

## Una anemia in gravidanza da indagare attentamente

Giuseppina Barberio, Flavia Bassetto, Eleonora Cover, Emanuela Gorrasi, Federica Martignago, Chiara Mattiuzzo, Annalisa Pegoraro, Silvia Zago

UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ulss 2 "Marca Trevigiana", Treviso

Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso SIBioC 11-13 Ottobre 2021, Virtual Edition, nella sessione Casi clinici

### ABSTRACT

#### A pregnant woman with anemia to be carefully investigated.

A 29-year-old woman, of Italian origin (Treviso, Italy), during her second pregnancy, was examined at the out-patients section of the laboratory a few years ago, to investigate the anemic status. Among the clinical information available on that occasion, there was a diagnosis of hemolytic anemia due to a possible haemoglobinopathy, that had led to a splenectomy at the age of 24 years. The hemoglobin pattern performed using a HPLC instrument (Variant II, Bio-Rad, USA) did not show the presence of any hemoglobin variant, but a reduced value of HbA<sub>2</sub> was observed. At that time, the anemia was not particularly marked considering the pregnancy (92 g/L (r.i. 120-160)). Further investigations to check the presence of unstable variants and the characterization of the variants by mass spectrometry, together with the clinical history of the family, allowed to characterize an unstable variant of the alpha globin chains (Hb Torino) and to identify a condition of alpha thalassemia *in trans*. During her third pregnancy, the monitoring of the glycemetic status showed particularly low values of glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) due to the instability of the Hb variant present.

**Keywords:** varianti emoglobiniche, anemia, gravidanza

### CASO CLINICO

Qualche anno fa, una donna di 29 anni, in occasione della sua seconda gravidanza, era stata esaminata per il monitoraggio di uno stato anemico. Dalla sua storia clinica, portata a conoscenza del laboratorio, era emersa una diagnosi di anemia emolitica dovuta alla sospetta presenza di una emoglobinopatia accompagnata da una splenomegalia importante, per la quale era stata necessaria una splenectomia all'età di 24 anni. Gli esami eseguiti in quella occasione sono presentati nella Tabella 1. L'assetto emoglobinico, eseguito mediante cromatografia ad alta risoluzione (HPLC- VARIANT II™ Dual Kit program, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) non aveva rivelato la presenza di frazioni anomale, mentre il valore dell'HbA<sub>2</sub> risultava leggermente diminuito. La storia clinica della paziente e della sua famiglia aveva suggerito in quella circostanza alcuni approfondimenti diagnostici di livello

intermedio (1) mediante l'esame *in vitro* della stabilità dell'emoglobina (Hb) e la ricerca di inclusioni eritrocitarie a 37 °C mediante Brilliant Cresil Blue (BCB), esami risultati entrambi positivi. Questo aveva portato, in accordo con il curante e dopo aver ottenuto il consenso informato della paziente, all'invio di un campione di sangue prelevato in EDTA a laboratori di riferimento per la caratterizzazione, mediante esami di 2° livello, del difetto Hb sospettato. Questo percorso diagnostico, previsto dalle linee guida per le emoglobinopatie (2), aveva soprattutto un obiettivo prognostico rivolto, nel caso specifico, ad una donna in gravidanza, splenectomizzata. Lo studio strutturale mediante spettrometria di massa, la successiva conferma mediante analisi dei geni alfa, nonché la ricerca di difetti alfa talassemici eventualmente co-ereditati, hanno portato a definire nella probanda la presenza di alfa talassemia NG\_000006.1:g.34164\_37967del3804 [3.7 kb (type I) deletion alpha-2] allo stato eterozigote e la mutazione

Corrispondenza a: Giuseppina Barberio, UOC Medicina di Laboratorio, Ospedale di Treviso, ULSS2 "Marca trevigiana", Treviso  
Cell 3479840508, E-mail giuseppina.barberio@aulss2.veneto.it

Ricevuto: 12.12.2021

Revisionato: 21.12.2021

Accettato: 14.01.2022

Pubblicato on-line: 25.01.22

DOI: 10.19186/BC\_2022.005

*HBA2:c.130T>G* [ $\alpha$ 43(CE1) Phe>Val]. Quest'ultimo difetto strutturale dei geni alfa corrisponde alla variante rara denominata Hb Torino descritta in letteratura associata a diverse espressioni cliniche (3).

