



ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

DALLA DIAGNOSI DI
PORTATRICE DI EMOFILIA
ALLA DIAGNOSI PRENATALE
E ALLA DIAGNOSI PREIMPIANTO



EDIZIONE SETTEMBRE 2020



ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

DALLA DIAGNOSI DI
PORTATRICE DI EMOFILIA
ALLA DIAGNOSI PRENATALE
E ALLA DIAGNOSI PREIMPIANTO

EDIZIONE SETTEMBRE 2020

Prefazione

A distanza di circa vent'anni dalla redazione di un opuscolo informativo su diagnosi di portatrice e diagnosi prenatale di Emofilia, il Gruppo di Lavoro (GdL) "Genetica" dell'AICE ha ritenuto opportuno approntarne una nuova edizione, dedicata alle donne portatrici o sospette tali e destinata ai Centri Emofilia impegnati in prima linea nel fornire loro le informazioni di maggiore interesse, sulla base delle più recenti acquisizioni dalla letteratura scientifica.

Tale impegno si è tradotto in un nuovo opuscolo, arricchito di una sezione riferita alle attuali opportunità offerte dalle tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) e di diagnosi genetica pre-impianto (PGD), argomento particolarmente sentito dalle portatrici cui era doveroso dare riscontro.

Grazie alla collaborazione di molti soci AICE, mi sembra sia stato compiuto un lavoro pregevole e utile. La redazione di questo nuovo opuscolo non sarebbe stata possibile senza il fondamentale aiuto di Isabella Garagiola, che si è occupata di rivedere e aggiornare il precedente opuscolo, arricchendolo della descrizione circa le modalità di svolgimento e i requisiti fondamentali per l'accesso ad un percorso di PGD.

Essenziale è stato anche il contributo di Federica Riccardi, che ha curato la sezione relativa all'identificazione dei laboratori che collaborano con l'AICE per la diagnosi di portatrice e la diagnosi prenatale, e si è occupata di censire i centri pubblici e privati convenzionati cui è possibile rivolgersi per intraprendere un percorso di PGD, ottenendo direttamente da tali centri informazioni sulle prestazioni erogate e le modalità di accesso.

Ad entrambe rivolgo uno speciale ringraziamento per l'enorme impegno profuso e per la dedizione con cui hanno portato a termine il compito loro assegnato.

Un ringraziamento particolare va riservato anche ad Antonio Coppola, impareggiabile Segretario dell'AICE, per aver curato la nuova parte iconografica, e all'intero GdL "Genetica" dell'AICE, che ha partecipato alla stesura e revisione dell'intero opuscolo.

Il mio augurio è che esso sia utile ai Centri Emofilia ma, soprattutto, a tutte le donne che fanno parte dell'universo emofilia, portatrici o meno, il cui ruolo fondamentale e difficile come madri, figlie, sorelle, compagne dei nostri pazienti, così come l'aiuto che, in ogni momento della vita, prestano loro e a noi stessi medici dei Centri Emofilia, è di assoluta importanza e merita il più profondo e sentito ringraziamento di noi tutti.

Napoli, 05 ottobre 2020



Sviluppo e cronologia del documento

La prima stesura del documento è stata redatta dal Gruppo di Lavoro 'Genetica', presieduto da Angiola Rocino, Presidente Reggente dell'AICE, coordinato da Giancarlo Castaman e Francesco Bernardi e costituito da: Lucia Dora Notarangelo, Flora Peyvandi, Paolo Radossi, Annarita Tagliaferri, Ezio Zanon, quali componenti medici, cui si aggiunge Massimo Morfini per lo studio delle correlazioni genotipo-PK; e da: Maura Aquila, Donata Belvini, Federica Riccardi, Roberta Salviato, Rosa Santacroce, Federica Zarrilli, quali biologi molecolari.

Alla redazione dell'intero documento ha fornito un contributo fondamentale Isabella Garagiola. Federica Riccardi, inoltre, ha curato specificamente l'identificazione dei Laboratori che collaborano con l'AICE per le indagini di biologia molecolare finalizzate alla diagnosi delle portatrici e alla programmazione di un percorso di diagnosi prenatale per Emofilia A e B, occupandosi, ancora, di svolgere un'indagine conoscitiva volta a identificare le strutture pubbliche e private convenzionate in grado di assistere le donne portatrici in un percorso di programmazione ed attuazione di una procedura di procreazione assistita, con la possibilità di effettuare una diagnosi pre-impianto di emofilia. Antonio Coppola, Segretario dell'AICE, ha fornito un contributo fondamentale alla revisione del testo e alla realizzazione della parte iconografica.

La versione finale del documento, approvata dal Consiglio Direttivo AICE (Presidente Reggente: A. Rocino; Past President: G. Di Minno; Consiglieri: C. Biasoli, R. De Cristofaro, R. Marino; Rappresentante ISS: A. Giampaolo) e dal Comitato Scientifico AICE (Presidente: M. Morfini; Componenti: G. Castaman, M. Franchini, G. Gamba, H.J. Hassan, M.G. Mazzucconi, A. Tosetto), è stata inviata ai Soci AICE via e-mail il 16 settembre 2020.

Ha inviato commenti e proposte di revisione A.C. Molinari.

La versione finale del documento, approvata dal consiglio direttivo e dal comitato scientifico AICE, ha ottenuto il parere favorevole dei soci mediante consultazione online attraverso il sito ufficiale AICE (www.aiceonline.org), indetta il: 25/09/2020 e conclusasi il 04/10/2020 il documento è stato pubblicato sul sito AICE in data 05/10/2020.

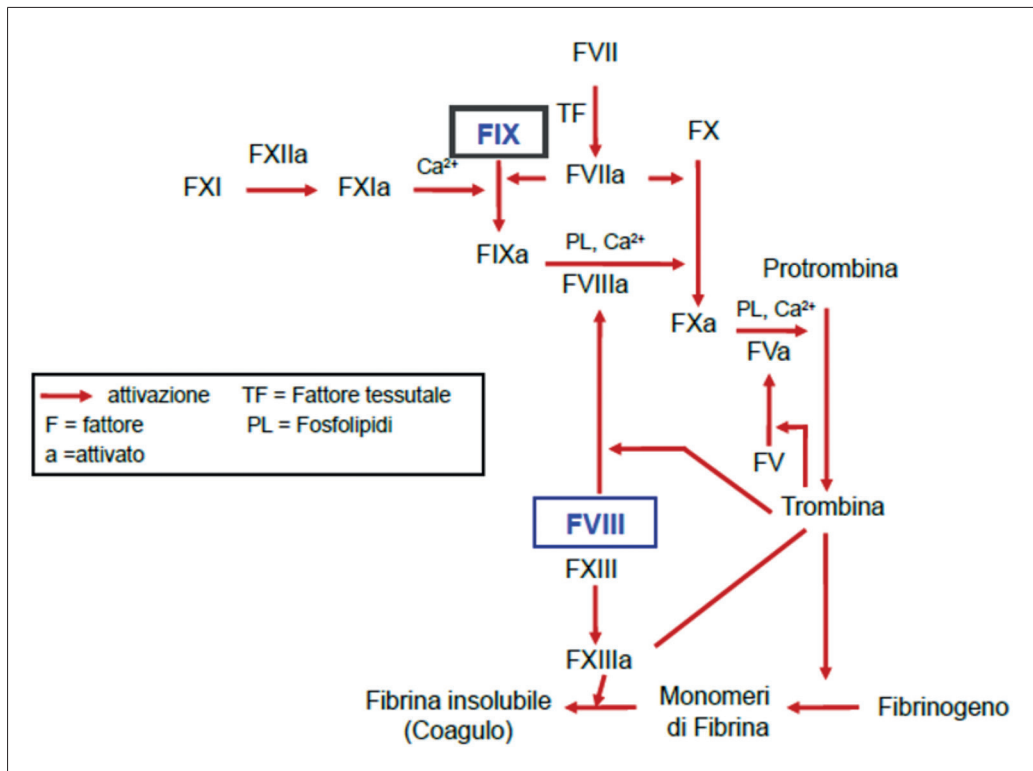
Indice	Pagina
INTRODUZIONE ALL'EMOFILIA	7
Emofilia familiare o sporadica	8
Come si manifesta l'emofilia?	9
Come si cura l'emofilia?	9
Nuove strategie per la cura dell'emofilia	10
<i>Prodotti a emivita prolungata (extended half-life)</i>	10
<i>Nuove terapie non sostitutive</i>	11
<i>Terapia genica</i>	11
Che cos'è l'inibitore?	12
LA PORTATRICE DI EMOFILIA	15
Qual è la probabilità di una donna portatrice di trasmettere il gene alterato?	15
Qual è la probabilità di un maschio affetto da emofilia di trasmettere il gene alterato?	15
DIAGNOSI DI PORTATRICE	17
Raccolta dei dati anamnestici della famiglia	17
Dosaggio del livello coagulante del FVIII o FIX	18
Diagnosi molecolare di portatrice	19
<i>Analisi indiretta</i>	19
<i>Analisi diretta</i>	19
• <i>Analisi molecolare diretta dell'emofilia A grave</i>	19
• <i>Analisi molecolare diretta dell'emofilia B grave</i>	20
• <i>Analisi molecolare diretta dell'emofilia A e B moderata</i>	21
• <i>Analisi molecolare diretta dell'emofilia A e B lieve</i>	21
Database delle varianti geniche in emofilia	21
Quale materiale biologico è necessario per effettuare la diagnosi di portatrice?	21
Perché è importante accertare lo stato di portatrice?	21
A quale età si effettua la diagnosi di portatrice?	21
Come la donna può avere tutte le informazioni necessarie per la diagnosi di portatrice?	22
DIAGNOSI PRENATALE	23
Come si ottiene il DNA fetale?	23
<i>Tecniche invasive</i>	23
• <i>Quando è possibile effettuare la diagnosi prenatale?</i>	23
• <i>Il prelievo presenta dei rischi?</i>	24
• <i>In quanto tempo si conosce il risultato?</i>	24
• <i>Chi può sottoporsi alla diagnosi prenatale</i>	24
• <i>Quando è possibile interrompere la gravidanza?</i>	24
<i>Tecniche di screening non-invasive: analisi del DNA fetale sul sangue materno (NIPT, non-invasive prenatal testing)</i>	25
Diagnosi genetica di preimpianto (PGT, prenatal genetic testing)	26
BIBLIOGRAFIA	29
INFORMAZIONI AGGIUNTIVE	32

INTRODUZIONE ALL'EMOFILIA

L'emofilia è una malattia ereditaria causata da un difetto genetico che comporta un'alterazione del normale processo della coagulazione del sangue. La coagulazione è un processo complesso che coinvolge le piastrine e diverse proteine del plasma secondo una reazione a catena.

