

<b>ITALIAN</b> <b>Cord</b> <b>Blood</b> <b>Network</b>	<b>LINEE GUIDA SULLO SCREENING DELLE</b> <b>EMOGLOBINOPATIE</b>	Rev. 0 del 02/12/2016
---	--	--------------------------

## INTRODUZIONE

La donazione del sangue cordonale del neonato, e quindi la sua crioconservazione nelle banche pubbliche, deve rispondere a una serie di condizioni tra cui l'assenza di difetti genetici importanti dell'emoglobina. Pertanto, le unità di sangue cordonale nel percorso di idoneità devono essere in tal senso testate, come previsto dagli standard IBMDR ("Italian Bone Marrow Donor Registry") (1), dagli standard internazionali NetCord-FACT (Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy") (2), dalla rete delle Banche del Sangue di Cordone Ombelicale Italiane (ITCBN, "ItalianCord BloodNetwork") e dalle linee guida per l'accREDITAMENTO delle banche di sangue da cordonale ombelicale (3).

La banca che gestisce il sangue cordonale è tenuta a promuovere esami per la ricerca di emoglobinopatie per accertare in primo luogo la presenza di HbS e dei suoi composti con difetti  $\beta$ -talassemici o varianti dei geni globinici clinicamente significativi (ad esempio presenza di un doppio difetto HbS/beta talassemia o HbS/altra variante) (4,5). Deve inoltre essere accertata la presenza di  $\beta$ -talassemie allo stato omozigote o di composti  $\beta$ -talassemici. Tutte queste condizioni, se presenti, rendono l'unità di sangue raccolta non eleggibile per il trapianto. Altri difetti allo stato omozigote o eterozigote evidenziati dall'esame di screening dovranno comunque essere documentati. Le presenti indicazioni per la corretta esecuzione dello screening per le emoglobinopatie su sangue cordonale sono ricavate dalle recenti raccomandazioni congiunte della Società Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie (SITE), della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC) e dell'Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP) (6).

## FASE PRE-ANALITICA

### Tipo di campione

Il campione da esaminare viene prelevato direttamente dalle sacche di raccolta dell'unità cordonale e trasferito in provetta contenente EDTA-K3 o EDTA-K2 come anticoagulante in quanto tale molecola è ritenuta ottimale per gli esami emocromocitometrici, cromatografici ed elettroforetici, ma soprattutto nel caso in cui si utilizzi la stessa provetta anche per l'estrazione del DNA destinato all'analisi molecolare. L'eventuale utilizzo di litio eparina può essere considerato di seconda scelta, risultando sufficientemente idoneo solo per alcuni sistemi cromatografici.

Il sangue deve essere preferibilmente non trattato con agenti conservanti o congelato. L'utilizzo di campioni congelati è consentito solo per le unità bancate prima dell'implementazione dello screening.

- ***E' raccomandata la conservazione del sangue cordonale in EDTA a 4 °C e l'esecuzione degli esami di 1° livello entro un periodo massimo di 10 giorni.***
- ***Si sconsiglia l'uso di sangue congelato per la definizione dell'assetto emoglobinico.***
- ***Si sconsiglia l'uso della carta di Guthrie***
- ***Per eventuali esami molecolari successivi è possibile conservare il sangue intero per più anni a -80 °C.***
- ***L'esecuzione dello screening al momento del ricevimento del campione garantisce inoltre di evitare ritardi nel rilascio dell'unità qualora siano necessari approfondimenti diagnostici di 2° livello.***

### Informazioni Pre- Test

<b>ITALIAN</b> <b>Cord</b> <b>Blood</b> <b>Network</b>	<b>LINEE GUIDA SULLO SCREENING DELLE EMOGLOBINOPATIE</b>	Rev. 0 del 02/12/2016
---	--	--------------------------

È auspicabile che al laboratorio che segue le indagini di 1° e/o 2° livello vengano fornite le notizie anamnestiche riguardanti il neonato e i genitori riportate nella sottostante tabella.

Tabella 1 Notizie essenziali su neonato e genitori

- Età gestazionale in settimane
- Genere
- Presenza di ittero neonatale
- Gemellarità
- Origini/etnia del ceppo familiare di entrambi i genitori
- Eventuali esami per le emoglobinopatie eseguiti dai genitori
- Consanguineità dei genitori

Informativa per genitori e consenso informato dedicato

Trattandosi di un test genetico è opportuno che i genitori siano informati sulle finalità e caratteristiche degli esami eseguiti dal laboratorio e dell'eventualità di dover proseguire le indagini con esami molecolari. (Vedi Informativa di cui al DM 2 novembre 2015 e smi).

**FASE ANALITICA**

1° livello diagnostico: assetto emoglobinico.

