

La determinazione dell'emoglobina A₂ nel sangue: attualità e prospettive

Andrea Mosca, Renata Paleari

Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME) e Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano

ABSTRACT

The determination of hemoglobin A₂ in human blood: current perspectives. The increase of hemoglobin A₂ (HbA₂) in blood is the most important feature for the identification of β -thalassemia carriers. However, some carriers are difficult to identify because the results of HbA₂ are not in the typical carrier range. The test has, therefore, to be performed with high accuracy. This review provides an update on the analytical and clinical aspects related to this measurement, as well summarizes the status of the international process of standardization of HbA₂ measurement using a candidate reference measurement procedure based on quantitative peptide mapping.

INTRODUZIONE

L'emoglobina A₂ (HbA₂) è una delle tre emoglobine che si trovano fisiologicamente nei globuli rossi di un soggetto adulto e che differiscono tra loro per sintesi genetica e quindi per composizione in catene globiniche. In condizioni fisiologiche si distinguono: l'emoglobina A (α_2, β_2), che è il componente emoglobinico principale e costituisce più del 96% di tutta l'emoglobina, la HbA₂ (α_2, δ_2), che rappresenta circa il 2,5% del totale, e l'emoglobina F (α_2, γ_2) che è presente in quantità inferiori al 1%. Le catene α sono formate da 141 amminoacidi e sono identiche per le tre diverse emoglobine (A, A₂ ed F), mentre le catene δ sono specifiche per la HbA₂. Esse sono formate da 146 amminoacidi, come le catene β , ma differiscono da queste per 10 amminoacidi compresi tra la posizione 22 e la posizione 115 e questo comporta, da un punto di vista biochimico, una variazione del pI della HbA₂ che risulta più alto rispetto a quello dell'emoglobina A. La HbA₂, così come la A, viene prodotta solo dopo la nascita quando il gene δ e il gene β si attivano gradualmente man mano che diminuisce l'attività dei geni γ (switch HbF \rightarrow HbA), e solo dopo il sesto mese di vita la sua percentuale raggiunge quella propria della vita adulta.

Le prime segnalazioni riguardanti la HbA₂ risalgono alla metà degli anni '50 quando, in seguito agli studi elettroforetici sull'emoglobina umana, venne dimostrata da Kunkel e Wallenius (1) la presenza nel sangue di soggetti adulti sani di una piccola frazione emoglobinica a mobilità elettroforetica lenta che costituiva circa il 2% dell'emoglobina totale. Negli anni immediatamente successivi, gli stessi autori osservarono che i genitori di bambini affetti da morbo di Cooley presentavano concentrazioni di HbA₂ aumentate di circa il doppio rispetto a quelle fisiologiche (2). Questa prima osservazione venne in seguito confermata da molti altri autori che riportarono il tipico aumento di HbA₂ nei soggetti portatori di β -talassemia, ponendo così le basi per l'utilizzo della HbA₂ come

marcatore caratteristico per la diagnosi di questa condizione (3).

Il laboratorio è quindi chiamato a misurare l'HbA₂ nel sangue per il riconoscimento del portatore di β -talassemia e deve essere in grado di effettuare misure accurate, perchè la differenza tra soggetti sani e portatori di tratto talassemico è piccola (4). Inoltre, a volte si incontrano soggetti con genotipi misti che possono non avere concentrazioni di HbA₂ elevate come i portatori "classici" di β -talassemia, ma che pur sempre possono portare difetti β -talassemici gravi.

Pertanto, con l'intento di fornire le informazioni più aggiornate per la misura di questa emoglobina nel sangue umano, si è ritenuto opportuno preparare questa rassegna, mettendo in particolare risalto alcuni aspetti forse poco noti ed illustrando il processo di standardizzazione che negli ultimi anni è stato avviato anche in questo settore dall'IFCC.

ASPETTI ANALITICI

Da un punto di vista analitico, i metodi quantitativi che si possono utilizzare per misurare l'HbA₂ sono per la maggior parte basati sulla separazione di questa emoglobina dalle altre emoglobine eritrocitarie in ragione della differenza di pI. Molte fonti fanno riferimento a metodi manuali in cromatografia liquida con minicolonne di resina a scambio anionico debole. Questo è il metodo raccomandato a suo tempo dal Comitato Internazionale per la Standardizzazione in Ematologia (5), ma a nostro avviso si tratta di un metodo non sufficientemente riproducibile sulla base degli attuali traguardi analitici, menzionati più avanti. Per una più accurata quantificazione è senz'altro consigliabile utilizzare l'HPLC (6) o l'elettroforesi capillare (7), quest'ultima in Italia ancora non molto diffusa. Sono anche stati descritti metodi immunochimici, ma tale approccio non ha avuto applicazioni significative, forse per scarsa sensibilità

analitica (8, 9).

L'utilizzo di metodi HPLC rispetto alle metodiche manuali consente un notevole risparmio di tempo grazie alla completa automazione dell'intero processo analitico, poichè su molti strumenti è possibile caricare direttamente la provetta primaria.

Sono invece da non utilizzare le metodiche basate sull'elettroforesi zonale, seguita da scansione densitometrica della lastrina, perchè è stato dimostrato che tale approccio tende a sovrastimare significativamente l'HbA₂ (5). La sola possibilità di usare l'elettroforesi per la misura dell'HbA₂ è quando, dopo la separazione su acetato di cellulosa, le bande corrispondente all'HbA₂ viene eluita manualmente e la frazione percentuale di HbA₂ viene calcolata dopo lettura dell'eluato allo spettrofotometro (10). Questa procedura, anche se accurata, è molto laboriosa e scarsamente riproducibile.