Chi è affetto da emofilia presenta un ritardo nell'attuazione di questo processo da cui deriva la mancata o ritardata formazione di un coagulo stabile in seguito ad una lesione vascolare (Figura 1).

Figura 1. Meccanismo fisiologico della coagulazione.



L'emofilia si distingue in emofilia A e emofilia B sulla base della presenza di varianti nei due geni responsabili, rispettivamente, della sintesi del fattore (F) VIII (FVIII) e FIX. Entrambi i geni *F8* e *F9* sono localizzati sul cromosoma X. L'emofilia è, pertanto, una malattia X-linked trasmessa come carattere recessivo [1]. Le donne possiedono due cromosomi X (cariotipo 46, XX), mentre i maschi possiedono un solo cromosoma X, ereditato dalla madre e un cromosoma Y, ereditato dal padre (cariotipo 46, XY). Ne deriva che l'emofilia si manifesta, generalmente, nei maschi, mentre le donne, che possiedono due cromosomi X,

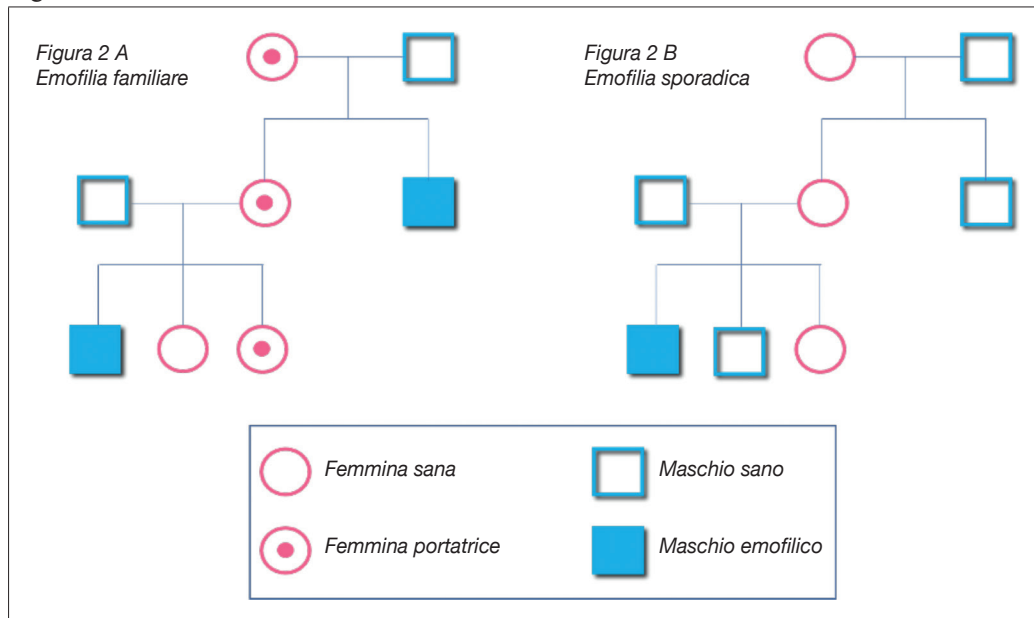
solitamente, non manifestano la malattia ma possono esserne portatrici e trasmetterla ai figli. Il livello di attività coagulante di FVIII o FIX nei soggetti affetti consente di definire la gravità della malattia: livelli di FVIII o FIX circolanti inferiori a 1% (1 UI/dL) del normale determinano un'emofilia grave; valori compresi tra 1 e 5% definiscono l'emofilia moderata; in caso di livelli compresi tra più del 5% e meno del 40%, l'emofilia viene definita lieve [2, 3]. L'entità del deficit è simile in tutti i soggetti emofilici di una famiglia, poiché strettamente dipendente dal tipo di variante genica ereditata. La frequenza dei casi di emofilia è di circa 1:5.000 maschi per l'emofilia A e 1:30.000 maschi per l'emofilia B con minime variazioni per etnia e caratteristiche demografiche in differenti popolazioni.

Emofilia familiare o sporadica

L'**emofilia familiare** è definita dalla presenza di almeno due soggetti emofilici in una famiglia (Figura 2A).

L'**emofilia sporadica** è caratterizzata dalla presenza apparentemente di un unico soggetto affetto da emofilia in una famiglia. La variante genica che provoca la malattia è definita "de novo" poiché non evidenziata o diagnosticata nelle generazioni precedenti (Figura 2B). La frequenza dei casi sporadici è del 30% circa [4].

Figura 2



Come si manifesta l'emofilia?

Dal punto di vista clinico, le due forme di emofilia A e B si manifestano con sintomi emorragici del tutto simili e strettamente correlati alla gravità del difetto coagulativo.

Le emorragie possono verificarsi in varie sedi. Tuttavia, la manifestazione più frequente e tipica dell'emofilia è l'emorragia intra-articolare o emartro [5]. Anche gli ematomi muscolari sono piuttosto comuni, a volte successivi a traumi lievi o del tutto inapparenti. Gli emofilici gravi presentano ematriti frequenti, spesso spontanei o non riconducibili ad eventi traumatici; gli emofilici moderati manifestano solo occasionalmente episodi emorragici spontanei, mentre i pazienti con emofilia lieve sanguinano, generalmente, solo in seguito a gravi traumi o interventi chirurgici [2]. Gli ematriti cominciano a manifestarsi, negli emofilici gravi, sin dalla prima infanzia, quando il bambino comincia a gattonare e poi a camminare.

Sanguinamenti ricorrenti in una singola articolazione (articolazione bersaglio) possono indurre il manifestarsi di una malattia articolare cronica e irreversibile (artropatia emofilica).

L'artropatia cronica è causa di disabilità negli emofilici non adeguatamente trattati, triste realtà dei decenni passati, ma oggi efficacemente prevenuta, grazie all'introduzione nella comune pratica clinica di programmi di profilassi.

Come si cura l'emofilia?

Cardine dell'attuale terapia è il trattamento sostitutivo basato sulla somministrazione endovenosa di concentrati di FVIII o FIX a derivazione plasmatica od ottenuti mediante la tecnologia del DNA ricombinante [6]. Tale trattamento non solo consente di arrestare le emorragie ma anche di prevenirle, in caso di traumi od interventi chirurgici.

Per una rapida risoluzione delle emorragie è, tuttavia, estremamente importante che esse siano riconosciute tempestivamente, in modo da poter attuare un adeguato e precoce trattamento. Ciò consente di ridurre il rischio di complicanze, prima fra tutte la comparsa di articolazioni bersaglio e lo sviluppo di un'artropatia cronica irreversibile.

Per prevenire questa grave complicanza, viene oggi intrapreso un trattamento di profilassi basato sulla somministrazione del fattore carente ad intervalli di tempo preordinati che, in caso si utilizzino prodotti ad emivita standard, variano da 2 a 3 infusioni settimanali, consentendo il mantenimento di livelli minimi di FVIII

o FIX sempre superiori a 1-2% e rendendo così più lieve il difetto coagulativo [7]. La disponibilità di concentrati ad emivita prolungata può consentire di dilazionare gli intervalli tra le somministrazioni. La *profilassi primaria*, intrapresa subito dopo la comparsa del primo emartro è, ad oggi, il trattamento di scelta in tutti gli emofilici gravi ed è ampiamente attuata in Italia. Dal 1995 è raccomandata dalla WHO (Organizzazione Mondiale della Sanità) [8] e dalle linee guida della World Federation of Haemophilia (WFH) recentemente riformulate [9]; è, inoltre, sancita dagli European Principles of Haemophilia Care [10], nonché dai *Principi di trattamento delle malattie emorragiche congenite* edite dall'AICE [11, 12]. Altre forme di profilassi sono pure molto diffuse nella comune pratica clinica. La *profilassi secondaria* (iniziata nel bambino dopo che si siano verificati già alcuni ematri, ma prima della comparsa di segni clinici o strumentali di danno articolare) e *terziaria* (iniziata più avanti negli anni, anche in età adulta, in presenza di danno articolare documentato) perseguono l'obiettivo di prevenire ulteriori sanguinamenti intra-articolari che potrebbero contribuire a peggiorare i danni a carico del sistema muscoloscheletrico e, soprattutto nell'adulto, promuovere un miglioramento della qualità della vita, uno stile di vita più attivo e la partecipazione alla vita sociale.

Tuttavia, la profilassi richiede notevole impegno, sia sul piano pratico che psicologico, e grande costanza, tanto da parte del paziente che dei familiari. D'altro canto, se i problemi iniziali vengono correttamente affrontati e superati, essa produce vantaggi notevoli, con un grande impatto positivo sul benessere psicofisico dei pazienti. Inoltre, i programmi di profilassi si configurano, oggi, in programmi personalizzati il cui obiettivo è, non solo la prevenzione dell'artropatia cronica, ma anche il superamento delle barriere di integrazione sociale e l'inserimento, con soddisfazione e piena partecipazione, nel mondo della scuola, della formazione professionale e poi del lavoro, nonché nelle attività ricreative anche fisico-sportive.

Nuove strategie per la cura dell'emofilia

Prodotti a emivita prolungata (extended half-life)

Negli ultimi 10 anni, l'uso di tecniche di bioingegneria ha portato allo sviluppo di nuovi prodotti ricombinanti con "emivita" prolungata, cioè con una più lunga permanenza in circolo, grazie ad una meno rapida rimozione e degradazione.

Questi prodotti hanno il vantaggio di poter essere somministrati con una minore frequenza durante la profilassi, riducendo il numero delle infusioni

settimanali e conseguentemente lo stress associato al ripetuto accesso venoso, soprattutto nei bambini. Inoltre, l'uso dei prodotti a emivita prolungata consente di mantenere livelli minimi di FVIII o FIX costantemente più elevati, superiori al 5% per il FVIII e al 10% per il FIX, conferendo al paziente una maggiore protezione nella prevenzione dei sanguinamenti spontanei ed in particolare per l'insorgenza di ematriti [12].

Nuove terapie non sostitutive

Negli ultimi anni, la ricerca ha portato allo sviluppo di approcci di trattamento mediante terapia non sostitutiva. Questa può realizzarsi mediante l'utilizzo di farmaci che permettono di promuovere il processo coagulativo attraverso meccanismi alternativi, indipendentemente dalla mancanza di FVIII o FIX in circolo. L'emicizumab rappresenta il capostipite di tali farmaci, avendo come principio attivo un anticorpo monoclonale che simula l'azione del FVIII e, interagendo con il FIX attivato ed il FX, è in grado di promuovere il naturale processo della coagulazione [13]. Sulla base delle evidenze disponibili [14, 15] emicizumab è stato approvato dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), agenzia regolatoria italiana, per l'indicazione all'uso in pazienti affetti da emofilia A con inibitori del FVIII e da emofilia A grave (FVIII <1%) senza inibitori di qualsiasi età per la profilassi di routine degli episodi emorragici. Il vantaggio maggiore, offerto da tale farmaco, è legato alla via di somministrazione sottocutanea, una volta alla settimana o anche ogni due o quattro settimane. Il trattamento con emicizumab richiede, comunque, un monitoraggio assiduo e puntuale, con un'attenzione particolare al paziente e ai suoi familiari per la gestione di eventuali emorragie intercorrenti, specie per i pazienti con inibitore anti-FVIII, viste le problematiche di tipo trombotico insorte quando il farmaco è stato somministrato in concomitanza con il concentrato di complesso protrombinico attivato [14]. Non è nota, inoltre, l'efficacia a lungo termine nel prevenire l'artropatia cronica.

