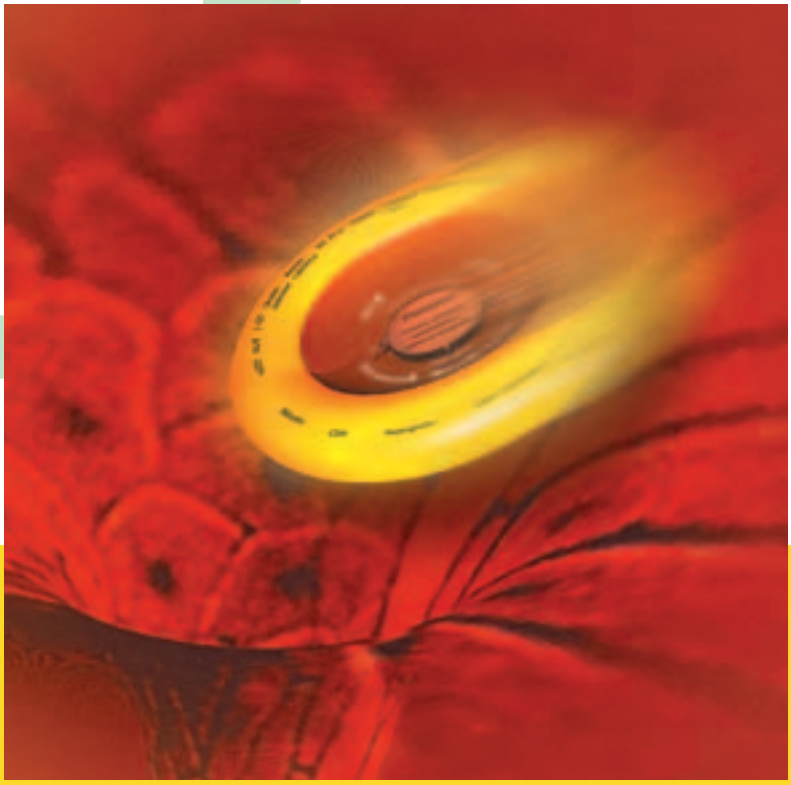
EsaDia

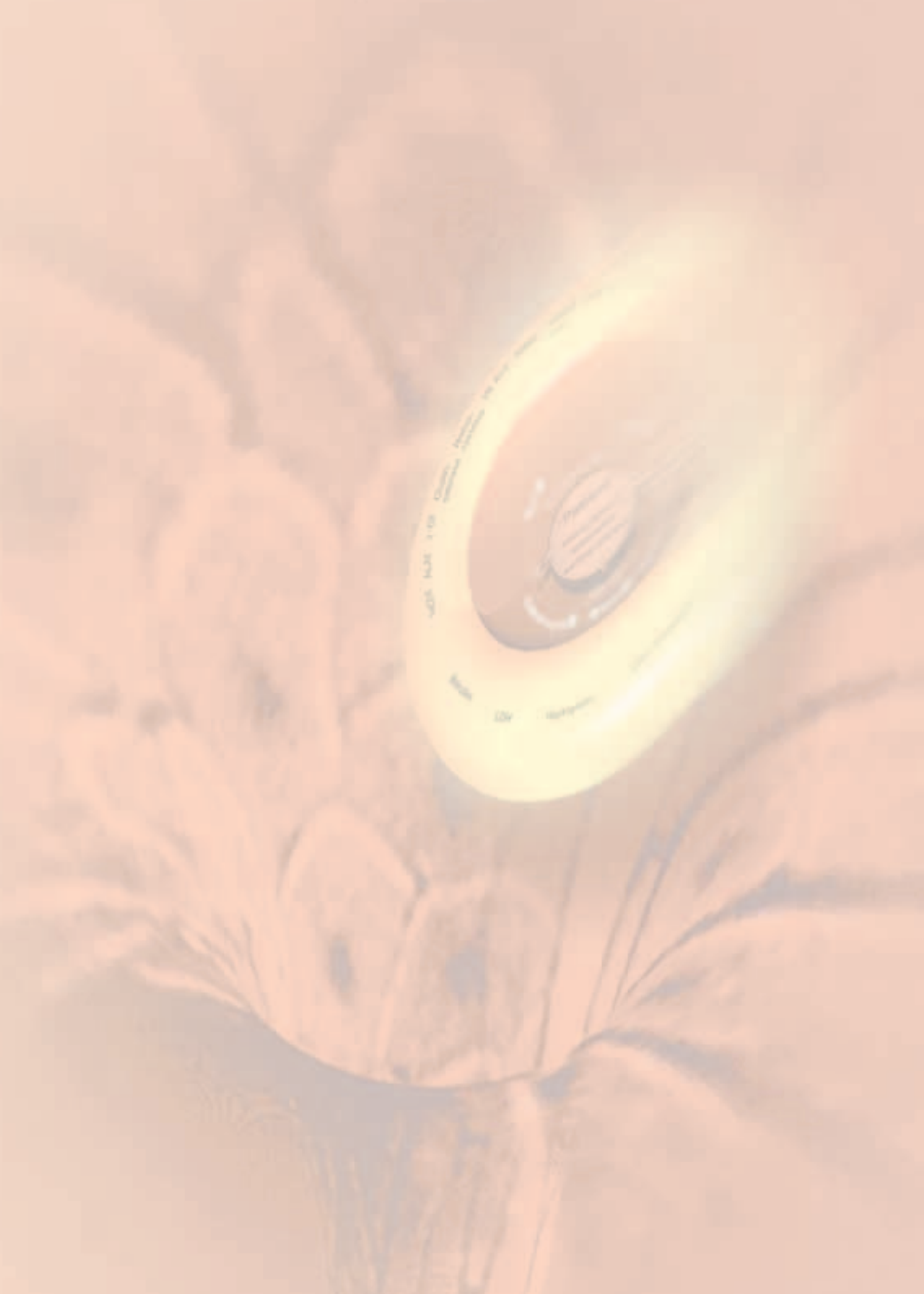
MAGGIO 2003

Rivista di attualità diagnostiche

IN QUESTO NUMERO



Anemie: aspetti clinici e diagnostici



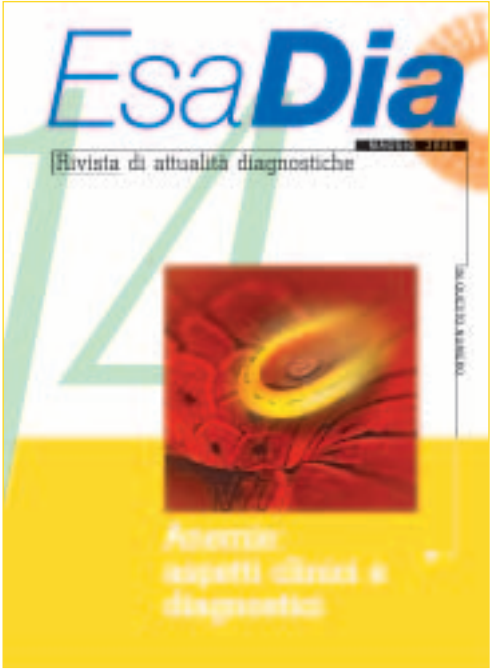
SOMMARIO

MONOGRAFIA - ANEMIE: ASPETTI CLINICI E DIAGNOSTICI

Approccio razionale alla diagnosi di anemia	Pag. 4
Anemie emolitiche	Pag. 10
Problematiche nella diagnosi dei difetti molecolari del gene β-globinico	Pag. 21
Anemia da carenza di folati e vitamina B12	Pag. 28
L'anemia sideropenica	Pag. 36

ROCHE DIAGNOSTICS INFORMA

Light Cycler per la prevenzione del rischio trombotico	Pag. 42
Cobas TaqMan 48: alta tecnologia e semplicità d'uso	Pag. 46
I test disponibili sui sistemi Roche Diagnostics per la diagnostica dell'anemia	Pag. 48
Roche Diagnostics per la coagulazione: Affidabilità, Innovazione e Libertà	Pag. 51
La piena realizzazione del progetto Modular	Pag. 52
Cobas Integra 400 plus e Abuscreen OnLine di II[a] generazione: il non plus ultra per lo screening delle droghe d'abuso	Pag. 54
NT-proBNP: il contributo del laboratorio nello Scompenso Cardiaco	Pag. 58



Anno 6 - n. 14 Maggio 2003
EsaDia è un trimestrale di medicina di laboratorio edito da CE.D.RI.M.
Autorizzazione del Tribunale di Milano n. 277 del 18/4/1992

Direttore responsabile: Giuseppe Minola
Redattore capo: Paolo Scala
Progetto grafico: Aretré srl
Art Direction: Ruggero Manganini
Impaginazione e illustrazioni: Simona Burla
Redazione: A. Gallazzi - P. Alessio - E. Beretta - M. Martino - C. Mosso - M. Paci - P. Pedrotti
Hanno collaborato: M. Cazzola - A. Giambona - R. Laricchia - F. Leto - A. Maggio - A. Molteni - D. Scribano

Stampatore: Arti Grafiche Amilcare Pizzi - Cinisello Balsamo

Copyright: Roche S.p.A.

Nessuna parte di questa pubblicazione può essere fotocopiata o riprodotta senza l'autorizzazione scritta dell'Editore.
L'Editore è disponibile al riconoscimento dei diritti di copyright per qualsiasi immagine utilizzata e della quale non si sia riusciti a ottenere l'autorizzazione alla riproduzione.

INTRODUZIONE

Inquadramento diagnostico delle anemie

Una delle principali funzioni del sangue è il trasporto dell'ossigeno dai polmoni, dove viene captato dall'aria inspirata, ai tessuti, dove viene consumato dalle cellule durante i processi vitali che in esse si svolgono. Il trasporto dell'ossigeno viene effettuato dai globuli rossi, e più precisamente dall'emoglobina in essi contenuta e che lega la molecola dell'ossigeno. Si definisce anemia una condizione morbosa caratterizzata dalla riduzione del patrimonio emoglobinico dell'organismo o, più semplicemente, della concentrazione dell'emoglobina nel sangue circolante. L'anemia è certamente una delle condizioni morbose più diffuse nel mondo, sia nei paesi sviluppati sia in quelli in via di sviluppo. La diagnosi differenziale non è sempre facile e richiede talvolta specifico know-how e sofisticati metodi diagnostici.

Essendo il ferro un componente fondamentale della molecola dell'emoglobina, la mancanza di ferro è una delle cause più frequenti di anemia. La carenza di ferro ha una prevalenza elevata anche nei paesi occidentali. Studi dell'Organizzazione Mondiale della Sanità stimano in 500-600 milioni le persone affette da carenza di ferro nel mondo. I gruppi della popolazione più a rischio sono i bambini e gli adolescenti, le donne in età fertile e le persone anziane. Durante la crescita, i giovani hanno bisogno di molto ferro per espandere le masse corporee, e questo contrasta spesso con un apporto dietetico inadeguato. Le donne in età fertile sono a rischio elevato di carenza non solo per le perdite mestruali, ma anche per le gravidanze, ciascuna delle quali richiede mediamente circa 700 mg di ferro. Le emorragie, spesso occulte, a carico del tubo digerente sono la causa più frequente di carenza nelle persone anziane. Lo spettro delle patologie responsabili di tali emorragie è molto ampio: si va condizioni banali, quali le emorroidi, alle neoplasie del tubo digerente.

L'anemia da carenza di ferro è tipicamente microcitica (MCV < 80 fL) e per tale carattere entra in diagnosi differenziale con le talassemie, condizioni morbose molto diffuse nel bacino del Mediterraneo. Le sindromi talassemiche sono disordini ereditari della sintesi della globina: una lesione genica, trasmessa come carattere ereditario, comporta riduzione o abolizione completa della sintesi di una o più catene globiniche. I difetti genetici che sono alla base delle sindromi talassemiche sono molto eterogenei e vanno dalla mancanza completa del gene responsabile della sintesi di una determinata catena globinica, alle cosiddette mutazioni puntiformi che interferiscono con la funzione del gene interessato. La sintesi di emoglobina è deficitaria e si hanno alterazioni degli eritroblasti e degli eritrociti provocate dalle catene globiniche in eccesso. Microcitosi e ipocromia da ridotta sintesi emoglobinica sono caratteristiche costanti delle sindromi talassemiche. Eritropoiesi inefficace, da morte intramidollare degli eritroblasti, ed iperemolisi periferica sono i meccanismi patogenetici dell'anemia, ma svolgono ruoli diversi nei diversi tipi di sindrome talassemica.

Non va confusa con l'anemia da carenza di ferro la cosiddetta anemia delle malattie croniche, vale a dire quel tipo di anemia che si associa frequentemente a malattie infettive, flogistiche o neoplastiche aventi un decorso subacuto o cronico, che è caratterizzata dalla combinazione di sideremia bassa con ferritina normale o elevata ed aumento del ferro di deposito nelle cellule reticoloendoteliali del midollo osseo, del fegato e della milza. Le malattie cui si associa più frequentemente sono l'artrite reumatoide, la polimialgia reumatica e le neoplasie con manifestazioni sistemiche. Si tratta probabilmente del tipo di anemia di più frequente riscontro nei paesi sviluppati; è importante distinguerla dall'anemia da carenza di ferro in quanto l'anemia delle malattie croniche non risponde generalmente alla terapia marziale.

L'acido folico e la vitamina B12 sono di fondamentale importanza per la proliferazione degli eritroblasti nel midollo osseo, e la loro mancanza produce anemia megaloblastica. Le anemie megaloblastiche sono caratterizzate da una particolare morfologia degli eritroblasti nel midollo osseo (eritroblasti che vengono appunto definiti megaloblasti) e da aumentato volume dei globuli rossi, quindi da macrocitosi (MCV > 100 fL). La più classica delle anemie megaloblastiche è l'anemia perniciosa.

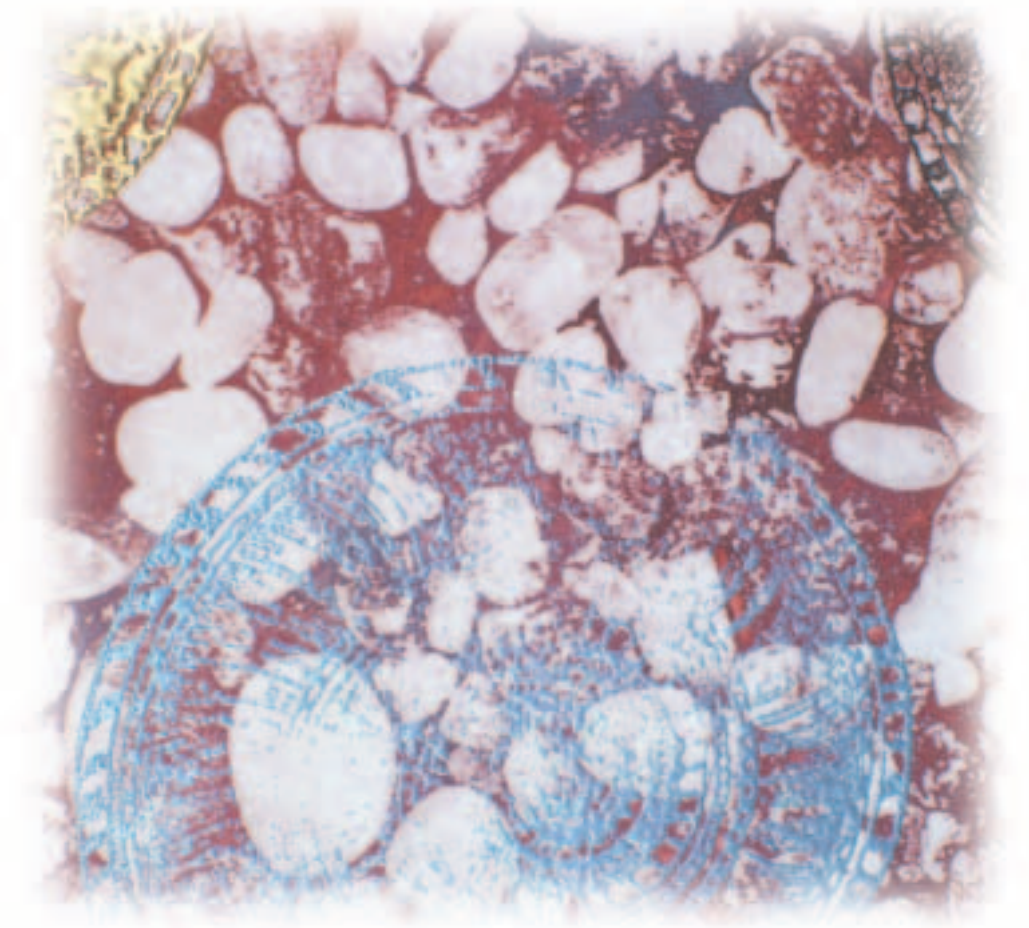
Le anemie emolitiche sono dovute ad eccessiva distruzione dei globuli rossi, che può essere dovuta o ad un difetto intrinseco ai globuli rossi stessi o a cause estrinseche. Il meccanismo patogenetico comune consente di individuarle facilmente: infatti, l'eccessiva distruzione di globuli rossi comporta un netto aumento dei reticolociti (globuli rossi giovani) ed iperbilirubinemia indiretta. Nella maggior parte dei casi l'aumentata distruzione di eritrociti è extravascolare, vale a dire ha luogo nei macrofagi del sistema reticoloendoteliale come nei soggetti normali. In alcuni casi, soprattutto di anemie emolitiche acute, l'eccessiva distruzione degli eritrociti avviene invece all'interno dei vasi sanguigni, con importanti manifestazioni cliniche.

Per quanto la causa di un'anemia possa talvolta emergere dall'anamnesi e dall'esame obiettivo del paziente, l'aiuto del laboratorio è indispensabile in ogni caso. L'approccio iniziale prevede un esame emocromocitometrico completo, il conteggio dei reticolociti e l'esame dello striscio di sangue periferico. Sono poi necessarie indagini più approfondite, quali lo studio della eritropoiesi midollare, dello stato del ferro corporeo, della composizione emoglobinica e dell'emolisi periferica per diagnosticare accuratamente un'anemia.

Prof. Mario Cazzola
Università degli Studi di Pavia - Divisione di Ematologia
IRCCS Policlinico S. Matteo - Pavia

Approccio razionale alla diagnosi di anemia

M. Cazzola
Professore di Ematologia
dell'Università di Pavia
Divisione di Ematologia
IRCCS Policlinico S. Matteo
Pavia



La diagnosi di anemia viene posta attraverso una serie di esami di laboratorio che consentono di stabilirne la gravità e la natura.

Di fondamentale importanza è, ovviamente, l'esame emocromocitometrico completo, comprendente i parametri elencati nella Tabella 1.

In questa breve nota viene presentato un approccio razionale alla diagnosi di questa condizione morbosa estremamente frequente.

Diagnosi di anemia

Nell'adulto la *diagnosi di anemia* si pone quando l'emoglobina è inferiore a 13,0 g/dL nel maschio, e a 12 g/dL nella donna. Nell'anziano, il livello di emoglobina tende a ridursi progressivamente con l'avanzare dell'età, e 12 g/dL costituisce un livello discriminante valido per entrambi i sessi. Nella donna gravida, l'emodiluizione abbassa la concentrazione di emoglobina: il limite inferiore della norma è 11 g/dL nei primi due trimestri e 10

g/dL nel terzo trimestre di gravidanza. In generale, quando la concentrazione di emoglobina è vicina al valore soglia (cosiddetto valore "borderline"), conviene ripetere nel tempo l'esame emocromocitometrico per stabilire se vi sia o meno anemia.

I tipi principali di anemia sono riportati nella Tabella 2. La classificazione adottata è strettamente collegata al procedimento diagnostico, in base al quale i parametri che hanno all'inizio maggior potere diagnostico sono l'MCV, che consente la distinzione fra anemie microcitiche e anemie normo-macrocitiche, ed il conteggio dei reticolociti, che consente la distinzione fra anemie emolitiche o emorragiche, da un lato, e anemie ipoproliferative o da eritropoiesi inefficace, dall'altro.

Le anemie microcitiche hanno un'elevata prevalenza in Italia per l'elevato numero di soggetti con β-talassemia eterozigote. Inoltre l'anemia da carenza di ferro ha una prevalenza del 10-20% in certe fasce di età, quali i bambini, le donne in età feconda e gli anziani. L'anemia delle malattie croniche è in assoluto l'anemia più frequente, ma è microcitica in una minoranza dei casi. La maggior parte delle anemie normocitiche è costituita dall'anemia delle malattie croniche e dall'anemia da insufficienza renale cronica. Fra le anemie macrocitiche, le più frequenti sono l'anemia associata ad epatopatia cronica e le anemie da carenza di folati e vitamina B12.

Tabella 1

	Maschi	*Femmine*
Emoglobina (Hb), g/dL	13,0-17,0	12,0-16,0
Ematocrito (Hct o PCV), rapporto	0,39-0,50	0,36-0,45
Eritrociti (RBC), 10^{12}/L	4,5-5,9	4,0-5,5
Volume globulare medio (MCV), fL	83-97*	
Contenuto emoglobinico globulare medio (MCH), pg	27-32	
Concentrazione emoglobinica globulare media (MCHC), g/dL	32-36	
RDW (Red cell distribution width, ovvero ampiezza della distribuzione eritrocitaria), CV %	11,5-14,5	
Reticolociti (Retic),		
%	0,4-2%	
10^9/L	20-100	
Leucociti (WBC), 10^9/L	4-11	
Piastrine (PLT), 10^9/L	150-450	

** Nella diagnosi di anemia microcitica, normocitica e macrocitica si usano cut-off di MCV più netti per avere maggior potere diagnostico: < 80 fL (anemia microcitica), 80-100 fL (anemia normocitica), > 100 fL (anemia macrocitica). Chiaramente esistono margini di incertezza nell'ambito 80-83 fL ed in quello 97-100 fL: il follow-up è indispensabile in questi casi, soprattutto se non vengono in aiuto altri dati clinici e/o di laboratorio.*

Tab 1
Valori normali di riferimento dei vari parametri dell'esame emocromocitometrico in una popolazione adulta (tra parentesi vengono riportate gli acronimi inglesi dei singoli parametri).

Procedimento diagnostico

Il procedimento diagnostico proposto è articolato su un modello di diagnosi fisiopatologica descrittiva, il cui obiettivo è quello di definire il principale meccanismo patogenetico dell'anemia, ed è integrato dalle informazioni cliniche; spesso, queste ultime consentono di arrivare alla diagnosi rapidamente, anche senza aver percorso tutto l'iter diagnostico fisiopatologico.

Stabilita la presenza dell'anemia, il primo parametro che si prende in considerazione è il volume globulare medio (MCV) che è routinariamente misurato dai contatori automatici e ha un forte potere diagnostico. Consente, infatti, di distinguere fra le anemie microcitiche, nelle quali la sintesi emoglobinica è ridotta per inadeguato apporto di ferro al midollo eritroide o per deficitaria sintesi della globina o dell'eme, e tutte le altre anemie. Non va dimenticato che l'MCV fornito dai contaglobuli è un valore medio, che come tale può essere inadeguato in particolari situazioni: conviene quindi esaminare, nei casi dubbi, la curva di distribuzione dei volumi eritrocitari.

Se l'MCV è ridotto (< 80 fL), si è di fronte ad una *anemia microcitica*. Vi è un certo margine di incertezza nell'ambito di MCV da 80 a 83 fL, per cui i pazienti con questi valori devono essere rivalutati nel tempo e riconsiderati per le diverse possibili opzioni diagnostiche.

Se l'MCV è normale (80-100 fL) o aumentato (> 100 fL), si è di fronte ad una *anemia normocitica* o *macrocitica*, rispettivamente. Sulla base del conteggio dei reticolociti si distingue fra anemie emolitiche, che hanno un numero di reticolociti adeguato per il livello di anemia in quanto il midollo eritroide è in grado di rispondere allo stimolo eritropoietinico, e le anemie ipoproliferative e da eritropoiesi inefficace, che hanno un numero di reticolociti non appropriato per il grado di anemia in quanto il midollo eritroide non è in grado di produrli adeguatamente. Non vi sono criteri universalmente accettati per definire l'adeguatezza della risposta reticolocitaria. Valori > 3% sono adeguati per il grado di anemia, mentre valori <3% e, soprattutto, al 2% sono inadeguati. In alternativa si può calcolare il numero assoluto di reticolociti: si considerano adeguati valori 150 x 10^9/L, inadeguati valori inferiori.

Anemie microcitiche

Le anemie microcitiche sono per definizione caratterizzate da un volume globulare medio (o MCV) inferiore a 80 fL. Queste anemie sono per solito anche ipocromiche, ovvero hanno un contenuto emoglobinico globulare medio

Tabella 2

Anemie microcitiche (MCV < 80 fL)

- Anemia da carenza di ferro
- Anemia delle malattie croniche
- Sindromi talassemiche
- Anemia saturnina
- Anemia sideroblastica congenita
- Emoglobina C
- Emoglobina E

Anemie normocitiche (MCV 80-100 fL) e macrocitiche (MCV >100 fL)

Anemie ipoproliferative (reticolociti < 2%)

- Anemia delle malattie croniche (incluse le neoplasie)
- Anemia da insufficienza renale cronica
- Anemia associata ad epatopatia
- Anemia associata ad endocrinopatia
- Anemia secondaria a malnutrizione
- Anemie refrattarie (sindromi mielodisplastiche)
- Anemia associata a malattia mieloproliferativa
- Anemia associata a malattia linfoproliferativa
- Anemia aplastica (compresa l'eritroblastopenia selettiva)

Anemie da eritropoiesi inefficace (reticolociti < 3%, bilirubina non coniugata ed LDH aumentate)

- Anemie megaloblastiche (carenza di vitamina B12 o folati)
- Anemie sideroblastiche acquisite
- Anemie diseritropoietiche congenite

Anemie emolitiche (reticolociti > 3%, bilirubina non coniugata ed LDH aumentate)

- Anemie immunoemolitiche
- Anemie emolitiche da disordini della membrana eritrocitaria
- Anemie emolitiche da emoglobinopatia
- Anemie emolitiche da difetti metabolici eritrocitari
- Emolisi intravascolare

Anemia emorragica (reticolociti variabilmente aumentati)

Tab 2 Principali possibilità diagnostiche di fronte ad un paziente anemico

(MCH) inferiore a 27 pg. Le anemie microcitiche sono di frequente osservazione, costituendo più della metà di tutte le anemie. Il principale meccanismo patogenetico di queste anemie è una deficitaria sintesi di emoglobina, che può essere dovuta a diverse cause. I tre tipi principali di anemia microcitica sono i seguenti:

- anemia da carenza di ferro;
- anemia dell'infiammazione o delle malattie croniche;
- sindromi talassemiche dovute a deficitaria sintesi di una o più catene globiniche.

Ai tre tipi principali di anemia microcitica vanno aggiunte forme più rare, quali l'anemia saturnina (provocata dall'inibizione della sintesi dell'eme indotta dal piombo), le anemie sideroblastiche congenite (dovute a sintesi deficitaria dell'eme) ed alcune emoglobinopatie, quali l'emoglobina C (dovuta a cristallizzazione dell'emoglobina) e l'emoglobina E (sindrome talassemica a tutti gli effetti):

Talvolta le informazioni anamnestiche consentono di orientare subito la diagnosi differenziale di anemia microcitica. Dopo aver valutato le informazioni anamnestiche, si passa alle indagini di laboratorio. Il primo passo di fronte ad un'anemia microcitica è quello di procedere ad una valutazione dello stato del ferro corporeo attraverso la determinazione di sideremia, TIBC, ferritina sierica e, eventualmente, recettore solubile della transferrina. Se la sideremia è bassa, l'anemia è verosimilmente da carenza di ferro o da malattia cronica. Mediante l'impiego combinato dei vari parametri dello stato del ferro corporeo è possibile diagnosticare la carenza di ferro. L'anemia da carenza di ferro va distinta dall'anemia dell'infiammazione o delle malattie croniche, vale a dire l'anemia associata a processi flogistici subacuti e cronici (infezioni, collagenopatie, neoplasie, etc.): siccome entrambe le condizioni sono molto frequenti, la diagnosi differenziale si pone spesso. L'anemia da malattia cronica è normocromica normocitica in circa i 2/3 dei casi, e quasi sempre nelle fasi iniziali della malattia; tende a diventare modicamente microcitica (MCV tra 70 e 80 fL) ed ipocromica con il perdurare della condizione morbosa e soprattutto nelle collagenopatie. Nell'anemia da malattia cronica i depositi corporei di ferro non sono depleti: il ferro è sequestrato prevalentemente nelle cellule reticoloendoteliali (sideropessi). Sideremia e saturazione della transferrina sono in genere basse, come accade anche nella carenza di ferro: sono la TIBC, la ferritina sierica ed il recettore solubile della transferrina i parametri che consentono la diagnosi differenziale, come indicato nella Tabella 3. L'anemia delle malattie croniche è caratterizzata da alcune modificazioni delle proteine plasmatiche, in particolare da una riduzione dell'albumina e da una elevazione delle cosiddette proteine della fase acuta, alfa-2 globuline e proteina C reattiva: il riscontro di indici della fase acuta mossi è di fondamentale importanza per la diagnosi di anemia delle malattie croniche.

È possibile che una carenza di ferro si sovrapponga ad un'anemia da malattia cronica, soprattutto nel paziente con artrite reumatoide che assume FANS e può pertanto avere uno stillicidio cronico di sangue dal tubo digerente. L'associazione di anemia da malattia cronica e carenza di ferro dà luogo ad una condizione clinica di non semplice diagnosi: gli indici della fase acuta mossi sono suggestivi di una patologia flogistica, mentre una ferritina sierica < 50 µg/L in presenza di flogosi e, soprattutto, un recettore solubile della transferrina aumentato sono parametri suggestivi di carenza di ferro (Tabella 3). Pertanto, in un paziente anemico con indici della fase acuta mossi, ferritina sierica inferiore a 50 µg/L e/o aumento del recettore solubile della transferrina, vale la pena di

Tabella 3

	TIBC (µg/dL)	*Ferritina sierica (µg/L)*	*Recettore solubile della transferrina*
Carenza di ferro	› 360	‹ 15 (M) ‹ 10 (F)	Aumentato
Infiammazione	Normale o ridotta	› 50	Normale
Infiammazione con carenza di ferro (artrite reumatoide)	Variabile	Variabile	Aumentato

Tab 3
Diagnosi differenziale fra carenza di ferro ed infiammazione

iniziare un trattamento con ferro: la somministrazione endovenosa è molto più efficace di quella orale in questi casi.

Sindromi talassemiche ed altre anemie microcitiche di più rara osservazione

Se la sideremia e gli altri parametri dello stato del ferro sono normali, e se non vi sono indici della fase acuta mossi, ci si orienta verso una sindrome talassemica. Va segnalata un'eventualità non infrequente in Italia, ovvero che ci si trovi di fronte ad un caso di anemia microcitica con sovraccarico di ferro (sideremia elevata, TIBC ridotta, ferritina sierica elevata): questi possono essere casi di *thalassemia intermedia* o minor o, più raramente, casi di *anemia sideroblastica congenita*. La diagnosi richiede sempre indagini familiari ed attento esame della morfologia eritrocitaria sullo striscio di sangue periferico. Sono inoltre necessari studi sulla composizione emoglobinica e approcci di biologia molecolare nel caso di sindrome talassemica, ed un aspirato midollare per la dimostrazione di sideroblasti ad anello nel caso di anemia sideroblastica congenita.

