Emoglobinopatie: principi diagnostici e casistica

G.C. Guidi, F. Manzato*, G. Poli
con la coll. tecnica di I. Turolla

Laboratorio di Biochimica clinica, Ematologia e Biologia molecolare clinica – Az. Osp. Univers. di Verona

**Servizio di Medicina di Laboratorio – Az. Osp. "Carlo Poma" di Mantova*

Emoglobinopatie

- **Descritte finora più di 1000 mutazioni causa di Hb-patie, fra di esse:**
  - **> 800 sono causa di varianti qualitative (es. HbS, HbO, HbC, Hb instabili, ecc.)**
  - **> 100 sono causa di α-talassemia**
  - **> 200 sono causa di β-talassemia e sindromi correlate**

Emoglobinopatie

diagnosi fenotipica

aspetti morfologici

aspetti strutturali

aspetti funzionali

laboratorio prevalente

Aspetti morfologici

evidenza nei preparati

microciti

target cells

F cells

corpi inclusi

sickling

Aspetti strutturali

tecniche impiegate

elettroforesi a pH alcalino

elettroforesi a pH acido

isoelettrofocalizzazione

HPLC

Aspetti funzionali

metodi di indagine

misura saturazione Hb – P_{50}

meta-Hb

stabilità al calore e all'isopropanolo

solubilità

Indici eritrocitari caratteristici del trait β-talassemico

- Hb ↓
- MCV ↓
- MCH ↓

- RBC N/↑
- HbA_2 ↑
- HbF N/↑

Frazioni di Hb nelle varianti genotipiche di β-talassemia minor e minima

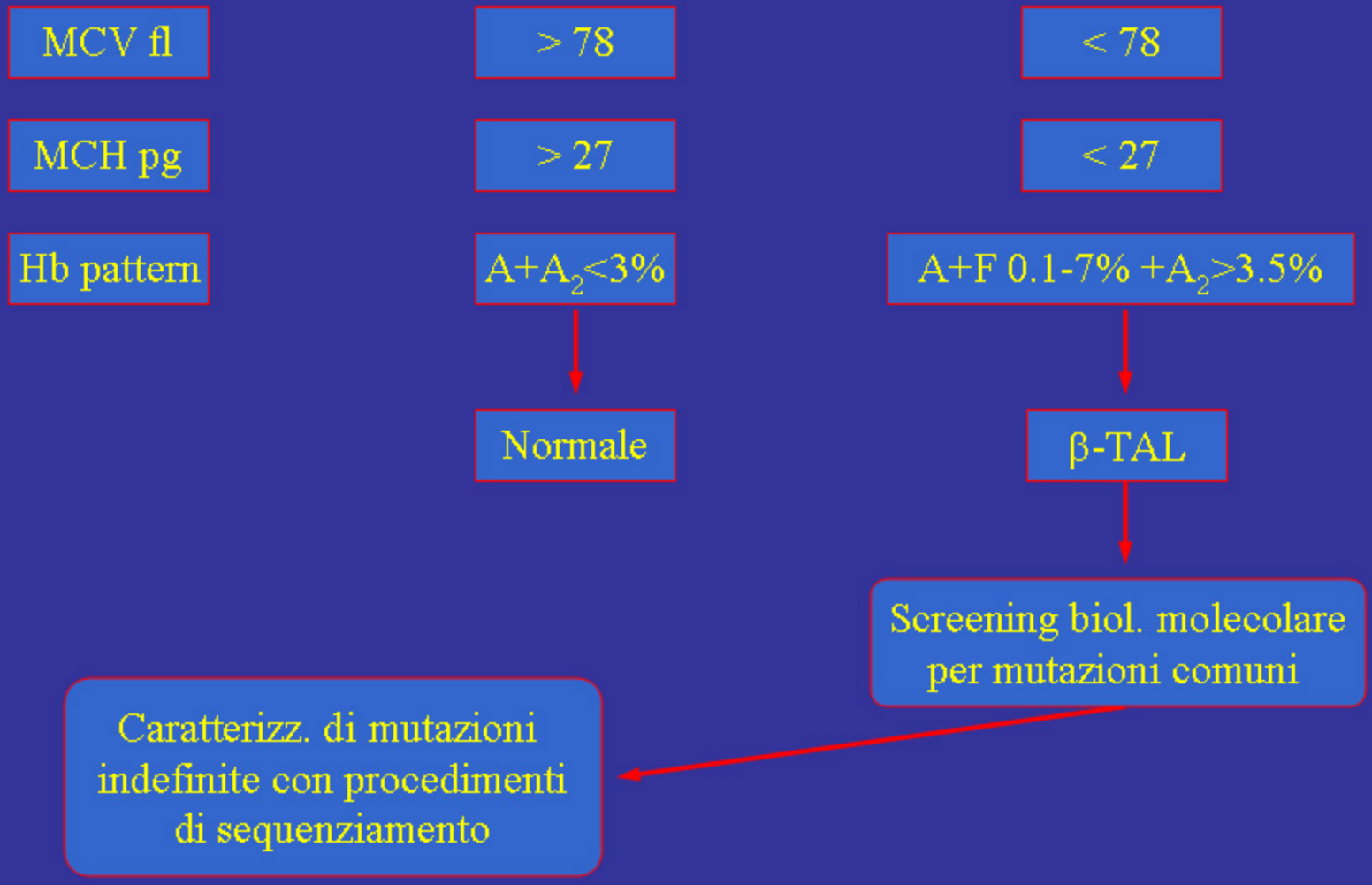
Talassemia minor

Genotipo	HbA (%)	HbA_2 (%)	HbF (%)	Altre Hb
β^+/β	> 90	3.5 – 8.0	1 – 2	No
β°/β	> 90	3.5 – 8.0	1 – 2	No
$(\delta\beta)^\circ/\beta$	< 90	2.5 – 3.0	5 – 20	No
$(\delta\beta)^{Lepore}/\beta$	Presente	1.2 – 2-6	1 – 3	Lepore
$(\gamma\delta\beta)^\circ/\beta$	Presente	2.5 – 3.2	< 1 - 2	No

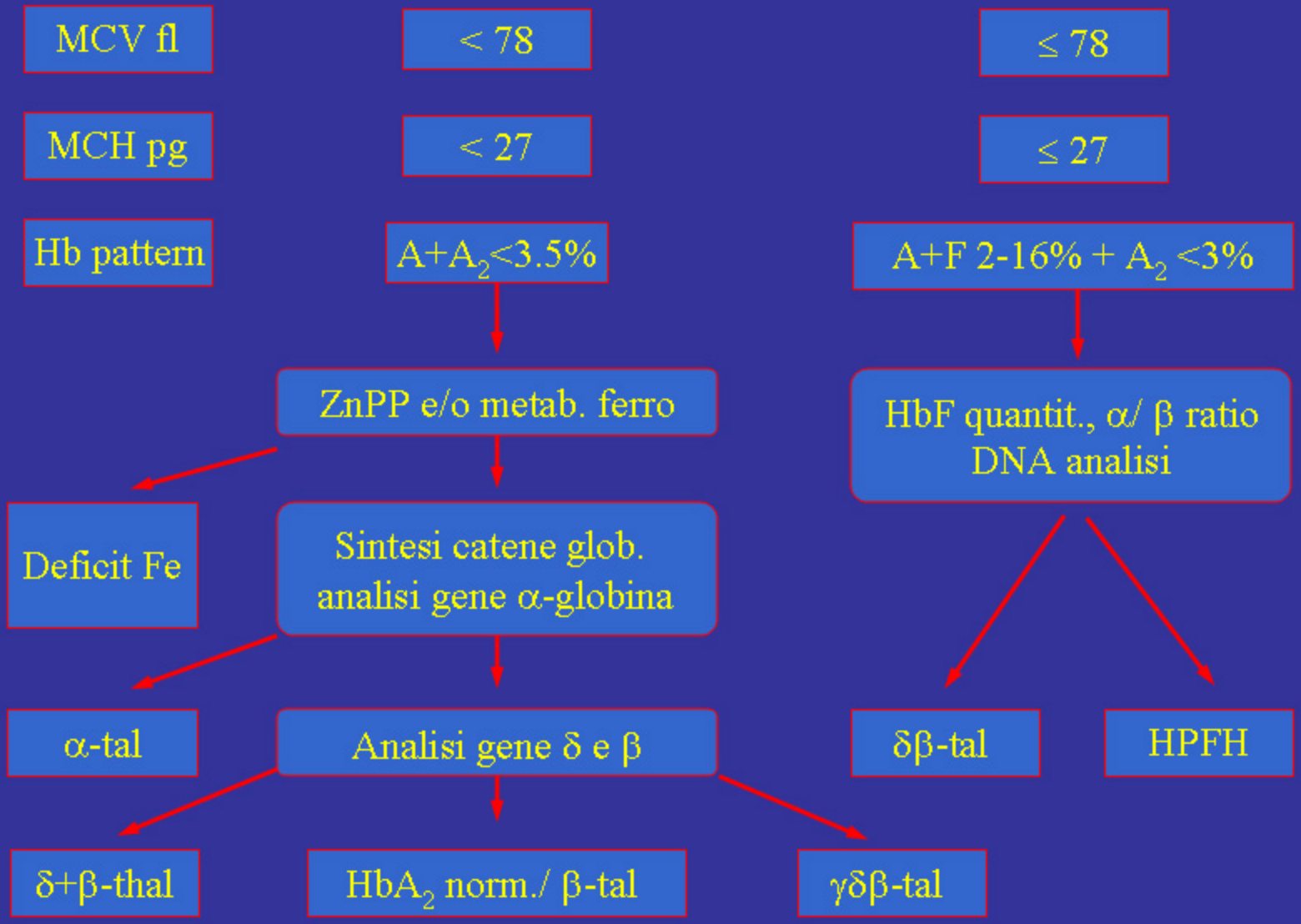
Talassemia minima

Genotipo	HbA (%)	HbA_2 (%)	HbF (%)	Altre Hb
$\beta^{silente}/\beta$	97	< 3.2	< 1	No

Flow chart per lo screening del trait β-talassemico



Flow chart per lo screening del trait β-talassemico



Fenotipi α-talassemici

- Trait α-talassemico
  - lieve (α thal 2)
  - moderato (α thal 1)
- HbH
- Hb Bart's (sindrome con idrope fetale)

