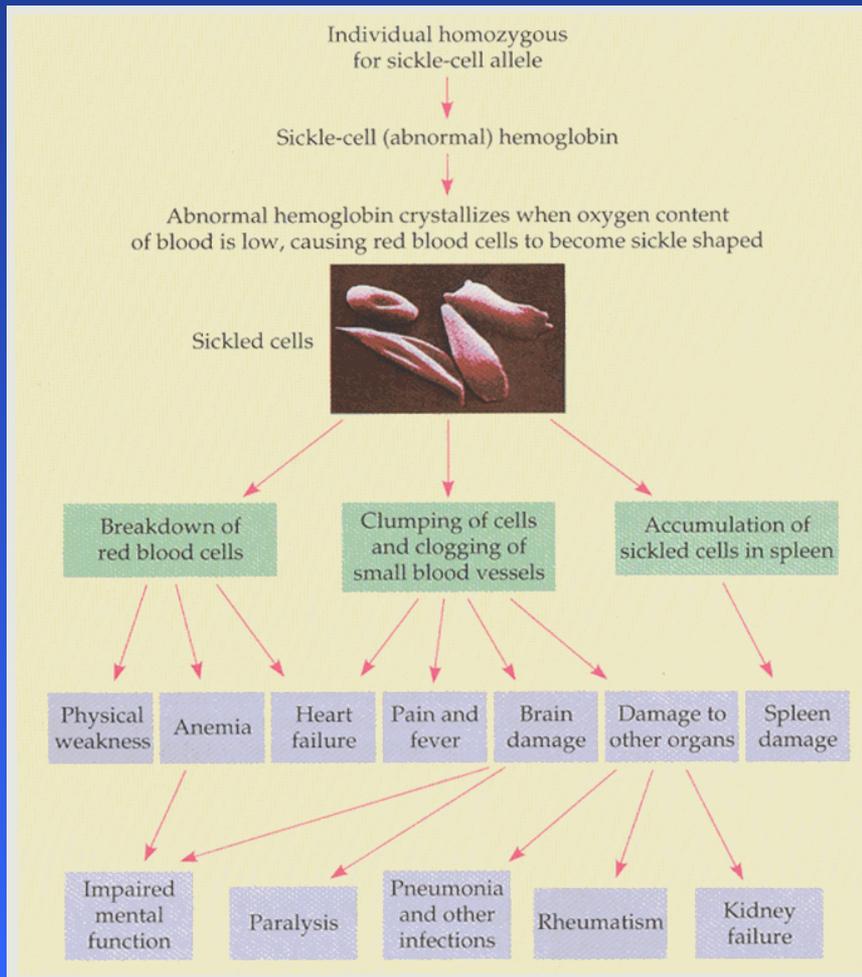
### *Principali Fenotipi:*

- *Omozigosi HbS*
- *Eterozigosi composta  $S\beta^0$*
- *Eterozigosi composta  $S\beta^+$*
- *Eterozigosi composta SC*

# Drepanocitosi: il fenotipo o diversi fenotipi...

## OMOZIGOSI HBS

### Sintomatologia quadro clinico classico



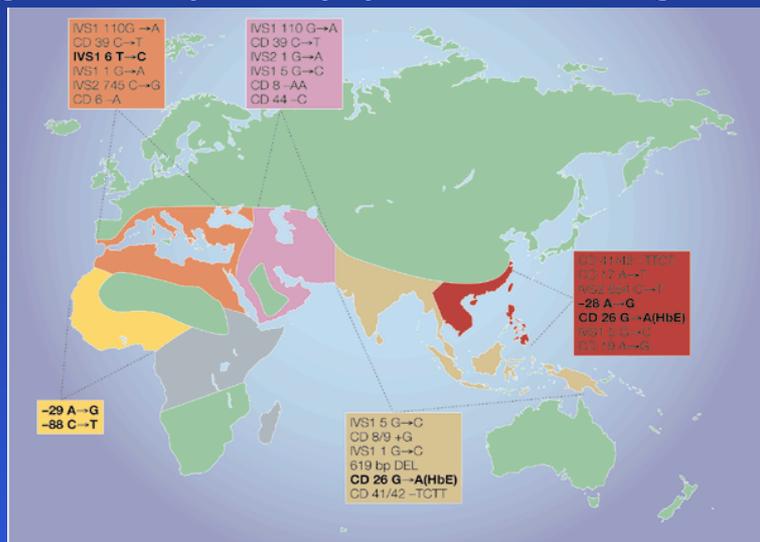
Fattori in grado in qualche modo di modulare il fenotipo

- Fattori correlati al  $\beta$ -globin cluster region (Aplotipi)
- Coesistenza di delezioni dei geni alfa globinici (delezioni che coinvolgono uno-due geni)
- Incremento dell'HbF

# Drepanocitosi: il fenotipo o diversi fenotipi...

Eterozigosi composta Sβ (microdrepanocitosi)

- Eterozigosi composta β<sup>s</sup>β<sup>o</sup>
- Eterozigosi composta β<sup>s</sup>β<sup>+</sup>



Fenotipo dipende da:

- Tipo di mutazione Beta talassemica β<sup>o</sup>/ β<sup>+</sup>
- Aplotipo β<sup>s</sup>

Nei β<sup>o</sup>β<sup>s</sup> (vs β<sup>s</sup>β<sup>s</sup>): Persistenza della splenomegalia e crisi di sequestro splenico per lo più in adolescenza