Se ci si orienta verso una sindrome talassemica, le indagini familiari, l'esame della morfologia eritrocitaria sullo striscio di sangue periferico ed uno studio della composizione emoglobinica del sangue periferico diventano le indagini diagnostiche più importanti.

Le sindromi talassemiche sono disordini ereditari della sintesi emoglobinica, e sono caratterizzate da riduzione o abolizione completa dalla sintesi di una o più catene globiniche. La diagnosi di sindrome talassemica che il medico italiano ha più occasioni di porre è quella di β-*talassemia eterozigote* (trait β-talassemico) (circa 1.500.000 soggetti in Italia). Il paziente tipico ha un'emoglobina ai limiti inferiori della norma o lievemente ridotta (11-13 g/dL nel maschio adulto, 10-12 g/dL nella donna adulta), netta microcitosi (MCV intorno ai 60-70 fL) ed un numero di globuli rossi mediamente superiore al normale. L'errore più frequente di fronte ad un soggetto con queste caratteristiche è di ignorare sia l'emoglobina che l'MCV, e di guardare solo al numero dei globuli rossi, e quindi di considerare l'emocromo normale. E' proprio l'individuazione della microcitosi marcata, associata a modica riduzione dell'emoglobina, che deve suggerire invece il sospetto diagnostico di trait talassemico. In questi casi, le indagini familiari dimostreranno l'ereditarietà del carattere. La resistenza osmotica eritrocitaria è aumentata, ma l'esame fondamentale è lo studio della composizione emoglobinica, che consente di dimostrare un aumento dell'emoglobina A_2 (› 3%, soglia variabile da metodo a metodo). Non tutti i casi di β-talassemia eterozigote hanno alterazioni dell'esame emocromocitometrico: esistono infatti i cosiddetti portatori o carrier silenti che hanno un emocromo normale. Anche l'emoglobina A_2 è normale in questi soggetti e solo lo studio della sintesi delle catene globiniche (rapporto β/α) o l'approccio di biologia molecolare consente la diagnosi.

Siccome la sintesi delle catene globiniche α è governata da 4 geni (due per cromosoma 16), la genetica delle α-talassemie è complessa e la diagnosi richiede elevato know-how. In generale la diagnosi di α-talassemia si articola su 3 livelli. Il primo consiste nel riconoscere una condizione di anemia microcitica ipocromica, o più semplicemente di microcitosi, attraverso un esame emocromocitometrico eseguito con contaglobuli elettronico. Il secondo consiste nell'escludere una carenza di ferro (attraverso la valutazione dello stato del ferro corporeo) ed una β-talassemia (attraverso lo studio della composizione emoglobinica). Il terzo livello è quello costituito dallo studio della biosintesi delle catene globiniche in vitro e dalle indagini molecolari.

Anemie normo-macrocitiche

Le anemie normo-macrocitiche di più frequente osservazione non sono dovute ad un disordine primitivo del midollo eritroide, ma sono secondarie a malattie sistemiche non ematologiche. Queste anemie secondarie hanno una patogenesi multifattoriale e sono spesso complicate da perdite ematiche, carenza di ferro e carenza di folati.

La più comune di queste anemie secondarie è *l'anemia delle malattie croniche*, dovuta ad eccessiva produzione di citochine quali interleuchina 1, interleuchina 6 e tumor necrosis factor, ed associata a malattie infettive croniche, malattie infiammatorie e neoplasie. L'anemia è per solito modesta (Hb › 9 g/dL), normocitica e normocromica in 2/3 dei casi, con sideremia bassa, TIBC normale o bassa e ferritina sierica normale o aumentata. Come si è già

detto, l'anemia tende ad essere microcitica nei casi di maggior gravità (con marcata iperproduzione di citochine) e di più lunga durata, e tipicamente nell'artrite reumatoide.

L'*insufficienza renale cronica* comporta anemia da produzione inadeguata di eritropoietina. L'anemia è più importante nei soggetti in trattamento dialitico che nei pazienti in fase predialitica, non solo per maggior gravità della malattia di fondo, ma anche in quanto la dialisi può comportare cause aggiuntive di anemia. La diagnosi è importante anche perchè questa anemia può essere completamente corretta con la somministrazione di eritropoietina umana ricombinante.

Le *neoplasie* possono produrre anemia non soltanto attraverso il meccanismo dell'iperproduzione di citochine (anemia delle malattie croniche), possono infiltrare direttamente il midollo osseo e possono comportare perdite di sangue. L'infiltrazione midollare è costante nel mieloma multiplo e molto frequente nei linfomi a basso grado di malignità, mentre è più rara nei tumori solidi. In alcuni casi, tipicamente nell'adenocarcinoma metastatizzato, può essere presente un'anemia emolitica microangiopatica.

Un MCV molto elevato (› 110 fL) è di per sè un parametro sufficientemente espressivo per generare ipotesi diagnostiche. Più dell'80% di tali pazienti hanno una *anemia da carenza di acido folico o di vitamina B12 (anemia megaloblastica);* altre possibili ipotesi diagnostiche sono l'anemia associata ad epatopatia alcoolica, l'effetto di farmaci antifolici o antimetaboliti (tipicamente l'idrossiurea) sul midollo eritroide, o una pesudomacrocitosi (da crioagglutinine, iperglicemia, leucocitosi). La pseudomacrocitosi da crioagglutinine viene diagnosticata eseguendo l'esame emocromocitometrico a caldo, quella da iperglicemia sostituendo il plasma con fisiologica e quella da leucocitosi analizzando la distribuzione dei volumi eritrocitari.

L'ipersegmentazione dei neutrofili è tipica delle anemie megaloblastiche: questo parametro ha un forte potere diagnostico, tanto che il riscontro su uno striscio di sangue periferico di un singolo neutrofilo con 6 o più segmentazioni nucleari deve far immediatamente pensare all'anemia megaloblastica, e quindi indurre a dosare la vitamina B12 o il livello di folati nel siero. Ovviamente, il riscontro simultaneo di macrocitosi marcata e di ipersegmentazione dei neutrofili è molto suggestivo di anemia megaloblastica.

Una volta escluse le anemie normo-macrocitiche più frequenti (anemia delle malattie croniche, anemie secondarie, anemie megaloblastiche), la diagnosi passa quasi inevitabilmente attraverso l'esame del midollo osseo, quindi attraverso l'aspirato midollare e la biopsia ossea. La *sindrome mielodisplastica* si può sospettare dalla presenza di alcune anomalie del sangue periferico (bi- o pancitopenia, degranulazione dei neutrofili, anomalia tipo Pelger-Huet, piastrine giganti).

Anemie emolitiche ed emorragiche

Il riscontro di reticolociti elevati (conteggio reticolocitario corretto › 3%, o reticolociti in valore assoluto › 150 x 10^9/L) in un paziente anemico indica che il midollo eritroide è in grado di rispondere adeguatamente allo stimolo eritropoietinico producendo un maggior numero di eritrociti. L'esistenza di un compenso eritropoietico efficace indica a sua volta che il meccanismo di anemia è periferico.

L'approccio diagnostico all'*anemia emolitica cronica* richiede tre livelli sequenziali di intervento: a) la dimostrazione della natura emolitica dell'anemia, b) l'identificazione della causa dell'emolisi ed eventualmente c) la caratterizzazione del difetto molecolare.

Esame emocromocitometrico completo, conteggio accurato dei reticolociti, esame accurato della morfologia eritrocitaria, determinazione della bilirubina e della LDH costituiscono le indagini di laboratorio di primo livello. L'esame della morfologia eritrocitaria è di fondamentale importanza, in quanto ha in talune condizioni un elevato potere diagnostico: basti pensare alle implicazioni del riscontro di schistociti, sferociti, ellissociti, stomatociti, drepanociti, acantociti o granulazioni basofile intraeritrocitarie (costanti nel deficit di pirimidin-5'-nucleotidasi). Bilirubina non coniugata e LDH sono due indicatori importanti di emolisi, anche se sono parametri scarsamente specifici.

La presenza o l'assenza di emorragie è il criterio secondo il quale si realizza la suddetta distinzione. L'emorragia esterna è facile da diagnosticare: si tratta in genere di emorragia a carico del tubo digerente, comportante ematemesi, melena o rettorragia, manifestazioni che compaiono nel giro di poche ore dopo l'evento emorragico responsabile. Vi possono essere maggiori difficoltà nel caso di emorragia interna, ma questa è per solito causata da trauma e quindi il contesto clinico. Nei casi dubbi possono essere d'aiuto la bilirubina e l'LDH, che sono elevate nell'anemia emolitica e normali nell'anemia emorragica: nel caso di emorragia interna, tuttavia, gli eritrociti stravasati vengono catabolizzati, seppur lentamente, e questo può produrre una certa elevazione dei suddetti parametri.

L'*anemia emorragica* richiede alcuni giorni (da 3 a 7) per

TABELLA 4

Esami di laboratorio di routine nella diagnosi dell'anemia

Esame emocromocitometrico completo (mediante contatore automatico) *Parametri importanti: emoglobina, MCV, leucociti e formula leucocitaria, piastrine*
Esame microscopico della morfologia eritrocitaria e più in generale dello striscio di sangue periferico: *va sempre fatto al momento della prima diagnosi.*
Conteggio accurato (automatizzato) dei reticolociti: *questo esame è troppo spesso dimenticato, mentre è di fondamentale importanza.*
Sideremia, TIBC, ferritina sierica
Bilirubina e LDH
Indici di fase acute (proteina C reattiva)

sviluppare una reticolocitosi adeguata, e quindi può rientrare anche nelle anemie normo-macrocitiche con reticolociti bassi.
In questa anemia sono prominenti i segni dell'ipovolemia e l'intervento terapeutico deve essere primariamente diretto al ripristino della volemia, attraverso la somministrazione di soluzione fisiologica o di plasma expander.

Conclusioni

La Tabella 4 riporta una batteria di esami che possono ritenersi routinari nell'approccio alla diagnosi di anemia: tali esami, non invasivi, hanno complessivamente un forte potere diagnostico e consentono di diagnosticare la maggior parte delle anemie.

Anemie emolitiche

R. Laricchia
Direttore U.O.C. Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale
Osp. Generale Regionale "F. Miulli"
Acquaviva delle Fonti (Bari)

Anemie emolitiche

Le anemie emolitiche (A.E.) sono condizioni, eterogenee sotto il profilo eziopatogenetico, caratterizzate da una riduzione della vita media dei globuli rossi (G.R.) circolanti rispetto ai normali 100-120 giorni.

La diminuita sopravvivenza delle emazie *(iperemolisi)*, comunque determinata, comporta l'attivazione di meccanismi di compenso a livello midollare, con incremento dell'attività eritropoietica fino a 7-8 volte i valori basali. Quando l'aumentata produzione di G.R. ne bilancia l'accelerata distruzione, i livelli di emoglobina restano entro i limiti della norma *(stato emolitico compensato)*. Se, invece, l'intensità del processo emolitico è tale da superare le capacità di compenso del midollo, eventualmente ridotte per la concomitante presenza di fattori che ne limitano la risposta, si determina uno stato anemico *(anemia emolitica)*[1].

Classificazione

In base ai meccanismi eziopatogenetici, le A.E. vengono classificate in forme *ereditarie*, causate da difetti intrinseci dei G.R. (che possono interessare la membrana, il corredo enzimatico, le catene globiniche) determinati geneticamente, e forme *acquisite*. Queste ultime, ad eccezione dell'emoglobinuria parossistica notturna dovuta ad una mutazione somatica della cellula staminale con produzio-

ne di un clone eritrocitario anomalo, sono causate da noxae esterne che esercitano la loro azione lesiva su emazie metabolicamente e strutturalmente normali (Tabella I) [2]. In numerose altre condizioni anemiche (associate a neoplasie diffuse, a leucemie, a linfomi, a epatopatie, a insufficienza renale, ad artrite reumatoide ecc.), generalmente a patogenesi multifattoriale, può essere presente uno stato iperemolitico, di solito evidenziabile esclusivamente mediante studi di sopravvivenza eritrocitaria e poco rilevante ai fini del determinismo dell'anemia il cui meccanismo patogenetico principale risiede nella ridotta produzione midollare di G.R. Tali situazioni vengono definite di *anemia con componente emolitica*[1].

Tabella 1

1. ANEMIE EMOLITICHE EREDITARIE

1. 1. ANEMIE EMOLITICHE DA DIFETTO DELLA MEMBRANA
- 1.1.1. sferocitosi ereditaria
- 1.1.2. ellissocitosi e piropoichilocitosi ereditarie
- 1.1.3. altre forme ereditarie (stomatocitosi, acantocitosi)

1. 2. ANEMIE EMOLITICHE DA DIFETTO ENZIMATICO
- 1.2.1. della via glicolitica di Embden-Meyerhof
- 1.2.2. dello shunt degli esoso-monofosfati

1. 3. ANEMIE EMOLITICHE DA DIFETTO DELLE CATENE GLOBINICHE
- 1.3.1. varianti emoglobiniche stabili
- 1.3.2. varianti emoglobiniche instabili

2. ANEMIE EMOLITICHE ACQUISITE

2. 1. ANEMIE EMOLITICHE AUTOIMMUNI
- 2.1.1. da anticorpi caldi
- 2.1.2. da anticorpi freddi
  - 2.1.2.1. da agglutinine fredde
  - 2.1.2.2. da emolisine bifasiche
- 2.1.3. "mixed"
- 2.1.4. con test dell'antiglobulina diretto negativo

2. 2. ANEMIE EMOLITICHE IMMUNOMEDIATE DA FARMACI
- 2.2.1. con meccanismo dell'immunocomplesso
- 2.2.2. con meccanismo dell'adsorbimento del farmaco
- 2.2.3. con meccanismo di induzione dell'autoimmunità

2. 3. ANEMIE EMOLITICHE DA ALLOANTICORPI
- 2.3.1. malattia emolitica del neonato
- 2.3.2. reazioni trasfusionali emolitiche

2. 4. EMOGLOBINURIA PAROSSISTICA NOTTURNA

2. 5. ANEMIE EMOLITICHE MECCANICHE
- 2.5.1. microangiopatiche
- 2.5.2. da traumatismo cardiaco
- 2.5.3. emoglobinuria da marcia

2. 6. ANEMIE EMOLITICHE DA AGENTI CHIMICI

2. 7. ANEMIE EMOLITICHE DA AGENTI INFETTIVI

Tab 1
Classificazione delle anemie emolitiche

Fisiopatologia dell'emolisi

Nelle A.E. la precoce distruzione dei G.R. avviene o per fagocitosi da parte dei macrofagi tessutali *(emolisi extravascolare)* oppure per lisi nel circolo sanguigno *(emolisi intravascolare).* In alcuni casi tali due differenti meccanismi possono coesistere.

L'*emolisi extravascolare* si realizza con modalità simili a quelle con cui fisiologicamente vengono rimosse a livello macrofagico le emazie senescenti, con liberazione in circolo di bilirubina indiretta (B.I.) e di ossido di carbonio (CO). Anche in tal caso, comunque, una certa quota di costituenti eritrocitari, tra cui emoglobina (Hb) e latticodeidrogenasi (LDH), viene riversata nel plasma.

L'*emolisi intravascolare* è dovuta a lisi dei G.R. in circolo, con liberazione nel plasma del contenuto eritrocitario, quindi principalmente di Hb, oltre che di enzimi, tra i quali la LDH. L'Hb nel plasma si scinde in dimeri che si legano all'aptoglobina (Hp), un'α2-globulina in grado di captare fino a 1 g di Hb/litro. Il complesso Hb-Hp viene veicolato a livello macrofagico, dove è metabolizzato con conseguente consumo di Hp. L'Hb che eccede la capacità di legame dell'Hp subisce vari destini:

- in parte viene captata come tale dai macrofagi epatici;
- in parte si ossida a metemoglobina, con distacco successivo dell'eme che si lega all'emopessina (Hx) o all'albumina (Al), mentre la globina viene agganciata dall'Hp. Tali complessi vengono trasportati a livello dei macrofagi, specie epatici, dove sono degradati, con conseguente caduta dei valori dell'Hx e dell'Hp sieriche;
- in parte viene filtrata a livello renale, riassorbita dalle cellule tubulari, fino ad una soglia massima di 0,25 g/l, e qui catabolizzata. Il ferro (Fe) eminico, legato dall'apoferritina a formare ferritina ed emosiderina, in parte è riutilizzato dall'organismo e per il resto viene perso con la desquamazione delle cellule tubulari nelle urine, dove è documentabile sotto forma di emosiderina. La quota di Hb che eccede le capacità di riassorbimento tubulare viene eliminata con le urine (emoglobinuria), nelle quali si trova in forma di ossiemoglobina, prevalente a pH alcalino, e/o metemoglobina, maggiormente presente a pH acido[1, 2, 3].

Sintomatologia

Sintomi e segni comuni alle diverse forme di A.E., variamente associati e con differente espressività in relazione al tipo e grado di anemia e alla rapidità con la quale questa si è instaurata, sono:

- astenia, facile affaticabilità, polipnea e tachicardia da sforzo, cefalea, vertigini, ronzii, disturbi visivi ecc.;
- pallore di cute e mucose, subittero o ittero, urine ipercromiche, feci ipercoliche, soffi cardiaci anorganici, ecc.

Nelle forme croniche possono riscontrarsi litiasi biliare, per formazione di calcoli bilirubinici, con colicistite cronica ed episodi di colica biliare, splenomegalia di entità variabile, talvolta epatomegalia, ulcere malleolari, cardiomegalia. Inoltre possono verificarsi episodi di aplasia midollare transitoria, eventualmente causati da infezioni da parvovirus[2].

Nelle A.E. intravascolari la sintomatologia differisce in relazione all'entità dell'emolisi, al tipo dell'A.E. e, conseguentemente, alla possibilità che vengano variamente attivati diversi sistemi (emocoagulativo, complementare, delle chinine, simpatico) che interagiscono tra loro in maniera complessa, anche per l'intervento di svariate citochine e di altre sostanze biologicamente attive. Possono essere presenti febbre preceduta da brividi, stato di malessere e di ansietà, cefalea pulsante, dolore addominale e/o lombare, urine ipercromiche (rossastre o nerastre), dolore toracico con senso di costrizione retrosternale, nausea, vomito e, nei casi più gravi, ipotensione, shock, insufficienza renale acuta, coagulazione intravascolare disseminata (CID)[3].

Diagnosi

La diagnosi di A.E. si basa sulla valutazione globale del paziente. E' necessaria, pertanto, un'approfondita *indagine anamnestica*, sia familiare (per definirne la possibile natura ereditaria), sia fisiologica (con particolare riguardo alle caratteristiche dell'alvo e della diuresi, all'alimentazione ecc.), sia patologica (che tenda a stabilirne l'età di insorgenza, talvolta rivelata da un ittero neonatale, che ricerchi i sintomi legati all'anemia e ad eventuali crisi emolitiche, valutandone i possibili fattori scatenanti, che indaghi sull'associazione di malattie infettive o autoimmunitarie ecc.). Altrettanto accurato deve essere l'*esame fisico*, mirato ad evidenziare i segni legati allo stato anemico e alle possibili complicanze. Peraltro la diagnosi definitiva può essere posta solo mediante appropriate *indagini di laboratorio*, che devono essere finalizzate a definire la natura emolitica dell'anemia e a consentirne l'inquadramento generale e, quindi, la precisa caratterizzazione.

La ***natura emolitica dell'anemia*** può essere stabilita mediante semplici esami di laboratorio che documentino lo stato iperemolitico, fornendo indicazioni circa la tipologia intra- o extravascolare, e la risposta compensatoria midollare.

I principali *indici di emolisi* correntemente valutati sono:

- l'incremento dei valori della ***bilirubina indiretta (B.I.)***. Peraltro nelle A.E., specie intravascolari, l'iperbilirubinemia non è un reperto costante e, quando presente, va posta la diagnosi differenziale con le altre condizioni nelle quali è riscontrabile;
- l'aumento dei valori della ***latticodeidrogenasi (LDH)*** sierica, in particolare degli isoenzimi 1 e 2, generalmente più evidente negli stati emolitici di tipo intravascolare. Poiché l'incremento della LDH riconosce anche altre cause, talvolta può essere necessario valutarne gli isoenzimi per stabilirne l'origine;
- la riduzione dei tassi di ***aptoglobina (Hp)*** sierica, più marcata nelle forme intravascolari. Nella valutazione di tale indice va considerato, comunque, che i livelli basali di Hp, in quanto proteina della fase acuta prodotta dal fegato, sono più elevati in varie condizioni patologiche (flogosi acute e croniche, neoplasie ecc.) e sono più bassi nella insufficienza epatica grave.

Altri indici di iperemolisi sono costituiti dall'aumentata produzione ed escrezione di ***ossido di carbonio (CO)***, dall'incremento dei livelli di ***sideremia*** e di ***ferritinemia*** (tranne che nelle A.E. con emoglobinuria) e, limitatamente alle forme con emolisi intravascolare, dall'incremento dei valori di ***emoglobinemia*** (con plasma di tonalità rosa o rossa), dalla riduzione dell'***emopessina*** sierica, dalla comparsa di ***metemalbumina*** nel plasma (che assume colore brunastro), dalla presenza di ***emoglobinuria*** (con urine di colore variante dal rosso vivo al marrone scuro a seconda della prevalenza di ossiemoglobina o di metemoglobina) e di ***emosiderinuria***[1, 2, 3].

L'*indice di compenso midollare* più semplice da determinare è costituito dalla conta dei ***reticolociti***, il cui valore correla in maniera diretta con l'eritropoiesi efficace midollare. I reticolociti possono essere espressi come percentuale dei G.R. circolanti (da rapportare al grado di anemia, mediante il calcolo dell'indice reticolocitario: I.R. = % reticolociti x Hct paziente / Hct normale) o come numero assoluto. In entrambi i casi nelle condizioni di stress eritropoietico, in considerazione del rilascio prematuro in circolo e dell'allungamento dell'emivita reticolocitari, per ottenere una stima più accurata del tasso di produzione dei G.R. tali valori vanno corretti dividendoli per 2[4]. L'assenza di reticolocitosi non esclude la diagnosi di A.E. in quanto può essere determinata dalla concomitante presenza di fattori che impediscono l'aumento compensatorio dell'attività eritropoietica, oltre a riscontrarsi nelle fasi iniziali delle A.E. ad insorgenza acuta, finché non si completa la risposta midollare[1]. D'altro canto, in presenza di un incremento del numero dei reticolociti, vanno escluse le altre possibili cause di reticolocitosi.

Nei casi di particolare stress eritropoietico nel sangue periferico possono comparire anche degli ***eritroblasti***.
Quale ulteriore indice di compenso midollare è stato proposto il dosaggio della ***creatina eritrocitaria***, presente in maggiore concentrazione nei G.R. più giovani, che correla sia con l'età media eritrocitaria sia, in ragione inversamente proporzionale, con la durata di vita media delle emazie misurata col ^{51}Cr[2].
Con l'esecuzione del *mielogramma* si può evidenziare l'iperplasia compensatoria della serie eritroide.
La dimostrazione conclusiva della ridotta sopravvivenza eritrocitaria si può ottenere mediante studi di *ferrocinetica,* tramite marcatura in vivo delle emazie con ^{59}Fe e misurazione della loro durata di vita (normalmente 100-120 giorni), o con *marcatura random in vitro* dei G.R. con ^{51}Cr e determinazione della loro emivita apparente dopo reinfusione (di norma 27-33 giorni)[5]. Le indagini basate sull'impiego di traccianti radioattivi possono essere sostituite dalla determinazione del *pattern eritropoietico* fondato sulla valutazione integrata di alcuni parametri di laboratorio, agevolmente determinabili pure in situazioni che non consentono la somministrazione di sostanze radioattive al paziente e anche più volte a breve intervallo di tempo. Tali parametri sono l'***eritropoietina*** sierica, Epo, (indice dello stimolo proliferativo cui è sottoposto il midollo eritroide), il ***recettore solubile della transferrina*** sierico, TfR-s, (misura della massa eritroide totale midollare, in quanto presente per l'80% sugli eritroblasti), il numero dei ***reticolociti*** (espressione del grado di efficacia dell'eritropoiesi stimolata dall'Epo) e l'***ematocrito*** (misura della massa eritrocitaria circolante che regola la produzione di Epo). Contemporaneamente deve essere valutato il bilancio marziale, sia perché l'attività eritropoietica è condizionata anche da un adeguato apporto di Fe sia perché le situazioni di sideropenia comportano un incremento dei livelli di TfR-s. Benché la corretta interpretazione di tali parametri ne preveda un'opportuna elaborazione matematica, il semplice riscontro di un incremento dei valori di Epo, di TfR-s e di reticolociti, va considerato espressione di A.E., quando si sia esclusa un'anemia postemorragica[6].

Posta la diagnosi generica di A.E., ulteriori indagini di laboratorio, supportate dagli elementi acquisiti con l'anamnesi e con l'esame fisico, ne consentono l'***inquadramento diagnostico*** e la ***caratterizzazione precisa***.
Un'accurata *valutazione della morfologia eritrocitaria* in strisci di sangue periferico spesso può già suggerire una diagnosi specifica o, comunque, circoscrivere le possibilità diagnostiche. La presenza di un'elevata percentuale di ellissociti è suggestiva di una ***ellissocitosi***, mentre il riscontro di ***sferociti*** è indicativo di una sferocitosi o di un'A.E. immunomediata o di una setticemia da clostridi o di una ipofosfatemia. Il rilievo di ***schistociti*** o di emazie ***"ad elmetto"*** o ***"triangolari"*** ecc. può indirizzare verso un'A.E. di tipo microangiopatico o meccanico o causata da sostanze chimiche, mentre l'evidenziazione di ***acantociti*** suggerisce una condizione di a-β-lipoproteinemia o di malassorbimento o di epatopatia cronica. ***Eritrociti a bersaglio, drepanociti, corpi di Jolly-Howell, punteggiatura basofila*** ecc. vengono variamente evidenziati nelle diverse forme di emoglobinopatia e talassemia[1, 2].
Un numero limitato di esami di laboratorio, da selezionare tra quelli riportati nella tabella II sulla base delle valutazioni clinico-laboratoristiche precedenti, è in genere sufficiente per consentire l'inquadramento diagnostico generale dell'A.E., mentre la caratterizzazione precisa della forma e la definizione approfondita dei meccanismi patogenetici che ne sono alla base richiede generalmente ulteriori specifiche indagini.

Anemie emolitiche da difetto della membrana eritrocitaria

Le A.E. ereditarie da difetto della struttura e della funzione della membrana eritrocitaria comprendono varie forme tradizionalmente raggruppate in base ai peculiari aspetti morfologici dei G.R. patologici, anche se è definitivamente accertato che ciascun gruppo così individuato include condizioni eterogenee sia sotto il profilo clinico e laboratoristico che per quanto attiene l'alterazione biochimica in causa.

TAB 2
ESAMI DI LABORATORIO PER L'INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO DELLE ANEMIE EMOLITICHE

TABELLA 2

- esame morfologico eritrocitario
- resistenze osmotiche eritrocitarie
  - a fresco
  - dopo incubazione
- test di lisi al glicerolo acidificato
- pink test
- elettroforesi e/o HPLC dell'emoglobina
- ricerca di emoglobine instabili
  - test di stabilità all'isopropanolo
  - test di stabilità al calore
  - shaking test
- ricerca di corpi inclusi eritrocitari
  - con metilvioletto, con blu brillante di cresile
  - con acetilfenilidrazina
- test dell'antiglobulina diretto
- test di Ham-Dacie
- test di lisi al saccarosio

La *membrana eritrocitaria* è costituita da un doppio strato di ***fosfolipidi***, con intercalate molecole di ***colesterolo*** non esterificato, e da varie ***proteine*** identificate mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide, dopo solubilizzazione con dodecilsolfato sodico (SDS-PAGE). Alcune di tali proteine (α- e β-spettrina, actina, ankirina, proteine 4.1, 4.2, 4.9, p55, adducina ecc.), definite ***"periferiche"*** o ***"estrinseche"***, costituiscono il citoscheletro, applicato in forma di reticolo esagonale contro la superficie interna della membrana, mentre altre (banda 3, glicoforine A, B e C, stomatina ecc.), denominate ***"integrali"*** o ***"intrinseche"***, sono situate nel suo contesto. Una serie complessa di interazioni tra le varie proteine periferiche (legami orizzontali) nonché tra i fosfolipidi o le proteine intrinseche e le proteine del citoscheletro (legami verticali) sono essenziali per mantenere l'integrità strutturale e funzionale della membrana, garantendo al G.R. la necessaria deformabilità. Mentre le proteine periferiche svolgono un ruolo eminentemente meccanico, quelle integrali hanno anche funzione di trasporto ionico (banda 3), formano canali transmembrana (acquaporine) e, nella porzione che sporge sulla superficie eritrocitaria, sono recettori (del complemento, dell'acetilcolina, di citochine, β-adrenergici ecc.), enzimi (acetilcolinesterasi, proteasi ecc.), proteine regolatorie dell'attivazione complementare (decay accelerating factor ecc.), molecole di adesione. Inoltre sia le proteine integrali sia i fosfolipidi sporgenti sulla superficie esterna della membrana, come tali o variamente glicosilati, sono portatori dei determinanti antigenici dei vari sistemi gruppoematici eritrocitari (ABO, Rh, MNSs, Duffy, P, Kidd, Kell ecc.)[2].

Sferocitosi ereditaria

Con il termine di Sferocitosi Ereditaria (HS) si indica un gruppo eterogeneo di A.E. ereditarie, dovute a varie ***mutazioni genetiche*** trasmesse come carattere autosomico dominante o recessivo, che causano alterazioni qualitative o quantitative, di differente tipo ed entità, delle diverse proteine di membrana del G.R., periferiche o integrali (anchirina e/o β-spettrina, banda 3, α-spettrina, banda 4.2). Tali anomalie determinano un ***difetto dei legami verticali del membranoscheletro***, con destabilizzazione del doppio strato lipidico e perdita di parti di membrana in forma di microvescicole. La riduzione della superficie della membrana, l'aumento della sua permeabilità al Na (con formazione di stomatociti e di sferociti) e la diminuita deformabilità delle emazie che ne conseguono provocano un'emolisi extravascolare per rimozione macrofagica che si realizza quasi esclusivamente a livello splenico, a causa dell'ostacolo meccanico rappresentato per gli sferociti poco deformabili dal tipo di microcircolo di tale organo, dell'ambiente metabolicamente sfavorevole (per una minore concentrazione di glucosio e di ATP, per un pH più basso, per una maggiore presenza di radicali liberi), e del contatto più intimo tra emazie e macrofagi che qui si verifica.

Il quadro clinico varia in relazione al tipo e alla gravità del difetto biochimico e al conseguente grado di alterazione della membrana, potendosi osservare oltre alle *forme tipiche,* con modesti anemia, ittero e splenomegalia, *forme asintomatiche o lievi,* con stato emolitico compensato, *forme gravi,* con anemia intensa, e *forme complicate* da crisi aplastiche, da crisi emolitiche, da litiasi biliare, da ulcere malleolari ecc..

La diagnosi si basa, oltre che sui dati clinico-anamnestici e sul rilievo degli indici di emolisi extravascolare e di compenso midollare, sulla evidenziazione di sferociti e di stomatociti nello striscio periferico e sull'aumento delle fragilità osmotiche eritrocitarie a fresco e dopo incubazione. Il test di lisi al glicerolo acidificato ed il pink test sono stati proposti in alternativa a quello per le resistenze globulari, mentre il test dell'autoemolisi viene raramente effettuato per la scarsa specificità. Una precisa caratterizzazione della forma e dell'anomalia biochimica che la sostiene, con eventuale documentazione del difetto genetico specifico, si può ottenere con valutazioni strutturali e funzionali delle proteine di membrana (mediante tecniche elettroforetiche e di immunoblotting, eventualmente dopo digestione triptica limitata della spettrina, tramite studi di trasporto ionico ovvero di rigidità e di fragilità della membrana ecc.) e con appropriate indagini genetiche e di biologia molecolare (studio del DNA genomico, del DNA "complementare" ecc.)[2, 7].