Parametri ed indici eritrocitari nel trait α-talassemico

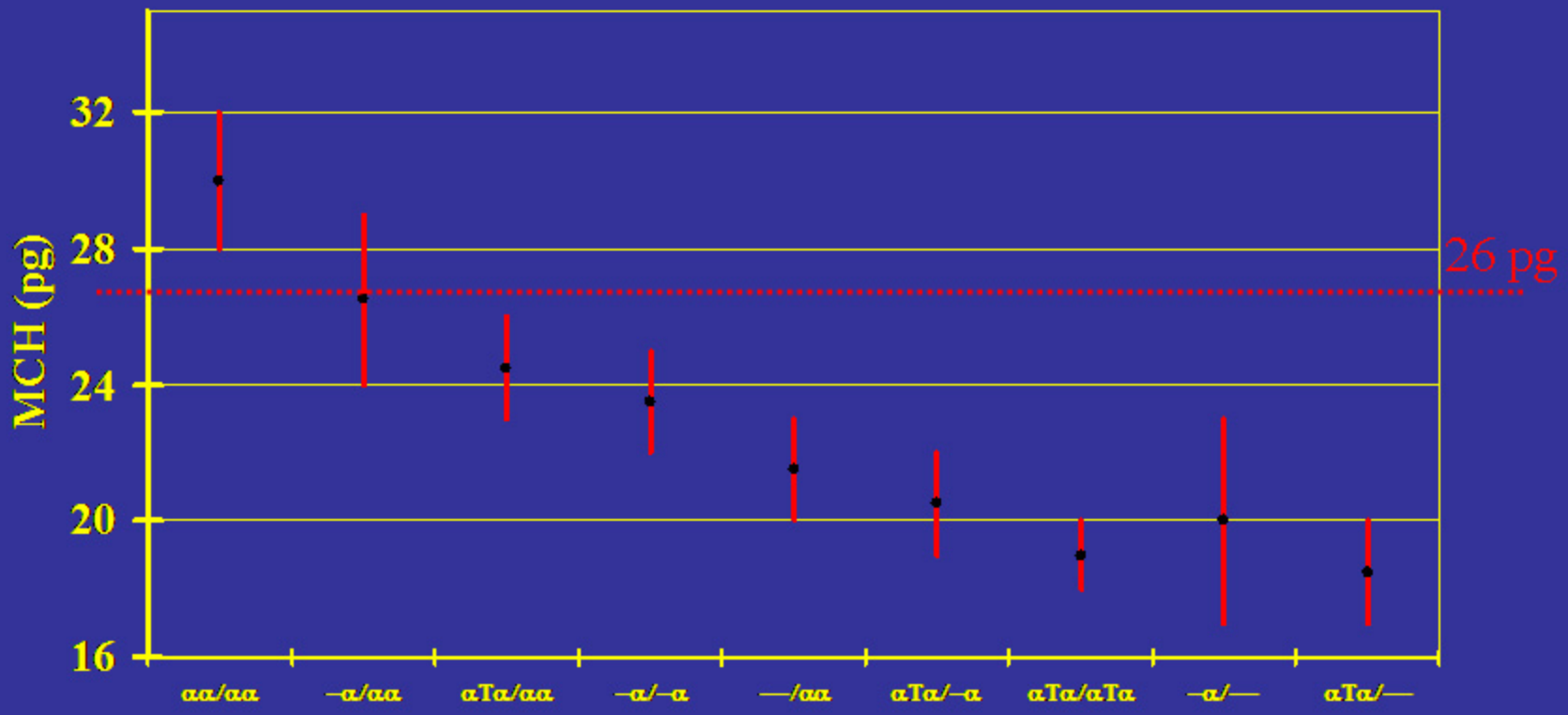
- Hb ↓
- MCV ↓
- MCH ↓

- RBC N/↑
- HbA_2 N/↓
- HbF N/↓

Relazione tra mutazione del gene α e sintesi delle catene α

- Le mutazioni del *cluster* dei geni α globinici possono inattivare uno (-α, $\alpha^T\alpha$, $\alpha\alpha^T$) o entrambi (--) i loci.
- Se la mutazione riguarda un singolo gene, la sintesi delle catene α dipende :
  - mutazione con (-α) o senza ($\alpha^T\alpha$, $\alpha\alpha^T$) delezione
  - perdita dell'espressione del gene parziale o completa
  - *locus* interessato α1 ($\alpha\alpha^T$) o α2 ($\alpha^T\alpha$)
  - compensazione da parte del gene rimanente (es:-$\alpha^{3.7}$,-$\alpha^{4.2}$)

MCH ed espressione gene α globina



(Wilkie AOM; 1991)

Considerazioni diagnostiche e genetiche sul trait α-talassemico

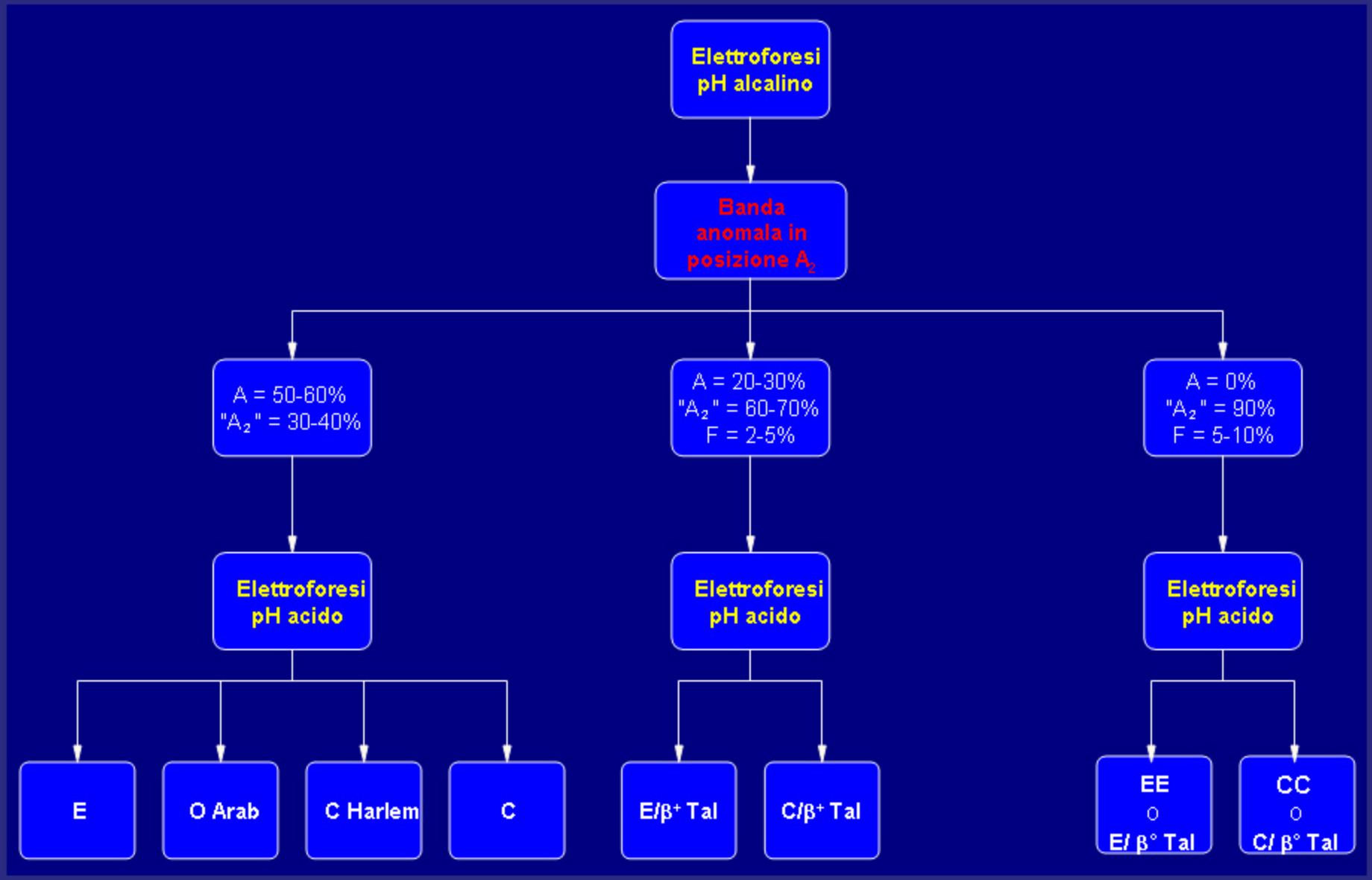
Patients with MCH $\leq$ 26 pg but with a normal level of HbA_2 (<3.5%) and a normal iron status, almost always have α-thalassemia trait

……The partners of such individuals should be screened and if they too have α-thalassemia trait, with a MCH of 26 pg or less, the couple should be offered counseling and genotype analysis

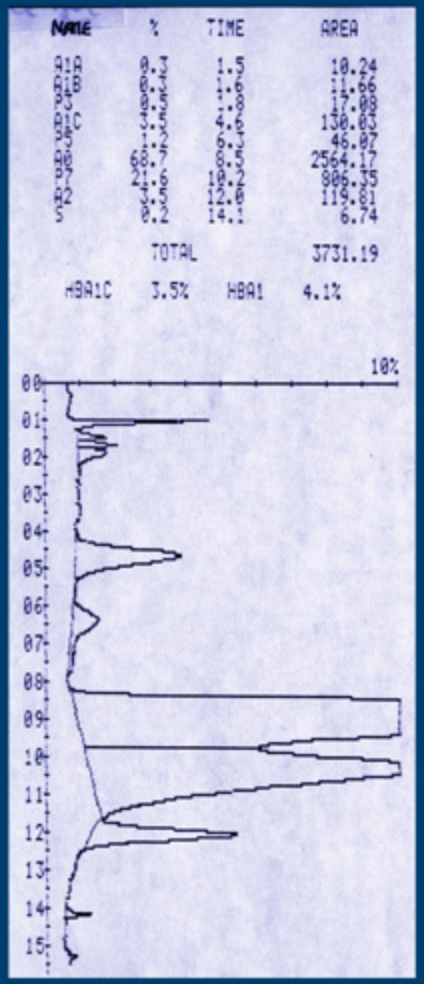
Higgs DR et al. *Disorders of Hemoglobin.* Cambridge University Press 2001

Varianti emoglobiniche clinicamente importanti

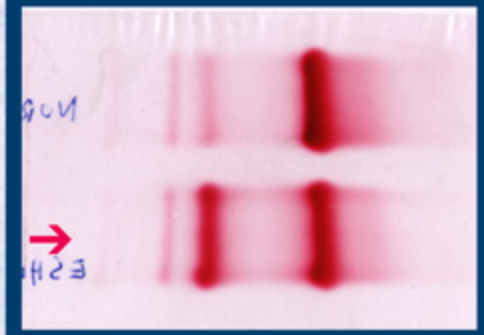
- Sindromi falcemiche:
  - Tratto falcemico
  - Sindromi falcemiche (SS; SC; SD Los Angeles; SO Arab; S/β talassemia)
- Emoglobine instabili (Anemia emolitica congenita con corpi di Heinz ~ 90 varianti)
- Emoglobine con alterata affinità per l'ossigeno (P_{50})
  - Alta affinità ⇒ Eritrocitosi familiare (~40 varianti)
  - Bassa affinità ⇒ Cianosi familiare (~ 20 varianti)
- Emoglobine M ⇒ meta-Hb e cianosi familiare (~ 6 varianti)
- Varianti strutturali con fenotipo talassemico
  - Fenotipo β-talassemico (Hb Lepore; Hb E; Hb Indianapolis)
  - Fenotipo α-talassemico (Hb Constant Spring; Hb Quong Sze)

