

## Riscontro occasionale di una condizione emolitica mediante la determinazione di HbA<sub>1c</sub> in elettroforesi capillare

Jasmine Turkman<sup>1</sup>, Sara Altinier<sup>1</sup>, Carlo Artusi<sup>1</sup>, Mariela Marinova<sup>1</sup>, Mario Plebani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università Padova

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 53° Congresso SIBioC - 11-13 Ottobre 2021, Virtual Edition, ricevendo il Premio SEBIA ITALIA AWARD*

### ABSTRACT

#### Casual finding of a hemolytic condition through the determination of HbA<sub>1c</sub> by capillary electrophoresis.

HbA<sub>1c</sub> is a major hemoglobin characterized by nonenzymatic binding of glucose to the N-terminal valine residue of the hemoglobin β-chain, which reflects average glucose levels during the erythrocyte lifespan. This test has been recommended for diabetes monitoring and even for diagnosis, as well as in assessing the risk for chronic complications in diabetic patients. Therefore, an accurate measurement of HbA<sub>1c</sub> is extremely important. However, the reliability of HbA<sub>1c</sub> is impaired in certain clinical conditions, such as hemolytic anemia, blood transfusion, renal disease, and pregnancy, that increase the erythrocyte turnover or reduce its lifespan. We report the case of a 38-years-old woman with previous history of high fasting plasma glucose level who underwent routine laboratory assessment. The analysis of HbA<sub>1c</sub> by capillary electrophoresis (CE) showed an atypical profile with a clear presence of abnormal hemoglobin that did not allow to obtain a reliable result for HbA<sub>1c</sub>. The same sample analyzed by HPLC showed, the presence of an abnormal Hb and obtained a different result for HbA<sub>1c</sub>. Subsequently, the analysis of hemoglobin fractions in CE (using Hemoglobin kit- Sebia) confirmed an atypical profile with the presence of an abnormal hemoglobin peak (27.3%) in the "zone Z15" and low HbA<sub>2</sub> (0.5%). The molecular investigation of the globin genes highlighted the presence of three mutations of the α-genes compatible with HbH disease. The HbH disease is responsible for a hemolytic condition that is associated with reduced erythrocyte survival, making it impossible to use HbA<sub>1c</sub> for diagnosis and monitoring the glycemic status in this patient. The use of separative technologies, such as CE and HPLC, has been useful to detect a thalassaemic defect, which must be reported to allow correct diagnostic conclusions. In this condition, the introduction of alternative biomarkers like glycated albumin (GA) is thought to be more reliable than HbA<sub>1c</sub>, since GA values are not influenced by the modifications of the erythrocyte lifespan.

**Parole chiave:** emoglobina glicata, elettroforesi capillare, alfa-talassemia

### CASO CLINICO

Una donna di origine italiana di 38 anni con pregressa storia di dermatite ocre e xerosi degli arti inferiori a eziologia sconosciuta si è rivolta presso l'U.O.C. Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedale-Università di Padova in seguito a riscontro di glicemia alterata a digiuno, per eseguire esami di routine che includevano emoglobina glicata (HbA<sub>1c</sub>), esame emocromocitometrico e alcuni indici biochimici.

L'esame emocromocitometrico valutato su analizzatore Sysmex Dasit (Sysmex XE 2100 e 5000, Kobe, Japan) riportava la presenza di indici eritrocitari alterati compatibili con un quadro di anemia ipocromica microcitica [conteggio degli eritrociti (RBC) 4,37 10<sup>12</sup>/L (i.r. 4,31-5,10), volume corpuscolare medio (MCV) 71,4

fL (i.r. 80-96), contenuto di emoglobina medio (MCH) 18,1 pg (i.r. 26-33), emoglobina (HGB) 79 g/L (i.r. 123-153), ematocrito (HT) 0,31 L/L (i.r. 0,36-0,45)]; lo striscio di sangue periferico mostrava la presenza di marcata anisopoichilocitosi delle emazie e di rari frammenti eritrocitari.