Ellissocitosi e piropoichilocitosi ereditarie

L'ellissocitosi (EE) e la piropoichilocitosi (PPE) ereditarie comprendono diverse forme di A.E. causate da ***mutazioni geniche,*** trasmesse come carattere dominante o recessivo, responsabili di varie anomalie delle proteine periferiche (in particolare della spettrina, ma in alcuni casi della banda 4.1), con conseguenti ***alterazioni dei legami orizzontali del membranoscheletro.***

Nella ***EE*** a causa delle alterazioni strutturali della membrana i G.R. circolanti, sollecitati dai normali stress meccanici, si deformano assumendo la caratteristica forma ovale e vengono rimossi a livello splenico.

La ***PPE*** rappresenta una variante della EE, come documentato dall'osservazione che entrambe possono compa-

rire nei membri di una stessa famiglia e possono riconoscere un difetto a carico della stessa proteina di membrana, la spettrina, che nel caso della PPE presenta delle anomalie quantitative oltre che qualitative. L'instabilità della membrana, accentuata dal calore ("piro"), ne determina la frammentazione con perdita di lipidi (micropoichilociti) e formazione di schistociti, oltre che di emazie di forma varia (poichilociti).

La sintomatologia della EE e della PPE, anche se generalmente più severa in quest'ultima, è variabile in relazione al tipo di difetto in causa ed è sovrapponibile a quella che si osserva nella HS.

La diagnosi si fonda sugli stessi principi descritti per la HS. E' patognomonico il rilievo nello striscio periferico di percentuali elevate di ellissociti nella EE ovvero di schistociti e di poichilociti nella PPE. Per la caratterizzazione molecolare della forma può essere utile il test di autoassociazione dei dimeri di spettrina[2, 7].

Altre A.E. ereditarie da difetto di membrana

Oltre alla HS, alla EE e alla PPE sono state descritte diverse altre forme di A.E. ereditarie da difetto di membrana, generalmente rare e con espressività clinica variabile in relazione al tipo e alla gravità dell'alterazione biochimica.

La stomatocitosi ereditaria comprende diverse forme di A.E., caratterizzate tutte dalla presenza di stomatociti negli strisci di sangue periferico, causate da alterazioni dello scambio cationico attraverso la membrana, con iperidratazione o disidratazione cellulare. Alcune di tali condizioni sono sostenute da anomalie delle proteine di membrana portatrici delle specificità Rh, per cui è presente un'alterata espressione dei corrispondenti antigeni (sindromi Rh null e Rh mod).

L'acantocitosi ereditaria raggruppa varie ed eterogenee sindromi (a-β-lipoproteinemia congenita, sindrome corea-acantocitosi ecc.) accomunate dalla presenza di emazie a forma di riccio o di foglia di acanto. In alcuni casi il difetto di membrana interessa strutture portatrici di determinanti antigenici eritrocitari, con conseguente loro anomala espressione (antigeni del sistema Kell, antigeni del sistema Lutheran ecc.) [2, 7].

Anemie emolitiche da difetto enzimatico

Al fine di conservare integre le proprie caratteristiche morfologiche e funzionali i G.R. devono produrre una quantità adeguata di energia da utilizzare in vari processi metabolici ATP-dipendenti (tra i quali la pompa Na/K che, estrudendo Na, impedisce l'iperidratazione cellulare) e devono mantenere allo stato ridotto il Fe emoglobinico, la globina e le proteine di membrana.

Tali esigenze vengono soddisfatte metabolizzando il glucosio attraverso due vie principali:

- la ***glicolisi aerobia di Embden-Meyerhof***, con la quale da ogni molecola di glucosio vengono ricavate due molecole di ATP, utilizzate per soddisfare il fabbisogno energetico cellulare, e due molecole di NADH, coenzima della metaemoglobina reduttasi principale che mantiene il Fe emoglobinico allo stato bivalente;
- lo ***shunt degli esoso-monofosfati***, attraverso il quale viene prodotto NADPH, coenzima sia della metaemoglobina reduttasi accessoria sia, principalmente, della glutatione reduttasi nel processo di rigenerazione del glutatione ridotto (GSH), il quale a sua volta funge da substrato per la glutatione perossidasi che neutralizza le noxae ossidative, proteggendo dall'ossidazione la globina e le proteine strutturali del G.R.

Sono state descritte diverse forme di A.E. ereditaria, la maggior parte delle quali trasmesse come carattere autosomico recessivo, determinate sia da difetti degli enzimi dello shunt degli esoso-monofosfati (riguardanti più di frequente la glucosio-6-P-deidrogenasi, raramente la glutatione sintetasi, la glutatione perossidasi, la glutatione reduttasi, la 6-P-gluconato deidrogenasi ecc.) sia da deficit enzimatici della glicolisi aerobia (in particolare della piruvato-chinasi, meno frequentemente della triosofostato isomerasi, della 2,3-difosfogliceromutasi, della glucosio-6-P-isomerasi ecc.).

Deficit di glucosio-6-fosfato-deidrogenasi

Le A.E. da deficit di glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G-6-PD) costituiscono un gruppo eterogeneo di forme dovute a svariate ***mutazioni del gene*** codificante per l'enzima posto sul cromosoma X, per cui vengono trasmesse secondo la modalità ginecoforo-diaginica, con femmine solitamente portatrici e maschi emizigoti affetti. L'enzima normale, in base alla mobilità elettroforetica più o meno rapida, viene definito di tipo A o di tipo B. Le mutazioni note sono oltre 350 e determinano ***difetti quantitativi*** (forme A- e B-) ***e/o qualitativi*** (forme A+ e B+) della G-6-PD, che può presentare ridotta stabilità in vivo, ridotta affinità per i substrati, abnorme sensibilità per l'effetto inibitore dei prodotti ecc.)

L'emolisi è determinata da ***noxae ossidanti*** (farmaci o sostanze chimiche, alimenti tipo fave, H2O2 rilasciata dai fagociti in corso di infezioni ecc.). Il difetto enzimatico determina diminuita produzione di NADPH e, conseguentemente, scarsa disponibilità di glutatione ridotto, per cui le noxae ossidative, non venendo neutralizzate, causano

ossidazione dei gruppi tiolici dell'Hb, delle proteine strutturali del G.R. e del glutatione che si complessano a costituire i disolfuri misti. Si formano in tal modo i ***corpi di Heinz***, inclusioni cellulari dislocate in posizione epilemmatica, che comportano intrappolamento delle emazie nel filtro splenico e successiva rimozione dal circolo.

La sintomatologia, come anche l'età a cui si manifesta l'emolisi, varia notevolmente in relazione alla gravità del difetto enzimatico, potendosi osservare quadri che vanno da una condizione di emolisi cronica con crisi parossistiche scatenate a distanza di ore o giorni dall'esposizione ad agenti ossidanti, a situazioni ematologiche apparentemente normali con episodi emolitici intercorrenti.

La diagnosi si basa sui dati clinico-anamnestici, sul rilievo dei consueti indici di emolisi e di compenso midollare, sulla dimostrazione dei corpi di Heinz (evidenziabili in vivo dopo lo stress ossidativo e prima della crisi emolitica o indotti in vitro mediante incubazione delle emazie con acetilfenilidrazina), sulla documentazione della sensibilità dei G.R. alle noxae ossidative (con il test di riduzione della metaHb mediante blu di metilene, con il test di stabilità del glutatione ecc.), ma soprattutto con lo studio della G-6-PD eritrocitaria, da eseguire a distanza dalla crisi emolitica. A tal fine, oltre ai test di screening, possono essere utili le indagini citochimiche che evidenziano la doppia popolazione di emazie, normale e carente, presente nelle donne eterozigoti in seguito all'inattivazione random del cromosoma X. Diagnostico è il dosaggio dell'enzima, mentre indagini più approfondite possono essere necessaire per l'identificazione delle sue varianti (elettroforesi, Km per G-6-PD e NADP, stabilità termica, pH ottimale, risposta agli inibitori ecc.). La caratterizzazione biochimica può essere affiancata o sostituita dall'analisi del DNA mediante tecniche di biologia molecolare [2, 8].

Deficit di piruvato-chinasi

Il deficit di piruvato-chinasi (PK) costituisce il difetto enzimatico meno raro della via glicolitica di Embden-Meyerhof e viene trasmesso come ***carattere autosomico recessivo.*** Il malfunzionamento di tale via metabolica comporta una ***ridotta produzione di ATP*** e, conseguentemente, uno squilibrio elettrolitico con perdita del potassio cellulare.

Alle oltre 100 mutazioni descritte fa riscontro una sintomatologia molto varia che si manifesta solo negli omozigoti. Sono presenti i caratteristici indici laboratoristici di emolisi extravascolare e di compenso midollare, mentre per la diagnosi vengono utilizzati vari test di screening, restando però conclusivo il dosaggio dell'attività dell'enzima[2].

Anemie emolitiche da emoglobinopatie

Le A.E. da emoglobinopatie sono causate da varie mutazioni che possono interessare i geni che codificano per le catene globiniche, con conseguente sintesi di globine, quindi di Hb, strutturalmente anomale.

Le emoglobinopatie vengono raggruppate in varianti emoglobiniche instabili (Hb Zurich, Hb Koeln, Hb Ferrara ecc.) e varianti emoglobiniche stabili (HbS, HbC, HbD, HbE ecc.)[9].

Anemia da emoglobine instabili

Nelle Hb instabili una sostituzione aminoacidica a vari livelli della catena globinica, determinata da una delle oltre 80 ***mutazioni*** note, comporta ***instabilità del tetramero*** che tende a denaturarsi e a ***precipitare*** all'interno del G.R., spontaneamente o in seguito all'azione di sostanze ossidanti, con conseguente ridotta deformabilità delle emazie che vengono fagocitate dai macrofagi splenici. La diagnosi, oltre che sui consueti reperti clinico-laboratoristici, si basa sulla ricerca dei corpi di Heinz, sui test di instabilità al calore e all'isopropanolo e, per la caratterizzazione della forma, su indagini elettroforetiche, di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), sull'analisi delle catene globiniche e su quella del DNA[9].

Anemia drepanocitica

La forma più frequente di A.E. causata da una variante emoglobinica stabile è l'anemia drepanocitica o falcemia, trasmessa come ***carattere autosomico recessivo***. La mutazione interessa il gene che codifica per la catena β-globinica, nella quale in posizione 6 l'acido glutammico è sostituito dalla valina, con formazione dell'HbS. In condizioni di ***deossigenazione*** le molecole di HbS si aggregano in microtubuli a formare una struttura filamentosa elicoidale, il ***tactoide***. I tactoidi costituiscono un gel che deforma progressivamente il G.R. facendogli assumere il caratteristico ***aspetto a falce***, ad un certo punto irreversibile. La falcizzazione delle emazie determina delle alterazioni progressive del metabolismo cellulare e della struttura e funzione della membrana (perdita del K e anomala distribuzione del Ca intracellulari, deplezione in ATP, alterazione dei legami tra doppio strato fosfolipidico e citoscheletro, perdita dell'asimmetria dei fosfolipidi di membrana ecc.) che ne favoriscono la precoce rimozione. Gli eritrociti irreversibilmente deformati, inoltre, danno luogo in vari distretti a ***eventi vaso-occlusivi acuti***, alla base dei quali vi sono complesse interazioni tra G.R., cellule endoteliali, piastrine e neutrofili, con il coinvolgimento di alcune molecole di adesione, di citochine e di

proteine plasmatiche.

La sintomatologia, presente negli omozigoti e nei doppi eterozigoti per l'HbS e per un'altra emoglobinopatia o la β-talassemia, è caratterizzata da emolisi cronica, complicata spesso da litiasi biliare, da ulcere malleolari, da episodi acuti vaso-occlusivi scatenati da situazioni che riducono l'ossigenazione del sangue.

La diagnosi si basa, oltre che sul quadro clinico e sul rilievo degli indici di emolisi e di compenso midollare, sulla dimostrazione di drepanociti nello striscio di sangue periferico, sul test di falcizzazione delle emazie in presenza di agenti riducenti, sull'elettroforesi e/o sull'HPLC dell'Hb. La diagnosi prenatale è possibile con tecniche di biologia molecolare su DNA fetale ottenuto mediante biopsia dei villi coriali[9].

Anemie emolitiche autoimmuni

Le A.E. autoimmuni (A.E.A.) comprendono le situazioni nelle quali la ridotta sopravvivenza dei G.R. è determinata da una condizione di autoimmunità anti-eritrocitaria.

La classificazione delle A.E.A. si basa sulle caratteristiche sierologiche delle diverse forme e sulla eventuale presenza di malattie associate, in qualche modo collegate ad esse sotto l'aspetto patogenetico (tabella III).

I meccanismi eziopatogenetici proposti per i diversi tipi di A.E.A. sono vari, essendo in causa o un disordine della immunoregolazione (indotto da stati di immunodeficienza primaria o secondaria, da virus, dall'invecchiamento, da fattori genetici predisponenti ecc.), o la presenza di antigeni (Ag) a reazione crociata o modificati, o un effetto allogenico dopo trapianto di midollo osseo oppure trasfusione di emocomponenti, o la proliferazione neoplastica di cloni B linfocitari autoreattivi.

Il ***meccanismo con cui si determina l'emolisi immunomediata*** è differente nelle diverse forme di A.E.A.. Di per sé il legame degli anticorpi (Ac) agli Ag di membrana delle emazie non è in grado di ridurne la vita media. La distruzione immunologica eritrocitaria secondaria all'interazione Ag-Ac è dovuta alla conseguente attivazione della cascata complementare e/o all'adesione dei G.R. rivestiti da immunoglobuline (Ig) e/o da frazioni del complemento (C) ai corrispondenti recettori di membrana (FcR e CR) dei macrofagi e delle cellule natural killer (NK). D'altro canto il riscontro di auto-Ac antieritrocitari non indica necessariamente una condizione di iperemolisi. Infatti la capacità dell'auto-Ac di determinare emolisi e la sede della stessa dipendono da vari fattori correlati tra di loro, quali l'isotipo e la sottoclasse anticorpale, la capacità dell'Ac di attivare il C, le caratteristiche termiche dell'Ac, l'affinità per l'Ag, il numero di siti antigenici presenti sulla membrana eritrocitaria, lo stato funzionale dei fagociti mononucleati ecc.. L'emolisi immunomediata si può determinare con 3 differenti meccanismi:

- ***emolisi intravascolare:*** causata da emolisine bifasiche, da agglutinine fredde e, meno di frequente, da Ac caldi (IgG1 e IgG3), è dovuta ad attivazione della cascata complementare fino al C9, con formazione del *"membrane attack complex"* (MAC) che produce nella membrana eritrocitaria dei pori, attraverso cui passano liberamente acqua e ioni, con conseguente lisi osmotica;
- ***emolisi extravascolare:*** è determinata dalla fagocitosi e/o frammentazione dei G.R. sensibilizzati da IgG1 e/o IgG3 e/o IgA, eventualmente associate a C, da parte dei macrofagi dotati dei corrispondenti recettori (FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcγRI, CR1, CR2, CR4). La sede della rimozione varia in relazione al tipo e all'entità della sensibilizzazione cellulare, venendo eliminate quasi esclusivamente a livello splenico le emazie con una quantità limitata di IgG adese alla membrana e a livello epatico quelle ricoperte massivamente da IgG o rivestite da IgG e C. L'esclusiva sensibilizzazione con C3b determina un temporaneo sequestro macrofagico, tramite i CR, degli eritrociti che successivamente, in seguito a degradazione del C3b a C3d, vengono rilasciati in circolo dove sopravvivono normalmente. Peraltro in presenza di uno stato di iperattività funzionale dei macrofagi, il C3b può

TABELLA 3

1. ANEMIE EMOLITICHE AUTOIMMUNI DA ANTICORPI CALDI
1.1. IDIOPATICHE
1.2. SECONDARIE
(malattie linfoproliferative, immunodeficienze, malattie autoimmuni, infezioni virali e batteriche, neoplasie, farmaci ecc.)

2. ANEMIE EMOLITICHE AUTOIMMUNI DA ANTICORPI FREDDI
2.1. DA AGGLUTININE FREDDE
2.1.1. Croniche
2.1.1.1. idiopatiche
2.1.1.2. secondarie (malattie linfoproliferative ecc.)
2.1.2. Acute (secondarie ad infezioni)
2.2. DA EMOLISINE BIFASICHE
2.2.1. Croniche
2.2.1.1. idiopatiche
2.2.1.2. secondarie (lue, malattie linfoproliferative)
2.2.2. Acute (A.E. di Donath-Landsteiner)
2.2.2.1. idiopatiche
2.2.2.2. secondarie (infezioni virali)

3. ANEMIE EMOLITICHE AUTOIMMUNI "MIXED"
3.1. DA ANTICORPI CALDI E AGGLUTININE FREDDE
3.2. DA ANTICORPI CALDI E EMOLISINE BIFASICHE

4. ANEMIE EMOLITICHE CON TEST DELL'ANTIGLOBULINA DIRETTO NEGATIVO

TAB 3
CLASSIFICAZIONE DELLE ANEMIE EMOLITICHE AUTOIMMUNI

diventare segnale sufficiente per la fagocitosi;

- ***citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC):*** i G.R. sensibilizzati da IgG1 e/o IgG3 vengono agganciati dai macrofagi o dalle cellule NK, dotati del corrispondente recettore (Fc_RIII), che ne determinano la lisi, i primi mediante esocitosi di lisozima e le seconde generando nella membrana, tramite le *perforine*, dei canali attraverso i quali passano in maniera incontrollata acqua e ioni [10].

Il quadro clinico delle A.E.A. varia in relazione al tipo dell'autoanticorpo in causa e alla presenza eventuale di una malattia associata. Le *A.E.A da auto-Ac caldi* esordiscono di solito con un'anemizzazione lenta e progressiva, accompagnata da ittero e splenomegalia, mentre le forme acute sono rare, ed hanno un'evoluzione variabile, potendo presentare un decorso transitorio o cronico, con remissioni e recidive. Le *A.E.A. da agglutinine fredde* hanno un andamento acuto e transitorio, se insorgono in corso di infezioni da *Mycoplasma pneumoniae* oppure di mononucleosi infettiva ecc., o cronico se sono idiopatiche oppure si associano a malattie linfoproliferative. In ogni caso il paziente, dopo esposizione al freddo, presenta formicolii, parestesie alle estremità, acrocianosi, ittero, talora emoglobinuria. *L'emoglobinuria parossistica a frigore (EPF)* può avere un decorso acuto o cronico. Le forme acute transitorie, raramente idiopatiche, si osservano non infrequentemente in età pediatrica in associazione ad infezioni virali. In tali casi, definiti più propriamente A.E. di Donath-Landsteiner, si rileva uno stato emolitico continuo, anziché l'insorgenza di crisi emoglobinuriche scatenate dal freddo. Le forme croniche, idiopatiche o eccezionalmente secondarie a sifilide o a malattie linfoproliferative, sono caratterizzate da periodiche crisi emolitiche emoglobinuriche causate dalle basse temperature.

La diagnosi di A.E.A., oltre che sul rilievo dei dati clinico-anamnestici e degli indici di emolisi e di compenso midollare, si basa su specifiche indagini immunoematologiche che consentono la precisa caratterizzazione della forma.

Nelle *A.E.A. da Ac caldi* sulle emazie si rileva la presenza di IgG (IgG1 e IgG3) e/o di IgA e/o di IgM e/o di C, in varia combinazione, documentabili con il test dell'antiglobulina diretto (TAD) o con altre tecniche (ELISA, RIA, immunofluorescenza, test di interazione emazie-macrofagi, test di consumo dell'antiglobulina ecc.). L'eluizione degli Ac adesi agli eritrociti consente di stabilirne l'eventuale specificità. Nel siero è frequente il riscontro di auto-Ac liberi, dimostrabili con il test dell'antiglobulina indiretto (TAI), con il test in enzimi ecc.. Degli anticorpi sierici vanno definiti l'isotipo, la specificità, il range termico, il titolo, la capacità di attivare il C in vitro. La precisa caratterizzazione del tipo di sensibilizzazione eritrocitaria e degli Ac liberi nel siero ha rilevanza clinica e prognostica, potendo fornire indicazioni circa la gravità del processo emolitico, essere predittiva della responsività della forma al trattamento terapeutico, fornire elementi valutativi relativamente all'utilità della splenectomia ecc..

Nelle *A.E.A. da agglutinine fredde* il TAD documenta la presenza di frazioni complementari adese alle emazie. Nel siero si rilevano Ac di isotipo IgM, raramente IgG o IgA, con specifità anti-I, meno frequentemente anti-i e, ancora più raramente, anti-Pr. Tali Ac presentano la massima attività a +4°C (temperatura alla quale il titolo generalmente è superiore a 1/512) ed hanno un ampio range termico, essendo ancora attivi oltre i 30°C. Nelle forme acute transitorie secondarie a fatti infettivi le IgM sono solitamente policlonali, in quanto espressione di una risposta immunitaria normale verso Ag a reazione crociata o modificati ovvero di un'attivazione policlonale di linfociti B. Nelle forme croniche, invece, sono monoclonali, generalmente IgMk, in quanto prodotti da cloni B autoreattivi normalmente silenti. In tal caso l'agglutinina fredda, se presente ad elevata concentrazione, può evidenziarsi all'elettroforesi come componente monoclonale.

Nella *E.P.F.* sui G.R. sono documentabili frazioni complementari. Nel siero, con il test di Donath-Landsteiner, si dimostra la presenza dell'emolisina bifasica (E.B.), una IgG diretta generalmente contro l'Ag eritrocitario P, la quale a bassa temperatura si lega ai G.R. iniziando l'attivazione complementare, che a freddo si ferma al C3. A temperature più elevate, mentre l'Ac si distacca dalla membrana eritrocitaria, la cascata del C prosegue fino al C9 con lisi dell'emazia ("bitermicità del complemento").

Nelle *A.E.A. "Mixed"* le indagini immunoematologiche dimostrano la presenza contemporanea di Ac "caldi" e "freddi" (generalmente agglutinine fredde, eccezionalmente E.B.).

In alcune *A.E.A. il TAD risulta negativo* a causa del basso numero di Ig adese ai G.R.. Tale scarsa sensibilizzazione eritrocitaria da parte dell'auto-Ac, talvolta, può essere favorita da una depressione dell'Ag bersaglio, per cui in tali casi l'Ac è documentabile nel siero. In altre A.E.A. con TAD negativo gli auto-Ac, adesi alle emazie ma non dimostrabili con il TAD, possono essere eluiti ed evidenziati nell'eluato con il TAI[1, 11, 12].

Anemie emolitiche immunomediate da farmaci

Numerosi farmaci possono essere responsabili di A.E. con meccanismo immunologico. Secondo una recente teoria

patogenetica unitaria, alla base delle citopenie immunomediate da farmaci vi sarebbe un'interazione tra il farmaco (o un suo metabolita) e le strutture della membrana cellulare. Tale legame, stabile o labile, potrebbe creare un "neoantigene" il quale, a sua volta, potrebbe indurre la produzione di Ac farmaco-dipendenti (di isotipo IgM o IgG) e/o di auto-Ac farmaco-indipendenti (di isotipo IgG). La capacità o meno di tali Ac di attivare il complemento condizionerebbe, poi, l'insorgenza di episodi di citolisi acuta o la rimozione delle cellule per fagocitosi o ADCC. Una stessa sostanza può determinare formazione di Ac, dipendenti o meno dal farmaco, diretti contro vari target cellulari (G.R., globuli bianchi, piastrine)[13]. Tuttavia è ancora consuetudine suddividere le A.E.A. da farmaci, sulla base di criteri patogenetici, in tre differenti gruppi:

- A.E. causate con il *"meccanismo dell'immunocomplesso o dell'astante innocente"* da farmaci che hanno il loro prototipo nella chinidina. La somministrazione di piccole dosi di sostanza a soggetti già sensibilizzati causa violente crisi emolitiche intravascolari che regrediscono rapidamente con la sospensione del farmaco. Sulle emazie si riscontra solo C, mentre nel siero l'Ac farmaco-dipendente, di classe IgM o IgG, può essere evidenziato esclusivamente aggiungendo alla miscela siero-eritrociti una soluzione contenente il farmaco;
- A.E. determinate con il *"meccanismo dell'adsorbimento del farmaco"* da farmaci il cui prototipo è la penicillina. L'A.E. di tipo extravascolare, ad andamento ingravescente, compare dopo almeno 7 giorni di terapia con dosi massive di farmaco e regredisce dopo pochi giorni dalla sua sospensione. I G.R. sono intensamente sensibilizzati da IgG. Gli Ac eluiti e quelli presenti nel siero, farmaco-dipendenti, possono essere dimostrati col TAI solo utilizzando emazie pretrattate col farmaco.
- A.E. causate mediante *"induzione di autoimmunità"* da farmaci tra i quali l'α-metildopa è quello più di frequente implicato. L'A.E., di tipo extravascolare, si instaura gradatamente dopo almeno 3-6 mesi di trattamento col farmaco e regredisce altrettanto gradualmente con la sua sospensione. Sierologicamente la forma non è distinguibile da una A.E.A. da Ac caldi, con eritrociti intensamente sensibilizzati da IgG e presenza nel siero di Ac simili, farmaco-indipendenti[1,14].

Anemie emolitiche alloimmuni

Le A.E. alloimmuni sono causate da allo-Ac anti-eritrocitari trasferiti passivamente da un soggetto ad un altro.
Oltre alle infrequenti reazioni trasfusionali emolitiche acute causate dagli Ac anti-emazie presenti negli emocomponenti contenenti plasma ABO incompatibile con G.R. del ricevente, in tale gruppo va inquadrata la ***Malattia Emolitica del Neonato (MEN).***
Nella MEN le emazie del bambino vanno incontro ad emolisi, generalmente di tipo extravascolare, per l'azione degli Ac anti-eritrocitari materni di isotipo IgG, trasferiti nel circolo fetale per passaggio transplacentare attivo. La forma più diffusa di MEN è dovuta ad incompatibilità Rh(D), con madre Rh(D)+ e figlio Rh(D)-, e può determinarsi, ma non necessariamente, se la donna si è immunizzata verso tale Ag in corso di precedenti gravidanze, aborti o trasfusioni. Meno frequenti sono la MEN da incompatibilità ABO (che può verificarsi in bambini di gruppo A o B figli di madri 0, anche in assenza di precedenti stimolazioni immunologiche) e quella da incompatibilità per altri Ag del sistema Rh o di altri sistemi eritocitari (Kell, Kidd ecc.) verso i quali vi sia stata una pregressa immunizzazione. Il quadro clinico della MEN varia notevolmente in relazione a diversi fattori (Ag in causa, titolo dell'Ac, sottoclasse dell'Ac ecc.). Alla nascita nel bambino si rilevano, oltre ai classici segni di emolisi e di compenso midollare, una positività del TAD (determinata dalle IgG adese ai G.R., la cui specificità può definita dopo averle eluite) ed una non costante presenza di Ac anti-emazie nel siero. Il TAI nella madre, invece, è sempre positivo in tutte le forme di MEN, tranne che in quelle da incompatibilità ABO, nelle quali nel siero materno può documentarsi un elevato titolo di IgG anti-A o anti-B[14].

Emoglobinuria parossistica notturna

L'emoglobinuria parossistica notturna (EPN) è un'A.E. cronica, con esacerbazioni notturne, causata da un difetto intraglobulare acquisito, associata a neutropenia e/o a piastrinopenia. E' determinata da una ***mutazione somatica*** verificatasi a carico della cellula staminale emopoietica che dà origine a dei cloni anomali (EPN+) eritrocitario e/o leucocitario e/o piastrinico. Tale mutazione, che interessa un ***gene posto sul cromosoma X***, determina un'***alterazione del sistema di ancoraggio mediato dal fosfatidil-inositolo*** (PI) comune a varie proteine di membrana di differenti linee cellulari. Diverse, pertanto, sono le strutture proteiche di membrana carenti nelle cellule EPN+: l'acetilcolinesterasi, la fosfatasi alcalina leucocitaria, la 5-ectonucleotidasi, l'FcγRIII, il *decay accelerating factor* (DAF), l'*homologous restriction factor* (HRF), il *membrane inhibitor of reactive lysis* (MIRL) ecc.. In particolare il ***deficit di proteine (DAF, HRF e, soprattutto, MIRL)*** che modulano in senso inibitorio gli effetti del complemento, espone maggiormente i G.R. EPN+ alla sua azione litica in

condizioni di attivazione sia basale (emolisi cronica) sia conseguente ad eventi che ne innescano la via classica o quella alternativa (episodi litici parossistici).

Il quadro clinico, molto vario, è caratterizzato dai segni dell'A.E., dalla possibile comparsa di complicanze trombotiche ed infettive e dalla eventuale evoluzione verso l'aplasia midollare o la leucemia acuta.

La diagnosi, oltre che sui dati clinico-anamnestici e sul rilievo degli indici di emolisi e di compenso midollare, si fonda su test che evidenziano una abnorme sensibilità dei G.R. all'azione litica del complemento. Tali esami si basano sull'attivazione complementare indotta in vitro da un abbassamento del pH (test di Ham-Dacie), da una riduzione della forza ionica (sucrose test), dall'azione di Ac freddi ecc.. L'analisi in citofluorimetria del CD59 (MIRL) eritrocitario e granulocitario o del CD55 (DAF) granulocitario, oltre a confermare la diagnosi, consente di quantificare le cellule EPN+ [14].

Anemie emolitiche meccaniche

Le A.E. meccaniche sono forme eterogenee in cui un danno traumatico dei G.R. ne determina l'emolisi intravascolare.

Nelle forme microangiopatiche primarie (porpora trombotica trombocitopenica, sindrome uremico-emolitica ecc.) o secondarie (a panarterite nodosa, a CID, a emangiomi cavernosi, a carcinomatosi diffusa ecc.) le anomalie dell'endotelio e/o la deposizione della fibrina nel lume arteriolare o precapillare determinano un danno meccanico delle emazie che, spinte dal flusso ematico contro i filamenti di fibrina, vanno incontro a frammentazione, con formazione di schistociti, cellule ad elmetto ecc. documentabili nello striscio periferico.

Le A.E. da traumatismo cardiaco sono dovute generalmente a protesi valvolari malfunzionanti o di vecchia concezione. In tal caso il danno eritrocitario è determinato dalla turbolenza del flusso sanguigno e comporta una frammentazione eitrocitaria simile a quella riscontrabile nelle A.E. microangiopatiche.

L'emoglobinuria da marcia è causata da distruzione traumatica delle emazie per schiacciamento dei vasi della pianta del piede tra l'osso e il piano d'appoggio. Nello striscio non si rilevano alterazioni morfologiche eritrocitarie.

Anemie emolitiche da agenti chimici

Le A.E. da agenti chimici sono causate da sostanze di varia natura (tossine animali o vegetali, veleni di serpenti, idrogeno arsenicale, piombo, rame, sulfoni, PAS ecc.) che aggrediscono direttamente, con meccanismo dose-dipendente, la membrana o i sistemi enzimatici di G.R. normali. In tali forme è generalmente evidenziabile la presenza di corpi di Heinz, determinati dall'azione ossidante della sostanza chimica.