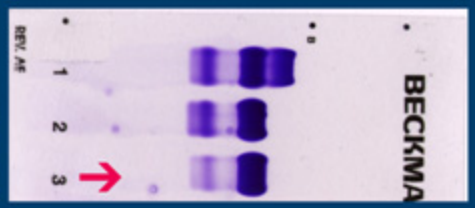

Elettroforesi pH alcalino
Banda anomala in posizione A_2
A = 50-60% "A_2" = 30-40%
A = 20-30% "A_2" = 60-70% F = 2-5%
A = 0% "A_2" = 90% F = 5-10%
Elettroforesi pH acido
Elettroforesi pH acido
Elettroforesi pH acido
E
O Arab
C Harlem
C
E/β⁺ Tal
C/β⁺ Tal
EE o E/ β° Tal
CC o C/ β° Tal

Eterozigosi HbE



EMOCROMO		
6.82	x10³/µL	WBC
4.96	x10⁶/µL	RBC
12.5	g/dL	HGB
37.5	%	HCT
75.6	fL	MCV
25.1	pg	MCH
33.3	g/dL	MCHC
14.6	%	RDW
2.27	g/dL	HDW
436	x10³/µL	PLT
6.3	fL	MPV
52.2	%	PDW
.27	%	PCT
MORFOL RBC		0600





Eterozigosi HbC

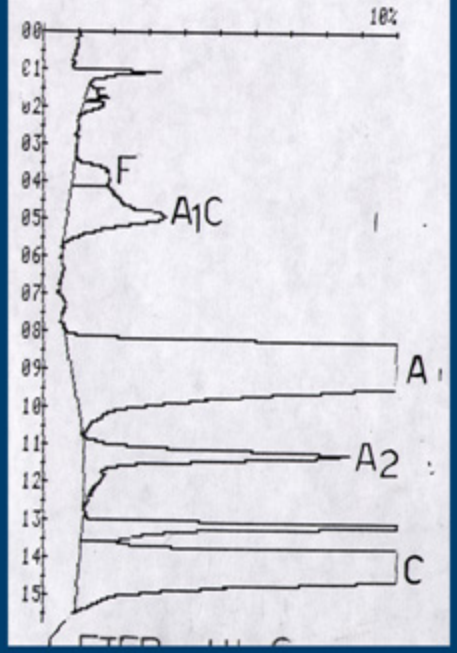
EMOCROMO

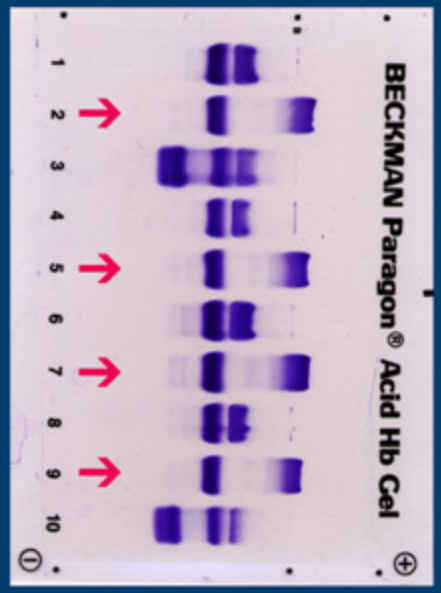
8.58	x10³/µL	WBC
5.27	x10⁶/µL	RBC
15.9	g/dL	HGB
44.7	%	HCT
84.8	fL	MCV
30.2	pg	MCH
35.6	g/dL	MCHC
12.9	%	RDW
2.42	g/dL	HDW
182	x10³/µL	PLT
9.2	fL	MPV
46.7	%	PDW
.17	%	PCT

SAMPLE NO. 005

NAME	%	TIME	AREA
A1A	0.1	1.7	5.34
A1B	0.2	1.9	7.17
F	0.8	3.9	28.30
A1C	3.1	4.9	112.82
A0	53.1	8.5	1916.41
P6	3.9	11.2	142.15
P7	4.0	13.1	146.21
S	34.4	14.0	1242.40
	TOTAL		3612.27

HBA1C 3.1% HBA1 3.5%





Omozigosi HbE

REFERTO EMATOLOGICO

NOME [redacted] AK6

PROVENIENZA

DATA 17/ 2/98 16:09

CAMPIONE N 4

WBC	8.10	x10³/µl	RDW-SD	37.2	fl
RBC	5.87+	x10⁶/µl	RDW-CV	15.2	%
HGB	13.6	g/dl	PDW	----.-	fl
HCT	39.9	%	MPV	----.-	fl
MCV	68.0-	fl	P-LCR	----.-	%
MCH	23.2-	pg			
MCHC	34.1	g/dl			
PLT	247 *	x10³/µl			

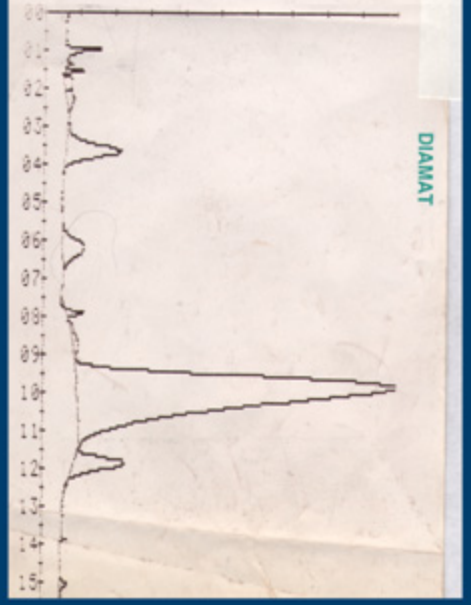
BIO-RAD

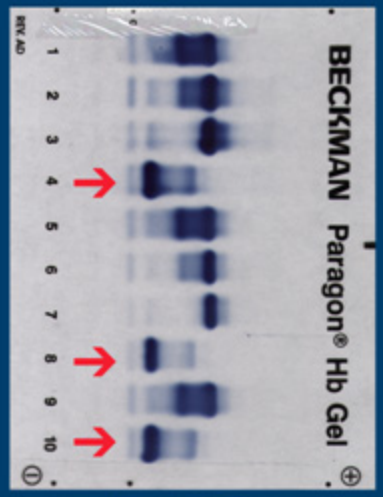
NAME	%	TIME	AREA
P8	81.4	11.0	1114.63
A2	5.0		68.53
TOTAL			1369.79

