Determinazione della variabilità biologica dell'emoglobina A_2

Renata Paleari[1], Martina Montagnana[2], Elisa Danese[2], Milena Tozzi[1], Gian Cesare Guidi[2], Andrea Mosca[1]
[1]Centro per la Riferibilità Metrologia in Medicina di Laboratorio (CIRME), Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano
[2]Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Università degli Studi di Verona

ABSTRACT

Determination of biological variation of hemoglobin A_2. We present an experimental report aimed to evaluate the biological variation of hemoglobin A_2 (HbA_2), a minor hemoglobin component in post-natal life, accounting for 2.5%-3.5% of the total hemoglobin in red cells, which is very relevant for the laboratory diagnosis of thalassemic syndromes. We took five blood specimens from 17 apparently healthy subjects (9 men and 8 women, ages 26-52 years) on the same day, every two weeks for two months. Samples were stored at -80 °C until analysis and assayed in duplicate by Bio-Rad Variant II analyzer. Data were analyzed by the ANOVA. There were no differences in HbA_2 values between men and women. HbA_2 exhibited marked individuality: within- (CV_I) and between-subject (CV_G) biological variation were 0.7% and 7.7%, respectively. Desirable analytical goals derived from biological variation for imprecision (0.5 CV_I), bias [0.25 $(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$] and total error [1.65 (0.5 CV_I) + 0.25 $(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$] were 0.4%, 1.9%, and 3.1%, respectively. In conclusion, this is the first evidence that HbA_2, as well as total hemoglobin, is under a strict homeostatic control. Our data also show that stringent analytical goals are needed for the clinical application of HbA_2 measurements.

INTRODUZIONE

L'emoglobina A_2 (HbA_2) è una frazione emoglobinica formata da due catene α e due catene δ (α_2,δ_2), che in condizioni fisiologiche costituisce il 2%-3% circa del totale dell'emoglobina in un individuo adulto. A causa delle basse concentrazioni presenti nel sangue, l'HbA_2 ha uno scarso rilievo fisiologico, ma la sua determinazione è estremamente importante in quanto rappresenta un marcatore ematologico fondamentale per la diagnosi del tratto β-talassemico. In questa condizione si ha infatti un caratteristico aumento di HbA_2 che tipicamente è compreso tra 4% e 6% (1). In seguito all'esistenza di mutazioni β-talassemiche lievi e di diverse condizioni sia ereditarie che acquisite che possono modulare la concentrazione della HbA_2 nel sangue, è tuttavia possibile trovare fenotipi intermedi con concentrazioni di HbA_2 di poco aumentate che possono rendere difficile una corretta diagnosi (2, 3). Pertanto, in seguito a queste considerazioni e tenuto conto del notevole valore diagnostico che la misura della HbA_2 riveste, risulta evidente l'importanza che la qualità analitica, associata alla misura di questa frazione emoglobinica, sia adeguata alle esigenze cliniche.

La definizione dei traguardi analitici per le misurazioni di laboratorio è sempre più spesso basata sull'approccio che considera la variabilità biologica dell'analita (4). È disponibile a questo riguardo il "data base" di Westgard contenente i dati sulla variabilità biologica intra- ed interindividuale di 298 diversi analiti, e i relativi traguardi analitici (5). In questo archivio non sono però riportati dati di variabilità biologica della HbA_2, mentre sono presenti i dati relativi all'emoglobina totale e all'emoglobina glicata. (HbA_{1c}) Per quest'ultima frazione emoglobinica è stata recentemente portata a termine una valutazione sperimentale che fornisce nuove evidenze (6). Una ricerca bibliografica effettuata su "Medline" ha confermato l'assenza al momento attuale di informazioni riguardo la variabilità biologica della HbA_2. Scopo del presente studio è stato quindi quello di effettuare una valutazione sperimentale su soggetti in buono stato di salute al fine di determinare i parametri di variabilità biologica intra- e interindividuale della HbA_2 e di derivarne i relativi traguardi analitici.

MATERIALI E METODI

Soggetti e campioni

Lo studio è stato condotto su 18 volontari, 9 maschi e 9 femmine, di età compresa tra 26 e 52 anni, arruolati tra il personale del laboratorio. I criteri per l'arruolamento

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate, Milano. Tel/Fax 0299983892, E-mail andrea.mosca@unimi.it

Ricevuto: 13.09.2011 Revisionato: 29.09.2011 Accettato: 30.09.2011

erano l'apparente buono stato di salute, l'assenza di familiarità per diabete, talassemia o altre emoglobinopatie, non essere fumatore e non assumere farmaci, compresi i contraccettivi orali. Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso scritto per la partecipazione allo studio.

Ad ogni soggetto è stato prelevato un campione di sangue (EDTA) ogni 15 giorni per 2 mesi, per un totale di 5 campioni di sangue per ogni soggetto. I prelievi sono stati effettuati sempre nello stesso giorno della settimana, alla stessa ora e dallo stesso flebotomista in modo da minimizzare eventuali fonti di variabilità preanalitica. Ai partecipanti era richiesto di essere a digiuno e di non avere eseguito attività fisica intensa il giorno precedente il prelievo. Su tutti i campioni di sangue è stato eseguito, subito dopo il prelievo, l'esame emocromocitometrico per escludere la presenza di eventuali anemie. Il rimanente campione era rapidamente congelato a -80 °C e conservato in attesa di avere a disposizione tutti i campioni per la determinazione della HbA_2.