Anemie emolitiche da agenti infettivi

Le A.E. da agenti infettivi possono determinarsi, con vario meccanismo, in corso di alcune infezioni batteriche o protozoarie. Ad esempio nella malaria da *Plasmodium falciparum* la lisi eritrocitaria è causata dall'invasione protozoaria, mentre la grave emolisi che si manifesta nel corso di sepsi puerperali sostenute da *Clostridium welchii* è determinata dalla tossina batterica, un'α-lecitinasi, che danneggia direttamente la membrana eritrocitaria.

BIBLIOGRAFIA

1. **Petz L.D., Garatty G.:** Acquired Immune Hemolytic Anemias. New York, Churchill Livingstone, 1980.
2. **Dacie J.:** The Haemolytic Anaemias. vol. 1 The hereditary haemolytic anaemias, Part 1, 3th ed, London, Churchill Livingstone, 1985.
3. **Mollison P.L., Engelfriet C.P., Contreras M.:** Haemolytic transfusion reactions. In Blood transfusion in clinical medicine, 10th ed., Oxford, Blackwell Science, 1997.
4. **Koepke J.F., Koepke J.A.:** Reticulocytes. Clin. Lab. Haemat., 1986; 8: 169-179.
5. **Stefanelli M., Barosi G., Cazzola M., Orlandi E.:** Quantitative assessment of erythropoiesis in haemolytic disease. Br. J. Haematol., 1980; 45: 297-308.
6. **Cazzola M., Beguin Y.:** New tool for clinical evaluation of erythron function in man. Br. J. Haematol., 1992; 80: 278-284.
7. **Tse W.T., Lux S.E.:** Red blood cell membrane disorders. Br. J. Haematol., 1999; 104: 2-13.
8. **Mason P.J.:** New insights into G6PD deficiency. Br. J. Haematol., 1996; 94: 585.
9. **Dacie J.:** The Haemolytic Anaemias. vol. 2 The hereditary haemolytic anaemias, Part 2, 3th ed, London, Churchill Livingstone, 1988.
10. **Engelfriet C.P.:** The immune destruction of red cells. Transfus. Med., 1992; 2: 1-6.
11. **Dacie J.:** The Haemolytic Anaemias, vol. 3, The autoimmune haemolytic anaemias, 3th ed, London, Churchill Livingstone, 1992.
12. **Chaplin H. (ed) Methods in Hematology:** Immune Hemolytic Anemias, vol. 12, New York, Churchill Livingstone, 1985.
13. **Mueller-Eckhardt C., Salama A.:** Drug-induced cytopenias: A unifying pathogenetic concept with special emphasis on the role of drug metabolites. Transfus. Med. Rev., 1990; 4: 69-77.
14. **Dacie J.:** The Haemolytic Anaemias. vol. 5, Drug- and chemical-induced haemolytic anaemias; Paroxysmal Nocturnal haemoglobinuria; Haemolytic disease of the newborne, 3th ed, London, Churchill Livingstone, 1999.

Problematiche nella diagnosi dei difetti molecolari del gene β-globinico

A. Giambona - F. Leto - A. Maggio
Azienda Ospedaliera
Vzo Cervello
Divisione Ematologia II
con Talassemia
Centro Regionale di Riferimento
per la Diagnosi e la Terapia Fetale
delle Emoglobinopatie
Palermo

Le β-Talassemie

Le β-talassemie sono rappresentate da un gruppo di disordini autosomici recessivi molto eterogenei con la conseguente riduzione (β^+) o totale assenza (β°) della produzione delle catene β-globiniche. Ciò determina uno sbilancio della sintesi α/non-α delle catene globiniche del tetrametro emoglobinico causando la maggiore o minore severità delle manifestazioni cliniche ed ematologiche. Sia nello stato di eterozigosi che di omozigosi di β-talassemia, il rapporto di sintesi α/non-α varia non solo in relazione al tipo di mutazione che colpisce il gene β ma anche a causa di un certo numero di altri fattori genetici. Nell'individuo normale sono presenti tre tipi di emoglobine: HbA (adulta) per il 98%, HbA_2 presente per il 2.5%, e HbF (fetale), presente in bassa percentuale < 1%.

Struttura dei geni globinici

I due cluster globinici sono presenti nel cromosoma 11 (cluster β) e nel cromosoma 16 (cluster α). Il cluster β è contenuto in un tratto di DNA di 60 Kb comprendente il gene embrionario ε attivo fino all'8° settimana di gestazione, due geni fetali $^{G}\gamma$ e $^{A}\gamma$ attivi dall'ottava settimana

di gestazione fino a 3-6 mesi dopo la nascita e i due geni adulti δ e β che si attivano man mano che si riduce l'attività dei geni γ.
Il cluster α è contenuto in un tratto di DNA di 30 Kb comprendente un gene embrionario ζ2 e i geni feto-adulti α2 ed α1, oltre alcuni pseudo geni φζ1, φα2, φα1. Tutti i geni globinici presentano tre regioni codificanti (esoni) e due regioni intercalanti (introni o IVS). Il gene β-globinico contiene 146 codoni mentre i geni α globinici contengono 141 aminoacidi. Altra caratteristica comune è la presenza di estremità 5' e 3' fiancheggianti, notevolmente importanti per la traduzione.
L'estremità 5' di tutti i geni globinici è essenziale per una efficiente trascrizione di mRNA; tale regione è composta da specifiche sequenze nucleotidiche (box).
Nel gene β globinico sono presenti le seguenti box: la sequenza ATAA (ATA box) situata a circa -30 bp dal Cap; la sequenza CCAAT (CAAT box) situata tra i nucleotidi -70 e -80 ed una terza sequenza CACC duplicata (CACC prossimale e distale) situate in posizione -90 e -86 (prossimale) e in posizione -105 e -101 (distale). L'importanza di tali sequenze, per il gene β globinico, è stata valutata in vivo dalla presenza di mutazioni puntiformi che hanno determinato una riduzione del 20-40% di sintesi di mRNA e quindi di forme di β talassemie con fenotipo lieve.
Un'altra sequenza che presenta una particolare importanza per la funzione del gene è il CAP. Tale sequenza di 50 paia di basi contiene un gruppo di 6-8 nucleotidi, subito a monte del codone di inizio, che permette la traduzione di mRNA mediante il loro legame con le subunità ribosomiali più piccole (16S rRNA). Mutazioni in tale sequenza riducono l'efficienza di traduzione degli mRNA.
La stabilizzazione e la traduzione di mRNA è permessa da una sequenza tra il codone di termine TAA e la sequenza AATAAA al 3' del gene β globinico. Inoltre, la sequenza AATAAA ha il compito di termine trascrizionale di mRNA e permette l'aggiunta della coda di Poly-A.
Al 5'del gene α globinico è presente una sequenza fiancheggiante il CAP, la ATA box, la cui funzione è permettere l'inizio della trascrizione. A - 80 basi è presente la CAAT box che determina il livello di trascrizione ed ulteriormente al 5' è presente una sequenza che lega il fattore di trascrizione SP1. I due geni α differiscono tra loro al livello del II introne e al 3' dei geni; in particolare l'α2 presenta una sostituzione di due basi e la delezione di 7 basi nella IVS2, inoltre la sostituzione di 18 basi e la delezione di 1 base al 3' di α2. Anche se gli RNA dei due geni globinici sono identici, la quantità di mRNA del gene α2 risulta circa i 2/3 maggiore rispetto al gene α1.
Sono presenti altri punti caldi "hot spot" per una corretta produzione di mRNA e tra questi le "consensus sequences" che fiancheggiano i dinucleotidi GT e AG nel sito di taglio (splicing) donatore o accettore.
L'espressione dei geni globinici viene anche controllato da altri geni o da fattori esterni. Nel cluster β è presente una regione a circa 15 Kb dal gene ε che si estende per 90 Kb conosciuta come "Locus Control Region" (LCR). La LCR comprende 5 siti principali eritroidi specifici (HS-1, HS-2, HS-3, HS-4, HS-5) che conferiscono al gene β globinico, in cis, una efficiente trascrizione ed una specificità eritroide ed ontogenetica. La LCR svolge la sua funzione regolatrice dell'espressione dei geni attraverso legami con fattori proteici di trascrizione che attivano i suoi siti specifici che mediano le sue interazioni con i promoter globinici. La teoria che oggi spiega l'interazione fra LCR e geni globinici è nota come "looping" secondo la quale si ha la formazione di un'ansa cromatinica che permette all'LCR di porsi fisicamente a contatto con il promotore del gene globinico che è nella fase attuale ontogenetica (ad es. gene γ durante il periodo fetale; gene β durante il periodo adulto). Fattori proteici si legano in sequenze particolari dell'HS che interagiscono con il complesso di inizio trascrizionale del promoter.

Quadro ematologico ed emoglobinico del β-trait

Un complesso di caratteri permettono il riconoscimento del portatore sano di β thalassemia:
1) aumento del numero dei globuli rossi per mm^3;
2) riduzione del livello di Hb di circa il 10-30%;
3) riduzione del volume corpuscolato medio (MCV) intorno a 60-70 fl;
4) riduzione del contenuto globulare medio di Hb (MCH) intorno a 20-22 pg;
5) aumento della resistenza osmotica;
6) alterata morfologia eritrocitaria con microcitosi, poichilocitosi, emazie a bersaglio, ipocromia;
7) aumento della quota di HbA_2 >3.5%;
1) rapporto α/β >1.3.

Difetti molecolari del gene β globinico

Le β talassemie sono molto eterogenee a livello molecolare. Oggi sono note 645 differenti alterazioni molecolari che colpiscono il gene β-globinico, di cui la maggiore parte è data da mutazioni puntiformi che alterano le aree critiche per la funzione del gene β globinico, come descritto sopra.
Rispetto alle mutazioni puntiformi, il gene β globinico è interessato da poche mutazioni da delezione che colpisco-

no parte o tutto il gene β globinico e parte del cluster.
Prima di iniziare la descrizione delle mutazioni che colpiscono il gene β-globinico, facciamo alcuni accenni alle fasi che portano alla produzione delle proteine.
Il DNA viene trascritto in mRNA contenente tutte le sequenze del DNA del gene β-globinico, anche quelle che non verranno tradotte. Tale mRNA, definito pre-mRNA, subisce una serie di processi che lo porteranno alla maturazione, pronto per essere letto e tradotto in proteina.
La trascrizione inizia dal CAP al 5' di β fino al 3' di β.
La maturazione comporta:

1) l'aggiunta di un residuo di 7 metilguanosina al 5' del trascritto primario (capping), permettendo l'attacco dei ribosomi a mRNA;
2) il taglio della parte terminale di pre-mRNA in corrispondenza della sequenza AATAA e l'aggiunta di una coda di acido adenilico con la funzione di stabilizzare mRNA;
3) la rimozione degli introni e la perfetta saldatura degli esoni (splicing); tale processo necessita di 2 coppie di dinucleotidi, GT al 5' degli introni, AG al 3' conosciute come siti criptici; tali nucleotidi sono estremamente importanti in quanto sono riconosciuti da enzimi di taglio e cuci che permettono di assemblare tra loro i tre esoni.

Alla fine mRNA maturo passa nel citoplasma, dove viene tradotto in proteina.

Mutazioni Puntiformi

Le mutazioni che colpiscono il gene β-globinico sono differenti: delezioni o inserzioni di singoli nucleotidi o sostituzioni di basi che alterano il processo di trascrizione, di maturazione di mRNA, di traduzione o di stabilità della molecola messaggero.
Le delezioni o le inserzioni puntiformi degli esoni determinano uno scivolamento del messaggio con l'alterazione di tutti i codoni a valle della mutazione producendo una proteina non funzionante con un arresto più o meno precoce della proteina (Frameshift). Alcune di queste mutazioni presenti ad es. in Sicilia sono: FrCd 6(-A), FrCd 5 (-CT), FrCd 8 (-AA), FrCd 44 (-C), FrCd 76 (-C).
I difetti di trascrizione da sostituzione di base interessano soprattutto il promotore determinando una riduzione della quantità di mRNA e producendo forme di β^+ talassemia più o meno lievi in relazione alla box del promotore colpita.
Sono conosciute mutazioni nella ATA box (-28, -29, -30, -31), nella CACCC prossimale (-86, -87, -88, -90, -92) o nella CACCC distale (-101).

Le mutazioni non-senso sono rappresentate da variazioni puntiformi che creano una tripletta di STOP determinando un blocco della traduzione.
Tali mutazioni sono presenti all'interno delle sequenze codificanti (esoni) producendo un fenotipo talassemico β°. La mutazione più nota interessa il codone 39, presente in Sicilia ad es. con una frequenza del 36%.
Gli introni sono interessati da molte mutazioni puntiformi che annullano o riducono un sito di splicing. Tali mutazioni possono alterare un sito normale di splicing distruggendo i dinucleotidi GT o AG oppure possono produrre un nuovo sito di splicing con la creazione di un nuovo sito criptico GT o AG.
Tra il primo gruppo sono da annoverare le mutazioni della IVS1.nt1 G>A, IVS2.nt 1 G>A, molto frequenti nella nostra regione (Vedi Tab. 1), la IVS1. nt 130.
Tra il secondo gruppo (mutazioni interne agli introni) la più comune è la IVS1. nt 110, la IVS1. nt6, la IVS1. nt 5, IVS2. nt 745 etc.
Tali mutazioni producono una β° talassemia se colpiscono i siti criptici, ed una β^+ talassemia più o meno grave se sono interessate le sequenze interne agli introni. La IVS1. nt 110 è la mutazione intronica più frequente nell'area mediterranea, è una mutazione grave che crea un nuovo sito consenso AG, 19 basi a monte della fine dell'introne. La produzione di catene di pre-mRNA anomale rappresenta circa l'80-90%, per cui il risultato è quello di una β^+ talassemia grave. Al contrario la IVS1.nt6 produce

TABELLA 1

TIPO E FREQUENZA DELLE β-MUTAZIONI IN SICILIA

(8000 chromosomes)

	%				%
Cd 39	36.0	85%	96.5%	-92	< 0.1
IVS1.nt 110	26.5			IVS1.nt 5 (C)	< 0.1
IVS1.nt 6	16.0			IVS1.nt 130(G)	< 0.1
IVS1.nt 1	9.6			IVS1.nt 116(G)	< 0.1
IVS2.nt 745	5.3			IVS1. nt 2 (G)	< 0.1
- 87 (G)	1.9			- 28 (C)	< 0.1
IVS2.nt 1	1.7			- 86 (A)	< 0.1
Fr Cd6	1.0			Cd 126 (G)	< 0.1
-101	0.6			δβ–Thal Sicil	1.2
IVS1.nt 2(A)	0.5			Hb Lepore Bost.	0.5
IVS1.nt 5(A)	0.5				
Cd 30	0.3				
Fr Cd 5	0.2				
Fr Cd 76	0.2				
Fr Cd 44	0.2				
- 87 (T)	0.1				

TAB 1

una minore percentuale di molecole di pre-mRNA anomale tanto che un soggetto omozigote IVS1.nt6/IVS1.nt6 può presentare una forma di talassemia intermedia.
Un altro gruppo di difetti del gene β-globinico che generano β^+ talassemia, spesso lieve, è rappresentato da alterazioni della sequenza AATAAA.
La trascrizione del pre-mRNA prosegue oltre tale sequenza, ma durante la maturazione dell'mRNA avviene un taglio a 22 nt a valle della sequenza AATAAA riconosciuta da un enzima specifico e l'attacco della coda di adenina per la stabilizzazione dell'mRNA. Se la sequenza è mutata, il termine della trascrizione e la poliadenilazione si verifica più a valle producendo mRNA instabili e quindi una β+ talassemia molto lieve con HbA_2 poco più alta della norma.
Mutazioni nel codone d'inizio, mutazioni nel CAP, nel codone di termine o nella nella regione 3'UTR, possono provocare difetti di traduzione di mRNA.
Le mutazioni del codone d'inizio ATG danno origine a β° talassemia, mentre una mutazione del codone di termine del gene β-globinico CAC, codone 146, dà origine ad una catena più lunga determinando forme di β+ o β° talassemia.
Interessante è la mutazione a 6 basi a valle del codone di termine C>G descritta nella popolazione greca. Tale mutazione dà origine nel soggetto ad una forma di β talassemia silente, mentre l'omozigote per tale mutazione presenta un fenotipo da eterozigote. Se tale mutazione è composta con un'altra mutazione β marcata, genera un fenotipo da talassemia intermedia.

Mutazioni delezionali

Le delezioni, in relazione alla loro estensione producono differenti fenotipi ematologico che sono conosciuti come HPFH (hereditary persistence of fetal hemoglobin), δβ-talassemia, o εγδβ-talassemia.
La HPFH in eterozigosi è caratterizzata da un livello di HbF tra il 15 e il 25%, HbA2 normale o ridotta, indici eritrocitari normali e rapporto globinosintetico α/β bilanciato.
La δβ-thalassemia allo stato eterozigote ha un range di HbF del 5-15%, normale o ridotta HbA2, ipocromia, microcitosi e sbilancio del rapporto α/β (>1).
Delezioni di tutto il cluster β portano ad un fenotipo ematologico di γδβ-thalassemia caratterizzato da microcitosi, ipocromia, normale livello di HbF, normale o ridotto valore di HbA2 e sbilancio del rapporto α/β (>1).
Sembra che tale fenotipo possa essere prodotto anche dalla delezione dei siti ipersensibili HS2, HS-3 ed HS-4 del β LCR (Locus Control region).

Analisi dello stato di portatore sano di β-talassemia

La β-talassemia è causata da uno squilibrio globinosintetico α/β, in cui la quantità di β-globina è ridotta in percentuale dovuta al tipo di mutazione presente.

Ciò che è rilevato nel portatore sano di β talassemia è principalmente l'effetto microcitemico con l'aumento del valore dell'HbA2.

Lo studio del portatore sano si svolge attraverso una serie di tappe che devono partire da un ottimo esame emocromocitometrico completo, eseguito su un contaglobuli automatizzato seguito dalla determinazione del valore dell'HbA2 con apparecchiatura HPLC di provata affidabilità, e dall'esame elettroforetico dell'Hb. L'analisi della sideremia e della ferritina sono spesso necessari e per escludere anemie sideropeniche. Quando con questi esami non si raggiunge una diagnosi certa, si passa ad una seconda fase con la sintesi delle catene globiniche in vitro e successivamente all'analisi molecolare dei geni β, α, δ globinici.

β-Thalassemia eterozigote con indici eritrocitari normali

Sono causate, spesso, dalla co-eredità tra una mutazione β-talassemica in eterozigosi ed una α-talassemia in cui sono coinvolti due geni (delezione o mutazioni puntiformi α°). In tale forma, il volume corpuscolare ed il contenuto emoglobinico per cellula possono rientrare in un range di normalità. Di contro, la co-eredità del gene α–triplicato con un gene eterozigote β-thal, può determinare una manifestazione clinica più marcata con un fenotipo tra la talassemia intermedia e il semplice stato di portatore di β-talassemia.

L'implicazione pratica per lo screening è l'analisi molecolare dei geni β e dei geni α, soprattutto in una popolazione come quella siciliana dotata di grande eterogeneità e presenza di mutazioni nei due clusters.

β-Thalassemia eterozigote con normale livello di HbA2 (β-Thalassemia silente)

Un altro gruppo di β talassemia eterozigote è caratterizzato da lieve o assenza di microcitemia con valori di HbA2 normali. Le cause molecolari che possono spiegare tali forme di β talassemia sono piuttosto eterogenee. Studi recenti hanno mostrato che incrementi lievi dei livelli di HbA2 possono essere in relazione al tipo di β-mutazione presente. Alcune di tali mutazioni possono essere: -101 C>T, - 92 C>T, CAP + 45 G>T, CAP +1 A>C, IVS2.nt844 C>G. Comunque, molti casi di β-thal con HbA2 normale possono risultare dalla presenza delle doppie eterozigosità per δ e β talassemia lieve.

β-Thalassemia con alti livelli di HbA2

Il valore di HbA2 nello stato eterozigote varia tra il 3.5 ed il 5.5%, raramente superando il 6%. Sono stati riscontrati dei casi il cui valore di HbA2 era particolarmente alto, oltre 6.5%, spesso associato con un aumento di HbF. Le basi molecolari, in questi casi, sono spesso legati a delezioni che rimuovono il promotore del gene β globinico incluse la box TATA e la box CACCC. Tale fenomeno si spiega con l'annullamento della competizione del gene β globinico per l'LCR ed un miglioramento dell'interazione dell'LCR con i geni δ e γ in cis, aumentandone l'espressione.

β–Thalassemia dominante

Il portatore sano eterozigote si presenta clinicamente asintomatico. Sono state osservate delle forme presenti in eterozigosi con un fenotipo β-thalassemico piuttosto marcato legate alla presenza di emoglobine iper-instabili, definite anche come talassemia dominante. A livello molecolare sono presenti quattro categorie di alterazioni: sostituzione di una singola base, delezione di un codone intero, β catene troncate o allungate. La maggiore parte delle Hb iper-instabili, risultano da un termine prematuro della traduzione causato da mutazioni nel terzo esone determina una catena β-globinica troncata. Se la mutazione che porta ad una prematura interruzione della traduzione di mRNA cade nel 1° o nel 2° esone, non determina produzione di frammenti di catene β-globiniche tali da determinare forme cliniche importanti. Essendo queste emoglobine particolarmente instabili è molto difficile identificarle con metodi cromatografici o elettroforetici ed è per questo che molte volte si è costretti a ricorrere all'analisi della sequenza nucleotidica. La continua degradazione di tali Hb iper-instabili porta ad un aumento dell'attività proteolitica nei globuli rossi.

Questo determina un accumulo ed una precipitazione delle catene α-globiniche, in grado maggiore a quanto si osserva nel semplice stato di portatore di β- thalassemia.

Analisi Molecolari per lo studio del gene β-globinico

La patologia molecolare dei geni β-globinici è oramai perfettamente chiarita.

La maggior parte dei difetti responsabili della β-talassemia sono dovuti a mutazioni puntiformi come la sostituzione, l'inserzione o la delezione di basi. Di rado il gene

β-globinico è interessato da delezioni più o meno ampie. Oggi sono state descritte oltre 650 mutazioni nel mondo, per cui la talassemia è una patologia molto eterogenea a livello molecolare.
Per fortuna tale eterogeneità è limitata all'interno di una singola popolazione ove un numero ristretto di mutazioni possono essere riscontrate.
In Sicilia, per esempio sono presenti 27 mutazioni che rappresentano il 99.5% delle mutazioni puntiformi riscontrabili. Di queste, l'85% sono rappresentate da quattro mutazioni: Cd 39, IVS1.nt110, IVS1.nt1, IVS1.nt6.
Per lo screening molecolare dei soggetti portatori sani di β-talassemia e per i malati sono state messe a punto delle tecniche basate principalmente sull'amplificazione del DNA (come punto di partenza) e l'analisi dei frammenti amplificati.
I metodi di analisi possono essere distinti in due gruppi: analisi indiretta o analisi diretta. Con il primo metodo si può identificare uno o più tratti di DNA ove è presente una mutazione; l'analisi dovrà essere completata con i metodi diretti per la identificazione della specifica mutazione.
Il metodo indiretto più utilizzato è il DGGE (Elettroforesi su gradiente di gel denaturante).
Questa tecnica si basa su una migrazione elettroforetica su gel di poliacrilamide con gradiente di sostanze denaturanti (formamide ed urea), nella quale i frammenti amplificati riducono la velocità di corsa quando raggiungono una concentrazione di gel denaturante corrispondente alla loro temperatura più bassa di denaturazione (Tm: temperatura di melting). Questa temperatura è specifica per ogni segmento di DNA e dipende dalla sua composizione nucleotidica. Poiché ad ogni mutazione corrisponde un pattern elettroforetico caratteristico, è possibile individuare un frammento contenente una mutazione attraverso il confronto del pattern del soggetto esaminato con quello di altri campioni noti. Il DGGE è utile per l'identificazione di frammenti contenenti mutazioni sconosciute. Il frammento identificato dovrà successivamente essere sequenziato.
Diversi sono i metodi per la identificazione diretta delle mutazioni.
Ogni laboratorio, in relazione alla propria esperienza, opera con uno o più metodi.
Tra i metodi diretti possiamo elencare:
1) Digestione Enzimatica.
2) Uso di ASO Probes: Reverse Dot Blot e Dot blot.
3) Gap-PCR
4) ARMS
5) Sequencing.

Digestione Enzimatica
E' la tecnica più conosciuta ed utilizzata per l'analisi del DNA. Un enzima di restrizione riconosce una specifica sequenza, per cui una sostituzione nucleotidica determina una variazione del pattern normale dei frammenti normali. La variazione di una base può annullare un sito di restrizione normalmente presente o può creare un sito di restrizione nuovo.
Trattando uno specifico frammento di DNA amplificato con un enzima di restrizione e dopo valutazione dei frammenti con metodi elettroforetici (gel d'agar o poliacrilamide) sarà possibile riconoscere se è presente o meno una mutazione.

ASO Probes
Gli ASO Probes sono delle piccole sonde (15-25 basi) che vengono utilizzate per analizzare specifiche mutazioni del gene β-globinico mediante una reazione di ibridazione specifica tra la sonda e il DNA.
Sono conosciuti due sistemi che utilizzano gli ASO Probes, il Dot Blot ed il Reverse Dot Blot. Il principio di base è sempre lo stesso, cioè l'ibridazione specifica tra il frammento di DNA contenente la mutazione e la sonda.
Nel Dot Blot il campione amplificato viene denaturato e deposto su un filtro di nylon, quindi ibridato con una sonda specifica contenente la sequenza mutata ed una sonda normale per distinguere l'eventuale eterozigote per la mutazione dall'omozigote.
Questo metodo, insieme al metodo della digestione enzimatica, è stato quello più largamente utilizzato per l'analisi dei geni globinici.
Il Reverse Dot Blot, al contrario, consiste nel legare al filtro di nylon diverse sonde nucleotidiche (normali e mutate) ed ibridare uno di questi filtri con un campione di DNA amplificato. In tal modo è possibile fare uno screening di mutazioni con il campione in esame. I vantaggi del reverse dot blot (RDB) rispetto al dot blot (DB) sono: l'RDB non è radioattivo, permette lo screening di molte mutazioni (da 1 a 50 e più mutazioni) in poche ore di lavoro, è poco costoso. Al contrario il DB è un metodo che fa uso di radioattivo, è costoso e permette l'analisi di una sola mutazione al giorno.

GAP-PCR
E' il sistema che viene utilizzato per l'analisi di geni deleti o ricombinati come per la δβ-siciliana o l'Hb lepore. Tale sistema viene molto utilizzato per l'analisi delle delezioni dei geni α globinici.
In questa tecnica si utilizzano per la PCR una coppia di

primers complementari alle sequenze a monte e a valle della delezione. In presenza della delezione si otterrà un prodotto di ampiezza pari a quella ottenuta dal segmento compreso fra il 5' e il 3' meno la lunghezza del frammento deleto. Se non c'è stata alcuna delezione non si ottiene alcun prodotto di amplificazione.

ARMS (Amplification Refractory Mutation System)

E' la tecnica utilizzata in molti laboratori per l'analisi di mutazioni del gene β-globinico per la sua semplicità e rapidità d'analisi.

Si basa sull'utilizzo di una reazione di PCR selettiva per ogni mutazione in esame e sulla migrazione dell'eventuale frammento amplificato su gel d'agar. In particolari condizioni di PCR, primers con una base mutata all'estremità 3' non funzionano nella PCR se la sequenza è normale, mentre si ottiene un prodotto di PCR se la sequenza del DNA in esame è mutata ed è complementare alla base al 3' del primer.

Se l'amplificazione avviene sia con il primer normale che con quello mutato il soggetto è un portatore sano della mutazione, mentre se l'amplificazione avviene solo con uno dei due primer, il soggetto è omozigote per la sequenza normale o mutata in quel determinato tratto di DNA. Questo metodo è rapido, non richiede radioattivo ed è applicabile a qualsiasi mutazione.

SEQUENCING

E' la tecnica che viene utilizzata per le identificazioni di mutazioni nuove o non presenti in pannelli di mutazioni studiate con altri metodi. In genere possono essere seguite due strategie:

a) utilizzare il DGGE, identificare il frammento coinvolto per la possibile presenza di una mutazione e successivamente sottoporre tale frammento ad un'analisi di sequenza;

b) analizzare il DNA direttamente mediante sequenziamento senza usare il DGGE.

La tecnica di Sanger è quella oggi adottata nella maggiore parte delle metodiche di sequenza. Questa tecnica consiste in reazioni di estensione nelle quali si utilizzano 4 terminatori (dideossinucleotidi) dell'allungamento della catena nucleotidica.

I prodotti che si ottengono differiscono tra di loro per una sola base. Tali frammenti vengono separati in funzione della loro lunghezza tramite elettroforesi e loro lettura dopo rivelazione con apparecchiature specifiche.

La reazione di sequenza può essere manuale utilizzando radioattivo e lastra autoradiografiche, oppure automatica mediante reazione di PCR, reazione di sequenza e separazione con gel di poliacrilamide o con apparecchiature a capillare.

BIBLIOGRAFIA

1. **Weatherall D J, Clegg J B.** The thalassemia syndromes. Blackwell Scient Publ. 3 th edition 1981.
2. **Bunn H F, Forget B G.** Hemoglobin: molecular genetic and clinical aspects. Philadelphia, W B Saunders, 1986
3. **http://globin.cse.psu.edu**
4. **Bianco Silvestroni I.** Le Talassemie un problema medico sociale ieri e oggi. Istituto italiano di Medicina sociale Editore Roma 1998
5. **Lynch JR, Brown JM.** The polymerase chain reaction: current and future applications. J. Med. Genet 1990; 27:2
6. **Saiki RK, Walsh PS, et al.** Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence specific oligonucleotide probes. PNAS USA 1989; 86:6230.
7. **Giambona A, Lo Gioco P, Marino M et al.** The great heterogeneity of thalassemia molecular defects in Sicily. Human Genetics 1995; 95:526.
8. **Newton CR, Heptinstall LE.** Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. Lancet 1989; ii: 1481.
9. **Fischer SG, Lerman LS.** DNA fragments differing by simple base pair substitution are separate in denaturant gradient gels: Correspondence with melting theory. PNAS USA 1983; 80: 1579.
10. **Sanger F, Nicklen S, Couson AR.** DNA sequencing with chain terminatine inhibitors. PNAS USA 1977; 74: 5463.
11. **Maggio A, Giambona A, Cai SP, Wall J, Kan YW, Chehab FF.** Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean β-thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. Blood 1993; 81:239.

Anemia da carenza di folati e vitamina B12

D. Scribano
Dirigente di I Livello
Laboratorio di Chimica Clinica
Policlinico Gemelli - Roma

La carenza di acido folico e di vitamina B12 determina una forma di anemia megaloblastica caratterizzata da macrocitosi. La vitamina B12 e i folati sono composti che svolgono un ruolo fondamentale e interdipendente nella sintesi degli acidi nucleici, pertanto la loro carenza provoca alterazioni in tutti i tessuti ad alto turn-over cellulare. Nel midollo osseo gli eritroblasti, precursori degli eritrociti maturi, subiscono una trasformazione megaloblastica (fig.1) non potendo completare in maniera sincrona la maturazione del nucleo e quella del citoplasma, e diventano pertanto più grandi del normale. Di conseguenza si verifica un'eritropoiesi inefficace con rilascio in circolo di macro-megalociti, che clinicamente si manifesta con un quadro di anemia ingravescente. La severità dell'anemia ed il grado della macrocitosi dipendono dall'entità e dalla durata della carenza vitaminica.