I dati che abbiamo a disposizione sul grado attuale di concordanza delle metodiche per l'HbA₂ sono ricavabili essenzialmente dai programmi di VEQ, alcuni dei quali effettuati in Italia alcuni anni fa (11, 12), altri più recenti effettuati utilizzando sangue intero fresco come materiale di controllo e limitatamente alle metodiche HPLC, in collaborazione con la Società per lo Studio delle Talassemie ed Emoglobinopatie (So.S.T.E.) (13, 14). I dati a disposizione sono quindi incompleti e quelli, per esempio, raccolti attraverso il programma di VEQ dell'Azienda Ospedaliera "Careggi" di Firenze, che per altro fa uso di materiali liofilati la cui commutabilità non è stata finora provata, non coprono tutto il territorio nazionale (15). I dati più affidabili sono quelli raccolti in collaborazione con la So.S.T.E. che indicano una variabilità interlaboratorio compresa tra il 6,0% ed il 9,6% (in termini di CV), con un grado di non accettabilità, giudicato sulla base dell'errore totale derivato dalla variabilità biologica del parametro, pari a circa il 15%. I dati inglesi del "National EQA scheme" (NEQAS), raccolti in 281 laboratori (dei quali 218 utilizzavano metodiche HPLC), indicherebbero uno scarso allineamento delle metodiche HPLC, con un produttore (Tosoh) che sistematicamente sovrastimerebbe le concentrazioni di HbA₂ rispetto agli altri (media 3,9% rispetto a 3,6% per Beckman e 3,4% per Menarini) (B. De La Salle, comunicazione personale). Tali risultati non destano sorpresa non essendoci al momento un sistema di riferimento col quale i produttori possano calibrare le proprie metodiche.

La presenza di varianti emoglobiniche può interferire con la determinazione della HbA₂ in misura più o meno marcata a seconda del tipo di metodica. L'emoglobina S in particolare interferisce nella maggior parte delle metodiche HPLC (16-18) aumentando significativamente i valori. Questo fatto viene spiegato sia per la possibile interferenza da parte dell'addotto glicato dell'emoglobina S (HbS_{1c}), sia per il fatto che le catene β^s hanno un'affinità minore per le catene α rispetto alle catene δ. Anche l'emoglobina E interferisce con la misura dell'HbA₂, in quanto entrambe hanno pl molto simili (attorno a 7,4). Solo un metodo in elettroforesi capillare permetterebbe di quantificare correttamente l'HbA₂ nei portatori di emoglobina E e quindi potrebbe offrire qualche vantaggio

rispetto alle altre metodiche nello screening di popolazioni in certe zone dove la prevalenza di β-talassemia e di emoglobina E è significativa (Sud-Est Asiatico).

Considerando la grande diffusione che in Italia stanno avendo le metodiche HPLC ed il fatto che numerosi laboratori non raggiungono il livello desiderabile di qualità nella misura dell'HbA₂ si è pensato di raccogliere nella Tabella 1 alcuni importanti aspetti che devono essere tenuti presenti da chi utilizza strumenti HPLC per la misura dell'HbA₂.

Traguardi analitici

I traguardi analitici per l'HbA₂ possono essere definiti in basi ai dati di variabilità biologica dell'analita o secondo le esigenze cliniche.

Per quanto riguarda il primo approccio, l'archivio di informazioni sulla variabilità biologica di Westgard (19) non riporta alcuna informazione per l'HbA₂, ma solo per l'emoglobina totale o per l'emoglobina A_{1c}. Si possono fare quindi solo delle ipotesi, che potrebbero essere le seguenti:

- a) assumere che la variabilità biologica intra-individuale dell'HbA₂ sia simile a quella dell'emoglobina totale (3,8%);
- b) assumere che la variabilità biologica inter-individuale dell'HbA₂ possa essere calcolata sulla base degli intervalli di riferimento per i soggetti non portatori di tratto talassemico (da 2,0% a 3,3%).

Sulla base di tali ipotesi, e sottraendo una variabilità analitica pari al 3% (in termini di CV) dalla variabilità totale calcolata sulla base degli intervalli di riferimento sopra menzionati (HbA₂ media pari a 2,5%±0,5), applicando le formule correnti (20) si ottengono i dati presentati nella Tabella 2.

Per quanto riguarda invece il traguardo basato sulle esigenze cliniche, si può prendere come base di partenza la considerazione che si vuole evitare di perdere una possibile diagnosi di portatore di β-talassemia per un soggetto che abbia valori di HbA₂ al limite inferiore degli intervalli di concentrazione per i portatori di tale sindrome. Quindi si desidera poter classificare correttamente un soggetto che abbia un valore di HbA₂ intermedio tra quelli dei soggetti non portatori (limite superiore di HbA₂ pari a 3,3%) ed il limite inferiore dei portatori di tratto β-talassemico (HbA₂ pari a 3,8%). Ne risulta che l'errore totale non deve eccedere ±0,25% di HbA₂ come valore assoluto e ±7,0% (0,25/3,55 x 100) come valore relativo, per evitare la possibilità di classificare allo stesso tempo un soggetto che avesse una HbA₂ pari a 3,55% sia come soggetto sano che come portatore di tratto β-talassemico.

Sulla base di entrambe gli approcci, si ritiene ragionevole, anche in base all'attuale stato dell'arte delle metodiche analitiche, di proporre i seguenti traguardi analitici, corrispondenti al livello di qualità desiderabile: CV ≤1,4%; bias ≤ ±4,9%; errore totale ≤ ±7,3%.