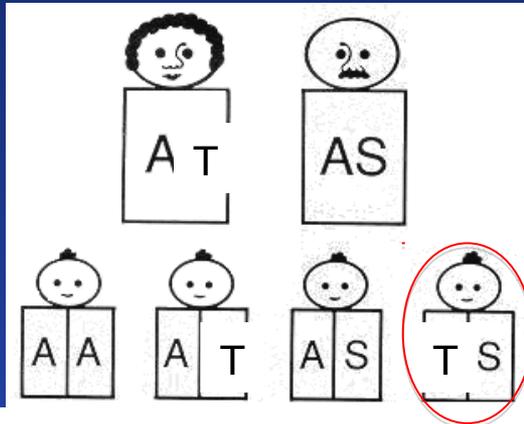


TABLE 3. Incidence of complications of sickle cell disease in the United States, by genotype

Complication	Gene variant*			
	Hb SS	Hb SC	Hb S/ β <sup>o</sup> - thalas- semia	Hb S/ β <sup>+</sup> - thalas- semia
Acute chest syndrome (per 100 patient-years)†	12.8	5.2	9.4	3.9
Cerebrovascular accidents (per 100 patient-years)‡	0.6	0.2	0.1	0.1
Pain crises (per patient-year)§	0.8	0.04	1.0	0.4

\* Hb SS, sickle cell anemia; Hb SC, sickle hemoglobin C disease; Hb S, sickle hemoglobin.

† Source: Castro et al. (7).

‡ Source: Ohene-Frempong et al. (17).

§ Source: Platt et al. (6).

TABLE 4. Median survival of individuals of all ages with sickle cell disease in the United States, by sex and genotype, 1980s\*

Sex and genotype†	Median survival (years)
Male, Hb SS	42
Female, Hb SS	48
Male, Hb SC	60
Female, Hb SC	68

\* Source: Platt et al. (14).

† Hb SS, sickle cell anemia; Hb SC, sickle hemoglobin C disease.

# Drepanocitosi: il fenotipo o diversi fenotipi...

## Eterozigosi composta SC

**TABLE 3. Incidence of complications of sickle cell disease in the United States, by genotype**

Complication	Gene variant*			
	Hb SS	Hb SC	Hb S/ $\beta^0$ -thalassemia	Hb S/ $\beta^+$ -thalassemia
Acute chest syndrome (per 100 patient-years)†	12.8	5.2	9.4	3.9
Cerebrovascular accidents (per 100 patient-years)‡	0.6	0.2	0.1	0.1
Pain crises (per patient-year)§	0.8	0.04	1.0	0.4

\* Hb SS, sickle cell anemia; Hb SC, sickle hemoglobin C disease; Hb S, sickle hemoglobin.

† Source: Castro et al. (7).

‡ Source: Ohene-Frempong et al. (17).

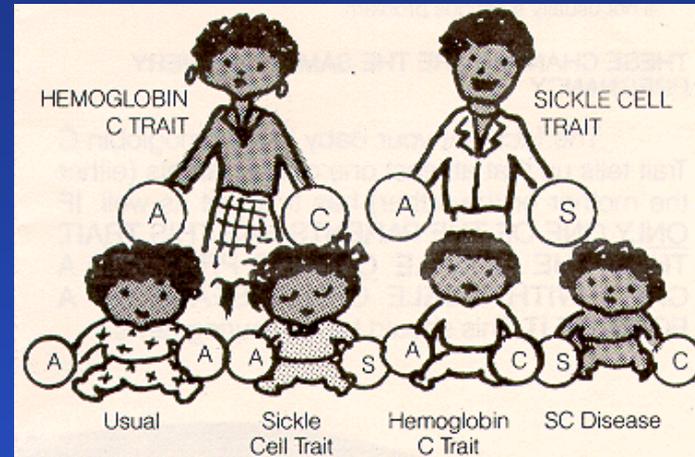
§ Source: Platt et al. (6).

**TABLE 4. Median survival of individuals of all ages with sickle cell disease in the United States, by sex and genotype, 1980s\***

Sex and genotype†	Median survival (years)
Male, Hb SS	42
Female, Hb SS	48
Male, Hb SC	60
Female, Hb SC	68

\* Source: Platt et al. (14).

† Hb SS, sickle cell anemia; Hb SC, sickle hemoglobin C disease.



- Tendono ad avere un decorso più lieve
- Aumentato rischio di complicazioni tromboemboliche, retinopatia e necrosi renale papillare

