

**RACCOMANDAZIONI
PER LA DIAGNOSTICA DI PRIMO LIVELLO
DELLE EMOGLOBINOPATIE**
della Società Italiana Talassemie
ed Emoglobinopatie - SITE

a cura di
G. IVALDI e G. BARBERIO

APRILE 2012

*Quando ci si trova davanti ad un ostacolo,
la linea più breve tra due punti
può essere anche una linea curva.*

Bertolt Brecht

L'avventura delle Raccomandazioni è stata caratterizzata da un iter tormentato anche se "tutti" sono sempre stati convinti della necessità di dover disporre di strumenti di supporto per la diagnostica di 1° livello delle Emoglobinopatie, adeguati allo sviluppo continuo dei mezzi tecnologici e alla aumentata eterogeneità genetica della nostra popolazione. Per "tutti" intendiamo tutti gli addetti impegnati nei Laboratori dal Nord al Sud della Penisola ma crediamo fermamente nel fatto di includere in quel "tutti" anche figure professionali non necessariamente operanti nel Laboratorio. È questa corallità che prelude ad un percorso di crescita e formazione: riteniamo importante che tale corallità si costituisca nonostante la tendenza "centrifuga" di chi vuole vedere il proprio *particolare* escludendo dalla propria percezione, talvolta ridimensionandoli, altri essenziali punti di vista.

Il recente sondaggio conoscitivo condotto dalla SITE ha messo in evidenza nel nostro Paese una realtà molto variegata della diagnostica delle Emoglobinopatie; oggi, uno dei dati più incerti sui percorsi diagnostici e preventivi riguarda l'elevato numero di esami eseguiti nei Laboratori privati, molti dei quali non hanno partecipato al sondaggio nonostante i reiterati richiami.

L'elaborazione dei dati emersi dal sondaggio, che ha riguardato più di 170 Laboratori, ci ha spinti a polarizzare l'attenzione su ciò che poteva essere utile e appropriato per la diagnostica dei difetti genetici dell'emoglobina, a cominciare dalla modalità della richiesta che non fosse più un banale elenco di test ma una richiesta posta in termini di *consulenza*, consentendo al Laboratorio di approfondire specifici percorsi diagnostici, per finire con una "nuova refertazione" arricchita dai commenti interpretativi e da adeguate conclusioni nella cornice di un "referto integrato".

Buona lettura e buon lavoro a tutti

G. Ivaldi e G. Barberio

1. Aspetti generali

1.1	Premessa	pag.	9
1.2	Definizioni	pag.	9
1.3	Prevenzione e screening dei difetti dell'emoglobina	pag.	10
1.4	Riferimenti normativi	pag.	10
1.5	Le emoglobinopatie in Italia: considerazioni su una popolazione che cambia	pag.	11
1.6	Le Talassemie	pag.	12
1.7	Le varianti dell'Emoglobina	pag.	13
1.8	L'Hb S, le varianti più frequenti e quelle clinicamente rilevanti	pag.	14
1.9	I composti eterozigoti e le omozigosi	pag.	14
1.10	Le HPFH e altri aumenti di Hb F in età adulta	pag.	15
1.11	I rapporti del laboratorio di 1° livello con la clinica	pag.	17

2. Aspetti pre-analitici

2.1	Indicazioni all'esame di 1° livello	pag.	18
2.2	Condizioni non idonee all'esame di 1° livello	pag.	18
2.3	La prescrizione delle indagini di 1° livello per le Emoglobinopatie	pag.	19
2.4	Appropriatezza della richiesta e ruolo del laboratorio	pag.	21
2.5	Informazioni da fornire al paziente sul ruolo e i limiti degli esami di 1° livello	pag.	22
2.6	Notizie utili sul paziente	pag.	24
2.7	Requisiti per l'idoneità del campione ematico all'esame per le emoglobinopatie	pag.	25
2.8	Conservazione dei campioni ematici in attesa dell'esame	pag.	25
2.9	Il laboratorio	pag.	26
2.10	Dotazione strumentale e tecnica	pag.	27
2.11	Formazione del personale addetto all'esame per le emoglobinopatie ...	pag.	27

3. Aspetti analitici

3.1	Percorsi diagnostici alla nascita	pag.	28
3.2	Percorsi diagnostici in epoca preconcezionale e in gravidanza	pag.	31
3.3	La valutazione dell'Hb A ₂	pag.	37

3.4	La valutazione dell'Hb F	pag.	41
3.5	Stato marziale ed emoglobinopatie	pag.	42
3.6	I parametri emocromocitometrici nelle emoglobinopatie	pag.	42
3.7	Il riscontro di Varianti Hb	pag.	43
3.8	Altri esami utili per la valutazione dello stato di portatore di emoglobinopatie	pag.	45
3.9	Il riscontro di emoglobinopatie nel corso di test non dedicati ai difetti dell'Hb	pag.	46
3.10	Le conferme diagnostiche non molecolari	pag.	47
3.11	Intervalli di riferimento	pag.	47
3.12	Emoglobine e VEQ	pag.	48
3.13	I tempi di refertazione	pag.	49
4.	Aspetti post-analitici		
4.1	Il Referto: caratteristiche generali e specifiche	pag.	50
4.2	Il Referto: le conclusioni diagnostiche del 1° livello	pag.	50
4.3	Dalla diagnostica di 1° livello ai test di approfondimento	pag.	52
4.4	Come inviare i campioni ematici o di DNA al laboratorio di 2° livello.....	pag.	52
4.5	Conservazione dei risultati degli esami	pag.	54
4.6	Alcuni Laboratori di Riferimento per la Diagnostica di 2° livello e/o Prenatale	pag.	54
5.	Conclusioni	pag.	57
	Bibliografia e documenti di riferimento	pag.	59
	Glossario	pag.	61

1. ASPETTI GENERALI

1.1 Premessa

La Società Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie (SITE), sulla base delle informazioni acquisite dal recente sondaggio sull'attività delle Strutture impegnate nella diagnostica di laboratorio, ha ritenuto opportuno rivolgere una particolare attenzione ai percorsi diagnostici di 1° livello per i difetti dell'emoglobina con l'obiettivo di favorire azioni appropriate e scelte metodologiche aggiornate.

Nascono così le seguenti "raccomandazioni" destinate in primo luogo agli specialisti di laboratorio che in centinaia di realtà pubbliche e private si occupano dello studio, della diagnosi, della prevenzione dei difetti dell'emoglobina nella consapevolezza che tali anomalie rappresentano le variazioni genetiche più ricorrenti nella popolazione italiana, oggi ancor più rispetto al passato.

1.2 Definizioni

È opportuno premettere alcune definizioni per una migliore interpretazione del testo. Una raccolta più completa dei termini e delle definizioni pertinenti è riportata alla voce "Glossario" alla fine del documento.

Per **emoglobinopatia** si intende una alterazione ematologica, talvolta associata ad anemia, dovuta ad un difetto genetico di una o più globine costituenti il tetramero dell'Hb. In queste raccomandazioni il termine è genericamente usato per: i difetti di sintesi o **talassemie**, i difetti strutturali o **varianti Hb** (emoglobine anomale con alterata funzionalità o clinicamente silenti), allo stato eterozigote e omozigote e per i **difetti composti**. Per estensione quindi intendiamo col termine emoglobinopatia ogni alterazione qualitativa e quantitativa dei geni globinici comprese le persistenze ereditarie di emoglobina fetale (HPFH).

I **test di 1° livello** sono costituiti dalle analisi ematochimiche essenziali alla individuazione di uno stato di portatore o di affetto da una emoglobinopatia; detti test che sono specificati nei percorsi diagnostici di seguito riportati e che, sulla base delle evidenze scientifiche, possono evolvere e modificarsi nel tempo, costituiscono i "test specifici di 1° livello per le emoglobinopatie".

L'**assetto emoglobinico** è parte dei test di 1° livello e rappresenta il dato qualitativo e la quantificazione relativa di tutte le frazioni emoglobiniche presenti che possono essere riscontrate con i metodi separativi di base (vd. HPLC ed elettroforesi).

Per **quesito diagnostico** si intende una richiesta formulata dal clinico finalizzata a concretizzare un'ipotesi diagnostica. Tale quesito si basa su elementi fenomenici esibiti dal paziente (segni e sintomi) o comunque su altri elementi diretti o indiretti di conoscenza.

1.3 Prevenzione e screening dei difetti dell'emoglobina

Gli esami di 1° livello per le emoglobinopatie hanno il compito principale di fornire informazioni utili a prevenire patologie determinate geneticamente che in omozigosi si esprimono con livelli variabili di anemia; la condizione eterozigote di tale difetti è in genere clinicamente asintomatica. Tali esami prevedono un approccio biochimico e nella maggior parte dei casi non richiedono ulteriori indagini sul DNA. **Per ciò che producono e rappresentano devono essere considerati test genetici e il loro risultato potrà avere ricadute immediate oppure a lungo termine.**

Il concetto di esame genetico è collegato all'ereditarietà dei caratteri e il risultato degli esami di 1° livello o di 2° livello pertanto coinvolge indifferentemente non solo il singolo soggetto esaminato ma anche i suoi genitori, i suoi figli, l'intera famiglia. Orientare quindi verso l'esame ai familiari in alcuni casi potrebbe essere una possibile conclusione e anche in questo, gli esami genetici si distinguono dai tradizionali esami di laboratorio.

1.4 Riferimenti normativi

I test di 1° livello per le emoglobinopatie vengono gestiti in ambiti che si richiamano a contesti legislativi diversi: come test genetici rientrano nelle norme che regolano lo svolgimento dell'attività clinica e di laboratorio della genetica (1-2) ma come test biochimici e molecolari trovano regole e comportamenti nelle norme che ordinano l'attività dei laboratori di analisi chimico-cliniche (3); i soggetti affetti da emoglobinopatia hanno poi nella

legge delle malattie rare (4) alcuni utili strumenti di tutela e sostegno. I test genetici, rispetto ad altri esami clinici, generano risultati con caratteristiche che li differenziano dalle altre informazioni sanitarie sensibili (sono immutabili, condivisi nell'ambito della famiglia, possono essere associati ad alta probabilità di sviluppo di malattie gravi).

Per una maggior tutela dai rischi connessi ad un'impropria gestione dei dati prodotti, il Garante per la privacy ha quindi ritenuto opportuno emanare una specifica "Autorizzazione per il trattamento dei dati genetici" (5). La SITE ritiene importante che si operi affinché nei laboratori che eseguono e gestiscono i test per le emoglobinopatie di 1° e 2° livello si faccia riferimento alle norme e ai principi citati precedentemente.

1.5 Le emoglobinopatie in Italia: considerazioni su una popolazione che cambia

Negli ultimi 15 anni il numero di stranieri immigrati e regolarmente residenti in Italia è costantemente cresciuto fino a superare i 5 milioni di unità, pari a oltre l'8% dell'intera popolazione. Essi rappresentano una moltitudine di soggetti, proveniente da molte aree geografiche e che nella maggior parte dei casi presenta un'alta incidenza di emoglobinopatie. Sono inoltre migliaia ogni anno i bambini che nascono da genitori appartenenti a etnie diverse. Gli stranieri immigrati sono distribuiti sul territorio italiano in modo disomogeneo, prevalentemente nelle grandi città. Oltre il 55% dell'immigrazione è concentrata nelle sei regioni dell'Italia settentrionale con presenze significative di Nord Africani, Rumeni e Albanesi nelle regioni del Nord-Ovest e di provenienti dall'Asia e dall'Europa dell'Est nel Nord-Est. ***Con l'immigrazione è aumentata nei laboratori l'osservazione di alcuni difetti Hb già presenti nella popolazione italiana come l'Hb S, l'Hb C, Hb D Punjab (D Los Angeles) e di diverse mutazioni beta talassemiche e la segnalazione di rari e nuovi difetti emoglobinici. L'Hb E e l'Hb O Arabia, da tempo già osservate in Italia, ma considerate varianti molto rare, si riscontrano con notevole frequenza soprattutto nel Nord-Est.***

In questi ultimi anni proprio le regioni del Nord Est hanno vissuto più di altre il cambiamento della diagnostica di laboratorio orientandola anche alla gestione delle emoglobinopatie (formazione del personale, organizzazione dei flussi diagnostici a diversi livelli, rapporti con i clinici).

Le azioni che riguardano oggi la prevenzione delle emoglobinopatie devono tener conto di un contesto sempre più globalizzato con la possibilità che i fenotipi classici, tipici della popolazione autoctona, si accompagnino sempre più con difetti un tempo mai segnalati negli italiani ma oggi di comune riscontro per effetto dell'immigrazione. La combinazione inoltre nello stesso soggetto, di caratteri autoctoni ed importati, non mancano già di porre nuovi interrogativi in termini diagnostici, clinici e preventivi.

1.6 Le Talassemie

Il cluster globinico α (alfa) e quello non- α (comprendente i geni β (beta), γ (gamma) e δ (delta)) si definiscono normali quando ciascun cluster, per ogni allele, produce la giusta quantità di catene, dotate di normale affinità reciproca, in modo che non rimangano catene libere in eccesso.

Si definisce invece "microcitemico" il cluster in cui ha sede un difetto che determina un deficit totale o parziale di sintesi di una catena o produce catene fortemente instabili e/o con una ridotta affinità per le globine complementari, con il risultato finale, comune nei due casi, che una grande quantità di catene α o non- α resta libera più o meno a lungo negli eritroblasti. Le microcitemie o *talassemie* rappresentano quindi un gruppo di malattie ematologiche molto eterogenee dal punto di vista genetico. I metodi più recenti per lo studio della struttura dei geni hanno permesso di mettere in evidenza molte delle alterazioni strutturali che stanno alla base delle talassemie confermando al tempo stesso l'eterogeneità sia nei difetti molecolari che le determinano sia negli aspetti biochimici e fenotipici che le caratterizzano. Le talassemie (Tal.) possono essere classificate, a seconda del gene difettoso, in α -Tal. (α^0 o α^+), β -Tal. (β^0 o β^+), δ -Tal. (δ^0 o δ^+) mentre le γ -Tal. (A-gamma o G-gamma) sono molto rare; tra queste sindromi sono incluse anche forme più complesse determinate in genere da ampie delezioni che interessano più di un gene contemporaneamente come le $\delta\beta$ -Tal. e le $\epsilon\gamma\delta\beta$ -Tal.. È inoltre evidente che tutti i diversi genotipi talassemici possono interagire tra loro a formare composti eterozigoti (doppie eterozigosi come α/β -Tal., $\beta/\delta\beta$ -tal., β^0/β^+ -Tal.).

Le Talassemie, in particolare le beta talassemie, costituiscono l'impegno

diagnostico prevalente per il laboratorio di 1° livello: gli oltre 400 difetti "talassemici" noti (6) rappresentano costantemente una sfida per il laboratorio considerando la loro elevata eterogeneità fenotipica.

1.7 Le varianti dell'Emoglobina

Si definiscono Varianti dell'emoglobina quei difetti genetici dell'emoglobina che si trasmettono con un meccanismo autosomico recessivo o "semidominante" e dovute ad una sintesi difettosa da un punto di vista qualitativo, raramente quantitativo. Le varianti coinvolgono una delle catene globiniche che risulta modificata prevalentemente da mutazioni puntiformi, microdelezioni o inserzioni e interessano i geni alfa, beta, delta e gamma quasi esclusivamente nella loro parte codificante (esoni). La distinzione tra difetti quantitativi (talassemie) e qualitativi (varianti Hb) talvolta risulta arbitraria essendo note alcune varianti emoglobiniche responsabili di fenotipi talassemici con ipoproduzione o denaturazione delle catene globiniche.

Come nel caso dell'emoglobina S (Hb S) la stragrande maggioranza delle varianti emoglobiniche non è associata a parametri ematologici anomali. Di conseguenza la provenienza etnica rappresenta una indicazione essenziale per la richiesta di analisi di 1° livello. Nei casi in cui la variante è associata a parametri ematologici anomali (Hb E, Hb Lepore etc...), la sua presenza può essere sospettata dall'anamnesi familiare o clinica del soggetto in esame e può trovare conferme nell'ambito degli esami di 1° livello. Nella maggior parte dei casi, le varianti Hb si rilevano nel corso di esami richiesti per individuare lo stato di portatore di beta talassemia. È però evidente che nessun sistema analitico o test di 1° livello risulta sufficientemente raffinato da consentire di rilevare tutti gli oltre mille difetti strutturali dei geni globinici già noti e le almeno altrettante possibili variazioni non ancora descritte. Pur essendo comunque molte le varianti Hb che oggi si possono discriminare dall'Hb A, dall'Hb A₂, e dall'Hb F, solo in pochissimi casi l'approccio diagnostico di 1° livello è in grado di identificare con certezza una componente anomala dell'emoglobina. La caratterizzazione di questi difetti è pertanto possibile, prevalentemente, mediante indagini di 2° livello (analisi molecolare, DNA).

1.8 L'Hb S, le varianti più frequenti e quelle clinicamente rilevanti

L'Hb S è la variante emoglobinica più diffusa nel mondo. In Italia è la variante più frequentemente riscontrata, oggi non più solo tra i Siciliani e i Calabresi: anzi, in alcune città del Nord, l'Hb S allo stato omozigote o nei composti eterozigoti (SCD) rappresenta una vera e propria emergenza, ciò in seguito alla massiccia presenza di immigrati provenienti da Paesi nei quali tale variante è significativamente presente. Altre varianti delle beta catene globiniche riscontrabili con una certa frequenza sono l'Hb C, l'Hb Lepore, l'Hb D Punjab, e oggi numerose sono anche l'Hb E e l'Hb O Arabia; tra le varianti alfa l'Hb Hasharon, l'Hb J Sardegna e l'Hb J Oxford sono le più osservate da sempre in certe aree e l'Hb G Philadelphia come conseguenza dei recenti flussi migratori. Tra tutte queste varianti citate, oltre all'Hb S, sono significative dal punto di vista clinico, e quindi rilevanti ai fini della prevenzione, l'Hb E e l'Hb Lepore nonché l'Hb C, l'Hb D Punjab e l'Hb O Arabia quando si trovano associate all'Hb S. Non possiamo però dimenticare che molte varianti, singolarmente ritenute rare, presentano caratteristiche cliniche rilevanti: si tratta delle emoglobine instabili e di quelle con alterata affinità (soprattutto alta affinità) per l'ossigeno. Se questi casi si presentano al laboratorio di 1° livello possono costituire un impegnativo esercizio di riconoscimento: richiedono la conoscenza di informazioni anamnestiche specifiche e l'utilizzo di alcuni test funzionali (non sempre in uso nella maggior parte dei laboratori), prima della diagnosi certa mediante analisi molecolare.

