

DALLA DIAGNOSI DI PORTATRICE DI EMOFILIA ALLA DIAGNOSI PRENATALE



AICE
(Associazione Italiana Centri Emofilia)

**DALLA DIAGNOSI
DI PORTATRICE DI EMOFILIA
ALLA DIAGNOSI PRENATALE**



AICE
(Associazione Italiana Centri Emofilia)

a cura di:

Dr.ssa Flora Peyvandi

Dr.ssa Liliana Tagliabue

Dr.ssa Marzia Menegatti

Dr.ssa Isabella Garagiola

Dr.ssa Elena Santagostino

Centro Emofilia e Trombosi Angelo Bianchi Bonomi
IRCCS Ospedale Maggiore - Milano

(Revisionato dalla Commissione per gli studi di Genetica
e Biologia molecolare dell'AICE)

*Ringraziamo la Dott.ssa Angiola Rocino
per il suo prezioso contributo*

■ DALLA DIAGNOSI DI PORTATRICE DI EMOFILIA ALLA DIAGNOSI PRENATALE ■

Scopo di questo libretto è guidare la donna ed i suoi familiari ad una migliore comprensione di cosa vuol dire essere portatrice di emofilia

Capitolo I:

- **Introduzione all'emofilia**, essenziali cenni circa le modalità di trasmissione, le manifestazioni cliniche, le attuali possibilità di trattamento, le complicità correlate al trattamento e le prospettive terapeutiche future _____ pag. 6
- **La portatrice di emofilia**, si cerca di chiarire come è possibile identificare la portatrice di emofilia e quali sono i dati necessari ed indispensabili per una corretta diagnosi _____ pag. 13

Capitolo II:

- **Diagnosi di Portatrice**, sono riportate le tecniche utilizzate per la diagnosi biochimica e molecolare diretta e indiretta _____ pag. 15

Capitolo III:

- **Diagnosi Prenatale**, è chiarito come si pratica la diagnosi prenatale, quali sono le tecniche utilizzate e i tempi necessari ad effettuarla, dal prelievo alla consegna del referto _____ pag. 22

Capitolo IV:

- **Malattie rare della coagulazione**, essenziali cenni circa le modalità di trasmissione e la diagnosi _____ pag. 26

■ Capitolo I ■ INTRODUZIONE ALL'EMOFILIA

L'emofilia è una malattia ereditaria causata da un difetto della coagulazione del sangue. La coagulazione è un processo complesso che comporta l'attivazione di diverse proteine del plasma secondo una reazione a catena. Chi è affetto da emofilia ha un'alterazione di questo processo e presenta sintomi emorragici. Sia l'emofilia A che l'emofilia B sono causate dall'alterazione di un gene che guida la produzione, rispettivamente, del fattore VIII (FVIII) e del fattore IX (FIX).

Entrambi i geni sono localizzati sul cromosoma X ed è per questo motivo che l'emofilia viene definita come una **malattia X-linked**. Il cromosoma X è uno dei due cromosomi che determinano il sesso: le femmine possiedono due cromosomi X (cariotipo 46,XX), mentre i maschi possiedono un cromosoma X, ereditato dalla madre e un cromosoma Y, ereditato dal padre (cariotipo 46,XY).

L'emofilia, come la maggior parte delle altre alterazioni dovute a mutazioni di geni presenti sul cromosoma X viene trasmessa come **carattere recessivo** e **si manifesta generalmente nei maschi**, determinando un deficit dell'attività coagulante del FVIII o FIX, **mentre le femmine**, che possiedono due cromosomi X, non manifestano la malattia ma **possono esserne portatrici e trasmetterla ai figli**.

Il livello di attività coagulante di FVIII o FIX consente di definire la gravità della malattia: valori di FVIII/FIX minori dell'1% determinano un'emofilia grave; valori compresi tra l'1 e il 5% definiscono l'emofilia moderata; in caso di livelli superiori al 5%, l'emofilia viene definita lieve. L'entità del deficit è simile in tutti i maschi emofilici di una data famiglia poiché esso dipende dal tipo di alterazione genica ereditato.



XY



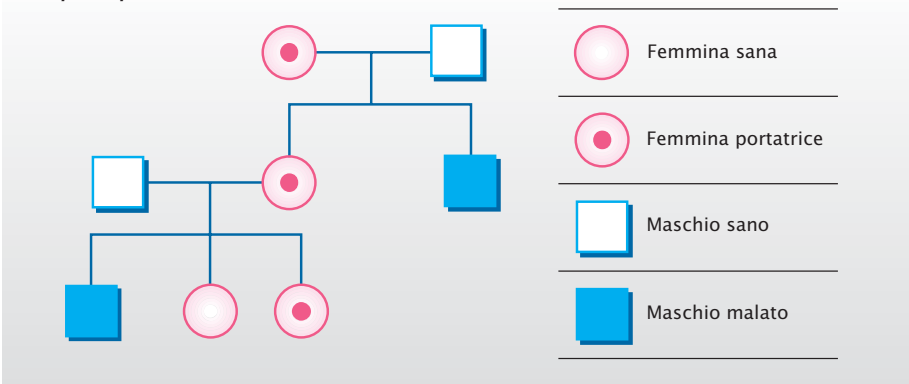
XX

La frequenza dei casi di emofilia è 1:10.000 per l'emofilia A e 1:60.000 per l'emofilia B.

