

INTRODUZIONE

Per doppio difetto globinico si intende:

1. **Un composto eterozigote:** prodotto da singoli difetti diversi, puntiformi o delezionali, presenti su geni uguali di entrambi gli alleli (es. Hb S + β talassemia, Hb Hasharon + α talassemia).
2. **Un difetto allo stato omozigote:** condizione che si presenta con difetti uguali che interessano geni uguali su entrambi gli alleli (es. Hb S / Hb S, β tal (cod 39) / β tal (cod 39)).
3. **Una associazione di difetti:** combinazione di difetti su geni diversi, sullo stesso allele o su alleli diversi (es. Hb S + α talassemia, β talassemia + varianti δ , α talassemia + β talassemia).

La presenza di due o più difetti, come ai punti 1 e 2 produce di solito fenotipi clinicamente più importanti, mentre una loro associazione (punto 3), nella maggior parte dei casi, comporta dei fenotipi lievi.

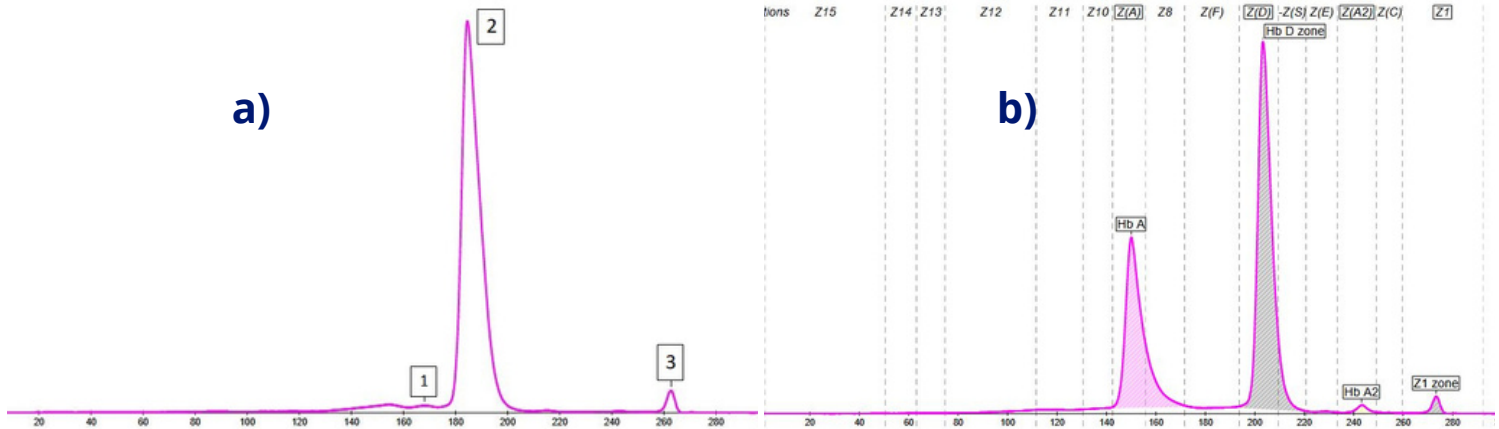
I metodi quali-quantitativi utilizzati per la separazione delle componenti fisio-patologiche dell'emoglobina (Hb), in particolare l'elettroforesi capillare (CE), consentono, in molti casi, di poter ipotizzare la presenza di più difetti globinici e procedere in modo appropriato, nella maggior parte dei casi, alla caratterizzazione molecolare.

Questo «caso 14» pone l'attenzione su tre pazienti nei quali una conclusione presuntiva di 1° livello può risultare più complessa.

