

ID: 119

Area di Laboratorio

Orale

Parole chiave: Controllo Esterno di Qualità, Genetica, Qualità

Controllo Esterno di Qualità dei test genetici Nazionale: Schema Beta Talassemia

Federica Censi¹, Fabrizio Tosto¹, Maria Chiara de Stefano¹, Marco Salvatore¹, Giovanna Florida², Maria Cristina Rosatelli³, Cristina Curcio⁴, Angela Ragusa⁵, Domenica Taruscio¹

¹Centro Nazionale Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanità, Italia; ²Unità di Bioetica, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Dipartimento di Medicina e Sanità pubblica- Università di Cagliari, Lab Genetica e Genomica PO A. Cao AO Brotzu, Cagliari; ⁴IRCCS ospedale policlinico maggiore ca' granda U.O.C. Lab. Centrale - settore genetica medica, Milano; ⁵Laboratorio Centralizzato, Sezione di Genetica Molecolare, Azienda Ospedaliero -Universitaria "Policlinico-Vittorio Emanuele", Catania; federica.censi01@iss.it

I laboratori che eseguono test genetici devono mantenere standard qualitativi elevati. La partecipazione al Controllo Esterno di Qualità (CEQ) è il principale strumento del laboratorio per monitorare i propri risultati; inoltre è essenziale per l'accreditamento con le norme ISO 17025 e 15189.

Dal 2001 il Centro Nazionale Malattie Rare, presso l'Istituto Superiore di Sanità, svolge attività di CEQ dei test genetici, come servizio conto terzi. La partecipazione è aperta a tutti i laboratori pubblici e privati che operano sul territorio Nazionale. Tra gli schemi offerti c'è uno schema dedicato all'analisi delle mutazioni del gene Beta Globinico.

Questo schema prevede per ogni turno, con ciclo annuale, l'invio di 4 campioni di DNA genomico a cui vengono assegnati dati anagrafici fittizi e una indicazione all'analisi generata sulla base delle mutazioni rilevabili nei campioni.

Ai laboratori è chiesto di inviare i risultati delle analisi ed i referti, entro 30 giorni, attraverso una piattaforma informatica. Le valutazioni sono eseguite da un gruppo di esperti Nazionali sulla base di criteri di valutazione stilati secondo linee guida Nazionali e Internazionali; dal 2013 ai laboratori viene assegnato un giudizio di performance sufficiente o insufficiente ed è stato stabilito che i laboratori partecipanti devono avere una efficienza diagnostica non inferiore al 99%.

Ad oggi sono stati conclusi 15 turni e monitorati 40 differenti laboratori, appartenenti per la maggior parte ad aziende ospedaliere e Asl. In media circa il 7% di laboratori riceve un giudizio di performance insufficienti in seguito ad errori critici nella genotipizzazione o nell'interpretazione del risultato. Quasi la totalità dei laboratori che ricevono un giudizio di performance insufficiente partecipa nuovamente nei turni successivi, riconoscendo l'effettiva utilità del CEQ. Nel corso di questi anni è stata raggiunta una standardizzazione delle informazioni contenute nel referto e un miglioramento nell'analisi del genotipo; rimangono, per alcuni, carenze nella completezza dell'interpretazione del risultato.

I dati generali ottenuti in questi anni confermano l'importanza della partecipazione costante dei laboratori partecipanti, con un miglioramento significativo della qualità delle analisi e della completezza della refertazione.

ID: 128

Area di Laboratorio

Orale

Concomitant Variants Associated to Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) in a Non Transfusion Dependent Homozygous Beta(O)39 Background.