L'emofilia può essere familiare o sporadica:

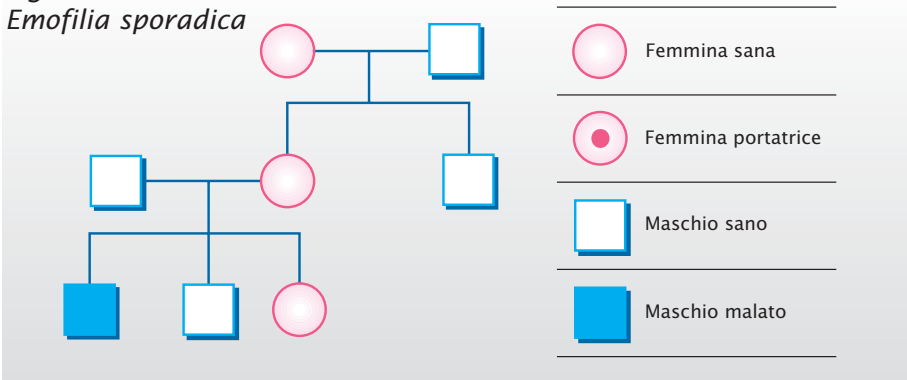
Emofilia familiare: quando in una stessa famiglia sono presenti almeno due soggetti emofilici (*vedi figura 1*).

Figura 1
Emofilia familiare



Emofilia sporadica: quando nella famiglia è presente un unico caso di emofilia. La mutazione che provoca la malattia è, in questo caso, definita “*de novo*” poiché non è rintracciabile in più generazioni dell'albero genealogico (vedi figura 2). La frequenza dei casi sporadici è del 30% circa.

Figura 2
Emofilia sporadica



► Come si manifesta l'emofilia?

Dal punto di vista clinico, l'emofilia A e B si manifestano con sintomi emorragici del tutto simili ma di maggiore o minore frequenza e gravità, a seconda della severità del difetto coagulativo.

Gli emofilici gravi presentano emorragie frequenti e spesso spontanee; gli emofilici moderati manifestano sanguinamenti prolungati in genere dopo traumi, anche modesti, mentre i pazienti lievi sanguinano solo in seguito a gravi traumi o interventi chirurgici.

Le emorragie possono verificarsi in varie sedi. Tuttavia, **la manifestazione più frequente e tipica dell'emofilia è l'emorragia intrarticolare o emartro**. Gli emartri cominciano a manifestarsi sin dalla prima infanzia, generalmente quando il

bambino comincia a gattonare e a camminare e se divengono ricorrenti, possono danneggiare le articolazioni sino a determinare una malattia articolare cronica e irreversibile.

L'artropatia cronica è la principale causa di disabilità negli emofilici non adeguatamente trattati: triste realtà dei decenni passati che oggi può essere efficacemente prevenuta. Anche gli ematomi muscolari sono piuttosto comuni e spesso successivi a traumi lievi o del tutto inapparenti.

Come si cura l'emofilia?

Cardine dell'attuale terapia dell'emofilia è il trattamento sostitutivo che si basa sulla somministrazione endovenosa di concentrati di FVIII o FIX. Questo non solo consente di arrestare le emorragie ma anche di prevenirle, in caso di traumi od interventi chirurgici. Un importante progresso terapeutico si è compiuto, nell'ultimo decennio, con la disponibilità dei concentrati di FVIII o FIX ottenuti mediante la tecnologia del DNA ricombinante. Tali prodotti, che non derivano dal plasma umano, offrono ampie garanzie di sicurezza rispetto al rischio di infezioni, soprattutto di origine virale, post-trasfusionali.

Per una rapida risoluzione delle emorragie è estremamente importante che esse siano riconosciute il più precocemente possibile in modo da poter attuare un tempestivo trattamento. Ciò consente anche un minor rischio di complicanze, favorisce l'integrazione sociale e garantisce un elevato livello di autonomia.

Inoltre, al trattamento delle emorragie al bisogno, sta attualmente, sempre più, affiancandosi il **trattamento profilattico**. Questo si basa sulla somministrazione di dosaggi di FVIII o FIX in 2-3 infusioni settimanali, tali da consentire di mantenere il livello di FVIII o FIX plasmatico sempre superiore all'1-2 %, rendendo più lieve il difetto coagulativo.