Procedure analitiche e protocollo di misura

L'esame emocromocitometrico è stato eseguito mediante strumentazione Advia 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics). L'esame è stato eseguito in singolo su ogni campione di sangue prelevato. HbA_2 è stata determinata mediante HPLC Variant II dual kit (Bio-Rad Laboratories). Il metodo è stato calibrato e utilizzato secondo le indicazioni dell'azienda produttrice. Le misure sono state eseguite in duplicato, in 4 serie analitiche consecutive. L'esattezza analitica è stata verificata prima di ogni serie di misure utilizzando i materiali di controllo forniti dal produttore ("Lyphochek Hemoglobin A_2 Control"). Tutti i campioni dello stesso paziente sono stati analizzati nella stessa seduta analitica. I risultati dell'HbA_2 sono stati elaborati con due decimali per avere il sufficiente numero di cifre significative.

Analisi statistica

L'elaborazione dei dati è stata effettuata mediante l'analisi della varianza, al fine di valutare i contributi alla variabilità totale della variabilità analitica, della variabilità biologica intraindividuale e della variabilità biologica interindividuale. La variabilità (σ^2) totale veniva scomposta nelle sue componenti come di seguito:

$$\sigma^2_{totale}=\sigma^2_{analitica}+\sigma^2_{biologica\ intra\text{-}individuale}+\sigma^2_{biologica\ inter\text{-}individuale}$$

La variabilità totale è stata valutata dalla matrice completa dei risultati e la variabilità analitica è stata ricavata dai risultati dei replicati ottenuti per ogni singolo campione. La variabilità biologica intraindividuale è stata stimata dalla media delle variabilità calcolate dai risultati ottenuti in ciascun soggetto, sottraendo la metà della variabilità analitica calcolata sui duplicati; la variabilità biologica interindividuale è stata stimata sottraendo alla variabilità totale la variabilità analitica e la variabilità biologica intra-individuale. Tutte le componenti di variabilità biologica ottenute sono state trasformate nei relativi CV utilizzando le medie corrispondenti. I dettagli dei calcoli sono identici a quanto precedentemente descritto per la stima della variabilità biologica dell'HbA_{1c} (6). I traguardi analitici ottimale, desiderabile e minimo per la misurazione della HbA_2 sono stati ottenuti dalle componenti della variabilità biologica in accordo con Fraser et al. (7).

Per le differenze tra gruppi è stato utilizzato il test del t di Student per dati non appaiati.

RISULTATI

Dall'elaborazione dei risultati sono stati esclusi i dati relativi a un soggetto di sesso femminile in quanto alcuni parametri dell'emocromo (MCV, emoglobina ed ematocrito sono risultati, nel corso dello studio, al di sotto del limite inferiore di riferimento.

La Figura 1 mostra, per ognuno dei 17 soggetti studiati, il valore medio e l'intervallo di HbA_2 misurato nell'arco dei 2 mesi. Già dall'ispezione visiva dei risultati ottenuti è possibile apprezzare come la variabilità dei valori di HbA_2 rilevata per ogni singolo soggetto sia decisamente inferiore alla variabilità esistente tra soggetti diversi. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nei valori di HbA_2 misurati nei maschi e nelle femmine (P=0,265).

Nella Tabella 1 sono riportati i dati dell'analisi della varianza e i CV biologici intra- e interindividuale. Nella Tabella 2 sono riportati i traguardi analitici per la misura della HbA_2, calcolati sulla base dei dati della variabilità biologica.

DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo presentato le prime evidenze sperimentali sulla variabilità biologica dell'HbA_2 raccogliendo i dati in un gruppo di soggetti apparentemente sani, non portatori di difetti talassemici,

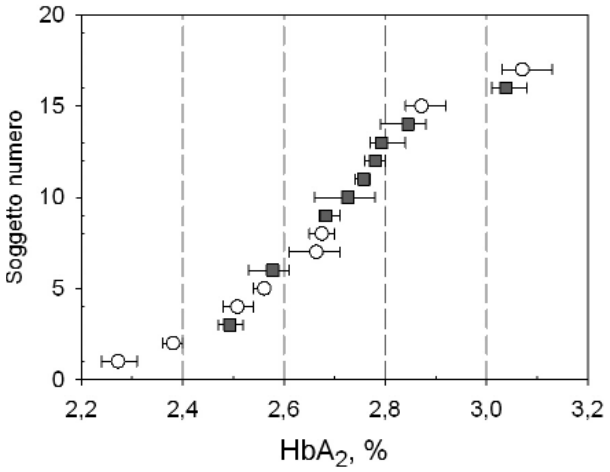


Figura 1
Media e intervallo (minimo-massimo) dei valori di emoglobina A_2 (HbA_2) misurati nell'arco di 2 mesi sui 17 soggetti partecipanti allo studio. I circoli vuoti indicano i soggetti di sesso femminile e i quadrati pieni quelli di sesso maschile.