**.....LA CONSULENZA GENETICA NELLE  
TALASSEMIE ED EMOGLOBINOPATIE .....**

**.....LA CONSULENZA GENETICA NELLE  
TALASSEMIE ED EMOGLOBINOPATIE .....**



**POSTNATALE**



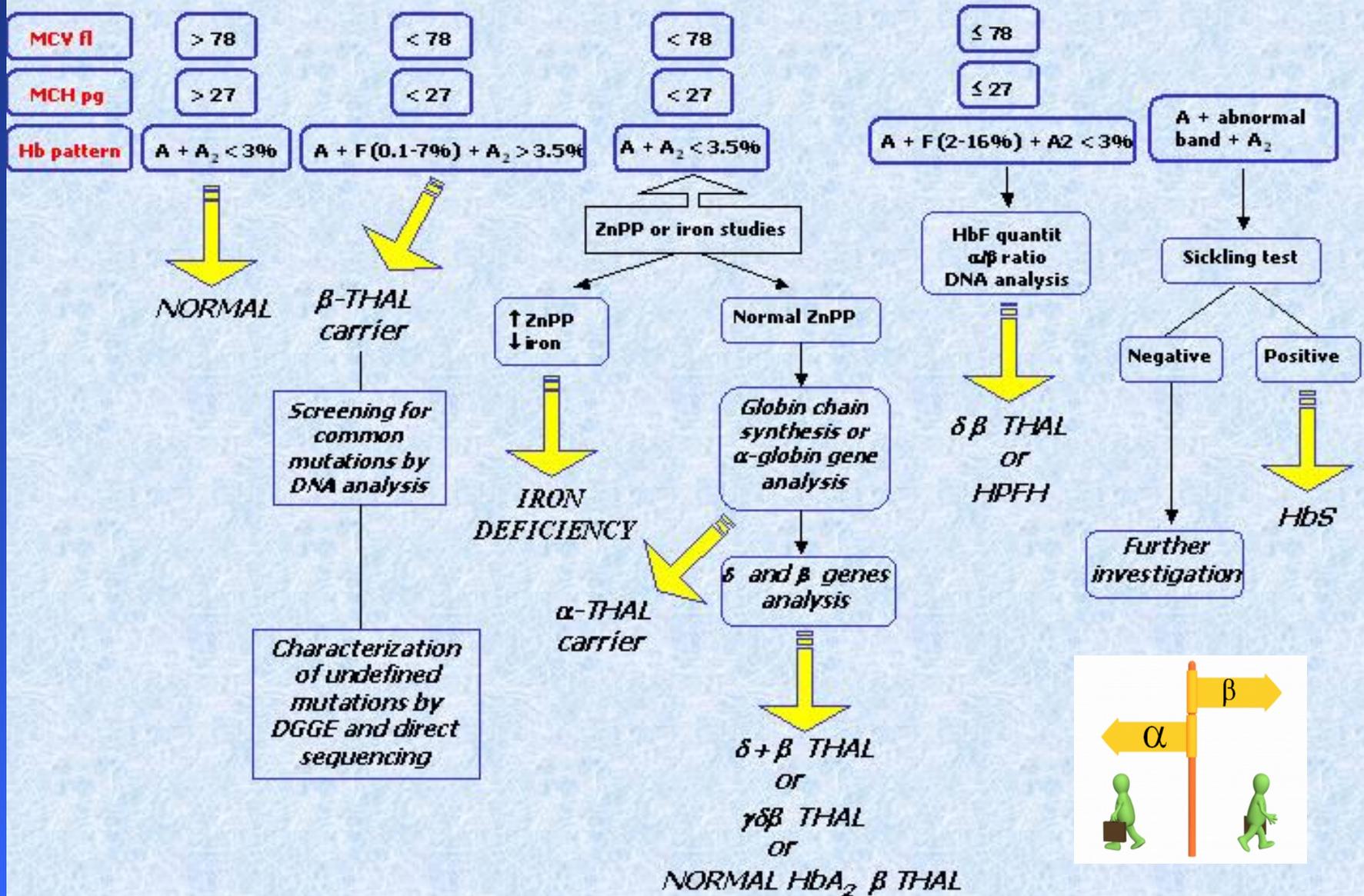
**PRENATALE**

## Iter diagnostico:

- complesso
- coinvolgente diverse competenze
- da effettuarsi in tempi rapidi (epoca prenatale)

- *Specialisti ginecologi*
- *Pediatri*
- *Equipe di consulenza genetica*
- *Laboratorio Analisi*
- *Laboratorio di Genetica Molecolare*
- *Laboratorio di Immunogenetica*
- *Servizio di Diagnosi Prenatale*

# Flow chart for thalassemia screening



# Iter diagnostico: I° step Consulenza genetica

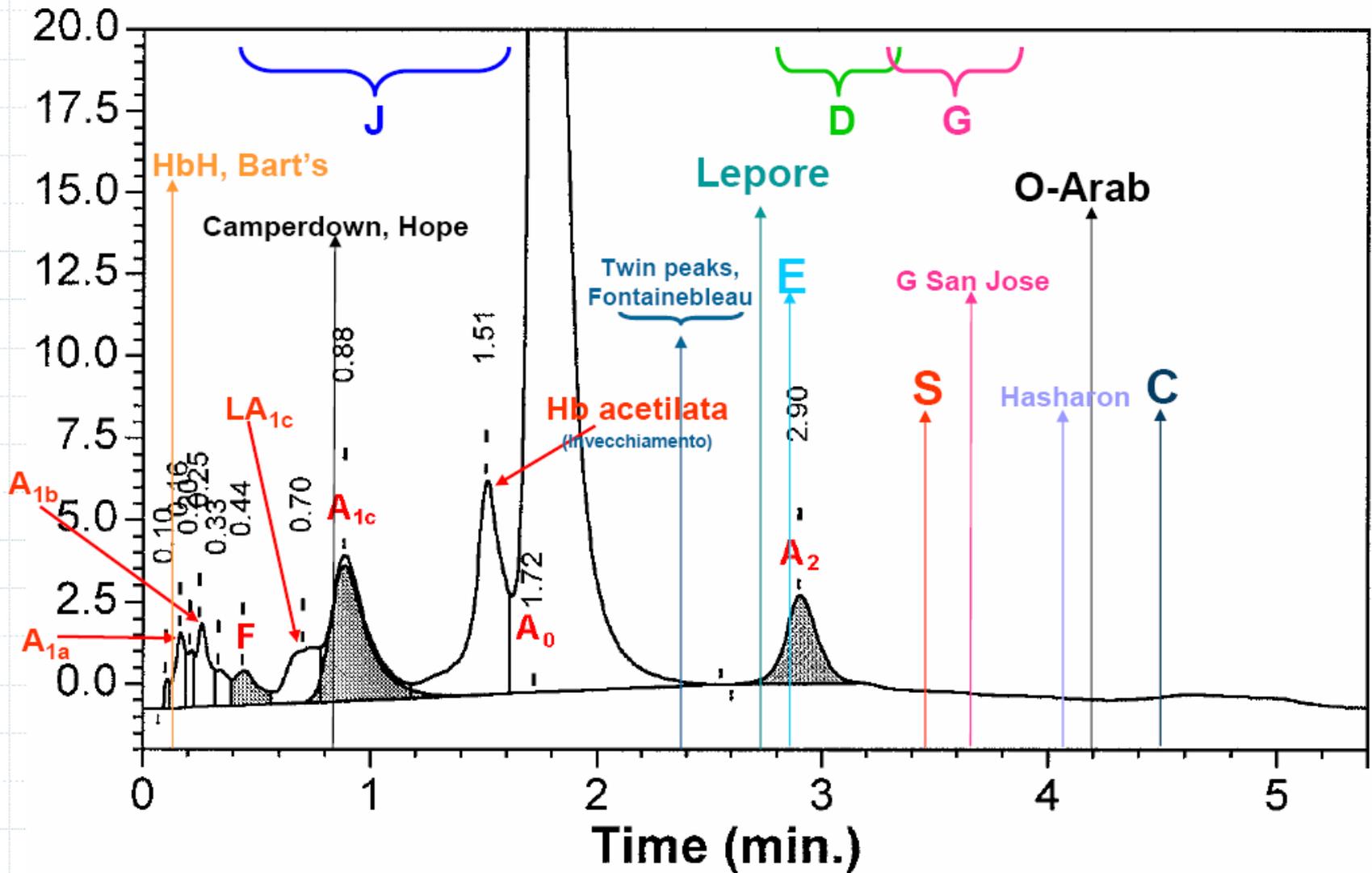
Raccolta di informazioni:

- ✓ Anamnesi personale e analisi dell' albero familiare (altri familiari portatori o affetti, precedenti gravidanze esitate in idrope fetale)
- ✓ Area di provenienza (aree ad elevata frequenza di particolari difetti emoglobinici cfr. DeltaBeta tipo Sicilia)

Accertamenti già eseguiti o da ripetersi in corso di consulenza

- ✓ Indici eritrocitari: G.R., Hb totale, MCV, MCH, RDW
- ✓ Parametri del ferro: ferritina, sideremia, % di saturazione della transferrina
- ✓ Assetto emoglobinico: % HbA2, % HbF, presenza di varianti Hb

# Assetto emoglobinico: cromatogramma tipo



# Iter diagnostico: II° step -> Diagnostica molecolare

Metodiche utilizzate:

- ❖ Reverse Dot Blot
- ❖ Sequenza del gene Beta
- ❖ Ricerca mutazioni più frequenti a carico dei geni alfa globinici
- ❖ Sequenza dei geni alfa globinici
- ❖ MLPA (geni beta, alfa globinici)

Identificazione del difetto emoglobinico dello stato di portatore in entrambi

↓ SI

Stima quantitativa e qualitativa del rischio

↓

Proposta di Diagnosi prenatale

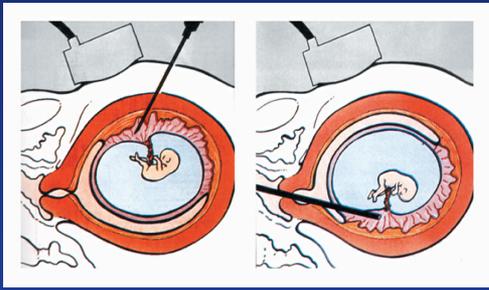
↓ NO

Rivalutazione dei dati ematologici

↓

Considerazione altre ipotesi alternative





## III° step -> Diagnostica molecolare prenatale

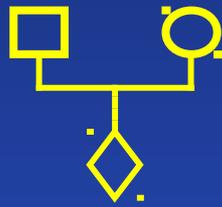


- è la **scelta prevalente** delle coppie a rischio (fatta soprattutto nel 1° trimestre, ma anche in 2° trimestre con **ricerca delle mutazioni parentali su DNA estratto da villi coriali o da amniociti**)

- Previa somministrazione di specifico consenso informato con dettagliati i rischi di occorrenza della patologia, il quadro clinico atteso in base ai difetti molecolari (assicurato la disponibilità di eventuale colloquio con il pediatra del DH Talassemico) e i rischi di abortività connessi alla metodiche proposte

- Alle coppie con precedente figlio affetto offerta la possibilità di caratterizzazione HLA fetale in caso di feto sano o portatore

# Caso-A



**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
beta talassemico

GR	6,09
Hb	10,6
MCV	57
MCH	17
HbA2	4,9
HbF	0,9

GR	5,00
Hb	11,8
MCV	63
MCH	21,6
HbA2	5,2
HbF	1,5

**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
beta talassemico



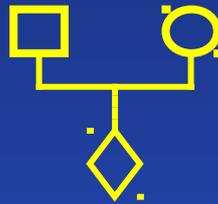
**Analisi molecolare geni  
beta globinici:**  
Eterozigosi Beta<sup>o</sup>cod 39

**Analisi molecolare geni beta  
globinici:**  
Eterozigosi Beta+IVS1-nt110

**Counselling genetico:**  
Rischio del 25% di feto affetto da T. Major

SI  
Percorso di DP

# Caso-B



**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
beta talassemico

GR	6,09
Hb	10,6
MCV	57
MCH	17
HbA2	4,9
HbF	0,9

GR	5,00
Hb	11,8
MCV	85
MCH	29
HbA2	3,9
HbF	1,3

**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
beta  
talassemico?????



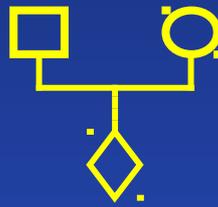
**Analisi molecolare geni  
beta globinici:**  
Eterozigosi Beta<sup>o</sup>cod 39

**Analisi molecolare geni beta  
globinici:**  
Eterozigosi Beta+IVS1-nt101

**Counselling genetico:**  
Rischio del 25% di feto con...fenotipo non  
dissimile dal portatore di trait beta talassemico

NO....  
Percorso di DP

# Caso-C

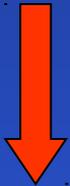


GR	6,09
Hb	10,6
MCV	57
MCH	17
HbA2	4,9
HbF	0,9

GR	5,00
Hb	11,8
MCV	82
MCH	27
HbA2	3,2
HbF	1,1

Ipotesi:  
Portatore di trait  
beta talassemico

Ipotesi:  
Portatore di?????



