

## Diagnosi molecolare del FAVISMO: test di I e II livello.

La glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6PD), enzima ubiquitario, è particolarmente importante per i globuli rossi (GR). Un'attività normale di tale enzima garantisce a tali cellule lo stato redox, fornendo la molecola di NADPH necessaria per la riduzione del glutatione (GSH), principale molecola antiossidante eritrocitaria, impegnata nei processi di detossificazione cellulare. In un soggetto carente in G6PD, in presenza di determinati stimoli esterni come, ingestione di fave e piselli, infezioni, inalazione di vapori di naftalina e assunzione di alcuni farmaci (ad esempio sulfamidici, salicilati, chinidina, menadione, ecc.), lo stato redox intracellulare viene irreversibilmente compromesso dal momento che la cellula non è in grado di rigenerare il GSH, mancando il NADPH fornito dall'attività della G6PD. Gli eventi successivi, non ancora completamente noti, hanno come risultato finale (a circa 48 ore dallo stimolo) una distruzione dei GR carenti (emolisi), comparsa di anemia emolitica con ittero e in casi estremi il soggetto colpito può essere sottoposto anche ad una trasfusione di sangue. Resta non risolto il fatto che la carenza dell'enzima costituisce una condizione necessaria per l'instaurarsi delle tipiche manifestazioni cliniche da carenza in G6PD, ma non è una condizione sufficiente: un soggetto con carenza grave può essere completamente asintomatico anche se sottoposto agli stimoli sopra riportati. È probabile che altri geni siano coinvolti nel predisporre l'individuo affetto da carenza in G6PD alle diverse manifestazioni (più o meno gravi) di tale patologia.

La carenza di G6PD è sempre accompagnata da un'alterazione del suo gene. Tale gene è localizzato sul cromosoma X, determinando una ereditarietà di tipo X-linked, le cui caratteristiche sono le seguenti:

1. L'incidenza del carattere è più alta nei maschi che nelle femmine;

2. Le donne eterozigoti sono solitamente non affette, ma possono esprimere il carattere con livelli di gravità variabili a seconda del pattern di inattivazione del cromosoma X;
3. Il gene mutato è trasmesso dal padre a tutte le figlie;
4. Il gene non è mai trasmesso da padre a figlio;
5. Il gene può essere trasmesso attraverso femmine portatrici sane;
6. Non è presente salto di generazione.

La trasmissione X-linked comporta che, nel maschio affetto (emizigote per la mutazione) e la donna portatrice di mutazione omozigote o eterozigote composta, il test biochimico-enzimatico risulta essere completamente diagnostico.

La donna eterozigote, invece, è molto spesso completamente asintomatica e presenta livelli di attività enzimatica normali: in questo caso il test biochimico-enzimatico non ha valore diagnostico e quindi il test genetico risulta essere l'unico in grado di identificare gli eterozigoti.

Va sottolineato che resta comunque fondamentale per la donna il dosaggio dell'enzima, in quanto il fenomeno della lyonizzazione, soprattutto quando "non bilanciato", può determinare anche nella donna eterozigote per una mutazione una carenza grave di attività enzimatica.

L'identificazione del difetto genetico nel gene della G6PD, accompagnata dallo studio del livello di attività enzimatica residua osservata nell'individuo affetto, riesce a completare l'inquadramento clinico del paziente e può, in alcuni casi, fornire indicazioni terapeutiche più mirate.

Attualmente si conoscono circa 180 mutazioni della G6PD che, sulla base dell'attività residua osservata e delle manifestazioni cliniche, sono raggruppate in 5 classi. Le **mutazioni di Classe I**, estremamente rare, sono quelle più gravi perché, interessando regioni critiche dell'enzima, rendono la proteina estremamente instabile e quasi priva di attività catalitica. Questo determina nel soggetto affetto da tali mutazioni

manifestazioni cliniche evidenti anche senza la presenza di uno stimolo esterno. Le **mutazioni di Classe II**, molto frequenti, determinano nel soggetto maschio una attività enzimatica residua <10% e manifestazioni cliniche evidenti soltanto in seguito ad uno stimolo esterno (ingestione fave e piselli, assunzione di determinati farmaci, esposizione a naftalina e presenza di infezioni). Le **mutazioni di Classe III**, determinano nel soggetto maschio una attività residua compresa tra il 10-60%, e manifestazioni cliniche che diventano evidenti, sotto forma di lieve o moderata emolisi, generalmente in seguito a fattori scatenanti esterni. Le **mutazioni di Classe IV e V**, con attività nella norma o anche superiore la norma, sono di difficile identificazione e risultano completamente asintomatiche anche in presenza di uno stimolo esterno.