Terapia genica

Le aspettative per una cura definitiva dell'emofilia sono oggi nutrite dai rapidi progressi compiuti nel campo della terapia genica. L'emofilia, essendo una malattia monogenica, costituisce la candidata ideale per un approccio terapeutico di tale tipo [16].

Negli ultimi 10 anni, numerosi studi clinici di terapia genica sono stati avviati e sono tuttora in corso, sia in pazienti con emofilia B che emofilia A. I risultati di tali studi hanno dimostrato la validità e la sicurezza di tale approccio con un'efficacia notevole. Nel caso dell'emofilia B, lo studio capostipite ha dimostrato che è possibile mantenere un livello di espressione del FIX nel plasma del 2–5% per un periodo di osservazione che ha raggiunto quasi dieci anni [17], mentre recentemente uno studio con una variante del gene che esprime un FIX ad attività potenziata (FIX Padova) [18] ha permesso di ottenere livelli medi del 40% dopo un anno dall'infusione. Nel caso degli studi nei pazienti con emofilia A, il livello medio di espressione del FVIII mantenuto è circa del 20% dopo un periodo di osservazione di tre anni [19]. I pazienti sottoposti a terapia genica hanno abbandonato, nella quasi totalità dei casi, la profilassi e la loro qualità di vita è notevolmente migliorata.

Attualmente non sono candidabili alla terapia genica i bambini, i pazienti con inibitori o con epatopatia severa. Inoltre, un numero significativo di pazienti non è idoneo alle sperimentazioni a causa di una preesistente immunità verso i vettori virali utilizzati per il trasferimento del gene. Un ulteriore limite è dato dalla mancanza di risultati di efficacia e sicurezza a più lungo termine. Per tale motivo, i tempi di applicazione di questo nuovo approccio nella comune pratica clinica saranno necessariamente lunghi, poiché l'osservazione dovrà essere attenta e protratta nel tempo, in modo da consentire di valutare tutti gli aspetti di efficacia e sicurezza del trattamento.

Che cos'è l'inibitore?

Lo sviluppo di anticorpi inibitori, che neutralizzano il FVIII o FIX infuso, rappresenta, a tutt'oggi, la più temuta delle complicanze della terapia dell'emofilia. Rendendo il trattamento sostitutivo del tutto inefficace, la presenza di inibitori modifica radicalmente le modalità di trattamento degli episodi emorragici e richiede l'adozione di differenti provvedimenti terapeutici [20]. Lo sviluppo dell'inibitore deriva da un complesso processo multifattoriale che comprende fattori noti ma anche altri non del tutto noti.

I fattori noti che possono contribuire all'insorgenza di inibitore sono sia di

natura genetica [tipo della variante genica responsabile dell'emofilia, etnia, familiarità per inibitore, e altre varianti a livello di geni coinvolti nella risposta immune, come i geni del complesso maggiore di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC) e di alcuni fattori che possono amplificare o inibire la risposta immune] [21], sia legati al trattamento sostitutivo (intensità del trattamento, specie nei primi giorni di esposizione al fattore esogeno, tipo di prodotto) [22]. L'inibitore compare nel 25-30% degli emofilici A gravi, generalmente entro le prime 10-20 esposizioni al FVIII esogeno.

Tuttavia, il rischio di comparsa si riduce progressivamente, con l'aumentare del numero delle esposizioni, fino a divenire pressoché nullo dopo i primi 150 giorni di esposizione. Inoltre, più di un terzo degli inibitori è di tipo transitorio, non raggiunge livelli elevati e scompare spontaneamente con la prosecuzione del trattamento sostitutivo, senza alcuna modifica del dosaggio e della frequenza di infusione. Altri pazienti mostrano, invece, una maggiore e persistente risposta anticorpale. In caso l'inibitore non superi un picco massimo di 5 Unità Bethesda (UB)¹ il paziente può, in genere, continuare a ricevere terapia sostitutiva con FVIII sia pur utilizzando dosi più elevate di FVIII. Viceversa, nei pazienti che mostrano un picco storico massimo superiore a 5 UB non è più possibile utilizzare FVIII, tanto a domanda, quanto in profilassi, poiché il fattore infuso viene rapidamente inattivato dall'anticorpo. In questi casi il trattamento delle emorragie è più complicato ed è necessario ricorrere a prodotti alternativi, i cosiddetti agenti bypassanti [Fattore VII attivato ricombinante (rFVIIa), o Complesso Protrombinico Attivato, (APPC)] [20]. L'efficacia di tali prodotti, anche quando utilizzati in regimi di profilassi, non è tuttavia paragonabile a quella del FVIII. Pertanto, i pazienti sono maggiormente esposti a manifestazioni emorragiche e allo sviluppo dell'artropatia cronica con conseguente notevole compromissione della qualità di vita [23, 24].

Considerato ciò, nonostante l'introduzione nella comune pratica clinica di emicizumab, la maggioranza dei clinici ritiene che l'obiettivo terapeutico principale nei pazienti che sviluppano inibitore ad alto titolo, particolarmente

¹ Il titolo degli inibitori viene determinato mediante metodo Bethesda e più modernamente mediante lo stesso metodo Nijmegen modificato; 1 UB/mL rappresenta la quantità di inibitore in grado di inibire il 50% dell'attività del FVIII nel plasma normale.

nei bambini, continui ad essere rappresentato dall'indurre il graduale spegnimento della risposta anticorpale (terapia eradicante) tramite la somministrazione di FVIII ad alte dosi, quotidianamente o a giorni alterni, sino alla definitiva scomparsa dell'inibitore e, comunque, per almeno 9 mesi [25]. Questo trattamento prende il nome di Induzione dell' Immunotolleranza (ITI) ma ha efficacia nel 70-80% dei casi [26]. Inoltre, l'ITI è estremamente impegnativa per i pazienti, specialmente in età pediatrica, e per i loro familiari ed è notevolmente costosa. Ha il vantaggio, tuttavia, una volta raggiunto lo stato di immunotolleranza, di consentire la reintroduzione del trattamento sostitutivo con FVIII e regimi di profilassi [20].

Lo sviluppo di inibitori in emofilici B rappresenta un evento molto più raro, verificandosi nel 5-10% circa dei pazienti gravi [27]. Il maggior fattore di rischio è di tipo genetico, legato a varianti geniche definite *null*, che impediscono la produzione di FIX [28]. Questo tipo di varianti si osserva raramente negli emofilici B gravi, mentre le varianti cosiddette *missense* sono le più frequenti e consentono una parziale produzione di FIX [29]. Negli emofilici B gravi con varianti geniche di tipo *null* in concomitanza, in genere, con la comparsa dell'inibitore possono manifestarsi reazioni allergiche e anafilattiche gravi a seguito del trattamento con qualsiasi tipo di concentrato di FIX [30].

Il meccanismo patogenetico è tuttora ignoto ma tali reazioni possono porre in serio pericolo la vita del paziente.

LA PORTATRICE DI EMOFILIA

La portatrice di emofilia A o B è una donna in cui uno dei due cromosomi X presenta una variante del gene *F8* o *F9*.

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.

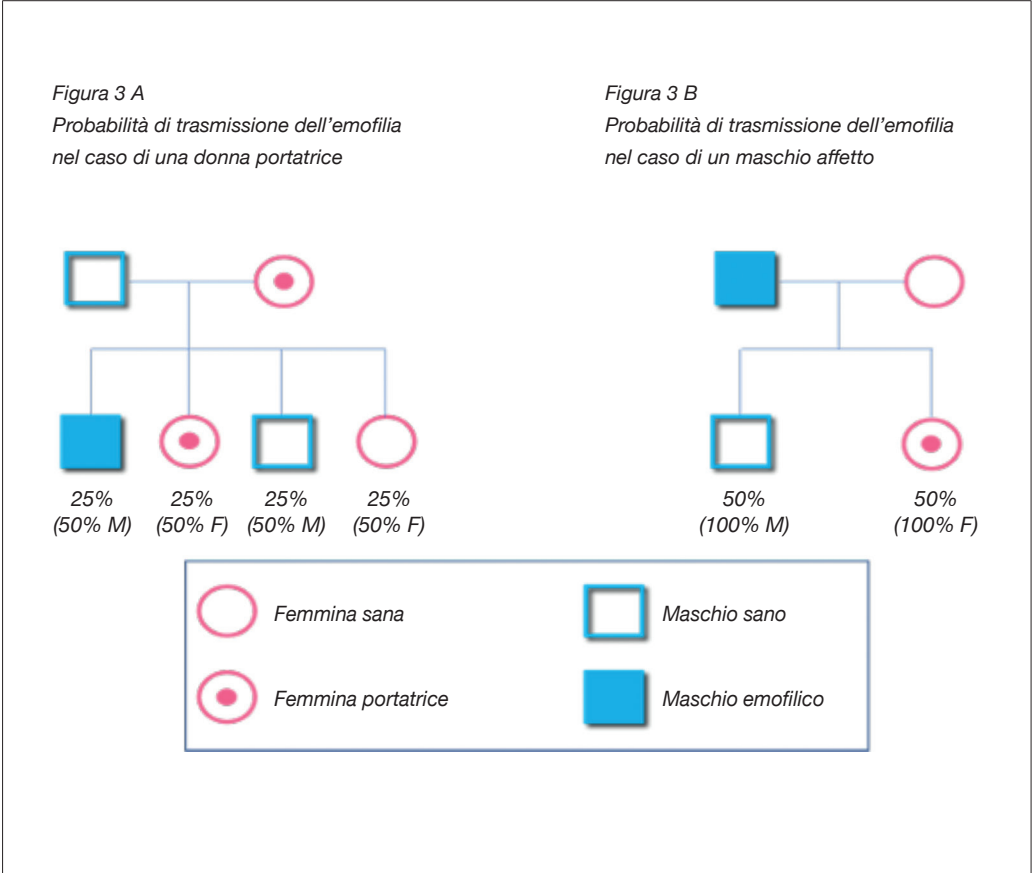
Qual è la probabilità di una donna portatrice di trasmettere il gene alterato?

Una donna portatrice di emofilia A o B, ad ogni gravidanza, ha una probabilità pari al 50% di trasmettere il proprio cromosoma X in cui è presente la variante genica causa di emofilia; se la trasmette a un figlio maschio, questi sarà affetto da emofilia; se lo trasmette ad una figlia femmina, questa sarà portatrice di emofilia (Figura 3A).