Analisi molecolare geni  
beta globinici:  
Eterozigosi Beta<sup>o</sup>cod 39

Analisi molecolare geni alfa  
globinici:  
Eterozigosi triplo alfa - anti 3.7

**Counselling genetico:**  
Rischio del 25% di feto Talassemia Intermedia

# Clinical Features of $\beta$ Thalassaemia Intermedia

---

## Extremely Variable

### 1. Anaemia and jaundice , variable

from relatively early presentation (2-4 years),  
dependant on 3-4 monthly transfusions  
to asymptomatic states and diagnosis by chance  
haematological studies

### 2. Splenomegaly

- usual but variable degree

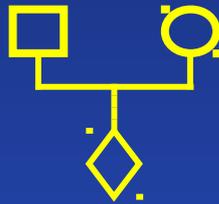
### 3. Growth and development

- normal to similar degree of retardation  
encountered in thal major

### 4. Bone changes variable

- none to severe, as in thal major

# Caso-C



Ipotesi:  
Portatore di trait  
beta talassemico

GR	6,09
Hb	10,6
MCV	57
MCH	17
HbA2	4,9
HbF	0,9

GR	5.00
Hb	11,8
MCV	82
MCH	27
HbA2	3,2
HbF	1.0

Ipotesi:  
Portatore di?????

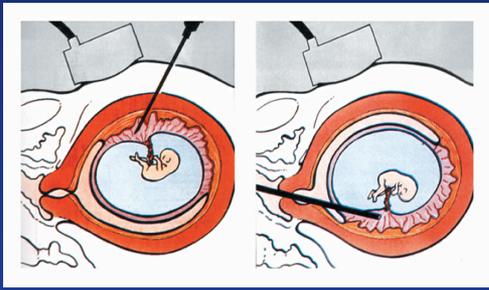


Analisi molecolare geni  
beta globinici:  
Eterozigosi Beta<sup>o</sup>cod 39

Analisi molecolare geni alfa  
globinici:  
Eterozigosi triplo alfa - anti 3.7

Counselling genetico: nella peggiore delle  
ipotesi.. Rischio del 25% di feto con  
Talassemia Intermedia

??????????  
Percorso di DP



## III° step -> Diagnostica molecolare prenatale



### *Finalità....*

*Rendere i singoli e le coppie consapevoli del rischio di patologia genetica per la prole, aiutandoli nelle loro decisioni riproduttive (counselling non direttivo)*



*.....in altre parole:  
evitare la nascita di un bimbo affetto in coppie inconsapevoli del rischio e non evitare la nascita di un bambino affetto*

## Message to take home.....

L'approccio è per una patologia genetica autosomica-recessiva :  
ciò comporta **un rischio solo se entrambi** i partner hanno  
alterazioni dell'Hb.

**Epoca preconcezionale**: può essere conveniente fare sempre l'  
esame completo ad almeno uno dei due partner, in caso di  
minimo dubbio approfondire l' altro



**In gravidanza** è meglio effettuare precocemente  
gli esami alla coppia

Bisogna **raccordare i tempi** per completare la diagnosi per  
alterazioni dell'Hb con i momenti utili per le procedure ostetriche  
connesse alla effettuazione dei prelievi per D.P.; **inizio: 11<sup>a</sup> , fine:**  
**22<sup>a</sup>** settimana gestazionale

Importante la concordanza di tutti i dati in nostro possesso (dati  
familiari, accertamenti ematologici, cromatografia, molecolare)  
Attenzione errori di laboratorio!!!!!!!!!!



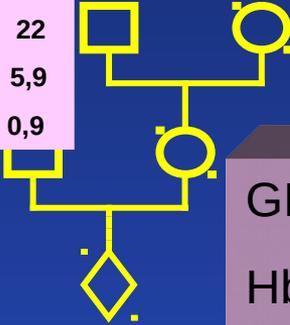
*Grazie per l'attenzione .....*



# Caso-D

GR 6,09  
Hb 11,6  
MCV 62  
MCH 22  
HbA2 5,9  
HbF 0,9

GR 6,09  
Hb 11,6  
MCV 90  
MCH 30  
HbA2 1,4  
HbF 0,9

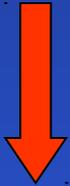


**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
beta talassemico

GR 6,09  
Hb 10,6  
MCV 57  
MCH 17  
HbA2 4,9  
HbF 0,9

~~**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
alfa talassemico~~

GR 5,00  
Hb 11,8  
MCV 63  
MCH 21,6  
HbA2 2,9  
HbF 1,5



**Analisi molecolare geni beta  
globinici:**  
Eterozigosi Beta<sup>o</sup>cod 39

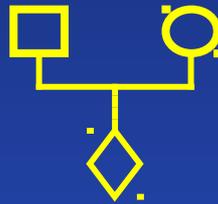
**Analisi molecolare geni alfa  
globinici: negativa**

**Counselling genetico:**  
Rischio del 25% di feto affetto da T. Major

1- **Analisi molecolare geni beta  
globinici:**  
Eterozigosi Beta+IVS1-nt110  
2- **MLPA cluster beta:** eterozigosi  
per la delezione  $\delta$  -7.2 Kb Corfu

SI Percorso di DP

# Caso-E



Ipotesi:  
Portatore di trait  
beta talassemico

GR	6,09
Hb	10,6
MCV	57
MCH	17
HbA2	4,9
HbF	0,9

GR	5,00
Hb	11,8
MCV	75
MCH	25,6
HbA2	2,7
HbF	1

Ipotesi:  
Portatore di trait  
alfa talassemico



Analisi molecolare geni  
beta globinici:  
Eterozigosi Beta<sup>o</sup>cod 39

Analisi molecolare geni alfa  
globinici:  
Eterozigosi del. alfa-3.7

**Counselling genetico:**  
Rischio del 25% di feto con doppia  
eterozigosi Beta<sup>o</sup>cod 39 e delez. Alfa-3.7

NO Percorso di DP!!!!