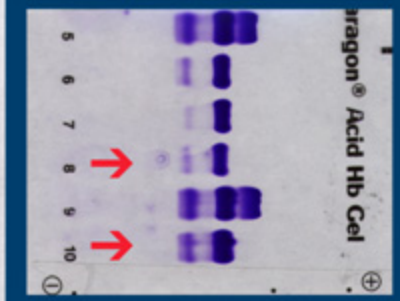
A1C PEAK NOT DETECT

HBA1C 0.0% HBA1 1.1%

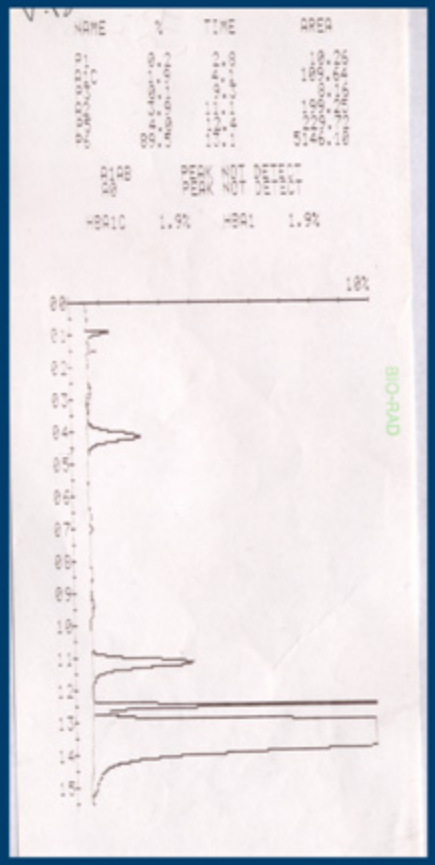
DIAMAT

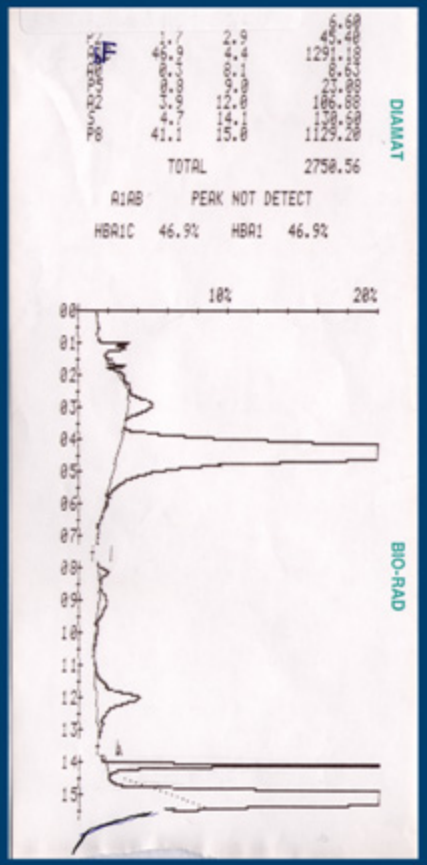


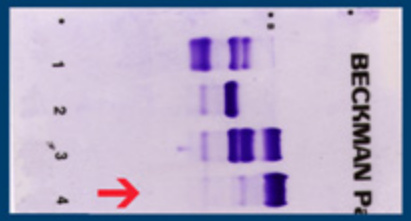


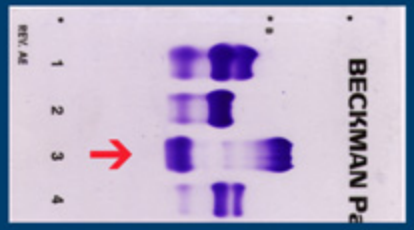


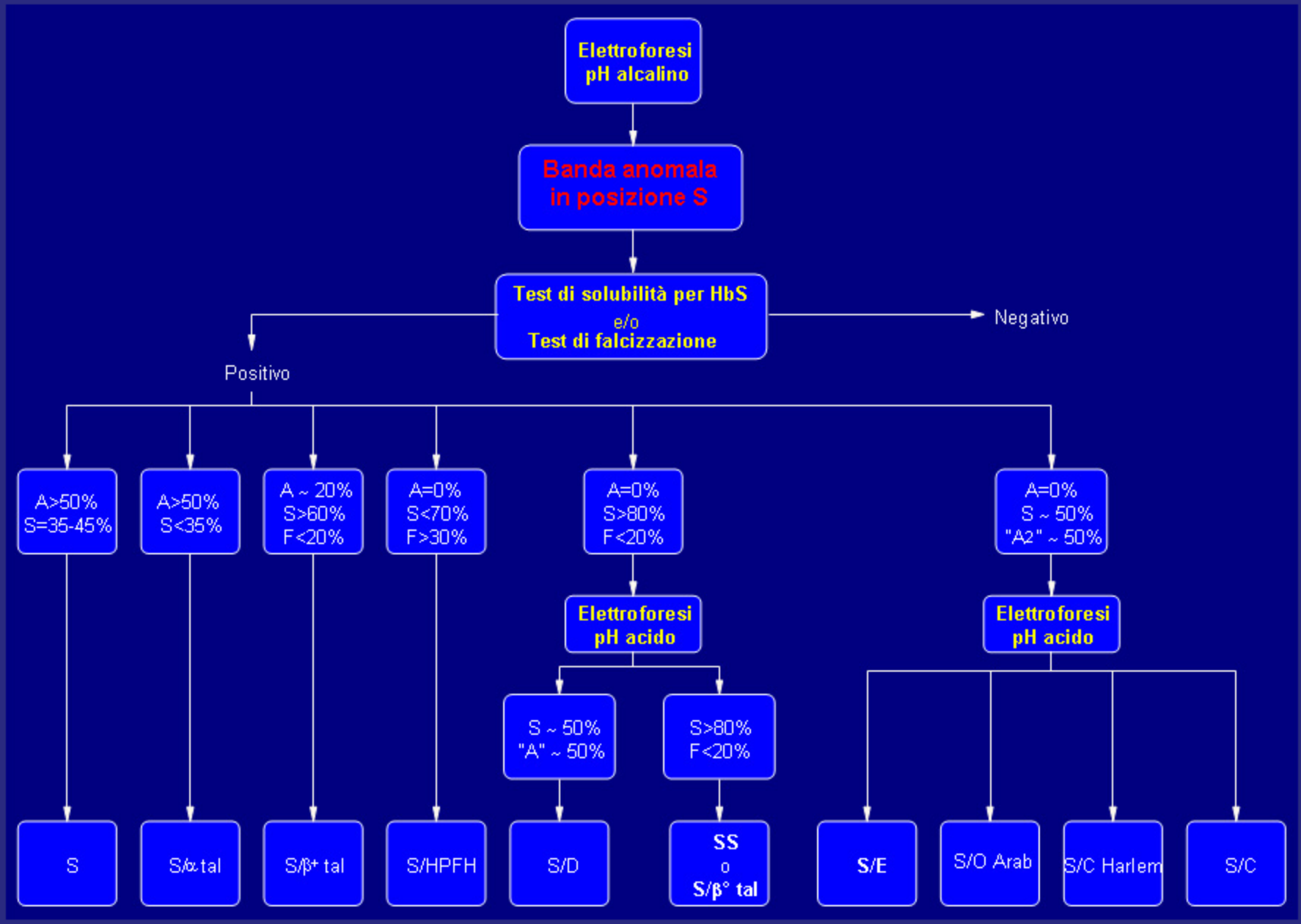
Omozigosi C
HbC/HPFH










Elettroforesi pH alcalino
Banda anomala in posizione S
Test di solubilità per HbS
e/o
Test di falcizzazione
Negativo
Positivo
A>50% S=35-45%
A>50% S<35%
A ~ 20% S>60% F<20%
A=0% S<70% F>30%
A=0% S>80% F<20%
A=0% S ~ 50% "A2" ~ 50%
Elettroforesi pH acido
Elettroforesi pH acido
S ~ 50% "A" ~ 50%
S>80% F<20%
S
S/α tal
S/β+ tal
S/HPFH
S/D
SS o S/β° tal
S/E
S/O Arab
S/C Harlem
S/C

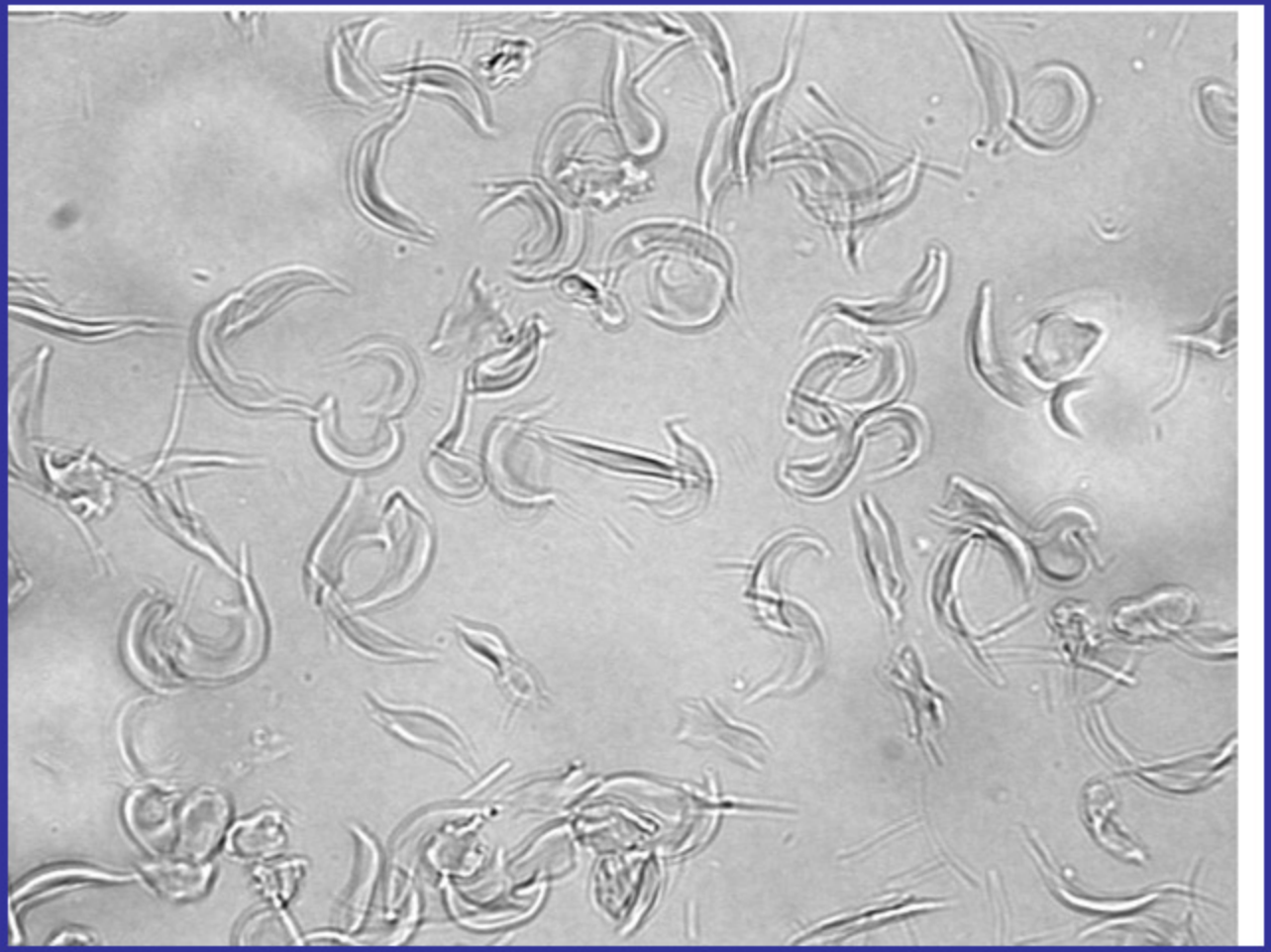
Test di solubilità per HbS

- Reattivo : Sodio ditionito 2% in H_2O
- Procedimento:
  - A 2 provette con 2 ml di reattivo ciascuna aggiungere 3 gocce di sangue da soggetto normale e da paziente
  - Appena l'emolisi è completa osservare le due provette contro un foglio bianco a righe
  - Test positivo se si osserva torbidità

Sickling test

- Reattivo : Sodio metabisolfito 2% in H_2O
- Procedimento:
  - su vetrino mescolare 1 gtt di sangue con 2 gtt di reattivo
  - coprire con coprioggetto largo, eventualmente sigillare con adesivo trasparente
  - dopo 10 - 15 min osservare a 400 - 1000 x la presenza di eritrociti a falce, se positivo

Sickling osservato a fresco



Falsa negatività ai test per HbS

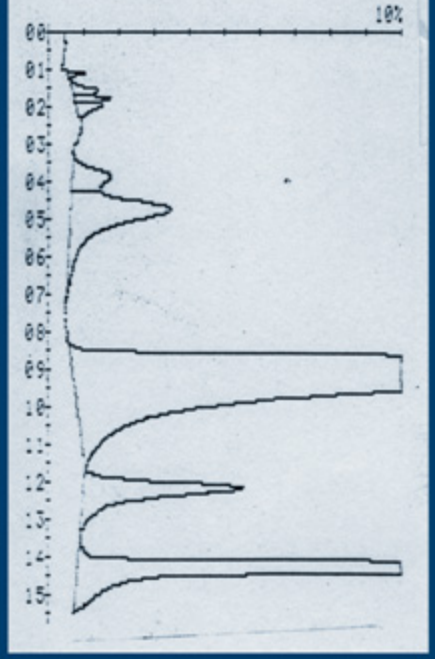
- Può osservarsi nei neonati con trait HbS e più raramente con HbSS per due motivi principali:
  - Ridotta presenza di HbS – ricordare che è una variante β e quindi ancora poco espressa alla nascita
  - Inibizione dovuta a elevata HbF che inibisce la polimerizzazione di HbS

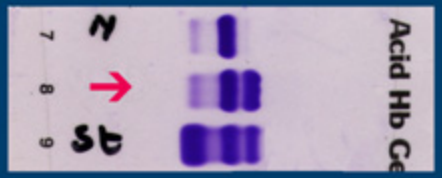
Nel dubbio ricorrere all'elettroforesi o HPLC

