

Utilità clinica della misura dell'emoglobina fetale

Renata Paleari¹, Giovanni Ivaldi², Daniela Leone², Antonio Amato³, Andrea Mosca¹

¹Centro Interdipartimentale per la Referibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano

²Laboratorio di Genetica Umana e Microcitemia, Ospedali Galliera, Genova

³Associazione Nazionale per la Lotta contro le Microcitemie in Italia, Onlus-Centro di Studi delle Microcitemie, Roma

ABSTRACT

The clinical relevance of the determination of fetal hemoglobin. The clinical significance of the determination of hemoglobin F (HbF) depends on a number of hereditary and acquired conditions. The HbF concentrations in blood are variably increased in the presence of β -thalassemia trait, and are more typically elevated in presence of $\delta\beta$ -thalassemia and of hereditary persistence of HbF. Here, after a review of pre-analytical and analytical aspects of HbF determination, we present suggestions for the interpretation of the HbF values together with other classic laboratory parameters in different thalassemia syndromes and related hemoglobinopathies.

INTRODUZIONE

L'emoglobina fetale (HbF) rappresenta la principale frazione emoglobinica durante la vita fetale ed alla nascita costituisce circa l'80% dell'emoglobina totale. La HbF è prodotta a partire dalla sesta settimana di gestazione e sostituisce le emoglobine embrionali Gower I, Gower II e Portland prodotte nelle prime settimane dal concepimento. Dopo la nascita, la sintesi di HbF diminuisce gradualmente e viene sostituita da quella dell'emoglobina A (HbA); in tal modo, entro il primo anno di vita appare il caratteristico fenotipo emoglobinico dell'adulto con concentrazioni di HbF inferiori a 1% (1, 2). La HbF è distribuita eterogeneamente nei globuli rossi in quanto la sua sintesi è limitata ad un numero ristretto di cellule, chiamate F-cellule, che rappresentano approssimativamente il 3-7% degli eritrociti e contengono circa il 20-25% di HbF (3).

L'HbF è formata da due catene α e due catene γ ($\alpha_2\gamma_2$), costituite rispettivamente da 141 e 146 amminoacidi. Le catene α sono identiche a quelle presenti nella HbA ($\alpha_2\beta_2$) e nella HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), mentre le catene γ sono caratteristiche della HbF e differiscono dalle β per 39 amminoacidi. Le catene γ sono strutturalmente omogenee tra loro, con l'unica diversità in posizione 136, dove può essere presente glicina (catene G_γ) o alanina (catene A_γ). Inoltre, nella catena A_γ è presente in posizione 75 un sito polimorfico, dove si può trovare treonina (A_γ^T) al posto di isoleucina (A_γ^I). Le catene G_γ e A_γ vengono prodotte da due geni distinti localizzati sul cromosoma 11 nel cluster β -globinico. Il rapporto percentuale $G_\gamma:A_\gamma$ è circa 70:30 alla nascita per poi diventare 40:60 nell'adulto. Variazioni in questo rapporto sono state osservate in alcune patologie ereditarie a carico dell'emoglobina (4, 5) o in seguito a duplicazioni o riarrangiamenti dei geni G_γ e A_γ (6).

Circa il 10-20% della HbF, sia nel sangue fetale che nell'adulto, è presente in forma acetilata. L'acetilazione avviene in seguito ad una reazione enzimatica post-traduzionale a livello delle glicine N-terminali delle

catene γ (7, 8).

Da un punto di vista funzionale, le emazie con elevato contenuto di HbF presentano un'affinità per l'ossigeno più elevata rispetto a quelle che hanno esclusivamente HbA a causa della scarsa interazione dell'HbF con il 2,3-difosfoglicerato (DPG): in gravidanza, questa caratteristica facilita il trasporto dell'ossigeno dagli eritrociti materni a quelli fetali (9).

La misura della HbF è utile nello studio e nella diagnosi di alcuni importanti disordini a carico dei geni globinici dove le concentrazioni di HbF possono aumentare considerevolmente, principalmente β - e $\delta\beta$ -talassemia, ed elevata persistenza di HbF (HPHF), ed in alcune patologie acquisite, che sono associate ad un modesto incremento di HbF. La misura della HbF viene inoltre richiesta per monitorare i soggetti con anemia falciforme durante il trattamento con farmaci in grado di indurre la produzione di HbF in età adulta (10). La HbF è infatti un noto inibitore della polimerizzazione della emoglobina S (HbS) e diverse sostanze in grado di stimolare la produzione di HbF sono state sperimentate a scopo terapeutico.

