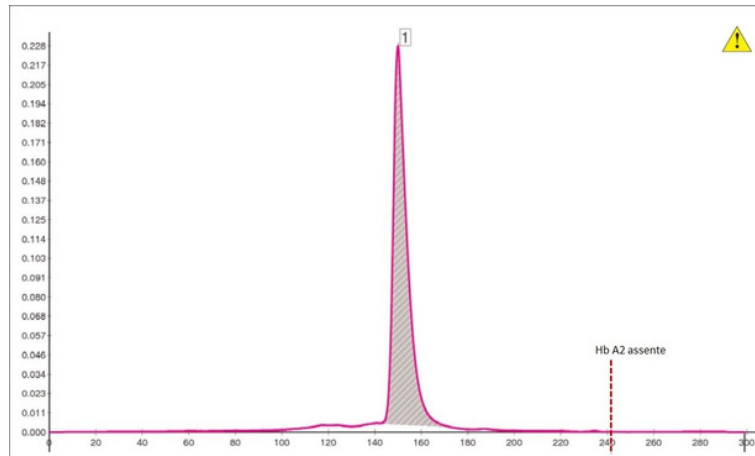
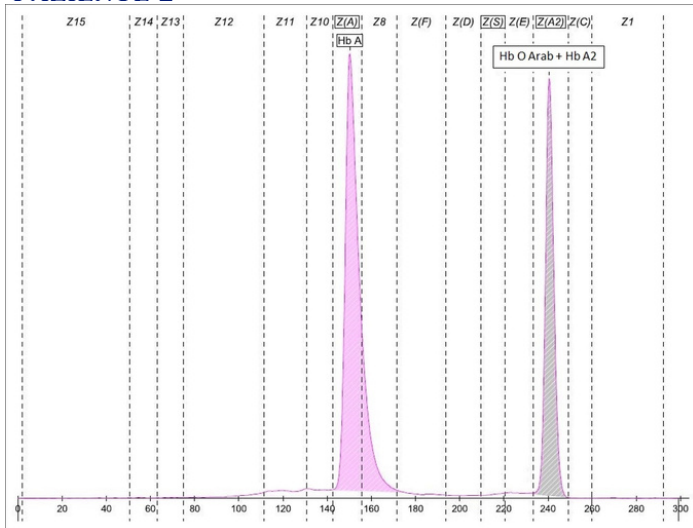


CASO 12

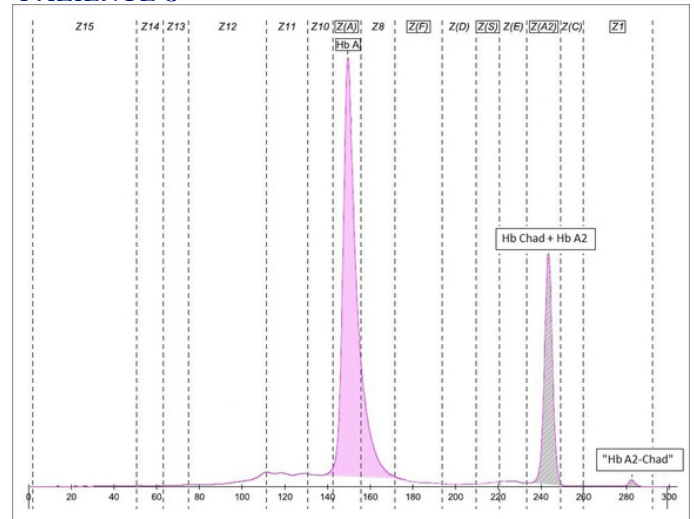
PAZIENTE 1



PAZIENTE 2



PAZIENTE 3



ASSETTO EMOGLOBINICO

	PAZIENTE 1	PAZIENTE 2	PAZIENTE 3
Hb A2	Assente	Non quantificabile	Non quantificabile
Hb A2-X	Assente	Assente	0,6%
Hb F	Assente	Assente	Assente
Hb X + Hb A2	Assente	37,7%	20,3%

DATI DEL PAZIENTE

	PAZIENTE 1	PAZIENTE 2	PAZIENTE 3
Età (sesso)	50 (M)	38 (F)	26 (F)
RBC ($10^{12}/L$)	5,08	5,83 >	4,29
HGB (g/L)	143,0	157,0 >	126,0
HCT	0,43	0,46	0,37 <
MCV (fL)	85,5	80,0 <	87,6
MCH (pg)	28,2	26,9	29,4
Assetto marziale	Normale	Normale	Normale
Gravidanza	-	no	sì
Origini	Italia	Italia	Italia

CASO 12

Paziente 1) È presente un segnale d'allarme e non vengono visualizzate le classiche 15 zone di migrazione. L'unica frazione Hb che si osserva è l'Hb A che risulta quindi pari al 100%.