Eterozigosi HbS

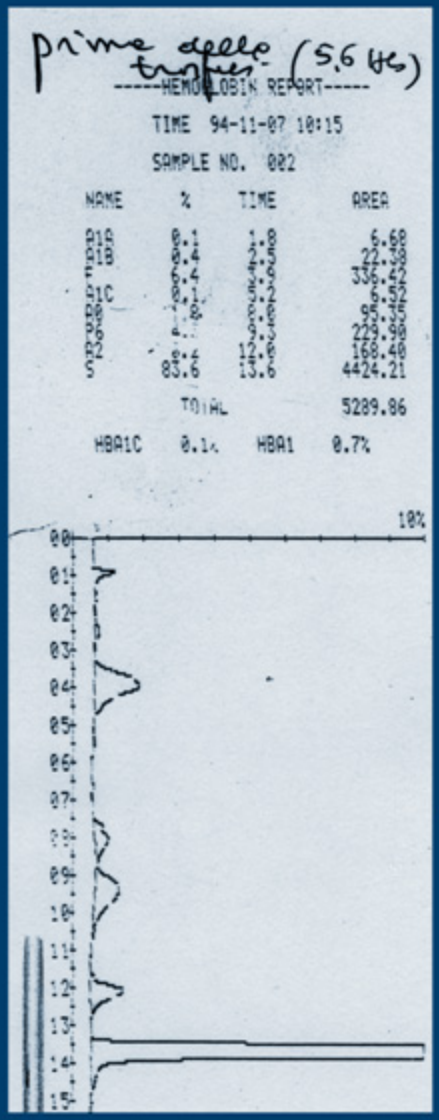
NAME	%	TIME	AREA
P1	0.1	1.1	5.87
A1A	0.4	1.5	16.79
A1B	0.2	1.7	21.06
P4	0.2	1.9	21.72
P5	0.8	3.8	74.12
A1C	4.1	4.7	283.43
A0	58.7	8.7	5334.48
A2	3.6	12.1	275.63
S	33.6	14.2	3048.33
		TOTAL	9085.67

HBA1C 3.1% HBA1 3.5%





Omozigosi HbS


prima dello trapianto (5,6 Hb)

-----HEMOGLOBIN REPORT-----

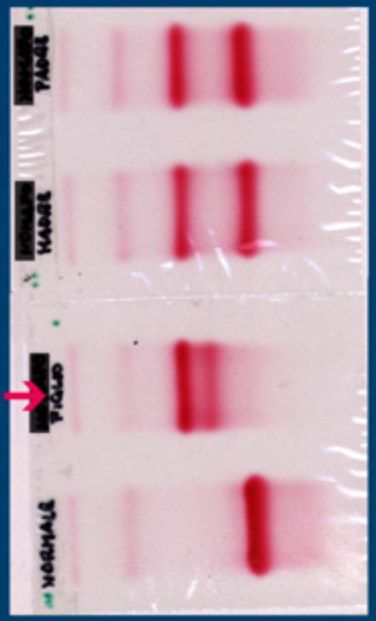
TIME 94-11-07 10:15

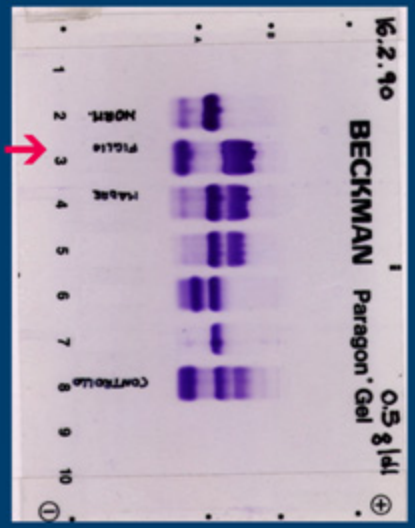
SAMPLE NO. 002

NAME	%	TIME	AREA
A1A	0.1	1.8	6.68
A1B	0.4	2.1	22.38
F	0.4	3.0	33.64
A1C	0.1	3.2	9.52
P3	1.8	4.0	95.34
P4	4..	9..	229.90
A2	8.4	12.0	168.40
S	83.6	13.6	4424.21
		TOTAL	5289.86

HBA1C 0.1% HBA1 0.7%

10%

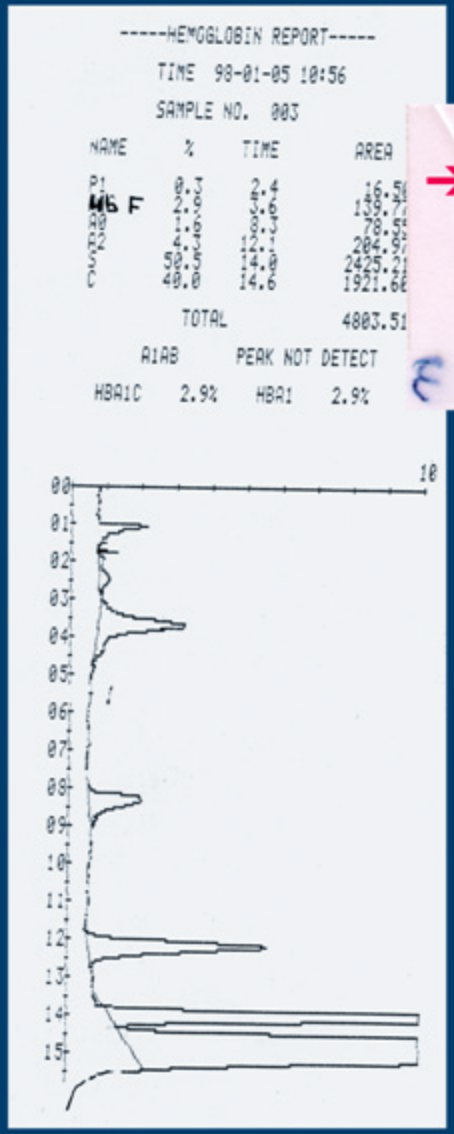


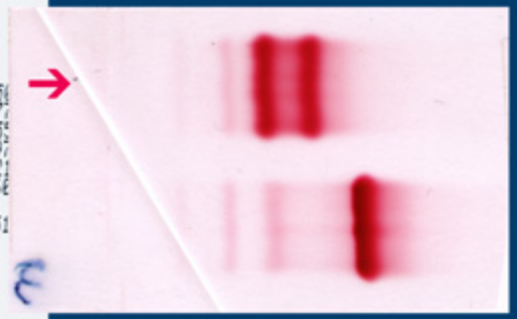


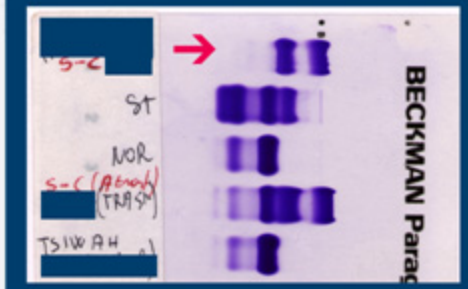
Diagnosi differenziale della malattia SS

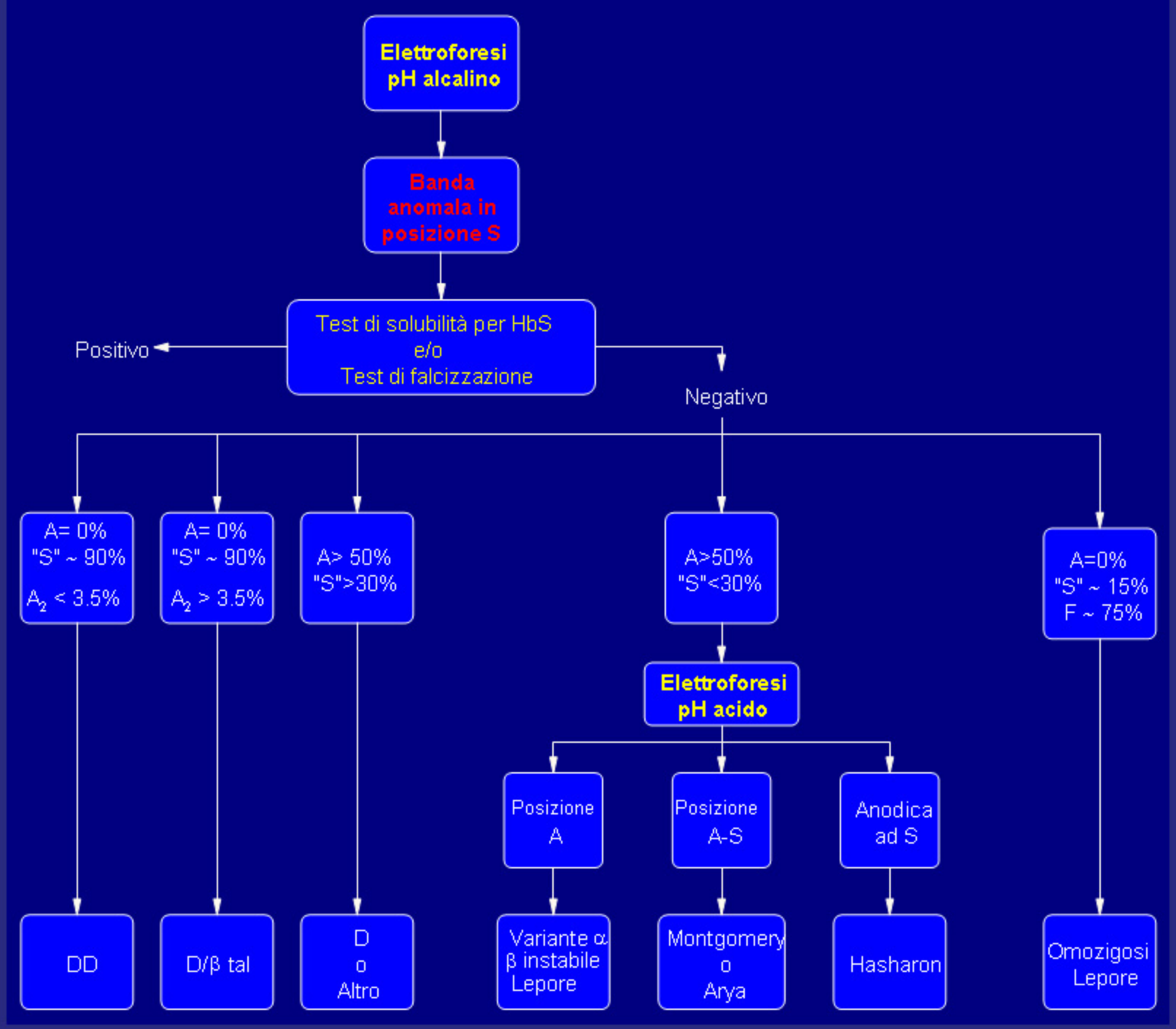
Diagnosi	Severità clinica	Hb (g/dL)	MCV (fL)	HbS (%)	HbF (%)	HbA_2 (%)	HbA (%)
SS	Grave	6–10	>80	>90	<10	<3.5	0
SD Los Angeles	Moderata Grave	6–10	75–95	~50	<5	<3.5	0
S/β^0 talassemia	Moderata Grave	6–10	<80	>80	<20	>3.5	0
S/β^+ talassemia	Lieve Moderata	9–12	<75	>60	<20	>3.5	~20
S/HPFH	Lieve	12–14	<75	<70	>30	<2.5	0