Per tutti questi motivi, la corretta misura dell'HbF assume importanza clinica. In questa rassegna, sono riportate le più recenti informazioni disponibili al riguardo oltre ad alcune raccomandazioni utili per evitare i più comuni errori e per interpretare al meglio il risultato di questo esame di laboratorio.

ASPETTI METODOLOGICI

Il metodo classico per la determinazione della HbF è quello della denaturazione alcalina (11). Il metodo è basato sulla maggiore resistenza della HbF alla denaturazione con basi forti rispetto alla HbA in quanto la denaturazione è attivata dalla ionizzazione di alcuni residui amminoacidici debolmente acidi (una tirosina e due cisteine) presenti nella HbA ma non nella HbF (12). La differenza nella resistenza agli alcali tra HbF e HbA è

solo relativa, per cui le condizioni operative dell'esame devono essere ottimizzate in modo che durante il trattamento con gli alcali si denaturino solo la HbA e la HbF rimanga immodificata. Prima dell'esposizione agli alcali, tutte le emoglobine vengono convertite nella forma stabile di cianometemoglobina mediante il trattamento con il reagente di Drabkin. Una versione ottimizzata del metodo è stata proposta da Pembrey et al. (13). È importante sottolineare che la denaturazione alcalina è un esame cinetico, pertanto per ottenere risultati riproducibili è necessario che venga eseguito in condizioni altamente standardizzate.

Attualmente, l'approccio più comunemente utilizzato per la misura della HbF è basato sulla sua separazione dalle altre frazioni emoglobiniche mediante HPLC a scambio cationico su strumentazione dedicata (14, 15). L'elettroforesi capillare è stata recentemente proposta come alternativa all'HPLC (16), mentre i metodi immunochimici finora sviluppati non sono stati ancora sufficientemente validati. Con il metodo della denaturazione alcalina viene misurata tutta la HbF, mentre in HPLC la HbF viene separata dalla HbF acetilata, che viene eluita con un tempo di ritenzione di poco inferiore. Questo comporta che i valori di HbF ottenuti in HPLC sono significativamente inferiori e che, anche se questo fattore è clinicamente irrilevante, ciò debba essere tenuto in considerazione quando si vogliono confrontare i metodi.

La HbF è stata recentemente determinata mediante spettrometria di massa con ionizzazione electrospray (ESI-MS) (17), una tecnica già ampiamente utilizzata nell'analisi delle varianti emoglobiniche anche in programmi di screening (18). Il metodo ha una buona riproducibilità (CV <5%) e può essere utilizzato per la valutazione accurata della massa delle catene γ nel sangue da cordone ombelicale.

Per la misura della HbF non esiste un programma internazionale di standardizzazione, per cui i risultati sono metodo-dipendenti. Inoltre, pochi programmi di VEQ includono la HbF tra gli analiti offerti.

La determinazione delle cellule contenenti HbF è utile per valutare la distribuzione della HbF negli eritrociti in presenza di HPFH, una condizione in cui la HbF è omogeneamente distribuita nei globuli rossi o per la ricerca di eritrociti fetali nel sangue materno in seguito ad emorragie transplacentali. L'esame di eluizione acida proposto da Kleihauer et al. (19) è ancora utilizzato, anche se recentemente sono stati proposti metodi più sensibili basati sull'utilizzo di anticorpi monoclonali e della citometria a flusso (20). È stata inoltre proposta la misura della HbF nel sangue di neonato mediante emogasanalisi, sulla base della determinazione della pressione parziale di ossigeno alla quale l'emoglobina è saturata al 50% (P_{50}) dalla curva di dissociazione per l' O_2 , che si abbasserebbe proporzionalmente alla quantità di HbF presente. Questo metodo però non è mai stato validato e fornisce risultati sovrastimati rispetto all'HPLC (21).