Questo quadro consente di ipotizzare la presenza di una δ -talassemia evidentemente allo stato omozigote: non si osserva alcuna significativa alterazione dei parametri eritrocitari e del fenotipo clinico. Si può supporre pertanto che il paziente non presenti alcun difetto β -talassemico, ma si rende comunque opportuno procedere con l'esame molecolare dei geni δ e dei geni β . L'analisi molecolare ha dimostrato la presenza della δ^0 -talassemia [IVS-II-897 A>G; HBD:c.316-2A>G] allo stato omozigote (2) e assenza di difetti dei geni beta.

Paziente 2) In questo caso, l'Hb A2 migra verosimilmente assieme alla variante che la successiva caratterizzazione molecolare ha dimostrato essere l'Hb O-Arab: [β 121(GH4) Glu>Lys; HBB:c.364G>A] (3).

L'Hb O-Arab è una variante delle catene β -globiniche descritta anche in combinazione con Hb S, Hb C, β -talassemia e α -talassemia in diversi gruppi etnici. Il composto eterozigote con Hb S presenta fenotipi SCD-simili. In questo Paziente possiamo con certezza escludere la presenza di β -talassemia per almeno tre motivi anche se la variante ci impedisce di valutare l'Hb A2 in quanto:

-I parametri eritrocitari non risultano significativamente alterati

-Non è presente Hb A2-X in «Z1» quindi la variante interferente è dovuta ad una mutazione di un gene β^{O-ARAB}

-È presente Hb A a dimostrazione della presenza di un gene $\beta^{NORMALE}$ (mentre l'altro gene risulta β)

Il Paziente è quindi portatore di Hb O-Arab allo stato eterozigote.

Paziente 3) Anche in questo caso l'Hb A2 migra verosimilmente assieme ad una variante che la successiva caratterizzazione ha dimostrato essere l'Hb Chad: [α 23(B4) Glu>Lys; HBA2:c.70G>A] una variante asintomatica delle α -catene (4).

L'appartenenza di questa variante alle catene α la possiamo dedurre facilmente anche osservando il profilo elettroforetico che mostra un picco minore in «Z1». È proprio questa la situazione che si osserva quando è presente una mutazione che coinvolge uno o più geni α . Si ha infatti la formazione di una frazione ridotta dell'Hb A2, formata dalle catene α mutate con le catene δ normali ($\alpha\delta$ CHAD δ 2), che migra in una zona più elettro-negativa rispetto all'Hb A2-normale. Anche in questo caso, come nel Paziente 2, potremmo escludere la presenza di β -talassemia eterozigote, ma occorre valutare con attenzione:

-La quantità relativa di α -variante (5)

-La quantità relativa di Hb A2CHAD (5)

-I parametri eritrocitari e l'assetto marziale

Nel caso dell'interferenza prodotta da una α -variante la presenza di Hb A non rappresenta una condizione sufficiente per escludere l'associazione con β -talassemia. Pertanto l'analisi molecolare rimane l'opzione più raccomandata.

PREMESSA

Questo «caso clinico» pone l'attenzione sulle circostanze in cui l'emoglobina A2 (Hb A2) non può essere valutata, quando cioè viene a mancare il parametro principale per la diagnosi di laboratorio finalizzata alla ricerca e prevenzione dei difetti talassemici.

L'impossibilità di valutare l'Hb A2 ($\alpha\delta$ 52) può dipendere dalla mancata sintesi di catene δ , di catene α normali come descritto nel «Caso 11» di questo portale o dall'interferenza con altre componenti dell'emoglobina durante l'analisi quali-quantitativa dell'assetto Hb. In tal caso, l'esame di 1° livello potrebbe comunque pervenire a conclusioni presuntive, ma a condizione che siano disponibili tutti gli altri parametri indicati nelle raccomandazioni per tale livello diagnostico (1). Tali conclusioni presuntive saranno di supporto per i successivi esami di 2° livello.