Il percorso analitico che porta alla diagnosi di 1° livello dei difetti emoglobinici alla nascita si basa principalmente sulla definizione dell'assetto emoglobinico ottenuto con una o più tecniche separative, per una valutazione quali-quantitativa ottimale delle frazioni emoglobiniche fisiologiche o patologiche. Ai vari sistemi analitici commerciali è richiesta una risoluzione ottimale nella separazione quali-quantitativa di HbF e di HbA, anche in considerazione degli elevati valori di HbF tipici del periodo neonatale. Attualmente HPLC ed elettroforesi capillare (CE) sono le metodiche che meglio rispondono alle esigenze analitiche per la definizione dell'assetto emoglobinico alla nascita.

Come per ogni altra indagine di laboratorio l'esecuzione ad ogni seduta analitica del Controllo Interno di qualità (CQI) è indispensabile per la valutazione della performance strumentale e per monitorare l'imprecisione del dato analitico. Poiché al momento non sono disponibili materiali di controllo dedicati, pur con tutti i limiti già menzionati, si può ricorrere all'utilizzo, in aggiunta ai controlli abitualmente eseguiti, di aliquote di campioni di sangue cordonale conservate a -20°C per non più di un mese, avendo cura di selezionare campioni non ambigui o border-line. La partecipazione a un sistema di VEQ nel settore delle emoglobinopatie è non solo raccomandabile, ma doverosa dato l'alto significato diagnostico degli esami e l'alto valore predittivo. Nel caso specifico delle emoglobinopatie alla nascita, una VEQ può assumere grande rilievo anche nella verifica dell'appropriatezza degli intervalli di riferimento adottati.

***Per la determinazione quali-quantitativa dell'assetto emoglobinico sono raccomandati sistemi in HPLC o in CE, che dimostrino una buona risoluzione nella separazione di HbF e HbA.***

<b>ITALIAN</b> <b>Cord</b> <b>Blood</b> <b>Network</b>	<b>LINEE GUIDA SULLO SCREENING DELLE</b> <b>EMOGLOBINOPATIE</b>	Rev. 0 del 02/12/2016
---	--	--------------------------

*Le varianti più comuni rilevate dai sistemi separativi in uso, così come eventuali difetti talassemici sospettati dalla ridotta o assente HbA devono essere confermati con un secondo esame specifico e dedicato.*

*È sconsigliato l'uso di metodi non dedicati come isoelettrofocusing, elettroforesi su agarosio, spettrometria di massa, cromatografia a bassa pressione (LPC)*

*È raccomandata l'esecuzione di un adeguato CQI per la valutazione nel tempo dell'imprecisione analitica e la partecipazione a programmi di VEQspecifici per la diagnosi delle emoglobinopatie alla nascita*

### 2° livello diagnostico

Le presenti raccomandazioni dedicate alla diagnostica di 1° livello, non entrano nel merito degli accertamenti diagnostici di 2° livello.

*Qualora il laboratorio che esegue il test di 1° livello non sia in grado di effettuare il 2° livello, è raccomandato che venga definito dalla banca un percorso per l'invio del campione in un centro specialistico.*

### **FASE POST-ANALITICA**

#### 1° livello diagnostico: assetto emoglobinico

Gli esami di 1° livello su sangue cordonale consentono di poter descrivere i fenotipi emoglobinici associati alle più importanti condizioni cliniche. Nella Tabella 2 sono riportate indicazioni degli standard NetCord Fact, relativamente all'assetto emoglobinico del campione.

Tabella 2. Assetto emoglobinico: indicazioni degli standard NetCord Fact

CONDIZIONE	BANCAGGIO	SEGNALAZIONE
Assenza di difetti globinici	SI	-
Presenza di un difetto Beta Talassemico eterozigote	SI	SI
Concomitanza di un difetto alfa e di un difetto beta talassemico	SI	SI
Presenza di varianti Hb allo stato eterozigote	SI	SI
Presenza di varianti Hb allo stato omozigote	NO	-
Doppio difetto beta talassemico o beta talassemia allo stato omozigote	NO	-
Presenza di Hb varianti e concomitante difetto beta talassemico	NO	-

Si ritiene che gli esami di 1° livello, prevalentemente l'assetto emoglobinico, consentano di definire "altamente probabile" la condizione di assenza di difetti globinici quando la quantità relativa di HbA risulti >22%. Con valori di HbA < 22% la presenza di una β-talassemia "silente" non può essere esclusa. Tuttavia con HbA > 17% la condizione di assenza di difetti globinici è probabile almeno al 95%. HbA<sub>2</sub> alla nascita non è di solito quantificabile e comunque non è non significativa; qualora però risultasse in quantità >0,5% in combinazione con HbA diminuita, accertata l'età gestazionale, questo potrebbe far sospettare una β-

<b>ITALIAN</b> <b>C</b> ord <b>B</b> lood <b>N</b> etwork	<b>LINEE GUIDA SULLO SCREENING DELLE</b> <b>EMOGLOBINOPATIE</b>	Rev. 0 del 02/12/2016
--	--	--------------------------

talassemia eterozigote. Quando invece HbA risultasse aumentata rispetto ai valori medi di riferimento, occorrerà verificare un'eventuale contaminazione con sangue materno.