La profilassi rappresenta una strategia di prevenzione primaria delle manifestazioni emorragiche dell'emofilia. Non solo consente di ridurre drasticamente la frequenza degli episodi emorragici, ma si è dimostrata altamente efficace nel preservare le articolazioni dalle lesioni infiammatorie e degenerative tipiche dell'emofilia, soprattutto se viene intrapresa molto precocemente e cioè sin dalla comparsa dei primi episodi di emartro.

Tuttavia, la profilassi, che deve essere protratta fino all'adolescenza richiede notevole impegno, sia sul piano pratico sia psicologico, e grande costanza, tanto al paziente quanto ai familiari. D'altro canto, se i problemi iniziali vengono correttamente affrontati e superati, essa produce vantaggi notevoli e di grande impatto sulle potenzialità fisiche, sociali e professionali del paziente, permettendo di assumere uno stile di vita del tutto normale.

Che cos'è l'inibitore?

Lo sviluppo di anticorpi inibitori, che neutralizzano il FVIII o FIX infuso, **rappresenta, a tutt'oggi, la principale complicanza della terapia dell'emofilia**. Rendendo il trattamento sostitutivo del tutto inefficace, gli inibitori modificano radicalmente le modalità di trattamento degli episodi emorragici e richiedono l'adozione di differenti provvedimenti terapeutici. **L'inibitore compare nel 25-30% degli emofilici A gravi**, generalmente entro le prime 10-20 infusioni di fattore VIII. Tuttavia, il rischio si riduce progressivamente, con l'aumentare del numero delle esposizioni, fino a divenire pressoché nullo oltre le prime 50 infusioni. Inoltre, più di un terzo degli inibitori è di tipo transitorio, non raggiunge livelli elevati e scompare spontaneamente con la prosecuzione del trattamento. Questi inibitori non costituiscono, pertanto, un grosso problema terapeutico, perchè il paziente può essere efficacemente trattato

utilizzando dosi più elevate di FVIII. Altri pazienti mostrano, invece, una vivace risposta anticorpale contro il FVIII e presentano alti livelli d'inibitore circolante. In questi casi il trattamento delle emorragie è più complicato ed è generalmente necessario, per arrestarle, ricorrere a prodotti alternativi al FVIII, plasmaderivati o ricombinanti.

L'obiettivo terapeutico principale nei bambini che sviluppano l'inibitore ad alto titolo è pertanto l'induzione dell'immunotolleranza con graduale spegnimento della risposta anticorpale, sino alla definitiva scomparsa dell'inibitore. Tale risultato viene raggiunto in circa il 70-80% dei casi mediante la somministrazione di FVIII ad alte dosi, quotidianamente o a giorni alterni, per almeno 6 mesi e spesso sino a 12-18 mesi complessivi. Una volta effettuato con successo quest'impegnativo trattamento, è poi possibile proseguire la terapia con FVIII a dosi più basse, attuando un regime di profilassi.

Quali possono essere i futuri progressi nella cura dell'emofilia?

Le tecniche di biologia molecolare applicate all'emofilia aprono uno scenario di prospettive terapeutiche innovative che sono attualmente oggetto di intensa ricerca. Ad esempio, la tecnologia che ha già consentito di sviluppare i concentrati di FVIII e FIX ricombinante consente di manipolare il gene del FVIII in modo da ottenere la sintesi di proteine ricombinanti modificate aventi una più lunga "emi-vita" (cioè una più lunga permanenza in circolo) o una minore immunogenicità (capacità di evocare lo sviluppo d'inibitori) o minore antigenicità (capacità di reagire con l'inibitore). E' perciò prevedibile che si rendano in futuro disponibili prodotti ricombinanti da somministrare meno frequentemente o che comportino un minor rischio di sviluppo d'inibitore o dotati di maggiore efficacia, anche in presenza di inibitore.

Inoltre, le aspettative per una cura definitiva dell'emofilia sono, già ai giorni nostri, nutrite dai rapidi progressi compiuti nel

campo della terapia genica. **L'emofilia costituisce**, tra le malattie genetiche, **l'ideale candidata ad un approccio terapeutico di terapia genica** suscitando l'interesse dell'intera comunità scientifica che, negli sforzi sinora compiuti, è stata ampiamente supportata da ingenti investimenti per la ricerca in questo specifico settore.