Cause di anemia megaloblastica

1. Cause nutrizionali

Deficit di Vitamina B12 Veganismo, alimentazione insuffi-

ciente

Deficit di Folati - Apporto alimentare inadeguato, età avanzata, condizioni economiche disagiate, latte di capra

2. Malassorbimento

Cause gastriche di deficit di Vitamina B12: anemia perniciosa, deficit congenito di fattore intrinseco, gastrectomia

Cause intestinali di deficit di Vitamina B12: sindrome dell'ansa cieca, malassorbimento selettivo, resezione ileale

Cause intestinali di deficit di folati: morbo celiaco, sprue tropicale

3. Aumentato turnover cellulare

Deficit di folati: gravidanza, prematurità, anemia emolitica cronica (ad es. l'anemia a cellule falciformi), malattie infiammatorie, tumori

4. Perdite renali

Deficit di folati: scompenso cardiaco congestizio, dialisi

5. Farmaci

Deficit di folati: antiepilettici, sulphasalazine

6. Anomalie metaboliche

deficienza congenita di transcobalamina II (TCII)

7. Altre cause di macrocitosi

- Alcool
- Malattie epatiche
- Ipotiroidismo
- Reticolocitosi
- Anemia aplastica
- Mielodisplasia
- Farmaci citotossici
- Paraproteinemie (come il mieloma)
- Gravidanza
- Periodo neonatale

Queste condizioni sono in genere caratterizzate da midollo normoblastico con presenza di reticolocitosi.

Vitamina B12

Struttura

Il termine generico di vitamina B12 si riferisce ad un gruppo di sostanze fisiologicamente attive classificate da un punto di vista chimico come cobalamine o corrinoidi. Sono composte da un anello tetrapirrolico che circonda un atomo centrale di cobalto, da una catena laterale costituita dal nucleoside del 5,6 dimetilbenzimidazolo legato al cobalto e da un ligando organico. L'anello tetrapirrolico, escluso il cobalto e le catene laterali, è chiamato corrina e tutti i composti contenenti questo nucleo sono indicati come corrinoidi. Il complesso cobalto-corrina prende il nome di cobamide. In natura le cobalamine differiscono per i gruppi addizionali legati al cobalto:

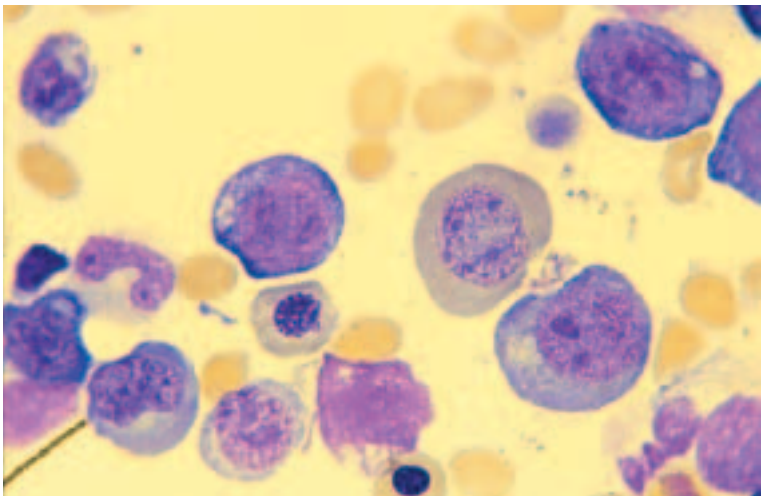
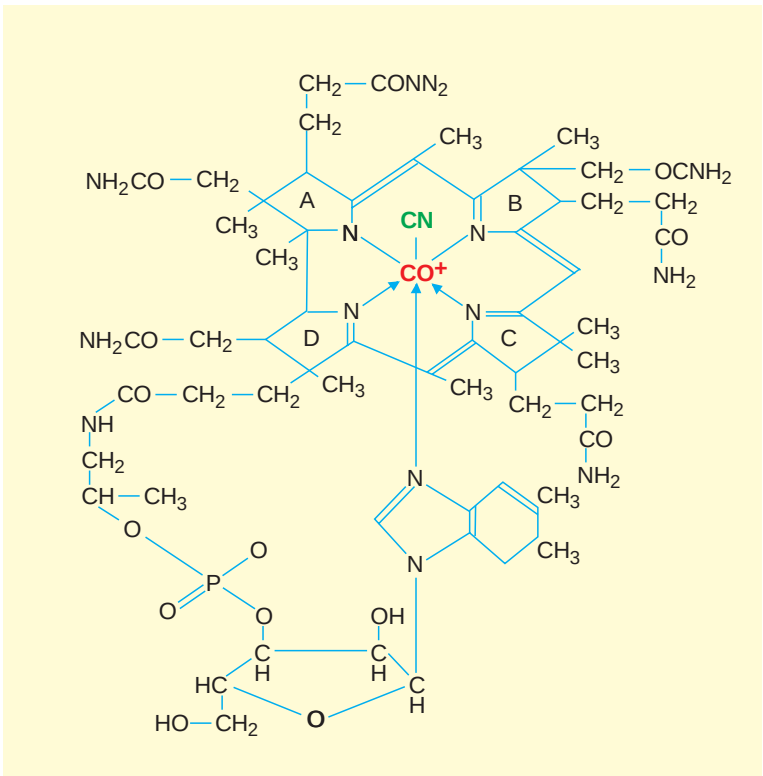


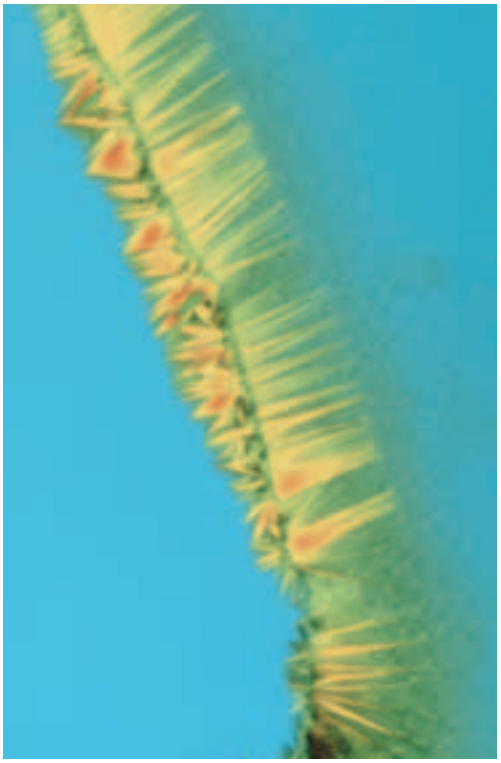
Fig. 1: midollo con cellule megaloblastiche

gruppi metilici (metil-cobalamina), 5'-deossiadenosina (deossiadenosil-cobalamina o coenzima B12), gruppi idrossilici (idrossicobalamina o vitamina B12), o cianuro (cianocobalamina o vitamina B12). La cianocobalamina è un composto stabile ed è il composto di riferimento per la misura della concentrazione di cobalamina nel siero. Le cobalamine sieriche sono poco stabili e devono essere convertite in cianocobalamine per essere misurate.

In ogni caso il termine di vitamina B12 viene usata per descrivere tutti i corrinoidi che esibiscono l'attività biolo-

Fig. 2: struttura chimica della vitamina B12





gica della cianocobalamina.
Tre sono le forme naturali di cobalamina: metil, idrossi e adenosilcobalamina.

Sorgenti alimentari e fabbisogno giornaliero

Tutti i prodotti animali sono ricchissimi di vitamina B12, soprattutto il fegato e la carne rossa, ma anche il pesce e il latte: le verdure non contengono invece quantità importanti, a meno che non siano contaminate da alghe o batteri.
L'apporto di vitamina B12 nella dieta occidentale (5-15 ug/giorno) è più che sufficiente a coprire il fabbisogno giornaliero di 2 ug/die. Per cui, ad eccezione dei vegetariani stretti (vegaliani), la carenza di B12 è la spia di un problema di assorbimento. La riserva corporea di B12 è notevole, e il tempo richiesto per evidenziare un deficit è di circa 2-5 anni anche in presenza di un grave malassorbimento. I livelli sierici di vitamina B12 sono 200-835 pg/ml.

Assorbimento e trasporto

L'assorbimento della vitamina B12 avviene tramite diverse fasi:

- rilascio di B12 dagli alimenti nello stomaco, ad opera della pepsina e dell'acidità gastrica;
- legame della B12 alle glicoproteine salivari, le cobalofiline, dette anche aptocorrine o proteine leganti R;
- distacco di B12 dalle cobalofiline per opera del succo pancreatico;
- legame di B12 al fattore intrinseco (FI), prodotto dalle cellule parietali del fondo e del corpo dello stomaco, la cui secrezione è sotto il controllo vagale; il FI prodotto giornalmente può legare 40-80 µg di B12;
- la vitamina B12 è assorbita a livello dell'ileo; il complesso FI-B12 si lega agli enterociti a pH 6.4-8.4 in presenza di ioni Ca^{2+} e viene internalizzato; la B12 rilasciata dal complesso si lega alla transcobalamina II (TC-II, la più importante proteina di trasporto), oppure ad aptocorrine sieriche, TCI e TCIII;
- la vitamina B12 viene poi captata da cobalofiline biliari, riversata nel duodeno e riassorbita nel circolo entero-epatico.

Le proteine di trasporto, oltre al FI, sono le tre transcobalamine (TCI, TCII, TCIII).
La TCI o Rapid Protein (R) è presente in diversi liquidi biologici e può determinare falsi aumenti della concentrazione sierica di vitamina B12, in quanto lega sia la forma biologicamente attiva sia analoghi non attivi.
La TCII trasporta la forma biologicamente attiva della B12 ai recettori cellulari.
La TCIII è prodotta dai granulociti; nei pazienti affetti da leucemia mieloide cronica si osservano valori falsamente aumentati di Vitamina B12.

Acido folico

Struttura

L'acido folico è una vitamina del gruppo B, costituita da tre componenti: pteridina, acido p-aminobenzoico ed acido glutammico (Fig 3). L'apporto alimentare di acido folico è essenziale perché l'organismo umano non è in grado di sintetizzare p-aminobenzoico o di attaccare il glutammato alla pteridina. L'acido folico funge da accettore-donatore di unità monocarboniose, fondamentali nella reazione di sintesi della glicina, della metionina e di purine e pirimidine.

Sorgenti alimentari e fabbisogno giornaliero

Alimenti ricchi di folato sono soprattutto i vegetali a foglie verdi, ma anche il lievito, il fegato, i reni, i cereali e il latte. Tuttavia con la cottura si distrugge circa il 50-95% dei folati contenuti negli alimenti.
L'apporto giornaliero (circa 227 pgr/die, in genere sotto forma di poliglutammato) copre ampiamente il fabbisogno (circa 50 pgr/die). A differenza della vitamina B12, le

scorte di folati (5-10 mg) sono scarse rispetto alla richiesta quotidiana, per cui stati carenziali possono insorgere più rapidamente.

Assorbimento e trasporto

L'assorbimento dei folati avviene nel digiuno sotto forma di poliglutammati. Questi vengono idrolizzati dagli enzimi intestinali, e assorbiti nel digiuno come monoglutammati. Nella cellula intestinale la diidrofolato redattasi riduce l'acido folico a diidrofolico e a tetraidrofolico. Dopo l'assorbimento i folati sono trasportati al fegato che li accumula e li distribuisce ai tessuti. La captazione da parte delle cellule del folato circolante è facilitata da meccanismi di trasporto e da un recettore dei folati. Nella cellula il folato viene di nuovo trasformato a poliglutammato e viene utilizzato nel metabolismo delle purine e pirimidine e nella sintesi del DNA.

In situazioni di carenza di acido folico, i depositi epatici sono mobilitati. Gli eritrociti maturi contengono folati in quantità strettamente correlata al pool depositato nel fegato.

I livelli di folato sierico variano da 6 a 20 ng/ml, quelli dei globuli rossi da 160-640 ng/ml.

Livelli sierici inferiori a 4 ng/ml ed eritrocitari inferiori a 140 ng/ml, sono indicativi di carenza di folati.

Lesione biochimica nelle anemie megaloblastiche

La Vitamina B12 nelle sue forme attive interviene in due importanti reazioni biochimiche:

1) come deossiadenosil-cobalamina, interviene nella trasformazione del metilmalonilCoA in succinilCoA;

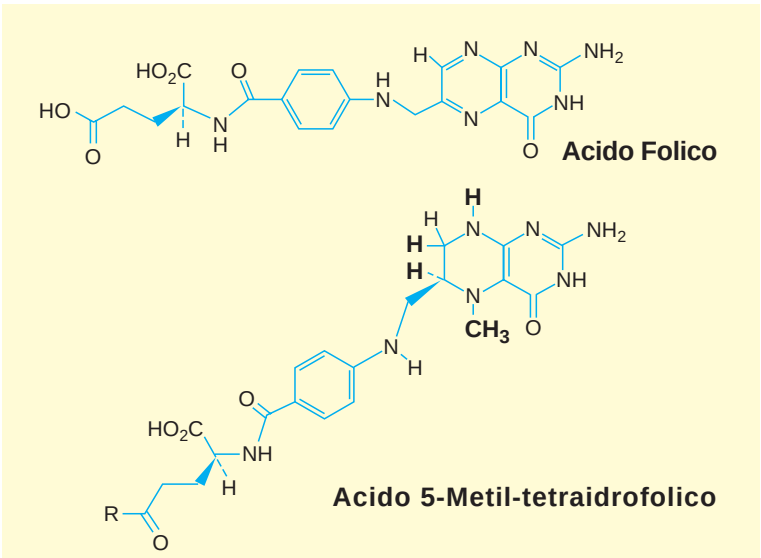


Fig. 3: **STRUTTURA CHIMICA DELL'ACIDO FOLICO E DELL'ACIDO 5-METIL-TETRAIDROFOLICO**

ne deriva che un deficit di cobalamina determina un aumento del metilmalonilCoA e del suo prodotto di idrolisi l'acido metilmalonico (MMA) nelle urine;

2) come metil-cobalamina, interviene nella reazione di metilazione dell'omocisteina a metionina, con formazione finale di S-adenosil-metionina (SAM).

Quest'ultima reazione rappresenta il punto di contatto tra la via metabolica del folato e quella della vitamina B12 (Fig. 4); la cobalamina accetta infatti il gruppo metilico dal N-5-metil-tetraidrofolato, che si trasforma in tetraidrofolato: inoltre il prodotto finale della reazione, l'adenosil-metionina (SAM), controlla con un meccanismo di feed-back negativo la disponibilità di metil-tetraidrofolato, bloccando la sua formazione dal metilen-tetraidrofolato.

Il SAM produce inoltre vari composti metilati che intervengono come donatori di formiato, necessario per le trasformazioni:

tetraidrofolato --> metilen-tetraidrofolato

tetraidrofolato --> formil-tetraidrofolato --> folato-poliglutamato

In caso di carenza di vitamina B12, viene bloccata la formazione di tetraidrofolato: il folato rimane "intrappolato" sotto forma di metil-tetraidrofolato ed è metabolicamente inattivo. A livello cellulare si realizza una deplezione di metilen-tetraidrofolato, che blocca la sintesi di acido timidilico secondo la reazione:

timidilico-sintetasi

deossi-uridil-monofosfato <----------> timidil-monofosfa

metilen-tetraidrofolato

Viene anche bloccata la sintesi ex novo di nucleotidi purinici, normalmente catalizzata dal formil-tetraidrofolato.

La conseguenza diretta di questo blocco metabolico è il ritardo maturativo del nucleo cellulare ed insorgenza di anemia megaloblastica. In caso di carenza di vitamina B12, la concentrazione di folato nel siero può essere abnormemente elevata per l'accumulo di metil-tetraidrofolato, a fronte di una concentrazione intraeritrocitaria diminuita per l'insufficiente sintesi di poliglutamati metabolicamente attivi.

La ridotta sintesi di SAM provoca una compromissione della disponibilità di gruppi metilici per la metilazione dei lipidi della sostanza bianca e quindi un'alterata sintesi della mielina. Anche il metabolismo dell'acido propionico è compromesso per la mancata formazione di suc-

cinil-CoA, dovuta alla carenza di deossi-adenosil-cobalamina (reazione 1).
L'insieme di queste alterazioni metaboliche determina l'insorgenza di lesioni neurologiche.

Sintomatologia clinica

Anemia perniciosa

L'anemia perniciosa è la sindrome più tipica dovuta a carenza di vitamina B12. L'esordio è insidioso ed il quadro clinico diventa generalmente manifesto quando le concentrazioni di vitamina B12 sono inferiori a 160 pg/ml. Progressivamente si manifestano i segni di un'anemia severa, con astenia marcata, pallore e subittero, dovuto all'eccessiva distruzione dei globuli rossi per eritropoiesi inefficace.
Frequentemente si osserva un interessamento cardiaco proporzionale all'entità dell'anemia: le alterazioni del miocardio sono riconducibili direttamente alla carenza di vitamina B12 e possono esitare in un'insufficienza cardiaca congestizia con cardiomegalia.
Le alterazioni del trofismo cellulare sono molto evidenti nel cavo orale: i pazienti presentano cheilite angolare ed una glossite caratteristica (glossite di Hunter); dapprima la lingua appare ricoperta da vescicole e ragadi molto dolorose, successivamente assume un aspetto traslucido e liscio dovuto all'atrofia della mucosa. I pazienti sono spesso inappetenti e l'apporto alimentare è ulteriormente limitato dalla possibile coesistenza di diarrea e vomito, espressione dell'interessamento intestinale e gastrico.
A carico dello stomaco è presente una gastrite atrofica spesso di natura autoimmune, con infiltrazione linfocitaria e plasmacellulare della mucosa.
L'anemia perniciosa può infatti manifestarsi anche nel quadro di altre patologie autoimmuni, non è infrequente ad esempio l'associazione con la vitiligo, con l'ipotiroidismo da tiroidite autoimmune e con la rettocolite ulcerosa. Nel 85% circa dei pazienti sono presenti nel siero anticorpi anti-cellule parietali ed in circa la metà sono presenti anticorpi-anti fattore intrinseco, altamente specifici perché raramente presenti nei soggetti sani o con altre endocrinopatie autoimmuni.
I sintomi neurologici possono essere precoci e comparire prima dei segni ematologici di carenza di vit. B12 e, se non corretti tempestivamente, possono diventare irreversibili. I pazienti sviluppano una polineuropatia demielinizzante a carico dei cordoni posteriori e laterali del midollo spinale e dei nervi periferici. Ciò si manifesta dapprima con astenia e parestesie più marcate agli arti inferiori poi, nelle fasi più avanzate, con atassia, andatura paretico-spastica e iperriflessia.
Sono spesso presenti disturbi cerebrali più difficili da inquadrare, ad esempio perdita di memoria e stati depressivi.

Altre anemie megaloblastiche da carenza di Vitamina B12

La sintomatologia è simile a quella dell'anemia perniciosa e la gravità è in relazione al grado di deficit vitaminico. Possono inoltre essere presenti sintomi legati alla

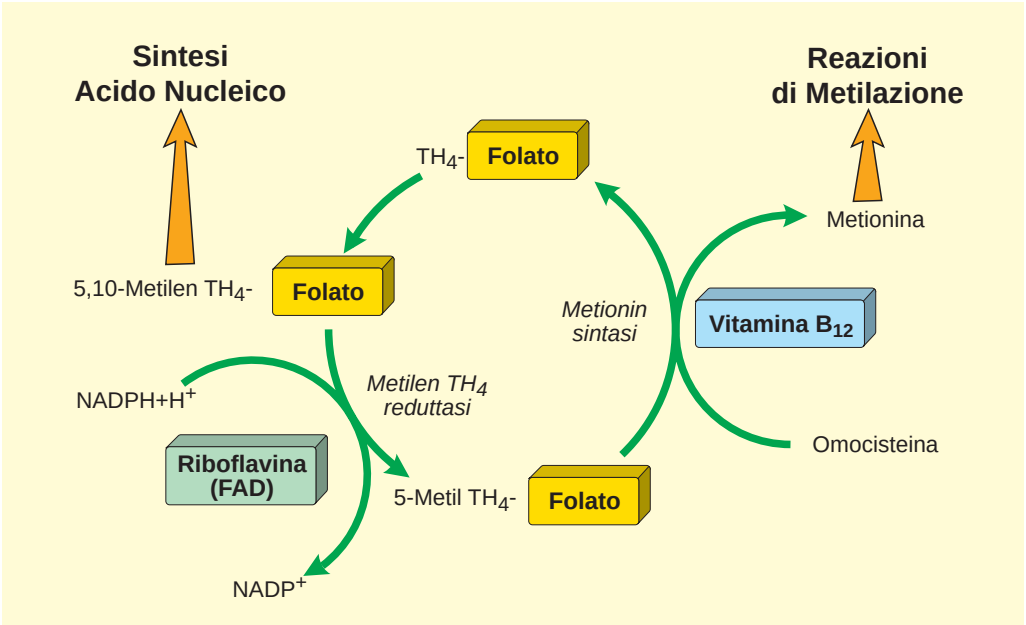


Fig. 4: vie metaboliche della vitamina B12 e dei folati

patologia responsabile della carenza; ad esempio, nella sindrome da ansa cieca con abnorme proliferazione di microrganismi intestinali, si osserva diarrea con steatorrea e calo ponderale.

Anemia megaloblastica da carenza di folati

Sono costantemente assenti i sintomi neurologici e quelli riconducibili all'achilia gastrica istamino-resistente; la sintomatologia legata all'anemia e all'interessamento del sistema digerente è invece sovrapponibile a quella dell'anemia perniciosa.

Nelle sindromi da malassorbimento difficilmente la carenza di folato è isolata, molto più spesso è accompagnata da una carenza contemporanea di vitamina B12 e di ferro.

Esami di laboratorio

Sangue periferico

A carico dei globuli rossi si manifestano nel sangue periferico sia alterazioni quantitative, fino a valori di 1.000.000/mm^3, sia gravi alterazioni morfologiche.

La macrocitosi, ossia l'aumento del volume corpuscolare medio eritrocitario, è quasi sempre presente e può precedere la caduta della concentrazione emoglobinica. Tuttavia non sempre indirizza verso una diagnosi di anemia megaloblastica, sia perché può essere mascherata se la carenza di Vitamina B12 e folati insorge in soggetti microcitemici o sideropenici, sia perché una macrocitosi si osserva anche in condizioni patologiche non-megaloblastiche, ad esempio nelle anemie emolitiche, nelle anemie che accompagnano patologie epatiche e nell'alcolismo.

Solo un aumento del Volume Corpuscolare Medio al di sopra dei valori di 130 fl può essere considerato realmente predittivo di anemia perniciosa.

E' presente una poichiloanisocitosi con tipici ovalociti di diametro generalmente superiore a 10µ, frequentemente sono presenti anche eritroblasti ortocromatici ed emazie con granulazioni basofile, corpi di Jolly e anelli di Cabot. Il numero di reticolociti è diminuito come conseguenza dell'eritropoiesi inefficace.

La quantità di emoglobina è sempre diminuita, fino a 4-5 g/dl, ma il contenuto emoglobinico medio aumenta proporzionalmente all'aumento del volume globulare medio.

Anche la serie bianca mostra alterazioni evidenti. E'costantemente presente una neutropenia assoluta e linfocitosi relativa. I granulociti hanno in genere dimensioni maggiori rispetto alla norma ed hanno sempre il nucleo plurisegmentato, con spostamento a destra dello schema di Arneth.

Le piastrine sono modestamente diminuite con anomalie morfologiche e strutturali.

In tutte le condizioni caratterizzate da una carenza contemporanea di ferro, il quadro periferico non è così spiccatamente macrocitico-megaloblastico e può essere presente una doppia popolazione eritrocitaria, una microcitica e un'altra macrocitica.

Anche nella carenza di folato insorta in corso di anemie emolitiche manca in genere il quadro megaloblastico.

Nella carenza di vit. B12 prodotta da infestazione da diphillobotrium latum, l'eosinofilia periferica unitamente al dato anamnestico di ingestione di pesce crudo, dirige verso la ricerca delle uova del parassita nelle feci.

Le anemie megaloblastiche devono essere differenziate dalle altre anemie macrocitiche non megaloblastiche, caratterizzate da macrociti rotondeggianti e non ovalari e da spiccata reticolocitosi.

Aspirato midollare

Nelle anemie megaloblastiche da carenza di vit. B12 e folati si osserva un'iperplasia della serie rossa con presenza predominante di megaloblasti basofili, con volume aumentato e ridotto rapporto nucleo-citoplasmatico: gli eritroblasti normali sono notevolmente ridotti e vi sono segni evidenti di eritropoiesi inefficace.

Mielociti e metamielociti raggiungono un diametro di 20-30 µ con gravi alterazioni della maturazione nucleare: anche i megacariociti sono diminuiti di numero e presentano nucleo ipersegmentato e granulazioni citoplasmatiche.

Altri parametri sierici

Si può osservare un modesto aumento della bilirubina indiretta per l'emolisi intramidollare; per lo stesso motivo si ha aumento della sideremia con modesta diminuzione della capacità legante il ferro.

La latticodeidrogenasi è nettamente aumentata, in particolare si osserva un prevalente aumento della frazione isoenzimatica LDH1, diversamente da quanto avviene nei pazienti affetti da anemia emolitica in cui aumenta la LDH2.

Diagnosi di anemia megaloblastica

Per la diagnosi di anemia megaloblastica è fondamentale eseguire un'anamnesi accurata, atta a mettere in evidenza i possibili fattori eziologici responsabili della carenza vitaminica.

L'esame emocromocitometrico di solito permette già di fare diagnosi con il reperto di macrociti ovalari, neutro-

penia con ipersegmentazione nucleare e assenza di reticolocitosi.
Tuttavia occorre ricordare che sebbene le anormalità ematologiche si sviluppino generalmente prima di quelle neurologiche, circa un quarto dei pazienti con manifestazioni neurologiche da carenza di vitamina B12 ha ematocrito normale o un volume corpuscolare medio nella norma.
A volte entrambi i valori sono normali.
Per effettuare una diagnosi sicura è pertanto indispensabile effettuare.
- il dosaggio sierico della vitamina B12
- il dosaggio sierico ed eritrocitario del folato
- il test di Schilling

La diagnosi di anemia perniciosa richiede la dimostrazione di anticorpi anti-fattore intrinseco nel siero e la dimostrazione dell'incapacità di assorbire la vitamina B12 (test di Schilling), per differenziare le forme di carenza della vitamina per carenza di fattore intrinseco da quelle dovute a malassorbimento.
Nell'85% dei pazienti sono presenti anticorpi anticellule parietali, che però non sono specifici, in quanto sono presenti anche in pazienti affetti da patologie autoimmuni e nel 3-7% di persone sane.
Gli anticorpi anti-Fattore Intrinseco sono presenti soltanto nel 50% dei pazienti affetti da anemia perniciosa, ma raramente nelle persone sane o nei pazienti affetti da patologia autoimmune, pertanto sono più specifici.

Test di Schilling

Il test di Schilling è un test a 3 steps:

1. step somministrare al paziente 1 nanogrammo di vitamina B12 marcata per via orale; controllare l'eliminazione urinaria della vitamina marcata assunta oralmente; se la vitamina marcata nelle urine è circa 5-40%, il paziente ha assorbito la vit. B12 e la diagnosi è deficit alimentare di B12;
   se la vitamina marcata non è eliminata con le urine, è evidente che la vitamina B12 somministrata non è stata assorbita;
2. step somministrare contemporaneamente per via orale fattore intrinseco e vitamina B12 marcata e controllare l'eliminazione urinaria di B12; se questa viene trovata nelle urina, il difetto è dovuto a carenza di fattore intrinseco; se la vitamina marcata non è eliminata con le urine, il difetto non è dovuto a carenza di fattore intrinseco, ma è a livello intestinale;
3. step trattare il paziente con antibiotici per 7-10 giorni e poi somministrare vitamina B12 marcata; se questa viene trovata nelle urine il difetto è dovuto ad alterato assorbimento ileale per abnorme crescita batterica, condizione corretta dagli antibiotici; nel caso in cui la vit. B12 non è eliminata con le urine perché gli antibiotici non hanno sortito nessun effetto, il difetto è secondario ad alterazione anatomica.

Quando si valuta un paziente con anemia megaloblastica occorre eseguire, contemporaneamente, la determinazione della concentrazione di folato e vitamina B12 nel siero e la concentrazione dei folati intraeritrocitaria (espressione del pool di folato disponibile).
Si deve tenere presente che:
- nel deficit di folato la concentrazione dei folati nel siero è diminuita mentre negli eritrociti può essere normale o diminuita;
- il 10 % dei pazienti con deficit di folato presenta valori di vitamina B12 intorno a 100 pg/ml, che si normalizzano dopo somministrazione di acido folico;
- nel deficit di vitamina B12 il folato sierico e quello intraeritrocitario possono essere diminuiti;
- spesso i deficit di B12 e folati sono strettamente associati.

Diagnosi differenziale tra carenza di folati e di vitamina B12

Il dosaggio della omocisteina e dell'acido metilmalonico può risultare utile per differenziare le forme da carenza di vitamina B12 da quelle di folato.
Questo perché cobalamina e folato intervengono ambedue nel metabolismo dell'omocisteina, mentre la sola cobalamina interviene nel metabolismo dell'acido metilmalonico.
Pertanto, in caso di deficit di cobalamina, si osserva un aumento sia di metilmalonico che di omocisteina, mentre in caso di carenza di folato si osserva solo un aumento di omocisteina. L'accumulo di questi metaboliti nel plasma precede la caduta delle concentrazioni sieriche delle vitamine nel siero e riflette in maniera accurata lo stato nutrizionale.
Inoltre, il dosaggio dell'omocisteina permette di identificare le forme di deficit di folato atipiche o associate a manifestazioni cliniche inusuali. Questo può avere implicazioni importanti rispetto al rischio di malattia, dal momento che un apporto sub-ottimale di folato può essere associato a rischio aumentato di malattia cardiovascolare, di neoplasie e, nelle donne in gravidanza, a difetti del tubo neurale a carico del feto.

Criteri di interpretazione dei dati di Laboratorio

Cobalamina	Folato	
<150 pg/ml	Normale	probabile deficit di vit. B12
<150 pg/ml	Diminuito	probabile deficit combinato
100-300 pg/ml	Normale/Diminuito	valutare MMA e Omocisteina
>300 pg/ml	Diminuito	probabile deficit di folato

Cause che influiscono sulla concentrazione sierica di cobalamina

La concentrazione sierica di cobalamina può risultare normale, pur in presenza di deficit, nel caso di:

- disordini mieloproliferativi (CML, Policitemia vera)
- deficit congenito di transcobalamina II
- sovracrescita batterica intestinale
- precedente somministrazione di composti a base di vit. B12

La concentrazione sierica di cobalamina può risultare diminuita pur in assenza di un quadro carenziale nel caso di:

- deficit di folato
- gravidanza
- uso prolungato di contraccettivi orali
- deficit congenito di aptocorrine sieriche
- mieloma multiplo

Occorre ricordare infine che l'omocisteina può essere elevata, oltre che nel deficit di folato e cobalamina, per deficit di piridossina, nell'insufficienza renale, nelle ipovolemie, nella psoriasi, e per difetti metabolici ereditari.
Anche l'acido metilmalonico può variare per cause non legate al deficit di vitamina B12. In particolare può risultare elevato nell'insufficienza renale, e per difetti metabolici ereditari, può invece risultare ridotto in seguito a terapie antibiotiche per riduzione della flora batterica intestinale.