Unità di misura

Le unità di misura utilizzate per l'HbA₂ sono ancora quelle della frazione percentuale (%) sul totale delle

Tabella 1*Attenzioni da porre nella misura dell'emoglobina A₂ mediante HPLC*

| Attività | Segnale di attenzione | Note |
|--|--|---|
| CQI | Valori dei materiali di controllo | Utilizzare regolarmente per ogni seduta analitica i materiali di controllo forniti dall'azienda o pool di campioni di sangue congelati a -20 °C in piccole aliquote. Non usare i calibratori come materiali di controllo. |
| Calibrazione | | Effettuare la calibrazione ogniqualvolta i risultati del CQI non siano all'interno dell'intervallo di accettabilità e comunque ad ogni cambio di colonna o di lotto di reagenti. Effettuare un paio di analisi a perdere dopo il cambio della colonna. |
| Interventi in presenza di particolari problemi | <ul style="list-style-type: none"> - Area totale del cromatogramma - Tempo di eluizione - Temperatura dei tamponi e della colonna | Il tempo di eluizione dei picchi emoglobinici nell'HPLC dipende molto dalla temperatura (che può influenzare il pH) e piccoli cambiamenti possono portare al non riconoscimento di tempi di eluizione predefiniti dal "software" dello strumento. E' pertanto molto importante che i cromatogrammi vengano ispezionati attentamente prima di rilasciare il referto. I tempi di eluizione possono anche cambiare da colonna a colonna ed in funzione del lotto di reagenti. |
| | <ul style="list-style-type: none"> - "Spikes" nel cromatogramma - Derive nella linea di base | Possibile presenza di bolle d'aria nella pompa, o nella cella del "detector", o in qualche parte del circuito fluidico. |
| | <ul style="list-style-type: none"> - Comparsa di picchi anomali | I sistemi automatici quantificano correttamente l'HbA ₂ e l'emoglobina F in condizioni normali, ma possono dare valori fuorvianti in presenza di una variante emoglobinica. In tali casi, se non si riesce a risolvere la quantificazione dell'HbA ₂ con una integrazione manuale, la misura dell'HbA ₂ deve essere effettuata con altra metodica che non risenta dell'interferenza. Campioni invecchiati possono mostrare la presenza di picchi di degradazione. A volte si segnalano effetti di trascinarsi. E' possibile che dopo un campione con concentrazioni elevate di emoglobina S nel campione successivo possa comparire ancora una traccia della stessa. |
| Manutenzione periodica dello strumento | Scarsa pulizia | Seguire le istruzioni del produttore per assicurare il perfetto funzionamento della strumentazione, con particolare attenzione alla pulizia dei pistoni delle pompe, dell'ago campionatore, del comparto diluizione dei campioni ed alla decontaminazione periodica dei percorsi fluidici. |
| Cambio colonna | Numero totale corse | Ogni azienda consiglia di non superare un numero massimo di analisi per colonna. A volte occorre cambiare la colonna in anticipo per mantenere le prestazioni analitiche a livello ottimale. |
| Cambio filtro | | Cambiare frequentemente i filtri di protezione della colonna (in certi strumenti non c'è questa possibilità). |
| VEQ | | Partecipare regolarmente ed attivamente a programmi di VEQ. |

Tabella 2*Traguardi analitici per l'imprecisione, il bias e l'errore totale per la misura di HbA₂, espressi a tre differenti livelli di qualità*

| Traguardo | Livello di qualità | | |
|--------------------------------|--------------------|--------------|----------|
| | Minimo | Desiderabile | Ottimale |
| Imprecisione | 2,1% | 1,4% | 0,7% |
| Bias (scostamento sistematico) | 7,4% | 4,9% | 2,5% |
| Errore totale | 10,9% | 7,3% | 3,6% |

emoglobine eritrocitarie. Tali unità non sono in linea con il sistema SI, ma sono largamente diffuse nella pratica clinica.

Intervalli di riferimento

La proporzione dell'HbA₂ negli individui non portatori di tratto β -talassemico (con più di 1 anno di età) è compresa tra 2,0% e 3,2% (21). Come limite superiore taluni riportano anche 3,5% (22), dato quest'ultimo che, sulla base della nostra esperienza, sembra eccessivamente alto.

A causa della tardiva espressione del gene δ rispetto ai geni β globinici, i valori dell'HbA₂ alla nascita sono più bassi ed arrivano ai livelli degli adulti attorno ad un anno di vita. Considerando che lo screening delle emoglobinopatie e delle sindromi talassemiche è già stato avviato sui neonati in diversi paesi europei (Gran Bretagna, Belgio) e che probabilmente potrebbe essere attivato anche in alcune regioni italiane, per una migliore interpretazione dei risultati su campioni raccolti in periodo perinatale e nei primi mesi di vita, riportiamo nella Tabella 3 i valori dell'emoglobina A, dell'HbA₂ e dell'emoglobina F in diversi periodi, dalla nascita all'età adulta.

VARIABILI PREANALITICHE

Fattori legati all'individuo

Diversi sono i fattori preanalitici che possono influenzare le concentrazioni di HbA₂ nel sangue rendendone difficile la interpretazione (Tabella 4).

Per quanto riguarda l'ipertiroidismo ci sono in letteratura segnalazioni di casi isolati, che sono tuttavia significativi (23). Gli aumenti dell'HbA₂ conseguenti a tale condizione andavano fino a oltre il 4%, in assenza di tratto β -talassemico.