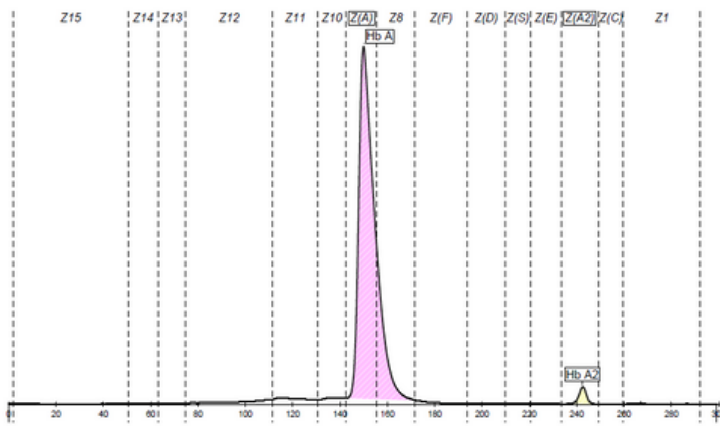
CASO 14

DOPPI DIFETTI GLOBINICI:
SOSPETTI E CONCLUSIONI DI 1° LIVELLO

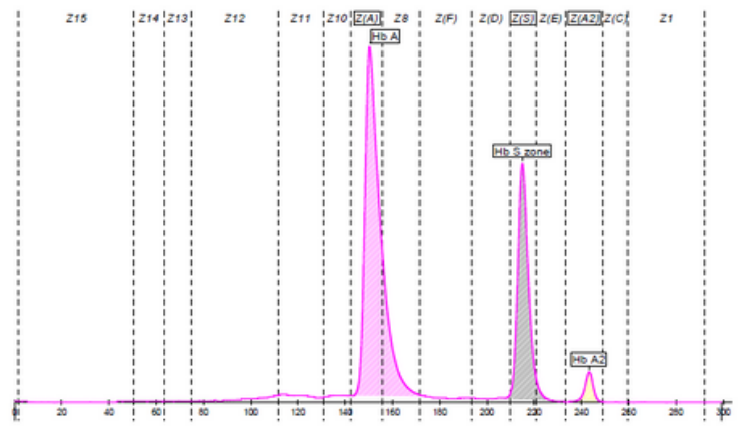
PAZIENTE 1



PAZIENTE 2



PAZIENTE 3



ASSETTO EMOGLOBINICO

	VALORI RIFERIMENTO	PAZIENTE 1	PAZIENTE 2	PAZIENTE 3
Hb A2	2,2-3,2	Assente	2,5%	3,2%
Hb A2-X	-	2,4%	-	-
Hb F	inf. 1%	Assente	Assente	Assente
Hb X	-	97,6%	-	28,1%

DATI DEL PAZIENTE

	VALORI RIFERIMENTO	PAZIENTE 1	PAZIENTE 2	PAZIENTE 3
Età (sesso)		26 (F)	30 (M)	27 (F)
RBC ($10^{12}/L$)	4,0-5,4	4,69	5,18	4,80
HGB (g/L)	120,0-140,0	99,0 <	124	115,0 <
HCT	0,38-0,47	0,31 <	0,37 <	0,35 <
MCV (fL)	82-98	66,3 <	72,4 <	74,6 <
MCH (pg)	25,0-34,0	21,1 <	23,9 <	24,0 <
Assetto marziale		Normale	Normale	Normale
Gravidanza		SI	-	SI
Origini		Italia	Italia	Africa

INTERPRETAZIONI

Paziente 1)

La presenza di un profilo elettroforetico con i picchi numerati e senza l'indicazione delle zone di migrazione [a] richiede una seconda corsa elettroforetica con sangue normale di controllo (mix) [b] come previsto dalle procedure del Produttore per verificare la corretta migrazione elettroforetica.

-Il picco 2 in [a] viene collocato in «Hb D zone» in [b]; ne consegue che l'Hb A risulta assente nel campione nativo [a].

-In [b] l'Hb A2 presente è quella del sangue di controllo mentre il picco visibile in «Z1» corrisponde al picco 3 in [a] e verosimilmente rappresenta l'unica Hb A2 presente, quindi nel sangue del paziente vi sarà solo una Hb A2-X al 2,4%.

L'assenza di Hb A e di Hb A2 normale deve far pensare alla mancata sintesi di catene α normali e quindi alla presenza di difetti che interessano tutti i quattro geni α . Si possono ipotizzare più difetti combinati ma i parametri eritrocitari e quelli emoglobinici fanno supporre maggiormente la presenza di varianti alfa e difetti alfa talassemici su entrambi gli alleli.

La caratterizzazione molecolare successiva ha mostrato la presenza di Hb G Philadelphia (variante delle catene α) allo stato omozigote e a talassemia (-3.7kb) allo stato omozigote.

L'espressione e le caratteristiche funzionali di questi difetti sono tali da produrre un fenotipo clinico non significativamente alterato. È possibile comunque che lo stato di gravidanza condizioni in negativo i diversi parametri eritrocitari e gli esami al partner sono comunque da consigliare.