BIBLIOGRAFIA

Breedveld FC, Bieger R., Van Wermeskerken RK. The clinical significance of macrocytosis. Acta Med Scand 1981; 209:319-322.

Lindebaum J., AllenRH. Clinical spectrum and diagnosis of folate deficiency. In Bailey LB,ed.Folate in Health and disease.New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1995:43-73

Lindebaum J., Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. Am J Hematol, 1990; 34: 99-107

Beck WS. Cobalamin and the nervous system (Editorial). N Engl J Med 1992; 327: 1875-1877

Carmel R. Pernicious anemia: the expected findings of very low serum cobalamin levels, anemia, and macrocytosis are often lacking. Arch Intern Med 1988; 148: 1712-1714

Hillman RS, McGuffin R., Campbell C. Alcohol interference with the folate enterohepatic cycle. Trans Assoc Am Physicians. 1977; 90: 145-156

Christopher F.Snow. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency. Arch intern Med, 1999;159:1289-1298.

Doscherholmen A., Silvis S., McMahon. Dual isotope Schilling Test for measuring absorpion of food-bound and free vitamin B12 simultaneously. Am J Clin Pathol, 1983; 80:490-495

George G. Klee. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B12 and folate.Clinical chemistry,2000;46:1277-1283

Bruno Zappacosta, Silvia Persichilli, Donata Scribano, Angelo Minucci, Daniele Lazzaro, Pasquale De Sole and Bruno Giardina. Comparing different methods for homocysteine determination. Clin Chem Lab 2002;40(11):1139-1142.

L' anemia sideropenica

A. Molteni
Azienda Ospedaliera
Ca' Granda Niguarda
Milano

L'anemia da carenza di ferro (sideropenica) si manifesta quando la quantità di ferro disponibile nell'organismo risulta insufficiente per una adeguata sintesi di emoglobina. La carenza di ferro è una condizione che si verifica quando la velocità di perdita o di utilizzazione del ferro supera la velocità di assimilazione dello stesso.

1. Il ferro nell'organismo umano

Il contenuto medio di ferro in un individuo adulto varia tra i 2 e i 5 grammi ed è in rapporto con il peso corporeo e con la concentrazione emoglobinica. Nel maschio risulta circa 50 mg/kg, mentre nelle femmine circa 35 mg/kg.
La quota maggiore di ferro è contenuta nell'emoglobina (70%) e nella mioglobina (10-13%).

L'emoglobina, contenuta nei globuli rossi, è la proteina deputata al trasporto dell'ossigeno. E' formata da un tetramero di catene proteiche, dette globina, in ciascuna delle quali è inserito un gruppo prostetico, detto eme, formato da un anello tetrapirrolico contenente all'interno un atomo di ferro in forma ridotta. Questa struttura permette di legare e rilasciare l'ossigeno in relazione alla pressione parziale dello stesso secondo una curva sigmoidea.
La mioglobina, contenuta nel muscolo scheletrico e cardiaco, ha la struttura di un singolo monomero ed è caratterizzata da un legame con l'ossigeno ad alta affinità, con lo scopo di costituire un serbatoio di ossigeno che la cellula utilizza quando sottoposta ad ipossia.
In presenza di normali livelli di emoglobina, 1 mL di sangue contiene 0,5 mg di ferro.

Per il resto il ferro risulta presente in un compartimento "di deposito" e un compartimento "plasmatico".
I depositi di ferro si individuano nelle molecole di ferritina ed emosiderina.
La *ferritina* è una proteina costituita da un guscio proteico detto apoferritina che è in grado di racchiudere al suo interno fino a 4500 atomi di ferro. E' una molecola ubiquitaria, anche se concentrazioni particolarmente elevate si riscontrano a livello di fegato, milza e midollo osseo.
L'*emosiderina* trae origine dall'aggregazione di diverse molecole di ferritina in seguito alla degradazione dell'involucro proteico formando così polimeri di diverse dimensioni. Come la ferritina, essa è presente soprattutto a livello di fegato, milza e midollo osseo.
La fissazione del ferro alla molecola di ferritina e la sua liberazione sono mediate da un meccanismo metabolicamente controllato, che ne consente la pronta disponibilità per le necessità fisiologiche della cellula. Al contrario il ferro compreso nel condensato emosiderinico può essere mobilizzato soltanto in modo lento ed incontrollato.
Il ferro plasmatico costituisce meno dello 0,1% del ferro nell'organismo e viene trasportato quasi esclusivamente dalla *transferrina*. Questa molecola è una glicoproteina con conformazione bilobata, in cui ciascun lobo contiene un sito di legame con una molecola di ferro trivalente. Normalmente la transferrina non si lega al ferro al massimo delle sue potenzialità, ma viene occupata per circa un terzo. Per questa ragione, spesso e più correttamente viene espressa attraverso la sua capacità di legare il ferro, detta *TIBC* dall'acronimo inglese "total iron-binding capacity". La sua concentrazione sierica è compresa tra 4.4 e 8.0 µmol/100ml (250 e 450 µg/100ml, con valore medio di circa 300 µg/100ml). La *saturazione della transferrina* è definita come il rapporto tra i siti occupati da atomi di ferro e i siti disponibili a tale legame, ed è espressa in percentuale. I valori di normalità sono compresi tra il 20% e il 50%.
La concentrazione sierica di ferro, detta *sideremia*, è normalmente circa un terzo della TIBC, ossia mediamente 1.8 µmol/100ml (circa 100µg/dL). La concentrazione del ferro è influenzata da molte variabili sia fisiologiche che patologiche. Ha un ritmo diurno, per cui si riduce di pomeriggio raggiungendo il valore più basso attorno alle 9 di sera, mentre raggiunge il massimo tra le 7 e le 10 del mattino. Può apparire ridotta durante il ciclo mestruale, in presenza di stato infiammatorio, di neoplasia o successivamente a infarto del miocardio. Neoplasia e chemioterapia possono però causare anche un incremento dei valori di sideremia. Valori incrementati si osservano anche

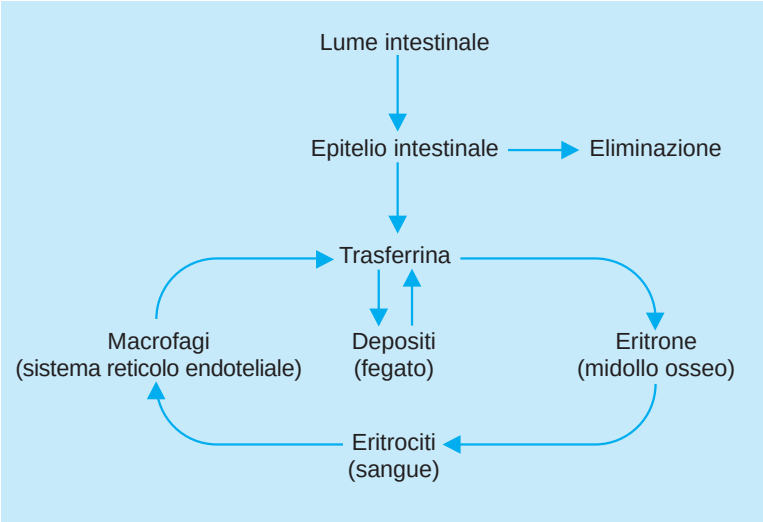


Fig. 1:
IL CICLO DEL FERRO

in pazienti sideropenici durante il trattamento con ferro, soprattutto se trattati con ferro per via parenterale.
La *ferritina* è presente in piccola quota anche nel sangue circolante e varia, nei soggetti normali, da 20 a 200 µg/L. Esistono significative differenze tra i livelli medi di ferritina negli uomini (94 µg/mL) e nelle donne (34 µg/mL). Nell'adulto sano la concentrazione di ferritina sierica risulta essere direttamente proporzionale all'entità dei depositi di ferro nell'organismo: 1 µg di ferritina equivale approssimativamente a 10 mg di ferro accumulato nei siti di deposito. La presenza di uno stato infiammatorio, anche di modesta entità, ne può aumentare la concentrazione. La sua concentrazione risulta inoltre incrementata dall'assunzione di terapia marziale sia orale che parenterale.
All'interno dell'organismo il ferro viene scambiato in modo unidirezionale dalla transferrina plasmatica all'eritrone (definito come la totalità degli elementi eritroidi in ogni stadio di maturazione), da questo ai macrofagi e di nuovo alla transferrina plasmatica (figura 1). Circa 4/5 del ferro trasportato dalla transferrina, ogni giorno è veicolato verso l'eritrone. La cellula emopoietica acquisisce il ferro dalla transferrina attraverso uno specifico recettore di membrana e i complessi transferrina-recettore vengono internalizzati all'interno di endosomi. La maggior parte del ferro viene utilizzato per la sintesi dell'emoglobina, mentre una piccola parte viene immagazzinato nella ferritina citoplasmatica. La sintesi del recettore della trasferrina e della ferritina citoplasmatica vengono regolate da due proteine dette IRP-1 e IRP-2. Gli eritrociti senescenti vengono fagocitati dai macrofagi a livello di fegato, milza e midollo osseo e, all'interno dei macrofa-

gi, l'enzima eme-ossigenasi catabolizza il gruppo eme liberando ione ferroso. Quest'ultimo, attraverso un meccanismo non ancora completamente chiarito, che coinvolge una proteina detta ferroportina 1 e la ceruloplasmina, viene per la maggior parte ceduto nuovamente alla transferrina e il ciclo ricomincia.
La forma tronca del *recettore della transferrina* è solubile nel plasma. Tale proteina può essere dosata e riflette la quantità totale del recettore cellulare della transferrina e quindi l'attività dell'eritrone. In caso di iperplasia eritroide (che si ha per esempio in caso di talassemia, anemia falciforme, anemia emolitica) si osserva un incremento di tale proteina. Anche la carenza marziale è causa di incremento del recettore solubile della transferrina in quanto la carenza di ferro comporta una "up-regulation" del recettore. Questo parametro dunque può essere utilizzato anche come indice di sideropenia, ovviamente solo in assenza di copatologie che determinino iperplasia eritroide. La sua importanza deriva soprattutto dal fatto che la sua concentrazione non è influenzata dallo stato infiammatorio.

2. Ricambio giornaliero del ferro

Non esiste una vera e propria via di eliminazione del ferro dall'organismo. Ogni giorno attraverso l'esfoliazione delle cellule dell'epitelio gastrointestinale vengono eliminati circa 0.5 mg di ferro. Altrettanto ferro viene eliminato attraverso urine, sudore, desquamazione epiteliale e bile, per cui la perdita giornaliera media di un uomo adulto è di circa 1 mg al giorno. La donna mestruata ha una ulteriore perdita media di ferro. Calcolando che il flusso mestruale oscilla tra 25 e 80 ml di sangue, si ottiene che la perdita mensile si stima in 17-40 mg e cioè circa 1 mg al giorno medio, che aggiunto alle altre perdite fisiologiche comporta una perdita totale di circa 2 mg al giorno. La gravidanza è una ulteriore causa fisiologica di perdita marziale. La madre perde circa 680 mg di ferro durante la gravidanza, calcolando la quota ceduta al feto, la quota ritenuta dalla placenta e dal cordone ombelicale e la perdita durante il parto. La perdita in gravidanza aumenta con l'aumentare della gestazione, per cui si è calcolato che il fabbisogno della gestante risulta di circa 0.8mg al giorno nei primi mesi, 4,4 mg al giorno a metà della gravidanza, fino ad arrivare a 8-9mg al termine della gestazione.
Non essendo possibile una eliminazione attiva, è l'assorbimento che regola il bilancio del ferro. L'assorbimento del ferro risulta infatti correlato alla attività eritropoietica e ai depositi di ferro. Una dieta bilanciata contiene giornalmente circa 10-20 mg di ferro, ma in condizioni normali solo una parte di questo, corrispondente al 5-10%, viene assorbito ed è quanto corrisponde per bilanciare le perdite fisiologiche. In condizione di carenza l'assorbimento aumenta fino a cinque volte quello basale.
Il ferro contenuto negli alimenti di origine animale è assorbito molto meglio rispetto al ferro vegetale perchè i primi contengono quote elevate di ferro emico, ossia legato al gruppo eme dell'emoglobina e della mioglobina, che non viene digerito, ma penetra intatto nella cellula intestinale. L'ambiente acido dello stomaco ha un ruolo fondamentale in quanto rende possibile la digestione peptica degli alimenti liberando il ferro e fa si che esso rimanga in forma chimicamente attiva e possa legarsi a sostanze con cui forma complessi che rimangono successivamente stabili nel pH neutro intestinale, disponibili per l'assorbimento.
La maggior parte del ferro viene assorbita nella prima parte dell'intestino tenue (duodeno e metà prossimale del digiuno).

3. Cause di carenza di ferro

L'evento di gran lunga più frequente che causa una anemia da carenza di ferro è l'incremento delle perdite. Nella donne in età fertile ipermenorrea, gravidanze e metrorragie sono i fattori più spesso implicati. I donatori di sangue dimostrano spesso una carenza marziale. Nell'uomo e nella donna in menopausa, o senza problematiche di tipo ginecologico, il tratto gastrointestinale è molto spesso responsabile di perdite ematiche patologiche. Le cause più frequenti di sanguinamento sono: ulcera peptica, gastrite, emorroidi, varici esofagee, ernie jatali, poliposi, l'angiodisplasia colica, carcinoma gastrico, diverticolosi, diverticolo di Meckel, colite ulcerosa, morbo di Crohn,

Fig. 2:
CAUSE PRINCIPALI DI CARENZA DI FERRO (IN ORDINE DI FREQUENZA)

Ipermenorrea	Patologia gastroduodenale
Gravidanze	Donazioni di sangue
Patologia gastroduodenale	Emorroidi e proctorragie
Metrorragie	Patologia intestinale
Emorroidi e proctorragie	Ematuria
Donazioni di sangue	Epistassi
Patologia intestinale	
Epistassi	

adenocarcinoma del colon. E' sufficiente una perdita anche di soli 10-15 mL/die per provocare nell'adulto anemia sideropenica. Talora la sideropenia può essere l'unico segno insidioso di una neoplasia del tratto gastroenterico. La figura 2 riassume le cause più frequenti di sideropenia.Rare cause di perdita marziale sono epistassi frequenti, diatesi emorragiche da difetto congenito emocoagulativo (emofilie, piastrinopenie-patie, malattia di Von Willebrand), teleangectasia ereditaria, emoglobinuria, emorragie polmonari secondarie a bronchiectasia o a siderosi polmonare idiopatica, ematuria, stillicidio intestinale da infezione da parassiti quali l'Anchilostoma ed il Necator Americanum (sopratutto frequenti nelle regioni tropicali). Alcune rare carenze marziali possono essere causate da diminuito apporto.

Questo si verifica nei vegetariani stretti, in quanto sebbene frutta e verdura contengano discrete quantita' di ferro, non ne contengono in forme emica, ed è possibile che il ferro ionico venga chelato da nitrati, fosfati e quindi non assorbito.

Alcuni soggetti sono sideropenici per un meccanismo di inadeguato assorbimento del ferro che può essere dovuto ad acloridia, gastrectomia totale o parziale con gastrite atrofica del moncone, morbo celiaco.

Nel bambino tra i sei mesi e i tre anni è abbastanza frequente l'instaurarsi di una sideropenia come bilancio negativo tra i depositi di ferro presenti alla nascita e la quantità assorbita con la dieta verso le forti richieste per l'incremento della massa corporea e le perdite fisiologiche.

4. Fisiopatologia della carenza di ferro e diagnosi di laboratorio

La sideropenia può essere più o meno importante e comportare conseguenze più o meno rilevanti. Infatti l'organismo dapprima contrasta la carenza di apporto richiamando il ferro ferritinico e il ferro dei depositi. Svuotati i depositi viene sfruttato il ferro circolante che viene sottratto alla transferrina, poi viene ridotta la sintesi degli enzimi contenenti ferro e solo alla fine viene sacrificata la sintesi dell'emoglobina. Si distinguono così diverse fasi:

1. *Sideropenia latente:* costituisce una condizione di diminuzione del ferro plasmatico, senza evidenza di alterazioni ematologiche. Da un punto di vista biochimico è caratterizzata da sideremia ridotta, TIBC normale o lievemente aumentata, saturazione della transferrina inferiore al 20% e ridotta ferritina. Non vi è anemia, nè riduzione del volume delle emazie. Questa situazione normalmente non richiede supporto marziale. Ma in soggetti che, per qualunque motivo siano sottoposti a trattamento con eritropoietina (per esempio pazienti chirurgici che debbano effettuare autodepositi di globuli rossi concentrati) questa situazione incarna lo stato di carenza "funzionale" in cui sebbene le riserve di ferro risultino di fatto normali, vi è una quota inadeguata di ferro per far fronte alle aumentate richieste da parte dell'eritrone stimolato. Solo in questi casi si ritiene corretto avviare terapia di supporto marziale nella sideropenia latente.
2. *Sideropenia conclamata senza compromissione dell'eritropoiesi:* situazione che corrisponde a svuotamento dei depositi marziali senza ancora compromissione ematologica. Da un punto di vista biochimico è caratterizzata da sideremia ridotta, TIBC aumentata, saturazione della transferrina inferiore al 10% e ridotta ferritina. In questo caso è sempre indicato supporto marziale per ricostituire i depositi.
3. *Eritropoiesi sideropenica:* è lo stato in cui compare la riduzione del livello di emoglobina e quindi l'anemia. Dal punto di vista biochimico si noteranno le stesse alterazioni dello stato precedente: sideremia ridotta, TIBC aumentata, saturazione della transferrina inferiore al 10% e ridotta ferritina. Ovviamente l'entità dell'anemia è corrispondente all'entità della carenza di ferro. L'eritropoiesi avviene senza la possibilità di sintetizzare una quantità adeguata di emoglobina, per cui tipicamente verranno prodotti eritrociti ipocromici e microcitici. Nelle forme di anemia più lievi all'osservazione con il microscopio ottico si noterà solo anisocitosi e lieve ovalocitosi (figura 3). Con la progressione dell'anemia si noterà una riduzione consensuale del volume corpuscolare medio (MCV) e del contenuto di emoglobina (MCH), mentre le concentrazione eritroci-

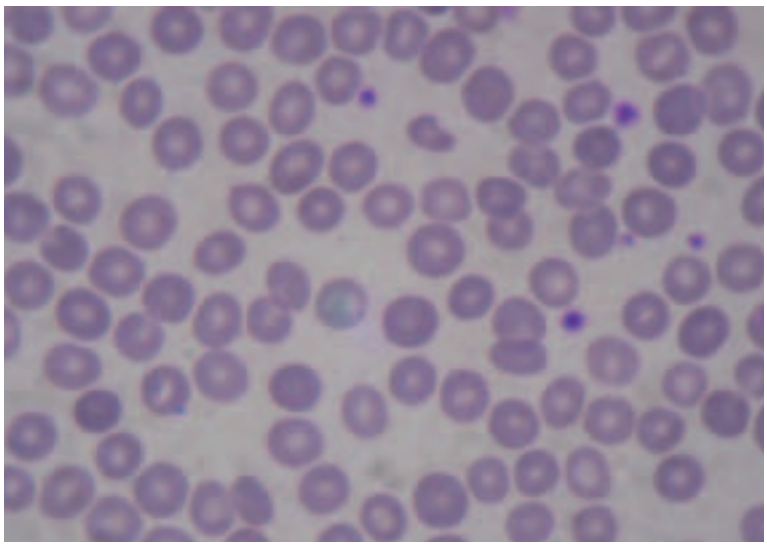


Fig. 3: anemia sideropenica lieve

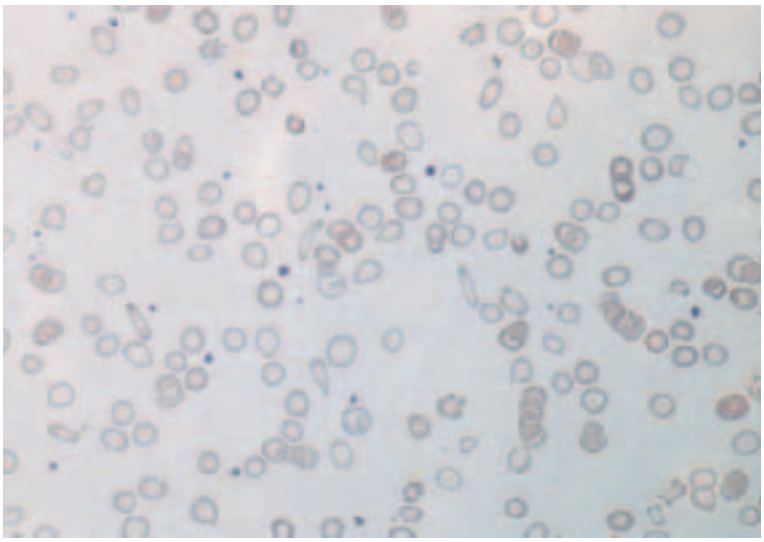


Fig. 4:
ANEMIA SIDEROPENICA CONCLAMATA

taria di emoglobina (MCHC) rimane solitamente stabile. Al microscopio compariranno emazie francamente ipocromiche e microcitiche, talora anche con forme bizzarre come ellissociti, forme allungate "a sigaro" e bersagliociti (figura 4). Sono descritte anche alterazione delle piastrine, in particolare trombocitosi, soprattutto in caso di perdita cronica, ma anche trombocitopenia e leucopenia. Ovviamente in questo caso è indicato il supporto marziale.

5. Diagnosi differenziale

Esistono altre anemie microcitiche ipocromiche oltre a quelle dovute a carenza di ferro. In particolare, l'anemia sideropenica si dovrà distinguere da:

1. Talassemia minor: tutte le talassemie "minor" sono modeste anemie microcitiche, spesso morfologicamente indistinguibili dalla anemia sideropenica. Spesso queste forme di talassemia presentano, molto più frequentemente di quanto accada della carenza marziale, conte eritrocotarie particolarmente elevate (oltre 5 x 10^{12}/L). L'MCV è di regola molto piccolo, tra 60 e 70 fL, e costante nel tempo, mentre nell'anemia sideropenica raggiunge tali valori solo in caso di grave anemia. Normalmente nelle talassemie la misurazione di sideremia, TIBC e ferritina non risultano alterati e naturalmente il riscontro all'elettroforesi dell'emoglobina di incremento delle catene globiniche HbA2 o HBF ne permette la diagnosi. E' opportuno però ricordare che in caso di concomitante sideropenia l'elettroforesi dell'emoglobina può essere falsamente normale in quanto la riduzione di HbA2 da sideropenia può essere più marcata della riduzione della HbA e quindi può risultare, per l'appunto, un rapporto normale. E' quindi sempre opportuno, per evitare falsi negativi, correggere la carenza marziale prima di eseguire l'elettroforesi dell'emoglobina.
2. Anemia delle malattie croniche: l'anemia che si sviluppa nelle malattie croniche infiammatorie e nelle neoplasie è in genere normocitica, ma appare microcitica nel 20-30% dei casi. La morfologia del sangue periferico è spesso non differente dall'anemia da carenza di ferro. Di solito la distinzione si basa sulla riduzione della TIBC e sul riscontro di valori di saturazione di transferrina superiori al 15% e di ferritina elevata. Ci possono essere casi dubbi, perchè , come visto, anche in caso di sideropenia i valori di ferritina possono essere alterati ed in particolare aumentati dallo stato infiammatorio. In questi casi può essere utile il dosaggio del recettore solubile della transferrina che risulta ridotto nell'anemia delle malattie croniche. In particolare è utile il "transferrin receptor-ferritin index" definito come il rapporto tra il recettore solubile della transferrina e il logaritmo della ferritina, che risulta basso (<1) nell'anemia delle malattie croniche ed elevato (>4) nella anemia sideropenica.
3. Anemia nell'insufficienza epatica: talora in pazienti affetti da insufficienza epatica vi può essere anemia ipocromica, ma si riscontra comunemente incremento della concentrazione di sideremia con TIBC normale o ridotta e aumento della saturazione della trasferrina
4. Anemia nell'insufficienza renale: spesso di difficile distinzione in quanto sideremia e TIBC possono mimare il comportamento che hanno nell'anemia sideropenica. Nell'insufficienza renale la ferritina è spesso elevata, anche nel caso in cui sia concomitante una carenza di ferro. In casi estremi, per valutare lo stato marziale di questi pazienti, può essere utile eseguire un aspirato midollare per valutare con colorazione specifica (blu di Prussia) i depositi di emosiderina.

Gli elementi differenziativi di queste anemie sono riassunti nella figura 5.

6. Clinica

Lo stato di sideropenia è spesso clinicamente silente; i segni ed i sintomi compaiono con la comparsa dell'anemia. Nella grande maggioranza dei pazienti si verifica una progressione estremamente lenta e graduale della sintomatologia.

Molte caratteristiche cliniche dell'anemia sideropenica, quali pallore, astenia, apatia, tachicardia, dispnea da sforzo, facile irritabilità, insonnia e labilità emotiva sono

	Anemia sideropenica	Talassemia minor	Anemia delle malattie croniche	Anemia sull'epatopatie	Anemie sull'insufficienza renale cronica
Sideremia	Ridotta	Normale	Ridotta o normale	Normale o aumentata	Ridotta
Transferrina	Aumentata	Normale	Ridotta o normale	Normale o ridotta	Aumentata
Saturazione della transferrina	Ridotta	Normale	Ridotta o normale	Aumentata o normale	Ridotta
Ferritina	Ridotta	Normale o aumentata	Normale o aumentata	Normale o aumentata	Aumentata o normale
Recettore solubile della transferrina	Elevato	Elevato	Ridotto		
Transferrin receptor-ferritin index	>4		<1		
Depositi midollari di emosiderina	Ridotti	Normali o aumentati	Normali o aumentati	Normali o aumentati	Normali o aumentati

Fig. 5: Diagnosi differenziale delle anemie microcitiche

comuni a tutte le altre forme di anemia.
Dal momento che la carenza di ferro coinvolge anche molti coenzimi, come i citocromi, le catalasi, le perossidasi e le metallo-flavoproteine, possono comparire sintomi non correlati all'anemia.
In particolare sono descritte lesioni a carico della cute, degli annessi cutanei e delle mucose. La cute diventa secca, anelastica, i capelli sottili, fragili, radi, le unghie fragili, opache, con striature longitudinali, appiattite e/o concave (coilonichia, cioè unghie a forma di cucchiaio). Lesioni a carico delle mucose interessano particolarmente il cavo orale e, più raramente, la faringe.
A livello labiale è frequente una stomatite angolare che può presentarsi con piccole erosioni e fissurazioni dolenti ai lati della bocca; la mucosa orale è arrossata, la lingua tumefatta, liscia, disepitelizzata, lucente e dolente. Sporadicamente può verificarsi anche glossite.

Fig. 6: Terapia sostitutiva

Livelli di emoglobina	<9 g/dL	Tra 9 e 12 g/dL	>12 g/dL
Quantità di ferro necessaria per correggere la carenza	2,5 g	1,8 g	1,0 g
Durata della terapia			
Via parenterale	30 giorni	20 giorni	10 giorni
Via orale	6 mesi	4 mesi	2,5 mesi

Occasionalmente si può verificare gastrite atrofica con acloridia. Descritta anche atrofia della mucosa vaginale. Entrambi questi ultimi due sintomi possono assumere significato sia di conseguenza che di causa della sideropenia stessa.

7. Cenni di terapia

Il primo intervento terapeutico deve mirare a correggere le cause delle sideropenia quando questo è possibile. Il supporto marziale dipende dalla entità della carenza (figura 6).
In caso di anemia grave (Hb < 9 g/dL) la quantità media di ferro da fornire per correggere la carenza risulta di 2,5 g corrispondente a 30 giorni di terapia con ferro per via endovenosa (e.v.), al dosaggio di 100 mg al giorno o a 6 mesi di terapia con ferro per via orale (per os), al dosaggio di 150 mg al giorno.
Se l'anemia è lieve (Hb compresa tra 9 e 12 g/dL) basteranno 1,8 g di ferro (20 giorni di terapia e.v. oppure 4 mesi di terapia per os). Infine per correggere solo la sideropenia senza anemia bisogna fornire circa 1,0 g di ferro (10 giorni di terapia e.v oppure 2,5 mesi di terapia per os).

Light Cycler per la prevenzione del rischio trombotico

La biologia molecolare sta aprendo davvero nuovi orizzonti di possibili utilizzi in campo diagnostico; il range delle offerte con metodologie automatizzate e standardizzate si amplia continuamente e arriva a coprire anche quelle indagini che erano appannaggio quasi esclusivo dei centri di ricerca.
Oggi presentiamo alcune applicazioni della biologia molecolare nel settore della coagulazione.
Grazie alla versatilità del sistema **LIGHT CYCLER** disponiamo di alcuni importanti parametri per la valutazione del rischio trombotico.

Trombosi venosa profonda
La trombosi venosa profonda (TVP) è una patologia molto diffusa nella popolazione di origine caucasica, così come l'embolia polmonare (EB) che è la complicanza più temibile della TVP.
E' difficile fornire stime precise sull'incidenza della TVP nella popolazione, poichè spesso misconosciuta.
Dati più precisi, invece, sono disponibili sulla prevalenza di TVP ed EP in condizioni ad alto rischio, con dati che sono sorprendenti e preoccupanti, se sottovalutati.
La tabella 1 mostra l'incidenza della TVP in alcune situazioni cliniche in pazienti non sottoposti a idonea profilassi.

Altre situazioni cliniche sono associate ad aumentato rischio di TVP (età avanzata, neoplasie, gravidanze, scom-

TABELLA 1

	%PVP
• **Chirurgia generale**	15-25
• **Chirurgia ortopedica (protesi d'anca)**	50-60
• **politrauma**	ca. 65
• **ictus cerebrale ischemico**	ca.45
• **infarto del miocardio**	ca. 25

penso cardiaco, collagenopatie, ecc.) e possono coesistere e sommarsi in un medesimo individuo in modo da rendere meno prevedibile e comunque amplificato il rischio stesso di ipercoagulabilità che è il meccanismo patogenetico della TVP.
E' evidente l'importanza di individuare soggetti particolarmente predisposti che possono sviluppare trombosi venose in presenza di cause scatenanti (o anche spontaneamente) e persino in giovane età.
Un traguardo ambizioso sarebbe la valutazione del rischio trombotico di qualunque soggetto in procinto di essere sottoposto ad una situazione a rischio (es. intervento chirurgico) per poter attuare le adeguate misure di prevenzione.
Tra i fattori di rischio evidenziati da numerosi studi, quelli di tipo genetico giocano un ruolo cruciale nello sviluppo della malattia.
Tra le anomalie congenite possiamo ricordare le carenze degli anticoagulanti naturali quali Antitrombina III, Proteina C, Proteina S, che sono generalmente trasmesse come carattere autosomico dominante; tuttavia queste anomalie sono rare nei pazienti con trombosi venosa e rarirssime nella popolazione generale (meno dell'1 %)

Nell'ultimo decennio la conoscenza dei meccanismi patogenetici della TVP è migliorata notevolmente grazie alla scoperta di altre due anomalie della coagulazione: una mutazione a carico del fattore V ed una mutazione a carico del fattore II, trasmesse ereditariamente con carattere autosomico dominante e che si traducono in un meccanismo di ipercoagulabilità.

Fattore V Leiden

Nel 1993 venne fatta la prima osservazione su alcuni individui con TVP, appartenenti alla stessa famiglia, ai quali il test -aPTT- non veniva prolungato dall'aggiunta di proteina C attivata.
L'anomalia venne infatti denominata "resistenza alla proteina C attivata".