Marco Musso¹, Massimo Maffei², Massimo Moggi², Giulia Albasini¹, Martina Lamagna¹, Domenico Coviello², Gian Luca Forni²

¹S.S.D. Centro della Microcitemia, anemie congenite e dismetabolismo del ferro E.O. Ospedali Galliera, Italia; ²Dipartimento di Genetica, E.O. Ospedali Galliera; marco.musso@galliera.it

Beta thalassemias are characterized by reduced (beta+) or absent (beta0) beta globin chain production due to homozygous or double heterozygous mutations in beta globin gene. Beta(0) 39 (C>T) mutation, which converts the normal CAG codon for glutamine in a TAG stop codon, causes premature termination of beta chain synthesis. Individuals homozygous for this mutation are forced since childhood to regular blood transfusions and clinically classified as Thalassemia Major (TM). However, this homozygosity is sometime masked by other mutations or deletions in the beta globin gene cluster leading to an asymptomatic condition called hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH). Here we report four cases of beta thalassemia intermedia (TI): two patients were episodically transfused, one became transfusion dependent at the age of 37 after pregnancy and the last was never transfused. They all carry homozygous beta(0) 39 mutation, two of them have heterozygous mutation in G-gamma globin gene -158 C>T and the four bases -225 to -222(-AGCA) deletion in A-gamma globin gene, while the other two had this deletion in homozygous state. These globin genes mutations are combined with haplotypes in the modifier genes associated to HPFH such as BCL11A and HBS1L-MYB intergenic region. These data suggest that the high level of fetal hemoglobin (Hb F) could be due to the synergistic effect of all these variants, although the contribution of other unknown genetic factors could not be completely ruled out.

ID: 151

Area di Laboratorio

Orale

Diagnosi prenatale precoce di emoglobinopatia mediante celocentesi

Margherita Vinciguerra, Filippo Leto, Cristina Passarello, Filippo Cassarà, Monica Cannata, Manuela Orlandi, Valentina Cigna, Giovanna Schillaci, Francesco Picciotto, Aurelio Maggio, Antonino Giambona

A.O. Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello, Italia; m.vinciguerra@campuscutino.it, f.letto@villasofia.it, c.passarello@campuscutino.it, f.cassara@campuscutino.it, m.cannata@campuscutino.it, orlandimanu78@gmail.com, valentinacigna@gmail.com, giovannaschillaci3@gmail.com, francesco.picciotto@libero.it, md.amaggio@gmail.com, a.giambona@villasofia.it

Nella pratica clinica le tecniche utilizzate per il prelievo di campioni biologici fetali sono la villocentesi e l'amniocentesi, alla XI e XVI settimana. La maggior parte delle malattie genetiche diagnosticabili nel periodo prenatale non possono essere curate anche se sono stati raggiunti notevoli progressi terapeutici per alcune di esse, come i trapianti di midollo osseo nelle emoglobinopatie. L'unica opzione possibile per prevenire la nascita di bambini affetti è la interruzione volontaria di gravidanza consentita dalla legge 194/78 entro i primi 90 giorni di gestazione o l'aborto terapeutico entro la XXIII settimana. Presso il nostro centro è stata sviluppata una nuova procedura di diagnostica prenatale, la Celocentesi. A 8 settimane la cavità amniotica contenente il feto è più piccola rispetto alla cavità celomatica che scompare alla X. Alla VIII settimana di gestazione è possibile prelevare 1 ml di liquido celomatico (LC) per via transvaginale contenente cellule fetali. Queste cellule possono essere isolate in relazione alla loro morfologia mediante l'uso di un micromanipolatore. Sono state effettuate 436 celocentesi per emoglobinopatie con una fattibilità diagnostica del 99% ed attendibilità del 100% rilevata mediante i controlli effettuati su tessuti abortivi, su liquido amniotico o alla nascita del bambino. Punti di forza della celocentesi sono: (i) Precocità: è la procedura prenatale invasiva più precoce che può essere offerta alle coppie a 7-9 settimane di gestazione. Ciò ha una grande valenza psicologica sulla coppia sia in termini di rassicurazione in presenza di un feto sano, sia perché riduce i rischi ed il trauma legati ad un aborto chirurgico in epoca di gestazione più avanzata nel caso di feto affetto. (ii) Fattibilità: prossima al 100%. (iii) Attendibilità diagnostica: in nessun caso sono stati riscontrati errori diagnostici dopo controllo post celocentesi. (iv) Tempi di risposta: circa 5 giorni lavorativi, durante i quali viene conclusa e comunicata la diagnosi. Ciò potrebbe consentire alla donna di ricorrere all'interruzione volontaria di gravidanza, se richiesta, e non all'aborto terapeutico, con un beneficio sia fisico che emotivo.