1.9 I composti eterozigoti e le omozigosi

Con il termine di composti eterozigoti (doppi eterozigoti) o mutazioni composte dell'emoglobina si vuole indicare la contemporanea presenza di difetti emoglobinici differenti, su alleli diversi, tali da produrre fenotipi clinici variabili, anche non gravi, diagnosticati in base a comportamenti anomali da un punto di vista funzionale, elettroforetico e/o cromatografico. Considerando la frequenza e l'eterogeneità dei difetti emoglobinici, talassemici e strutturali, in Italia è ragionevole supporre che ritrovare mutazioni diverse associate, appartenenti a geni globinici diversi, non

costituisca un'evenienza troppo rara; la probabilità di trovare tali doppi difetti aumenterà in quelle regioni dove più alto è il numero di soggetti portatori di emoglobinopatie, come la Sicilia e il Meridione in genere. La Sardegna pur avendo la maggior frequenza di difetti talassemici ha una scarsa presenza di difetti strutturali, per cui risultano meno frequenti i casi di mutazioni composte mentre in questa regione sarà più elevata la probabilità di omozigosi o composti eterozigoti per beta talassemia.

L'Hb S è la variante maggiormente osservata in associazione alla beta talassemia ed è all'origine di una condizione patologica importante (talassodrepanocitosi o microdrepanocitosi) clinicamente eterogenea anche in rapporto alla mutazione talassemica presente. Le varianti Hb C e Hb S oltre che nell'Italia meridionale sono presenti in elevato numero proprio nelle aree geografiche da cui provengono molti soggetti recentemente immigrati nelle nostre regioni e quindi saranno proprio queste due varianti che più di altre contribuiranno a incrementare il numero di composti emoglobinici nella nostra popolazione.

1.10 Le HPFH e altri aumenti dell'Hb F in età adulta

L'emoglobina fetale (HbF) rappresenta la principale frazione emoglobinica durante la vita fetale, ed alla nascita costituisce circa l'80% dell'emoglobina totale. L'HbF è prodotta a partire dalla sesta settimana di gestazione e sostituisce le emoglobine embrionali Gower I, Gower II e Portland prodotte nelle prime settimane dal concepimento. Dopo la nascita la sintesi di HbF diminuisce gradualmente e viene sostituita da quella dell'HbA in modo che normalmente dal primo anno di vita in poi appare il caratteristico fenotipo emoglobinico dell'adulto con livelli di HbF inferiori a 1%.

La misura della HbF è utile nello studio e nella diagnosi di alcuni importanti disordini a carico dei geni globinici dove i livelli di HbF possono aumentare considerevolmente: nella beta talassemia allo stato omozigote e nei composti eterozigoti beta talassemici nonché nelle $\delta\beta$ -talassemie allo stato eterozigote. Ma la presenza nella vita adulta di una più o meno elevata persistenza di HbF (HPFH), spesso senza segni clinici, costituisce una condizione non rara. Sono note anche alcune patologie acquisite che possono esprimere un incremento modesto di HbF. La misura della HbF viene

inoltre richiesta per monitorare i pazienti con anemia falciforme durante il trattamento con farmaci in grado di indurre la produzione. In Tabella 1-1 (7) sono riassunte alcune cause di aumento dell'Hb F non riconducibili a difetti dei geni globinici.

Tabella 1-1

Alcune condizioni non genetiche che possono determinare nell'individuo adulto la presenza di Hb F.

Anemie congenite o acquisite da primitiva insufficienza midollare con o senza displasia

- anemia aplastica
- anemia megaloblastica da carenza vitaminica
- anemia di Diamond-Blackfan
- alcune forme di anemia normoblastica
- anemie sideroblastiche congenite
- anemie sideroblastiche acquisite
- emoglobinuria parossistica notturna

Neoplasie

- epatocarcinoma
- leucemie acute mieloidi
- mielofibrosi primitiva
- leucemia mielomonocitica cronica giovanile

Condizioni associate a specifici trattamenti terapeutici

- chemioterapia per leucemie
- terapia con idrossiurea, butirrati ed agenti stimolanti l'eritropoiesi

Altre condizioni

- gammopatia monoclonale di incerto significato
- gravidanza
- insufficienza renale cronica
- ipertiroidismo
- trisomia 13

1.11 I rapporti del laboratorio di 1° livello con la clinica

Sebbene la diagnostica di I livello sia diffusa ormai in molti laboratori generali, la gestione del dato analitico complesso (talassemie allo stato omozigote e intermedio, i composti, le varianti particolarmente rilevanti dal punto di vista clinico) e la cura dei malati in genere, resta appannaggio di pochi Centri clinici specialistici e di riferimento.

Per questo è opportuno che il Laboratorio abbia un ruolo centrale: come consulente, per quanto riguarda la parte diagnostica e di prevenzione, nei confronti dei medici prescrittori e di feedback continuo con i Clinici dei Centri di cura. Il Laboratorio dunque, deve svolgere un ruolo transizionale in quel processo clinico che va dalla diagnostica-prevenzione alla eventuale terapia e follow-up dei pazienti affetti.

2. ASPETTI PRE-ANALITICI

2.1 Indicazioni all'esame di 1° livello

Molte sono le ragioni che inducono i clinici a richiedere esami per i difetti dell'emoglobina; le più frequenti sono: microcitosi già accertata con indici marziali nella norma, familiarità per tali difetti, conferma di un sospetto clinico in presenza di marcata anemia, valori di ematocrito elevati, anemia emolitica non sferocitica.

In epoca preconcezionale o in gravidanza l'esame specifico è indicato nel partner qualora uno dei soggetti della coppia abbia già riscontrato alterazioni ematologiche riconducibili a difetti emoglobinici. La richiesta di un assetto Hb può riguardare anche il monitoraggio dei pazienti politrasfusi con SCD; in questo caso la richiesta è finalizzata alla quantificazione delle frazioni Hb nel corso della terapia.

Talvolta la richiesta d'esame può essere suggerita solo dalla necessità di aderire a screening mirati o generalizzati previsti per determinate categorie di soggetti o gruppi etnici (nell'ambito di programmi di prevenzione preconcezionale o prenatale, alla nascita, nei donatori di sangue, di midollo o di cellule staminali, in vista di una fecondazione medicalmente assistita, in popolazioni particolarmente a rischio per emoglobinopatie) o per rispondere ad indicazioni di opportunità basate su prove di efficacia in un ambito di favorevole rapporto rischio/beneficio e di beneficio/costi (8).

2.2 Condizioni non idonee all'esame di 1° livello

Ci sono circostanze nelle quali il test di 1° livello per le emoglobinopatie va differito nel tempo. In Tabella 2-1 sono riportate alcune situazioni che non permettono di procedere ad una richiesta appropriata di tale test; la mancata valutazione di tali condizioni può rendere non appropriati i test eseguiti nonché le relative conclusioni.

Tabella 2-1

Alcune condizioni non idonee all'esame di 1° livello la cui richiesta risulterebbe non appropriata.

- a. Nei tre mesi successivi ad una trasfusione se non destinato al monitoraggio nei politrasfusi
- b. In carenza marziale accertata di recente (*)
- c. In terapia per grave carenza marziale non risolta (*)
- d. In soggetti nei quali è già stata esclusa la beta Talassemia e si vuole escludere anche l'alfa Talassemia
- e. Alla nascita per beta Talassemia eterozigote, Hb Lepore e delta-beta Talassemia

(*) Salvo in quei casi in cui il contesto clinico richieda pressantemente l'esclusione di una mutazione di tipo beta talassemico (Hb A₂ aumentata), tenendo ben presente che il dato ottenuto non ha valore definitivo e va valutato criticamente alla fine della terapia ripetendo l'esame soprattutto se l'Hb A₂ era normale o ridotta.

2.3 La prescrizione delle indagini di 1° livello per le Emoglobinopatie

2.3a *La richiesta di esami può avvenire in diversi ambiti e prodotta da specialisti diversi: in genere il clinico nel compilare l'impegnativa sul ricettario regionale o qualsiasi altro documento di richiesta dovrà riportare, insieme al quesito diagnostico, la seguente indicazione: "Esami specifici di 1° livello per emoglobinopatie". Nelle Regioni in cui è previsto dovranno essere riportati i codici che tale dicitura comprende (Tabella 2-2).*

Se esistono le condizioni, il clinico prescrittore dovrà anche riportare l'eventuale esenzione. Tale richiesta così formulata consentirà al laboratorio di applicare il corretto percorso diagnostico e soprattutto comunicare il risultato dell'esame in modo appropriato e utile al clinico stesso.

Tabella 2-2

La prescrizione del Clinico per le indagini di base sui difetti dell'emoglobina.

La definizione dello stato di soggetto « affetto » o di soggetto « portatore » di una variazione dell'emoglobina necessariamente deve prevedere, come primo momento diagnostico, test biochimici di base che eventualmente potranno solo successivamente essere integrati da test molecolari. Pertanto qualunque sia il contesto nel quale viene richiesta una diagnosi di emoglobinopatia, con la seguente indicazione:

« Esami specifici di 1° livello per Emoglobinopatie »

si devono intendere prescritti i seguenti esami:

- Determinazione quali-quantitativa delle frazioni emoglobiniche, altrimenti detto « assetto emoglobinico »
- Esame emocromocitometrico
- Esami per la valutazione dello stato marziale

In alternativa si possono riportare i codici del Tariffario Nazionale relativi ai suddetti esami o altri codici se previsti da specifiche norme regionali.

2.3b È indispensabile inoltre che il clinico riporti nella prescrizione il "Quesito diagnostico specifico" in quanto il laboratorio deve poter finalizzare l'iter diagnostico anche relativamente ai tempi di refertazione, ai valori di riferimento da indicare, alle conclusioni pertinenti da riportare sul referto e agli eventuali suggerimenti di approfondimento diagnostico.

Ogni realtà di laboratorio dovrà attivare strumenti informatici adeguati al fine di evitare che la prescrizione del clinico e il quesito diagnostico risultino erroneamente interpretati; inoltre occorre evitare che il filtro amministrativo impedisca al laboratorio di conoscere la volontà del medico prescrittore o che interpreti erroneamente il quesito di quest'ultimo.

2.3c Queste raccomandazioni non fanno riferimento alle norme che regolano la partecipazione alla spesa per i test di 1° livello delle emoglobinopatie da parte del paziente (utente, cliente). Ogni regione ha norme e regole in materia secondo criteri locali o nazionali: tali norme amministrative non possono essere considerate linee guida per le decisioni sui percorsi diagnostici opportuni da adottare. In tale contesto sono comprese le esenzioni secondo lo stato di malattia o di gravidanza e quanto regolato dalla legge sulle malattie rare (4).

2.4 Appropriatezza della richiesta e ruolo del laboratorio

Nello studio dei difetti dell'emoglobina i test di 1° livello rappresentano il momento analitico essenziale in un percorso diagnostico adeguato che comunque non può prescindere da una richiesta appropriata. Tale esigenza scaturisce prevalentemente da due motivi:

- a) l'assetto emoglobinico esprime la sintesi dei geni globinici, quindi a tutti gli effetti tale test deve considerarsi un test genetico e come tale può essere richiesto una sola volta nella vita a condizione che sia eseguito nei modi corretti e con gli strumenti adeguati;**
- b) la valutazione dell'assetto e la conseguente formulazione di un referto, sia definitivo che presuntivo, non può prescindere in ogni caso dalla valutazione di alcuni indici eritrocitari, dallo stato marziale del paziente e dalla conoscenza minima del contesto nel quale e per il quale viene chiesto l'esame.**

Un eventuale percorso a step che preveda momenti diversi e successivi di valutazione dei parametri sopra citati, nella pratica può produrre un pericoloso allungamento dei tempi di diagnosi. Il rischio è quello di non giungere ad una valutazione definitiva con la necessità di ripetere nel tempo esami già eseguiti (ma non correttamente valutati) e quindi anche un aumento totale della spesa nella diagnostica. Ad oggi alcune regioni hanno adottato criteri di appropriatezza per i percorsi diagnostici relativi a varie patologie in conformità a quanto disposto da alcune Società scientifiche italiane e in mancanza di raccomandazioni specifiche i riferimenti per le emoglobinopatie sono ancora quelli forniti dalle linee guida internazionali (9, 10).

È opportuno precisare che in presenza di test più specifici e informativi oggi non è più ritenuto necessario l'esame delle resistenze osmotiche eritrocitarie, pertanto non si ritiene appropriata la richiesta di tale test.

Analogamente non si può ritenere appropriato prescrivere singolarmente taluni esami quantitativi generici e con coefficienti di variabilità troppo elevati come l'elettroforesi su acetato di cellulosa e su gel d'agarosio o le colonnine monouso (CV>8). Per gli stessi motivi, tecniche raffinate ma particolarmente indaginose quali l'isoelettrofocalizzazione o la separazione quali-quantitativa delle catene globiniche non sono proponibili per esami routinari di 1° livello mentre possono eventualmente trovare utilizzo nel contesto della caratterizzazione e della ricerca.

2.5 Informazioni da fornire al paziente sul ruolo e i limiti degli esami di 1° livello

È opportuno che ogni laboratorio disponga di una propria "carta dei servizi" per una corretta informazione sulle modalità di accesso agli esami; **per le emoglobinopatie è buona norma che il laboratorio fornisca al momento dell'accesso agli esami una "specificativa informativa", considerando anche la crescente multiethnicità, sul significato del test genetico per le emoglobinopatie, sui meccanismi di trasmissione di tali difetti, sugli aspetti della prevenzione nonché sui limiti degli esami di 1° livello.** Il paziente deve essere informato sulla possibilità che i test producano un referto non conclusivo; in questi casi ulteriori indagini potranno essere necessarie e richieste al laboratorio di riferimento mediante l'invio di campioni di sangue o del paziente stesso.

Per l'esame di 2° livello può essere richiesto un nuovo prelievo, una nuova impegnativa ma soprattutto è opportuno produrre un "documento di consenso" (Fig. 2-1) come previsto per i test genetici (2).

nella pagina seguente

Figura 2-1

Facsimile di consenso da allegare alla richiesta e al campione da esaminare al momento dell'invio al 2° livello.

Intestazione e Responsabile della Struttura che contatta il paziente e invia al 2° livello

Io sottoscritto/a

nato/a a (.....) il
(nel caso di paziente minorenne: io sottoscritto/a padre/madre di acconsento a sottoporre mio/a figlio/a all'analisi molecolare dei geni globinici)

Dichiaro di volermi sottoporre all'analisi molecolare dei geni globinici

al fine di accertare eventuali variazioni da mettere in relazione ai risultati non definitivi degli esami di 1° livello già eseguiti.

Confermo di avere ricevuto alcune informazioni sulla finalità di tali test genetici, di averne compreso l'utilità.

Dichiaro inoltre di essere stato/a informato/a che:

- il test può risultare **normale**;
- il test può evidenziare **alterazioni** delle quali verrò messo/a a conoscenza mediante il referto che potrò ritirare nei tempi stabiliti (o ricevere a domicilio secondo gli accordi) e riporterà la conclusione diagnostica relativa alle indagini eseguite e concordate nel presente foglio di consenso;
- il referto dovrà essere portato a conoscenza del medico che ha prescritto l'esame;
- il referto potrà essere sottoposto ai medici specialisti del Centro Clinico di riferimento (se non coincidono con il medico prescrittore) per la specifica valutazione, gli eventuali ulteriori accertamenti, i consigli, le azioni terapeutiche e preventive;

PERTANTO ACCONSENTO

A ESEGUIRE IL/I TEST GENETICO/I MEDIANTE PRELIEVO DI SANGUE

Data e luogo, Firma

Il Dirigente che ha raccolto il consenso:

Nome:

Cognome Firma

Ai sensi del D.L. n° 196 del 30 giugno 2003

La informiamo che le informazioni e il materiale biologico raccolti saranno trattati ed utilizzati esclusivamente ai fini per cui Lei ha acconsentito. I dati non verranno comunicati a soggetti diversi dai responsabili dell'indagine e verranno custoditi in modo da garantire la loro sicurezza e riservatezza. La informiamo che il responsabile degli obblighi di legge relativamente al trattamento dei dati è il Direttore del Servizio.

2.6 Notizie utili sul paziente

Il momento analitico che è proprio del laboratorio non può prescindere da una opportuna ed appropriata conoscenza del contesto nel quale è stato formulato il quesito diagnostico dal medico curante e di alcune notizie sul paziente che possono condizionare l'esito stesso degli esami.

Pur sapendo che la raccolta di una "anamnesi personale essenziale" può rappresentare un impegno troppo gravoso per i ritmi e le consuetudini di molti laboratori, queste raccomandazioni vogliono comunque stimolare decisioni ed azioni per contribuire a far pervenire al laboratorio notizie cliniche "di minima" per il raggiungimento di corrette conclusioni diagnostiche.

La Tabella 2-3 riporta un esempio delle notizie che, in modi diversi e dipendenti dalla organizzazione di ogni laboratorio, dovrebbero essere acquisite e gestite in funzione del referto.

Tabella 2-3

Notizie sul paziente utili alla formulazione del referto conclusivo (da far pervenire al laboratorio contestualmente al prelievo).

Neonato	
Età gestazionale e sesso	
Origini / etnia	
Familiarità per emoglobinopatie	
Gemellarità	
Ittero neonatale	
Adulto	
Età e sesso	
Origini / Etnia	
Stato ed epoca della gravidanza	
Notizie su esami già eseguiti da familiari o dal partner	
Trasfusioni negli ultimi tre mesi	
Altre patologie note	
Terapie in atto	

2.7 Requisiti per l'idoneità del campione ematico all'esame per le emoglobinopatie

Per procedere all'assetto Hb viene considerato idoneo un campione ematico prelevato in provetta con anticoagulante EDTA; la maggior parte dei metodi separativi presenta comunque risultati sovrapponibili con Li-eparina e Na-citrato.

Il digiuno non è indispensabile per l'assetto emoglobinico ma occorre considerare che tra gli esami di 1° livello previsti per le emoglobinopatie rientrano anche quelli relativi alla valutazione dello stato marziale per i quali un eventuale siero lipemico è controindicato; pertanto è buona norma consigliare il prelievo ematico per il 1° livello diagnostico a digiuno mentre un eventuale prelievo destinato all'approfondimento diagnostico molecolare potrà essere eseguito anche in condizioni di non-digiuno.