Poco tempo dopo venne identificata la causa che risiedeva in una singola mutazione (Adenina al posto di Guanina) nel nucleotide 1961 del gene che codifica il fattore V. Il fattore V sintetizzato in presenza della mutazione risulta avere una sostituzione aminoacidica (Glutamina al posto di Arginina) in posizione 506, cioè proprio in uno dei siti di legame con la proteina C attivata.
La scoperta del difetto molecolare avvenne in un laboratorio della cittadina olandese di Leiden e per questo motivo la mutazione viene comunemente chiamata "fattore V Leiden".

Mutazione della protrombina

E' stata scoperta nel 1996 la mutazione puntiforme (Adenina al posto di Guanina) in posizione 20210 della regione 3' del gene che codifica per la protrombina.
Tale mutazione comporta un aumento del 30% dei livelli di protrombina che quindi spiegano il meccanismo trombogenico della mutazione.
La mutazione è stata riscontrata nel 10% dei casi di pazienti portatori della mutazione di Leiden.

Epidemiologia e rischio relativo

Le mutazioni "Fattore V e fattore II" sono le cause di trombofilia ereditaria più frequenti, dieci volte in più rispetto alle altre anomalie relative alle carenze degli anticoagulanti naturali.
Le stime di rischio riguardanti gli omozigoti, più raro riscontro rispetto agli eterozigoti, sono molto più eleva-

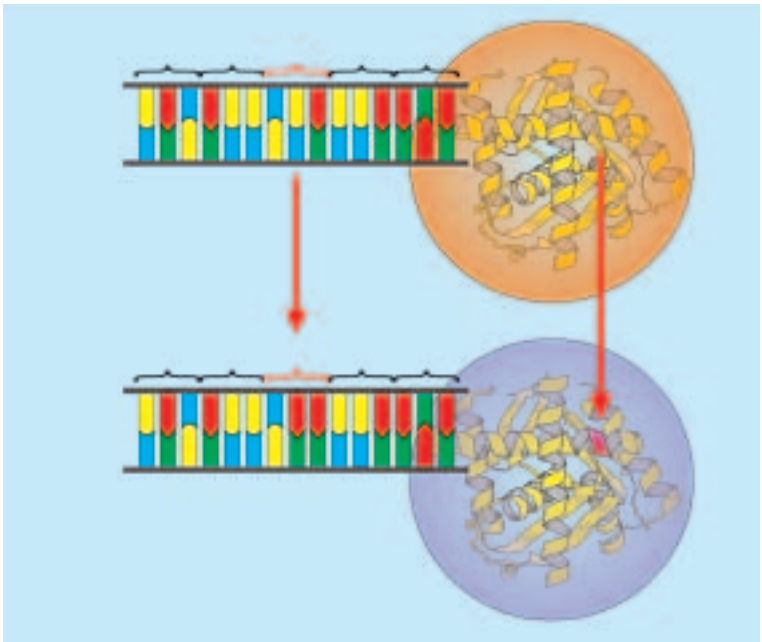


TABELLA 2

	Popolazione generale	Pazienti non selezionati	Pazienti selezionati*
Fattore V Leiden	3 - 7%	15 - 20%	50%
Mutazione della protrombina	2 - 5%	6 - 10%	18%

**selezionati per avere storia famigliare positiva e trombosi in età giovanile (< 45-50anni)*

TAB 2
PREVALENZA DELLE MUTAZIONI DEL FATTORE V E DELLA PROTROMBINA NELLA POPOLAZIONE GENERALE E NEI PAZIENTI CON TROMBOSI VENOSA

te, sino a 80 volte per il fattore Leiden., e presumibilmente sono allo stesso livello per l'omozigosi nel caso della protrombina.
Però la presenza delle due mutazioni spesso non è sufficiente a causare trombosi. Infatti gli individui portatori sono asintomatici oppure hanno trombosi in età avanzata e frequentemente in occasione di condizioni scatenanti. L'interazione tra fattori genetici e fattori scatenanti ambientali porta ad aumenti che non sono solo la somma dei rischi ma sono moltiplicativi, per cui il rischio complessivo è ben maggiore.

MTHFR

La metilentetraidrofolatoreduttasi (MTHFR) è un enzima coinvolto nel metabolismo dell'aminoacido metionina e precisamente interviene nel processo di rimetilazione da omocisteina a metionina tramite l'intervento della vitamina B12. Rare mutazioni possono causare deficenza grave di MTHFR e comparsa di omocisteinemia con sintomatologia grave sullo sviluppo psico-motorio e importanti fenomeni trombotici.
Un polimorfismo genetico più comune, dovuto alla sostituzione di una Citosina in Timina al nucleotide 677 causa una riduzione dell'attività enzimatica della MTHFR (variante termolabile). E' condizione piuttosto frequente nella popolazione a livello sino al 40% per quanto riguarda gli eterozigoti e al 10 % come omozigoti: tuttavia non semplice da identificare con le normali procedure diagnostiche.
Tale variante comporta un accumulo di omocisteina che è considerato un fattore di rischio di trombosi sia venosa che arteriosa.

TABELLA 3

	Pazienti non selezionati	Pazienti selezionati*
Fattore V Leiden	5 - 8	10 - 20
Mutazione della protrombina	3 - 4	5 - 10

** selezionati per avere storia famigliare positiva e trombosi in età giovanile (< 45-50anni)*

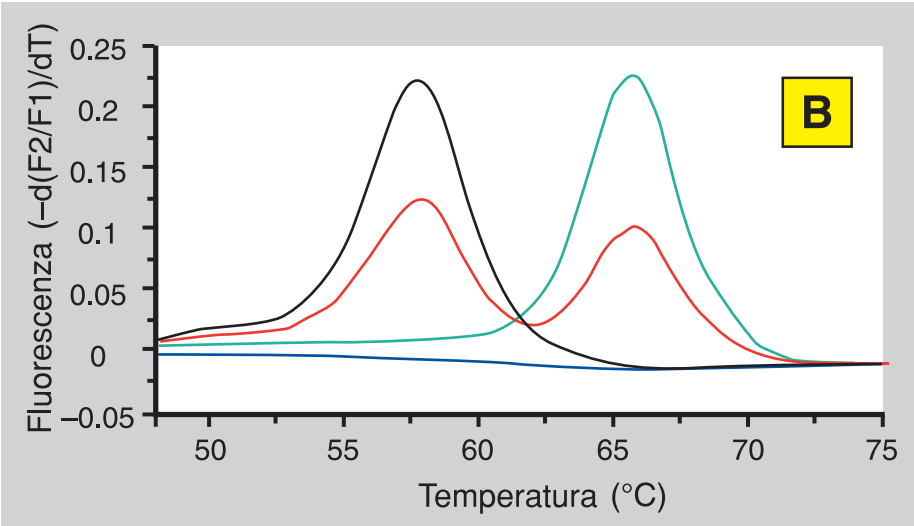
TAB 3
RISCHIO RELATIVO DI TROMBOSI VENOSA IN PORTATORI ETEROZIGOTI DELLE MUTAZIONI DEL FATTORE V O DELLA PROTROMBINA RISPETTO AI NON PORTATORI

Ricerca delle mutazioni

Il venire a conoscenza che il paziente è portatore di una mutazione, oltre a chiarire la causa dell'evento, ha il vantaggio di poter ottimizzare la profilassi secondaria della TVP, in termini di terapia anticoagulante e di necessità di profilassi delle situazioni a rischio.
Inoltre, una volta identificata l'anomalia trombofilica è possibile allargare lo studio ai consanguinei: chi risulterà portatore della stessa anomalia potrà beneficiare di una prevenzione primaria della TVP nelle condizioni a rischio.
La TVP è un evento di per sè pericoloso per la vita e ancor più poichè esiste il problema delle TVP asintomatiche: questa mancanza di sintomi può portare alla EP con esiti anche fatali, senza aver dato segni specifici apprezzabili.
Fino a pochi anni fa la diagnosi di TVP era resa difficile dalla scarsa disponibilità di mezzi adeguati e per questo motivo è stata sottostimata ed anche curata in modo tardivo.
Oggi è possibile porre con sicurezza e rapidità la diagnosi di TVP ed è auspicabile che il medico coinvolto adegui le proprie conoscenze in relazione alle nuove possibilità diagnostiche atte ad identificare i soggetti a rischio.

Light Cycler

Per rendere facilmente applicabile questo concetto Roche Diagnostics dispone del sistema Light Cycler.
Un sistema di PCR real-time con kit specifici per la determinazione delle mutazioni sopraindicate:
Fattore V Leiden, Protrombina, MTHFR.
Le determinazioni avvengono in maniera estremamente rapida e certa su normali campioni di sangue, identificando le mutazioni puntiformi alla posizione 1691 per il gene relativo al Fattore V Leiden, alla posizione 20210 per la protrombina e 677 per MTHFR
Il sistema Light Cycler è in grado di fornire la conferma del prodotto amplificato grazie all'innovativa funzione chiamata "melting curve analysis", assolutamente specifica per ciascun prodotto.
In tal modo è possibile evidenziare a video il genotipo "wildtype" il "mutante", "l'eterozigote".
Il Light Cycler rende facile e sicura anche l'identificazione delle mutazioni



CARATTERISTICHE PRINCIPALI

E' rapido :	- 30-40 cicli di PCR in 20-30 minuti
E' sicuro:	- reagenti pronti all'uso
	- Presenza di un controllo in ogni kit
	- Tubi di reazione chiusi
	- Nessun rischio di contaminazione
E' specifico:	- rileva anche mutazioni puntiformi
E' innovativo:	- PCR real time con monitoraggio on line
	- Hybidization Probes e SYBR green format
	- miniaturizzazione dei volumi
	- Melting curve analysis
E' semplice	- pochissima manualità
	- software user friendly
	- minime necessità di disposables
	- ingombro ridottissimo
E' robusto:	- nessuna manutenzione
E' affidabile	- elevata precisione : 0,3% CV al crossing point
	- range dinamico da 10 a 10^{10} copie-reazione

Il Light Cycler è oggi un sistema moderno, di grande flessibilità analitica, perchè consente un'ampia gamma di esami possibili, altamente specialistici, anche in diversi settori, oltre a quelli sopraindicati.

E' il sistema adatto ad approcciare indagini molecolari particolari quali i test per le mutazioni ed altri ancora.
Il crescente interesse verso nuovi test è una esigenza che soddisfa i bisogni dei laboratori che vogliono differenziarsi, aumentando la qualità e la quantità dei servizi offerti ai pazienti.

Cobas TaqMan 48: alta tecnologia e semplicità d'uso

I traguardi raggiunti dalla tecnologia, nelle scienze mediche e diagnostiche, sono evidenti: non sempre però evoluzione tecnologica e semplicità d'uso vanno di pari passo. Il Cobas TaqMan 48, strumento concepito per la PCR Real Time in diagnostica, è stato sviluppato con un occhio di riguardo all'utilizzatore: chi non possiede una diretta esperienza in PCR cinetica può ottenere fin da subito risultati accurati e precisi, mentre l'utente esperto può esplorare tutte le possibilità offerte dallo strumento e sfruttarne al meglio le notevoli caratteristiche.

Per i test diagnostici di routine, dove il numero delle richieste è notevole, è importante poter disporre di un sistema che processi i campioni in completa automazione, dalla PCR al risultato finale, nel più breve tempo possibile: il Cobas TaqMan 48, come vedremo più avanti, risponde perfettamente a questi requisiti.

La PCR Real Time con sonde TaqMan

I test virologici presto disponibili su Cobas TaqMan (HCV, HBV, HIV) si basano sul principio delle sonde TaqMan o sonde d'idrolisi: brevi sequenze nucleotidiche che si vanno a ibridare alla sequenza target, a valle del sito di attacco dei primer.

Sulla sonda TaqMan si trovano, a stretto contatto, fluorocromo e quencher, legati chimicamente a nucleotidi vicini. In tali condizioni la sonda non emette fluorescenza.

Ad ogni ciclo di PCR la polimerasi costruisce il nuovo amplificato,incontrando lungo il suo percorso la sonda

TaqMan, che viene idrolizzata.
I frammenti si allontanano in soluzione, la miscela di reazione viene illuminata per eccitare il fluorocromo la cui fluorescenza, non più mascherata dal quencher, viene letta e misurata.
Il risultato è una curva cinetica (in figura) che riproduce l'andamento della fluorescenza totale, proporzionale alla quantità di DNA amplificato, in rapporto al numero dei cicli della PCR.

Analisi e calcolo del risultato in totale automazione
A questo punto, senza alcun intervento dell'operatore, il software del Cobas TaqMan elabora i dati raccolti:

- le letture sono processate da un algoritmo brevettato (risoluzione multicomponente) che elimina le reciproche interferenze tra fluorocromi diversi, es. target e controllo interno oppure amplificazioni simultanee di più target (multiplex);

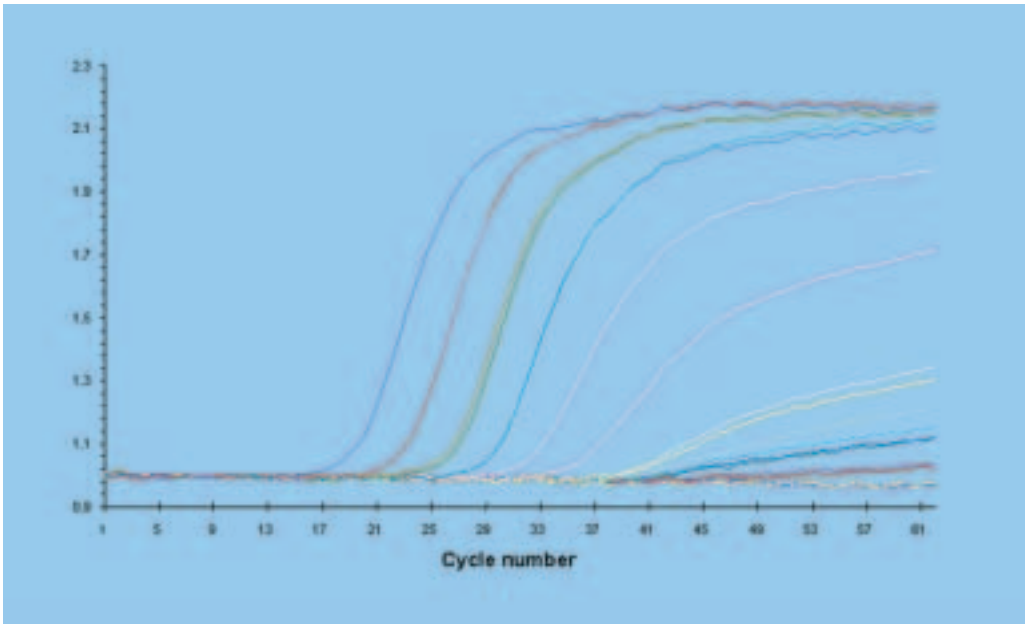
- vengono rilevate e automaticamente corrette tutte le piccole anomalie di forma della curva (spike, rumore di fondo) che potrebbero alterare i calcoli successivi;

- la curva viene ulteriormente analizzata attraverso controlli detti di plausibilità, che prendono in considerazione l'andamento della cinetica (pendenza della linea basale, monotonia).

Solo se i passaggi precedenti hanno avuto esito positivo, il calcolo del risultato può procedere:
- la curva cinetica viene derivata, per evidenziare meglio il punto di inizio della fase esponenziale della PCR, espresso in n° di cicli;
- nuovi controlli sulla forma della derivata, simili ai precedenti;
- rapporto tra curva del target e curva del controllo interno;
- calcolo del risultato, sia qualitativo che quantitativo.

Per quanto riguarda l'ultimo punto, va sottolineato che tutti i test Cobas TaqMan sono caratterizzati da un'eccellente sensibilità e da un range dinamico estremamente ampio, vantaggi ottenuti grazie all'efficienza della PCR Real Time, alla precisione della lettura in fluorescenza e all'affidabilità del software di calcolo.

Con il Cobas TaqMan 48 Roche Diagnostics intende eguagliare e superare il successo del Cobas Amplicor, ponendo una nuova pietra miliare nell'automazione in PCR grazie a un sistema che rappresenta lo stato dell'arte in termini di versatilità, semplicità d'uso, affidabilità e sicurezza.



I test disponibili sui sistemi RD per la diagnostica dell'anemia

L'anemia, considerazioni generali

L'anemia, nella sua accezione più ampia, corrisponde all'incapacità da parte del sangue di fornire ossigeno ai tessuti in quantità sufficiente per svolgere le proprie funzioni metaboliche.

L'anemia è normalmente associata a bassi livelli ematici di emoglobina oppure ad una diminuzione dell'Ematocrito (rapporto percentuale fra volume dei globuli rossi e volume del sangue intero).

All'anemia da molto tempo viene attribuita una notevole importanza per il fatto che interessa una porzione molto consistente della popolazione mondiale di tutte le età. E' stato calcolato che circa il 30% della popolazione mondiale abbia sofferto o stia soffrendo di anemia. Approssimativamente il 50% di tutte le anemie sono imputabili a carenza di Ferro, infatti il più alto grado di incidenza della malattia è stato riscontrato proprio nelle regioni meno sviluppate del mondo a causa di un insufficiente o inadeguato apporto alimentare.

Diagnostica dell'anemia

Da un punto di vista clinico la diagnosi primaria di anemia viene fatta riferendosi alla storia del paziente, alla sintomatologia e ai risultati ematologici dei referti di laboratorio.

L'anemia può essere considerata l'effetto secondario di una patologia primaria, il cui riconoscimento richiede l'identificazione del meccanismo e delle cause del deficit eri-

trocitario.
La determinazione della causa specifica di una certa anemia è fondamentale perché il medico possa mettere a punto la terapia più appropriata a quel caso.
Nella diagnosi e nel monitoraggio di un'anemia giocano un ruolo molto importante i seguenti parametri:

Ferro
Una parte dell'ossigeno presente nel sangue viene trasportato dalla *emoglobina*.
Questa quota risulta direttamente influenzata da fattori come la concentrazione di ossigeno e di CO2, il pH ematico e la temperatura corporea. L'emoglobina è una proteina ematica costituita da quattro catene proteiche con quattro gruppi eme, ciascuno di questi, contenendo Fe 2+ è in grado di legare una molecola di Ossigeno.
La concentrazione plasmatica del Ferro (Ferro non-attivo) e la sua distribuzione nell'organismo risultano di fondamentale importanza nel profilo d'esami utile alla diagnosi o al monitoraggio dell'anemia.
I disturbi metabolici del Ferro, dovuti a carenza o a cattiva distribuzione, sono tra le malattie più comunemente esaminate e mal interpretate dai clinici.
In un organismo sano adulto ci sono, in totale, circa 3 - 5 gr. di Ferro, questa quantità dipende direttamente dall'equilibrio fra assorbimento intestinale e perdite corporee. Il metabolismo del Ferro viene generalmente considerato un sistema chiuso, dato che gli scambi con l'esterno rappresentano meno dello 0.05%.
Nell'organismo umano il Ferro totale può essere diviso in tre frazioni, fra loro funzionalmente e strutturalmente diverse:
1) Ferro attivo del gruppo eme
2) Ferro plasmatico di trasporto
3) Ferro di deposito

Transferrina e Capacità Ferro-Legante Totale e Insatura
Il Ferro nel plasma è presente sostanzialmente solo in forma legata. La proteina di trasporto che veicola il Ferro nell'organismo è la Transferrina. Ogni molecola di questa proteina presenta due siti di legame per il Ferro, quindi nel plasma si può trovare in forma BI-ferrica, MONO-ferrica o APO-ferrica (priva di atomi di Ferro).
La TIBC (Total Iron Binding Capacity) rappresenta la "Capacità Ferro-Legante Totale" mentre la UIBC invece è la quota insatura della stessa capacità.
Normalmente la quota satura è solo di 1/3, mentre 2/3 restano invece insaturi (**quota insatura**).
Da un punto di vista diagnostico la quota satura viene misurata direttamente con la determinazione della concentrazione plasmatica del Ferro. La restante quota insatura, che è deputata alla regolazione dell'assorbimento intestinale del Ferro, viene misurata specificamente con test appositi per la UIBC.
Quando tutta la Transferrina risulta satura di Ferro l'assorbimento cessa del tutto. La quota insatura della Transferrina diminuisce quindi con l'aumento della sideremia, e risulta in aumento invece in condizioni di sideropenia.

Ferritina
Il Ferro viene immagazzinato nelle cellule del fegato, della milza, del midollo spinale e della mucosa intestinale, sotto forma di **Ferritina**. Questa è una macromolecola proteica la cui struttura quaternaria permette di immagazzinare nel suo interno un numero molto elevato di atomi di Ferro.
La sintesi della Ferritina viene stimolata dalla quantità di Ferro intracellulare e il dosaggio della sua concentrazione ematica risulta indicativo principalmente per una valutazione clinica delle riserve corporee di Ferro.

Recettori solubili della Transferrina
Il recettore della Transferrina è una glicoproteina dimerica bivalente. La sua funzione è legata all'assorbimento del Ferro da parte delle cellule eritropoietiche.
Questo avviene tramite un legame specifico che i recettori formano sulla superficie cellulare con la Transferrina satura di Ferro e con l'inglobamento degli atomi del metallo per endocitosi mediata dai recettori stessi.
Quando le riserve endocellulari di Ferro si abbassano la

quantità dei recettori della Transferrina aumenta proporzionalmente. La proteolisi porta alla liberazione nel plasma dei recettori solubili della Transferrina (sTfR). La concentrazione plasmatica della forma solubile risulta direttamente proporzionale alla concentrazione del recettore di membrana.

Aptoglobina

La Aptoglobina è una proteina che ha funzione di trasporto nei confronti della Emoglobina.
La piccola quantità di Emoglobina che si libera nel sangue in condizioni normali viene legata appunto all'Aptoglobina. Una riduzione del livello plasmatico di Aptoglobina libera è indice di emolisi intravascolare.

Ceruloplasmina

Di questa proteina è stata dimostrata una attività ferro-ossidasica.
Svolge infatti una importante funzione come acceleratore della velocità di ossidazione dello ione ferroso (forma di deposito) in ione ferrico (forma di trasporto). L'interesse diagnostico della Ceruloplasmina, per quanto riguarda il metabolismo del Ferro, è legato alla ossidazione di questo metallo dopo il suo rilascio da parte dei siti di deposito, e quindi alla sua disponibilità per il legame con la Transferrina.

Vitamina B12 e Acido Folico

Vitamina B12 e Acido Folico giocano un ruolo molto importante nella sintesi proteica.
Un abbassamento dei livelli serici di queste due sostanze può determinare nei globuli rossi un'alterazione del metabolismo e quindi una ridotta capacità di rigenerazione.
Carenza di Vitamina B12 e Folati è causa diretta di anemia.

Elenco dei parametri	*Sistemi Hitachi di C.C. H.912/917/Mod. P800*	*Sistemi Hitachi di IMM. H.2010/Mod. E170*	*Sistemi INTEGRA 400 PLUS/800*
Ferro	•		•
UIBC/TIBC	•		•
Transferrina	•		•
Ferritina	•	•	•
Recettori TfR	•		•
Aptoglobina	•		•
Ceruloplasmina	•		•
Vitamina B12		•	
Acido Folico sierico ed eritrocitario		•	

I benefici di un ricco pannello integrato sui sistemi di analisi RD

Roche Diagnostics con i suoi sistemi analitici di chimica clinica e di immunochimica (linea strumentale Hitachi e INTEGRA) offre un ampio pannello di test, che, parallelamente ai parametri ematologici, permette la realizzazione di un quadro clinico molto ricco per la diagnosi e il monitoraggio delle anemie.
Il carico di lavoro, il TAT (turn around time), l'automazione dei test e la riduzione dei costi sono punti essenziali per il laboratorio.
Un maggior grado di consolidamento dei test che fanno parte del profilo diagnostico dell'anemia, sui sistemi automatici del laboratorio, permette ai laboratoristi di produrre risultati analitici in minor tempo e con maggior accuratezza, e ai clinici di inquadrare meglio la patologia predisponendo più mirati interventi terapeutici.

Roche Diagnostics per la coagulazione: Affidabilità, Innovazione e Libertà

Il settore della Coagulazione richiede professionisti attenti e capaci in grado di orientare un settore che nel laboratorio è ancora in fase di crescita.
Le nuove tecnologie affiancano così quelle già consolidate e generano un modello che risponde alle moderne esigenze gestionali del laboratorio.
In questo panorama Roche Diagnostics si propone come azienda fortemente impegnata nel settore offrendo ai suoi Clienti un mix tra reagenti e strumenti di elevata qualità. Ciò permette di soddisfare diversi bisogni: eseguire al meglio la routine di laboratorio, approfondire i test coagulativi tramite la biologia molecolare, applicare la diagnostica coagulativa nei reparti ed arrivare sino all'automonitoraggio dello stesso paziente.
L'**Affidabilità** del dato clinico è garantita da un sistema di misura brevettato utilizzato dai propri strumenti ad alta tecnologia, flessibili ed utilizzabili da qualsiasi laboratorio.
L'**Innovazione** è rappresentata sia dalla evoluzione continua dei reagenti e degli strumenti per il laboratorio di coagulazione di routine sia nell'ambito dell'approfondimento diagnostico per lo studio delle mutazioni genetiche strettamente correlate, ad esempio alle trombofilie come nel caso del Fattore V di Leiden e il Fattore II.
In quest' ultimo caso Roche Diagnostics mette a disposizione innovativi test in PCR Real Time.
La **Libertà** viene offerta al paziente attraverso i sistemi di Self Monitoring, che rendono il possessore più autonomo nel controllo della terapia. Libertà che viene anche offerta al clinico che può muoversi nei reparti o nel proprio doctor office mantenendo la certezza della qualità del risultato sia per il controllo della terapia anticoagulante (PT) sia per parametri d'urgenza come il D-Dimero.

La piena realizzazione del progetto Modular

Nel numero 10 di ESADIA, pubblicato a Maggio 2002, sono state ripercorse le prime tappe seguite dal "progetto Modular".

Tale progetto prevedeva l'introduzione sul mercato del sistema **Modular SWA** passando attraverso due fasi distinte. Le due fasi comprendevano l'introduzione sequenziale dapprima dei sistemi Modular di chimica clinica (Modular D e P), proposti al mercato a partire dal 1999, e successivamente dei sistemi Modular di immunochimica (Modular E), proposti a partire dal 2001.

Nella seconda metà del 2002 si è arrivati al completamento della terza e ultima fase del "progetto Modular" che è rappresentata dall'introduzione sul mercato del sistema **Modular SWA**.

Il Modular SWA rappresenta la possibilità di avere, in un unico sistema, moduli di chimica clinica (moduli D o P) e moduli di immunochimica (moduli E).

L'acronimo S.W.A. sta per **S**erum **W**ork **A**rea ("area di lavoro del siero") e il Modular SWA rappresenta la massima espressione di consolidamento su un unico sistema analitico dei test eseguibili su un campione di siero.

La "Serum Work Area" comprende infatti tutti quei settori analitici nei quali può essere potenzialmente impiegato il siero per la determinazione di esami, spaziando dai test di Chimica Clinica, Elettroliti, Proteine specifiche, Farmaci e Droghe d'Abuso, agli Ormoni, ai Marcatori Tumorali, alle Malattie Infettive e ai Marcatori Cardiaci.

In un mercato in cui la complessità e la molteplicità delle richieste di analisi ha portato ad un progressivo aumento dei sistemi analitici dedicati a diverse tipologie di test, il sistema Modular, e in particolar modo il Modular SWA, risponde contrastando questa tendenza e proponendo un unico sistema analitico in grado di gestire tutte queste richieste.

Consolidare più aree analitiche in una significa ridurre il numero di provette per singolo campione, minimizzare gli errori pre-analitici e post-analitici, semplificare il flusso dei campioni nel laboratorio, gestire un minor numero di strumenti analitici, aumentare la produttività riducendo il Turn Around Time (TAT), migliorare la congruenza dei dati analitici, ridurre ed ottimizzare gli investimenti e i costi di gestione del laboratorio oltre che ridurre il numero di fornitori e semplificare le procedure amministrative.

Modular SWA, dalla seconda metà del 2002, ad oggi è stato introdotto in un elevato numero di laboratori. Si tratta di realtà molto diverse tra loro, pubbliche e private, con carichi di lavoro ed esigenze naturalmente molto diverse.

Modular SWA ha fornito in ognuna di queste realtà una soluzione ottimale, perchè per ognuna di esse è stata proposta la configurazione di moduli e di test che più si è adattata alle richieste del cliente.

Per il Modular, infatti, a differenza di quanto succede con gli strumenti non "modulari", non esiste una risposta unica alle necessità del laboratorio. La composizione dei moduli e il pannello dei test possono essere modificati a piacere. E' inoltre, possibile implementare il sistema, in tempi successivi, aggiungendo uno o più moduli o modificando il tipo di moduli già presenti, senza tuttavia incorrere in tutti gli svantaggi che si hanno quando si cambia la strumentazione (utilizzo di reattivi diversi, software diversi, training del personale).

In tutti i casi, i vantaggi portati da **Modular SWA** sono principalmente di tipo organizzativo e, a ricaduta, economico.

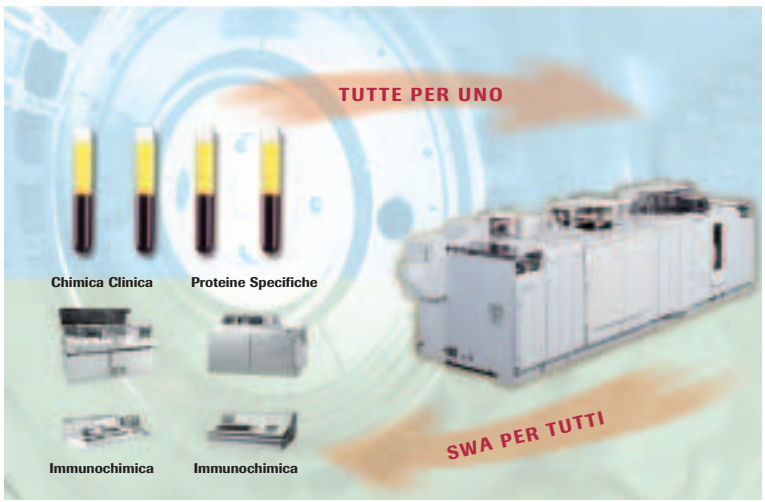
I laboratori hanno quindi, la possibilità di trasferire su un unico strumento test che vengono eseguiti su strumentazioni diverse.

Questo permette di ridurre il tempo dedicato al training del personale e, permettendo nel contempo, un miglior utilizzo dello stesso strumento da parte di più persone (vedi urgenze).

Il consolidamento di più test rende possibile un notevole risparmio di provette, semplifica le procedure di accettazione e di prelievo ai reparti, riducendo le possibilità di errore e permette una migliore tracciabilità del campione.

Il migliore e più razionale utilizzo del personale di laboratorio (sia tecnico che laureato) da maggior spazio ad altre attività quali la didattica, la formazione, la sicurezza e il controllo di qualità.

Tutto questo è stato possibile anche nei laboratori in cui ad un Modular di chimica clinica è stato aggiunto un modulo di immunologia, permettendo di ottenere tutti i vantaggi fin qui descritti, senza impatti negativi sulla gestione routinaria del laboratorio.



Modular SWA è stato proposto ai laboratori solo dopo che i sistemi separati di chimica clinica e di immunologia avevano dimostrato affidabilità e qualità. Le installazioni del Modular SWA eseguite ad oggi stanno dimostrando che l'unione di questi sistemi ha portato alla stessa affidabilità e qualità, caratteristiche consolidate dei sistemi RD/Hitachi.