Qual è la probabilità di un maschio affetto da emofilia di trasmettere il gene alterato?

Un maschio affetto da emofilia A o B trasmette a tutte le figlie il proprio unico cromosoma X in cui è presente la variante genica causa di emofilia. Esse sono, quindi, portatrici obbligate. I figli maschi non saranno, invece, affetti da emofilia poiché ricevono dalla madre il loro unico cromosoma X (Figura 3B). Solo in caso la madre sia portatrice di emofilia può verificarsi, con una probabilità del 50% ad ogni concepimento, che un maschio figlio di padre emofilico risulti anch'egli affetto da emofilia, che sarà A o B a seconda a seconda che la madre sia portatrice di una variante genica *F8* o *F9*.

Figura 3



DIAGNOSI DI PORTATRICE

Le informazioni per un'accurata e completa diagnosi di portatrice dovrebbero essere raccolte attraverso un percorso diagnostico a più fasi, condiviso e adottato in maniera uniforme da tutti i Centri emofilia.

Raccolta dei dati anamnestici della famiglia

Rappresenta il primo passo da intraprendere per l'individuazione di una possibile portatrice. Totalmente a carico del Centro Emofilia di riferimento, tale raccolta consiste in un'indagine preliminare da cui scaturisca il disegno di un dettagliato albero genealogico.

Scopo di tale indagine anamnestica è:

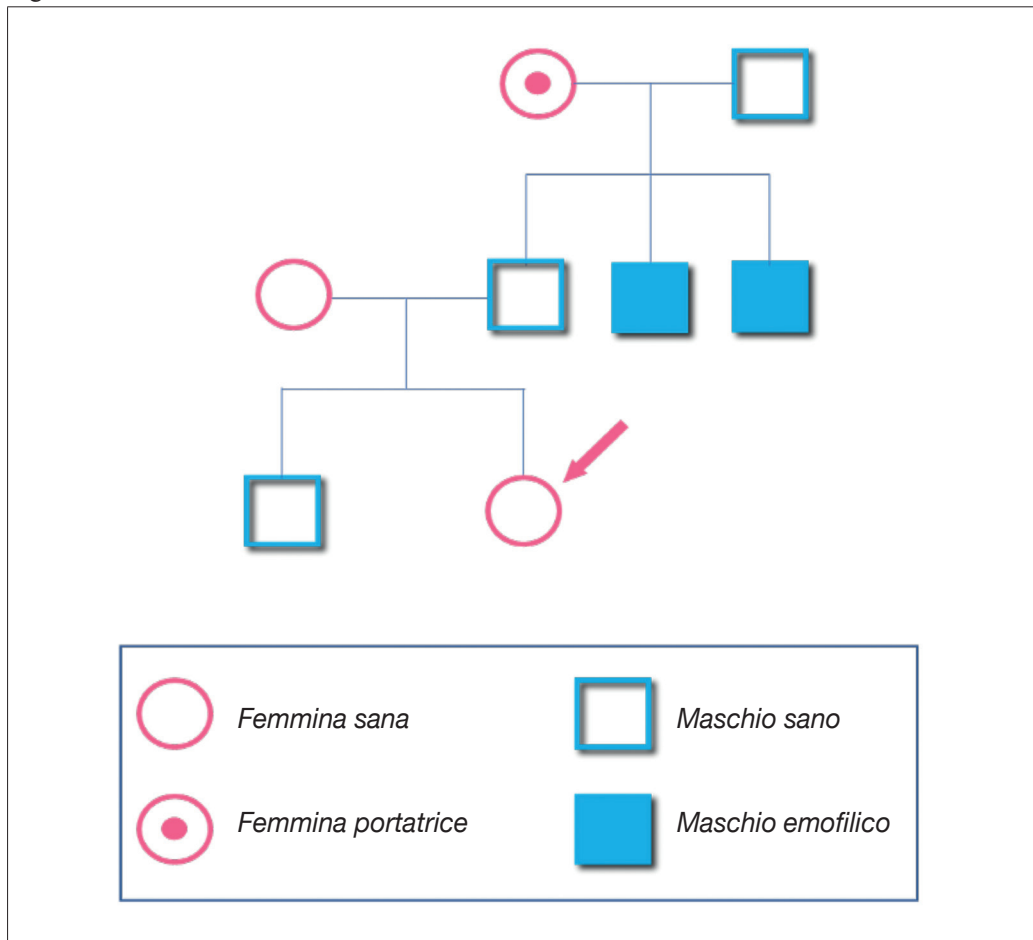
- raccogliere informazioni circa la storia familiare;
- disporre dei dati clinici di eventuali familiari affetti;
- escludere casi di adozione.

Utile è anche raccogliere informazioni circa i risultati di indagini di laboratorio già effettuate dalla sospetta portatrice e dal/i familiare/i affetto/i in altre strutture. Questi possono essere particolarmente utili in caso includano il dosaggio dell'attività coagulante del FVIII o FIX nella sospetta portatrice e l'identificazione della specifica variante genica nel soggetto con diagnosi certa di emofilia appartenente alla famiglia (probando).

Tali informazioni sono necessarie per:

- comprendere se la sospetta portatrice appartenga a famiglia con storia familiare già nota;
- comprendere se possa appartenere a famiglia in cui esista un caso sporadico;
- stabilire il tipo di emofilia (A o B) e la gravità della malattia (grave, moderata o lieve) presente nella famiglia;
- escludere la possibilità che la donna sia portatrice, attraverso l'analisi dell'albero genealogico; ad esempio, lo stato di portatrice può essere escluso nel caso di una donna in cui la familiarità per emofilia è presente nella linea paterna, e la donna in esame è figlia di un maschio sano (Figura 4);
- scegliere il percorso diagnostico da seguire, dal momento che questo è strettamente dipendente dal tipo e dalla gravità dell'emofilia.

Figura 4



Dosaggio del livello coagulante del FVIII o FIX

La conoscenza del livello di FVIII o FIX coagulante (FVIII:C, FIX:C) nella donna in esame non costituisce un buon criterio identificativo, ma fornisce solo indicazioni probabilistiche. Il riscontro di normali livelli plasmatici di FVIII o FIX non esclude, infatti, lo stato di portatrice. Ciò nonostante, nel caso in cui la donna risultasse portatrice, conoscere il suo livello di FVIII o FIX può essere utile per programmare un eventuale trattamento terapeutico in previsione di procedure chirurgiche ed invasive in genere, comprese la diagnosi prenatale, la diagnosi preimpianto (PGT) o in previsione del parto. I farmaci di scelta da utilizzare in tali occasioni sono rappresentati dalla desmopressina, per livello di FVIII <50% nelle portatrici di emofilia A, e FIX ricombinante, per livello di FIX <50% nelle portatrici di emofilia B.

Diagnosi molecolare di portatrice

Analisi indiretta

Con questo tipo di analisi non si ricerca direttamente la variante genica responsabile della malattia ma si sfrutta la presenza di marcatori genici, definiti *polimorfismi*, associati al gene *F8* o *F9*, localizzati all'interno (intragenici) o nelle vicinanze del gene (extragenici) in esame [31].

I *polimorfismi* sono varianti naturali nella sequenza di DNA che non provocano la malattia e che sono presenti nella popolazione generale con una frequenza superiore all'1%. La loro analisi, è oggi ampiamente superata da metodologie più avanzate che permettono l'identificazione diretta della variante genica responsabile della malattia. Ciò nonostante, sussistono condizioni in cui l'analisi diretta non permette di giungere ad una diagnosi definitiva. In questi casi, conoscere come la variante genica venga trasmessa nell'ambito della famiglia può essere di ausilio. L'accuratezza della diagnosi utilizzando tale metodica è pari al 95% per i marcatori extragenici e 99% per i marcatori intragenici.

Tuttavia, la sua applicabilità è limitata dalla disponibilità di alcuni componenti chiave della famiglia, non sempre facilmente reperibili:

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

Analisi diretta

Consiste nella identificazione della variante genica responsabile della malattia. L'approccio diagnostico si differenzia a seconda del tipo di emofilia, A o B, e sulla base della gravità clinica.

Analisi molecolare diretta dell'emofilia A grave

L'emofilia A grave può essere causata da numerose varianti geniche.

L'approccio diagnostico segue, pertanto, un percorso basato sull'analisi delle varianti che hanno una maggior frequenza nei pazienti emofilici (Figura 5).

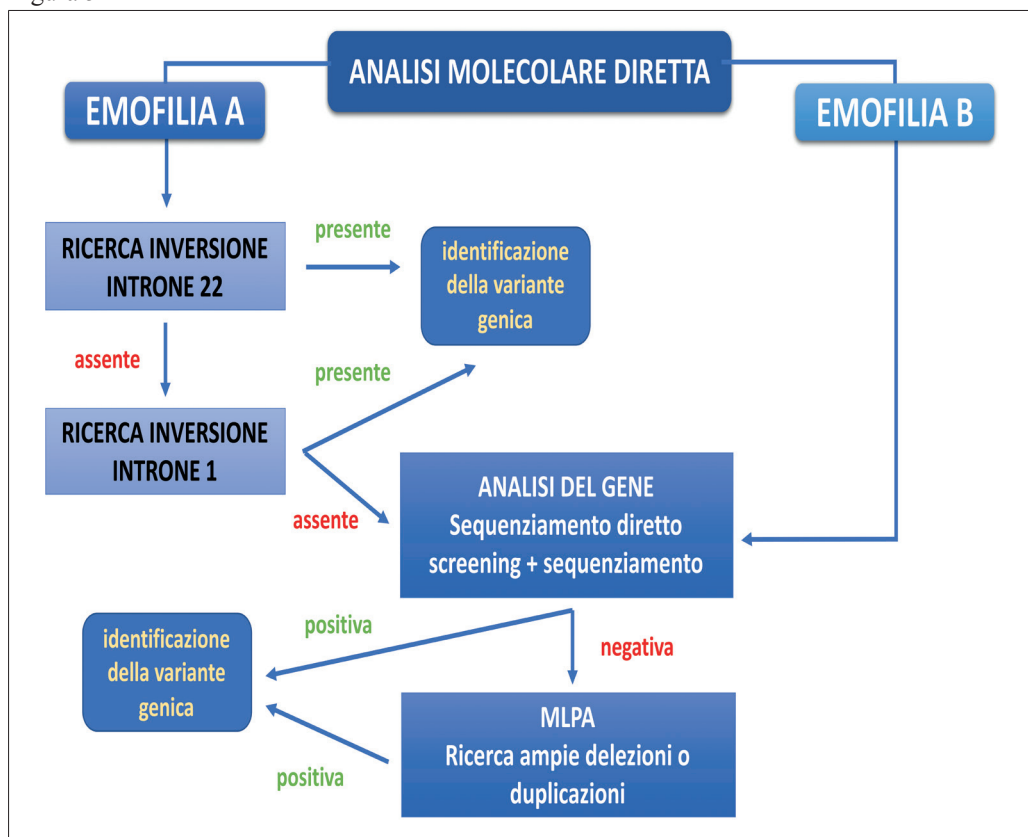
- **Inversione introne 22:** è il primo test che viene effettuato poiché questa mutazione è causa di emofilia A grave nel 40% circa dei casi, in tutte le popolazioni sinora studiate [32-34];
- **Inversione introne 1:** se l'inversione dell'introne 22 è assente, si procede con la ricerca dell'inversione dell'introne 1 che è causa della malattia nel 2% dei casi [35,36];

- **Analisi del gene *F8***: se entrambe le inversioni sono assenti, si procede con la ricerca di altre varianti geniche utilizzando tecniche di sequenziamento diretto o tecniche di screening associate a sequenziamento diretto [37,38]. Attualmente sono usate anche tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing) [39];
- **MLPA** (Multiple Ligation Probe Amplification): è una metodica che permette di individuare ampie delezioni o duplicazioni del gene [37-39].