- Delta talassemie allo stato omozigote o delta talassemie in composti eterozigoti. La presenza di difetti δ -talassemici (δ^0) allo stato omozigote o di composti eterozigoti δ^0 non consente la sintesi di catene δ , pertanto non si forma il previsto tetramero che costituisce l'Hb A2 (Paziente 1).
- Varianti strutturali dei geni delta allo stato omozigote o in composti eterozigoti. Le δ -varianti possono sottrarsi all'osservazione durante l'analisi dell'assetto Hb in quanto co-migranti in elettroforesi capillare (CE) o co-eluite in cromatografia (HPLC) con altre componenti Hb presenti, sia fisiologiche che patologiche. Tuttavia, la circostanza che ciò si verifichi allo stato omozigote o che due varianti diverse siano co-ereditate e risultino entrambe silenti è molto rara.
- Varianti strutturali dei geni beta interferenti con l'Hb A2. Nel corso dell'analisi quali-quantitativa delle componenti Hb possono essere evidenziate varianti che si collocano nella stessa posizione dell'Hb A2 con la possibilità di sovrapposizione delle aree dei relativi picchi. Tali varianti, che di solito si presentano in quantità superiore al 10%, andranno quindi ad interferire nella valutazione quantitativa dell'Hb A2. Nel caso in cui non risulta presente alcun altro picco «minore», si può ritenere che la mutazione che ha prodotto tale quadro appartenga ai geni β (Paziente 2).
- Varianti strutturali dei geni alfa interferenti con l'Hb A2. Quando si osserva una variante il cui picco interferisce con l'Hb A2 e, nel caso dell'elettroforesi capillare, ne compare uno minore in zona «Z1», potremo concludere che siamo di fronte ad una variante α (Paziente 3).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE (5,6)

Il ruolo e l'importanza dell'Hb A2 nella valutazione di una condizione talassemica è resa ancor più evidente quando non si ha la possibilità di risalire alla misura di tale parametro. Tuttavia possiamo considerare che:

- Ad oggi sono riportate in letteratura circa 40 diverse varianti Hb interferenti con la quantificazione dell'Hb A2 mediante sistemi HPLC e 7 varianti interferenti mediante CE.
- La combinazione di tecniche diverse può migliorare l'interpretazione dell'assetto Hb e contribuire a concludere un esame di 1° livello.
- Più recentemente si è anche potuto documentare che l'elettroforesi capillare, quando viene utilizzata per la quantificazione dell'Hb A1c, può ulteriormente fare la differenza nella comprensione di un assetto Hb.
- I casi qui illustrati indicano che quando non è possibile quantificare l'Hb A2 per la presenza di α -varianti interferenti (si osserva un picco aggiuntivo Hb A2-X in «Z1 zone»), il ricorso alla diagnostica molecolare è sempre necessario per poter accertare l'eventuale presenza di beta talassemia.
- Quando si osserva la presenza contemporanea di Hb A superiore al 50% e di una variante delle catene β accertata a comunque in assenza di Hb A2-X, si ha sempre la possibilità di escludere la presenza di forme classiche di β -talassemia, senza dover fare ricorso all'esame molecolare e indipendentemente quindi dal valore dell'Hb A2. Tale concetto è sempre valido, anche quando non vi è interferenza tra i picchi.

BIBLIOGRAFIA

1. www.site-italia.org: Diagnostica di I e II livello delle Emoglobinopatie Buone Pratiche SITE, 2022.
2. Trifillis P, Ioannou P, Schwartz E, Surrey S. Identification of four novel delta-globin gene mutations in Greek Cypriots using polymerase chain reaction and automated fluorescence-based DNA sequence analysis. *Blood*. 1991 Dec 15;78(12):3298-305.
3. Sciarrotta GV, Ivaldi G, Sansone G, Di Pietro P. Hb O-Arab [β 121 (GH4) Glu----Lys] in Italy. *Hemoglobin*. 1985;9(5):513-5.
4. Boyer SH, Crosby EF, Fuller GF, Ulenurm L, Buck AA. A survey of hemoglobins in the Republic of Chad and characterization of hemoglobin Chad: α -2-23Glu--Lys- β -2. *Am J Hum Genet*. 1968 Nov;20(6):570-8.
5. Ivaldi G, Barberio G, Harteveld C, et al. HbA2 measurements in beta-thalassemia and in other conditions. *Thalassemia Rep* 2014; 4:45-8.
6. Barberio G, Ivaldi G. (2020). Emoglobinopatie. Dalla diagnosi alle consulenze specialistiche. Piccin.