Sono stati riportati alcuni casi di pazienti positivi per HIV-1 e trattati con azivudina, nei quali si è osservato un modesto aumento dell'HbA₂ (fino a 3,2%) in assenza di anemia microcitica ipocromica e senza familiarità per β -talassemia (24). Tali osservazioni sono state successivamente confermate anche in donne positive per HIV e sottoposte a screening prenatale per emoglobinopatie (25). Tale interferenza, col crescere del numero di soggetti positivi per HIV ed in terapia, deve essere tenuta presente nell'interpretare i dati di screening. Dall'analisi retrospettiva sembrerebbe che nei soggetti con aumentate concentrazioni di HbA₂ vi sia uno sbilanciamento nei rapporti biosintetici dei diversi geni globinici, che si alte-

Tabella 3

Concentrazioni (in unità %, intervallo minimo-massimo) delle principali emoglobine umane dalla nascita all'età adulta in soggetti non portatori di difetti di sintesi o di struttura dell'emoglobina (modificata da Ivaldi et al, *Biochim Clin* 2007;31:276)

| Età | HbA | HbA ₂ | HbF |
|--------------|---------|------------------|-----------|
| Neonati | 15 - 40 | 0 - 1 | 58 - 84 |
| 1 - 3 mesi | 38 - 70 | 0,5 - 1,5 | 29 - 61 |
| 3 - 5 mesi | 65 - 90 | 1,3 - 2,1 | 9-40 |
| 5 - 8 mesi | 83 - 95 | 1,6 - 2,6 | 3-15 |
| 8 - 12 mesi | 89 - 96 | 1,8 - 2,9 | 1-10 |
| 12 - 24 mesi | 94 - 97 | 1,9 - 3,0 | 0,5 - 3,0 |
| Oltre 2 anni | 95 - 98 | 2,0 - 3,3 | 0,1 - 1,2 |

HbA, emoglobina A; HbA₂, emoglobina A₂; HbF, emoglobina fetale.

Tabella 4

Principali variabili preanalitiche legate all'individuo che possono influenzare le concentrazioni ematiche di emoglobina A₂

| Aumento | Diminuzione |
|---|---|
| Ipertiroidismo | Anemia sideropenica grave |
| Anemia megaloblastica | Anemia sideroblastica |
| Terapia con farmaci retro-virali | Alleli β -talassemici "silenti" |
| Omozigosi per emoglobina S con α -talassemia | Interazione tra δ e β -talassemia |
| Alcune varianti emoglobiniche instabili | $\delta\beta$ -talassemia |
| Gene α triplicato ($\alpha\alpha\alpha$) | Variante emoglobinica con mutazione sulle catene |
| | Variante delle catene δ |
| | Malattia da emoglobina H |
| | Alcune forme di persistenza ereditaria di emoglobina fetale |
| | Emoglobina Lepore |
| | Eritroleucemia |

rebbe maggiormente con il progredire della malattia (26).

Gli aumenti riscontrati in presenza di anemia megaloblastica sono stati segnalati da varie fonti (27, 28), ma non vi sono evidenze sperimentali che ne spieghino la ragione. Nel caso della omozigosi per emoglobina S in presenza di α -talassemia, l'aumento dell'HbA₂ è invece spiegato dalla maggiore probabilità delle catene δ di combinarsi con le catene α a formare il tetramero emoglobinico, rispetto alle catene β^S . L'aumento dell'HbA₂ in presenza di gene α triplicato sarebbe invece spiegato dalla maggiore disponibilità di catene α circolanti (29).

Se un aumento dell'HbA₂ può non essere causato dalla presenza del tratto β -talassemico, come nei casi sopra citati, e questo può portare ad una diagnosi errata di eterozigosi per β -talassemia, la situazione opposta (mancanza di riconoscimento del tratto β -talassemico quando invece esso sia presente) si può verificare in presenza delle condizioni mostrate nella colonna di destra della Tabella 4. Che l'anemia sideropenica possa influenzare le concentrazioni di HbA₂, facendole diminuire significativamente, è noto da tempo (30), ma sembra che difficilmente (in meno dell'1% dei casi esaminati) le concentrazioni di HbA₂ nei portatori di tratto β -talassemico e con anemia sideropenica si abbassino a tal punto da confondersi con i valori dei soggetti con anemia sideropenica ma senza tratto β -talassemico (31), anche se la questione rimane ancora aperta (32).

Recentemente è emerso che esiste una proteina, chiamata proteina stabilizzante le catene α emoglobiniche (AHSP), che viene prodotta nella serie eritroide e la cui modulazione potrebbe avere un ruolo determinante nella definizione fenotipica dei soggetti con β -talassemia (33). È inoltre probabile che la riduzione di espressione delle globine α in presenza di anemia sideropenica renderebbe le globine α presenti meno disponibili a combinarsi con le globine δ , al posto delle globine β , spiegando quindi una minore presenza, per cellula, dell'HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) rispetto all'emoglobina A ($\alpha_2\beta_2$).

Le altre condizioni mostrate nella Tabella 4 spiegano possibili diminuzioni dell'HbA₂ quando le catene δ sintetizzate ancora una volta si trovano a competere con le catene β disponibili per formare il tetramero emoglobinico.

Raccolta e conservazione dei campioni

L'EDTA è l'anticoagulante più utilizzato nella raccolta del campione di sangue intero per la misura dell'HbA₂. Si può usare sia sangue venoso che capillare. Anche l'eparina può essere utilizzata, ma in questo caso la stabilità del campione è inferiore a quella del campione in EDTA, che è di almeno 3 settimane a 4 °C (34). Non ci sono riferimenti precisi in letteratura per la stabilità a temperatura ambiente, a -20 °C e a -80 °C. Alcuni produttori di diagnostici indicano una stabilità di un mese a -20 °C e tre mesi a -80 °C. Si raccomanda un congelamento rapido ed uno scongelamento lento a temperatura ambiente (circa 1 ora) con successivo delicato rimescolamento. Una volta scongelati i campioni debbono essere analizzati entro breve tempo.

Un campione che sia parzialmente coagulato non può essere accettato per l'analisi.