ID: 156

Area di Laboratorio

Orale

Parole chiave: Hipoxia Inducible Factor 2, erytoferrone, erythropoiesis

Serum levels of HIF2 α and ERFE in transfused and non-transfused-dependent thalassemic patients

Elisa Ferro¹, Anna Paola Capra¹, Petronilla Romeo¹, Maria Angela La Rosa¹, Domenico D'Ascola², Silvana Briuglia¹, Saverio Alberti¹

¹Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, University Hospital of Messina, Italy.; ²U.O.C. Centro Microcitemia, Riuniti Hospital, Reggio Calabria, Italy; ferro_elisa@alice.it, annapaolacapra@gmail.com, malarosa@unime.it

Introduction. Hipoxia Inducible Factor 2 (HIF-2) has emerged as a regulator of intestinal iron absorption but it indirectly regulates hepcidin suppression through the EPO-mediated stimulation of erythropoiesis (1, 2). Erytoferrone (ERFE) was identified as the major negative regulator of hepcidin in conditions of stress or ineffective erythropoiesis (3).

Phlebotomy or EPO administration in ERFE-knockout mice failed to suppress hepcidin, demonstrating that ERFE is absolutely necessary for acute hepcidin response to increased erythroid activity. Recently, has been developed the first-generation assay for human ERFE (hERFE) proving the pathological increases of ERFE with a parallel decrease of hepcidin in β -thalassemia patients (4).

Objectives. We aimed herein to determined serum levels of HIF2 α and ERFE in transfused and non-transfused-dependent thalassemic patients (NTDT) in relation with others anemia and erythropoiesis parameters. Was also evaluated the effect of splenectomy and their fluctuation over the inter transfusion interval between pre- and post-transfusion sampling time.

Methods. 20 transfused-dependent (TDT) patients samples were collected just before blood transfusion (T0) and 4/6 days after transfusion (T1) when erythroid suppression was expected to be maximal. In addition were recruited also 24 NTDT and 20 healthy controls.

In TDT group the 50% of patients were splenectomized while in NTDT were 29.16%. Were determined ERFE and HIF-2 α using ELISA kits following the recommended protocol. In addition, were determined hemocromocytometric and iron parameters, soluble transferrin receptor factor (sTfR), erythropoietin (EPO) and martial indexes, fetal hemoglobin (HbF) ratio and nucleated red blood cells (NRBC%), a marker of ineffective erythropoiesis.

Results. Serum levels of ERFE and HIF-2 α were strongly correlated (R=0.70, P<0.001), both were significantly higher in thalassemic patients than controls group (P<0.001) and in NTDT than TDT patients (P<0.001). In the latter were detected significant fluctuations between T0 and T1 sampling time (P<0.001). In addition, both were not affected by splenectomy and were observed several relationships with other determined parameters. We confirmed that ERFE was strongly correlated to EPO and we described a new interaction with sTfR (P=0.007).

Discussion. As recently reported by Ganz (4), our patients had higher ERFE levels than controls with lower values in TDT compared to NTDT subjects. We confirmed this results also by higher HIF-2 α levels in NTDT than TDT patients and by its fluctuation between pre and post-transfusion time in TDT group. Both ERFE and HIF2 α levels abruptly decreased within 4/6 days and were related to total amount of RBCs transfused required to maintain Hb levels between 9.5 and 10 g/dl. Furthermore, high ERFE levels were associated to low inter-transfusional interval. Measurement of these indices could assist clinical monitoring.