Cobas Integra 400 plus e Abuscreen OnLine di II[a] generazione: il non plus ultra per lo screening delle droghe d'abuso

Il problema droga all'alba del nuovo millennio non accenna a ridursi: le statistiche mostrano anzi un preoccupante incremento del fenomeno, a fronte di una minore attenzione dei media e dell'opinione pubblica. Si è assistito infatti nell'ultimo decennio ad una progressiva "normalizzazione" del fenomeno: alle piazze dello spaccio si sono sostituite nuovi innumerevoli punti di smercio più silenziosi e meno visibili. Il mercato si è diversificato, riuscendo a trasformare le droghe in beni di consumo. Il "consumatore" ha oggi una vasta scelta di sostanze fra cui scegliere, legali ed illegali insieme, e la poliassunzione è una pratica sempre più diffusa. I cocktails sono costituiti da droghe "classiche", come cocaina o cannabinoidi, da droghe emergenti, come l'ecstasy, oltre che da alcool e psicofarmaci.

Nel complesso le statistiche evidenziano un incremento degli utilizzatori di droghe: a fronte di un calo nel consumo di eroina, cresce invece notevolmente il consumo di cocaina, cannabinoidi ed ecstasy, con una sempre maggiore diffusione di queste sostanze fra i minorenni.

Ed è in particolare sui giovani e giovanissimi che si devono concentrare gli sforzi di tutti gli operatori del settore affinchè l'*uso occasionale* di droga non abbia tempo e modo di trasformarsi in *abuso e dipendenza*.

A questo proposito, il laboratorio analisi stesso riveste un ruolo molto importante, che non è limitato alla sola identificazione di consumatori abituali e cronici o al monitoraggio dell'eventuale trattamento terapeutico cui

essi sono sottoposti, ma è anche e soprattutto di *diagnosi precoce* dei nuovi utilizzatori occasionali.
La probabilità che i primi contatti di una persona con le sostanze d'abuso non abbiano seguito, sono maggiori tanto prima si riesce ad intervenire con adeguato sostegno ad opera anche dei diversi attori sociali.

Il dosaggio delle sostanze d'abuso nei campioni biologici rappresenta un valido strumento a questo scopo, se è in grado di evidenziare con certezza l'avvenuta esposizione del soggetto in esame con la sostanza.E' quindi indispensabile eseguire analisi cromatografiche, che risultano però particolarmente complesse e costose.
E' pertanto di primaria importanza poter disporre di un test preliminare di screening dotato di un alto livello di specificità e che sia sufficientemente semplice da automatizzare, al fine di analizzare un alto numero di campioni in modo efficiente ed economico.
E' in questo contesto che si inserisce la ormai trentennale attività di Roche Diagnostics, impegnata a sviluppare tecnologie nel settore droghe d'abuso che siano rispondenti alle crescenti aspettative di qualità e praticità del laboratorio di tossicologia.
Con il marchio Abuscreen, Roche Diagnostics si è fatta conoscere presso gli operatori del settore a partire dal 1972 con una innovativa, per quel periodo, linea di reagenti per il dosaggio delle droghe d'abuso in RIA (Radio Immuno Assay) in grado di offrire ai pionieri di questo tipo di indagini il primo sistema di analisi applicabile in routine. Fino alla dismissione di questa linea, avvenuta nel 1997, il metodo veniva giudicato dagli utilizzatori molto affidabile nello screening urinario e nell'uso medico-forense.
Nel 1991 Roche Diagnostics introduce sul mercato la linea Abuscreen OnLine, basata sulla tecnologia KIMS (Kinetic Interaction Microparticles in Solution) messa a punto nei propri laboratori di ricerca negli Stati Uniti. Questa tecnologia, continuamente, aggiornata negli anni, presenta notevoli vantaggi sia dal punto di vista analitico che di praticità operativa non solo rispetto ai metodi RIA, ma anche rispetto ai metodi EIA lanciati agli inizi degli anni '80.
I reagenti OnLine sono applicati su entrambe le linee dei sistemi Integra e Hitachi di Roche Diagnostics.
Essi sono basati su un metodo immunochimico in fase omogenea, e su un principio di competizione. Quando un campione è negativo, gli anticorpi liberi si legano con le microparticelle con adesa la droga in esame, dando origine a macroaggregati in grado di aumentare l'assorbanza del campione. Nel caso in cui nel campione è presente la sostanza target (positivo), quest'ultima compete con le microparticelle per gli anticorpi liberi. Come conseguenza, la sostanza target lega l'anticorpo impedendo così la formazione di macroaggregati e l'assorbanza viene proporzionalmente ridotta in funzione della concentrazione della droga presente (Fig. 1 e 2).
Attraverso questo meccanismo d'azione, con Abuscreen OnLine è possibile misurare un ampio range di concentrazioni per le diverse sostanze ricercate, con un bilanciamento ottimale fra sensibilità e specificità, tale da garantire una elevata capacità discriminante intorno hai valori decisionali.
La diffusione della luce è regolata da una funzione mate-

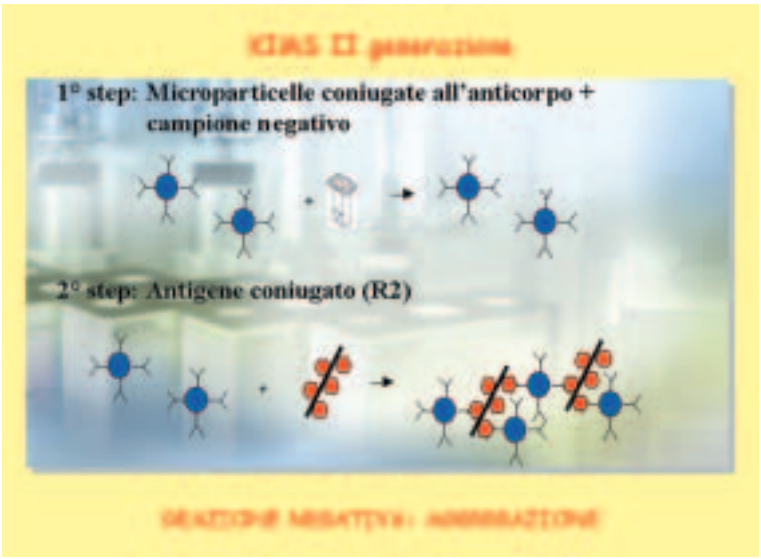


FIG. 1

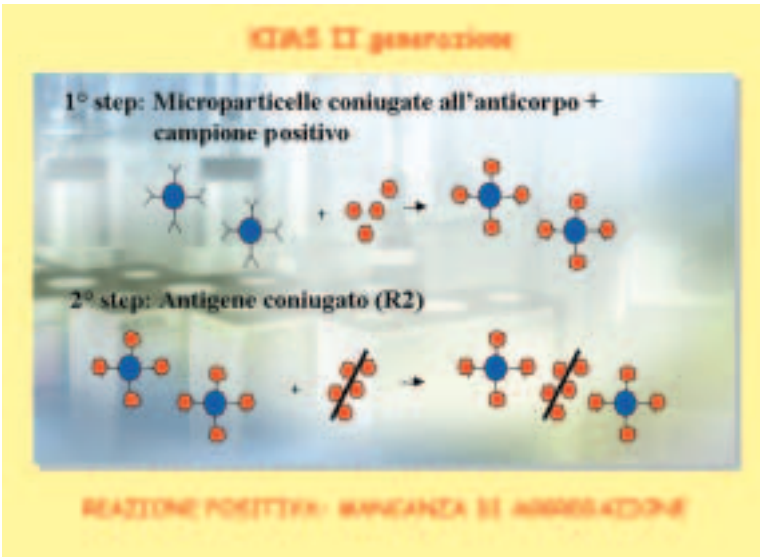


FIG. 2

matica, in base alla quale tanto è maggiore la dimensione delle particelle tanto maggiore sarà la luce dispersa. Sulla base di questo principio è facile intuire che la formazione di aggregati particellari consente uno scattering di luce elevato e quindi particolarmente sensibile.
L'elevata pendenza della curva di calibrazione garantisce un'eccellente discriminazione in particolare in prossimità del cut-off. L'elevata accuratezza comporta un minor numero di campioni da inviare all'analisi di conferma, con un notevole risparmio per il laboratorio, sia per quanto riguarda i costi che i tempi di risposta.
L'aggregazione di microparticelle in soluzione rende il test estremamente robusto poichè l'avvenuta reazione comporta un vero e proprio cambio dello stato fisico nella soluzione.
La tecnologia KIMS mostra, inoltre, una notevole robustezza nei confronti delle sostanze adulteranti che più comunemente vengono utilizzate per negativizzare i campioni. A fronte di campioni adulterati il comportamento dei test Online non subisce mediamente variazioni (nessun effetto), ad eccezione di alcune sostanze particolarmente aggressive che inducono a risultati positivi, correttamente classificati alla successiva analisi di conferma (Fig. 3).
Un altro importante vantaggio della tecnologia KIMS è l'assenza di effetto gancio, a conferma di una totale affidabilità e sicurezza del risultato.
Ad ulteriore supporto dell'interesse di Roche Diagnostics per questo settore, sta per essere immessa in commercio la seconda generazione dei reagenti OnLine, che sostituirà, entro il prossimo anno la linea attuale per lo screening delle droghe d'abuso. Il primo test della 2° generazione (Oppiacei II) è già in commercio da tempo e a partire dal mese di giugno prossimo sarà disponibile il Metadone II.

Adulterante	esito
Sale	nessuno
Aceto	nessuno
Proteine	nessuno
Aspirina	nessuno
Benedril	nessuno
Glutaraldeide	positivo
Candeggina	positivo

FIG. 3

La seconda generazione costituisce un ulteriore miglioramento delle performances dei test.
La nuova formulazione del reagente di seconda generazione, in cui l'anticorpo è adeso alla superficie delle microparticelle e non più in soluzione nel reagente, migliora la stabilità del reagente, che per il metadone sarà di ben 12 settimane a bordo degli analizzatori Integra 400 plus e Integra 800.
I miglioramenti non sono solo di ordine pratico e gestionale, ma incidono anche sulla qualità dei risultati, grazie ad un incremento di precisione:

	Oppiacei		*Metadone*	
Precisione	**Nella serie**	**Tra serie**	**Nella serie**	**Tra serie**
I generazione	2,5%	4%	3%	4%
II generazione	1,8%	3,1%	2%	2,5%

Da segnalare inoltre una miglior specificità e sensibilità degli OnLine di II^{a} generazione, oltre che un'aumentata linearità, come mostra la tabella, che riduce ripetizioni e diluizioni.

Linearità	*Oppiacei*	*Metadone*
I generazione	600 ng/ml	600 ng/ml
II generazione	2.000 ng/ml	2.000 ng/ml

Inoltre, in virtù del fatto che gli OnLine di II^{a} gen. sono bi-reattivi, mentre la generazione precedente era tri-reattiva, la produttività dei sistemi Integra nel dosaggio delle droghe d'abuso viene ad essere raddoppiata: Cobas Integra 400 plus è ora in grado di produrre 300 risultati all'ora, mentre Cobas Integra 800 ne produce 600!.
Risulta evidente che la linea Cobas Integra è in grado di soddisfare le esigenze di ogni tipologia di laboratorio analisi, offrendo sistemi adeguati al carico e alla modalità di lavoro di ogni laboratorio.
Per quanto riguarda il laboratorio di tossicologia o comunque il laboratorio che sceglie di dedicare un sistema allo screening delle droghe d'abuso, Cobas Integra 400 plus, in particolare, è il sistema ideale in grado di sostenere un carico di lavoro fino a 100.000 determinazioni all'anno. Per carichi superiori, il sistema più indicato è Cobas Integra 800.
E ciò grazie all'integrazione di 4 tecnologie in un unico sistema:
- assorbanza per la determinazione di enzimi e substrati,

fra cui la creatinina nelle urine per la valutazione dell'integrità del campione
- potenziometria diretta ed indiretta per la determinazione di sodio, potassio, cloro e litio
- turbidimetria per la determinazione delle droghe d'abuso
- fluorescenza polarizzata per il monitoraggio terapeutico di un pannello completo di farmaci, fra cui benzodiazepine e barbiturati nel siero, oltre che salicilati e acetaminofene

Cobas Integra 400 plus consente l'esecuzione di un pannello completo di Droghe d'abuso con la possibilità di estendere la misurazione ai parametri di tossicologia sierica.
Il sistema è semplice da utilizzare, è pronto all'uso 24 ore su 24 e consente una sicurezza totale del risultato grazie alle cuvette monouso che evitano qualsiasi tipo di trascinamento, al sensore di coaguli che assicura una corretta dispensazione del campione ed al nuovo sistema ICVC (Integrated Cassette Volume Check) che garantisce la corretta dispensazione dei reagenti.
A ciò dobbiamo aggiungere le caratteristiche di convenienza operativa dei reagenti OnLine, che rendono Cobas Integra 400 plus davvero ineguagliabile. I reagenti, liquidi e pronti all'uso, sono caratterizzati dalla più elevata stabilità a bordo presente oggi sul mercato (dai 2 ai 3 mesi). In virtù di ciò, le calibrazioni sono richieste solo al cambio di lotto e a parità di lotto, ogni 12 settimane.
Per diversi test vi è la possibilità di scegliere fra cut-off diversi, a seconda delle esigenze del cliente, con la disponibilità di controlli multiparametrici con concentrazioni coerenti ai cut off in uso.
Per laboratori che invece scelgono di consolidare l'analisi delle droghe con la routine di chimica clinica, Cobas Integra 800 può rispondere molto bene alle esigenze di un laboratorio di medie dimensioni, mentre Modular è la soluzione per grosse routine.

Roche Diagnostics conferma in modo tangibile l'interesse che ha sempre rivestito in questo settore, investendo costantemente nella ricerca per poter garantire agli operatori del settore una sempre migliore e rinnovata offerta, orientata ai criteri di qualità e convenienza organizzativa per il laboratorio.
Ci auguriamo in questo modo di poter dare un contributo positivo nella gestione delle problematiche complesse che il laboratorio di tossicologia deve affrontare quotidianamente.

NT-proBNP: il contributo del Laboratorio nello Scompenso Cardiaco

Lo scompenso cardiaco è la risultante di numerose condizioni cliniche quali malattie coronariche e sue conseguenze (ad es. infarto miocardico), ipertensione, difetti alle valvole e affezioni primarie del muscolo cardiaco.

Le più frequenti cause di insufficienza ventricolare sinistra restano comunque l'ipertensione e le malattie coronariche. Lo sviluppo dell'insufficienza cardiaca è generalmente lento ed una forma asintomatica può richiedere anni prima di essere riconosciuta, poichè nella prima fase della malattia si verifica una ipertrofia del muscolo cardiaco che consente una eiezione non scompensata del sangue dal ventricolo sinistro. Questo evento è chiamato disfunzione diastolica del ventricolo sinistro.

Quando la patologia progredisce si verifica poi una dilatazione del ventricolo sinistro associata ad una ridotta frazione di eiezione.

Questo evento è chiamato disfunzione sistolica del ventricolo sinistro. Ed è a questo stadio della malattia che i pazienti diventano frequentemente sintomatici.

Lo scompenso cardiaco costituisce oggi uno dei maggiori problemi sanitari mondiali ed è anche la sola patologia cardiovascolare la cui prevalenza ed incidenza sono in continuo aumento. Nelle sue fasi iniziali questa patologia risulta spesso difficile da diagnosticare, in quanto la sintomatologia caratteristica, quale mancanza di fiato, gonfiore agli arti inferiori ed affaticamento non è affatto specifica della patologia e, nei casi più lievi, può risultare addirittura assente.

Oggi circa il 2 % della popolazione occidentale (circa 10 milioni di persone) soffre di scompenso cardiaco sintomatico, ed una situazione ancor più critica si ritrova nei soggetti con oltre 70 anni, dove la prevalenza può arrivare fino al 10 %.

Le spese ospedaliere costituiscono quindi una quota rilevante dell'onere economico correlato a questa patologia, dal momento che essa altera profondamente sia la qualità della vita che l'aspettativa di vita dei pazienti più gravi, provocando di conseguenza un costante aumento dei ricoveri e delle degenze ospedaliere.

I mezzi abitualmente utilizzati dai medici per una diagnosi iniziale di scompenso cardiaco sono l'esame fisico del paziente, l'ECG ed i raggi X al torace, anche se di recente sono state introdotte tecniche più sofisticate, ma molto specialistiche, quali l'ecocardiografia, l'angiografia nucleare e la risonanza magnetica cardiaca.

Nessuna di queste tecniche tuttavia, nella pratica clinica quotidiana, è risultata essere completamente affidabile e totalmente applicabile per una diagnosi precoce di disfunzione ventricolare.

Anche l'attuale "gold standard", e cioè l'ecocardiografia, presenta infatti alcuni inconvenienti poichè necessita della disponibilità costante di attrezzatura adeguata oltre che di personale altamente qualificato (con costi elevati), e non è neppure utilizzabile sulla totalità dei potenziali pazienti (presenza di adiposità o di enfisema).

Nonostante i significativi sviluppi nella comprensione della fisiopatologia e nel trattamento dello scompenso cardiaco, esso rappresenta ancora uno dei problemi sanitari in cui le esigenze mediche non sono state completamente soddisfatte (Tab.1)

Le nuove Linee Guida Europee (ESC Guidelines)

Per venire incontro a tali esigenze, la ***European Society of Cardiology*** nel 2001 ha istituito una apposita task force avente l'obiettivo di definire proprio le nuove

"Linee Guida per la Diagnosi ed il Trattamento dello Scompenso Cardiaco Cronico" (ESC Guidelines).

Il risultato di questo lavoro è stato pubblicato sull'***European Heart Journal*** ed ha, tra l'altro, per la prima volta introdotto l'impiego sistematico dei Peptidi Natriuretici quale supporto al processo diagnostico per lo Scompenso Cardiaco.

Nello scompenso cardiaco infatti, i livelli presenti nel sangue dei Peptidi Natriuretici Cardiaci ANP e BNP risultano sensibilmente aumentati (proporzionalmente al grado dello scompenso) a causa del sovraccarico volumetrico e dell'aumentata pressione nel miocardio.

Poiché poi il BNP viene rilasciato principalmente dal ventricolo (mentre l'ANP dall'atrio), esso risulta essere anche il marcatore più specifico nei confronti di una sospetta disfunzione ventricolare (Fig 1).

Questo fatto può rivelarsi estremamente utile ai fini diagnostici, ed è stato infatti recepito dalle Linee Guida ***(ESC Guidelines)*** emanate dalla European Society of Cardiology.

Queste hanno indicato proprio nella determinazione preliminare dei Peptidi Natriuretici, unitamente o in alternativa ai tradizionali ECG e RX torace (già diffusamente utilizzati per la ricerca di danni al miocardio) la discriminante per decidere se effettuare o meno sul paziente un accertamento diagnostico più approfondito, con l'impiego di tecniche strumentali più sofisticate quali l'ecocardiografia, la risonanza magnetica o l'angiografia nucleare, oppure se ricercare le cause in altre direzioni sulla base dei sintomi presenti.

Un elevato livello dei Peptidi Natriuretici sarà infatti indicativo della presenza di una sottostante disfunzione cardiaca, ma richiederà necessariamente indagini più approfondite per una conferma della diagnosi.

Viceversa, un livello normale dei Peptidi Natriuretici tenderà virtualmente ad escludere la presenza di una disfunzione cardiaca, dal momento che è stato dimostrato il loro elevato valore predittivo negativo.

TABELLA 1

ESIGENZE MEDICHE PER LO SCOMPENSO CARDIACO

- Un test obiettivo ed affidabile per l'identificazione dei pazienti con disfunzione ventricolare (sistolica e diastolica), in particolare dei pazienti nello stadio iniziale della patologia.
- Un marcatore più accurato per la stratificazione del rischio nei pazienti con scompenso cardiaco cronico.
- Un test semplice e riproducibile per il monitoraggio della terapia, che permetta di ottimizzare ed affinare il trattamento stesso.

N-Terminal proBNP

Il BNP (Brain Natriuretic Peptide), così denominato perchè originariamente rinvenuto nel cervello di maiale (anche se prodotto prevalentemente nei ventricoli cardiaci) viene sintetizzato sotto forma di pro-ormone denominato appunto proBNP.

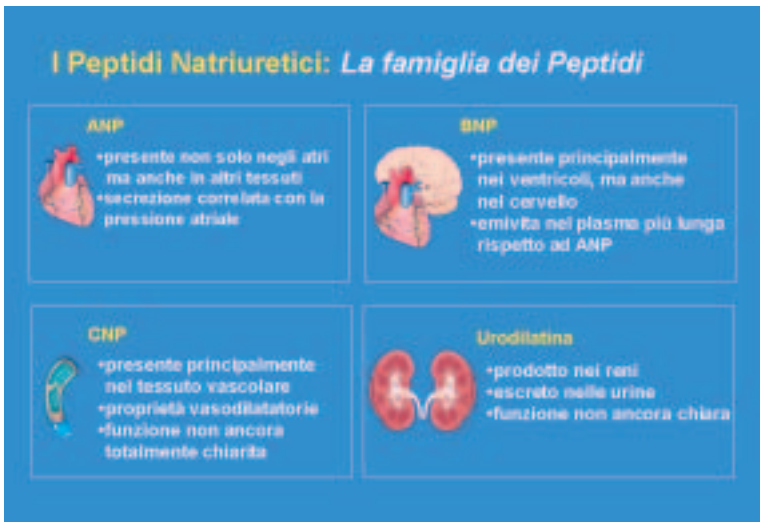
Dopo stimolazione dei cardiomiociti, ad esempio a seguito di distensione delle pareti ventricolari, il pro-ormone proBNP viene rilasciato in circolo e quindi immediatamente scisso da una proteasi nel frammento N-Terminal proBNP (NT-proBNP) e nel peptide BNP biologicamente attivo (Fig.2).

L'emivita in vivo di NT-proBNP e di circa 60-120 minuti ed è pertanto più elevata rispetto a quella di BNP che è inferiore ai 20 minuti.

Numerosi studi hanno evidenziato che la concentrazione di BNP e di NT-proBNP risulta aumentata nei pazienti con disfunzione ventricolare, e che il livello di questi marcatori risulta direttamente correlato con la gravità dello scompenso cardiaco.

Poiché è stato anche dimostrato che il 50% circa dei soggetti con insufficienza respiratoria presenta sintomi del tutto simili a quelli dello scompenso, pur in totale assenza di una patologia cardiaca, diviene spiegabile come mai una elevata percentuale (attorno al 40%) delle diagnosi iniziali di Scompenso Cardiaco non risulti poi confermata dagli accertamenti diagnostici strumentali più approfonditi eseguiti successivamente.

FIG 1



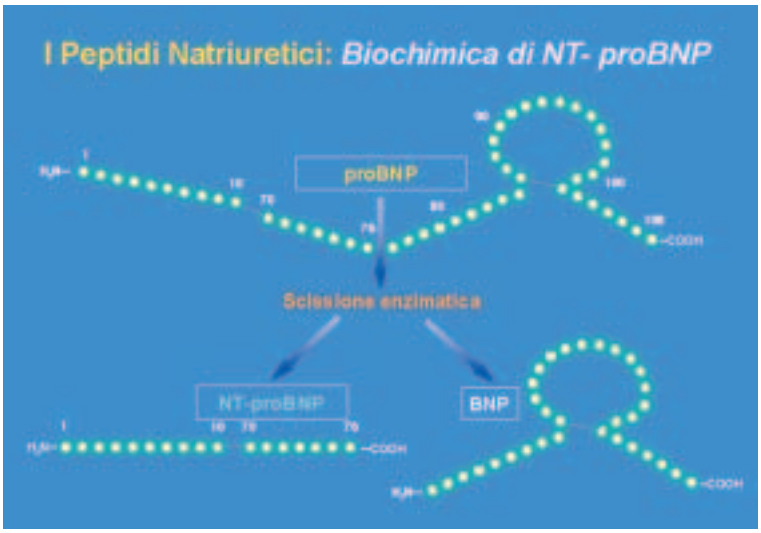


Fig 2

Dal momento però che la presenza di determinati sintomi costituisce spesso il principale indicatore per decidere il trattamento di un paziente, può talvolta accadere che soggetti sintomatici, ma esenti da qualsiasi disfunzione cardiaca, vengano dai Medici di base inutilmente indirizzati ad ulteriori accertamenti cardiologici, oppure direttamente sottoposti ad una specifica terapia per lo scompenso.

Per tali motivi il dosaggio di NT-proBNP può rivelarsi di grande aiuto per:

- Escludere (o confermare) una diagnosi iniziale di disfunzione cardiaca in soggetti con sintomi tipici dello scompenso.
- Stratificare il rischio nei pazienti scompensati cronici
- Valutare il rischio di morte nei pazienti con sintomi di una Sindrome Coronarica Acuta (SCA)
- Guidare il trattamento terapeutico del paziente, evitando nel contempo casi di "eccessi di trattamento" sulla base di un semplice sospetto e non della effettiva presenza di uno scompenso cardiaco.

Il test Elecsys® ProBNP

Roche Diagnostics ha già dal 2002 messo a disposizione del Laboratorio Analisi il nuovo test ***Elecsys® ProBNP***, con tecnologia ECLIA (Elettrochemiluminescenza), in grado di dosare proprio il frammento NT-ProBNP. In pochi minuti, in maniera completamente automatizzata e con le stesse modalità operative di un normale test immunologico di routine, si rende così questo dosaggio disponibile a qualsiasi laboratorio dotato di un sistema Elecsys o Modular E 170.

Prestazioni del test Elecsys ProBNP

- Automazione completa sui sistemi Elecsys e Modular E170
- Durata del test in solo 18 minuti
- Elevata sensibilità analitica (5 pg/ml) e funzionale (< 50 pg/ml)
- Ampio intervallo di misura, fino a 35.000 pg/ml senza diluizione
- Notevole precisione analitica intra ed inter-assay (CV inferiori al 4%)
- Eseguibile su siero oppure plasma con eparina od EDTA

Perché Roche Diagnostics ha scelto NT-proBNP e non BNP ?

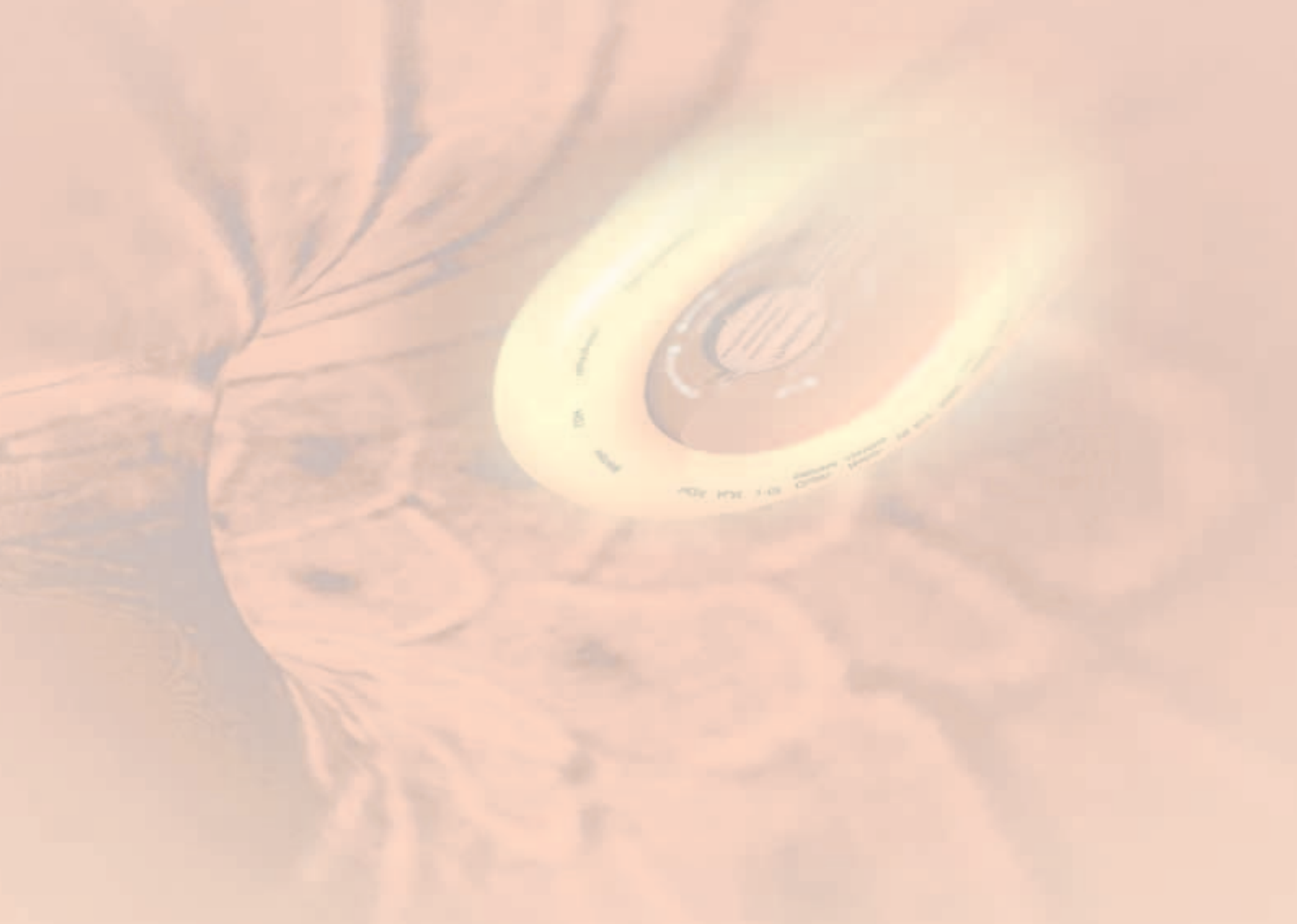
NT-proBNP si distingue dagli altri peptidi natriuretici per alcune caratteristiche esclusive che lo rendono estremamente più pratico nell'impiego diagnostico e quindi preferibile per lo sviluppo di un test destinato a divenire, molto probabilmente, di impiego routinario in ogni laboratorio.

Una licenza esclusiva è stata pertanto acquisita da Roche Diagnostics per lo sviluppo e la commercializzazione del test immunologico ***Elecsys® ProBNP*** per il dosaggio del frammento NT-proBNP che, pur vantando un analogo significato clinico ed impiego diagnostico, presenta numerosi vantaggi rispetto al peptide BNP :

- Minor variabilità biologica intra-individuale
- Concentrazione nel sangue da 10 a 100 volte più elevata
- Più lunga emivita in vivo (1 - 2 ore)
- Minima dipendenza dalle modalità del prelievo
- Miglior stabilità in vitro fino a 3 giorni a temperatura ambiente e 5 giorni a 4 - 8 °C
- Nessun problema per conservazione e trasporto dei campioni
- Completamente automatizzabile, anche congiuntamente agli altri marcatori cardiaci
- Facilmente integrabile nel normale flusso di lavoro di ogni laboratorio.

In conclusione, il valore del test ***Elecsys® ProBNP***, che il Laboratorio Analisi può oggi fornire al Cardiologo in pochi minuti, consente sicuramente una miglior gestione complessiva del paziente con scompenso cardiaco, a partire dalla diagnosi iniziale fino al suo più efficiente trattamento e monitoraggio terapeutico.

Il tutto anche con un sensibile contenimento dei costi sanitari conseguente alla possibilità di una più mirata richiesta di costosi esami strumentali, spesso anche causa di lunghe liste di attesa per i pazienti.



IVR0305

Roche Diagnostics

Roche Diagnostics
Viale G.B. Stucchi, 110
20052 Monza (MI)
www.roche-diagnostics.it