UTILIZZO CLINICO

La misura dell'HbA₂ è importante per lo studio delle anemie microcitiche e delle emoglobinopatie, con particolare riferimento al riconoscimento del portatore di β -talassemia. Sulla base di questa considerazione abbiamo cercato di fornire una chiave interpretativa al risultato della HbA₂, mettendo insieme la maggior parte delle informazioni attualmente disponibili nella Figura 1. In questa figura, oltre al dato dell'HbA₂, sono anche presi in considerazione altri esami di laboratorio utili nell'inquadramento delle sindromi talassemiche, quali i due parametri dell'emocromo più indicativi (volume corpuscolare medio (MCV) e contenuto emoglobinico cellulare (MCH)), i valori dell'emoglobina F ed i valori dei parametri più importanti per l'inquadramento dell'anemia sideropenica (a seconda dei contesti, la zinco-protoporfirina, la capacità ferro-legante totale, la ferritina, il recettore solubile della transferrina). All'estrema destra della Figura è mostrato il referto tipico del portatore di tratto β -talassemico, nel quale i valori dell'HbA₂ sono tipicamente superiori a 3,8% e generalmente non superano l'8% del totale dell'emoglobina nel sangue (22). Per valori superiori al 10% è probabile ci sia la presenza di una variante emoglobinica che interferisce nella misura quantitativa dell'HbA₂.

Valori molto bassi di HbA₂ debbono far pensare alla presenza di possibili varianti delle catene δ o a δ -talassemia, se l'emocromo è normale, o ad altri quadri se MCV e MCH sono ridotti e si può escludere la presenza di anemia sideropenica. La co-eridarietà di δ -talassemia in *cis* od in *trans* ad un gene talassemico è responsabile di alcune forme di β -talassemia con HbA₂ in concentrazioni fisiologiche.

Particolare cautela deve essere posta nella interpretazione di valori compresi nella zona "borderline", tra i valori tipici dei soggetti non portatori e quelli dei portatori "classici" di β -talassemia. È stato infatti dimostrato che tali valori, soprattutto se associati alla presenza di microcitosi, possono essere compatibili con la presenza di mutazioni β -talassemiche gravi (come la $\beta 39$) (35) e quindi il laboratorio non deve perdere questa possibilità di ipotesi diagnostica. Altri tipi di mutazioni (quali -101 C→T, -92 C→T, CAP +45 G→T, CAP +1 A→C, IVS2.nt844 C→G) non associate a microcitosi possono essere associate a lievi aumenti dell'HbA₂, e molti casi di β -talassemia con HbA₂ nei limiti fisiologici possono risultare dalla presenza della doppia eterozigosi tra δ e β -talassemia lieve (36). Da alcune indagini retrospettive che abbiamo effettuato in due centri ad alta prevalenza di sindromi talassemiche è emerso che l'occorrenza di questi fenotipi non è rara (in alcuni casi oltre il 5% di tutti gli esami effettuati per la misura dell'HbA₂) e quindi particolare attenzione deve essere posta all'accuratezza del risultato, perché in condizioni non ottimali (per es., per eventuali derive strumentali o perdita di accuratezza) il tasso di prevalenza di tali fenotipi potrebbe facilmente aumentare (37).

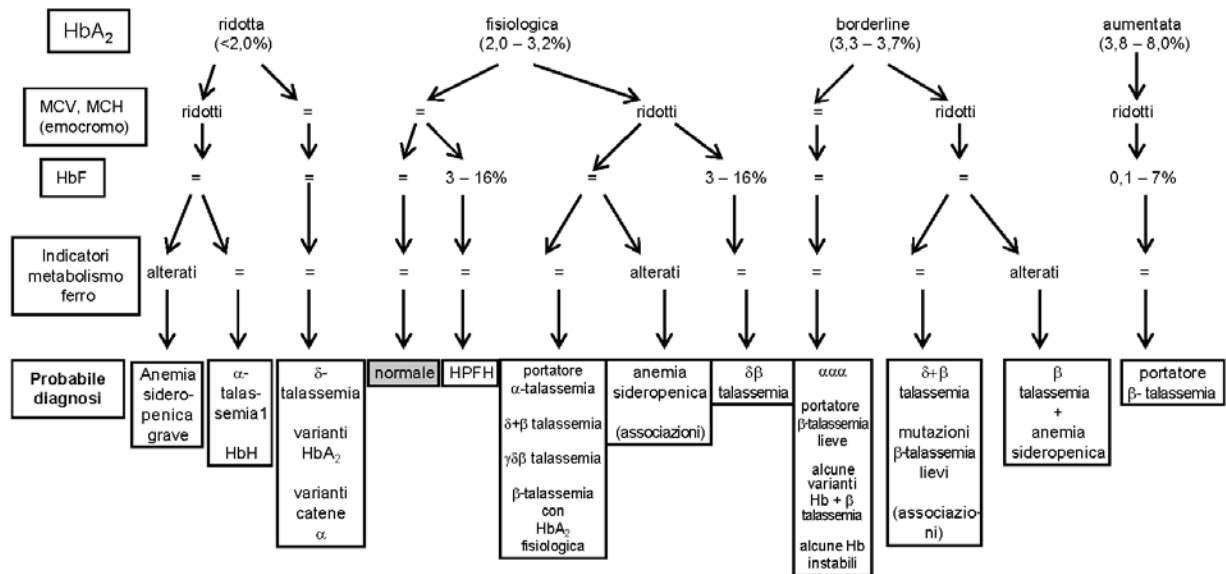


Figura 1

Quadro sinottico per la diagnostica delle sindromi talassemiche partendo dal risultato dell'emoglobina A₂ (HbA₂). I valori soglia dei parametri dell'emocromo sono tipicamente 80 fL per il volume corpuscolare medio (MCV) e 27 pg per il contenuto emoglobinico cellulare (MCH).

=, assenza di alternazione; HbF, emoglobina fetale; HbH, emoglobina H; HPFH, persistenza ereditaria di HbF.