Il nuovo millennio ha già assistito all'avvio dei primi studi clinici in pazienti con emofilia A e B. I risultati preliminari, pur non completamente soddisfacenti, poiché mostrano un'efficacia solo parziale e transitoria con livelli plasmatici di FVIII o FIX non ancora sufficienti a prevenire efficacemente la comparsa di eventi emorragici, sono comunque incoraggianti e promettenti. Tuttavia, bisogna considerare che i tempi di sviluppo ed applicazione di questo nuovo approccio terapeutico saranno necessariamente lunghi poiché l'osservazione clinica dovrà essere attenta e protratta nel tempo per consentire di valutare tutti gli aspetti di sicurezza e i possibili effetti collaterali legati ad un tale tipo di terapia.

■ LA PORTATRICE DI EMOFILIA ■

L'emofilia è una malattia X-linked in cui il gene del FVIII o FIX responsabile della malattia è localizzato sul cromosoma X. La maggior parte delle mutazioni presenti sul cromosoma X sono trasmesse come carattere recessivo. Tali malattie si manifestano in genere nei maschi che possiedono un solo cromosoma X, mentre le femmine possedendo due cromosomi X (XX) possono essere portatrici.

► Chi è la portatrice di emofilia?

La portatrice di emofilia A o B è una donna in cui uno dei due cromosomi X presenta un'alterazione nel gene del FVIII o FIX. Tale alterazione, che è causa dell'emofilia, può essere trasmessa al figlio maschio in caso riceva dalla madre il cromosoma X portatore del gene alterato.

La portatrice può essere:

OBBLIGATA:

- **figlia di un paziente emofilico**
- **madre di più figli emofilici (escluso il caso di gemelli monozigoti, nati cioè dalla stessa cellula uovo)**
- **madre di un figlio emofilico e di una figlia portatrice**
- **madre di un emofilico e con un parente affetto da emofilia nella linea materna**

PROBABILE:

- **madre di un emofilico senza altri familiari affetti da emofilia**
- **donna che, pur non avendo figli affetti, ha un parente emofilico nella linea materna**

► **Qual è la probabilità di una donna portatrice di trasmettere il gene mutato?**

Una donna portatrice di emofilia A o B ha una probabilità pari al 50% di avere figli maschi affetti ed una probabilità del 50% di avere figlie portatrici.

► **Qual è la probabilità di un maschio affetto da emofilia di trasmettere il gene mutato?**

Un maschio affetto da emofilia A o B trasmette il proprio gene alterato alle figlie femmine, che sono quindi portatrici obbligate, mentre i figli maschi sono certamente sani poiché non ricevono dal padre, bensì dalla madre, il proprio unico cromosoma X.

■ Capitolo II ■ DIAGNOSI DI PORTATRICE

Per un'accurata e completa diagnosi di portatrice è necessario disporre di alcune importanti informazioni circa la storia familiare di emofilia, la storia emorragica di eventuali familiari affetti ed inoltre disporre di dati clinici e di laboratorio.

Tali informazioni possono essere raccolte attraverso diverse fasi di un unico percorso diagnostico, ciascuna dotata di una propria importanza ed utilità:

1) Raccolta dei dati anamnestici della famiglia

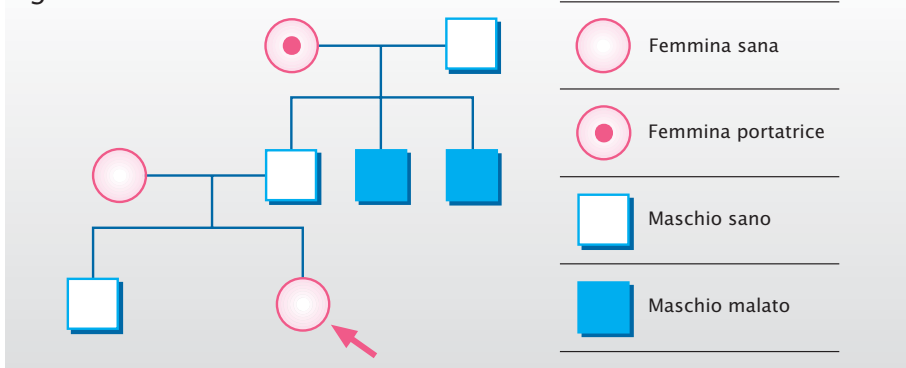
Il primo passo nell'individuazione della sospetta portatrice di emofilia A o B consiste nel disegnare un **dettagliato albero genealogico** e raccogliere informazioni circa la **storia familiare e clinica** di eventuali familiari affetti. In questa fase è utile indagare la presenza, nell'ambito della famiglia, di soggetti che abbiano manifestato o presentino eventi emorragici cercando, nel contempo, di valutarne frequenza e gravità. Occorre, inoltre, accertarsi che non si siano verificati casi di adozione. Utile è anche raccogliere informazioni circa **i risultati di esami di laboratorio** già effettuati dalla sospetta portatrice e dal/i familiari affetti in altre strutture pubbliche o private. Tali esami saranno particolarmente utili in caso includano il **dosaggio dell'attività coagulante del FVIII/FIX e la diagnosi molecolare** (analisi diretta/indiretta).