In seguito al riscontro di questa variante erano state date indicazioni alla paziente di evitare l'assunzione di farmaci e sostanze con caratteristiche ossidanti (4).

Più recentemente, in occasione della sua terza gravidanza, alla 24<sup>a</sup> settimana, la paziente è stata nuovamente osservata in laboratorio (Tabella 1) anche per la valutazione della emoglobina glicata (HbA<sub>1c</sub>), in seguito ad un recente riscontro di una modesta alterazione della glicemia. In assenza di adeguate informazioni anamnestiche collegate alla richiesta, il laboratorio ha eseguito la determinazione della HbA<sub>1c</sub> utilizzando un metodo separativo in elettroforesi capillare (Capillarys HbA<sub>1c</sub> kit - Sebia, Lisses, France) (Figura 1) ottenendo un valore particolarmente basso (12 mmol/mol) (i.r. 42-47). Tale risultato, analiticamente corretto, non ha contribuito a fornire informazioni circa un eventuale diabete pre-gestazionale o gestazionale, mentre ha aiutato a confermare la natura emolitica del difetto globinico, in precedenza accertato. Valori bassi di HbA<sub>1c</sub> possono infatti essere segnali di una ridotta sopravvivenza eritrocitaria come accade in presenza di varianti instabili o di altre cause emolitiche.

## DISCUSSIONE

La popolazione italiana è caratterizzata da una marcata ed eterogenea presenza di difetti talassemici e strutturali dell'emoglobina; su questa evidenza si basano le indicazioni per strategie di prevenzione, contenute in diverse raccomandazioni e linee guida (2,5), emanate nel tempo. Il momento privilegiato per individuare eventuali rischi di trasmissione genetica di questi difetti è quello pre-concezionale, ma spesso le prime settimane di gravidanza rappresentano l'occasione per eseguire per la prima volta controlli ed esami specifici per le emoglobinopatie. La rarità di taluni difetti associati a caratteristiche cliniche ed ematologiche, non facilmente riconducibili a percorsi diagnostici classici di laboratorio, possono produrre diagnosi non corrette, soprattutto quando una adeguata informativa pre-test non viene prodotta al laboratorio o comunque non è disponibile.

