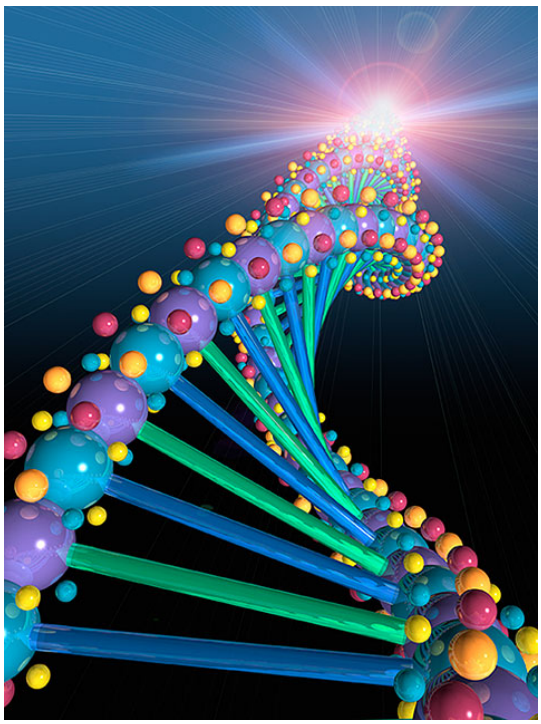
Il progetto della Biologa: la diagnosi genetica dell'emofilia.....
LA DIAGNOSI GENETICA DELL'EMOFILIA A e B



Dr.ssa Donata Belvini.

Dipartimento di Laboratorio, Servizio Trasfusionale, Centro per le Malattie del Sangue e Servizio di Assistenza agli Emofilici, Ospedale Civile di Castelfranco Veneto (TV), ASL 8 Regione Veneto

Responsabile Unità Operativa Centro Trasfusionale: Dr. Giuseppe Tagariello

Lavoro realizzato con il supporto della Libera Associazione Genitori Emofilici Veneto (LAGEV)

Introduzione
Le emofilie A (HA) e B (HB) sono malattie a trasmissione genetica determinate rispettivamente da carenza delle proteine Fattore VIII (FVIII) e Fattore IX (FIX) della coagulazione. Il difetto risiede in due geni distinti localizzati sul cromosoma X.

Al Centro per le Emofilie di Castelfranco Veneto è stato creato, presso il Servizio Trasfusionale, un laboratorio di genetica molecolare che permette di effettuare lo studio genetico del paziente emofilico e la diagnosi di stato di portatrice.
Attualmente la conoscenza del difetto molecolare alla base dell'emofilia rappresenta uno dei più importanti ausili nella gestione dei pazienti affetti da queste coagulopatie.
L'identificazione della mutazione che determina la malattia permette infatti una definizione precisa del difetto in ciascun paziente. Inoltre offre chiarimenti alle più importanti problematiche relative all'emofilia quali la gravità della malattia, il rapporto genotipo/fenotipo o lo sviluppo di inibitori anti-FVIII o FIX.

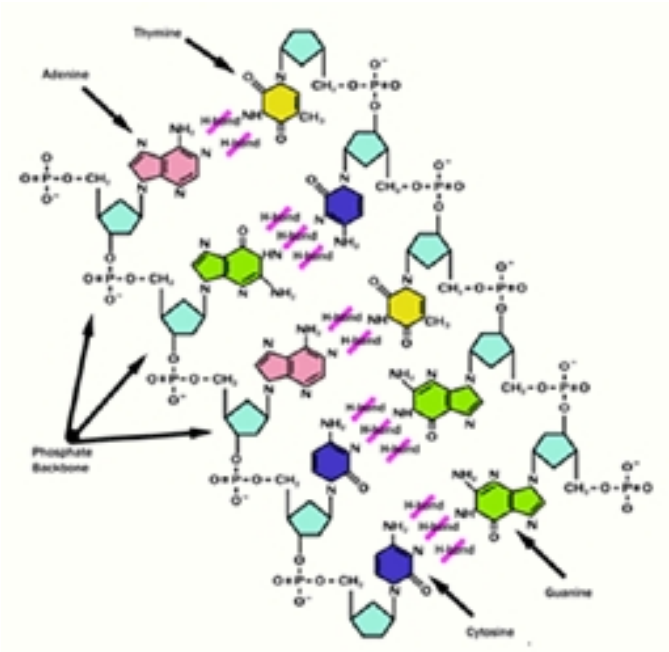
Ma l’aspetto che ha subito maggiori trasformazioni dall’avvento della biologia molecolare nell’emofilia è stata senz’altro la consulenza genetica alle famiglie dei pazienti emofilici: permette di compiere con sicurezza la diagnosi dello stato di portatrice nelle donne correlate ed a rischio di essere portatrici e definisce con sicurezza la possibilità o meno di trasmettere il gene alterato.

La consulenza genetica si articola in un primo colloquio in cui si raccolgono le informazioni utili allo svolgimento dello studio (albero genealogico, dati clinici ed anagrafici) e si effettuano i prelievi di sangue necessari; segue poi l’analisi genetica del DNA estratto dalle cellule del sangue e si conclude con la stesura di una risposta ed un eventuale altro colloquio per la discussione con la paziente dei risultati. Spesso la prima fase della consulenza viene svolta in altri centri che poi inviano i campioni da studiare.