Tali informazioni vengono generalmente raccolte durante il primo incontro con l'equipe medica del Centro di Riferimento.

Le informazioni anamnestiche servono a:

- **comprendere se si tratta di emofilia familiare o sporadica**
- **stabilire il tipo di emofilia (A o B) e la severità della malattia (grave, moderata o lieve) presente nella famiglia**
- **individuare il possibile stato di portatrice**, il che richiede di proseguire l'indagine
- **escludere lo stato di portatrice** ad esempio, può essere escluso lo stato di portatrice nel caso di una donna in cui una storia familiare di emofilia è presente nella linea paterna ma è figlia di un maschio sano (*vedi figura 3*).
- **scegliere il percorso diagnostico da seguire**. Questo è strettamente dipendente dal tipo e dalla gravità dell'emofilia ed è pertanto opportuno che sia scelto di comune accordo con i medici del Centro di riferimento.

Figura 3



2) Dosaggio del livello coagulante del FVIII o FIX

L'acquisizione di questo dato non costituisce un buon criterio identificativo ma fornisce indicazioni solo probabilistiche e non accurate. Il riscontro di normali livelli plasmatici di FVIII o FIX non esclude infatti lo stato di portatrice. Conoscere

il livello di FVIII o FIX può essere utile solo per programmare un eventuale trattamento terapeutico in previsione di procedure chirurgiche, villocentesi o parto (DDAVP per FVIII <50% e FIX ricombinante per FIX <50%).

3) Diagnosi molecolare di portatrice

Prima dell'avvento delle moderne tecnologie (anni '70) era possibile effettuare la diagnosi di portatrice solo misurando il livello del fattore carente nel plasma.

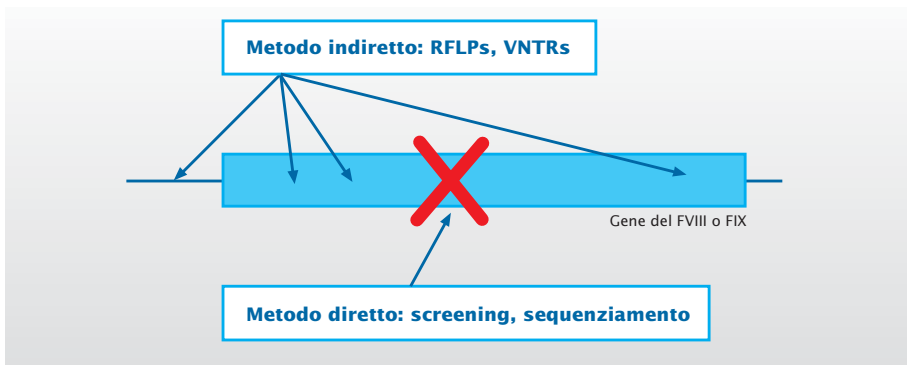
Dagli anni '80, lo sviluppo della biologia molecolare ha permesso di caratterizzare i geni del FVIII e FIX e utilizzare nuove metodiche diagnostiche più approfondite e raffinate che studiano il DNA del paziente.

Attualmente la diagnosi molecolare comporta l'utilizzo di metodiche indirette e/o dirette.

Metodiche indirette: non ricercano direttamente la mutazione responsabile della malattia ma utilizzano marcatori genici associati al gene del FVIII o FIX e localizzati all'interno (intragenic) o nelle vicinanze del gene (extragenici). I marcatori genici (RFLPs o VNTRs) sono delle variazioni naturali nella sequenza di DNA che non provocano la malattia ed hanno una frequenza nella popolazione maggiore dell'1%. Questi marcatori permettono di capire come il gene mutato sia trasmesso nell'ambito della famiglia e quindi di identificare i soggetti come sani, affetti o, nel caso delle donne, portatrici. La scelta dei marcatori per la diagnosi indiretta dipende dalla loro frequenza nella popolazione generale. **L'accuratezza della diagnosi utilizzando tale metodica è pari al 95% per i marcatori extragenici e 99% per i marcatori intragenici.** Per l'analisi molecolare indiretta è indispensabile disporre di alcuni soggetti chiave della famiglia:

- **soggetto emofilico**
- **donne appartenenti alla linea materna della famiglia** in esame (per esempio, madre e sorelle del paziente emofilico, zie materne, cugine, nonna)
- **maschi sani** la cui analisi può aiutare a confermare la diagnosi

Metodiche dirette: recentemente alle tecniche di analisi indiretta si sono affiancate nuove metodiche che consistono nella **ricerca diretta della mutazione responsabile della malattia**.