Per i test biochimici di conferma o di approfondimento il sangue con anticoagulante EDTA è idoneo. Per la determinazione della P_{50} occorre ricordare che il sangue arterioso consente una più precisa valutazione, quando ciò non dovesse essere possibile anche dal sangue venoso si può ricavare un valore di P_{50} utile a definire un eventuale aumento o diminuzione dell'affinità per l'ossigeno. È comunque essenziale che il prelievo di sangue venga realizzato nelle condizioni previste in generale per gli esami ossimetrici.

2.8 Conservazione dei campioni ematici in attesa dell'esame

L'esame emocromocitometrico e la valutazione degli indici marziali è buona norma che siano eseguiti entro le 24 ore dal prelievo. ***L'esame dell'assetto Hb può essere eseguito entro i sette giorni successivi al prelievo conservando il campione a 4°C. Eventuali test di approfondimento biochimico, per la stabilità e la funzionalità della molecola Hb richiedono un prelievo fresco e vanno eseguiti entro 12 / 24 ore dal prelievo.***

2.9 Il laboratorio

La centralità del laboratorio a supporto della clinica, nella diagnosi e nella prevenzione delle talassemie e dei difetti strutturali dell'emoglobina è un dato riconosciuto e più volte richiamato dalla letteratura scientifica (11). Ciò emerge ancor più oggi con il laboratorio sempre più coinvolto nella gestione di strumenti e metodi innovativi (12), in percorsi diagnostici di qualità e certificati. Il laboratorio dovrà essere promotore di conoscenza e di stimolo all'innovazione nei confronti dei clinici attraverso la condivisione di queste raccomandazioni, delle linee-guida relative alla diagnostica di laboratorio delle emoglobinopatie e alle norme che regolano i comportamenti nella gestione dei test genetici. In Italia la diagnostica delle emoglobinopatie è affidata per quanto attiene il 2° livello ad un numero limitato di *Laboratori specialistici di riferimento* (meno di 20) e quella pre-natale in non più di 10 *Centri di riferimento*; il 1° livello è invece presente in centinaia di realtà diversificate e soprattutto nei Laboratori di analisi chimico clinica. In alcuni casi le emoglobinopatie sono diagnosticate in laboratori con autonomia organizzativa o compresi in Centri clinici o Strutture universitarie. La diagnostica delle emoglobinopatie, sia in ambito pubblico che privato, è maggiormente parcellizzata nel Centro-Sud mentre nel Nord i laboratori sono spesso organizzati in rete all'interno di aree territoriali o regionali.

I laboratori che eseguono un numero ridotto di esami/anno (inf. a 800) maturano di solito una "minor esperienza" in ragione di una ridotta casistica e di un impegno secondario rivolto alle emoglobinopatie dal personale addetto. In questi casi è auspicabile una concentrazione di tale diagnostica anche per un opportuno rapporto costo/beneficio.

Un laboratorio che è dedicato unicamente alla diagnostica di 1° livello può essere riconosciuto "esperto" sulla base della casistica acquisita, dai metodi e dalle attrezzature in dotazione e dalla formazione continua del personale addetto. Tali contesti possono essere valutati e valorizzati nell'ambito di una VEQ specifica (vd. punto 3.12).

È opportuno sottolineare che queste raccomandazioni sono anche il risultato del sondaggio conoscitivo sulla diagnostica di 1° livello che la SITE ha condotto recentemente su un numero rappresentativo (oltre 170) di laboratori pubblici e privati.

2.10 Dotazione strumentale e tecnica

Il settore che si occupa dei test per le emoglobinopatie è quella parte del laboratorio che ha in dotazione uno o più strumenti dedicati all'assetto Hb e altre attrezzature e reagenti utili ai test aggiuntivi e di conferma. La misura degli indici marziali e di quelli emocromocitometrici in un laboratorio di analisi chimico cliniche è di solito centralizzata ma, se destinati alla diagnosi delle emoglobinopatie, la loro valutazione deve essere affidata al personale dedicato.

2.11 Formazione del personale addetto all'esame per le emoglobinopatie

Il personale tecnico addetto a gestire la strumentazione dedicata alle emoglobinopatie e il personale dirigente responsabile dell'intero percorso diagnostico devono aver ricevuto un addestramento adeguato e aver frequentato corsi specifici. Spesso, soprattutto nei laboratori di analisi chimico-cliniche, la frequente rotazione del personale tecnico non favorisce il consolidamento delle esperienze; pertanto è auspicabile che il personale dirigente responsabile rappresenti nel laboratorio un riferimento più stabile per la diagnostica delle emoglobinopatie di 1° livello attraverso un controllo continuo sul risultato strumentale, sui controlli di qualità e sui risultati complessivi del percorso diagnostico.

Le Società scientifiche di laboratorio ed in particolare la Società Italiana per la Talassemia ed Emoglobinopatie avranno cura di promuovere percorsi formativi tali da garantire un aggiornamento continuo del personale dedicato alla diagnostica delle emoglobinopatie.

3. ASPETTI ANALITICI

3.1 Percorsi diagnostici alla nascita

La ricerca di difetti talassemici o di varianti dell'emoglobina può presentarsi in diverse circostanze e a diverse età (in epoca prenatale, alla nascita e in età adulta) con motivazioni e conseguenze diverse. Alla nascita di solito è meno frequente la necessità di procedere ad esami specifici per le emoglobinopatie ma in determinate popolazioni, alcuni difetti Hb possono presentare una particolare frequenza e rilevanza sociale; può essere quindi giustificato un impegno diagnostico utile a far conoscere precocemente particolari assetti emoglobinici e suggerendo all'occorrenza trattamenti preventivi idonei come accade in alcuni Paesi Europei (13) e negli Stati Uniti per l'HbS (14-15).

Le possibilità diagnostiche, con l'aiuto anche di intervalli di riferimento aggiornati riportati dalla letteratura, risultano maggiori alla nascita rispetto ad un'epoca successiva quando lo switch dell'Hb F non è ancora completato; ciò vale soprattutto esaminando direttamente il sangue proveniente dal cordone ombelicale o dal prelievo venoso, in prima o seconda giornata. Più ampia ancora appare infatti la variabilità dell'assetto Hb durante i primi sei mesi di vita e quindi prima che si stabilizzi "l'assetto adulto" (16).

In Italia oggi è crescente la richiesta di esami alla nascita (nei primissimi giorni o su sangue del cordone ombelicale), in conseguenza di due fenomeni emergenti: la ricerca di emoglobinopatie sul sangue di funicolo destinato alla conservazione o proveniente dalle banche di cellule staminali e lo screening di decine di migliaia di bambini che ogni anno nascono da genitori giunti dall'Africa, dall'Albania e dall'Asia.

Gli strumenti e il percorso diagnostico per poter individuare anomalie nella sintesi delle frazioni normali dell'Hb alla nascita sono sintetizzati in Tabella 3-1. I risultati ottenuti esaminando il sangue del cordone ombelicale o il sangue periferico prelevato nella prima giornata di vita sono praticamente sovrapponibili se si procede all'esame su campione fresco e non dopo crioconservazione e/o conservazione in DMSO. Occorre inoltre considerare che l'esame da sangue adsorbito su carta può dare risultati non sovrapponibili a quelli ottenuti su prelievo fresco e in tali circostanze occorrerebbe considerare valori di riferimento adeguati.

In Fig. 3-1 sono riportate alcune tipologie di casi con i relativi parametri emoglobinici e le possibili conclusioni. In maggior dettaglio le possibilità diagnostiche alla nascita per i difetti globinici più frequenti sono riportate in Tabella 3-2.

Sull'appropriatezza e l'opportunità di un approfondimento diagnostico alla nascita si potrebbero aggiungere altre considerazioni con riferimento al contesto socio-sanitario e normativo, al rapporto costo/beneficio, tali aspetti non vengono qui trattati in quanto dipendono da altri ambiti decisionali e non direttamente pertinenti al ruolo del laboratorio.

Tabella 3-1
Percorso diagnostico di 1° livello alla nascita.

Prelievo venoso o cordonale	⇐ ⇒ ⇒	- Informazioni pre-test - Consenso informato - Informativa sui limiti del test	- Raccolti dal laboratorio direttamente dai genitori o ricevute dal clinico - Fornita dal laboratorio
Assetto Hb	⇒	- Mediante HPLC - Elettroforesi capillare	I due metodi risultano parzialmente sovrapponibili nella valutazione dell'Hb F, dell'Hb A e delle varianti più frequenti
Indici emocromocitometrici	⇒	Alla nascita sono parzialmente utilizzati	
Eventuali altri test	⇒	- Test di sickling - Ricerca di inclusioni "HbH like" - Esami ai genitori	
Conclusione certa o presuntiva	⇒	Eventuale coinvolgimento del clinico o del Laboratorio di 2° livello	In caso di conclusione presuntiva, nella maggior parte dei casi, si rimanda l'esame almeno a dopo i sei mesi d'età
Referto	⇒	Va riportato il valore dell'Hb A oltre a quello dell'Hb F e delle eventuali altre frazioni Hb	Alla nascita il valore dell'Hb A ₂ , anche se può essere presente in tracce, non ha significato diagnostico e non va riportato

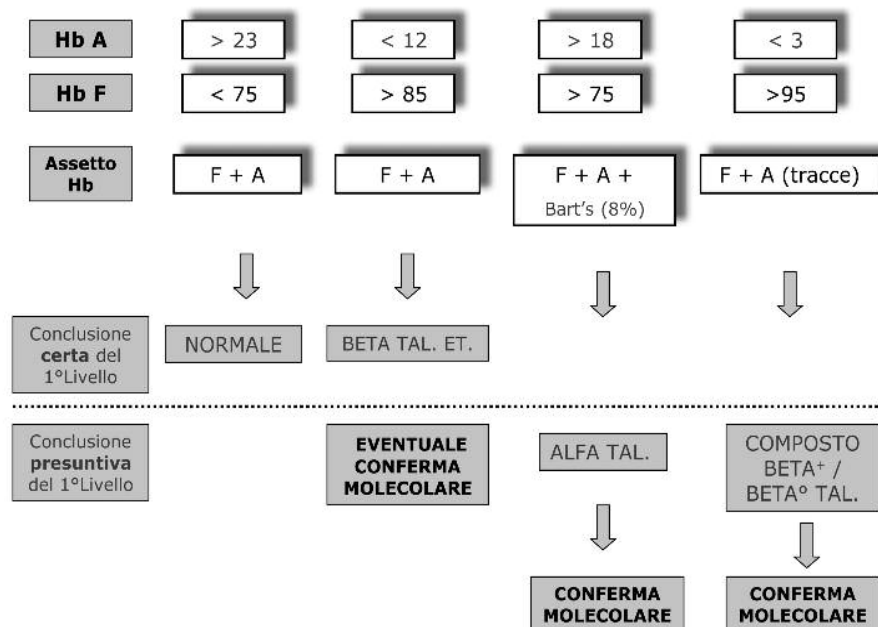


Figura 3-1

Alcuni casi alla nascita con i relativi parametri ematologici e le possibili conclusioni.

Tabella 3-2

Possibili diagnosi di emoglobinopatia alla nascita e variabilità della quantità relativa delle diverse frazioni emoglobiniche in presenza di alcuni più frequenti difetti globinici. I valori e gli intervalli riportati sono ricavati dall'ampia letteratura sull'argomento (13-16, 28).

	Hb A %	Hb F %	Hb S %	Hb C %	Hb E %	Hb D %	Hb Bart's %	Hb Lepore %	Hb Hasharon %	Diagnosi
Normale	23 ± 8	71 ± 15	-	-	-	-	-	-	-	Certa (per Hb A > 23%)
β^o o β⁺ Talassemia eterozig.	13 ± 7	84 ± 9	-	-	-	-	-	-	-	Presuntiva (per Hb A < 12%)
β⁺ / β⁺ Talassemia	0	100	-	-	-	-	-	-	-	Certa (a)
β⁺ / β⁺ o β⁺ / β⁺ Talassemia	< 5	> 95	-	-	-	-	-	-	-	Certa (a)
α⁺ Talassemia	21 ± 8	> 65	-	-	-	-	< 3	-	-	Presuntiva
α⁺ Talassemia	20 ± 7	> 65	-	-	-	-	2 - 6	-	-	Presuntiva
Hb H	18 ± 6	> 65	-	-	-	-	> 8	-	-	Presuntiva
Hb S eterozigote	15 ± 7	73 ± 16	10 ± 5	-	-	-	-	-	-	Certa (b)
Hb S omozigote	0	> 85	< 15	-	-	-	-	-	-	Presuntiva (b)
β⁺ / β^S (Talasodrepanocitosi)	0	> 85	< 15	-	-	-	-	-	-	Presuntiva (b)
β⁺ / β^S (Talasodrepanocitosi)	< 5	> 82	< 12	-	-	-	-	-	-	Certa (b)
Hb C eterozigote	< 20	70 ± 10	-	10 ± 5	-	-	-	-	-	Certa (c)
Hb C omozigote	0	> 80	-	< 20	-	-	-	-	-	Presuntiva
Hb E eterozigote	< 20	75 ± 10	-	-	8 ± 3	-	-	-	-	Certa (c)
Hb E omozigote	0	> 85	-	-	< 15	-	-	-	-	Presuntiva
Hb D Punjab eterozigote	< 20	> 65	-	-	-	< 20	-	-	-	Presuntiva
Hb Lepore eterozigote	12 ± 7	> 80	-	-	-	-	-	0	-	Presuntiva (a)
Hb Lepore / β⁺ Tal	0	100	-	-	-	-	-	0	-	Presuntiva (a)
Hb Lepore / β⁺ Tal	< 5	> 95	-	-	-	-	-	0	-	Presuntiva (a)
δ-β Tal. eterozigote	12 ± 7	86 ± 9	-	-	-	-	-	-	-	Presuntiva (a)
δ-β Tal. omozigote	0	100	-	-	-	-	-	-	-	Certa (a)
Hb Hasharon eterozigote	< 25	> 60 (d)	-	-	-	-	-	-	< 8	Presuntiva

(a) se si conoscono i difetti dei genitori

(b) dopo conferma del test di sickling

(c) dopo conferma mediante CE

(d) è compresa la quota variabile di Hb F con le catene alfa mutate

3.2 Percorsi diagnostici in epoca preconcezionale e in gravidanza

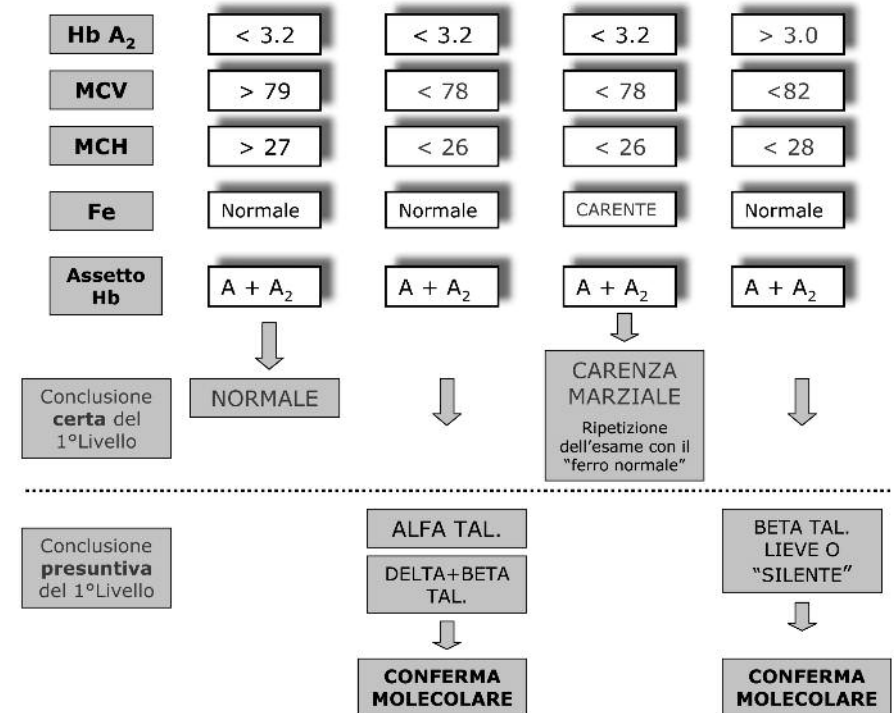
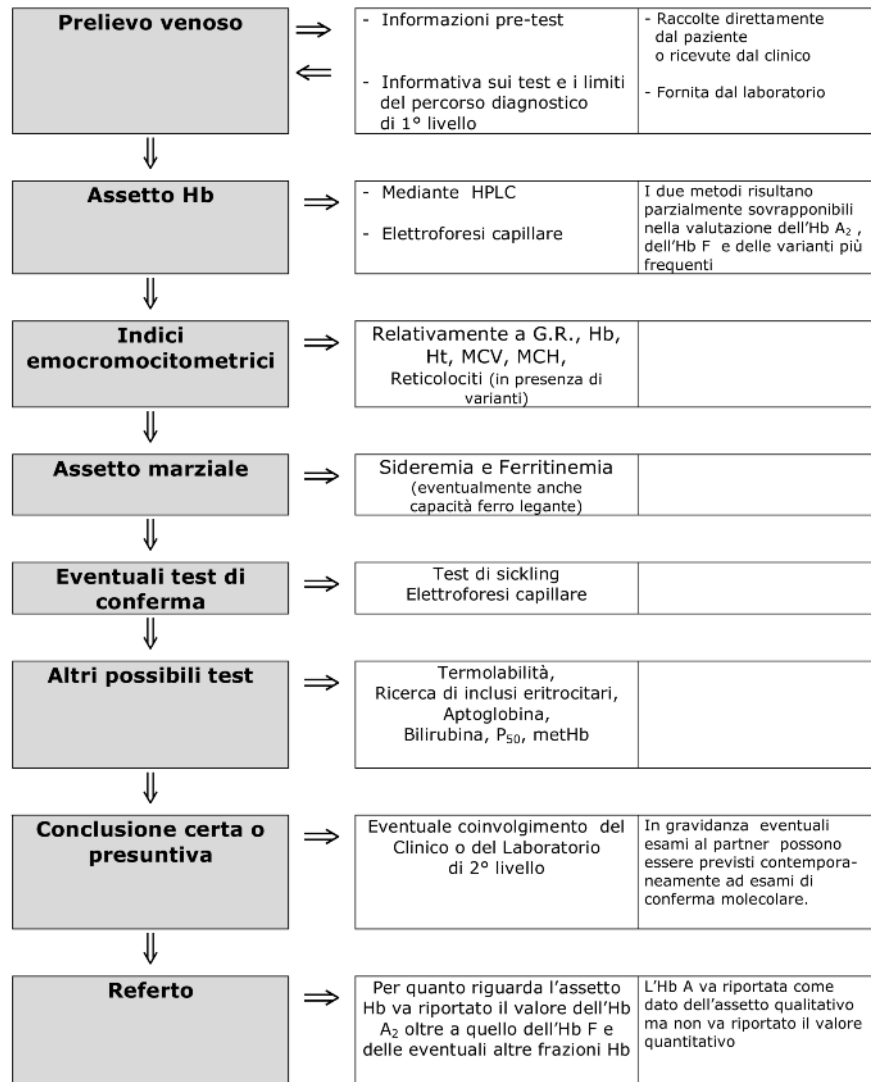
In Tabella 3-3 è riportato il percorso base che consente di poter giungere ad una conclusione certa o presuntiva di 1° livello in epoca preconcezionale e in gravidanza.