Analisi molecolare diretta dell'emofilia B grave

Nell'emofilia B, non vi sono varianti geniche più frequenti. Per la loro ricerca si esegue, pertanto, l'analisi diretta del gene *F9*, utilizzando tecniche di sequenziamento diretto del gene o tecniche di screening associate a sequenziamento diretto [40] (Figura 5). Attualmente, sono usate anche tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS). La metodica MLPA è usata per l'individuazione di ampie delezioni o duplicazioni [41].

Figura 5



Analisi molecolare diretta dell'emofilia A e B moderata

Si procede mediante tecniche di sequenziamento diretto o di nuova generazione (NGS) dei geni *F8* o *F9* o con tecniche di screening associate a sequenziamento diretto.

Analisi molecolare diretta dell'emofilia A e B lieve

Non è solitamente consigliata data la lieve sintomatologia della malattia, ma può essere di particolare importanza per l'identificazione di varianti di emofilia A lieve associate ad elevato rischio di comparsa dell'inibitore [3, 42].

Database delle varianti geniche in emofilia

Le varianti geniche sinora identificate nei geni *F8* o *F9* sono riportate in database on-line la cui consultazione è gratuita e può essere effettuata agli indirizzi web:

EAHAD FVIII variant database: <http://f8-db.eahad.org/>

EAHAD FIX variant database: <http://f9-db.eahad.org/>

Inoltre, il sito web <https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>, permette di scaricare l'elenco delle varianti geniche riportate per il *F8* o *F9* sotto forma di tabelle.

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:C o FIX:C);
- DNA per la diagnosi molecolare.

Perché è importante accertare lo stato di portatrice?

Conoscere lo stato di portatrice è utile per avere un'adeguata informazione circa il rischio di trasmissione della malattia ai propri figli, sia in caso di storia familiare di emofilia sia in caso nella famiglia sia presente un caso sporadico.

A quale età si effettua la diagnosi di portatrice?

La diagnosi di portatrice dovrebbe essere effettuata al raggiungimento della maggiore età e, comunque, sempre prima di intraprendere una gravidanza, ma può essere anticipata, con il consenso dei genitori/legale rappresentante, in situazioni particolari come, ad esempio, in caso sia già in corso una gravidanza in donna di minore età.

Come la donna può ricevere tutte le informazioni necessarie per la diagnosi di portatrice

La donna può rivolgersi al Centro Emofilia di riferimento e ottenere tutte le informazioni necessarie durante una consulenza genetica che dovrebbe, sempre, essere effettuata prima di eseguire i test di laboratorio. Scopo di tale consulenza è fornirle tutti gli elementi utili a sottoscrivere un consapevole consenso informato, vale a dire informazioni riguardanti:

- Modalità di trasmissione genetica dell'emofilia e i test di diagnosi disponibili;
- Valutazione dei dati molecolari già a disposizione (analisi diretta o indiretta);
- Limiti delle tecniche disponibili e della possibilità che i risultati possano non essere informativi. Sarebbe, inoltre, opportuno che le sia fornito supporto psicologico nel corso dell'iter diagnostico che si sta avviando ad intraprendere. La consulenza deve, in ogni caso, essere attuata nel pieno e più ampio rispetto di ogni valore etico, culturale, sociale e religioso della donna che la richiede.

LA DIAGNOSI PRENATALE

La diagnosi prenatale comprende un insieme di indagini, invasive e non-invasive, finalizzate a individuare una patologia nel nascituro. Il suo scopo è offrire ai genitori la possibilità di conoscere, in tempi relativamente precoci (primo o secondo trimestre di gravidanza), se il feto sia affetto da una definita malattia, come nel caso dell'emofilia.

L'indicazione per la diagnosi prenatale è che la patologia, da cui può essere affetto il feto, sia grave. L'indagine prenatale comprende tecniche di tipo invasivo (villocentesi e/o amniocentesi), o noninvasivo (NIPT, non-invasive prenatal testing). Con le tecniche invasive si ottengono sia cellule che DNA di origine fetale su cui si eseguono le indagini per conoscere il sesso del nascituro, determinarne il cariotipo (corredo cromosomico), per escludere la presenza di eventuali anomalie cromosomiche, ed eventualmente le analisi molecolari. Nel caso specifico dell'emofilia, il sesso fetale viene determinato con metodiche di biologia molecolare tipo QF-PCR o analisi citogenetica, a seguito di villocentesi o amniocentesi. Nel caso il feto sia maschio, l'analisi proseguirà con la diagnosi molecolare, volta a verificare se il feto ha ricevuto dalla madre il cromosoma X con la variante genica causa di emofilia o il cromosoma X con il gene non alterato, privo cioè della variante genica identificata nella famiglia e nella donna portatrice. L'indagine molecolare non viene, generalmente, eseguita nel caso il feto risultasse di sesso femminile.

Come si ottiene il DNA fetale

Tecniche invasive

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

Entrambi i prelievi vengono eseguiti per via transaddominale sotto stretto controllo ecografico e ginecologico.

Quando è possibile effettuare la diagnosi prenatale?

- Il prelievo di villi coriali viene effettuato tra la 10^a e la 12^a settimana di gestazione
- Il prelievo di liquido amniotico si esegue classicamente nel secondo trimestre di gravidanza (15^a - 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 e tale da consentire di eseguire l'indagine in tempo utile.
- Nel caso di donne in gravidanza in età gestazionale avanzata ed in cui non si conosca la variante genica causa dell'emofilia, la diagnosi prenatale non può essere assicurata, poiché i tempi ridotti per eseguire l'analisi potrebbero non essere sufficienti per fornire una diagnosi certa ed accurata.

Il prelievo presenta dei rischi?

Il rischio di aborto attribuibile alla esecuzione del prelievo di villi coriali è dello 0.2-2%, mentre per l'amniocentesi il rischio è stato stimato dello 0.1-0.5%, come riportato nelle Linee Guida della Società Internazionale di Ecografia Ostetrica e Ginecologica (ISUOG) [43-45].

In quanto tempo si conosce il risultato?

- Generalmente, entro 3-7 giorni dal prelievo di villi coriali o dopo 15 giorni dal prelievo di liquido amniotico, 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 viene, in genere, effettuata entro 10 giorni.

Chi può sottoporsi alla diagnosi prenatale

- Tutte le donne in cui lo stato di portatrice sia stato precedentemente accertato e geneticamente caratterizzato con analisi dirette o indirette.
- Un caso particolare è rappresentato dalle madri di soggetti emofilici con varianti geniche "de novo". Queste donne non presentano la variante genica, responsabile della malattia, nel DNA estratto dai loro globuli bianchi ma sussiste, comunque, il rischio che esse possano avere un altro figlio affetto, a causa del fenomeno del mosaicismo germinale. Con il termine mosaicismo si intende la presenza di due tipi cellulari con un patrimonio genetico differente. Nel caso di una nuova gravidanza si suggerisce, pertanto, l'esecuzione di test diagnostici prenatali.

Quando è possibile interrompere la gravidanza?

In Italia l'interruzione di gravidanza è regolata dalla legge 194 del 1978² ed è consentita, entro i primi 90 giorni di gestazione, solo in caso la gravidanza e/o il parto costituiscano un rischio per la salute fisica e psichica della donna. Dopo il primo trimestre, l'interruzione di gravidanza è ammessa solo in caso un medico rilevi e certifichi che la gravidanza costituisce un grave pericolo per la vita della donna o per la sua salute fisica o psichica (ad esempio: a causa di gravi anomalie genetiche e/o di malformazioni dell'embrione o del feto, o a causa di gravi patologie materne come tumori o patologie psichiatriche). L'interruzione di gravidanza si pratica, dunque, dopo i primi tre mesi di gestazione ma entro la 22^a-24^a settimana di gestazione.

² "Norme per la tutela della maternità e sull'interruzione volontaria di gravidanza"

Tecniche di screening non-invasive: Analisi del DNA fetale su sangue materno (NIPT, non-invasive prenatal testing)

Da alcuni decenni, nuove linee di ricerca sono finalizzate allo sviluppo di procedure non-invasive, con l'intento di ridurre i rischi di aborto e di anticipare i tempi della diagnosi prenatale. Lo sviluppo di questi test si basa sulla presenza di DNA di origine fetale nel circolo materno già dalle prime settimane di gestazione. Il DNA fetale rappresenta il 3-10% circa del DNA totale nel plasma di una donna in gravidanza e varia con il progredire dell'età gestazionale [46]. Lo screening prenatale non invasivo basato sul DNA (NIPT) non è un test diagnostico ma un test di screening. Il test verifica sia il sesso del feto, nelle gravidanze a rischio per malattie genetiche X-linked, che la presenza delle più comuni anomalie cromosomiche (trisomia 13, trisomia 18 e trisomia 21). Nel caso specifico dell'emofilia, essendo una malattia legata al cromosoma X, tale test offre la possibilità di conoscere il sesso del nascituro con un semplice prelievo di sangue periferico. Nel caso il feto risulti di sesso femminile, si eviterebbe l'esecuzione di una procedura invasiva, quale villocentesi o amniocentesi mentre, nel caso di feto maschio, si procederà con le comuni tecniche invasive. Il test NIPT viene generalmente eseguito tra la 10^a e la 14^a settimana di gestazione, anche se può essere eseguito già dalla 8^a settimana ma con una minore sensibilità. I test non-invasivi non sono sostitutivi e perciò non evitano di effettuare le altre indagini cliniche, laboratoristiche e strumentali che fanno parte integrante del monitoraggio della gravidanza. Questo test di screening deve essere sempre associato all'ecografia morfologica, eseguita con strumentazione ad elevata tecnologia, onde valutare la crescita fetale endouterina; permette anche di stabilire il sesso del nascituro. Solitamente è eseguita intorno alla 20^a settimana, ma è possibile eseguire un'ecografia morfologica precoce fra la 16^a e la 19^a settimana. L'esecuzione dei test non invasivi non preclude la scelta, da parte della coppia, di effettuare una diagnosi prenatale di tipo invasivo. Tuttavia, è necessario che le donne che intendano sottoporsi a NIPT ricevano, preliminarmente, una consulenza genetica con la quale vengano fornite le informazioni necessarie a comprendere le finalità del test ed i suoi limiti, anche in rapporto alle altre tecniche di diagnosi prenatale disponibili, in modo da poter sottoscrivere un consapevole consenso informato scritto. Ciò è specificamente indicato nelle Linee guida del Ministero della Salute del 2015³.