In questa figura è schematicamente rappresentata la differenza tra diagnosi diretta ed indiretta. La X rappresenta la mutazione causa di emofilia A o B.

Analisi molecolare nell'emofilia A grave:

- **Inversione introne 22:** è il primo test che viene effettuato poiché questa mutazione è causa di emofilia A grave nel 40% dei casi, in tutte le popolazioni sinora studiate.
- **Inversione introne 1:** se l'inversione dell'introne 22 è assente, si procede con la ricerca dell'inversione dell'introne 1 che è causa della malattia nel 4-6% dei casi.
- **Analisi del gene del FVIII:** se entrambe le inversioni sono assenti, si procede con la ricerca di altre eventuali mutazioni geniche utilizzando tecniche di sequenziamento diretto del gene o tecniche di screening associate a sequenziamento diretto.

Analisi molecolare dell'emofilia B grave:

Si esegue l'**analisi diretta del gene** per la ricerca delle mutazioni utilizzando tecniche di sequenziamento diretto del gene o tecniche di screening associate a sequenziamento diretto.

Analisi molecolare nell'emofilia A e B moderate:

Si procede con l'analisi indiretta o diretta mediante tecniche di sequenziamento diretto del gene o tecniche di screening associate a sequenziamento diretto.

Analisi molecolare nell'emofilia A e B lievi:

Non è solitamente consigliata data la lieve sintomatologia della malattia.

Database delle mutazioni in emofilia:

Le mutazioni sinora identificate nei geni del FVIII e FIX sono riportate in database on-line la cui consultazione è gratuita e può essere effettuata agli indirizzi web:

Fattore VIII: <http://europium.csc.mrc.ac.uk>

Fattore IX: <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>

In assenza del soggetto emofilico, la diagnosi può comunque essere effettuata ma richiede molto più tempo e risorse e, talvolta, non è possibile raggiungere una diagnosi di certezza.

Ogni caso va comunque discusso con i medici del Centro di Riferimento.

► **Quale materiale biologico è necessario per effettuare la diagnosi di portatrice?**

Prelievo di sangue periferico da cui ottenere :

- **Plasma** per la misurazione del livello di attività coagulante del fattore carente (FVIII o FIX).
- **DNA** per la diagnosi molecolare

► **Perchè è importante accertare lo stato di portatrice?**

Conoscere lo stato di portatrice per le donne appartenenti ad una famiglia con storia di emofilia A o B è utile per avere un'adeguata informazione circa il rischio di trasmissione della malattia ai propri figli.

► **A quale età si effettua la diagnosi di portatrice?**

Idealmente, la diagnosi di portatrice dovrebbe essere effettuata non appena ha inizio l'età fertile e comunque sempre prima di intraprendere una gravidanza

► **Come la donna può avere tutte le informazioni necessarie per la diagnosi di portatrice?**

La donna può ottenere tutte le informazioni necessarie durante la consulenza genetica, che dovrebbe essere sempre effettuata prima di eseguire i test di laboratorio, allo scopo di fornire tutti gli elementi utili a consentirle di sottoscrivere un consapevole consenso informato.

La consulenza genetica prevede informazioni riguardanti:

- **Modalità della trasmissione genetica dell'emofilia e i test di diagnosi disponibili**
- **Valutazione dei dati molecolari a disposizione (analisi diretta o indiretta)**
- **Limiti delle tecniche disponibili e quindi la possibilità che i risultati dei test possano non essere informativi**

E' di primaria importanza che la donna possibile portatrice riceva dal Centro di riferimento un'adeguata consulenza genetica.

Sarebbe inoltre opportuno che le venga fornito supporto specialistico di tipo ematologico, ostetrico e psicologico che le sia di aiuto non solo sul piano clinico ma anche psicologico.

La consulenza deve tuttavia essere attuata nel pieno e più ampio rispetto di ogni valore etico, culturale, sociale e religioso della donna che la richiede.

▪ Capitolo III ▪ LA DIAGNOSI PRENATALE

Scopo della diagnosi prenatale è offrire ai genitori la possibilità di conoscere in tempi relativamente precoci (I/II trimestre di gravidanza) se il feto è affetto da emofilia.

Attualmente, con lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare, è possibile effettuare la diagnosi prenatale direttamente sul DNA fetale. Con queste tecniche si può conoscere sia il sesso che il cariotipo (corredo cromosomico) fetale per escludere la presenza di eventuali anomalie cromosomiche.

Nel caso il feto sia di sesso maschile si procederà alla diagnosi molecolare con cui si dovrà verificare se il feto ha ricevuto dalla madre il cromosoma X portatore del gene del FVIII/FIX mutato o il cromosoma X con il gene sano.

► Come si ottiene il DNA fetale?