L'analisi genetica dell’emofilia A e B

Per l'analisi genetica si utilizza comunemente DNA ad alto peso molecolare ottenuto da leucociti di sangue periferico anticoagulato. Nei soggetti affetti da emofilia A grave il primo step per una indagine genetica è rappresentato dalla ricerca di due frequenti mutazioni: l’inversione dell’introne 22 del gene del FVIII, presente in circa il 40-50 % di questi casi e l’inversione dell’introne 1 che ha una frequenza pari a circa il 2% dei casi di emofilia A grave.

Nei soggetti con HA che non presentano l'inversione del gene del FVIII e in tutti i pazienti con HB, qualora sia necessario identificare la mutazione responsabile del difetto, devono essere usate tecniche in grado di analizzare l'intero gene.
Nel nostro centro in particolare viene eseguita una metodica di screening del DNA denominata CSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis), che consente di rivelare la presenza di mutazioni puntiformi, piccole delezioni e inserzionii nelle porzioni codificanti e regolatrici del gene analizzato.



Per identificare la natura e la posizione della mutazione, il DNA viene quindi sottoposto a sequenziamento.
La mutazione individuata può essere utilizzata per studiare le donne correlate a rischio di essere portatrici per sapere se hanno ereditato il difetto che causa la malattia. Alle donne portatrici di emofilia grave viene offerta la possibilità di effettuare una indagine prenatale in occasione di eventuali gravidanze.

A sostegno di quanto individuato dalla ricerca dalla mutazione causativa (analisi diretta) si può utilizzare un'analisi indiretta che consiste nella valutazione di alcuni polimorfismi della sequenza del DNA posti all'interno o in prossimità (flanking regions) dei geni che codificano per il FVIII o per il FIX.
Tali polimorfismi sono dei marcatori che permettono di seguire in maniera indiretta la trasmissione del gene mutato nelle famiglie.

Risultati dell'esperienza

Emofilia A
L'attività di diagnostica genetica dell'emofilia A ci ha permesso di identificare la mutazione causativa della malattia in 334 pazienti provenienti da vari centri in tutta Italia.
Per quanto riguarda il Centro di Castelfranco Veneto, sono stati caratterizzati 130 pazienti seguiti dal Reparto di Ematologia.
A seguito di questi risultati sono state studiate 156 famiglie coinvolgendo 389 donne correlate. Tra le portatrici, 20 donne ci hanno contattato per una consulenza prenatale a seguito della quale abbiamo eseguito 26 diagnosi prenatali su DNA fetale estratto da villi coriali. Tenendo conto dell'aumento di richieste registrato negli ultimi anni, studiamo circa 50 pazienti affetti da emofilia A all'anno, circa 80 possibili portatrici ed eseguiamo 6 consulenze prenatali in donne portatrici di emofilia A.

Emofilia B
Nel 2001 abbiamo ottenuto un finanziamento dal Ministero della Salute che ci ha permesso di coinvolgere 27 centri italiani per lo studio di 271 pazienti affetti da Emofilia B. Di questi, 41 pazienti sono regolarmente seguiti dal Reparto di Ematologia dell'Ospedale di Castelfranco Veneto. A seguito di questi risultati sono state studiate 84 famiglie coinvolgendo 185 donne correlate.

Tra le portatrici, 17 donne ci hanno contattato per una consulenza prenatale a seguito della quale abbiamo eseguito 13 diagnosi prenatali su DNA fetale estratto da villi coriali.

Dalla conclusione del progetto finanziato dal Ministero, studiamo circa 10 pazienti affetti da emofilia B all'anno, circa 40 possibili portatrici ed eseguiamo 4 consulenze prenatali in donne portatrici di emofilia B.

Conclusioni

La diagnostica genetica riteniamo debba essere parte essenziale di quello che, con termine anglosassone si definisce "Comprehensive Care Haemophilia Centre".

Infatti la conoscenza delle genetica molecolare permette la gestione più completa di queste coagulopatie consentendo di rispondere in modo adeguato alle esigenze dei pazienti e delle loro famiglie su problematiche cruciali per la salute dei singoli, ma anche per l'armonia e la serenità delle intere famiglie.



L'obbiettivo futuro del nostro servizio è duplice: da una parte aumentare il numero di pazienti caratterizzati; dall'altra utilizzare il già consistente numero di dati ottenuti studiando di pazienti affetti da emofilia per la diagnosi di stato di portatrice delle donne ad essi correlate. Lo studio effettuato prima di progettare una gravidanza è lo strumento necessario per una maternità e paternità consapevoli.

Bibliografia

- Belvini D., Salviato R., Are A., Radossi P., Tagariello G. Rapid prenatal diagnosis of haemophilia. Haemophilia 2001; 7: 603-4.
- Belvini D., Salviato R., Radossi P., Pierobon F., Mori PG., Castaldo G., Tagariello G. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B. Haematologica 2005; 90(5): 635-42.
- Belvini D., Salviato R., Radossi P., Are A., Davoli PG., De Biasi E., Risato R., Tagariello G. La diagnosi genetica delle emofilie A e B. La trasfusione del sangue 2001; 46(3): 179-88.
- Bowen DJ. Haemophilia A and Haemophilia B: molecular insights. J Clin Pathol: Mol Pathol 2002; 55: 127-144.
- Salviato R., Belvini D., Are A., Radossi P., Tagariello G. Large FVIII gene deletion confers very high risk of inhibitor development in three related severe haemophiliacs. Haemophilia 2002; 8: 17-21.