La presenza di varianti emoglobiniche può interferire nella misura della HbF in HPLC. Sono state segnalate un

numero limitato di varianti che presentano tempi di ritenzione uguali a quello della HbF (ad es., Hb Camperdown, Hb Dagestan, Hb J-Sardegna) (22). Anche concentrazioni elevate di emoglobina glicata (HbA_{1c}) possono interferire con la misura della HbF, in quanto le due emoglobine hanno tempi di ritenzione molto vicini.

Diversi fattori devono essere tenuti in considerazione quando si utilizzano i metodi HPLC, come ad es. le modalità di integrazione delle aree dei picchi che possono essere diverse nei diversi sistemi analitici, il possibile trascinarsi tra i campioni, la concentrazione di Hb del campione e differenze nei lotti di reagenti. Inoltre, è essenziale al fine di ottenere risultati attendibili, la valutazione critica dei cromatogrammi unitamente all'attenzione nella calibrazione dello strumento e allo svolgimento regolare dei programmi di controllo qualità. Dati del programma di VEQ della Regione Toscana indicano, per valori di HbF attorno al 4%, una variabilità interlaboratorio (CV) tra il 5% ed il 9%, limitatamente ai laboratori che utilizzano metodiche HPLC. La variabilità aumenta ulteriormente per concentrazioni più basse di HbF.

Raccolta e conservazione dei campioni

L'EDTA rappresenta l'anticoagulante di scelta per il prelievo dei campioni di sangue su cui devono essere effettuate analisi per lo studio delle emoglobinopatie, ad eccezione per la sintesi delle globine in vitro dove viene consigliato l'uso dell'eparina. Per la misura della HbF è preferibile utilizzare sangue fresco o comunque prelevato da non più di una settimana; tuttavia, è stato riportato che mediante HPLC è possibile ottenere risultati di HbF accurati anche in campioni conservati a 4 °C fino a 3 settimane (23), mentre la metemoglobina ed altri composti che si formano durante la conservazione del campione tendono ad aumentare progressivamente. I lisati possono essere conservati a -20 °C o a -80 °C per tempi più lunghi, anche se dati precisi sulla stabilità dei campioni in queste condizioni non sono disponibili. Alcune aziende dichiarano una stabilità del campione di un mese a -20 °C e 3 mesi a -80 °C. Lo scongelamento del campione seguito da ricongelamento è da evitare.

Traguardi analitici

I dati sulla variabilità biologica sono spesso utilizzati per definire i traguardi analitici delle procedure di laboratorio. Per quanto riguarda l'Hb totale e l' HbA_{1c} i dati di variabilità biologica sono reperibili in letteratura, mentre nessuna informazione è disponibile a questo riguardo sulla HbF (24, 25).

Unità di misura

L'unità di misura utilizzata per la HbF è la percentuale relativa (%) sul totale delle emoglobine eritrocitarie. Tale unità non è in linea con il Sistema Internazionale (SI), ma è tuttavia ampiamente consolidata e utilizzata in tutto il

mondo, come d'altra parte si verifica per altre unità di misura ed altre grandezze (ad es., la pressione espressa in mmHg e non in kPa).

Intervalli di riferimento

Ogni laboratorio dovrebbe calcolare i propri intervalli di riferimento per la HbF, misurandola in almeno 100 individui adulti che non siano portatori di α o β -talassemia e che non abbiano disturbi del metabolismo del ferro. Per i soggetti adulti viene generalmente riportato solamente il limite superiore di riferimento, a causa delle concentrazioni estremamente basse in cui la HbF è presente in assenza di sindromi talassemiche. I valori trovati nel laboratorio di uno degli autori (GI) sono sempre $\leq 1,1\%$ in assenza del polimorfismo -158 C \rightarrow T e $\leq 2,5\%$ quando questo polimorfismo è presente (Tabella 1). In presenza di β -talassemia eterozigote, anche in combinazione con il polimorfismo -158 C \rightarrow T, o nel corso di gravidanza si possono osservare nell'adulto valori variabilmente aumentati di HbF.

E' possibile riscontrare valori di riferimento differenti a causa di differenze tra le diverse metodiche analitiche o alle caratteristiche della popolazione riguardo la frequenza di α -talassemia o anemia sideropenica. Nei bambini, la HbF si stabilizza dopo il primo anno di età e raggiunge le concentrazioni riscontrabili nell'adulto dopo i due anni (26).