In gravidanza può essere chiesto al laboratorio di concludere il percorso analitico con urgenza e soprattutto che si concluda in modo definitivo e certo in tempo utile per eventuali esami fetali: nell'eventualità di una conclusione presuntiva il laboratorio di 1° livello dovrà porre le premesse per un rapido coinvolgimento del partner se non esaminato in precedenza, del clinico ed eventualmente del laboratorio di 2° livello.

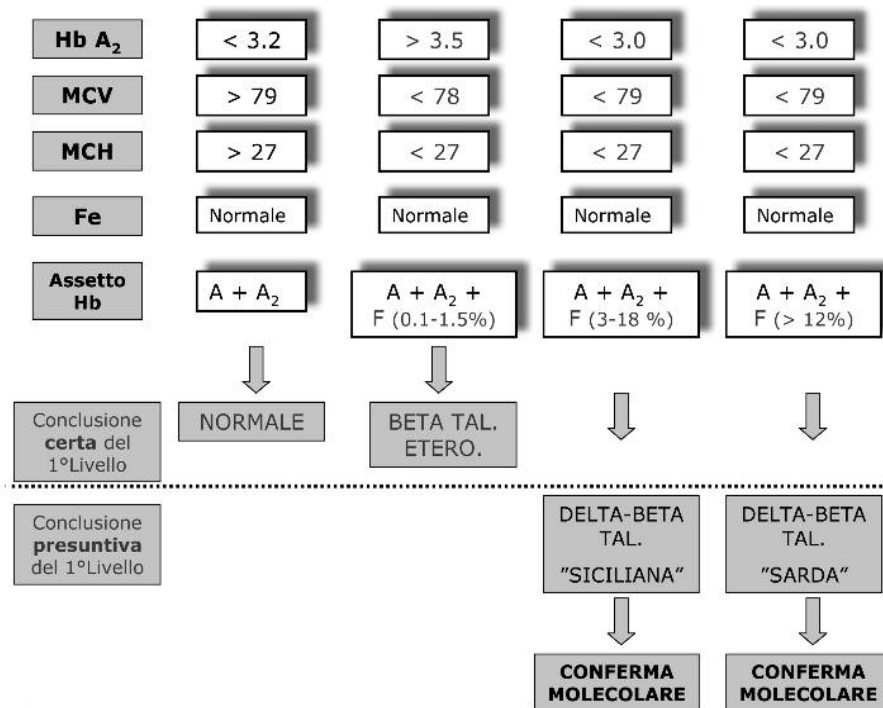
Nelle Fig. 3 (2-5), sono riportate tipologie di casi in età adulta con i relativi flussi diagnostici e le conclusioni a cui è possibile pervenire.

Tabella 3-3

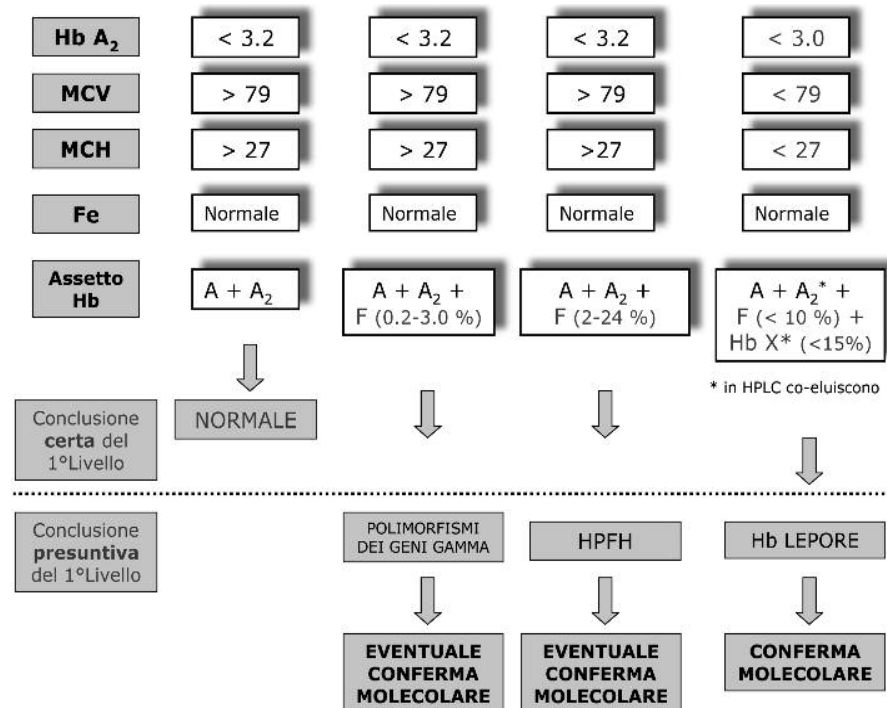
Percorso diagnostico di 1° livello in epoca preconcezionale e in gravidanza.

**Figura 3-2**

Alcuni casi in età adulta con i relativi parametri ematologici e le possibili conclusioni.

**Figura 3-3**

Alcuni casi in età adulta con difetti del cluster non-alfa: parametri ematologici associati e possibili conclusioni.

**Figura 3-4**

Alcuni casi in età adulta con diversi livelli di Hb F: parametri ematologici associati e possibili conclusioni.

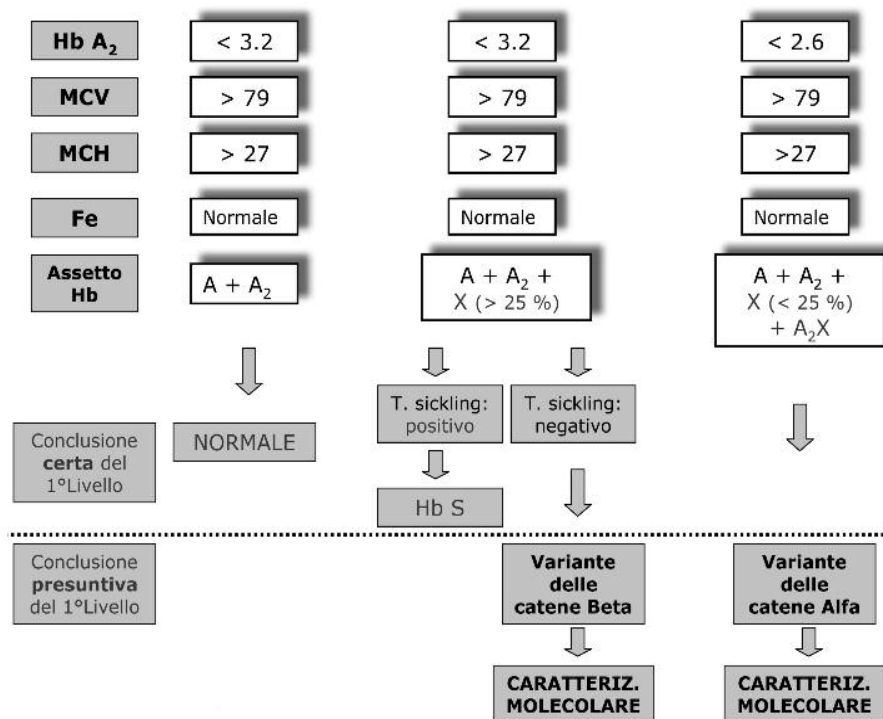


Figura 3-5

Alcuni casi in età adulta con la presenza di varianti Hb: parametri ematologici relativi e possibili conclusioni.

3.3 La valutazione dell'Hb A₂

L'emoglobina A₂ rappresenta una componente minore rispetto all'Hb A ma significativamente presente nei globuli rossi di un individuo normale dopo i sei-otto mesi d'età, quando cioè si è completata la sostituzione dell'Hb F con l'Hb A (l'Hb F dopo l'anno di vita è presente in quantità inferiore all'1% e praticamente non rilevabile nella maggior parte dei soggetti normali). Dalla metà degli anni '50 la presenza dell'Hb A₂ venne dimostrata con metodi elettroforetici e successivamente osservato il suo aumento, circa il doppio del valore normale, nei genitori di bambini affetti da morbo di Cooley e quindi nei portatori sani del tratto beta talassemico (17). Questo rilievo, successivamente confermato, divenne il presupposto per considerare l'Hb A₂ il marcatore principale per la diagnosi di portatore associato a caratteristiche alterazioni ematologiche (18). **Il laboratorio è stato quindi da oltre cinquant'anni chiamato a misurare l'Hb A₂ per il riconoscimento del portatore di beta talassemia; ciò è richiesto con elevata accuratezza in quanto la differenza di quantità di Hb A₂ tra i soggetti sani e quelli portatori può anche essere di poco superiore all'1%. Valori considerati "normali" per l'Hb A₂ sono nella maggior parte dei casi compresi tra 2.5 e 3.2%. È opportuno ricordare che valori compresi tra 2.2 e 2.5 nonché valori compresi tra 3.2 e 3.5 si possono riscontrare in una minor percentuale di soggetti "normali". In quest'ultimo intervallo rientrano anche le forme di beta talassemia "border line" associate a difetti lievi. In nessun caso comunque la diagnosi può essere basata sulla singola determinazione dell'emoglobina A₂ senza tener conto degli indici eritrocitari.**

In alcuni casi il valore dell'Hb A₂ può essere sovrastimato senza la presenza di un difetto talassemico, mentre può risultare nella norma per alcuni rari difetti talassemici "silenti".

La sovrastima dell'Hb A₂ è un evento frequente in presenza di varianti "tipo Hb S" a causa della interferenza con la frazione glicata della variante stessa: in questi casi se il soggetto esaminato non è stato trasfuso negli ultimi tre mesi e presenta una percentuale relativa della variante inferiore a 48%, con certezza si potrà comunque concludere per la presenza di variante allo stato eterozigote. Nel referto va riportato il valore percentuale ottenuto segnalando però la sovrastima dopo aver escluso che si tratti di paziente trasfuso. Inoltre è bene ribadire che, in presenza di una variante beta, una

quota di Hb A attorno al 50% (sempre escludendo i soggetti trasfusi nei tre mesi precedenti la valutazione), implica il fatto che entrambi i due geni beta sono attivi e quindi non può esserci un gene beta talassemico da diagnosticare tramite la valutazione dell'Hb A₂ (19).

In Tabella 3-4 sono riportate le principali variabili preanalitiche individuali che possono produrre sovrastima o sottostima delle concentrazioni relative dell'Hb A₂.

Tabella 3-4

Principali variabili che possono far aumentare o diminuire la concentrazione relativa dell'Hb A₂.

Cause di aumento	Cause di diminuzione
- Ipertiroidismo - Anemia megaloblastica - Terapie con farmaci anti retrovirali - Alcune Hb varianti instabili - Gene alfa triplicato o quadruplicato (non sempre rilevabile) - Componente glicata della beta Variante Hb eventualmente presente (a)	- Anemia sideropenica grave - Anemia sideroblastica - Presenza di Delta Talassemia (b) - Presenza di Varianti delle catene Delta (c) - Presenza di Varianti delle catene Alfa (d) - Alcune forme di HPFH da difetto del promotore dei geni Gamma (e) - Delta-Beta Talassemie - Alfa Talassemie: marginale in Alfa⁺ o Alfa^o mentre è marcata nell'Emoglobinosi H - Hb Lepore (f)
(a) Nel caso di quantificazione con sistemi HPLC (b) Il valore dell'Hb A₂ potrebbe essere normale (c) Il valore reale dell'Hb A₂ equivale a circa il doppio rispetto a quella dosata e definita tale dalla strumentazione. Nel caso in cui l'Hb A_{2x} è rilevata, l'Hb A₂ reale è data dalla somma delle due frazioni. (d) In tale circostanza il valore dell'Hb A₂ va sommato al valore dell'Hb A_{2x}. (e) È ciò che si verifica nella cosiddetta "delta-beta talassemia sarda" con la mutazione -196C>T del promotore del gene A_γ. (f) Rilevabile solo nel caso di quantificazione con CE	

In Tabella 3-5 sono riportati gli intervalli di variabilità dell'Hb A₂ in presenza di alcuni difetti dei geni globinici allo stato eterozigote.

Tabella 3-5

Espressione dell'Hb A₂ in relazione ad alcuni più frequenti difetti dei geni α, β, δ e γ allo stato eterozigote e ad altre condizioni non genetiche: confronto di alcuni significativi parametri (9-10).

Hb A ₂ %	Hb F %	MCV fl	MCH pg	Difetto gene α	Difetto gene β	Difetto gene δ	Difetto gene γ (promoter)	Fenotipo
1.2 – 2.2	< 1.0	> 78	> 26	NO	NO	δ ^o - δ ⁺	NO	Delta Talassemie
1.2 – 1.8	< 1.0	≥ 80	> 27	NO	NO	δ ^x	NO	Delta Varianti
1.2 – 2.3	< 1.0	< 67	< 26	α ⁻ /--	NO	NO	NO	Hb H
1.5 – 2.5	< 1.0	< 80	< 26	NO	NO	NO	NO	IpoFe
1.5 – 2.8	3.0 – 18.0	< 75	< 26	NO	β ^{del}	δ ^{del}	NO	Delta-Beta Tal.
1.9 – 3.1	< 1.0	< 75	< 26	αα/-- (α ⁺) α-/α- (α ^o omo)	NO	NO	NO	Alfa Tal.
2.1 – 3.2	< 1.0	> 76	> 26	α-/αα (α ⁺)	NO	NO	NO	Alfa Tal.
< 2.8	> 12.0	< 75	< 26	NO	β ^o	NO	~196 A _γ	Delta-Beta Tal. Sarda
< 2.8	2.0 – 10.0	< 75	< 26	NO	ibrido δ-β	ibrido δ-β	NO	Hb Lepore
< 3.1	< 2.0	< 75	< 26	NO	β ⁺ o β ⁺	δ ^o , δ ⁺ , δ ^x	NO	δ + β Tal.
2.2 – 3.2	1.0 – 25.0	> 79	> 27	NO	NO	NO	Vari	Varie HPFH
2.5 – 3.2	< 1.0	≥ 79	> 27	NO	NO	NO	NO	Normale
2.8 – 3.5	< 1.5	> 78	> 25	ααα	NO	NO	NO	Gene Alfa Triplicato
2.9 – 3.7	< 1.0	75 – 82	< 28	NO	β ⁺⁺	NO	NO	Beta Tal. silenti
3.0 – 3.7	< 1.0	> 80	> 28	NO	NO	NO	NO	Ipertiroid.
3.0 – 4.2	< 1.0	> 88	> 28	NO	NO	NO	NO	HIV
3.5 – 5.0	< 1.0	68 – 78	< 27	α ⁺ o α ^o	β ⁺ o β ⁺	NO	NO	α + β Tal.
3.6 – 5.5	< 1.5	65 – 78	20 – 27	NO	β ⁺	NO	NO	Beta Tal.
4.1 – 6.5	< 1.5	60 – 72	18 – 26	NO	β ⁺	NO	NO	Beta Tal.

Il metodo oggi più utilizzato per valutare la quantità relativa di Hb A₂ nel sangue circolante è la cromatografia liquida ad alta risoluzione (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) proposta nella forma *dedicata* da diverse Ditte e in varie versioni (20). Essa può garantire un CV inferiore al 4% (21). Per quanto attiene la misura dell'Hb A₂ e dell'Hb F, le strumentazioni disponibili in commercio forniscono in genere buone prestazioni e risultati sovrapponibili. Diverso e più articolato è l'aspetto che riguarda la capacità di separare e discriminare le varianti: tra i diversi sistemi

disponibili ciò dipende soprattutto dal tipo di gradiente che viene applicato. L'elettroforesi capillare (CE) già utilizzata per la separazione delle proteine del siero, oggi è stata proposta anche per lo screening delle emoglobinopatie, per la quantificazione e la separazione delle frazioni fisiologiche e patologiche dell'Hb (22): questa tecnica può rappresentare, insieme ad altri, anche uno strumento secondario di conferma nella diagnosi delle varianti più comuni (Tabella 3-6).

Tabella 3-6

Metodi e Test nella diagnosi di 1° livello delle emoglobinopatie.

Metodo o Test	Test specifici	Test di conferma	Altri Test	Commenti
1.HPLC	X	X		Separazione e quantificazione
2.CE	X	X		Separazione e quantificazione alternativa
3.Emocromo	X			Indici eritrocitari valutati: G.R. ($\times 10^3/\mu\text{L}$), Hb (g/dL), MCV (fL), MCH (pg), Ht (%).
4.Sideremia	X			In alternativa ZnPP.
5.Transferrina	X			
6.Ferritina	X			
7.T. di sickling		X		Nel caso di variante separata come Hb S in 1 e 2: la falcizzazione <i>in vitro</i> mediante metabisolfito di Na è il test di conferma richiesto
8.T. termolabilità			X	T. di Carrell a 37°C : risultato osservato dopo 30' di incubazione
9.Ricerca inclusi Hb H like			X	Si valuta la presenza degli inclusi dopo incubazione a 37°C in brilliant cresyl blue per almeno 4 ore. (una o poche cellule con inclusi possono indicare la presenza di un trait alfa talassemico, molte cellule con inclusi Hb H disease)
10.Reticolociti			X	(%)
11.Ricerca Corpi di Heinz			X	Si valuta la presenza dei Corpi di Heinz dopo incubazione a 37°C per 1 ora senza determinarne la percentuale (in soggetti splenectomizzati con varianti Hb instabili)
12.P ₅₀			X	Test su sangue arterioso o venoso in presenza di un ematocrito aumentato (>45% nella donna e >50% nell'uomo)
13.Aptoglobina			X	In presenza di anemia emolitica
14.Metaemoglobinemia			X	In presenza di cianosi
15.Bilirubina			X	In presenza di anemia emolitica

L'Hb A₂ può in alcuni casi non essere quantificabile per interferenza con una variante Hb, alcune di queste varianti sono elencate in Tabella 3-7.