Paziente 2)

In questo caso si potrebbe supporre subito la presenza di α talassemia. Tuttavia, pur non essendo apparentemente possibili altre spiegazioni, si deve procedere secondo le indicazioni delle raccomandazioni: "in presenza di microcitosi evidente, soprattutto in gravidanza e con un assetto marziale nella norma, ogni ipotesi di α talassemia deve essere confermata da un esame molecolare".

La caratterizzazione molecolare in questo paziente ha dimostrato invece la presenza di un difetto β talassemico (cod 39) e una variante delle δ catene (Hb A2-Asti).

La variante Hb A2-Asti in CE ed in HPLC non si separa dall'Hb A, non si rende visibile e si sottrae quindi alla corretta quantificazione dell'Hb A2 che appare normale (2,5%). Ciò non ha consentito di supporre subito la presenza di β talassemia. Questo quadro di doppio difetto non era quindi possibile ipotizzarlo con esami di 1° livello ma la corretta gestione degli esami e una adeguata comunicazione dei risultati che orientano verso il 2° livello diagnostico hanno permesso di riconoscere nel paziente la condizione di β talassemia, importante per il percorso di prevenzione e di consulenza.

Paziente 3)

Se si escludono in questo paziente trasfusioni negli ultimi tre mesi, la percentuale relativa del 28,1% appare senz'altro inferiore a quella attesa per la variante Hb S allo stato eterozigote. In assenza di anemia marcata tale dato può far supporre la presenza di α talassemia.

In questo caso la presenza di una variante e la relativa quantificazione ci possono dare indicazioni utili per concludere l'esame di 1° livello. Tuttavia la segnalazione di Hb S, prodotta dal sistema separativo, dovrà essere confermata mediante test specifico (sickling) o molecolare non tralasciando di valutare la coerenza dei dati quantitativi che possono far pensare alla presenza di un trait alfa talassemico associato.

L'approfondimento molecolare e/o l'esame al partner in un caso come questo è previsto dalle raccomandazioni e avrà la finalità di valutare un eventuale rischio di trasmissione per la coppia di anemia falciforme o di emoglobinosi H. In gravidanza, l'urgenza di una diagnosi può suggerire di procedere in contemporanea con gli esami al partner e con gli esami di conferma di 2° livello per i difetti accertati o se la partner sia in gravidanza ma tali informazioni devono comunque essere fornite.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

- L'analisi del partner e/o l'esame molecolare deve essere considerato appropriato in gravidanza quando anche uno solo dei parametri di riferimento (assetto Hb, emocromo) è alterato, dopo aver escluso la carenza di ferro.
- L'assenza di Hb A e dell'Hb A2 deve far sospettare il coinvolgimento di più difetti dei geni α -globinici.
- L'assenza di Hb A con Hb A2 presente deve far sospettare il coinvolgimento di più difetti dei geni β -globinici.
- In un soggetto non trasfuso la percentuale relativa di una variante Hb può orientare a diagnosticare presuntivamente anche la presenza di composti o associazioni con α o β talassemia.
- Anche la presenza e la quantità relativa di una eventuale Hb A2-X contribuisce a formulare una conclusione presuntiva di 1° livello.
- La riflessione sugli esami di 1° livello nei tre pazienti ha comportato in ogni caso la caratterizzazione molecolare che ha dimostrato la presenza di più difetti.
- Oggi tale approccio diagnostico completo è reso più preciso e veloce dal sequenziamento di nuova generazione (NGS) che è disponibile in diversi laboratori di riferimento. Tuttavia, occorre considerare che i pannelli di esami oggi in uso non consentono di analizzare il gene delta per il quale sarà indispensabile procedere mediante sequenziamento tradizionale secondo Sanger.

BIBLIOGRAFIA

1. • www.site-italia.org: Diagnostica di I e II livello delle Emoglobinopatie Buone Pratiche SITE, 2022.
2. • Ivaldi G, Barberio G, Carta M, et al. Diagnosi di laboratorio e prevenzione delle emoglobinopatie: considerazioni e proposte sulla comunicazione del risultato degli esami di primo livello. *Biochim Clin* 2010;34:277-82.
3. • Barberio G, Ivaldi G. (2020). Emoglobinopatie. Dalla diagnosi alle consulenze specialistiche. Piccin.