PRINCIPALI CAUSE DI AUMENTO DELL'EMOGLOBINA FETALE

Fattori genetici quantitativi

Nella Tabella 2 sono riportate le cause più rilevanti che possono determinare un aumento delle concentrazioni di HbF e che sono essenzialmente riconducibili a difetti dei geni γ , difetti in altri geni o a condizioni acquisite. In generale, va tenuto presente che i valori di HbF vanno sempre interpretati nel contesto della più importante situazione ematologica globale (anemia, macrocitosi, ipocromia).

Finora sono state descritte più di 100 mutazioni dei geni γ o delle zone adiacenti che causano HPFH (27). Alcune di esse (ad esempio la -117 G \rightarrow A $A\gamma$; la -175 T \rightarrow C $A\gamma$ o $G\gamma$; la -196 C \rightarrow T $A\gamma$ e la -202 C \rightarrow G $G\gamma$) sono associate a concentrazioni piuttosto elevate di HbF (fino a 35%) con distribuzione pancellulare. Altre mutazioni (come la -202 C \rightarrow T $A\gamma$) sono associate a concentrazioni meno elevate di HbF (fino a 15%) con distribuzione eterocellulare; altre ancora (come la -37 A \rightarrow T $G\gamma$) si presentano in associazione con rare forme di δ -talassemia e con concentrazioni di HbF di poco aumentate (intorno a 2-3%) (28). Infine, alcune mutazioni (come la -158 C \rightarrow T in $G\gamma$) presentano valori di HbF quasi fisiologici (29).

In presenza di alcune varianti (HbS, HbC, Hb Lepore, alcune Hb instabili) e di β -talassemia, si può osservare un lieve aumento di HbF nei portatori eterozigoti (da 1% a 5%), mentre aumenti più consistenti sono osservabili

negli omozigoti e negli eterozigoti composti. In presenza di HbS omozigote o di HbS associata alla β -talassemia, l'incremento di HbF è variabile in relazione all'aplotipo β S presente (Benin, Bantu, Camerun, Senegal, arabo-indiano) e alla severità della malattia. Nell'aplotipo arabo-indiano, l'aumento di HbF rende la HbS più solubile allo stato deossigenato e la malattia meno severa (30). Modesti incrementi di HbF (2-4%) sono stati osservati anche nella sferocitosi ereditaria (31). Concentrazioni di HbF variabilmente aumentate (10-80%) si riscontrano in caso di talassemia intermedia da eterozigosi composta HbE/ β -talassemia, in relazione all'età, alla presenza di α -talassemia e a determinanti genetici della sintesi delle catene γ (32). Inoltre, come mostrato nella Tabella 1, la presenza del polimorfismo -158 C \rightarrow T, comporta un aumento di HbF in soggetti per il resto sani. Recentemente è stata trovata una variante del gene BCL11A associata ad aumento della HbF in portatori di β -talassemia e soggetti con HbS (33).

Fattori genetici qualitativi

Nella valutazione dell'assetto emoglobinico alla nascita o comunque in presenza di HbF aumentata occorre considerare la possibilità che siano presenti varianti strutturali delle catene $G\gamma$ o $A\gamma$. In letteratura sono riportate 85 varianti, rispettivamente 30 delle catene $A\gamma$ e 51 delle catene $G\gamma$, mentre per altre 4 varianti non è nota la catena interessata al difetto (27). A causa dello "switch" che interessa soprattutto i primi mesi di vita possono facilmente passare inosservate molte di queste varianti fetali in quanto nella maggior parte dei casi non sono associate a quadri clinici di significato patologico.

Fattori occasionali

Durante la gravidanza si verifica un aumento delle concentrazioni di HbF nel sangue materno che raggiungono il valore massimo all'inizio del secondo trimestre per poi tornare lentamente ai livelli fisiologici al termine della gravidanza. Tale incremento rappresenta probabilmente una risposta a induttori placentali o fetali che promuovono la produzione di F-cellule che aumentano nel circolo materno.