Dal momento che le mutazioni della G6PD sono area specifiche, in quanto la loro distribuzione, oltre a rispecchiare la distribuzione presente e passata della malaria, risulta essere strettamente associata ad una determinata zona geografica, per la popolazione Italiana è possibile organizzare il test genetico in due livelli di analisi:

1. **Test genetico di I livello** che prevede la ricerca delle mutazioni più frequenti nell'area Mediterranea. In particolare vengono ricercate, mediante tecniche di PCR, RFLP e Sequenziamento diretto, le seguenti mutazioni:

Nome mutazione	Sostituzione nucleotidica	Regione esonica	Sostituzione aa	Fenotipo
<b>Mediterranea</b>	<i>c.563C&gt;T</i>	6	p.S188F	<b>Class II</b>
<b>Seattle</b>	<i>c.844G&gt;C</i>	8	p.D282H	<b>Class III</b>
<b>A<sup>-</sup></b>	<i>c.202G&gt;A</i>	4	p.V68M	<b>Class III</b>
<b>A<sup>-</sup></b>	<i>c.376A&gt;G</i>	5	p.N126D	<b>Class III</b>
<b>Cassano</b>	<i>c.1347G&gt;C</i>	11	p.Q449H	<b>Class II</b>

**N.B.** La ricerca delle 5 mutazioni del gene della G6PD, considerate più frequenti in Italia (test di I livello), fornisce una copertura del rischio di mutazione pari a circa il **94%**.

Se il **test di I livello risulta negativo**, in presenza di un valido motivo clinico e in accordo con il paziente ed il Medico curante, si procede al:

2. **Test genetico di II livello** che consiste nel sequenziamento diretto delle regioni esoniche e dei tratti di giunzione esone/introne dell'intero gene.

**Modalità di compilazione impegnativa per TEST di I LIVELLO:**

Su una stessa impegnativa inserire le seguenti voci:

- **Estrazione DNA** (cod. ssn 91.36.5)
- **Conservazione DNA** (cod. ssn 91.36.1)
- **Ricerca delle principali mutazioni del gene G6PD mediante sequenziamento diretto (3 blocchi da 400bp)** (cod. 91.30.3 x 3 volte)

**Nota:** Per un più accurato inquadramento diagnostico, si consiglia di eseguire il dosaggio enzimatico della G6PD contestualmente alla richiesta del test genetico, inserendo sulla stessa impegnativa le voci:

- **Dosaggio enzimatico della G6PD**
- **Emocromo completo**

## Modalità di compilazione impegnativa per TEST di II LIVELLO:

Su una stessa impegnativa inserire le seguenti voci:

- Estrazione DNA (cod. ssn 91.36.5)
- Conservazione DNA (cod. ssn 91.36.1)

**Sequenziamento diretto dell'intero gene G6PD (6 blocchi da 400bp) (cod. 91.30.3 x 6 volte)**

### Tabella riassuntiva della patologia:

Gene investigato:	G6PD
Metodica impiegata:	RFLP e Sequenziamento Automatico
Consenso informato:	Necessario
Ereditarietà	X-Linked
Consulenza genetica:	Consigliata
Tempi di risposta:	20 gg (I livello)-40gg (II livello)
Tipo di campione:	Prelievo ematico in EDTA, saliva, liquido amniotico

L'ambulatorio prelievi è aperto tutti i giorni (sabato compreso) dalle ore 8.00 alle 12.00.

**Costo dell'esame:** ticket dell'impegnativa (40,15 euro); verificare con il proprio medico curante la possibile esenzione per patologia.

### Responsabili della procedura analitica

Dott. Ettore Capoluongo (email:ecapoluongo@rm.unicatt.it)

Dott. Angelo Minucci (email:angelo.minucci@rm.unicatt.it)

**Policlinico Universitario Agostino Gemelli**

**Largo Francesco Vito 1, 00168 Roma**

**Laboratorio di Analisi I - 3° Piano Piastra Polifunzionale**

**Telefono 06.3015 4222/4250**

**Fax. 06-30156706**