Doppia Eterozigosi SC

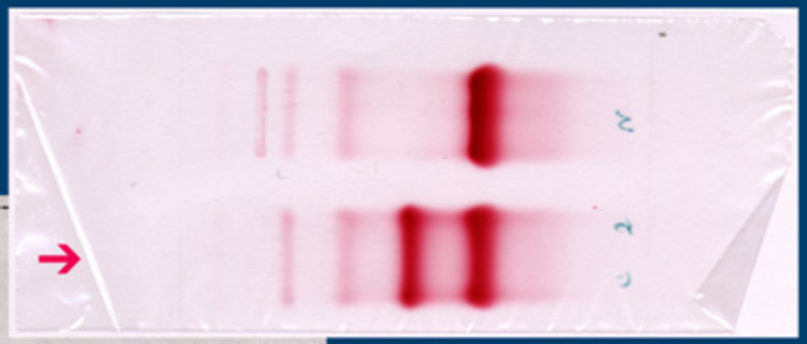


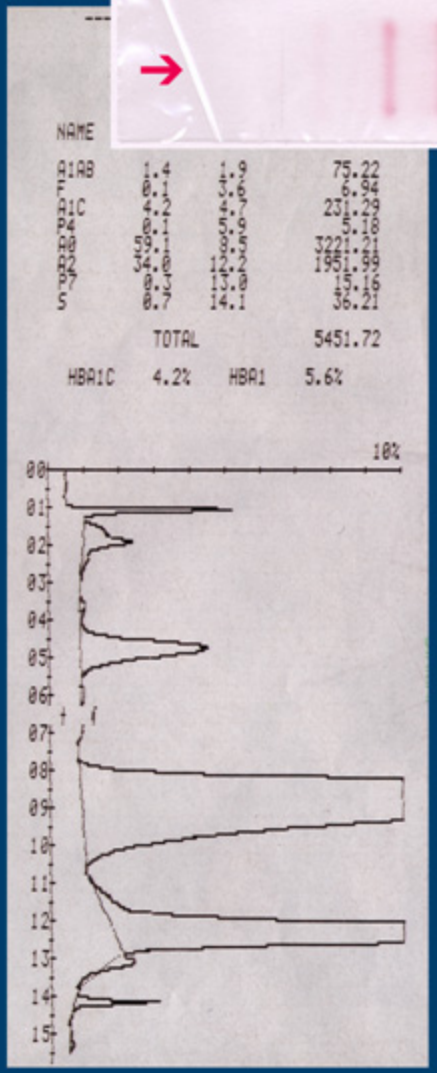


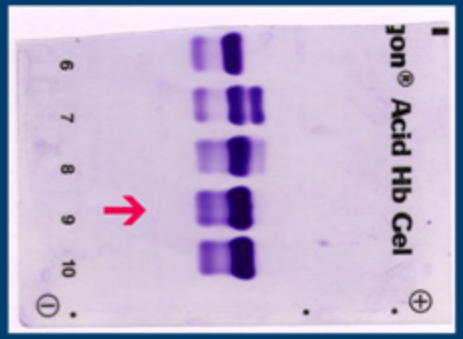



Elettroforesi pH alcalino
Banda anomala in posizione S
Test di solubilità per HbS e/o Test di falcizzazione
Positivo
Negativo
A= 0% "S" ~ 90% A_2 < 3.5%
A= 0% "S" ~ 90% A_2 > 3.5%
A> 50% "S">30%
A>50% "S"<30%
A=0% "S" ~ 15% F ~ 75%
Elettroforesi pH acido
Posizione A
Posizione A-S
Anodica ad S
DD
D/β tal
D o Altro
Variante α β instabile Lepore
Montgomery o Arya
Hasharon
Omozigosi Lepore

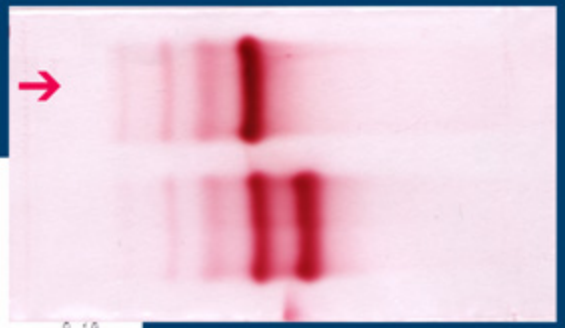
Eterozigosi HbD

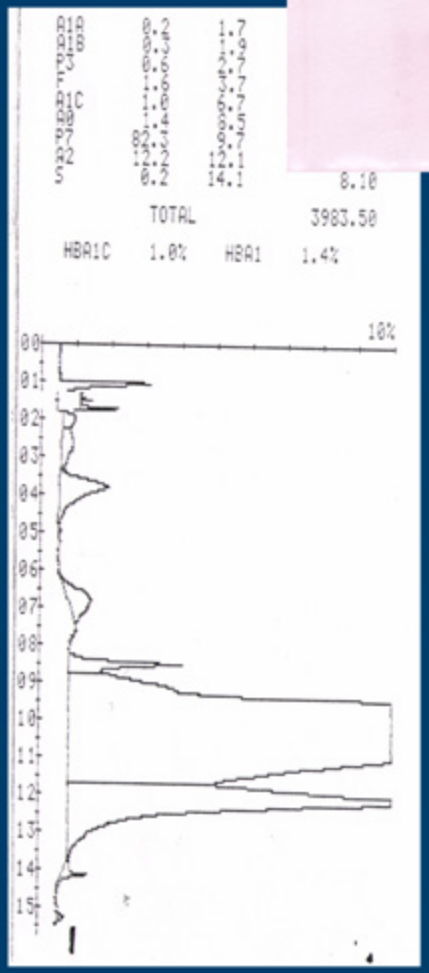






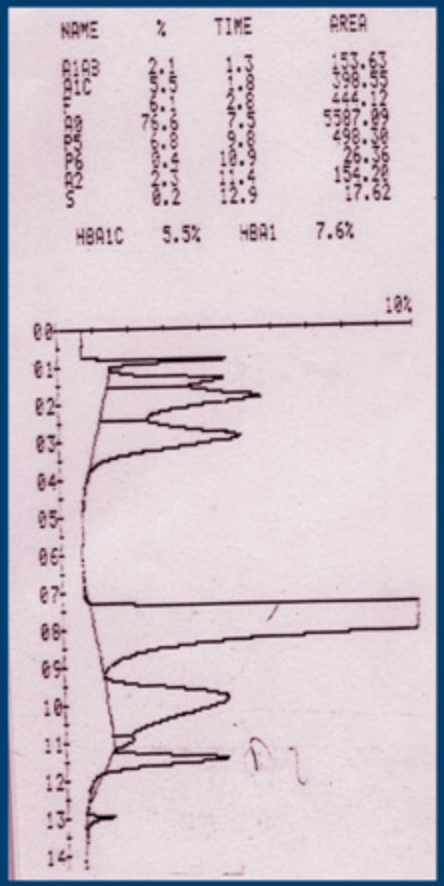
Doppia Eterozigosi D/β talassemia

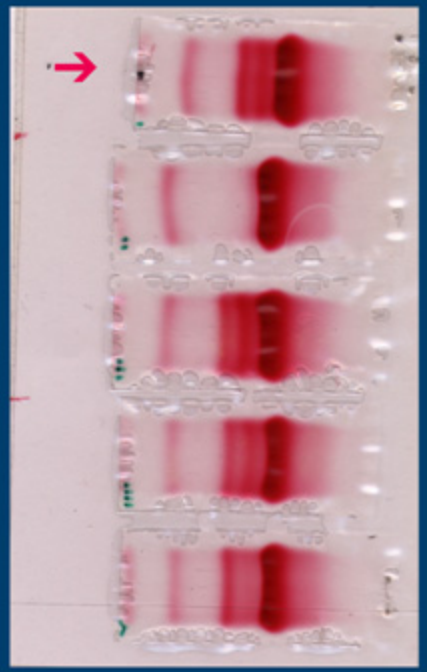




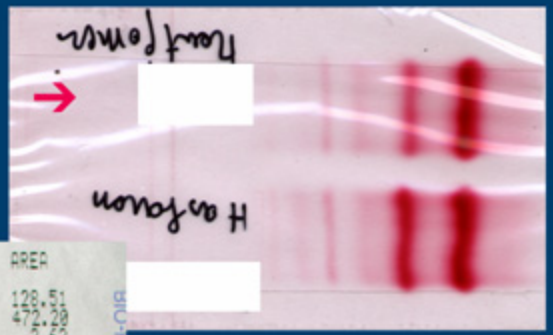
Eterozigosi
Hb Lepore

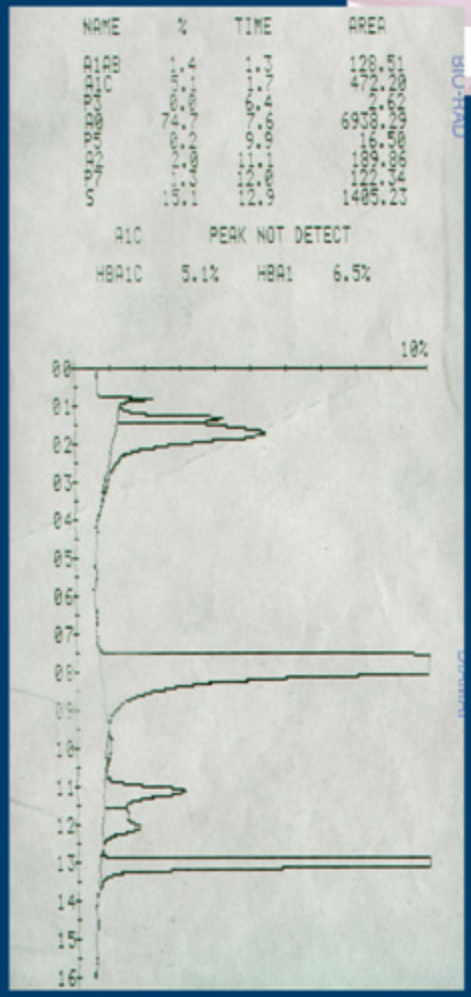
EMOCROMO		
8.51	x10³/µL	WBC
5.43	x10⁶/µL	RBC
11.5	g/dL	HGB
34.9	%	HCT
64.3	fL	MCV
21.2	pg	MCH
33.0	g/dL	MCHC
17.0	%	RDW
2.83	g/dL	HDW
287*	x10³/µL	PLT
6.8	fL	MPV
53.8	%	PDW
.19*	%	PCT