Nella leucemia mieloide cronica giovanile (malattia rara che si manifesta in bambini al di sotto dei 5 anni) sono stati rilevati consistenti aumenti di HbF, che varia da 20% a 80% e tende ad aumentare con il progredire della malattia (34). Poiché la HbF è distribuita in modo eterogeneo negli eritrociti ed il rapporto $G\gamma:A\gamma$ rispecchia il quadro fetale, si è ipotizzato che una linea cellulare, prima o durante lo "switch", sia sfuggita al controllo del meccanismo che porta ad un normale processo di differenziamento piuttosto che un'inversione dell'eritropoiesi. Anche in altre forme leucemiche, ed in particolare in soggetti affetti da leucemia acuta in fase di remissione dopo trattamento farmacologico, sono stati osservati aumenti consistenti di HbF, a volte fino al 15% (35).

La HbF è spesso aumentata nell'anemia aplastica

Tabella 1

Concentrazioni ematiche di emoglobina fetale (HbF) in soggetti non portatori di persistenza ereditaria di HbF ed in soggetti eterozigoti per il polimorfismo $G\gamma$ -158 C→T, in presenza od assenza di gravidanza e concomitante tratto β -talassemico

HbF (%)		Soggetti		
Media	Intervallo	Tipo	n	
0,4	0,1–1,1	Sani ^a	288	
1,1	0,4–2,3	Sani in gravidanza ^b	114	
1,4	0,4–2,5	Sani con -158 C→T eterozigosi	68	
1,6	0,3–2,2	β -talassemia eterozigote	127	
2,0	1,2–3,9	Sani in gravidanza con -158 C→T eterozigosi	33	
2,8	1,5–4,7	β -talassemia eterozigote con -158 C→T eterozigosi	38	
3,9	0,5–7,2	Sani con -158 C→T omozigosi	22	
6,8	1,4–15,0	β -talassemia eterozigote con -158 C→T omozigosi	14	

^aSoggetti adulti non anemici e con valori fisiologici all'esame emocromocitometrico.

^bDonne non portatrici di difetti β -talassemici in età gestazionale variabile.

Tabella 2

Principali situazioni che possono determinare un aumento delle concentrazioni ematiche di emoglobina F (HbF) (modificata da rif. 1)

Disordini ereditari

Sindromi talassemiche

- β -talassemia omo- od eterozigote
- $\delta\beta$ -talassemia omo- od eterozigote
- persistenza ereditaria di emoglobina fetale (HPFH) omo- ed eterozigote

Altre emoglobinopatie

- anemia falciforme
- HbC, HbE, Hb Lepore, alcune emoglobine instabili (effetto variabile)
- alcune varianti emoglobiniche (Hb Rainier, Hb Bethesda) alcali-resistenti^a
- varianti emoglobiniche con pl uguale a quello dell'HbF^b
- varianti emoglobiniche con tempo di ritenzione simile a quello della HbF^b

Sferocitosi ereditaria

Disordini acquisiti

Malattie del sangue (non neoplastiche)

- anemia aplastica
- anemia normoblastica (refrattaria e non)
- anemia perniziosa
- anemia sideroblastica
- emoglobinuria parossistica notturna
- eritroblastopenia pura

Neoplasie

- epatocarcinoma
- eritroleucemia
- leucemia acuta
- leucemia mieloide cronica giovanile
- neoplasie con metastasi midollari

Condizioni associate a specifici trattamenti terapeutici

- chemioterapia per leucemie
- terapia con idrossiurea, 5-aza-2'-deossicitidina, butirrati, eritropoietina

Altre condizioni

- gammopatia monoclonale benigna
- gravidanza
- insufficienza renale cronica
- ipertiroidismo
- recupero dopo trapianto di midollo osseo o ipoplasia midollare
- trisomia 13 (trisomia D)

^aInterferenza sul metodo di denaturazione alcalina.