Tabella 3-7

Quantificazione dell'Hb A₂ e riscontro comparato di alcune Varianti Hb più frequenti e rare: comportamenti rispetto ai metodi separativi riportati nel testo.

Varianti Hb più frequenti	La Variante interferisce nel calcolo dell'Hb A ₂ ?		La Variante risulta correttamente quantificata?	
	HPLC	CE	HPLC	CE
Hb S	SI (1)	NO	SI	SI
Hb C	NO	NO	SI	SI
Hb D Punjab (Hb D Los Angeles)	NO (2)	NO	SI	SI
Hb E	SI	NO	SI	SI
Hb Lepore	SI	NO	SI	SI
Hb Hasharon	NO	NO	SI	SI
Varianti Hb rare				
Hb O Arabia	NO	SI	SI	SI
Hb Osu Christiansborg	SI	NO	SI	SI
Hb D Ouled Rabah	SI	NO	SI	SI
Hb G Copenhagen	SI	NO	SI	SI
Hb Muravera	SI	NO	SI	SI
Hb Okayama	NO	NO	SI	NO
Hb Camperdown	NO	NO	SI	NO
Hb Niguarda	NO	NO	SI (3)	NO
Hb Kempsey	NO	NO	SI	SI

(1) Interferenza dovuta alla componente glicata della variante
(2) Con alcuni sistemi HPLC la variante interferisce nel dosaggio dell'Hb A₂
(3) Separazione parziale da Hb A

3.4 La valutazione dell'Hb F

Attualmente, anche per l'Hb F come per le altre frazioni Hb, l'approccio quali-quantitativo utilizza sistemi HPLC a scambio cationico su strumentazioni commerciali dedicate (23) oppure l'elettroforesi capillare (CE). L'Hb F quantificata mediante CE può risultare parzialmente sottostimata per valori inferiori all'1.5% mentre in HPLC può risultare sovrastimata se parzialmente sovrapposta alla frazione labile dell'Hb glicata o, con alcuni sistemi, non correttamente quantificata per valori elevati. In HPLC, l'Hb F viene separata dalla Hb F acetilata (l'acetilazione è una reazione enzimatica post-traduzionale che interessa le glicine N-terminali delle catene gamma) che viene eluita con un tempo di ritenzione di poco inferiore e rappresenta circa il 10-20% della HbF, sia nel sangue fetale che, se è presente, in quello dell'adulto. Nella maggior parte dei soggetti

“normali” l’Hb F mediamente risulta inferiore all’1% mentre si conoscono significativi aumenti in presenza di difetti isolati o associati dei geni del cluster “non-alfa” (Tabella 3-5).

Sono rari i casi noti di interferenza, nella valutazione dell’Hb F: con i vari sistemi HPLC possiamo osservare una sovrapposizione con le varianti Hb Marseille e Hb J Iran, mentre in CE con l’Hb Richmond, l’Hb G San José, l’Hb Presbiterian, l’Hb Porto Alegre (24).

3.5 Stato marziale ed emoglobinopatie

La carenza marziale rappresenta la maggior causa di anemia e come è noto il ferro influenza come nel talassemico, il volume dei globuli rossi (MCV) nonché il contenuto medio in emoglobina nell'eritrocita (MCH) ed ovviamente la quantità totale di emoglobina (Hb) ma, contrariamente alla condizione talassemica, la conta eritrocitaria (RBC) è spesso normale o ridotta. Per questo motivo contestualmente all'assetto emoglobinico è opportuno conoscere lo stato marziale del paziente attraverso alcuni parametri specifici (sideremia, ferritina, transferrina).

Nel caso di carenza di ferro con indici eritrocitari inferiori alla norma, è necessario procedere agli esami di 1° livello per le emoglobinopatie a valori marziali corretti e, se non urgenti, dopo un periodo di tempo adeguato al ripristino della popolazione eritrocitaria. Va ribadito che una marcata carenza di ferro può mascherare la presenza di difetti talassemici. Casi classici sono quelli di madri provenienti dal Nord Africa, talassemiche, che dopo molte maternità possono presentarsi all'attenzione clinica con una marcata anemia ferropriva associata a carenza di acido folico (25). Nei casi urgenti la definizione diagnostica del soggetto deve poter avvenire mediante test molecolari con l'obiettivo primario di escludere i difetti più importanti.

3.6 I parametri emocromocitometrici nelle emoglobinopatie

È noto come gli indici eritrocitari risentano del contenuto del globulo rosso e quindi della produzione di emoglobina, dell'attività midollare e della sopravvivenza eritrocitaria. Alcuni di questi parametri sono messi a

confronto in Tabella 3-5. Quasi tutti i counters producono il dato dell'RDW che nella nostra esperienza poco aggiunge all'informativa finalizzata alla diagnostica dei difetti emoglobinici; la sua valutazione può essere utile in presenza di una doppia popolazione.

Nessuna conclusione degli esami di 1° livello è possibile senza conoscere il dato dell'emocromo: esso risulta alterato e particolarmente significativo in presenza di difetti talassemici mentre le varianti dell'emoglobina solo in rari casi particolari (varianti instabili o con alterata affinità per l'ossigeno) presentano alterazioni degli indici eritrocitari.

Nell'Hb S di solito gli indici eritrocitari sono normali ma nella popolazione afro-americana con tale variante, frequentemente risultano presenti anche difetti alfa talassemici che possono produrre una diminuzione del volume cellulare medio.

Alla luce anche di queste considerazioni occorre ricordare l'importanza di non basare mai la valutazione dello stato di portatore di emoglobinopatia solo sulla lettura degli indici eritrocitari.

3.7 Il riscontro di Varianti Hb

Le varianti emoglobiniche fino ad oggi descritte (6) appartengono prevalentemente alle catene beta, oltre 500, e alle catene alfa, oltre 350 e nella maggior parte dei casi differiscono strutturalmente dall'Hb A per la sostituzione di un solo amminoacido, conseguenza di una singola base nucleotidica mutata. Le tecniche separative normalmente in dotazione al laboratorio di 1° livello permettono di distinguere la presenza di circa i 2/3 delle varianti conosciute e tra queste riconoscere con un grado di specificità accettabile ma pur sempre presuntivo le emoglobine anormali rilevanti e più comuni (Hb S, C, E, Lepore). Le numerose varianti dal comportamento cromatografico o elettroforetico meno comune, anche se in apparenza clinicamente asintomatiche, dovranno comunque essere successivamente caratterizzate mediante tecniche più specifiche e raffinate (DNA). ***Tuttavia in presenza di fenomeni emolitici, poliglobulie e anemie, è auspicabile che già nell'ambito della diagnostica di 1° livello il laboratorio sia in grado di orientare, in prima battuta, l'iter diagnostico verso alcuni test biochimici. (Tabella 3-6).*** Quando una variante si separa in HPLC o in CE disponiamo della sua

percentuale relativa e del suo tempo di eluizione: queste informazioni ci consentono di ipotizzare il cambiamento di carica elettrica intervenuto e supporre il tipo di catena globinica coinvolta. La percentuale relativa della maggior parte delle emoglobinopatie strutturali, allo stato eterozigote, varia tra il 15 e il 45 % quando il difetto interessa le catene beta e tra il 5 e il 30% quando interessa le catene alfa globiniche. Tali percentuali dipendono da alcuni fattori, quali la stabilità della catena mutata, l'affinità che questa ha nei confronti della catena omologa normale e quindi l'efficienza nel formare un tetramero stabile, la possibile ridotta sintesi della globina variante, il numero di geni strutturali mutati sul totale dei geni presenti (due per le catene beta e quattro per le catene alfa), l'affinità per l'ossigeno della emoglobina mutata o l'associazione con difetti alfa o beta talassemici.

Quando una variante, qualunque essa sia, presenta una quantità relativa superiore al 50% è certa la presenza di un doppio difetto dello stesso gene su due alleli diversi, se il soggetto in esame non è stato trasfuso recentemente.

Nella pratica quotidiana una condizione riscontrabile con una certa frequenza, assimilabile alla presenza di doppia eterozigosi o di omozigosi dello stesso difetto, è rappresentato dalle SCD: in questi casi l'assetto emoglobinico mostrerà la variante (Hb S) in quantità superiore al 50% (se il soggetto non è stato trasfuso). L'ipotesi di un doppio difetto in questo caso sarà corretta e potrà essere riportata nelle conclusioni dell'esame, ma per poter risalire ai difetti presenti (omozigosi per Hb S o doppia eterozigosi di Hb S con Beta Talassemia) occorrerà affidarsi all'analisi molecolare (2° livello).

Gli strumenti HPLC "dedicati" o la CE, in presenza di varianti, forniscono alcune indicazioni all'operatore: in genere la "finestra" che contiene il picco anomalo segnala le varianti con caratteristiche simili. Tali messaggi devono solo suggerire una ipotesi diagnostica che non può mai essere considerata certa, e quindi trasferita nel referto, senza la validazione di almeno un test di conferma (Tabella 3-6).

Il test di conferma che maggiormente il laboratorio potrà essere chiamato ad eseguire è il test per l'Hb S: a questo proposito va detto che il test più affidabile, se correttamente eseguito, è il test di sikling o test di falcizzazione "in vitro" (26).

L'osservazione di una variante richiama comunque l'opportunità, come per i difetti talassemici, di esaminare il partner del soggetto portatore: la presenza di

difetti emoglobinici in entrambi i soggetti della coppia dovrà suggerire una consulenza genetica specialistica presso un Centro clinico. Nel caso di varianti rare o nuove non sarà certamente facile poter prevedere o supporre il fenotipo clinico del composto emoglobinico che ne può derivare: è soprattutto in tali circostanze che si auspicano comportamenti sinergici tra i laboratori di 1° e 2° livello e i clinici.

3.8 Altri esami utili per la valutazione dello stato di portatore di emoglobinopatie

Come evidenziato nelle Tabelle 3-3 e 3-6 in aggiunta ai parametri emoglobinici ed ematologici classici, altri esami possono contribuire all'identificazione e alla definizione di caratteristiche biochimiche e funzionali di una possibile emoglobinopatia.

In particolare: reticolociti e bilirubina sono importanti nella valutazione della beta talassemia allo stato omozigote, nell'alfa talassemia da Hb H nonché in presenza di varianti instabili e/o emolitiche allo stato eterozigote, omozigote o associate a difetti talassemici (composti).

Nelle varianti che comportano emolisi può essere utile valutare anche l'aptoglobina e LDH prima della formulazione di un referto definitivo e/o presuntivo. È comunque importante considerare che se la determinazione dei reticolociti, della bilirubina totale e frazionata, dell'LDH, dell'aptoglobina, sono importanti nell'individuazione di una condizione emolitica, ciascuno di questi parametri potrebbe perdere il significato diagnostico perché influenzato anche da condizioni diverse dall'emolisi. Pertanto bisogna tenere presente che l'iperbilirubinemia indiretta potrebbe scaturire da epatopatia o Sindrome di Gilbert (in essa è assente la reticolocitosi). L'aumento della LDH può avere svariata eziologia. La reticolocitosi può mancare, anche se l'emolisi è presente, per disparate cause (problematiche carenziali multiple, insufficienza midollare o infiltrazione da parte di cellule neoplastiche, cause immunologiche, etc). L'aptoglobina può essere falsamente normale per difetto della fagocitosi o per contemporanea flogosi ed essere ridotta in assenza di emolisi per deficit di sintesi epatica (epatopatie, periodo neonatale).

Occorre ricordare che le varianti instabili (soprattutto delle catene beta)

dell'emoglobina possono essere individuate mediante la ricerca di inclusioni eritrocitarie dopo incubazione con BCB o di corpi di Heinz nei soggetti splenectomizzati.

La metaemoglobinemia, dato ricavabile anche da un'emogasanalisi, è un parametro da considerare in presenza di varianti il cui difetto comporta la stabilizzazione del ferro all'interno dell'eme allo stato ossidato (Fe^{+++}). La valutazione della P_{50} è importante nel sospetto di varianti con alterata affinità per l'ossigeno: aumenta con varianti a bassa affinità e diminuisce con quelle ad alta affinità.

Per questi motivi si ritiene opportuno che il laboratorio possa o consigliare i test di cui a questo capitolo o, meglio ancora, avere la possibilità di produrre un "test reflex" previa doverosa informativa al paziente all'atto della prenotazione.

3.9 Il riscontro di emoglobinopatie nel corso di test non dedicati ai difetti dell'Hb

La ricerca e il riscontro di difetti dell'emoglobina non di rado rappresenta il momento successivo ad accertamenti che il laboratorio ha condotto in soggetti genericamente anemici, microcitotici, poliglobulici o in soggetti potenzialmente diabetici nei quali, in genere per la prima volta, viene dosata l'emoglobina glicata (Hb A_{1c}).

Le cause più frequenti di microcitosi sono dovute alla carenza di ferro e non di rado vengono richiesti esami per la ricerca dello stato di portatore di talassemia proprio dopo aver escluso una carenza di ferro. Alla ricerca di una variante instabile talvolta si giunge dopo aver escluso altre cause di anemia emolitica, più frequentemente enzimopenica o da sferocitosi; in questi casi alcuni esami (vd. 3.8) possono orientare i successivi percorsi diagnostici.

Le eritrocitosi possono suggerire la ricerca di varianti con affinità aumentata per l'ossigeno dopo aver valutato altre cause di policitemia. In tutti questi casi è opportuno che il "laboratorio delle emoglobinopatie" venga informato sul risultato degli esami già eseguiti con obiettivi diversi.

La circostanza che più frequentemente può condurre al riscontro, soprattutto, di varianti è la misura dell' Hb A_{1c} : esame questo molto frequente e diffuso e che oggi si esegue in prevalenza con metodi

cromatografici "dedicati". Nel caso in cui con questo esame si rileva una qualsiasi variante, talvolta anche interferente con la misura dell' Hb A_{1c} , è opportuno che ne venga segnalata la presenza al Responsabile del Settore "emoglobinopatie" che provvederà eventualmente ad attivare i percorsi di identificazione dopo che il riscontro e/o l'interferenza della variante è stata segnalata al clinico prescrittore e al paziente (27).

3.10 Le conferme diagnostiche non molecolari

Il laboratorio che esegue esami di 1° livello può essere in grado di eseguire anche alcuni test secondari di conferma: senza dover ricorrere all'esame del DNA potrà così risultare conclusivo il dato biochimico di 1° livello. ***In Tabella 3-6 sono riportati alcuni dei test che possono essere considerati di parziale conferma in quanto riconducibili a metodi o principi diversi da quelli su cui si basa la valutazione primaria dell'assetto Hb.***

3.11 Intervalli di riferimento

Un requisito previsto nella risposta del laboratorio è in genere rappresentato dagli intervalli di riferimento relativi ai risultati prodotti (vd. 4.1). Nel caso dei test di 1° livello per le emoglobinopatie tali intervalli riguardano i valori numerici di riferimento ritenuti "normali" dell'assetto emoglobinico, dell'assetto marziale e dell'emocromo. Come per tutti gli intervalli di riferimento essi sono definiti rispetto alla popolazione sana e in genere dovrebbero servire al clinico per orientarlo nella valutazione dei risultati riferiti dal laboratorio (11). In particolare per quanto riguarda i valori di riferimento normali relativi all'assetto emoglobinico non è facile definirne gli intervalli con assoluta certezza a causa della numerosità dei fattori, genetici e no, che possono intervenire e coesistere. Inoltre lievi ma comunque ininfluenti differenze si possono avere tra i sistemi separativi in uso.

Per l'assetto Hb i valori di riferimento, si riferiscono all'Hb F e all'Hb A alla nascita e all'Hb A₂ e all'Hb F negli individui adulti: essi non presentano differenze significative tra maschio e femmina e neanche tra i soggetti di

etnie diverse. Nelle Tabelle 3-2 e 3-5 sono riportati i valori considerati normali rispettivamente alla nascita e nel soggetto adulto.

Gli indici eritrocitari da riportare nel referto sono quelli utili alla conclusione diagnostica per i difetti dell'emoglobina così come indicato in Tabella 3-8. In alternativa l'intero risultato dell'esame emocromocitometrico, con i relativi intervalli di normalità, può essere incluso nel referto. In Tabella 3-8 sono riportati alcuni intervalli di riferimento specifici ricavati dalla letteratura (28). Analogamente avverrà anche per gli esami relativi all'assetto marziale da utilizzare per differenziare le "microcitosi" dalle vere e proprie "microcitemie". Per quanto detto fin qui, risulta evidente che l'ampia variabilità genetica dei difetti globinici condiziona ciascun test e l'insieme dei "test specifici per le emoglobinopatie": anche per questo motivo appare evidente l'importanza del commento del laboratorio a conclusione dell'esame, onde evitare che gli intervalli di riferimento siano utilizzati dal clinico come soglia decisionale per scelte che potrebbero non tener conto dell'insieme dei risultati.

Tabella 3-8

Intervalli di variabilità degli indici eritrocitari utilizzati nella diagnosi delle emoglobinopatie in sei classi di soggetti « normali »* (28).

Principali Indici Eritrocitari	Maschio adulto caucasico	Donna adulta caucasica	In gravidanza (1° trimestre)	In gravidanza (3° trimestre)	Neonato	A un mese
RBC $\times 10^{12}/L$	4.32 – 5.66	3.88 – 4.99	3.52 – 4.52	3.1 – 4.44	3.5 – 6.7	2.8 – 5.3
Hb g/dL	13.3 – 16.7	11.8 – 14.8	11.0 – 14.3	9.8 – 13.7	13.7 – 20.1	10.1 – 18.3
Hct %	39 – 50	36 – 44	31 – 41	28 – 39	47 – 59	32 – 55
MCV fL	80 – 96	80 – 96	81 – 96	81 – 99	90 – 118	90 – 120
MCH pg	27.3 – 32.6	27.0 – 33.0	26.5 – 33.0	25.0 – 33.5	30.0 – 38.5	28.0 – 36.4

(*) Sono riportati i cinque indici ritenuti maggiormente utili tra quelli espressi dall'esame emocromocitometrico. Tra i parametri eritrocitari talvolta è stato considerato anche l'RDW ma nella nostra esperienza poco informa sulle emoglobinopatie; la sua valutazione può essere utile in presenza di una doppia popolazione eritrocitaria.