Nel loro insieme le osservazioni presentate nella Figura 1 devono sempre essere integrate dalla considerazione che le manifestazioni cliniche della β-talassemia sono molto diverse, perché si possono avere sia casi di anemia grave, trasfusione-dipendente, che condizioni assolutamente silenti dal punto di vista clinico. Di fatto, il fattore di gran lunga più affidabile nel predire il fenotipo è la natura della mutazione nello stesso locus genico β, ma tuttavia è molto difficile mettere in relazione il genotipo col fenotipo a causa delle complesse interrelazioni con l'ambiente e con altri fattori genetici a livello secondario o terziario (geni modificatori), taluni rilevabili da studi familiari, altri tuttora sconosciuti (38).

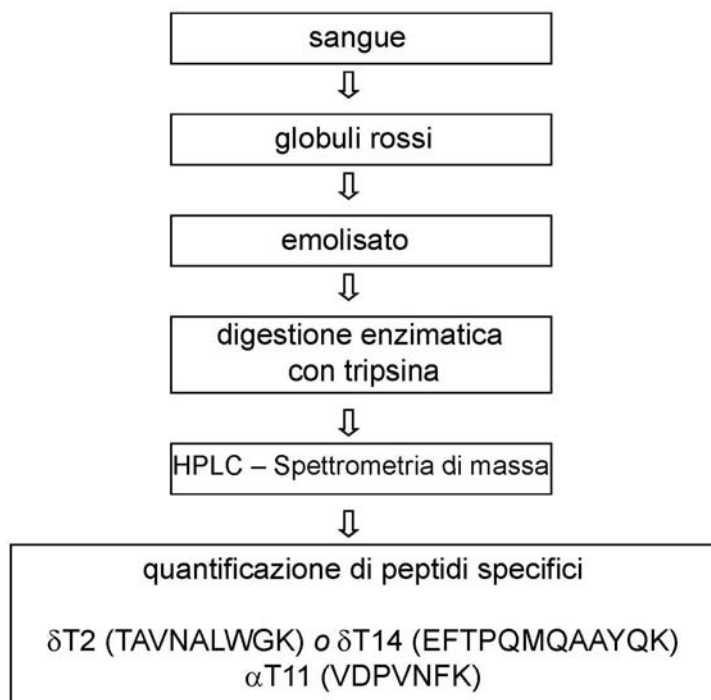
STANDARDIZZAZIONE DELLA MISURA DELL'HbA₂

La standardizzazione delle misure dell'HbA₂ è possibile attualmente utilizzando l'unico materiale di riferimento disponibile, che consiste in un prodotto liofilo preparato alla fine degli anni '90 dalla WHO. Tale liofilo, preparato a partire dal sangue di un portatore di β-talassemia ed ottenibile dal "National Institute for Clinical Laboratory Standards" (NIBSC; cod. NIBSC 89/666), ha un titolo di HbA₂ assegnato a suo tempo da un gruppo di laboratori che utilizzavano minicolonne in cromatografia liquida a scambio ionico. E' attualmente disponibile in quantitativi limitati e non ne è prevista una nuova produzione.

Al fine di poter arrivare ad una standardizzazione globale dell'HbA₂, l'IFCC ha promosso nel 2004 la costituzione di un gruppo di lavoro per lo sviluppo di un nuovo materiale di riferimento per l'HbA₂ in collaborazione con l'Institute for Reference Materials and Measurements

(IRMM). Il gruppo di lavoro (IFCC WG-HbA₂) ha quindi iniziato a sviluppare un sistema metrologico completo per la misura di questa emoglobina, secondo le più recenti indicazioni sulla standardizzazione degli esami di laboratorio (39). Gli elementi chiave del sistema sono rappresentati dal metodo di riferimento, che ha lo scopo di assegnare il valore ad un materiale di riferimento ben caratterizzato, ed appunto dal materiale di riferimento. Questo materiale, una volta certificato, servirà ai produttori di diagnostici per assegnare i valori ai propri materiali di calibrazione. I laboratori clinici useranno quindi le procedure calibrate con i materiali validati per misurare l'HbA₂ nei campioni biologici ed in tal modo i risultati ottenuti saranno riferibili al metodo di riferimento raggiungendo così la standardizzazione di tutte le misure.

Il metodo di riferimento che il WG-HbA₂ sta cercando di sviluppare si rifà al principio utilizzato per la messa a punto del metodo di riferimento per l'emoglobina A_{1c}, vale a dire la mappatura peptidica quantitativa (Figura 2) (40). Essenzialmente, dopo aver isolato, lavato e lisato le emazie, le proteine eritrocitarie vengono digerite con tripsina e si isolano e quantificano, mediante spettrometria di massa, due peptidi specifici, uno per le catene δ ed uno per le catene α dell'emoglobina. Dal rapporto delle concentrazioni relative dei due peptidi si risale, tramite un algoritmo, alla concentrazione di HbA₂ nel campione, secondo il principio proposto da Leone et al. (41). Al momento non si è ancora deciso quale peptide utilizzare per le catene δ, perchè ce ne sono almeno due (δT2 e δT14) che sembrano avere caratteristiche ottimali (unicità di rapporto massa/carica, buona risoluzione dagli altri tramite cromatografia inversa, facilità di clivaggio da parte della tripsina). Il metodo candidato di riferi-

**Figura 2**

Principio del metodo candidato di riferimento per la misura dell'emoglobina A₂ mediante mappatura peptidica.

mento è stato implementato in tre diversi laboratori e sono in corso esperimenti per valutare il grado di concordanza delle misure ottenute su una serie di campioni di sangue umano, con valori di HbA₂ ben distribuiti nell'intervallo fisiopatologico. I dati preliminari finora ottenuti provverebbero una buona correlazione anche con i risultati ottenuti con sistemi HPLC commerciali.