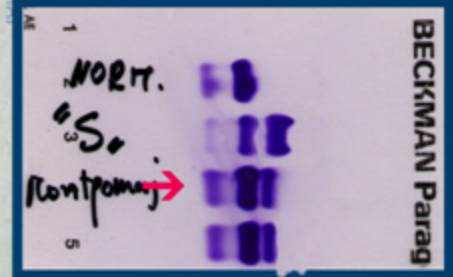




Hb Montgomery







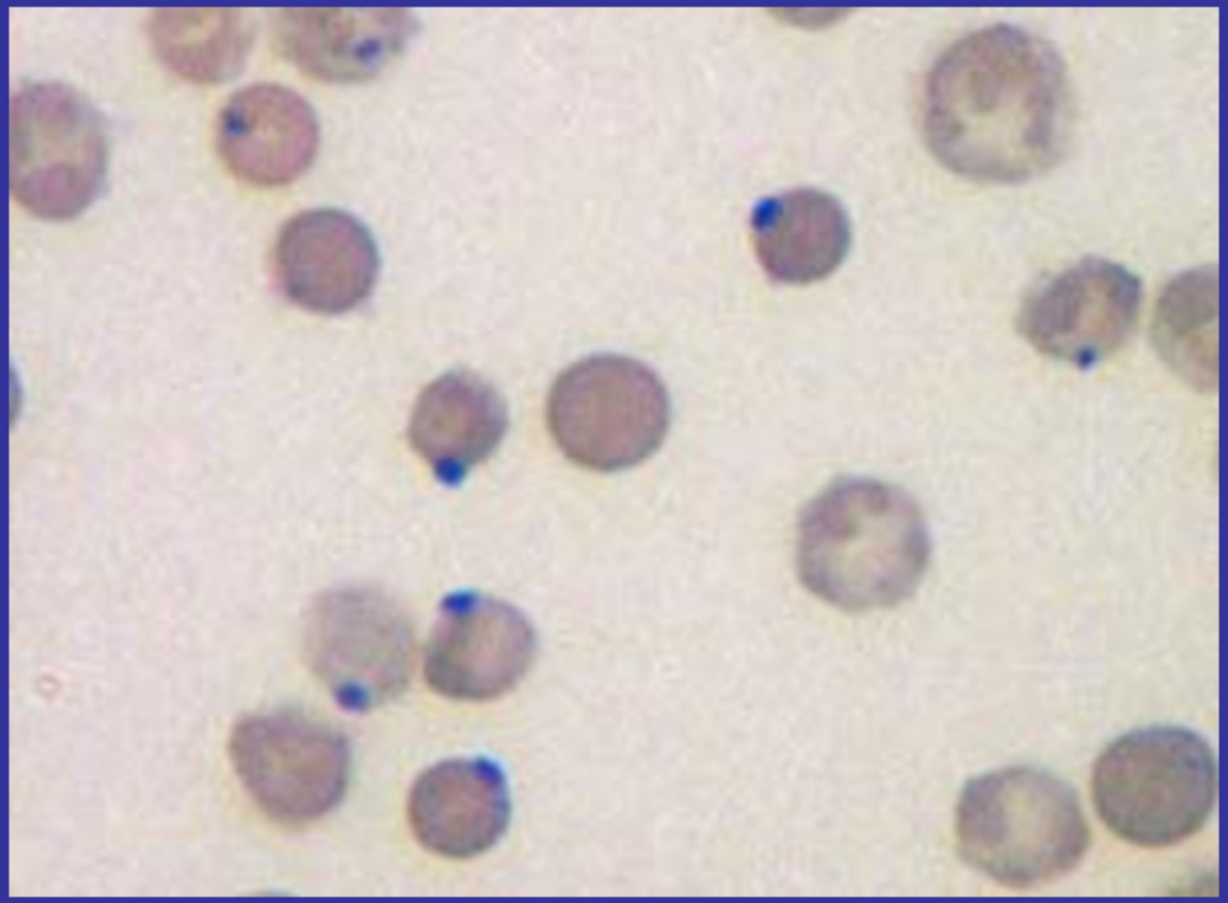
Emoglobine instabili

- Caratterizzate da:
  - Presenza di corpi di Heinz (Heinz bodies) intraeritrocitari
  - Instabilità globinica (α o β) per mutazioni che avvengono in prossimità del contatto con l'eme
  - Tendenza della molecola a precipitare dopo trattamento in condizioni di moderato calore (48-50°C) o con isopropanolo 17% a 37°C

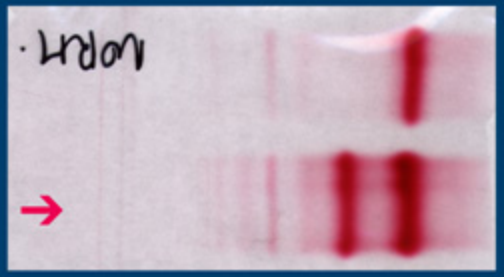
Heinz-bodies

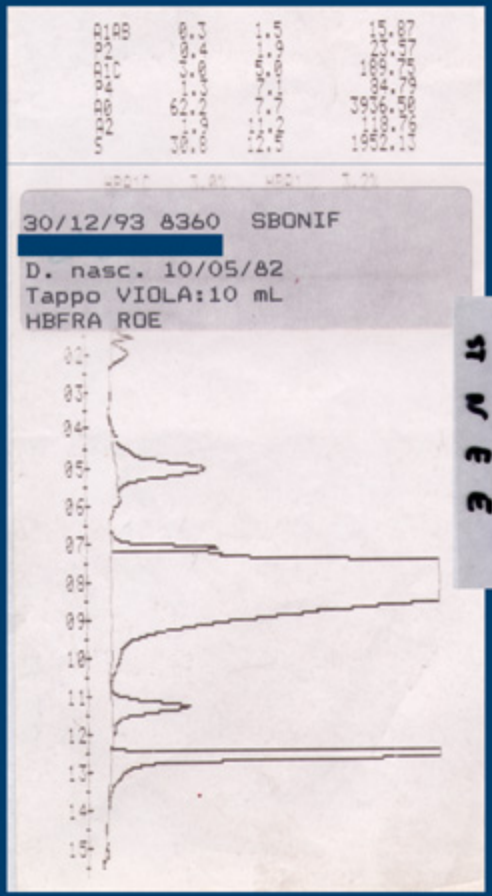
- Corpi inclusi da precipitati di Hb rimossi dalla milza (bite-cells) → emolisi
- Presenti in varie condizioni:
  - deficit G6PD, Hb instabili, varianti talassemiche, alcuni agenti chimici
- Visibili con coloranti sopravitali (metilvioletto)
- Indotti da ossidanti (acetilfenilidrazina)

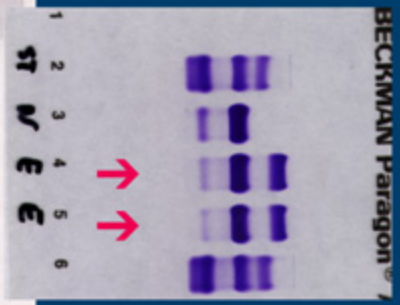
Heinz-bodies



Hb Hasharon


HARON


30/12/93 8360 SBONIF
[redacted]
D. nasc. 10/05/82
Tappo VIOLA:10 mL
HBFRA ROE


BECKMAN Paragon

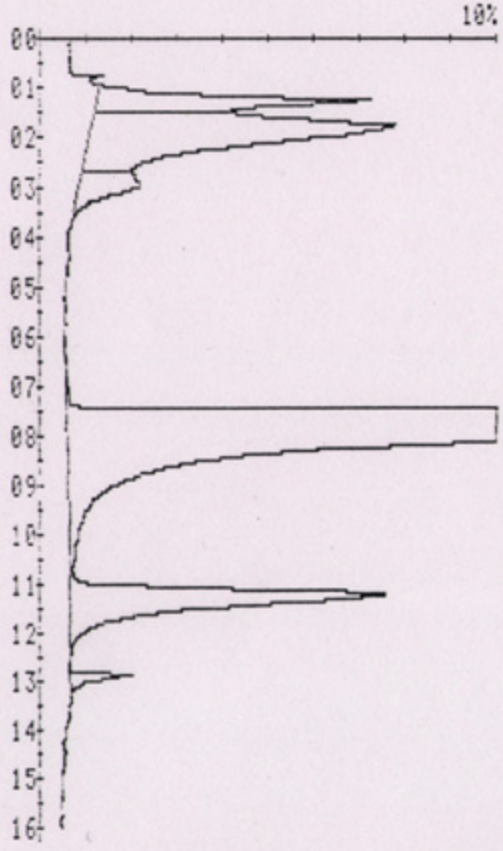
-----HEMOGLOBIN REPORT-----

TIME 91-07-03 10:59

SAMPLE NO. 005

NAME	%	TIME	AREA
A1AB	2.9	1.2	162.08
A1C	7.6	1.8	423.53
F	1.1	2.9	63.04
A0	82.6	7.5	4609.41
A2	5.3	11.2	298.40
S	0.4	12.8	20.53
C	0.0	14.4	2.03