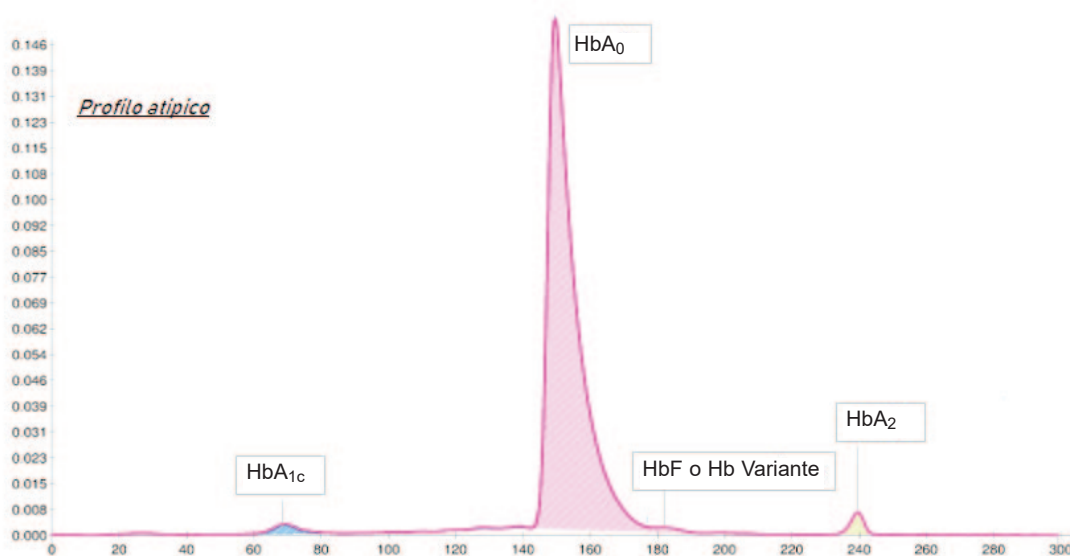
L'Hb Torino che si è potuta accertare nel corso della seconda gravidanza della paziente è una variante dell'Hb documentata per la prima volta nel 1968 (6) in una famiglia originaria di Treviso residente a Torino e, successivamente, in altre famiglie del Trevigiano (3,7), apparentemente non imparentate tra loro. L'unica eccezione riportata in letteratura è rappresentata dall'osservazione di questa variante su una donna libanese; tuttavia in questo caso gli esami effettuati avevano portato a supporre un'origine *de novo*.

**Tabella 1**

*Risultati degli esami eseguiti nel corso delle due gravidanze*

	Alla 2 <sup>a</sup> gravidanza	Alla 3 <sup>a</sup> gravidanza	Valori di riferimento
Età (anni)	29	39	
Emoglobina (g/L)	92	99	120 – 160
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L)	3,29	3,93	4,13 – 5,15
MCV (fL)	95,3	89,4	81,8 – 95,3
MCH (pg)	27,9	25,1	27 – 31
Ematocrito (L/L)	0,31	0,35	0,38 – 0,47
Reticolociti (%)	4,20	4,88	0,5 – 2,5
HbA <sub>2</sub> (%)	2,3	2,1	2,5 – 3,2
HbF (%)	1,3	1,3	<1
HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol)	–	12	42 – 47
Sideremia (βg/dL)	87	–	37,0 – 145,0
Ferritina (ng/mL)	193	–	13 – 150
Aptoglobina (mg/dL)	19	–	30 – 200
Bilirubina totale (mg/dL)	1,9	–	<0,9
Bilirubina indiretta (mg/dL)	1,4	–	<0,6
Lattato deidrogenasi (U/L)	424	–	135 – 214

*MCV, Volume Corpuscolare medio; MCH, Concentrazione Emoglobinica Media.*



**Figura 1**

Elettroferogramma ottenuto dalla quantificazione dell'HbA<sub>1c</sub>. I valori dell'HbA<sub>1c</sub> e dell'HbA<sub>2</sub> sono particolarmente ridotti; l'Hb Torino non viene evidenziata.

La fenilalanina (Phe) in CD1 rappresenta un residuo amminoacidico (aa) idrofobico ingombrante che nelle catene globiniche fa parte della tasca dell'eme. Oltre all'Hb Torino, sono note in particolare altre due varianti delle catene beta che in posizione omologa (CD1) presentano la sostituzione dell'aa Phe: l' *HBB*:c.128T>C [β42(CD1) Phe>Ser] denominata Hb Hammersmith, e l' *HBB*:c.127T>C [β42(CD1) Phe>Leu] denominata Hb Bucaresti (detta anche Hb Louisville). Queste tre emoglobine condividono due proprietà: instabilità con conseguente anemia emolitica e ridotta affinità per l'ossigeno (4). In generale, il quadro ematologico prodotto dall'Hb Torino è simile a quello osservato in altre anemie emolitiche dovute a emoglobine instabili. La splenomegalia è presente in quasi tutti i pazienti portatori di Hb Torino, descritti con frequenti crisi emolitiche e ingrossamento splenico, eritroblastosi e urine scure. L'origine delle crisi emolitiche appare prevalentemente associata all'assunzione di farmaci ossidanti o a processi febbrili.