Per quanto riguarda i materiali di riferimento, nel nostro laboratorio si è provveduto ad isolare sufficienti quantità di emoglobina A e di HbA₂, partendo da sacche di sangue di donatori sani e portatori di tratto β-talassemico. Le emoglobine isolate sono state analizzate con diverse tecniche (HPLC, spettrometria di massa) e trovate pure per oltre il 99%. Da queste sono state quindi preparate miscele con concentrazione relativa di HbA₂ variabile tra 2% e 6%, che sono state utilizzate per la calibrazione del metodo di riferimento.

Si è anche provveduto a trasmettere all'IRMM un lotto pilota di emolisato umano congelato da sottoporre a liofilizzazione con la stessa procedura che verrà poi utilizzata per la preparazione dei materiali secondari di riferimento. Si prevede che, se la procedura di liofilizzazione non provocherà la comparsa di artefatti o di alcun effetto matrice e se i liofilati ottenuti saranno sufficientemente stabili ed omogenei, si potrà provvedere in un prossimo futuro ad allestire un lotto sufficientemente grande di altri liofilati da sottoporre quindi a certificazione e validazione per essere infine resi disponibili come materiali di riferimento secondari.

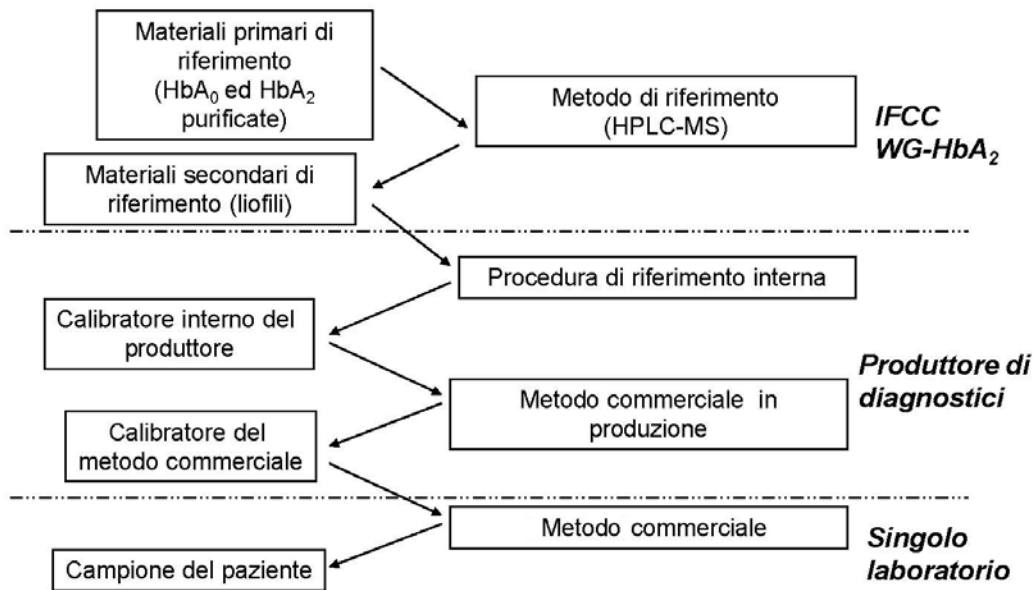
Lo schema del sistema di riferimento dell'HbA₂ al quale il gruppo di lavoro IFCC sta lavorando è riassunto

nella Figura 3. Si auspica che, se il progetto riuscirà a completarsi con successo, anche per questo parametro si possa giungere ad una standardizzazione su scala mondiale, con conseguente miglioramento della sensibilità diagnostica e dell'affidabilità dei dati a livello di consultorio genetico. Il processo limitante al momento resta la validazione e pubblicazione del metodo candidato di riferimento, che deve essere sufficientemente robusto e riproducibile da poter permettere l'assegnazione dei valori ai materiali secondari di riferimento con un margine di incertezza sufficientemente ridotto rispetto ai traguardi per l'errore totale. Secondo alcuni, infatti, l'incertezza associata ad una misura ottenuta con un metodo di riferimento non dovrebbe eccedere un quarto (quindi il 25%) dell'errore totale accettabile (42).

In attesa che il sistema di riferimento IFCC sia implementato ai laboratori non resta che continuare ad usare metodiche di buona qualità analitica, che in particolare siano in grado di raggiungere i traguardi analitici sopra menzionati, e operare monitorando costantemente la qualità delle proprie metodiche, attraverso l'utilizzo di adatti schemi di VEQ.

RINGRAZIAMENTI

Le seguenti persone, oltre agli autori del presente documento, sono gli attuali componenti del WG-HbA₂ IFCC: Donatella Caruso (Università degli Studi di Milano); Christine Schaeffer, Alain Van Dorsselaer (CNRS, Strasbourg, Francia); Emmanuel Bissé (University Hospital, Freiburg, Germania); Barbara Wild

**Figura 3**

Il sistema di riferimento proposto dal gruppo di lavoro IFCC e la catena della riferibilità metrologica per l'emoglobina A₂ (HbA₂). Sono anche indicati i diversi livelli di responsabilità.