I parametri biochimici valutati su campioni di plasma con strumentazione Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) presentavano valori alterati di transferrina (TRF) 1,41 g/L (i.r. 1,75-3,75), recettore solubile della transferrina 7,02 mg/L (i.r. 0,76-1,76), ferritina 450 mg/L (i.r. 10-120), bilirubina totale 95,6 mmol/L (i.r. 1,7-17,0), bilirubina coniugata 5,9 mmol/L (i.r. 0,0-5,1), bilirubina non coniugata 89,7 mmol/L (i.r. 3,4-13,7), lattato deidrogenasi (LDH) 573 U/L (i.r. 135-214) e glucosio a digiuno 6,5 mmol/L (i.r. 3,7-5,6).

Corrispondenza a: Jasmine Turkman, UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università Padova  
Email: jasmine.turkman@studenti.unipd.it

Ricevuto: 17.02.2022

Revisionato: 01.03.2022

Accettato: 29.03.2022

Pubblicato on-line: 14.04.2022

DOI: 10.19186/BC\_2022.017

La presenza di anemia ipocromica microcitica e gli indici biochimici alterati risultavano compatibili con uno stato di emolisi cronica.

La determinazione dell'HbA<sub>1c</sub> eseguita su campione di sangue in provetta K<sub>3</sub>EDTA mediante elettroforesi capillare (Capillarys 3 Tera con HbA<sub>1c</sub> kit – Sebia, Lisses, Francia) evidenziava un profilo classificato dal software "Phoresis" dello strumento come "atipico" caratterizzato dalla presenza di una frazione anomala "veloce" dell'emoglobina (Hb) e non consentiva di ottenere un valore di HbA<sub>1c</sub>, in quanto valutato estremamente basso dallo strumento (Figura 1, pannello A). La successiva analisi del medesimo campione mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) (Menarini Arkray

ADAMS A<sub>1c</sub> HA-8160 e HA-8180, Firenze, Italia) evidenziava, dopo attenta analisi del pattern separativo, la presenza della frazione di Hb anomala, permettendo contestualmente di ottenere la concentrazione di HbA<sub>1c</sub>, seppur con valori altamente discordanti tra le due tipologie di analisi (rispettivamente 81 versus 18 mmol/mol) a causa dell'interferenza dovuta alla presenza del picco anomalo di Hb (Figura 1, pannello B). Il successivo assetto emoglobinico eseguito in CE (Capillarys 3 Tera con Hemoglobine kit, Sebia, Lisses, France) confermava la presenza di una frazione di Hb anomala con un picco pari al 27,3% in "Z15" con HbA<sub>2</sub> pari allo 0,5% (i.r. 2,2-3,0) (Figura 2). Gli elettroferogrammi ottenuti deponevano per la presenza di emoglobinosi H (HbH), seppur in

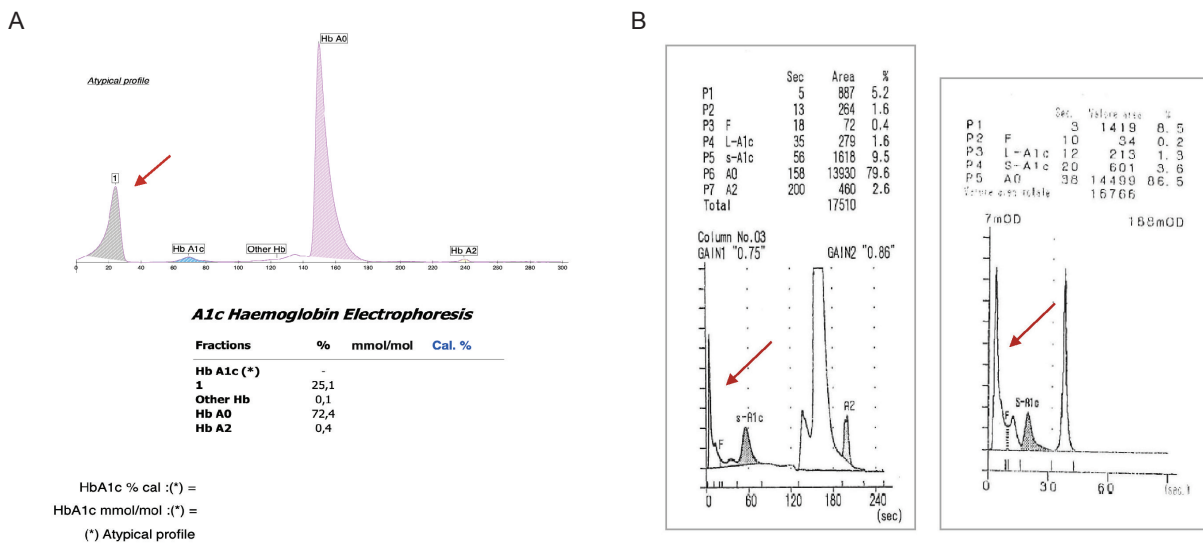


Figura 1

Tracciati emoglobinici del caso in esame:

pannello A: elettroferogramma eseguito con Capillarys 3 Tera (HbA<sub>1c</sub> kit)

pannello B: cromatogramma eseguito con Menarini Arkray ADAMS HA-8160 (sinistra) e HA-8180 (destra)

Le frecce indicano la frazione Hb anomala, identificata successivamente come HbH

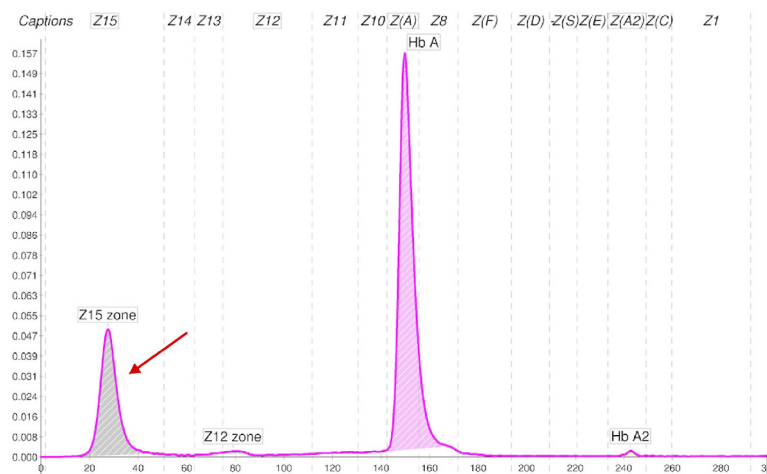


Figura 2

Elettroferogramma eseguito con Capillarys 3 Tera (Hemoglobin kit).

Il picco in zona Z15, indicato dalla freccia, corrisponde alla frazione Hb anomala, identificata come HbH.

percentuale insolitamente elevata, compatibile con il quadro di emolisi cronica osservato nella paziente. Al fine di confermare tale ipotesi, il campione è stato inviato ad un laboratorio di 2° livello per la caratterizzazione molecolare dei geni globinici. Il DNA estratto dai leucociti di un campione di sangue in K<sub>3</sub>EDTA è stato amplificato con primer dedicati per la ricerca dei difetti delezionali dei geni  $\alpha$ -globinici mediante la tecnica Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA). Quindi è stato eseguito il sequenziamento diretto secondo Sanger: le regioni analizzate includevano rispettivamente le sequenze nucleotidiche del gene *HBA1* da -140 a +20 3' UTR e del gene *HBA2* da -100 a +20 3' UTR.

L'approfondimento diagnostico molecolare ha mostrato la presenza in eterozigosi del difetto  $\alpha$  talassemico: c.95+2\_95+6delTGAGG definito anche come IVS1-5nt, una microdelezione che compromette il funzionamento del gene *HBA2* e la presenza dell'ampia delezione in eterozigosi: NG\_000006.1:g.24664\_41064del16401, definita anche  $\alpha$  talassemia --(MED-I) che compromette il funzionamento di entrambi i geni *HBA1* e *HbA2*.

I tre geni  $\alpha$ -globinici mutati non funzionanti risultavano quindi compatibili con la malattia da HbH presente nel soggetto esaminato.

## DISCUSSIONE

L'HbA<sub>1c</sub> è un'emoglobina alla cui valina N-terminale della catena beta è legato il glucosio attraverso un processo non enzimatico. L'utilizzo di HbA<sub>1c</sub> per il monitoraggio dei livelli di glucosio nel tempo è raccomandato dalle principali linee guida internazionali, motivo per il quale un'accurata determinazione di tale parametro è fondamentale al fine di garantire una corretta diagnosi e gestione del paziente diabetico (1).