^bInterferenza sui metodi in HPLC.

congenita e nelle ipoplasie eritroidi, con una distribuzione negli eritrociti eterogenea e con un rapporto $G\gamma:A\gamma$ di tipo fetale. Nell'anemia di Fanconi la HbF è sempre aumentata anche dopo la remissione della malattia ottenuta con la terapia steroidea (36). Nell'emoglobinuria parossistica notturna si osserva un aumento di HbF non relativo alla linea clonale patologica ma ai cloni normali (37).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E RUOLO DEL LABORATORIO

Aumenti di HbF >1% in un individuo adulto si possono verificare in seguito ad uno o più difetti genetici e/o essere la conseguenza di anomalie ematologiche acquisite. La HPPH è quindi solo una delle possibili cause di aumento di HbF. In presenza di HbF aumentata il laboratorio ha pertanto un ruolo importante nell'indirizzare la diagnosi mediante l'analisi dei geni globinici e la scelta degli intervalli di riferimento più appropriati.

Escludendo *a priori* i casi di aumento variabile di HbF in presenza di aumento dell'HbA₂, tipicamente associati alla presenza di β -talassemia, si segnalano valori di HbF tipicamente tra il 4% e il 15% per la $\delta\beta$ -talassemia di tipo siciliano e tra il 15% e il 22% per la $\delta\beta$ -talassemia di tipo sardo. Invece, valori di HbF compresi tra 1% e 6% sono generalmente riferibili a difetti puntiformi del promotore dei geni γ globinici, in prevalenza associabili al difetto -158 C→T. Non risultano invece segnalati casi di aumento dell'HbF dovuti a difetti α -talassemici.

Da un punto di vista operativo, si deve in prima istanza escludere le $\delta\beta$ -talassemie effettuando analisi dei prodotti di amplificazione della reazione a catena della polimerasi (PCR). Negli altri casi, è invece necessario effettuare studi di sequenza od analisi con enzimi di restrizione. Ovviamente, il dato dell'HbF deve essere integrato con gli altri parametri più importanti, costituiti da alcuni dati dell'esame emocromocitometrico [soprattutto volume corpuscolare medio (MCV) e contenuto emoglobinico corpuscolare medio (MCH)] e dagli indicatori del metabolismo del ferro.

In generale, è auspicabile che un'attenta valutazione di queste emoglobine minori e un'accurata standardizzazione delle procedure analitiche utilizzate per la loro misura possa essere di aiuto nella diagnosi e nella cura delle sindromi talassemiche e delle emoglobinopatie (38).

RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato in parte supportato da un finanziamento della Comunità Europea, Directorate C - Public Health and Risk Assessment, agreement N. 2004110 (ENERCA II, titolare AM) e dal Ministero dell'Università e della Ricerca (MIUR). Si ringraziano il Dr. Maurizio Borsotti ed il Dr. Massimo Quercioli (Azienda Ospedaliera-Universitaria Careggi, Firenze) per aver fornito alcuni dati della VEQ per le emoglobine minori relativi agli esercizi 2008.