- **Prelievo di villi coriali (villocentesi)**
- **Prelievo di liquido amniotico (amniocentesi)**

Entrambi i prelievi vengono eseguiti per via transaddominale e sotto stretto controllo medico ed ecografico

► Quando è possibile effettuare la diagnosi prenatale?

- Il prelievo dei villi coriali viene effettuato tra la **10^a e la 12^a settimana di gestazione**
- In caso di amniocentesi il prelievo può essere effettuato tra la **16^a e la 18^a settimana di gestazione**
- Nel caso di donne in gravidanza in cui non sia già stato accertato lo stato di portatrice è possibile condurre l'indagine, solo se l'età gestazionale è molto precoce.

Non è possibile richiedere una diagnosi prenatale in età gestazionale avanzata, quando non si conosca la mutazione genetica causa dell'emofilia, poiché i tempi ridotti di analisi possono non essere sufficienti per fornire una diagnosi certa ed accurata.

► Il prelievo presenta dei rischi?

Sia l'amniocentesi che la villocentesi sono tecniche invasive non prive di rischio di aborto. Attualmente, **il rischio di interruzione della gravidanza è pari allo 0.5-1%.**

► In quanto tempo si ha il risultato?

- In tempi relativamente brevi (**3-15 giorni**), dal prelievo dei villi coriali o di liquido amniotico, a seconda delle metodiche utilizzate, è possibile conoscere **il sesso del feto.**
- **Se il feto è maschio a questi tempi si aggiungono quelli necessari ad effettuare l'indagine molecolare che differiscono notevolmente, a seconda che nella donna sia già stata precedentemente identificata la mutazione del gene del FVIII o FIX di cui è portatrice.**
- **Per le donne in cui lo stato di portatrice sia stato precedentemente accertato e geneticamente caratterizzato con metodiche dirette o indirette sono necessarie 1-2 settimane per la diagnosi e la consegna del referto.**

LABORATORI DI GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE/ CENTRI EMOFILIA AICE (Associazione Italiana Centri Emofilia)	Telefono e-mail	DIAGNOSI PORTATRICE	PRELIEVO VILLI CORIALI	DIAGNOSI PRENATALE
Dr. G.L. SCAPOLI Centro Emostasi e Trombosi Università di Ferrara/Azienda Ospedaliera di Ferrara Arcispedale S. Anna C.so Giovecca, 203 - 44100 Ferrara	0532-237291 0532-237290 cet@unife.it	+	+	+
Dr. G. TAGARIELLO Centro Regionale per le Malattie del Sangue Ospedale Civile, Via Ospedale - 18 31033 Castelfranco Veneto (Treviso)	0423-732346 0423-732327 tagariello@ulssasolo.ven.it	+	+	+
Dr.ssa A. TAGLIAFERRI Centro di Riferimento Regionale per la Cura dell'Emofilia e delle Malattie Emorragiche Congenite Azienda Ospedaliera di Parma Via Gramsci 14 - 43100 Parma	0521-703971 0521-702239 atagliaferri@ao.pr.it	+	+	-
Dr. R. TARGHETTA Centro Emofilia Ospedale Microcitamico Università di Cagliari Via Jenner - 09100 Cagliari	070-6095659 070-6095686 targhetta@tiscali.it	+	+	+
Prof.ssa F. TORRICELLI Servizio di Citogenetica e Genetica umana Azienda Ospedaliera- Universitaria Careggi Viale G.B. Morgagni, 85 - 50134 Firenze	055-4279363 055-4279678 f.torricelli@unifi.it	+	+	+
Dr. E. ZANON Centro Emofilia Clinica Medica II, Azienda Ospedaliera Universitaria Via Giustiniani 2 -35128 Padova	0498212666 ezio.zanon@unipd.it	+	+	+

Tuttavia, rivolgendosi a tutti i centri AICE è possibile effettuare una consulenza genetica. Il centro si occuperà anche di inviare i campioni necessari ad effettuare la diagnosi di portatore ai laboratori in grado di eseguire la diagnosi.

■Capitolo IV■

MALATTIE RARE della COAGULAZIONE

Il processo della coagulazione richiede, oltre all'intervento dei FVIII e FIX, la partecipazione di molte altre proteine (fibrinogeno, protrombina, Fattori V, VII, X, XI e XIII) la cui carenza può provocare sintomi emorragici importanti. La carenza di questi fattori è, in Italia, molto più rara dell'emofilia (da 1: 500.000 a 1: 2.000.000, a seconda del fattore interessato) ma in progressivo aumento a causa del forte flusso immigratorio di popolazioni provenienti da paesi in cui è tradizionalmente praticato il matrimonio fra consanguinei. A differenza delle carenze di FVIII e FIX, **la trasmissione di queste malattie non è legata al cromosoma X. Possono quindi esserne affetti sia i maschi che le femmine.** I geni responsabili sono infatti localizzati su cromosomi detti autosomici e la trasmissione del gene difettivo è di tipo recessivo. In altre parole, la malattia si manifesta nel caso in cui il figlio/a riceva da entrambi i genitori il cromosoma con il gene mutato.