HBA1C 7.6% HBA1 10.5%



-----HEMOGLOBIN REPORT-----

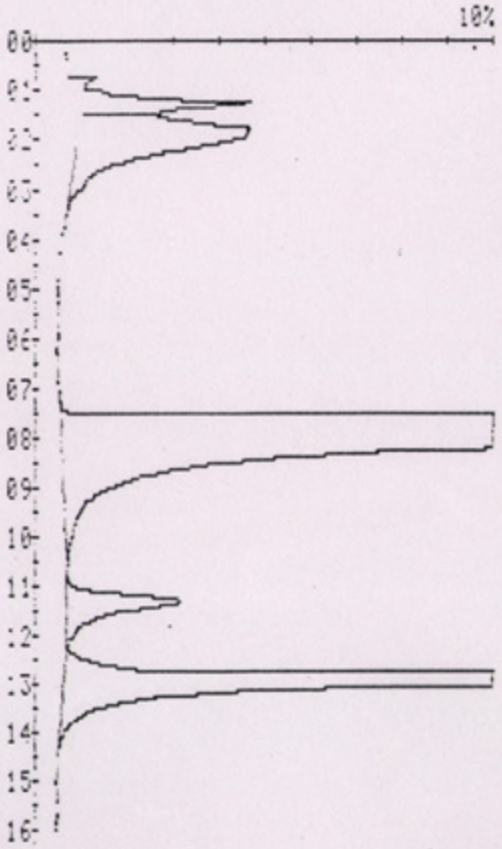
TIME 91-07-03 10:26

SAMPLE NO. 003

NAME	%	TIME	AREA
A1AB	1.6	1.2	91.58
A1C	4.4	1.8	257.18
A0	61.6	7.6	3633.49
A2	1.7	11.3	98.30
S	30.7	12.8	1809.04

A1C PEAK NOT DETECT

HBA1C 4.4% HBA1 5.9%



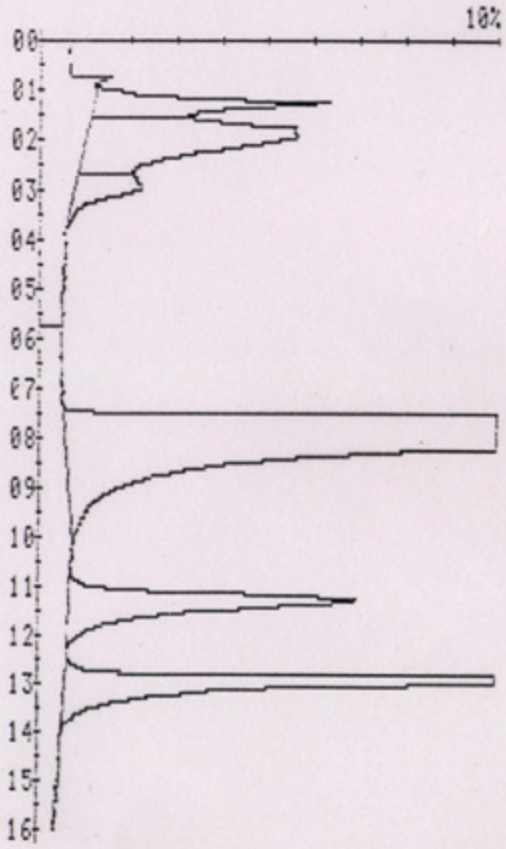
-----HEMOGLOBIN REPORT-----

TIME 91-07-03 10:43

SAMPLE NO. 004

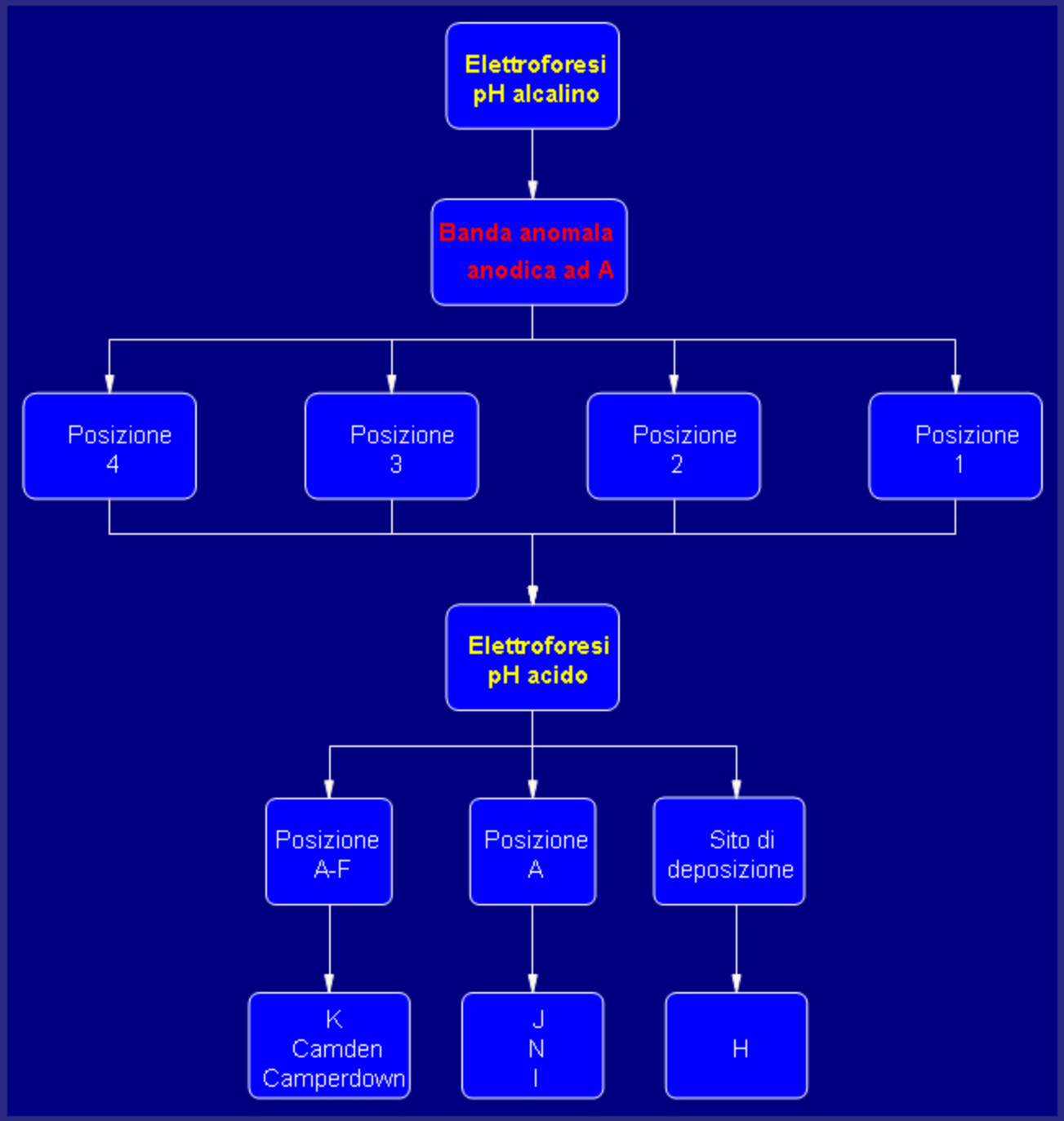
NAME	%	TIME	AREA
A1AB	2.3	1.2	103.72
A1C	5.4	1.8	242.51
F	1.2	2.9	53.15
A0	72.7	7.5	3248.35
A2	4.3	11.2	193.76
S	14.0	12.8	624.45

HBA1C 5.4% HBA1 7.7%

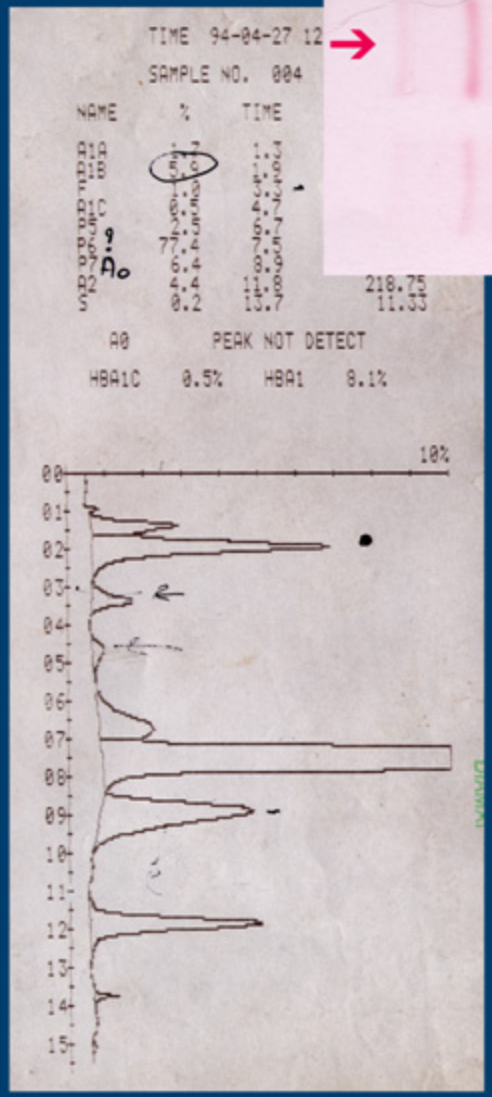


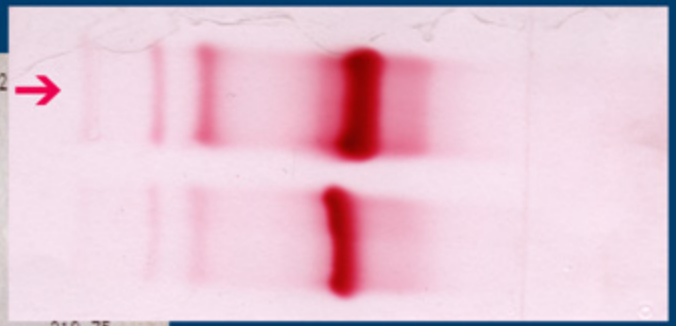
Emoglobine veloci

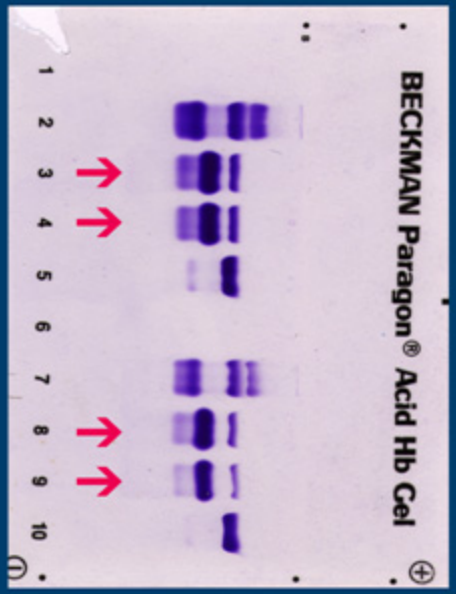
- A pH alcalino migrano più velocemente di HbA
- In genere non hanno rilievo clinico, ad eccezione di HbH (instabile) da cui vanno distinte
- HbH, doppia eterozigosi α-talassemica (- -,- α) presenta un fenotipo caratteristico ed è instabile con corpi di Heinz


Elettroforesi
pH alcalino
Banda anomala
anodica ad A
Posizione
4
Posizione
3
Posizione
2
Posizione
1
Elettroforesi
pH acido
Posizione
A-F
Posizione
A
Sito di
deposizione
K
Camden
Camperdown
J
N
I
H

Doppia eterozigosi
Camden/β talassemia







Eterozigosi HbJ