³ "La consulenza ha lo scopo di definire le motivazioni che giustificano il ricorso allo screening, fornire informazioni sulle conoscenze che possono essere acquisite, sui rischi e sui benefici, sulle possibili conseguenze in rapporto alla percezione e all'accettabilità da parte dei genitori delle informative ricevute e delle decisioni da prendere, sulle possibilità di assistenza disponibili e sul percorso per la donna/coppia nel caso in cui il risultato sia patologico".

Diagnosi genetica di preimpianto (PGT, prenatal genetic testing)

Questa procedura identifica i difetti genetici negli embrioni prima del loro impianto in utero, avvalendosi di tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) e di indagini genetiche. Le indicazioni al test genetico preimpianto per malattie monogeniche (PGT-M) sono finalizzate alla diagnosi di una grave malattia geneticamente trasmissibile come evidenziato nella sentenza 229/2015⁴. Pertanto, per poter accedere al percorso PGT è necessaria la certificazione di rilevanza della malattia genetica rilasciata dall'equipe medica di un Centro autorizzato.

Preliminarmente, la coppia deve ricevere una consulenza da parte di un team multidisciplinare composto, almeno, da un genetista e un ginecologo esperti in diagnosi preimpianto. Tale valutazione ha lo scopo di verificare che siano rispettati i presupposti necessari per avviare le procedure di fertilità clinica e di laboratorio relative alla specifica patologia per la quale la coppia richiede il PGT. Il percorso PGT comprende diverse fasi schematicamente riassunte nella figura 6:

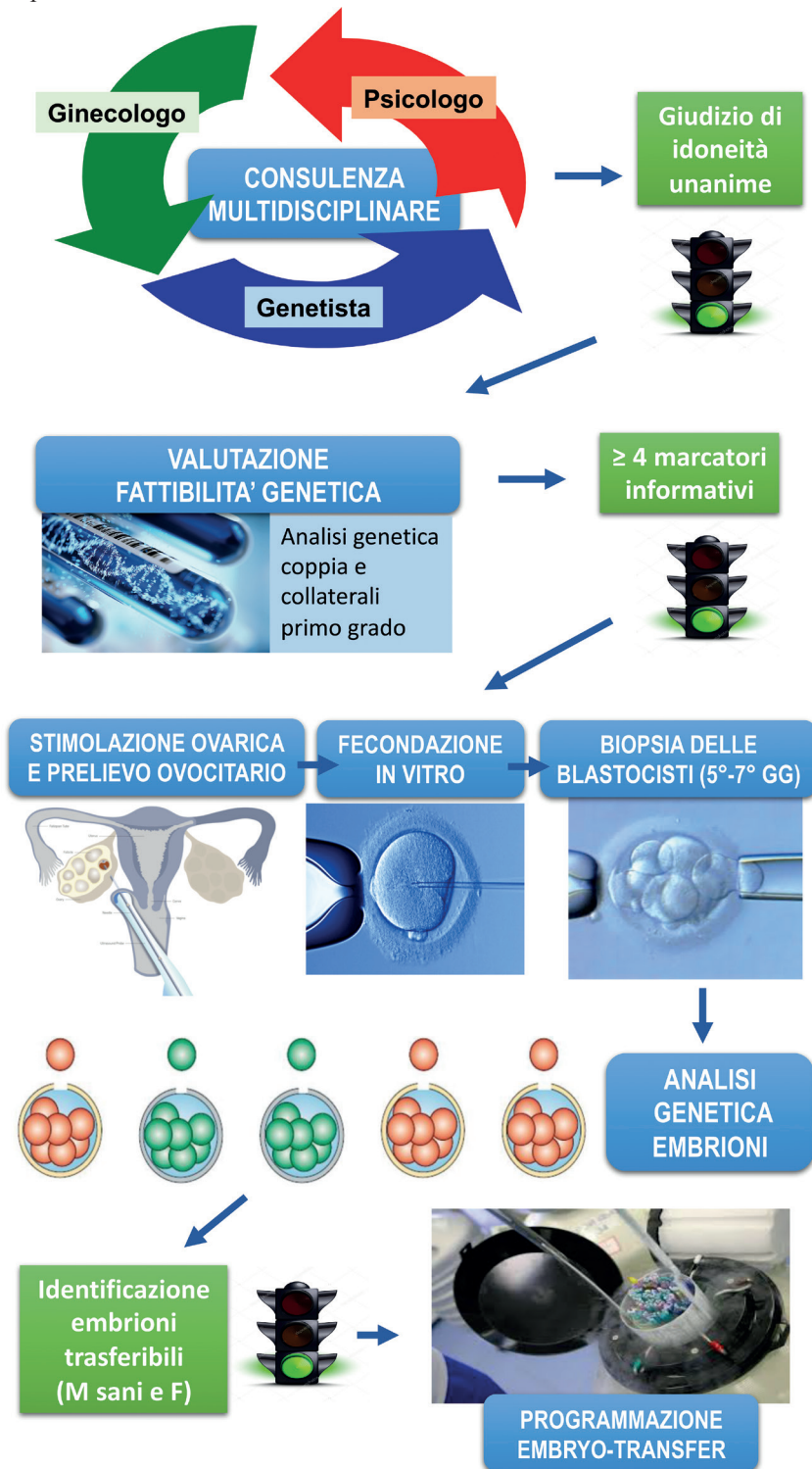
- In prima istanza, è necessario effettuare una consulenza multidisciplinare cui prendono parte genetista, ginecologo e psicologo, volta ad illustrare alla coppia il percorso relativo alla fecondazione in vitro, fornire una descrizione dettagliata delle procedure di PMA, prescrivere gli esami preliminari e informare la coppia circa le varie fasi attraverso cui viene condotta l'analisi genetica. Inoltre, vengono descritti i rischi collegati alla stimolazione ormonale cui dovrà sottoporsi la donna; nel caso specifico dell'emofilia, la donna portatrice viene informata del rischio di sanguinamento correlato alle procedure di PMA; il giudizio di idoneità al percorso dovrà essere unanime da parte degli specialisti interessati, anche in rapporto all'esito degli accertamenti richiesti nel corso della prima valutazione multidisciplinare.
- Qualora la coppia decidesse di intraprendere il percorso PGT, la fase successiva consiste nell'accertamento della fertilità genetica mediante analisi diretta delle varianti causative dell'emofilia e analisi indiretta basata sulla identificazione di marcatori informativi associati ai geni *F8* o *F9* all'interno della famiglia, utili nella ricostruzione della segregazione del gene malattia.
- Il genetista disporrà, quindi, i prelievi di sangue periferico e di cellule buccali

⁴ riferimento G.U. n. 46 del 18 novembre 2015

mediante tampone alla coppia, ai collaterali di primo grado e ad eventuali figli; le cellule buccali prelevate saranno utilizzate per simulare l'analisi genetica su singole cellule che verrà effettuata successivamente sulle cellule prelevate dall'embrione; solo nel caso l'analisi di fattibilità identifichi almeno 4 marcatori informativi, la coppia potrà continuare il percorso PGT.

- Il passo successivo consiste nella stimolazione ormonale, seguita dal prelievo di ovociti in regime di day-hospital; gli ovociti ottenuti verranno fecondati e messi in coltura fino al 5°-7° giorno, quando gli embrioni avranno raggiunto lo stadio di blastocisti; a questo stadio, in base alle specifiche caratteristiche di sviluppo dei singoli embrioni, viene eseguita la biopsia di alcune cellule che saranno sottoposte ad analisi per la ricerca della variante genica causa di emofilia, dei marcatori polimorfici risultati informativi nell'indagine genetica di fattibilità e dei marcatori per l'identificazione del sesso; gli embrioni da cui sono state prelevate le cellule vengono crioconservati singolarmente in attesa del risultato dell'analisi genetica.
- Mediante i test descritti vengono identificati gli embrioni trasferibili (tutti quelli di sesso femminile e quelli maschili che hanno ereditato il gene *F8* o *F9* non variato) e quelli non trasferibili, cioè gli embrioni di sesso maschile che hanno ereditato l'emofilia.
- La coppia viene informata dell'esito dell'analisi genetica durante un colloquio con i medici del centro che eseguirà la PMA. Durante la consulenza, qualora si decida il trasferimento degli embrioni, viene programmato il trasferimento embrionale su ciclo di scongelamento.
- Il trasferimento potrebbe non riguardare i soli embrioni risultati trasferibili in base all'analisi genetica, poiché la coppia può esprimere la volontà di trasferire embrioni con risultato dubbio o affetti.
- Gli embrioni non trasferiti rimarranno crioconservati.
- Solitamente, si consiglia alla coppia di eseguire i test prenatali sia non-invasivi che invasivi.

Figura 6. Il percorso PGT



BIBLIOGRAFIA

1. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 2001;344:1773-9.
2. White GC 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J; Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:560.
3. Makris M, Oldenburg J, Mauser-Bunschoten EP, Peerlinck K, Castaman G, Fijnvandraat K subcommittee on Factor VIII, Factor IX and Rare Bleeding Disorders. The definition, diagnosis and management of mild hemophilia A: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018;16:2530-2533.
4. Kasper CK, Lin JC. Prevalence of sporadic and familial haemophilia. *Haemophilia* 2007; 13:90-2.
5. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet* 2003;361:1801-9.
6. Franchini M, Mannucci PM. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:24.
7. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, Manco-Johnson MJ, van den Berg HM, Srivastava A; Subcommittee on Factor VIII, Factor IX and Rare Coagulation Disorders. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2014;12:1935-9.
8. Berntorp E, Boulyjenkov V, Brettler D, et al. Modern treatment of haemophilia. *Bull World Health Organ* 1995;73:691-701.
9. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia*. 2020 Aug 3. doi: 10.1111/hae.14046.
10. Colvin BT, Astermark J, Fischer K, et al.; Inter Disciplinary Working Group. European principles of haemophilia care. *Haemophilia* 2008;14:361-74.
11. Rocino A, Coppola A, Franchini M, et al.; Italian Association of Haemophilia Centres (AICE) Working Party. Principles of treatment and update of recommendations for the management of haemophilia and congenital bleeding disorders in Italy. *Blood Transfus* 2014;12:575-98.
12. Associazione Italiana Centri Emofilia (AICE). Principi di Trattamento e Aggiornamento delle Raccomandazioni per la Terapia Sostitutiva dell'Emofilia A e B. Disponibile alla pagina web: <https://aiceonline.org/?p=9792> Accesso 05.09.2020.
13. Shima M, Hanabusa H, Taki M, et al. Factor VIII-mimetic function of humanized bispecific antibody in hemophilia A. *New Engl J Med* 2016;374:2044-53.
14. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, et al. Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N Engl J Med* 2017;377:809-818.
15. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, et al. Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors. *N Engl J Med* 2018; 379:811-822.