# Caso-F

**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
alfa talassemico

GR 5.00

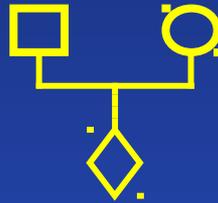
Hb 11,8

MCV 75

MCH 25,6

HbA2 2,7

HbF 1



GR 5.00

Hb 11,8

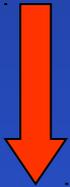
MCV 75

MCH 25,6

HbA2 2,7

HbF 1

**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
alfa talassemico



**Analisi molecolare geni alfa  
globinici:**  
Eterozigosi del. alfa-3.7



**Analisi molecolare geni alfa  
globinici:**  
Eterozigosi del. alfa-3.7

**Counselling genetico:**

Rischio del 25% di feto con omozigosi  
per la del. alfa-3.7

# Genotipi e fenotipi nella $\alpha$ -talassemia

<b>Assetto genomico</b>						
<b>N. Geni <math>\alpha</math></b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Stato</b>	omozigote wild-type	eterozigote <u>1 allele wild type</u>	eterozigote <u>1 allele wild type</u>	omozigote <u>nessun allele wild-type!</u>	eterozigote <u>nessun allele wild-type!</u>	omozigote
<b>Anemia</b>	nessuna	lieve	lieve	lieve	grave HbH	letale

Alcune forme di  $\alpha$ -talassemia sono dovute all'instabilita' dell'mRNA dell'emoglobina: mutazione nel sito di poliadenilazione, perdita del stop...

# Caso-F

**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
alfa talassemico

GR 5.00

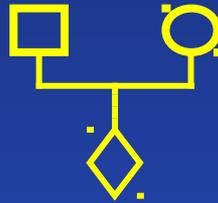
Hb 11,8

MCV 75

MCH 25,6

HbA2 2,7

HbF 1



GR 5.00

Hb 11,8

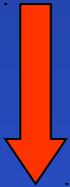
MCV 75

MCH 25,6

HbA2 2,7

HbF 1

**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
alfa talassemico



**Analisi molecolare geni alfa  
globinici:**  
Eterozigosi del. alfa-3.7

**Analisi molecolare geni alfa  
globinici:**  
Eterozigosi del. alfa-3.7

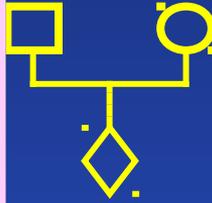
**Counselling genetico:**  
Rischio del 25% di feto con  
omozigosi per la del. alfa-3.7

**NO**  
Percorso di DP!!

# Caso-G

**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
alfa talassemico

GR	6,39
Hb	13,6
MCV	66
MCH	20,3
HbA2	2,2
HbF	0,4



GR	5,93
Hb	13,6
MCV	67
MCH	21,9
HbA2	2,7
HbF	1,4

**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
alfa talassemico



**Analisi molecolare geni alfa  
globinici:**  
Eterozigosi delezione --FIL



**Analisi molecolare geni alfa  
globinici:**  
Eterozigosi delezione --FIL

**Counselling genetico:**  
Rischio del 25% di feto con omozigosi  
per la del. --FIL

# Genotipi e fenotipi nella $\alpha$ -talassemia

<b>Assetto genomico</b>						
<b>N.Geni <math>\alpha</math></b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Stato</b>	omozigote wild-type	eterozigote <u>1 allele wild type</u>	eterozigote <u>1 allele wild type</u>	omozigote <u>nessun allele wild-type!</u>	eterozigote <u>nessun allele wild-type!</u>	omozigote
<b>Anemia</b>	nessuna	lieve	lieve	lieve	grave HbH	letale

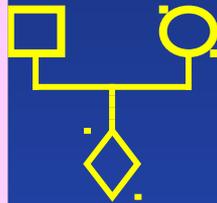


Alcune forme di  $\alpha$ -talassemia sono dovute all'instabilita' dell'mRN dell'emoglobina: mutazione nel sito di poliadenilazione, perdita del stop...

# Caso-G

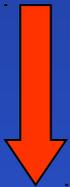
Ipotesi:  
Portatore di trait  
alfa talassemico

GR	6,39
Hb	13,6
MCV	66
MCH	20,3
HbA2	2,2
HbF	0,4



GR	5,93
Hb	13,6
MCV	67
MCH	21,9
HbA2	2,7
HbF	1,4

Ipotesi:  
Portatore di trait  
alfa talassemico



Analisi molecolare geni alfa  
globinici:  
Eterozigosi delezione --FIL



Analisi molecolare geni alfa  
globinici:  
Eterozigosi delezione --FIL

Counselling genetico:  
Rischio del 25% di feto con omozigosi  
per la del. --FIL

SI  
Percorso di DP!!

Table IV. Reasons for presentation of haemoglobin (Hb) H disease.