3.12 Emoglobine e VEQ

La costante verifica della qualità attraverso la partecipazione a schemi di VEQ, sia relativi ad aspetti metodologici specifici sia alla capacità di identificare specifici difetti e assetti, rientra nei percorsi di accreditamento e di certificazione dei laboratori d'analisi chimico clinica. **La SITE con un apposito documento si farà parte attiva nel proporre opportune e specifiche linee guida per la VEQ nell'ambito dei diversi livelli diagnostici delle emoglobinopatie con lo scopo di estendere la VEQ all'intero percorso diagnostico (dalla fase pre-analitica a quella post-analitica).**

3.13 I tempi di refertazione

Relativamente ai tempi di refertazione il laboratorio che si occupa della diagnostica delle emoglobinopatie dovrà considerare le caratteristiche di maggiore o minore urgenza delle richieste afferenti.

I laboratori che supportano la diagnostica a favore dei Centri clinici che hanno in cura soggetti politrasfusi dovranno essere organizzati per rispondere anche a richieste urgenti (referto non oltre le 2 ore dall'arrivo del campione).

È buona norma considerare urgenti anche gli esami eseguiti in gravidanza con tempi di risposta non superiori ai tre giorni. Gli esami eseguiti in epoca preconcezionale di solito non sono considerati urgenti.

Sovente i laboratori più piccoli hanno l'esigenza di dilazionare le sedute analitiche per poter raggiungere un numero congruo di campioni: tali comportamenti non consentono di rispondere a richieste urgenti. È comunque consigliabile eseguire almeno tre sedute settimanali evitando di congelare i campioni.

4. ASPETTI POST-ANALITICI

4.1 Il Referto: caratteristiche generali e specifiche

Da alcuni anni i laboratori di genetica, i laboratori di analisi chimico cliniche, specialistici e non, perseguono l'obiettivo di inserire un commento interpretativo a conclusione degli esami eseguiti per rendere più chiare le informazioni che oggi possono essere disponibili con le moderne tecnologie sempre più sofisticate (29-32).

Occorre premettere che l'insieme degli esami destinati a formulare una diagnosi relativa ai difetti genetici dell'emoglobina dovrebbero essere raggruppati a costituire una sezione distinta del referto evitando sovrapposizioni con eventuali altri esami eseguiti e non pertinenti.

Il referto degli esami di 1° livello per le emoglobinopatie deve quindi contenere nella prima parte i dati identificativi del paziente (cognome, nome, sesso, data di nascita), quelli relativi al campione (data del prelievo, numero identificativo interno), la provenienza del campione (ambulatorio esterno, interno, Unità Operativa, Ospedale). Vanno inoltre indicati i metodi che sono stati utilizzati per ottenere i dati quali-quantitativi dell'assetto Hb. Nella seconda parte del referto devono essere riportati i valori numerici relativi agli esami eseguiti e previsti dai diversi percorsi (vd. 3.1-3.3), nonché gli intervalli di riferimento distinti per sesso ed età quando previsto. Il referto non deve riportare allarmi strumentali di alcun tipo e al referto non devono essere allegati grafici o tabelle prodotte dalle apparecchiature.

La terza parte deve contenere le conclusioni o i commenti: pur nella loro ampia varietà, saranno standardizzati, sintetici quanto basta e pertinenti al quesito posto dal richiedente. Tali conclusioni del referto, i commenti e i suggerimenti trovano ampia spiegazione al punto 4.2.

4.2 Il Referto: le conclusioni diagnostiche del 1° livello

- 4.2a *Più esami concorrono alla formulazione di una diagnosi di laboratorio per le emoglobinopatie: pur con alcune variabili le informazioni fornite dai test di 1° livello possono essere sufficienti, nella maggior parte dei casi, a identificare una condizione genetica normale o di positività per un difetto dell'Hb, e tali condizioni non potrebbero essere definite altrimenti.*

- 4.2b *I quesiti diagnostici specifici per le emoglobinopatie possono essere formulati da vari specialisti e di conseguenza le conclusioni del laboratorio dovranno soddisfare molteplici aspettative: pur avvalendosi di tutte le informazioni analitiche e pre-analitiche il laboratorio potrebbe non essere in grado di rispondere con conclusioni definitive al quesito posto dal clinico. Il laboratorio se è in grado di procedere a "reflex-testing" potrebbe giungere a conclusioni diagnostiche definitive senza far ricorso a test di 2° livello, altrimenti la conclusione potrà essere solo "presuntiva".*

- 4.2c *È evidente che la corretta conclusione e comunicazione dei risultati di laboratorio dipende da una cascata di azioni appropriate a partire dalla richiesta e dal quesito diagnostico. Il fine ultimo è quello di ben operare a vantaggio del paziente senza sprechi di risorse: solo nel caso in cui l'insieme di tutti i test di 1° livello dovessero produrre una conclusione incerta potrà essere consigliata la ripetizione degli stessi esami presso lo stesso laboratorio dopo una valutazione delle possibili cause dell'incertezza; eventualmente gli stessi esami potranno essere consigliati ai familiari e quando ciò non è possibile per motivi di urgenza allora si potrà ricorrere ad esami specifici di 2° livello presso un laboratorio di riferimento.*

Nel caso delle emoglobinopatie, come per la maggior parte dei test genetici, partendo da una richiesta appropriata, disponendo di una anamnesi minima e dati di laboratorio informativi, si potrà pervenire a produrre un referto che nella maggior parte dei casi, per tutta la vita, non richiederà ulteriori accertamenti. In mancanza di uno di tali requisiti non si potrà giungere ad alcuna conclusione diagnostica. Così facendo, lo Specialista di laboratorio non intende sostituirsi al Clinico ma essere un valido complemento e supporto al Clinico stesso, al quale compete sia la diagnosi clinica che la conduzione terapeutica del paziente.

4.3 Dalla diagnostica di 1° livello ai test di approfondimento

Gli esami per il riscontro di difetti dell'Hb possono risultare parzialmente alterati ponendo il laboratorio che esegue solo test di 1° livello nella condizione di non riuscire a rispondere in modo esauriente e definitivo al quesito posto dal clinico prescrittore; tale circostanza suggerisce la necessità di proporre o decidere per un approfondimento diagnostico coinvolgendo un laboratorio di riferimento con la richiesta di esami di 2° livello. È opportuno condividere con il clinico tale decisione, portandone a conoscenza anche il paziente dal quale occorre ottenere un adeguato consenso (Fig. 2-1).

Questo passaggio di consegne potrebbe essere reso urgente da una gravidanza in corso o da una criticità clinica: in queste circostanze il commento o la relazione a conclusione degli esami di 1° livello può rappresentare un elemento di valore per meglio orientare e velocizzare il percorso diagnostico di 2° livello. Se l'approfondimento diagnostico non è urgente e quindi procrastinabile, il messaggio al clinico prescrittore da parte del laboratorio di 1° livello deve essere tale da informare in modo chiaro sul risultato non definitivo e rimandare comunque a successive indagini.

4.4 Come inviare i campioni ematici o di DNA al laboratorio di 2° livello

La spedizione del materiale da esaminare, sangue o DNA già estratto, può avvenire secondo gli usi e le modalità proprie di ciascun laboratorio: è comunque essenziale che il 1° livello prenda gli opportuni accordi con il laboratorio di 2° livello prima della spedizione o dell'invio del paziente: in Tabella 4-1 sono riportate alcune modalità pratiche.

Tabella 4-1

Suggerimenti pratici per l'invio di un campione da esaminare presso il laboratorio di 2° livello.

INDIVIDUAZIONE DI UN LABORATORIO DI RIFERIMENTO PER LE Hb-PATIE DA COINVOLGERE IN UN APPROFONDIMENTO DIAGNOSTICO (A.D.)	- La scelta del laboratorio a cui inviare per l'A.D. in talune realtà regionali può essere orientata da specifiche regole nell'ambito di una razionale gestione della spesa sanitaria; - E' comunque preferibile optare verso quelle realtà di laboratorio di 2° livello direttamente o indirettamente collegate ad una struttura clinica dedicata alle Hb-patie; - Nei casi in cui si dovesse prefigurare una diagnosi prenatale deve essere contattata una <u>struttura clinica</u> di riferimento per le Hb-patie che provvederà all'adeguata consulenza e all'invio al <u>laboratorio di riferimento dedicato</u> per le opportune caratterizzazioni.
INVIO DI UN CAMPIONE EMATICO (1) nel caso in cui il laboratorio di riferimento debba procedere ad esami funzionali il campione di sangue prelevato da più di una settimana può risultare non idoneo e quindi un prelievo « fresco » si rende necessario. (2) in regime di libera professione mediante specifici accordi con il laboratorio di 2° livello. In tutti i casi è opportuno accompagnare il campione da esaminare con i risultati degli esami già eseguiti, una « anamnesi breve » (vedere allegato) del paziente o dei familiari, il consenso informato firmato.	- può avvenire <u>per decisione del laboratorio</u> di 1° livello : a. utilizzando il sangue già prelevato in occasione del primo esame¹; b. se un nuovo prelievo si rende necessario se ne informa il paziente stesso in occasione della consegna del referto di 1° livello ; c. coinvolgendo il clinico prescrittore che potrà produrre una nuova richiesta; d. senza coinvolgere il clinico prescrittore producendo direttamente una nuova richiesta; e. nel caso in cui il paziente è ricoverato occorre l'autorizzazione della direzione sanitaria ; f. può anche essere prevista una richiesta di esame per approfondimento diagnostico <i>in regime di libera professione</i>², se previsto dal laboratorio di 2° livello, nel caso ad esempio in cui non vi sia una necessità clinica riconosciuta ma solo una esigenza di tipo speculativo; g. per il trasferimento del materiale possono essere utilizzate soluzioni diverse: è importante che siano garantite alcune condizioni (trasferimento in tempi ragionevoli, non superiore alle 48 ore, temperatura controllata, non superiore a 8°C); - può avvenire <u>per decisione del clinico specialista</u> prescrittore con le modalità di cui sopra;
INVIO DEL PAZIENTE	- se le condizioni lo consentono, può essere opportuno inviare il paziente stesso presso la struttura di 2° livello; il paziente dovrà essere munito della documentazione prodotta dal laboratorio di 1° livello.

4.5 Conservazione dei risultati degli esami

I risultati degli esami prodotti dovranno essere archiviati e conservati in copia per un tempo indeterminato come documento cartaceo o informatizzato eventualmente a disposizione degli interessati nei limiti previsti dal consenso firmato.

I casi di particolare interesse, dopo la opportuna anonimizzazione nel rispetto della normativa che regola la privacy, potranno essere utilizzati facendoli confluire, in collaborazione con i Laboratori di 2° livello, in raccolte utili anche ai Centri di Riferimento Clinico per le consulenze genetiche.

4.6 Alcuni Laboratori di Riferimento per la Diagnostica di 2° livello e/o Prenatale

In Tabella 4-2 sono riportati indicativamente alcuni Laboratori di Riferimento a cui il 1° livello diagnostico può sottoporre i casi non diagnosticati in modo definitivo o per i quali genericamente risulta necessario un percorso diagnostico successivo o di consulenza genetica come indicato in diversi punti da queste raccomandazioni.

Tabella 4-2

Alcuni Laboratori di Riferimento per la Diagnostica di 2° livello e/o Prenatale.

Città	Ospedali - Centri	Denominazione del Laboratorio
Bari	Policlinico di Bari	• Ematologia con Trapianto
Cagliari	Ospedale Microcitemico	• Laboratorio di Genetica Umana
Catania	Ospedale Vittorio Emanuele	• Servizio di Diagnosi Prenatale e Genetica Medica
Ferrara	A.O. Universitaria S. Anna	• Laboratorio di Genetica Molecolare, Unità Operativa di Genetica Medica
Genova	E.O. Ospedali Galliera	• Laboratorio di Genetica Umana, Settore Microcitemia
Milano	Fondazione "Ca' Granda" Policlinico	• Laboratorio di Genetica Medica, Settore Molecolare
Napoli	A.O.U. Federico II A.O.R.N. Cardarelli	• Dip. Medicine di Laboratorio CEINGE, Biotecnologie Avanzate • Genetica Medica, Diagnostica Talassemie ed emoglobinopatie
Palermo	A.O. Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello	• Laboratorio Molecolare, Unità Operativa Ematologia con Talassemia
Roma	Centro Studi delle Microcitemie	• Laboratorio annesso al Centro
Torino	A.O.U. S. Luigi di Orbassano	• Laboratorio Biologia Molecolare

CONCLUSIONI

Queste *raccomandazioni* volute dalla Società Italiana per le Talassemie ed Emoglobinopatie, sono dirette soprattutto agli specialisti di Laboratorio: esse possono rappresentare uno strumento per espletare una “buona pratica” di Laboratorio nella condivisione di percorsi analitici standardizzati. L’obiettivo che ha portato a proporre azioni e decisioni appropriate è stato quello di trovare risposte alle esigenze manifestate dai laboratori su tutto il territorio nazionale per migliorare l’efficienza e l’efficacia del proprio agire, consapevoli che una buona diagnosi di laboratorio possa contribuire in modo essenziale a migliorare l’intervento terapeutico, come pure, quando possibile, a garantire le più idonee procedure preventive.

Riteniamo che queste *raccomandazioni* potranno essere uno strumento fruibile anche da parte dei Clinici e dei Medici di Medicina Generale nell’ottica di una più moderna e aggiornata prevenzione, diagnosi e cura dei difetti dell’emoglobina. Esse non rappresentano certamente indicazioni immutabili nel tempo ma dovranno essere suscettibili di modifiche e integrazioni alla luce di nuove acquisizioni scientifiche o di cambiamenti nei percorsi diagnostici.

BIBLIOGRAFIA E DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

1. Harper P.S. What do we mean by genetic testing? J. Med Genet 1997; 34, 749-757.
2. Attuazione delle linee guida per le attività di genetica medica - Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano, accordo 26/11/2009 (repertorio Atti 241/CSR del 26/11/2009).
3. Linee di indirizzo per la riorganizzazione dei Servizi di medicina di laboratorio nel Servizio Sanitario Nazionale" predisposte dall'Agenzia nazionale per i servizi sanitari regionali Ministero della Salute, Ministero dell'Economia e delle Finanze Adempimenti previsti dalla Legge Finanziaria 2007 Riorganizzazione della rete delle Strutture pubbliche di Diagnostica di Laboratorio (art.1, comma 796, lettera O della L 296/2006).
4. Regolamento di istituzione della rete nazionale delle malattie rare e di esenzione dalla partecipazione al costo delle relative prestazioni sanitarie - DM n. 279/2001.
5. Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici - Garante per la protezione dei dati personali - G.U. n.65 del 19/03/2007.
6. 2011: <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/>
7. Steinberg M.H., Forget B.G., Higgs D.R., Weatherall D.J. eds. Disorders of Hemoglobin 2th ed. Cambridge University Press, 2009.
8. Linea Guida 20: Gravidanza Fisiologica 2010-2014. Documento del Ministero della Salute 2010.
9. J. Traeger-Synodinos, J.M. Old, M. Petrou, R. Galanello: Best Practice Guidelines for carrier identification and prenatal diagnosis of haemoglobinopathies, EMQN, 2002.
10. Ryan K., Bain B.J., Worthington D., James J., Plews D., Mason A. et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. BJH 2010; 149: 35-49.
11. Bunting P.S., Sandberg S. La risposta del laboratorio ai clinici: è basata sull'evidenza? In Dorizzi R. M., Trenti T., *La medicina di laboratorio basata sulle prove di efficacia. dai principi agli outcome* 2° ed. Milano: Biomedica, 2008:337-357.
12. Old J. M., Traeger-Synodinos J., Galanello R., et al. Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders. T.I.F. Publications, 2005.
13. Bouva M. J., Mohrmann K., Brinkman H. B., Kemper-Propert E. A., Elvers B., Loeber J. G., Verheul F. E., Giordano P. C. - Implementing neonatal screening for haemoglobinopathies in the Netherlands, J. Med. Screen. 2010; 17(2): 58-65.
14. Wethers D. L., Panel, Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement 1987; 6:1-22.
15. Newborn Screening Committee, The Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN), National Newborn screening Report-1995, CORN, Atlanta, 1999.
16. Ivaldi G., Leone D., Viaggi C., Pascotto D. *Variabilità delle frazioni emoglobiniche dalla nascita all'età adulta in condizioni fisiologiche e patologiche*. Biochimica Clinica 2007; 31: 276-279.
17. Kunkel H. G., Ceppellini R., Muller-Eberhard U., et al. Observation of the minor basic hemoglobin component in blood of normal individuals and patients with thalassemia. J. Clin Invest 1957; 36:1615-25.

18. Gerald P.S., Diamond L.K. The diagnosis of thalassemia trait by starch block electrophoresis of hemoglobin. *Blood* 1958;13:61-9.
19. Stephens A.D., Angastiniotis M., Baysal E., Chan V., Fucharoen S., Giordano P.C., Hoyer J.D., Mosca A., Wild B.; On behalf of the international council for the standardisation of haematology (ICSH) *Int J Lab Haematol.* 2012 febr; 34(1): 1-13.
20. Van Delft P., Lenters E., Bakker-Verweij M., de Korte M., Baylan U., Harteveld C. L., Giordano P. C. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. *Int J Lab Hematol.* 2009 oct;31(5): 489-95. Epub 2009 apr 17.
21. Clarke G.M. and Higgins T.N., Laboratory investigations of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update *Clin.Chem.* 2000; 46, 8(B), 1284-90.
22. Cotton F., Lin C., Fontaine B., et al. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobin A2 and F. *Clin Chem* 1999;45:237-43.
23. Fucharoen S., Winichagoon P., Wisedpanichkiy B S-N, et al. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassaemias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clin Chem* 1998;44:740-48.
24. Stephens A.D., Angastiniotis M., Baysal E., Chan V., Davis B., Fucharoen S., Giordano P.C., Hoyer J.D., Mosca A., Wild B.; On behalf of the international council for the standardisation of haematology (ICSH) *Int J Lab Haematol.* 2012 febr; 34(1): 14-20.
25. Giordano P.C., Harteveld C.L., Kok P.J., Geenen A., Batelaan D., Amons R., Bemini L.F. Hb Gouda [alpha 72 (EF1) His > Gln] a new silent alpha chain variant. *Hemoglobin* 1996 febr; 20(1): 21-9.
26. Paleari R., Ivaldi G., Eridani S., Mosca A. Anemia a cellule falciformi e sindromi correlate: aggiornamenti e prospettive. *Biochimica Clinica* 2010; 34:250-258.
27. Carta M., Paleari R., Caldini A., Terreni A., Mosca A. Refertazione dell'emoglobina glicata in presenza di varianti emoglobiniche. *Biochimica Clinica* 2011; 35:42-45.
28. Bain B. J.: *Blood Cells: a Practical Guide*. Blackwell Publishing, 4th ed. pag. 198-210, 2009.
29. Kay J., Information Technology e Implementazione della Medicina di Laboratorio basata sulle evidenze (cap.19) in *La Medicina di Laboratorio basata sulle prove di efficacia*. Dai principi agli outcome - II edizione italiana R.M. Dorizzi e T. Trenti, Ed. Biomedica, 2008.
30. Ivaldi G., Barberio G., Carta M., Mercadanti M., Rizzuti G., Roncoroni L., Mosca A. Diagnosi di laboratorio e prevenzione delle emoglobinopatie: considerazioni e proposte sulla comunicazione del risultato degli esami di primo livello. *Biochimica Clinica* 2010; 34:277-282.
31. Lim E.M., Sikaris K. A., Gill J., Kalleja J. Hickman P. E., Beilby J. et al. Quality assessment of interpretative commenting in clinical chemistry. *Clin Chem.* 2004; 50:632-7.
32. Plebani M. Interpretative commenting: a tool for improving the laboratory-clinical interface. *Clin Chim Acta* 2009; 404 (1): 4651.