Tabella 1
Componenti della varianza e coefficienti di variabilità biologica intra- e interindividuale per l'emoglobina A_2 (HbA_2). I dati sono riferiti a una concentrazione media di HbA_2 pari a 2,69%

Varianza			CV_I	CV_G
Analitica	Intraindividuale	Interindividuale		
0,0010	0,0003	0,0424	0,7%	7,7%

CV_I, variabilità biologica intraindividuale; CV_G, variabilità biologica interindividuale.

Tabella 2
Traguardi analitici per la misura dell'emoglobina A_2 (HbA_2) derivati dai dati di variabilità biologica ed espressi per tre diversi livelli di qualità

Traguardo	Livello di qualità		
	Minimo	Desiderabile	Ottimale
Imprecisione, %	0,6	0,4	0,2
Bias, %	2,9	1,9	0,9
Errore totale, %	4,7	3,1	1,5

al fine di derivarne i traguardi di imprecisione, esattezza ed errore totale. I risultati dimostrano che l'HbA_2 ha una variabilità biologica intraindividuale estremamente piccola e una consistente variabilità biologica interindividuale. Questo risultato non è sorprendente, perché l'HbA_2 è considerata un marcatore genetico utile per la diagnosi delle sindromi β-talassemiche e riflette un livello di espressione dei geni δ globinici che risulta sempre molto basso per tutto il periodo di vita (8). I geni δ globinici sono infatti da molti considerati come pseudogeni di scarso interesse e difficilmente sono stati trovati casi nei quali i valori di HbA_2 superano il 7%-8% del totale delle emoglobine (9).

Per quanto riguarda i traguardi di variabilità analitica per HbA_2, difficilmente gli attuali metodi di laboratorio, anche i più sofisticati, sono in grado di raggiungere tali livelli, soprattutto per quanto riguarda l'imprecisione. Si pone pertanto il problema di usare traguardi basati su altri criteri. A tal fine abbiamo già precedentemente proposto che il traguardo di errore totale per l'HbA_2, valutato in base ai requisiti clinici, sia pari al 7,2% (10).

Anche il traguardo di esattezza è di difficile raggiungimento pratico, dal momento che non esiste ancora un metodo di riferimento per la misura dell'HbA_2, nonostante gli sforzi che in tale direzione si stanno compiendo da parte dell'apposito gruppo di lavoro IFCC, che sta cercando di sviluppare un metodo di riferimento in spettrometria di massa con diluizione isotopica. Lo stesso gruppo ha recentemente proposto un materiale candidato di riferimento in collaborazione con l'"Institute of Reference Materials and Measurements" (IRMM) (11) e si spera che nei prossimi anni l'intero sistema di riferimento per l'HbA_2 sia definito per poter assicurare una diagnostica sempre più accurata dei disordini delle emoglobinopatie.

RINGRAZIAMENTI

Lavoro supportato in parte da un progetto di ricerca PRIN 2008 (contraente AM).

BIBLIOGRAFIA

1. Giambona A, Passarello C, Renda D, et al. The significance of the hemoglobin A(2) value in screening for hemoglobinopathies. Clin Biochem 2009;42:1786-96.
2. Mosca A, Paleari R. La determinazione dell'emoglobina A_2 nel sangue: attualità e prospettive. Biochim Clin 2008;32:251-9.
3. Mosca A, Paleari R, Galanello R, et al. New analytical tools and epidemiological data for the identification of HbA2 borderline subjects in the screening for beta-thalassemia. Bioelectrochemistry 2008;73:137-40.
4. Fraser CG, Hyltoft Peterson P. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. Clin Chem 1999;45:321-3.
5. http://www.westgard.com/biodatabase1.htm
6. Braga F, Dolci A, Montagnana M, et al. Revaluation of biological variation of glycated hemoglobin (HbA1c) using an accurately designed protocol and an assay traceable to the IFCC reference system. Clin Chim Acta 2011;412:1412-6.
7. Fraser CG, Hyltoft Peterson P, Libeer JC, Ricos C. Proposal for setting generally applicable quality goals solely based on biology. Ann Clin Biochem 1997;34:8-12.
8. Wheaterall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed. Ofxord: Blackwell Scientific Publication, 1981.
9. Gasperini D, Cao A, Paderi L, et al. Normal individuals with high Hb A_2 levels. Br J Haematol 1993;84:166-8.
10. Mosca A, Paleari R, Ivaldi G, et al. The role of haemoglobin A_2 testing in the diagnosis of thalassaemias and related haemoglobinopathies. J Clin Pathol 2009;62:13-7.
11. Paleari R, Munoz A, Mosca A for the IFCC Working Group on Standardization of HbA2 (WG-HbA2). Towards the development of a certified reference material for hemoglobin A_2. Clin Chem Lab Med 2010;48:1611-8.