References

- 1)Mastrogiannaki M, Matak P, Mathieu JR, et al. «Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis.» *Haematologica.*, 2012 , 97,827-34.
- 2)Mastrogiannaki M, Matak P, Peyssonaux C. «The gut in iron homeostasis, role of HIF-2 under normal and pathological conditions.» *Blood*, 2013 , 122, 885–892.
- 3)Kautz L, Jung G, Valore EV, et al. «Identification of erytoferrone as an erythroid regulator of iron metabolism.» *Nature Genetics*, 2014, 46,678-684.
- 4)Ganz T, Jung G, Naeim A, et al. «Immunoassay for human serum erytoferrone.» *Blood*, 2017, 130,1243-1246.

ID: 168

Area di Laboratorio

Orale

Parole chiave: varianti emoglobiniche, screening, test genetici, prevenzione, talassemia

COMPLESSITÀ E SORPRESE NELLA DIAGNOSTICA EMOGLOBINICA IN FUNZIONE PREVENTIVA: HB VILLEJUIF, LA SECONDA SEGNALEZIONE IN ITALIA

antonio amato¹, paola rimessi², ofelia sarra¹, anna venturoli², mariapia cappabianca¹, marina taddei masieri², paola di biagio¹, daniela ze¹

¹ALMAVITA Coop. Soc., Italia; ²U.O. di Genetica Medica, Azienda Ospedaliero Universitaria di Ferrara, Italia; amministrazione@almavitaroma.org, rsp@unife.it

Ci è stata inviata a fini preventivi una coppia in corso di gravidanza.

Il sig. RM aveva effettuato screening scolastico (Centro Studi Microcitemie Roma-2005) con diagnosi di "sospetta β microcitemia". Da esami recenti si evidenziavano valori normali di Hb tot. (15,8 g/dl), con MCV ai limiti inferiori (78fl) e tendenziale poliglobulia (GR 5,7 $10^6/mm^3$). Normali i parametri marziali. Allo studio emoglobinico: HbA2= 3,8%; HbF=1,5% (HPLC).

La sig.ra BF presentava normali valori di Hb tot. (12,3 g/dl) con lieve riduzione di MCV (77fl) e MCH (26 pg) e normali valori dei parametri marziali. In HPLC il valore di HbA2 era pari a 4,6%, con HbF normale (1,0%) ed assenza di frazioni varianti.

Entrambi avevano effettuato la ricerca delle 23 mutazioni più frequenti nel gene β globinico, mediante Reverse Dot Blot (RDB), che utilizza sonde mutazione-specifiche legate a una membrana di nitrocellulosa che "catturano" le sequenze di DNA complementari eventualmente presenti nel prodotto di amplificazione specifico (PCR). L'esito era stato NEGATIVO.

Considerata l'incongruenza tra quanto emerso dall'analisi di I livello e quella molecolare, è stato richiesto studio molecolare dei geni α e β presso U.O. Genetica Medica - Az. Ospedaliera Universitaria di Ferrara.

La ricerca di delezioni/duplicazioni nel cluster α globinico mediante MLPA ha dato esito negativo in entrambi probandi. L'analisi di sequenza del gene β ha evidenziato nella sig.ra BF presenza in eterozigosi della variazione missenso p.Thr124Ile, corrispondente alla variante Hb Villejuif. La sequenza del gene β del sig. RM non ha evidenziato variazioni nucleotidiche di significato patologico, ma la ricerca di delezioni/duplicazioni nel cluster β globinico ha evidenziato una piccola duplicazione, di circa 2Kb che coinvolge l'esone 3 del gene G gamma e la regione intergenica compresa tra i geni G gamma e A gamma. L'effetto funzionale di tale alterazione non è noto. Lo studio del gene KLF1 non ha rivelato alterazioni. Pertanto il caso non è concluso.

Questo riscontro consente di confermare alcuni principi:

l'analisi molecolare per un certo numero di mutazioni del gene β non può essere considerata conclusiva;

l'incongruenza tra risultati dello studio di I livello e quelli dello studio molecolare devono destare sospetto ed indurre ulteriori approfondimenti;

la diagnostica emoglobinica è un sistema complesso con numerosi difetti rari per il cui riconoscimento necessitano strutture di alta specializzazione.