GLOSSARIO

- **2-3 Difosfoglicerato (2,3 DPG)**: metabolita contenuto nei globuli rossi in concentrazione simile a quella dell'emoglobina: si lega con la deossiemoglobina in proporzione 1:1 stabilizzandone la struttura diminuendone così l'affinità con l'ossigeno.
- **Acetilazione**: presenza di un gruppo acetile (CH₃CO-): come nel 10-15% dell'emoglobina fetale (F1).
- **Adenina**: base purinica del DNA o del RNA. Si appaia con una Timina nel DNA.
- **Affinità per l'ossigeno**: capacità che ha l'emoglobina di legare l'ossigeno e di rilasciarlo in relazione alle condizioni di pH o alla concentrazione di alcuni ioni o a caratteristiche della struttura primaria.
- **Affinità tra catene**: capacità di formare legami tra catene globiniche eterologhe con produzione di tetrameri stabili.
- **Alfa (α) Talassemia**: difetto dei geni che codificano le catene alfa dell'emoglobina dovuto di solito a delezione di porzioni di diversa lunghezza di geni o in alcuni casi a mutazione puntiforme (α⁺) con diminuita produzione di catene alfa.
- **Alfa Catene**: catene polipeptidiche che assieme alle catene beta costituiscono l'Hb A (α₂β₂). Sono formate da 141 amminoacidi.
- **Alfa Talassemia 1 (α⁻)**: diminuita o assente sintesi di catene alfa dell'Hb dovuta in genere a delezione di due geni alfa.
- **Alfa Talassemia 2 (α⁺)**: diminuita o assente sintesi di catene alfa dell'Hb dovuta in genere a mutazione o delezione di un gene alfa.
- **Alfa Talassemia Trait**: (vd. alfa talassemia 1 e 2)
- **Allele**: una di due o più forme alternative di un gene che occupa un dato *locus* nel cromosoma. Ogni gene esiste in due copie, una ereditata dal padre e una dalla madre. Le due copie di un gene si chiamano alleli, che possono essere uguali (l'organismo è omozigote per quel carattere) o diversi (eterozigote). I due alleli di un locus in un dato individuo rappresentano un genotipo.
- **Amminoacidi**: piccole molecole che costituiscono le unità elementari delle proteine. Venti sono gli amminoacidi che comunemente compongono le proteine. Tutti gli amminoacidi hanno la stessa struttura generale con una estremità acida (carbossilica) e una basica (amminica), ma differiscono nei gruppi laterali (R).
- **Anamnesi**: notizie relative alla storia clinica del paziente desunte direttamente dal paziente o dal racconto dei familiari quale contributo alla diagnosi.
- **Anamnesi "essenziale" o "mirata"**: anamnesi specifica finalizzata alla raccolta di notizie utili alla diagnosi di una particolare patologia o difetto genetico.
- **Anemia Emolitica**: anemia prodotta da una ridotta sopravvivenza eritrocitaria nel sangue circolante, dovuta alla presenza di difetti della membrana del globulo rosso, come nel caso della sferocitosi costituzionale.
- **Anemia Emolitica "non sferocitica"**: anemia prevalentemente dovuta alla presenza di varianti instabili con precipitati all'interno dei globuli rossi.
- **Anemia Falciforme (drepanocitica, sickle-cell anemia, sickle-cell disease)**: la malattia presente in un soggetto omozigote per Hb S e per estensione in presenza di un doppio difetto HbS con Beta Talassemia (vd. talassodrepanocitosi).

- **Anemia Mediterranea:** altrimenti detta Beta Talassemia major o Morbo di Cooley.
- **Anisocitosi:** presenza di eritrociti di diverse dimensioni: normali (normociti), dimensioni ridotte (microciti), più grandi dimensioni (macrociti). Caratterizza in grado diverso la morfologia eritrocitaria dei soggetti sideropenici o con difetti talassemici.
- **Anisocromia:** diversa colorazione dell'eritrocita, ipocromia (aumento della normale area chiara centrale, es nelle sideropenie), ipercromia, policromasia e basofilia.
- **Anodo:** il polo positivo di un sistema elettroforetico, attrae gli anioni carichi negativamente
- **Aplo tipo:** insieme di combinazioni di singoli alleli su un tratto di DNA che tendono ad essere trasmessi in blocco lungo un albero genealogico.
- **Aptoglobine:** proteine del siero che legano l'emoglobina e la trasportano dai globuli rossi lisati a siti dove viene ulteriormente metabolizzata.
- **Assetto emoglobinico:** parte dei test di 1° livello, rappresenta il dato qualitativo e la quantificazione relativa di tutte le frazioni emoglobiniche presenti che possono essere riscontrate con i metodi separativi di base (vd. HPLC ed elettroforesi).
- **Basi azotate:** componenti fondamentali degli acidi nucleici (DNA e RNA) (vd. adenina, guanina, citosina, timina e uracile).
- **Beta (+) Talassemia (β^+):** beta talassemia dovuta a difetti che non azzerano l'attività del gene beta globinico consentendo la sintesi di una quantità variabile di catene beta.
- **Beta (°) Talassemia (β^0):** beta talassemia dovuta a difetti che azzerano l'attività del gene beta globinico non consentendo la sintesi di catene beta.
- **Beta Catene:** catene polipeptidiche che assieme alle catene alfa costituiscono l'Hb A ($\alpha_2\beta_2$). Sono formate da 146 amminoacidi.
- **Beta Talassemia intermedia:** condizione clinica molto variabile e intermedia tra la Beta Talassemia major trasfusione dipendente e lo stato di Beta Talassemia minor (portatore sano eterozigote).
- **Beta Talassemia Major:** lo stato di malattia associato alla condizione di Beta Talassemia omozigote.
- **Beta Talassemia Minor:** lo stato di portatore eterozigote di Beta Talassemia.
- **Beta Talassemia Trait:** (vd. Talassemia Minor).
- **Beta Talassemia:** diminuita o assente sintesi di catene beta globiniche (vd. anche Beta T. Minor, Major, Intermedia).
- **Catodo:** il polo negativo di un sistema elettroforetico, attrae i cationi carichi positivamente.
- **cDNA (DNA complementare):** un filamento di DNA copiato "in vitro" da mRNA, quindi privato degli introni del DNA genomico utilizzando una trascrittasi inversa.
- **Chilobase (Kb):** unità di misura del DNA doppia elica corrispondente a 1000 paia di basi.
- **Cianosi:** colorito blastro della pelle dovuto alla presenza nelle arterie e nei capillari di metemoglobina o emoglobina ridotta.
- **Cis:** nel linguaggio comune si dice "mutazione in cis" di ulteriori mutazioni che si trovano sullo stesso cromosoma originariamente mutato.

- **Citosina:** base pirimidinica del DNA o nell'RNA. Si appaia con una Guanina nel DNA.
- **Cluster:** insieme di geni che codificano per prodotti proteici simili o strettamente correlati.
- **Codone "nonsense":** una delle tre triplette che non codificano aminoacidi e causano l'interruzione della sintesi proteica (vedere stop codon).
- **Codone:** Un gruppo di tre nucleotidi che codificano un aminoacido o un segnale di inizio o di terminazione. Esistono 64 codoni diversi (61 codificano 20 aminoacidi diversi) originati combinando i quattro nucleotidi tre a tre (43).
- **Commento interpretativo:** commento utile alla interpretazione dei risultati strumentali ad uso del paziente o del clinico.
- **Composto eterozigote:** modo alternativo di indicare la presenza di due diversi difetti allo stato eterozigote (es. Beta Talassemia e Hb S nella talassodrepanocitosi)
- **Consensus sequence:** Sequenze di DNA poste ai due lati dei nucleotidi invarianti AG e GT situati ai limiti tra introne ed esone.
- **Consulenza genetica (counselling):** il processo che fornisce agli individui e alle loro famiglie le informazioni sulla natura, sui meccanismi di trasmissione ereditaria e sulle implicazioni delle malattie genetiche allo scopo di aiutarli a prendere decisioni personali.
- **Conclusione diagnostica:** risultato dei test eseguiti che, insieme all'anamnesi, risponde al quesito posto dal medico che prescrive e che consente di caratterizzare una patologia, il rischio di malattia o una condizione genetica.
- **Coppia di basi (basepair, bp):** il più piccolo tratto di un acido nucleico a doppia elica, consistente di due basi (una per filamento) appaiate per mezzo di legami idrogeno. La coppia di basi è usata come unità di misura della lunghezza degli acidi nucleici a doppia elica.
- **Corpi di Fessas:** alfa catene libere denaturate presenti nei precursori dei globuli rossi di pazienti con Beta Talassemia major.
- **Corpi di Heinz:** sferiche aggregazioni microscopiche che derivano dalla depolimerizzazione delle molecole di emoglobina denaturata, di solito adese alla membrana eritrocitaria che si rendono visibili con un colorante in soluzione acquosa in soggetti splenectomizzati. In soggetti splenectomizzati portatori di varianti instabili dell'emoglobina, tali aggregazioni possono essere variabilmente irregolari e più grandi.
- **Corpi inclusi:** specificatamente sono così dette le aggregazioni microscopiche all'interno degli eritrociti di soggetti con emoglobine instabili dopo incubazione a 37°C con un colorante ossidante per un tempo più o meno lungo. Si presentano fini e regolari nell'emoglobinosi H, più irregolari e variabilmente irregolari nei vari tipi di emoglobine instabili.
- **Correlazione genotipo/fenotipo:** nello studio dei difetti dell'emoglobina rappresenta il rapporto tra le caratteristiche rilevate durante lo studio del genotipo e ciò che viene espresso e osservato dall'esame ematologico e clinico.
- **Cromatografia a scambio ionico:** La cromatografia a scambio ionico è il tipo di cromatografia che si basa sul principio di attrazione tra gli ioni di carica opposta. Molti composti organici, come ad esempio gli amminoacidi, possono avere parti della molecola polari favorendo quindi la loro

separazione tramite questo metodo. La carica netta che questi composti presentano dipende dal loro pKa e dal pH della soluzione.

- **Crossing over:** scambio reciproco di porzioni normalmente equivalenti di DNA tra cromatidi di cromosomi omologhi che può avvenire durante la meiosi o, meno frequentemente, durante la mitosi.
- **Crossing over ineguale:** si verifica quando le rotture che portano a crossing over avvengono in regioni non omologhe dei due cromosomi coinvolti nello scambio.
- **Degenerazione del codice genetico:** molti aminoacidi sono codificati da più di una tripletta di basi (codone). Dopo la sostituzione di una singola base (mutazione) il nuovo codone nel 20% dei casi codificherà lo stesso aminoacido. Ciò avviene soprattutto con la sostituzione della terza base della tripletta.
- **Delezione:** a livello molecolare la perdita di una o più basi dalla sequenza di DNA (in molte alfa talassemie le delezioni possono interessare poche migliaia di basi o diverse decine di migliaia di basi).
- **Delta + Beta Talassemia:** doppio difetto di sintesi dovuto a mutazioni sul gene delta e sul gene beta globinico.
- **Delta-Beta Talassemia:** talassemia prodotta da una delezione più o meno ampia comprendente i geni delta e beta globinici, con produzione di Hb F più o meno elevata.
- **Delta Catene:** catene polipeptiche che formano con le catene alfa l'Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$). La catena delta contiene 146 aminoacidi come la catena beta ma si differenzia da questa per 10 aminoacidi.
- **Delta Talassemia:** condizione che riduce la produzione di catene delta globiniche con conseguente ridotta o assente Hb A₂, e assenti alterazioni cliniche o ematologiche.
- **Diagnosi:** l'identificazione di una malattia attraverso i sintomi di un paziente. L'insieme dei metodi e degli strumenti utili alla diagnosi si chiama diagnostica (*Oxford Encyclopedic English Dictionary, 1994*).
- **Diagnosi di laboratorio o strumentale:** conoscenza attraverso metodi e strumenti particolari di una condizione di malattia altrimenti non rilevabile o da confermare. Particolare rilievo hanno le diagnosi specifiche di laboratorio relative alle variazioni genetiche che si trasmettono con meccanismo mendeliano in quanto i potenziali portatori risultano nella maggior parte dei casi asintomatici. Diagnosi clinica: conoscenza dello stato di malattia mediante l'esame diretto del paziente da parte del clinico.
- **Diagnosi differenziale:** discriminazione tra patologie analoghe che vengono progressivamente riconosciute mediante la presenza o assenza di indicatori patognomici, in questi casi risultano determinanti le indagini strumentali e/o di laboratorio.
- **Diagnosi prenatale:** la conoscenza e l'identificazione di eventuali difetti congeniti del feto, genetici e non genetici, mediante tecniche ostetriche o di laboratorio.
- **Dimero:** l'associazione di due subunità simili (non necessariamente identiche) come alfa e beta (dimero $\alpha\beta$). Due dimeri formano un tetramero come nell'emoglobina ($\alpha_2\beta_2$).
- **DNA polimerasi:** enzima che polimerizza i nucleotidi, avendo una elica come "template", riproducendo così un'altra elica di DNA complementare alla prima.

- **Dominante (carattere):** si dice di carattere che si esprime anche negli eterozigoti (cioè individui con un allele normale e uno mutato).
- **Effetto Bohr:** rilascio nei capillari tissutali dell'O₂ legato all'emoglobina per effetto delle concentrazioni relativamente elevate di CO₂ e H⁺.
- **Effettori allosterici:** sono così detti quegli ioni o quelle molecole che esercitano un effetto positivo o negativo sui legami con l'ossigeno (come H⁺, CO₂, 2, 3DPG).
- **Elettroforesi:** tecnica che si basa sulla migrazione, in un campo elettrico, su una matrice porosa (poliacrilammide, agarosio, acetato di cellulosa), di molecole a differente carica elettrica (come proteine e acidi nucleici): la migrazione dipende dalle dimensioni e dalle cariche totali.
- **Elettroforesi capillare:** conosciuta anche come elettroforesi di zona capillare, può essere usata per separare specie ioniche e quindi anche le frazioni emoglobiniche utilizzando le cariche ioniche e le forze di frizione. La tecnica dell'elettroforesi capillare, nota da alcuni decenni è pensata per separare le specie basandosi sulla dimensione del rapporto di carica all'interno di un piccolo capillare riempito con un elettrolita.
- **Elettrolita:** il termine si riferisce alla capacità di condurre la corrente elettrica da parte di una soluzione, la conduzione non è legata, in questo caso, al libero scorrimento di elettroni entro una struttura cristallina bensì sono gli ioni a farsi carico di "trasportare" la corrente elettrica.
- **Eluzione:** dissoluzione di frazioni proteiche (emoglobiniche) singole separate mediante elettroforesi o cromatografia.
- **Ematocrito:** il volume occupato dagli eritrociti (globuli rossi) nell'intero volume di sangue. È espresso in %.
- **Eme:** gruppo prostetico, ferro-protoporfirina IX (Fe⁺⁺), a cui una molecola di ossigeno dell'ossiemoglobina è legata.
- **Emoglobina "lenta":** definizione relativa alla migrazione elettroforetica delle varianti Hb che migrano a pH alcalino, dal polo negativo (catodo) al polo positivo (anodo), più lentamente rispetto all'Hb A (es. l'Hb S).
- **Emoglobina "veloce":** definizione relativa alla migrazione elettroforetica delle varianti Hb che migrano a pH alcalino, dal polo negativo (catodo) al polo positivo (anodo), più velocemente rispetto all'Hb A (es. l'Hb J Oxford).
- **Emoglobina A:** la proteina respiratoria maggiormente presente nell'individuo adulto (di solito superiore al 97%) formata da un tetramero di catene, 2 alfa e 2 beta ($\alpha_2\beta_2$).
- **Emoglobina A_{1c} (emoglobina glicata o emoglobina A1c, HbA_{1c}, A1C, o Hb_{1c}):** è una forma di emoglobina usata principalmente per identificare la concentrazione plasmatica media del glucosio per un lungo periodo di tempo. Viene prodotta in una reazione non-enzimatica a seguito della esposizione della emoglobina normale ad alte concentrazioni di glucosio plasmatico.
- **Emoglobina A₂:** componente minore dell'emoglobina presente nell'individuo adulto di solito in quantità inferiore al 3% formata da un tetramero di catene, 2 alfa e 2 delta ($\alpha_2\delta_2$).
- **Emoglobina Bart's:** omotetramero formato da 4 catene gamma (γ_4). È variabilmente elevata, in presenza di alfa talassemia, alla nascita e nel periodo perinatale.