BIBLIOGRAFIA

1. Weatherall DJ, Clegg JB, eds. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1981.
2. Birgens H, Ljung R. The thalassaemia syndromes. *Scan J Clin Lab Invest* 2007;67:11-26.
3. Franco RS, Yasin Z, Palascak MB, et al. The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. *Blood* 2006;108:1073-6.
4. Adachi K, Kim J, Asakura T, et al. Characterization of two types of fetal hemoglobin: $\alpha_2G\gamma_2$ and $\alpha_2A\gamma_2$. *Blood* 1990;75:2070-5.
5. Papassotiriou I, Ducrocq R, Prehu C, et al. Gamma chains heterogeneity: determination of HbF composition by perfusion chromatography. *Hemoglobin* 1998;22:469-81.
6. Efremov GD, Dimovski AJ, Popovski Z, et al. The gamma-globin gene rearrangements in newborns from the Republic of Macedonia. *Hemoglobin* 1996;20:401-14.
7. Garlick RL, Mazer JS, Himelstein AL, et al. Acetylation of human hemoglobin occurs throughout erythroid cell maturation. *Biochim Biophys Acta* 1984;799:29-37.
8. Kasten-Jolly J, Abraham EC. Heterogeneity in the globin chain composition of a human minor fetal hemoglobin component. *Biochim Biophys Acta* 1985;829:6-12.
9. Schechter AN. Hemoglobin research and origins of molecular medicine. *Blood* 2008;112:3927-38.
10. Platt OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med* 2008;358:1362-9.
11. Betke K, Marti HR, Schlicht I. Estimation of small percentages of foetal hemoglobin. *Nature* 1959;184:1877-8.
12. Perutz MF. Mechanism of denaturation of haemoglobin by alkali. *Nature* 1974;247:341-4.
13. Pembrey ME, McWade P, Weatherall DJ. Reliable routine estimation of small amounts of foetal hemoglobin by alkali denaturation. *J Clin Pathol* 1972;25:738-40.
14. Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkiy B S-N, et al. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassaemias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clin Chem* 1998;44:740-8.
15. Guideline. The laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. *Br J Haematol* 1998;101:783-92.
16. Cotton F, Lin C, Fontaine B, et al. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobin A2 and F. *Clin Chem* 1999;45:237-43.
17. Davidson A, Green BN, Roberts NB. Fetal hemoglobin: assessment of glycation and acetylation status by electrospray ionization mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1230-8.
18. Kleinert P, Schmid M, Zurbriggen K, et al. Mass spectrometry: a tool for enhanced detection of hemoglobin variants. *Clin Chem* 2008;54:69-76.
19. Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem hämoglobin in den erythrocyten eines blutausstrichs. *Klin Wochenschr* 1957;35:637-8.
20. Janssen WCM, Hoffmann JJML. Evaluation of flow cytometric enumeration of foetal erythrocytes in maternal blood. *Clin Lab Haem* 2002;24:89-92.
21. Shiao SYP, OU CN. Accurate measurements of fetal hemoglobin for neonates with different gestational ages. *Hemoglobin* 2006;30:419-35.
22. Prehu C, Ducrocq R, Godart C, et al. Determination of Hb F levels: the routine methods. *Hemoglobin* 1998;22:459-67.
23. Tietz NW, ed. Clinical guide to laboratory tests. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1990:214.
24. <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>

25. Braga F, Dolci A, Mosca A, et al. Variabilità biologica dell'emoglobina glicata: un'analisi sistematica della letteratura. *Biochim Clin* 2009;33:297-302.
26. Ivaldi G, Leone D, Viaggi C, et al. Variabilità delle frazioni emoglobiniche dalla nascita all'età adulta in condizioni fisiologiche e patologiche. *Biochim Clin* 2007;31:276-9.
27. <http://globin.cse.psu.edu/>
28. Bouva MJ, Hartevelde CL, Bakker-Verwij G, et al. G γ -37 (A \rightarrow T): a new nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin determinant associated with the rare codon 91 (+T) δ^0 -thalassemia. *Hemoglobin* 2006;30:871-7.
29. Huisman THJ. Gamma chain abnormal human fetal hemoglobin variants. *Am J Hematol* 1997;55:159-63.
30. Miller BA, Salameh M, Ahmed M, et al. Progress in clinical and biological research. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis WA, eds. *Developmental control of globin gene expression*. New York: Alan R Liss Inc, 1987;251:415-26.
31. Mohamedi S, Sinzinger H, Schneider K. Hereditary spherocytosis. *Studies of erythrocyte enzymes and fetal hemoglobin before and after splenectomy*. *Acta Medica Austriaca* 1976;3:16-9.
32. Rees DC. Hemoglobin F and hemoglobin E/ β -thalassemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000;22:567-72.
33. Uda M, Galanello R, Sanna S, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of β -thalassemia. *Proc Nat Acad Sci USA* 2008;105:1620-5.
34. Weatherall DJ, Clegg JB, Wood WG, et al. Foetal erythropoiesis in human leukaemia. *Nature* 1975;257:710-2.
35. Rautonen J, Siimes MA. Initial blood fetal hemoglobin concentration is elevated and is associated with prognosis in children with acute lymphoid or myeloid leukemia. *Blut* 1990;61:17-20.
36. Gumruk F, Tavil B, Balta G, et al. Significance of fetal hemoglobin values in detection of heterozygotes in Fanconi anemia: reevaluation of fetal hemoglobin values by a sensitive method. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30:896-9.
37. Rassiga-Pidot AL, Cornwell GG 3rd, McIntyre OR. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with elevated fetal hemoglobin. *Blood* 1974;43:233-8.
38. Mosca A, Paleari R, Ivaldi G, et al. The role of haemoglobin A2 testing in the diagnosis of thalassaemias and related haemoglobinopathies. *J Clin Pathol* 2008;62:13-7.