Nei casi riportati in letteratura, la presenza dell' alfa talassemia non è mai stata documentata, tuttavia l'eterogeneità dei vari fenotipi clinici riportati suggerisce che in alcuni casi, l'alfa talassemia possa aver contribuito alla condizione emolitica, talora particolarmente significativa. Tale condizione marcata ha portato alla splenectomia nel caso da noi documentato.

Abbiamo ritenuto che la caratterizzazione molecolare da noi supportata, coinvolgendo laboratori di riferimento che usano la spettrometria di massa, rappresentasse un adeguato approccio metodologico alla conoscenza e gestione di difetti genetici sintomatici capaci di influire nella gestione clinica in gravidanza; le risposte ai quesiti diagnostici sono state infatti più celeri. In particolari situazioni (come il caso in questione) si ritiene che la

spettrometria di massa possa portare più velocemente all'individuazione del difetto presente.

Come già osservato, il valore della HbA<sub>1c</sub> ha contribuito a confermare la condizione emolitica già nota. Ciò suggerisce, per casi analoghi, approcci analitici più appropriati, come l'albumina glicata, per la diagnosi della condizione diabetica o per il relativo monitoraggio, quando sono presenti cause note in grado di diminuire la sopravvivenza eritrocitaria (8). Tuttavia, da un altro punto di vista, l'utilizzo di un metodo separativo per la determinazione della HbA<sub>1c</sub> può fornire utili informazioni sulla presenza di difetti emoglobinici che possono causare diverse interferenze nella misura. Tali difetti, talvolta non noti o mai accertati, potrebbero essere rilevanti nell'ambito di eventuali consulenze genetiche prima o all'inizio di una gravidanza.

Questa esperienza riafferma ulteriormente la centralità del laboratorio nella gestione dei percorsi e dei risultati analitici, nella loro corretta interpretazione, e appropriato utilizzo. Viene anche ribadito il ruolo di consulenza che il laboratorio può avere e deve offrire al clinico (9) soprattutto nelle situazioni di urgenza come può accadere proprio in occasione di esami eseguiti in gravidanza.

## BIBLIOGRAFIA

1. Old J, Hartevelde CL, Traeger-Synodinos J, et al. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders: Volume 2: Laboratory Protocols. 2nd edition. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation; 2012.
2. Traeger-Synodinos J, Hartevelde C, Old JM, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and hematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet* 2015;23:426-37.

3. Ricco G, Scaroina F, Burzio P, et al. Functional properties of the unstable Hb-Torino: alpha 43 (CD-1) Phe-Val. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1985;61:619-26.
4. Sansone G, Sciarratta GV, Lang A, et al. A drug-induced haemolytic anaemia due to Hb Torino (alpha43(CD1)Phe replaced by Val). Second finding in an Italian family. *Acta Haematol* 1976;56:225-33.
5. Ministero della Salute: Linea guida 20 – Gravidanza fisiologica, 2011 [https://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6\\_2\\_2\\_1.jsp?id=1436](https://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?id=1436). (ultimo accesso: gennaio 2022).
6. Beretta A, Prato V, Gallo E, et al. Haemoglobin Torino- $\alpha$ 43 (CD1) Phenylalanine > Valine. *Nature* 1968;217:1016-8.
7. Prato V, Gallo E, Ricco G, et al. Haemolytic anaemia due to haemoglobin Torino. *Br J Haematol* 1970;19:105-15.
8. Debard A, Charmion S, Ben Ameer S, et al. Inappropriate low glycosylated hemoglobin and hemolysis. *Rev Med Internet* 2009;30:525-7.
9. Barberio G, Ivaldi G. Emoglobinopatie: dalla diagnosi alle consulenze specialistiche. Ed. Piccin, Padova, 2020.