► Come si effettua la diagnosi di malattia emorragica rara?

I primi test cui sottoporre un soggetto in cui si sospetti la carenza di uno dei fattori della coagulazione sono: **tempo d'emorragia (TE), tempo di protrombina (PT) e tempo di tromboplastina parziale (PTT)**. In base ai risultati ottenuti da questi test cosiddetti di "primo filtro" si procede con un'indagine specifica (fa eccezione la carenza del FXIII per cui questi test risultano normali):

- **identificazione del fattore carente e misurazione del suo livello nel plasma mediante determinazione dell'attività coagulante: diagnosi fenotipica**
- **studio del DNA** per la ricerca della mutazione genetica causa della malattia: **diagnosi genotipica**
- per una corretta diagnosi fenotipica/genotipica è necessario disporre di campioni di plasma e sangue di entrambi i genitori del paziente e, possibilmente, anche di altri membri della famiglia.

- anche per le malattie rare è necessario raccogliere informazioni sulla storia clinica della famiglia, che possono aiutare a capire come la malattia si è trasmessa all'interno della famiglia stessa e la gravità del quadro clinico

► Come si effettua la diagnosi prenatale in caso di carenze rare?

Non vi sono differenze con le tecniche utilizzate per effettuare la diagnosi di emofilia. Il campione si ottiene quindi attraverso villocentesi o amniocentesi.

► In quali casi è consigliata la diagnosi prenatale per le donne portatrici di carenze rare?

La diagnosi prenatale è consigliata:

- **solo alle donne già madri di un figlio/a affetto/a da carenza di entità severa che comporti sintomi emorragici gravi**
- **alle donne appartenenti a famiglie in cui si sia praticato il matrimonio tra consanguinei e in cui sia già presente un soggetto affetto da carenza rara di un fattore della coagulazione.**

è sconsigliata nel caso in cui la mutazione provochi una malattia con sintomi emorragici lievi.

E' sempre consigliabile che ogni singolo caso sia attentamente discusso con i medici del centro emofilia, che sia attuata un'attenta consulenza genetica e che ogni decisione sia presa di comune accordo con i referenti del centro.

PER LA DIAGNOSI DI PORTATORE DI DEFICIT CONGENITI DI ALTRI FATTORI DELLA COAGULAZIONE E PER ESEGUIRE LA DIAGNOSI PRENATALE E' POSSIBILE RIVOLGERSI AI SEGUENTI CENTRI AICE

CENTRI SPECIALIZZATI AICE (Associazione Italiana Centri Emofilia)	Telefono e-mail	DIFETTO COAGULATIVO (fattore)
Prof. P.M. MANUCCI Centro Emofilia e Trombosi "Angelo Bianchi Bonomi" IRCCS - Ospedale Maggiore Via Pace, 9 - 20122 Milano	02-54125707 02-55035414 flora.peyvandi@unimi.it 02-55035356 augusto.federici@unimi.it	afibrinogenemia II, V, V+VIII, VII, X, XI, XIII von Willebrand
Dr G. L.SCAPOLI Centro Emostasi e Trombosi Università di Ferrara/Azienda Ospedaliera di Ferrara Arcispedale S. Anna C.so Giovecca, 203 - 44100 Ferrara	0532-237291 0532-237290 cet@unife.it	V, VII, X, von Willebrand
Dr. E. ZANON Centro Emofilia Clinica Medica II, Azienda Ospedaliera Universitaria Via Giustiniani 2 - 35128 Padova	049-8212666 ezio.zanon@unipd.it	VII, X, XI, XII

Tuttavia, rivolgendosi a tutti i centri AICE è possibile effettuare una consulenza genetica. Il centro si occuperà anche di inviare i campioni necessari ad effettuare la diagnosi di portatore ai laboratori in grado di eseguire la diagnosi.

► Come viene prelevato, conservato, spedito il campione necessario ad effettuare la diagnosi di portatore di carenza rara di un fattore della coagulazione?

- Prelievo di **circa 15 ml** di sangue venoso in provetta contenente sodio citrato 3.8%
- Centrifugazione del campione per separare il plasma
- Suddivisione del plasma in aliquote di 1 ml circa che vengono congelate a -20°C
- Congelamento delle cellule da cui si dovrà estrarre il DNA a -20°C
- I campioni congelati vengono spediti in **ghiaccio secco** al Centro di riferimento.



Si ringrazia

Bayer HealthCare

per aver reso possibile la stampa di questo libretto

www.emofilia.it