In Tabella 3 è riportata una sintesi operativa dell'interpretazione e una proposta di refertazione dell'assetto emoglobinico.

Tabella 3. Livelli decisionali e interpretazione dell'assetto emoglobinico.

1° livello(screening)		2° livello (molecolare)	INTERPRETAZIONE	Note referto
HbA	Varianti Hb			
HbA ≥22%	Non rilevate	NO	Assenza di difetti emoglobinici	Assetto emoglobinico compatibile con lo stato fisiologico (assenza di difetti globinici)
22% <HbA>17%	Non rilevate	NO	Assenza di difetti emoglobinici (95% confidenza)	
10% <HbA≤ 17%	Non rilevate	NO	Un eventuale trait beta talassemico non può essere escluso.	Non è stata evidenziata nessuna delle più comuni varianti emoglobiniche, tuttavia l'assetto emoglobinico non consente di escludere la presenza di "trait" talassemico. Approfondimenti di II livello necessari solo in presenza di anamnesi familiare positiva.
8% <HbA≤10%	Non rilevate	SI	Per escludere o confermare un eventuale trait beta talassemico	Non è stata evidenziata nessuna delle più comuni varianti emoglobiniche, ma l'assetto emoglobinico è compatibile con la presenza di un difetto talassemico. Necessari approfondimenti di 2° livello.
5% ≥HbA≤ 8%	Non rilevate	SI	Possibile beta talassemia eterozigote o doppio difetto beta talassemico	
HbA<5% o assente	Non rilevate	SI	Condizione assimilabile ad un composto beta talassemico o ad uno stato omozigote	
HbA≥5%	Presenza di variante Hb	SI	Per la caratterizzazione della variante osservata allo stato eterozigote	Presenza di variante emoglobinica presumibilmente appartenente alle catene .. (alfa/beta) allo stato eterozigote. Necessari approfondimenti di 2° livello

HbA<5% o assente	Presenza di variante Hb	SI	Per la caratterizzazione della variante osservata allo stato omozigote o presente in un composto eterozigote	Presenza di variante emoglobinica presumibilmente appartenente alle catene .. (alfa/beta)allo stato omozigote o presente in un composto eterozigote. Necessari approfondimenti di 2° livello
HbA>30%	Non rilevate	-	Possibile contaminazione da sangue materno	Escludere contaminazione da sangue materno

<b>ITALIAN</b> <b>Cord</b> <b>Blood</b> <b>Network</b>	<b>LINEE GUIDA SULLO SCREENING DELLE EMOGLOBINOPATIE</b>	Rev. 0 del 02/12/2016
---	--	--------------------------

***Si raccomanda di eseguire approfondimenti di II livello per escludere la presenza di un tratto talassemico tutte le volte che ci sia un anamnesi familiare positiva, indipendentemente dai valori di HbA rilevati.***

***Poiché esiste una zona grigia (10% <HbA ≤ 17%) in cui il test di I livello è poco informativo rispetto alla presenza di un eventuale tratto talassemico e poiché questa condizione non esclude il bancaggio del campione, la decisione di effettuare in questi casi il test di II livello e se effettuarlo al bancaggio o al rilascio, viene demandata alle singole banche. In questi casi si può anche valutare l'ipotesi di un follow-up dopo i 6 mesi di età, se questa possibilità è stata comunicata e sottoscritta al momento del consenso iniziale.***

***Si raccomanda di refertare gli esami di 1° livello corredando i risultati con opportune conclusioni e indicando, quando opportuno, la necessità di eseguire accertamenti diagnostici di 2° livello.***

***Si raccomanda che la banca indirizzi i genitori ad un adeguato percorso di consulenza genetica, qualora i test di II livello forniscano un risultato positivo per la presenza di una emoglobinopatia.***

#### BIBLIOGRAFIA

1. [http://ibmdr.galliera.it/news\\_eventi/standard-ibmdr-2013-1](http://ibmdr.galliera.it/news_eventi/standard-ibmdr-2013-1) e successive revisioni.
2. <http://www.factwebsite.org/Standards/>.
3. <http://www.centronazionalesangue.it/pagine/sanguecordonale>, Gazzetta Ufficiale, Supp. ord. n. 124 del 17.5.2011.
4. THJ Huisman. Combination of beta chain abnormal hemoglobins with each other or with beta thalassemia determinants with known mutations: influence on phenotype. Clin Chem 1997;43(10):1850-6.
5. Bain B. Hemoglobinopathy diagnosis. Blackwell Science, Oxford, 2006.
6. G. Ivaldi, G. Barberio, V. Caruso, A. Caldini, A. Mosca, G. Russo, D. Leone, R. Mancini, M. Zaninotto, F. A. Zanolli, P. C. Giordano. Raccomandazioni per la diagnosi neonatale delle emoglobinopatie. biochimica clinica, 2015, vol. 39, n. 2, pag 116 -134.