(King's College Hospital, London, Regno Unito); Patricia Kaiser, Hans Reinauer (INSTAND ev, Düsseldorf, Germania). Ad essi va il nostro ringraziamento per il lavoro finora svolto. Si ringrazia inoltre il Dott. Giovanni Ivaldi (Laboratorio Genetica Medica, Ospedali Galliera, Genova) per aver rivisto il presente lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- Kunkel HG, Wallenius G. New hemoglobin in normal adult blood. *Science* 1955;122:288.
- Kunkel HG, Ceppellini R, Muller-Eberhard U, et al. Observation of the minor basic hemoglobin component in blood of normal individuals and patients with thalassemia. *J Clin Invest* 1957;36:1615-25.
- Gerald PS, Diamond LK. The diagnosis of thalassemia trait by starch block electrophoresis of hemoglobin. *Blood* 1958;13:61-9.
- Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1981.
- International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Recommendations for selected methods for quantitative estimation of HbA₂ and for HbA₂ reference preparation, *Br J Haematol* 1978;38:573-8.
- Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij R, et al. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clin Chem* 1998;44:740-48.
- Shihabi ZK, Hinsdale ME, Daugherty HK. Hemoglobin A₂ quantification by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 2000;21:749-52.
- Shyamala M, Kiefer CR, Moscoso H, et al. Application of a monoclonal antibody specific for the δ chain of hemoglobin A₂ in the diagnosis of β -thalassemia. *Am J Hematol* 1991;38:214-9.
- Ravindran MS, Patel ZM, Khatkhatay MI, et al. Beta-thalassaemia carrier detection by ELISA: a simple screening strategy for developing countries. *J Clin Lab Anal* 2005;19:22-5.
- Waickman H, Prehu C, Bardakdjian-Michau J, et al. Abnormal hemoglobin: laboratory methods. *Hemoglobin* 2001;25:169-81.
- Schmidt RM, Brosious EM. Quantitation of hemoglobin A₂. An interlaboratory study. *Am J Clin Pathol* 1979;71:534-9.
- Salvati AM, Maffi D, Caprari P, et al. A pilot programme of external quality assessment for general haematology in Italy. *Ann Ist Super Sanita`* 1995;31:131-9.
- Paleari R, Giambona A, Cannata M, et al, for the IFCC Working Group Standardization of HbA₂. External quality assessment of hemoglobin A₂ measurement: data from an Italian pilot study with fresh whole blood samples and commercial HPLC systems. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:88-92.
- Mosca A, Paleari R, Giambona A, et al. Esperienze pilota sulla Valutazione Esterna di Qualità della misura dell'emoglobina A₂ con campioni di sangue intero e metodiche HPLC commerciali. *Biochim Clin* 2007;31:105-10.
- <http://www.ao-careggi.toscana.it/crrveq>.
- Shu DD, Kraus JS, Bures K. Influence of haemoglobin S adducts on haemoglobin A₂ quantification by HPLC. *Clin Chem* 1996;42:1113-4.
- Shokrani M, Terrell F, Turner EA, Aguinaga MD. Chromatographic measurement of haemoglobin A₂ in blood samples that contain sickle haemoglobin. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:191-4.
- Kalleas C, Tentes I, Margaritis D, et al. Effect of HbS in the determination of HbA₂ with the TOSOH HLC-723G7 analyzer and the HELENA Beta.Thal Quick column kit. *Clin Biochem* 2007;40:242-7.
- <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
- Fraser GC, Hyltoft Petersen P, Libeer JC, et al. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Ann Clin Biochem* 1997;34:8-12.

21. Chanarin L, ed. *Laboratory haematology, an account of laboratory techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989;39-40.
22. Tietz NW, ed. *Clinical guide to laboratory tests*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995;316.
23. Kendall AG, Bastomsky CH. Hemoglobin A₂ in hyperthyroidism. *Hemoglobin* 1981;5:571-7.
24. Routy JP, Monte M, Beaulieu R, et al. Increase of hemoglobin A₂ in human immunodeficiency virus-1-infected patients treated with zidovudine. *Am J Hematol* 1993;43:86-90.
25. Howard J, Henthorn JS, Murphy S, et al. Implications of increased haemoglobin A₂ values in HIV positive women in the antenatal clinic. *J Clin Pathol* 2005;58:556-8.
26. Galacteros F, Amaudric F, Prehu C, et al. Acquired unbalanced hemoglobin chain synthesis during HIV infection. *Comptes Rendus Acad Sci* 1993;316:437-40.
27. Alperin JB, Dow PA, Petteway MB. Hemoglobin A₂ levels in health and various hematological disorders. *Am J Clin Pathol* 1977;67:219-26.
28. Metha BC, Agarwal MB. Haemoglobin A₂ in nutritional megaloblastic anaemia. In *J Med Res* 1983;77:478-81.
29. Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Vrettou C, et al. The triplicated α -globin gene locus in β -thalassaemia heterozygotes: clinical, haematological, biosynthetic and molecular studies. *Brit J Haematol* 1996;95:467-71.
30. Harthoorn-Lasthuizen EJ, Lindemans J, Langenhuijsen MM. Influence of iron deficiency anaemia on haemoglobin A₂ levels: possible consequences for beta-thalassaemia screening. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:65-70.
31. Madan N, Sikka M, Sharma S, et al. Phenotypic expression of hemoglobin A₂ in beta-thalassemia trait with iron deficiency. *Ann Hematol* 1998;77:93-6.
32. Giordano PC. The effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. *Clin Lab Haematol* 2003;25:203.
33. Lai MI, Jiang J, Silver N, et al. Alpha-haemoglobin stabilising protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of beta-thalassaemia. *Brit J Haematol* 2006;133:675-82.
34. Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994:2029.
35. Galanello R, Barella S, Ideo A, et al. Genotype of subjects with borderline hemoglobin A₂ level; implication for beta-thalassemia carrier screening. *Am J Hematol* 1994;46:79-81.
36. Giambona A, Lo Gioco P, Marino M, et al. The great heterogeneity of thalassemia molecular defects in Sicily. *Human Genetics* 1995;526.
37. 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, in corso di stampa.
38. Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica* 2005;90:649-60.
39. Panteghini M, Forest JC. Standardization in laboratory medicine: new challenges. *Clin Chim Acta* 2005;355:1-12.
40. Mosca A. La determinazione dell'emoglobina glicata nel sangue umano: attualità e prospettive. *Biochim Clin* 2008;32:27-35.
41. Leone L, Monteleone M, Gabutti V, et al. Reversed phase high-performance liquid chromatography of human haemoglobin chains. *J Chromatogr* 1985;321:407-19.
42. <http://www.dgkl-rfb.de:81/RelaProcManual.pdf>