	%
Anaemia, paleness	18.8
Haemolytic crisis	8.3
Neonatal anaemia	3.5
Asthenia	1.7
Jaundice	1.2
Hb H disease family history	1.2
Aplastic crisis	0.6
Cardiac murmur	0.6
Incidental	59.7

Table II. Haematological data of haemoglobin H disease patients, according to  $\alpha$ -globin genotype.

	Children ( $\leq 18$ years)		P-value	Adults ( $> 18$ years)		P-value
	Deletional (50)	Non-deletional (14)		Deletional (159)	Non-deletional (28)	
Haemoglobin (g/l)	91 $\pm$ 8.0	86 $\pm$ 7.0	<0.001	103 $\pm$ 8.0	90 $\pm$ 7.0	<0.001
Mean corpuscular volume (fl)	56 $\pm$ 4	60 $\pm$ 4	<0.001	61 $\pm$ 4	64 $\pm$ 6	<0.001
Mean corpuscular haemoglobin (pg)	18 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	0.1	19 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	0.3
Reticulocytes (%)	2.9 $\pm$ 1.3	4.5 $\pm$ 2.0	<0.001	3.5 $\pm$ 1.4	4.6 $\pm$ 1.4	0.04
Unconjugated bilirubin ( $\mu$ mol/l)	13.7 $\pm$ 10.3	18.8 $\pm$ 8.6	0.09	20.5 $\pm$ 17.1	30.8 $\pm$ 17.1	0.002

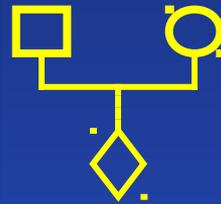
© 2006 The Authors

# HbH e HbBart disease

# Caso-H

Ipotesi:  
Portatore di trait  
alfa talassemico

GR	6,39
Hb	13,6
MCV	66
MCH	20,3
HbA2	2,2
HbF	0,4



GR	5,50
Hb	11,8
MCV	75
MCH	25,6
HbA2	2,7
HbF	1

Ipotesi:  
Portatore di trait  
alfa talassemico



Analisi molecolare geni alfa  
globinici:  
Eterozigosi delezione --FIL



Analisi molecolare geni alfa  
globinici:  
Eterozigosi del. alfa-3.7

**Counselling genetico:**  
Rischio del 25% di feto con eterozigosi  
composta per le del.-alfa 3.7/--FIL

Forse....  
Percorso di DP

# Caso-I

**Ipotesi:  
Portatore di HbS**

GR 6,39

Hb 13,6

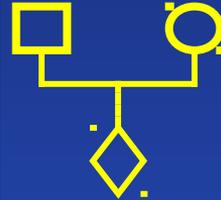
MCV 82

MCH 27

HbA2 3,2

HbF 0,4

HbS 40



GR 6,39

Hb 13,6

MCV 83

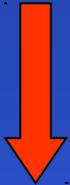
MCH 28

HbA2 3,3

HbF 0,4

HbS 38

**Ipotesi:  
Portatore di HbS**

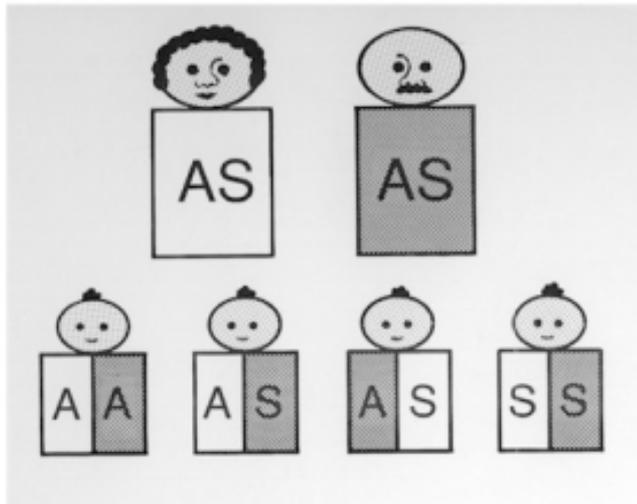


**Analisi molecolare geni beta  
globinici:  
Eterozigosi variante HbS**

**Analisi molecolare geni beta  
globinici:  
Eterozigosi variante HbS**

**Counselling genetico:**  
-----

## Genetics

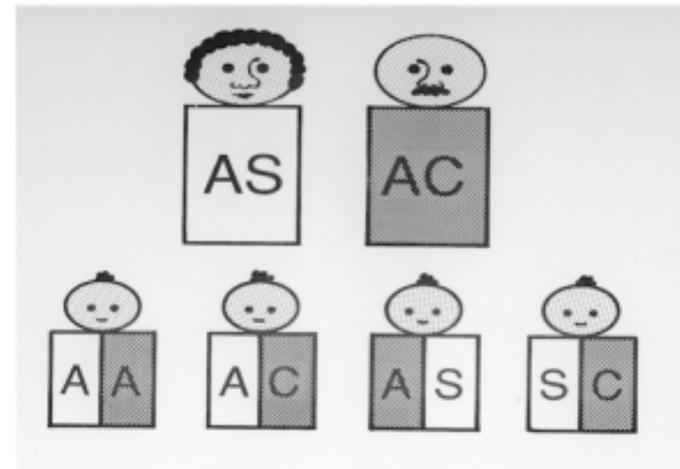


### Sickle Cell Anemia

Sickle Cell Anemia (SS) is an inherited blood disorder (autosomal recessive). Approximately one in 400 black babies are born with Sickle Cell Anemia, and about one in 11 have Sickle Cell Trait (AS).