16. Mannucci PM. Hemophilia therapy: the future has begun. *Haematologica* 2020;105:545-553.
17. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham E, et al. Long term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2014;371:1994-2004.
18. George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high specific activity factor IX variant. *N Engl J Med*. 2017;377:2215-2227.
19. Pasi KJ, Rangarajan S, Mitchell N, et al. Multiyear Follow-up of AAV5-hFVIIIISQ Gene Therapy for Hemophilia A. *N Engl J Med* 2020;382:29-40.
20. Rocino A, Franchini M, Coppola A. Treatment and prevention of bleeds in Haemophilia patients with inhibitors to Factor VIII/IX. *J Clin Med* 2017;6:46.
21. Astermark J. Inhibitor development: patient-determined risk factors. *Haemophilia* 2010; 16:66-70.
22. Gouw S.C., Fijnvandraat K. Identifying non genetic risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:740-751.
23. Gringeri A, Mantovani LG, Scalone L, Mannucci PM; COCIS Study Group. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood* 2003;102:2358-63.
24. Scalone L, Mantovani LG, Mannucci PM, Gringeri A; COCIS Study Investigators. Quality of life is associated to the orthopaedic status in haemophilic patients with inhibitors. *Haemophilia* 2006;12:154-62.
25. Carcao M, Escuriola-Ettingshausen C, Santagostino E, et al. The changing face of immune tolerance induction in haemophilia A with the advent of emicizumab. *Haemophilia* 2019; 25:676-684.
26. Coppola A, Di Minno MN, Santagostino E. Optimizing management of immune tolerance induction in patients with severe haemophilia A and inhibitors: towards evidence-based approaches. *Br J Haematol* 2010;150:515-28.
27. Male C, Andersson NG, Rafowicz A, et al. Inhibitor incidence in an unselected cohort of previously untreated patients with severe haemophilia B: a PedNet study. *Haematologica* 2020 Jan 9. doi: 10.3324/haematol.2019.239160 [Online ahead of print].
28. Hassan HJ, Leonardi A, Guerriero R, et al. Hemophilia B with inhibitor: molecular analysis of the subtotal deletion of the factor IX gene. *Blood* 1985;66:728-30.
29. Belvini D, Salviato R, Radossi P, Pierobon F, Mori P, Castaldo G, Tagariello G; AICE HB Study Group. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B. *Haematologica* 2005; 90:635-42.
30. Santoro C, Quintavalle G, Castaman G, Baldacci E, Ferretti A, Riccardi F, Tagliaferri A. Inhibitors in Hemophilia B. *Semin Thromb Hemost* 2018;44:578-589.
31. Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, et al. Haemophilia: strategies for carrier detection and prenatal diagnosis. *Bull World Health Organ* 1993;71:429-458.

32. Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993;5:236-241.
33. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995;86:2206-2212.
34. Margaglione M, Castaman G, Morfini M, et al. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica* 2008;93:722-8.
35. Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. Factor VIII gene intron 1 inversion: lower than expected prevalence in Italian haemophilic severe patients. *Haemophilia* 2004;10:1946.
36. Schroder J, El-Maarri O, Schwaab R, Muller CR, Oldenburg J. Factor VIII intron- 1 inversion: frequency and inhibitor prevalence. *J Thromb Haemost* 2006;4:1141-1143.
37. Al-Allaf FA, Taher MM, Abduljaleel Z, et al. Molecular analysis of factor VIII and factor IX genes in hemophilia patients: identification of novel mutations and molecular dynamics studies. *J Clin Med Res* 2017;9:317-331.
38. Belvini D, Salviato R, Radossi P, Tagariello G. Multiplex ligation dependent probe amplification as first mutation screening for large deletions and duplications in haemophilia. *Haemophilia* 2017;23:e124-e132.
39. Konkle BA, Johnsen JM, Wheeler M, Watson C, Skinner M, Pierce GF. Genotypes, phenotypes and whole genome sequence: approaches from the My Life Our Future haemophilia project. *Haemophilia* 2018; 24 (Suppl 6):87-94.
40. Belvini D, Salviato R, Radossi P, Pierobon F, Mori P, Castaldo G, Tagariello G; AICE HB Study Group. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B. *Haematologica* 2005;90:635-42.
41. Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. High resolution melting for F9 gene mutation analysis in patients with haemophilia B. *Blood Transfus* 2019;17:72-82.
42. Castaman G, Fijnvandraat K. Molecular and clinical predictors of inhibitor risk and its prevention and treatment in mild hemophilia A. *Blood* 2014;124:2333-6.
43. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:16-26.
44. ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho F, Coonen E, Goossens et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. *Hum Reprod Open* 2020;2020(3):hoaa021.
45. ESHRE PGT-M Working Group, Carvalho F, Moutou C, Dimitriadou E, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Hum Reprod Open* 2020;2020(3):hoaa018.
46. Brady P, Brison N, Van Den Bogaert K, et al. Clinical implementation of NIPT - technical and biological challenges. *Clin Genet* 2016;89:523-30.

INFORMAZIONI AGGIUNTIVE

Per la diagnosi di portatrice e la diagnosi prenatale è necessario rivolgersi ai Centri AICE che avvieranno l'iter diagnostico in collaborazione con i Laboratori di Genetica e Biologia Molecolare che con i Centri già strettamente collaborano.

L'elenco dei Centri Emofilia italiani aderenti all'AICE è consultabile alla pagina del sito ufficiale della Società: https://aiceonline.org/?page_id=758

La **tabella 1** riporta le informazioni circa i laboratori di Genetica e Biologia molecolare che collaborano con i Centri AICE per la diagnosi di portatrice e la diagnosi prenatale di emofilia A e B.

La **tabella 2** riporta i Centri pubblici e privati convenzionati che hanno aderito al 'Censimento dei Centri per la diagnosi pre-impianto per le portatrici di emofilia in Italia', comunicando informazioni a seguito della specifica richiesta di AICE inviata a tutti i Centri che eseguono diagnosi preimpianto secondo l'elenco pubblicato dall'Istituto Superiore di Sanità.

Tabella 1. LABORATORI SPECIALIZZATI CHE COLLABORANO CON I CENTRI AICE PER LA DIAGNOSI MOLECOLARE DI PORTATRICE DI EMOFILIA E LA DIAGNOSI PRENATALE*

Laboratorio	Referente/i di laboratorio per l'emofilia - Recapiti	Diagnosi molecolare di portatrice	Consulenza Genetica Prenatale	Gestione materiale ottenuto da procedure invasive**	Diagnosi molecolare prenatale
Centro Emofilia e Trombosi "Angelo Bianchi Bonomi" UOC Medicina Generale Emostasi e Trombosi Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Via Pace, 9 - 20122 Milano	Dr.ssa Isabella Garagiola Dr.ssa Mimosa Mortarino Tel. 0255035414 isabella_garagiola@yahoo.it mimosamortarino@hotmail.com	SI	SI	SI	SI
IRCCS Istituto Giannina Gaslini - Dipartimento Ricerca Traslationale, Medicina di Laboratorio, Diagnostica e Servizi Via Gerolamo Gaslini, 5 - 16147 Genova	Dr.ssa Maura Acquila Tel. 01056362822 mauraacquila@gaslini.org	SI	SI	SI	SI
UOSD Medicina Trasfusionale P.O. San Giacomo - AULSS2 Azienda 2 Marca Trevigiana Distretto di Asolo - Via dei Carpani, 16/Z 31033 Castelfranco Veneto	Dr.ssa Roberta Salviato Tel. 0423732326 genetica.molecolare@aulss2. veneto.it	SI	NO	NO	SI
UOSD Malattie Trombotiche ed Emorragiche - Azienda Universitaria Ospedaliera di Padova Via Giustiniani, 2 - 35128 Padova	Dr.ssa Cristiana Bulato Tel. 0498212583 - 0498212666 cristiana.bulato@unipd.it	SI	SI	NO	NO
SSD Centro Hub Emofilia e Malattie Emorragiche Congenite c/o U.O. Genetica Medica Padiglione Cattani I piano - Azienda Ospedaliero - Universitaria di Parma Via A. Gramsci, 14 - 43126 Parma	Dr.ssa Federica Riccardi Tel. 0521704466 friccardi@ao.pr.it	SI	SI	SI	SI
SOD Diagnostica Genetica Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi Largo G. Brambilla, 3 - 50134 Firenze	Dr.ssa Elisabetta Pelo Dr.ssa Barbara Minuti Tel. 0557949363 peloe@aou-careggi.toscana.it minutib@aou-careggi.toscana.it	SI	SI	SI	SI
Servizio di Genetica Medica Azienda Ospedaliero Universitaria "Ospedali Riuniti di Foggia" Viale L. Pinto, 1 - 71122 Foggia	Prof.ssa Rosa Santacroce Dr.ssa Angelica Leccese Tel. 0881588018 rosa.santacroce@unifg.it	SI	SI	SI	SI
Laboratorio Centralizzato di Diagnostica molecolare avanzata, CEINGE - Biotecnologie Avanzate Via G. Salvatore, 486 - 80145 Napoli	Prof. Giuseppe Castaldo tel. 0813737859 giuseppe.castaldo@unina.it Accettazione centralizzata: tel. 0813737781/727 accettazione@ceinge.unina.it Consulenza genetica: tel. 0813737898 genetica.unina@gmail.com	SI	SI multi- disciplinare	SI	SI

* La consulenza genetica viene svolta in tutti i centri AICE; Medici esperti del settore e/o Medici genetisti prendono in carico la paziente e, qualora necessario, ne facilitano il percorso in collaborazione con il Servizio di Genetica Medica e/o il Centro di Diagnosi Prenatale della propria struttura di appartenenza ** estrazione DNA/esclusione contaminazione materna