- **Emoglobina F (F₂):** emoglobina prodotta in epoca fetale costituita da un tetramero di catene: 2 alfa e 2 gamma ($\alpha_2\gamma_2$).
- **Emoglobina Gower:** emoglobina embrionale, ne sono note due forme: $\zeta_2\varepsilon_2$ l'Hb Gower I, e $\alpha_2\varepsilon_2$ l'Hb Gower II.
- **Emoglobina H:** emoglobina composta da quattro catene beta (β_4), un omotetramero che si produce in presenza di una forma di alfa talassemia in cui tre geni su quattro non risultano funzionanti. L'Hb H è instabile, ha una alta affinità per l'ossigeno e precipita all'interno dei globuli rossi con formazione di inclusioni tipiche.
- **Emoglobina instabile:** emoglobina anomala che ha tendenza (spontaneamente o indotta) a denaturare e formare precipitati intracellulari (corpi inclusi, corpi di Heinz) e conseguente anemia emolitica (es. Hb Köln, Hb Zurigo).
- **Emoglobine M:** varianti caratterizzate dalla sostituzione di istidina prossimale (F8) o distale (E7) con tirosina il cui gruppo fenolico lega covalentemente l'eme mantenendolo nella forma ferrica Fe³⁺, producono cianosi.
- **Emoglobina X (Hb X):** per convenzione viene così indicata una emoglobina anomala non riconducibile ad una variante Hb nota: ogni variazione nell'assetto emoglobinico in attesa di una adeguata caratterizzazione.
- **Emoglobinopatia:** alterazione ematologica, spesso associata ad anemia, dovuta ad un difetto genetico della globina. Il termine è usato nel caso di difetti strutturali (emoglobine anomale prevalentemente con alterata funzione e stabilità), di difetti di sintesi (talassemie) o difetti misti.
- **Emolisato:** soluzione di emoglobina ottenuta lisando i globuli rossi (lavati con soluzione fisiologica) con acqua aggiungendo un solvente organico (normalmente tricloruro di carbonio) e centrifugando per separare e rimuovere le membrane e gli altri detriti cellulari.
- **Eritroblasto:** genericamente qualunque globulo rosso nucleato normalmente non presente nel sangue periferico e tipicamente presente nel midollo. Si fa riferimento più specificatamente a *pronormoblasto* ad una cellula grande con citoplasma intensamente basofilo e un grosso nucleo contenente una delicata rete di cromatina e alcuni nucleoli. Si definisce *normoblasto basofilo (precoce)* una cellula più piccola della precedente con citoplasma intensamente basofilo. Il *normoblasto policromatofilo (intermedio)* è una cellula ancor più piccola e il citoplasma presenta una colorazione verdastria a causa dell'iniziale comparsa di emoglobina, il nucleo è più piccolo. Si definisce *normoblasto ortocromatico (tardivo)* una cellula ancor più piccola nella quale la cromatina si addensa fortemente, il nucleo diventa picnotico e alla fine viene espulso.
- **Eritrocitosi:** aumentato numero di globuli rossi circolanti. E. relativa (transitoria da emoconcentrazione) E. assoluta (secondaria nel caso di difetti dell'emoglobina, primaria o policitemia rubra vera o eritemia).
- **Esone:** sequenze di DNA che vengono trascritte nel mRNA e per lo più vengono tradotte in sequenze aminoacidiche
- **Eterocellulare:** una distribuzione diseguale nelle cellule (normalmente riferito all'Hb F).
- **Eterodimeri:** una struttura molecolare costituita da due diverse ma simili unità.

- **Eterozigote:** individuo con alleli diversi in un determinato locus.
- **Falcemia (drepanocitosi):** presenza di drepanociti, globuli rossi a falce, nel sangue circolante che si verifica nel soggetto con Hb S omozigote o nell'eterozigote in particolari condizioni di ipossia.
- **Fenotipo:** le caratteristiche osservabili in un individuo. Il fenotipo può essere l'espressione di un certo genotipo (assetto genetico) oppure essere influenzato da fattori sia genetici sia ambientali.
- **Frame Shift:** effetto della delezione o inserzione di uno o più nucleotidi con cambiamento della lettura del messaggio a valle.
- **Gamma Catene:** catene polipeptidiche che si trovano nell'emoglobina Portland e nell'emoglobina fetale (Hb F) assieme alle alfa catene ($\alpha_2\gamma_2$). Contengono 146 amminoacidi e differiscono dalle catene beta in 39 residui. Le catene γ si distinguono in G γ quelle che presentano un residuo di glicina in posizione 136 e A γ quelle che presentano in posizione 136 un residuo di alanina.
- **Gene silente:** gene strutturale silente, che non si esprime fenotipicamente o comunque in modo molto attenuato.
- **Gene strutturale:** segmento di DNA responsabile della produzione di una catena polipeptidica.
- **Genotipo:** la costituzione genetica di un individuo in uno specifico gene o in un gruppo di geni o nell'intero genoma.
- **Globina:** catena polipeptidica che associata all'eme costituisce l'emoglobina.
- **Gruppo prostetico:** piccola molecola attiva (di solito non proteica) legata ad una più grande molecola con caratteristiche funzionali diverse (come l'eme e la globina).
- **Guanina:** base azotata purinica che si trova nel DNA e nell'RNA. Si appaia con una Citosina nel DNA.
- **HPLC:** High Performance Liquid Chromatography (ovvero cromatografia liquida ad alte prestazioni). Si realizza con particolari fasi stazionarie in grado di sopportare pressioni di molte atmosfere con elevato potere di separazione in tempi brevi. Può essere a scambio ionico ed in fase inversa (Reversed Phase). Nella fase inversa il materiale di riempimento della colonna possiede gruppi lipofili che interagiscono con quelli analoghi delle molecole da separare e al passaggio di un solvente apolare si realizza la separazione.
- **HPFH:** (Hereditary Persistence Fetal Hemoglobin) vedere Persistenza Ereditaria di Emoglobina Fetale.
- **Ibrido (simmetrico):** tetramero emoglobinico formato da due coppie di subunità normali o da una coppia di subunità normali e una di subunità mutate
- **Idrofilico:** riferito ad un amminoacido con siti che attraggono molecole d'acqua.
- **Idrofobico:** riferito ad un amminoacido con siti che respingono molecole d'acqua.
- **Inclusi "Hb H like":** (vd. Corpi inclusi).
- **Indici eritrocitari:** si intendono i parametri utili alla valutazione del contenuto e della forma dei globuli rossi nell'ambito della diagnostica delle emoglobinopatie. A tal fine gli indici eritrocitari essenziali da considerare sono: i Globuli Rossi (G.R.), l'Emoglobina (Hb), l'Ematocrito (Ht), il Volume Cellulare Medio (MCV), il Contenuto Emoglobinico Medio (MCH).
- **Introne:** sequenze di DNA che interrompono le orzioni codificanti di un gene. Vengono trascritti e poi eliminati (splicing) dal mRNA.

- **Istidina distale:** residuo localizzato in posizione 7 dell'elica E con un atomo di N imidazolico orientato verso il ferro emico con il quale non si lega: nella catena alfa corrisponde al residuo 58 e nella catena beta al residuo 63.
- **Istidina prossimale:** residuo localizzato in posizione 8 dell'elica globinica F che lega mediante un atomo di N il ferro emico con il suo quinto legame di coordinazione. Nella catena alfa corrisponde al residuo 87, nella catena beta al residuo 92.
- **Kilobase (kb):** unità di misura del DNA e del RNA, corrispondente a 1000 nucleotidi.
- **LCR (locus control region):** cluster di siti ipersensibili alla DNasi I presenti nel locus genico delle globine necessario per la loro espressione.
- **Locus:** un determinato sito specifico di un gene su un cromosoma.
- **MCH:** (Mean Corpuscular Hemoglobin) quantità media di Hb contenuta negli eritrociti espressa in pg (pico grammi) (può essere calcolato come valore dell'Hb x10 / numero eritrociti).
- **MCV:** (Mean Corpuscular Volume) volume cellulare medio è espresso in fL (può essere calcolato come valore ematocrito x10 / numero eritrociti)
- **Metabisolfito di Sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$):** sostanza riducente che in soluzione al 2% in H_2O a contatto con il sangue contenente Hb S determina la formazione "in vitro" di emazie "a falce" e pertanto viene utilizzata per un test di conferma di tale emoglobina.
- **Metaemoglobinemia:** condizione prodotta dalla presenza di metaemoglobina o ferriemoglobina cioè di emoglobina nella quale l'atomo di ferro è nello stato ossidato ferrico Fe^{3+} . Può essere prodotta da una causa genetica come nel caso delle varianti emoglobiniche nelle quali è sostituito uno degli aminoacidi a contatto con l'eme, oppure per deficit enzimatici.
- **Monomero:** una subunità base; nell'emoglobina abbiamo quattro monomeri due a due uguali (due alfa e due beta)
- **Morfologia eritrocitaria:** studio qualitativo degli eritrociti dopo colorazione dello striscio di sangue su vetrino.
- **Mutazione "missense":** mutazione che comporta una sostituzione di un aminoacido con un altro conseguente alla sostituzione di una base con un'altra.
- **Mutazione nonsense:** Mutazione che produce un codone terminale e quindi un blocco in quel punto della traduzione del mRNA (vedere stop codon).
- **Mutazione:** ogni cambiamento permanente nella sequenza nucleotidica del DNA capace o meno di esercitare una influenza sul fenotipo. Le mutazioni più semplici interessano un singolo nucleotide e sono dette puntiformi.
- **Nucleotidi:** componenti fondamentali degli acidi nucleici, sono costituiti da una base azotata (adenina, guanina, citosina, timina, uracile), da uno zucchero a 5 atomi di carbonio (ribosio o desossiribosio) e da un gruppo fosfato.
- **Omologhi:** cromosomi (o segmenti di cromosoma) che portano geni che controllano le stesse caratteristiche, hanno morfologia simile e si appaiano durante la meiosi.
- **Omozigote:** individuo con il medesimo allele in loci corrispondenti su cromosomi omologhi.

- **P_{50} :** la pressione dell'ossigeno (misurata in mmHg) alla quale l'emoglobina è saturata al 50% con l'ossigeno. Il valore normale varia da 26 a 28 mmHg. Le varianti emoglobiniche ad alta affinità per l'ossigeno presentano valori significativamente inferiori mentre quelle con bassa affinità presentano valori più alti.
- **PAGE:** (Polyacrilamide Gel Electrophoresis) elettroforesi su gel di poliacrilamide.
- **PCR (Polymerase Chain Reaction):** tecnica che permette di copiare (amplificare) in un elevato numero di copie (fino a 100.000) determinate sequenze presenti in un campione di DNA, utilizzando l'enzima DNA polimerasi.
- **Peptide:** un filamento di aminoacidi (da due a poche decine) uniti da legami peptidici.
- **Persistenza ereditaria di Hb F (HPFH):** presenza nell'adulto di Hb F superiore al 1.5%. Valori percentuali molto diversi sono associati a vari difetti costituiti da delezioni più o meno estese comprendenti parte dei geni globinici non-alfa oppure mutazioni in genere puntiformi o microdelezioni nel promotore di uno dei geni gamma.
- **Pirimidine:** classe di composti organici a cui appartengono le basi degli acidi nucleici Citosina, Timina e Uracile.
- **Poichilocitosi:** variazione nella forma degli eritrociti: a bacchetta, a racchetta, a foglia, ovalociti, ellittociti, a falce (drepanociti).
- **Policitemia:** in genere è così definita la condizione riconducibile alla produzione abnorme di globuli rossi, bianchi e piastrine in seguito ad un funzionamento alterato del midollo osseo; la conseguente poliglobulia può richiedere periodici salassi terapeutici. Va posta diagnosi differenziale rispetto alla eritrocitosi (vedere eritrocitosi) che di solito si riferisce al solo aumento di eritrociti.
- **Polimorfismo:** L'esistenza di due sequenze diverse, ma pur sempre normali ad un particolare sito del DNA, di cui la meno frequente deve avere una frequenza di almeno l'1%.
- **Portatore:** individuo eterozigote per un gene recessivo e che perciò può trasmettere il gene alla progenie senza mostrare manifestazioni a livello fenotipico
- **Primer:** breve sequenza sintetica di DNA o di RNA che viene appaiata con un filamento di DNA ad essa complementare e molto più lungo in presenza di una trascrittasi inversa.
- **Promotore (promoter):** la porzione a monte di un gene dove si lega l'RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di una sequenza di DNA in RNA messaggero e quindi in proteina. La maggiore o minore attività del promotore determina la quantità di proteina prodotta.
- **Propositus (probando):** soggetto con specifico fenotipo attraverso cui viene identificata una famiglia con determinate caratteristiche genetiche.
- **Punto isoelettrico:** pH al quale le cariche elettriche positive e negative di una molecola si annullano per cui la molecola "in toto" è elettricamente neutra.
- **Purine:** composti azotati costituiti da due strutture ad anello, si trovano nel DNA e nell'RNA: Adenina e Guanina.
- **Quesito diagnostico:** si intende una richiesta formulata dal clinico finalizzata a concretizzare una ipotesi diagnostica. Tale quesito si basa su elementi fenomenici esibiti dal paziente (segni e sintomi) o comunque su altri elementi diretti o indiretti di conoscenza.

- **Recessivo:** si dice in genere di carattere che viene espresso a livello fenotipico solo se ci sono due copie dell'allele che lo producono (stato omozigote). La suddivisione tra recessivo e dominante può non essere sempre chiara (vd. semidominante).
- **Referto interpretativo:** (vd. conclusione diagnostica)
- **Reticolocitosi:** condizione caratterizzata da un aumento di reticolociti circolanti in seguito ad una rapida rigenerazione di globuli rossi (valori normali da 0.2 a 2.0 %).
- **Reverse Dot Blot:** tecnica che prevede una reazione polimerasica a catena (PCR) multipla in grado di amplificare differenti regioni del gene. A questa fa seguito una reazione di ibridazione allele specifica tra i prodotti della PCR e le sonde molecolari oligonucleotidiche complementari alla sequenza normale e a quella mutata.
- **R.G.O. (Resistenza Globulare Osmotica), resistenza eritrocitaria:** si misura calcolando la percentuale di globuli rossi che si emolizzano quando vengono posti in una soluzione iposalina (di solito al 36%).
- **Screening genetico:** analisi sistematica degli individui di una popolazione per accertare potenziali difetti genetici in essi o nei discendenti o ascendenti; difetti per i quali può essere necessario un trattamento o una prevenzione.
- **Separazione delle catene:** tecnica usata nella diagnosi delle emoglobinopatie per separare le diverse catene polipeptidiche presenti, può avere come fine la determinazione quantitativa e relativa delle diverse catene (vd. biosintesi "in vitro" delle catene) o la valutazione qualitativa delle catene normali o mutate presenti.
- **Sequencing (sequenziamento):** procedimento attraverso il quale vengono identificate nella loro esatta sequenza le basi che costituiscono il tratto di DNA in esame.
- **Sito di restrizione:** specifica sequenza nucleotidica riconosciuta e tagliata da una specifica endonucleasi.
- **Southern blotting:** trasferimento di frammenti di DNA denaturato da un gel d'agarosio ad un filtro di nitrocellulosa e successiva ibridazione con sonde specifiche.
- **Spettrometria di massa:** tecnica che si basa sulla possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Può essere utilizzata nella caratterizzazione strutturale delle varianti Hb.
- **Splicing:** processo di maturazione del RNA messaggero per il quale gli introni vengono tagliati e gli esoni uniti tra loro.
- **Stop codon:** codone nonsenso e di terminazione, una delle tre triplette UAG (detta ambra), UAA (detta oca), UGA (detta opale) che non codificano aminoacidi e causano l'interruzione della sintesi proteica: Negli RNA globinici normali sono presenti solo UAA e UGA.
- **Switch dell'emoglobina:** evento che produce la disattivazione di un gene globinico e l'attivazione di un altro gene globinico.
- **Talassemia:** ridotta o assente produzione delle catene dell'emoglobina (alfa, beta, gamma e delta).
- **Talassodrepanocitosi (microdrepanocitosi):** condizione prodotta da una doppia eterozigosi per Beta Talassemia e Hb S.

- **Tasca dell'eme o heme pocket:** porzione proteica delle catene globiniche costituita da una quarantina di aminoacidi in gran parte apolari nella quale si inserisce il gruppo prostetico ferroporfirinico.
- **Termolabilità:** Capacità di molte varianti dell'emoglobina di denaturare soprattutto "in vivo" ma anche "in vivo" con l'aumentare della temperatura oltre i 37°C.
- **Test all'isopropanolo:** (vd. Test di stabilità).
- **Test di sickling o di Itano-Pauling):** test di laboratorio che consente di confermare la presenza di una emoglobina S mediante la formazione di emazie "a falce" in presenza di una sostanza riducente (vd. metabisolfito di sodio).
- **Test di stabilità:** test di laboratorio per accertare la stabilità dell'emoglobina; test di indagine per le varianti instabili mediante calore a 50°C o 55°C oppure in presenza di alcol isopropilico a 37°C (test all'isopropanolo o Test di Carrell).
- **Test specifici di 1° livello:** sono costituiti dall'insieme delle misure ematochimiche essenziali alla individuazione di uno stato di portatore o di affetto da una emoglobinopatia. Comprendono: l'assetto quali-quantitativo emoglobinico, l'esame emocromocitometrico, i test per la valutazione dello stato marziale. Tali test sulla base delle evidenze scientifiche possono evolvere e modificarsi nel tempo.
- **Tetramero:** unità composta da quattro subunità simili non necessariamente uguali. Quattro subunità globiniche unite al gruppo prostetico eme formano il tetramero emoglobina
- **Timina:** base pirimidinica del DNA equivalente a Uracile nell'RNA. Si appaia con una Adenina nel DNA.
- **Trait:** la condizione di eterozigosi o di portatore di un disordine essenzialmente recessivo.
- **Trans:** nel linguaggio comune si dice "mutazione in trans" di ulteriori mutazioni che si trovano sul cromosoma opposto a quello originariamente mutato.
- **Transizione:** la sostituzione (mutazione) di una base purinica con un'altra base purinica oppure di una base pirimidinica con un'altra pirimidinica nel DNA. La sostituzione nella terza delle tre basi spesso porta alla formazione di una tripletta (codone) che codifica per lo stesso aminoacido (vd. Degenerazione del codice genetico e Transversione).
- **Transversione:** la sostituzione (mutazione) di una base purinica con una pirimidinica (o viceversa) nel DNA. La sostituzione nella terza delle tre basi spesso porta alla formazione di una tripletta (codone) che codifica per lo stesso aminoacido (vd. Degenerazione del codice genetico e Transizione).
- **Trascrizione:** la formazione di un'elica di m-RNA complementare a un'elica del DNA.
- **Tripletta:** sequenza di tre nucleotidi in un polinucleotide. Ogni tripletta (eccetto che per le triplette nonsenso o di termine di catena) codifica per un aminoacido.
- **Uracile:** base pirimidinica dell'RNA. Si appaia con una Adenina nel DNA.
- **Variante Hb (Emoglobina anomala):** Una emoglobina con una catena polipeptidica anomala in seguito alla sostituzione (nella maggior parte dei casi) di un aminoacido e che presenta normale funzionalità.

TUTTI I DIRITTI RISERVATI
È vietata la traduzione, la memorizzazione elettronica,
la riproduzione totale o parziale, con qualsiasi mezzo,
compresa la fotocopia, anche ad uso interno o didattico.

Per eventuali ristampe contattare:
Segreteria S.I.T.E. - Symposia S.r.l.
Borgo San Lazzaro, 17 - 00136 Roma
Tel. 06 39 72 55 40 - Fax 06 39 72 55 41
E-mail: segreteriasite@grupposymposia.it