The two hemoglobin types inherited will determine the shape of the red blood cell (RBC). When both parents have Sickle Cell Trait, there is a 1-in-4 chance (25 percent) the baby will have normal hemoglobin (AA), a 50 percent chance the baby will have Sickle Cell Trait (AS), and a 1-in-4 chance (25 percent) the baby will have Sickle Cell Anemia (SS). These chances remain the same with each pregnancy.

## Sickle Hemoglobin C Disease



Sickle Hemoglobin C (SC Disease) is a milder form of Sickle Cell Disease. The baby has inherited two (2) abnormal hemoglobins, hemoglobin S and hemoglobin C. Approximately one in 1,000 black babies are born with SC Disease. Hemoglobin C Trait (AC) occurs in about one in 40 black babies. If one parent has AS and the other AC, there is a 1-in-4 chance (25 percent) the baby will inherit AA, AS, AC, or SC Disease.

AS and AC are carrier states, not disease conditions.

# Caso-H

Ipotesi:  
Portatore di HbS

GR 6,39

Hb 13,6

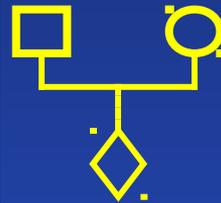
MCV 82

MCH 27

HbA2 3,2

HbF 0,4

HbS 40



GR 6,39

Hb 13,6

MCV 83

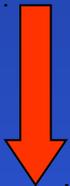
MCH 28

HbA2 3,3

HbF 0,4

HbS 38

Ipotesi:  
Portatore di HbS



Analisi molecolare geni beta  
globinici:  
Eterozigosi variante HbS

Analisi molecolare geni beta  
globinici:  
Eterozigosi variante HbS

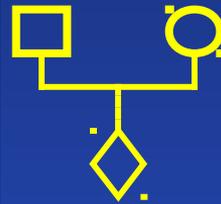
Counselling genetico:  
**Rischio di feto affetto da  
Drepanocitosi: 25%**

SI  
Percorso di DP!!

# Caso-H

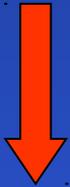
**Ipotesi:**  
Portatore di trait  
beta talassemico

GR	6,39
Hb	13,6
MCV	60
MCH	21
HbA2	5,2
HbF	2,4



GR	6,39
Hb	13,6
MCV	83
MCH	28
HbA2	3,3
HbF	0,4
HbS	38

**Ipotesi:**  
Portatore di HbS



**Analisi molecolare geni beta  
globinici:**  
Eterozigosi Beta° cod 39



**Analisi molecolare geni beta  
globinici:**  
Eterozigosi variante HbS

## Counselling genetico:

Rischio del 25% di feto con eterozigosi  
composta per la mutazione Beta°cod39  
e la variante HbS: Microdrepanocitosi

SI  
Percorso di DP!!

## Message to take home.....

L'approccio è per una patologia genetica autosomica-recessiva :  
ciò comporta **un rischio solo se entrambi** i partner hanno alterazioni dell'Hb.

**Epoca preconcezionale**: può essere conveniente fare sempre l' esame completo ad almeno uno dei due partner, in caso di minimo dubbio approfondire l' altro



**In gravidanza** è meglio effettuare precocemente gli esami alla coppia senza attendere la positività della gravida per l'esame del partner

Bisogna **raccordare i tempi** per completare la diagnosi per alterazioni dell'Hb con i momenti utili per le procedure ostetriche connesse alla effettuazione dei prelievi per D.P.; **inizio: 11<sup>a</sup> , fine: 22<sup>a</sup>** settimana gestazionale

Importante la concordanza di tutti i dati in nostro possesso (dati familiari, accertamenti ematologici, cromatografia, molecolare)  
Attenzione errori di laboratorio!!!!!!!!!!



*Grazie per l'attenzione .....*



# CONSULENZA GENETICA POSTNATALE

## Tipologie di consulenza principali

### 1- Consulenza genetica preconcezionale:

- ❖ coppie in cui entrambi i partner sono portatori di trait beta talassemico
- ❖ coppie in cui vi è il sospetto per uno/entrambi i partner di trait “talassemico” o di difetto emoglobinico
- ❖ coppie in cui uno dei due partner è affetto da T. Major (coppie PMA)

### 2- Consulenza genetica per inquadramento diagnostico:

- ❖ epoca infantile (soprattutto bambini adottati) nei quali agli accertamenti ematologici emerge il sospetto di anemia su base genetica

# CONSULENZA GENETICA PRENATALE

CHI sono i protagonisti?



A- coppie in cui entrambi i partner sono portatori di trait beta

**Situazione più semplice!!!!!!**

**Generalmente giungono precocemente in gravidanza**

**Generalmente sono stati già caratterizzati molecolarmente in epoca prenatale**

**Programmazione della diagnostica prenatale molecolare (spesso contestualmente alla diagnostica citogenetica)**

# CONSULENZA GENETICA PRENATALE

CHI sono i protagonisti?



B-coppie in cui vi è il sospetto per uno/entrambi i partner di trait “talassemico” o di emoglobinopatia

→ INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO E STIMA DEL RISCHIO

RIPRODUTTIVO-PROGRAMMAZIONE DELLA DIAGNOSI PRENATALE

## Possibili complicazioni:

- ❖ Epoca tardiva di richiesta consulenza (!!!!!!!!!!!Importanza di fare informazione presso ginecologi del territorio)
- ❖ Parametri ematologici borderline per cui i difetti emoglobinici non sono facilmente sospettabili

## Coppie di extracomunitari:

- ❖ Epoca tardiva di richiesta consulenza
- ❖ Difetti emoglobinici non sovrapponibili a quelli del nostro territorio
- ❖ Cultura diversa: difficoltà nel far comprendere il quadro clinico della patologia e pertanto nel proporre una diagnostica prenatale specifica (ruolo dei mediatori culturali)