Tabella 2. CENTRI PUBBLICI E PRIVATI CONVENZIONATI CHE EFFETTUANO DIAGNOSI PRE-IMPIANTO PER EMOFILIA S

Centro/indirizzo	Responsabile del Centro	Telefono / e-mail	Laboratorio di Genetica di riferimento	PGT-M	PGT-A	PGT-SR	Documenti necessari per accedere al servizio
Centro di Fisiopatologia della Riproduzione Umana Via Valle Oppio, 2 44023 Lagosanto (FE)	Dr. Andrea Gallinelli Responsabile di Laboratorio: Dr. Francesco Capodanno Referente Diagnosi Pre-Impianto: Dr. Attilio Anastasi	tel. 0533723169 dal Lunedì al Venerdì, dalle 8.30 alle 9.30 e dalle 12.00 alle 14.00 pma@ausl.fe.it tel. 0533723375 attilio.anastasi@ausl.fe.it	Igenomix- Marostica (VI) In futuro: Laboratorio di Genetica Medica Università degli Studi di Ferrara	SI	SI	SI	- Cariotipo - Consulenza e referto genetico per l'eventuale malattia/mutazione (PGT-M, PGT-SR) Tutti gli altri esami per procedere col servizio verranno prescritti in sede in seguito al primo colloquio con la coppia.
APSS (Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari) Trento Centro Provinciale per la Procreazione Medicalmente Assistita Servizio Ospedaliero Provinciale Struttura Ospedaliera di Arco Via Capitelli, 48 38062 Arco (TN)	Dr. Arne Luehwink	Tel. 0464582631 pma@apss.tn.it	Igenomix- Marostica (VI)	SI	SI*	SI	LEI: Hb patologica Sierologia: HCV -HIV - VDRL - HbsAG AMH TSH - Rubeo test Visita ginecologia, pap-test ed ecografia Cariotipo Emocromo Gruppo + RH LUI: Sierologia: HCV - HIV - VDRL - HbsAG, Hb patologica Spermiogramma Cariotipo Emocromo Fibrosi cistica Gruppo + RH
Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico di natura pubblica Via F. Sforza, 28 20122 Milano (MI)	Dr.ssa Alessandra Riccaboni	pgd@policlinico.mi.it	Interno alla struttura	SI	NO	NO	Tutta la documentazione in possesso della coppia deve essere inviata all'indirizzo e-mail indicato
Costi/convenzioni: Il percorso è pubblico							

Fisiopatologia della Riproduzione Centro di Procreazione Medicalmente Assistita Ospedale Cervesi di Cattolica AUSL Romagna Via Beethoven, 2 47841 Cattolica (RN)	Dr.ssa Valeria Polli	Tel. 0541966391 fpr.rn@auslromagna.it	UO Genetica Medica dell'AUSL Romagna	SI	SI	NO	- esami richiesti per la tecnica di PMA omologa - Consulenza genetica
---	----------------------	--	--------------------------------------	----	----	----	--

Costi/convenzioni: Il percorso è pubblico. Non ci sono costi per la coppia.

UO Genetica Medica Romagna Piazzale della Liberazione, 60 47522 Pievesestina di Cesena Servizio di Fisiopatologia della Riproduzione Umana AUSL della Romagna P.O. di Lugo Viale Dante, 10 48022 Lugo (RA)	Dr. Luca Maria Rocchetti	geneticamedica.ce@auslromagna.it	UO Genetica Medica dell'AUSL Romagna	SI	SI	SI	Tutti gli esami già effettuati da valutare durante la prima visita genetica
Dr.ssa Valeria Rambelli	prenotazionigenetica@auslromagna.it	Test S.r.l. Modena					

Costi/convenzioni: Il costo della prestazione deve essere garantito dalla Direzione Sanitaria dei Presidi di appartenenza della donna, che garantisce la copertura della spesa compilando un apposito modulo di autorizzazione. Questo modulo viene fornito in fac-simile alle coppie che risiedono fuori della AUSL Romagna insieme alla relazione clinica di Genetica Medica, che prescrive la prestazione, affinché la coppia ottenga analogo titolo dalla Direzione Sanitaria del presidio di appartenenza.

Centro di Procreazione Medicalmente Assistita Ospedale Valdichiana Santa Margherita di Cortona Località Fratta, 145 52040 Cortona (AR)	Prof. Luca Mencaglia	Tel. 0575639278 (attivo dal lunedì al venerdì dalle 9,00-13,00 e dalle 14,00-17,00) Fax: 0575639275 info@retepma.it	UO Genetica Medica dell'AOU di Siena	SI	NO	NO	- nome e cognome dei membri della coppia - data di nascita e provincia di residenza della partner femminile - 2 recapiti telefonici + e-mail - breve storia clinica - referto genetico attestante il tipo di patologia - referto esame AMH della partner femminile
---	----------------------	--	--------------------------------------	----	----	----	---

Costi/convenzioni: Servizio in convenzione per i residenti nella regione Toscana e per coloro che ottengono l'autorizzazione dalla loro ASL di residenza. In tutti gli altri casi il percorso è a carico del paziente (costi in delibera della regione Toscana 444/2019-Allegato A)

UOSD Centro PMA Sant'Anna via Garigliano, 55 00198 Roma (RM)	Dr.ssa Maria Rita Rampini	Tel. 0677302626 Tel. 0677302625 fecondazioneassistita@ aslroma1.it	Laboratorio GENOMA Roma	SI	NO	NO	L'accesso al servizio avviene tramite la prenotazione della prima visita al cup regionale 069939 con impegnativa del medico curante "visita ginecologica per sterilità" e "visita andrologica per sterilità".
---	------------------------------	---	-------------------------------	----	----	----	---

Costi/convenzioni: Il centro offre alle coppie portatrici di malattie geneticamente trasmesse la possibilità di accedere alla diagnosi pre-impianto (PGT-M) non si può accedere alla PGT-A. Il centro è pubblico e segue le normative vigenti nella regione Lazio per quanto attiene alla compartecipazione per la fecondazione in vitro. Per la parte della diagnosi genetica il costo è a carico dei pazienti.

Ospedale Pediatrico Microcitmico "Antonio Cao" S.C. Fisiopatologia della Riproduzione Umana e Diagnosi Prenatale Via E. Jenner snc, 09121 Cagliari (CA)	Dr. Giovanni Monni	Tel. 07052965546 prenatalmonni@ gmail.com	Laboratorio di Genetica e Genomica Ospedale Pediatrico Microcitmico, Cagliari Laboratorio GENOMA Roma	SI	NO	NO	Valutazione genetica della coppia, valutazione clinica per infertilità di coppia
---	--------------------	---	---	----	----	----	--

Costi/convenzioni: Ospedale Pubblico; per i residenti in Sardegna i costi delle procedure sono a carico della regione Sardegna, per i non residenti i costi sono a carico della regione di appartenenza. Possibilità di effettuare le prestazioni in regime di solvenza nei casi in cui la regione non autorizzi la spesa.

CENTRI PRIVATI CONVENZIONATI

CENTRO SCIENZE DELLA NATALITA', IRCCS Ospedale San Raffaele via Olgettina, 60 Milano	Prof. Massimo Candiani Dr. Enrico Papaleo	Tel. 0226436820 prenotazioni.natalità@ hsr.it	Laboratorio GENOMA Roma	SI	SI	NO	Consulenza genetica
--	---	---	-------------------------------	----	----	----	---------------------

Costi/convenzioni: PMA in convenzione con il SSN. PGT a carico della coppia.

Promea S.p.a. Via F. Menabrea, 14 10126 Torino	Direttore Sanitario: Dr. Vincenzo Arena Responsabile PMA: Dott Antonio Monaco	Telefono: 0116640800 info@promea.net	Laboratorio GENOMA Roma Igenomix- Marostica (VI)	SI	SI	SI	- cariotipo - fibrosi cistica - consulenza genetica in base alla situazione clinica pregressa
--	--	---	--	----	----	----	--

Costi/convenzioni: La diagnosi pre-impianto non usufruisce del SSN, come disposto dalla Regione Piemonte.

Centro Demetra, via Giulio Caccini 18 50141 Firenze	Dr.ssa Claudia Livi (anche referente per la Diagnosi preimpianto)	Telefoni: 055416231/ 055488709 direzionesanitaria@ centrodemetra.com	Igenomix- Marostica (VI)	SI	SI	SI	Tutti gli esami già effettuati (dosaggi ormonali, isteroscopia, esame seminale, etc) - cariotipo di entrambi i partners.
---	--	--	-----------------------------	----	----	----	---

Costi/convenzioni: I cicli di FIVET/ICSI sono generalmente effettuati in convenzione, mentre la diagnosi preimpianto può essere effettuata in regime convenzionato (attualmente) solo in Toscana, Emilia-Romagna (con autorizzazione specifica), Veneto (con autorizzazione specifica). Nel caso in cui la coppia non possa ottenere l'autorizzazione per la pre-impianto, il costo da sostenere è variabile in relazione alla tipologia di diagnosi richiesta e, in particolare, in base a se si tratti di malattie monogeniche o meno. Nel caso sia richiesta l'analisi per malattia monogenica, come nel caso dell'emofilia, la prestazione comprende l'analisi cromosomica su due blastocisti trasferibili con costi aggiuntivi per ogni blastocisti aggiuntivo richiesto.

Chianciano Salute SpA Via C. Marchesi, 73 53042 Chianciano Terme (SI)	Dr. Alfonso Maria Irollo Dr. Ezio Stortini	Tel. 057862713 Fax: 0578/62713 info@chiancianosalute. com www.chiancianosalute. com referenti: agoi@me.com e.stortini@chiancianos- alute.com	Altamedica Roma Toma Centro Sud - Napoli	SI	SI	NO	Esami genetici e consulenza genetica
--	--	---	---	----	----	----	---

Costi/convenzioni: Le tecniche di PMA si eseguono in regime convenzionato con il SSN e in regime privato.

Le procedure di PGT-M/PGT-A si eseguono in regime privato.

PGT-M: Test Genetico Pre-impianto per Malattie Monogeniche - ex PGD; PGT-A: Test Genetico Preimpianto per aneuploidie - ex PGS; PGT-SR: Test Genetico Preimpianto per riarrangiamenti strutturali; PMA: Procreazione Medicalmente Assistita.

§ Le informazioni inserite nella Tabella sono state ottenute direttamente dai Centri.

Sono riportati i Centri che hanno aderito e fornito informazioni entro il 10.09.2020 ad una richiesta di partecipazione al 'Censimento dei Centri per la diagnosi pre-impianto per le portatrici di emofilia in Italia' inviata via mail a nome del Gruppo di Lavoro Genetica e del Presidente Reggente dell'AICE il 26.08.2020. I destinatari della richiesta sono stati tutti i Centri pubblici e privati convenzionati che eseguono diagnosi pre-impianto, identificati consultando il censimento effettuato dall'Istituto Superiore della Sanità (<https://w3.iss.it/site/RegistroPMA/PUB/Centri/CentriPMA.aspx>). Allo stesso link è possibile visionare l'elenco dei centri italiani pubblici, privati convenzionati e privati che eseguono Procreazione Medicalmente assistita.

*attualmente solo su indicazione medica.