Nel caso da noi riportato, la determinazione di HbA<sub>1c</sub> richiesta dal medico curante in seguito a pregresso riscontro di alterata glicemia a digiuno, è stata eseguita tramite tecnica separativa in CE. L'elettroferogramma ottenuto su analizzatore Capillarys 3 Tera con HbA<sub>1c</sub> kit ha evidenziato la presenza di una frazione Hb anomala e non ha consentito di quantificare HbA<sub>1c</sub> a causa del suo valore eccessivamente basso. Viceversa, i cromatogrammi ottenuti in HPLC su Menarini ADAMS A<sub>1c</sub> HA-8160 e HA-8180 hanno permesso di ottenere una quantificazione di HbA<sub>1c</sub>, pur con valori nettamente contrastanti tra loro a causa dell'interferenza della frazione Hb anomala. In quest'ultimo caso, solo l'attenta valutazione del pattern separativo ha suggerito la presenza di emoglobinosi H (successivamente confermata dall'indagine molecolare), condizione per la quale l'HbA<sub>1c</sub> non può essere utilizzata per il monitoraggio glicemico a lungo termine.

L'emoglobinosi H rientra clinicamente nelle forme di talassemia intermedia o Talassemie Non Trasfusione Dipendenti (NTDT), i cui segni clinici sono estremamente variabili (splenomegalia, ipersplenismo, ittero, colelitiasi, infezioni, ulcere cutanee) e in genere si sviluppano nei primi anni di vita, anche se in alcuni pazienti, come nel caso riportato, non si presentano fino all'età adulta (2).

Nel presente caso clinico, la malattia da HbH è causata dall'inattivazione di tre geni  $\alpha$ -globinici che

provoca la ridotta produzione delle catene  $\alpha$ -globiniche dell'Hb con successiva formazione dei tetrameri  $\beta$ 4 (HbH), i quali costituiscono corpi inclusi eritrocitari che riducono la sopravvivenza eritrocitaria contribuendo a un quadro di emolisi prematura degli eritrociti. Si delinea quindi un quadro di anemia mista in parte emolitica e in parte da eritropoiesi inefficace, in cui la quota emolitica è prevalente (3).

La percentuale particolarmente elevata di HbH qui riscontrata può dipendere dalla presenza del difetto IVS1-5nt, assimilabile ad una mutazione puntiforme, che compromette l'espressione del gene *HBA2*, oltre al difetto --MED-I associato (4).

L'utilizzo di tecniche separative per la determinazione di HbA<sub>1c</sub> è risultato fondamentale per identificare la presenza di un difetto talassemico responsabile dell'emolisi cronica, alla quale è possibile ricondurre le manifestazioni cutanee a carico degli arti inferiori.

In pazienti affetti da malattia da HbH, il quadro di emolisi riduce fortemente la sopravvivenza eritrocitaria con conseguente riduzione del tempo di esposizione degli eritrociti al glucosio ematico e concomitante sottostima del valore di HbA<sub>1c</sub> che, pertanto, non può essere utilizzata per il monitoraggio glicemico a lungo termine (5,6). In questi soggetti il controllo glicometabolico a lungo termine risulta di grande importanza in quanto dati in letteratura evidenziano un'elevata prevalenza di ridotta secrezione insulinica da parte delle cellule beta del pancreas e conseguente predisposizione a sviluppare intolleranza glucidica e diabete. In questi casi, si consiglia l'utilizzo di marcatori alternativi non dipendenti dall'Hb come, ad esempio, l'albumina glicata (7,8).

In conclusione, i metodi separativi disponibili in commercio per la determinazione dell'emoglobina glicata consentono di identificare la presenza di frazioni emoglobiniche anomale con differenze legate al principio chimico-fisico utilizzato. La presenza di frazioni Hb anomale che possono interferire nella determinazione della HbA<sub>1c</sub> deve essere tenuta in attenta considerazione da parte del laboratorista che deve fornire un risultato attendibile e un'interpretazione non ambigua al clinico (9,10). Conseguentemente, si raccomanda di segnalare opportunamente sul referto la presenza di Hb anomala poiché, in alcuni casi come quello descritto, l'HbA<sub>1c</sub> non può essere utilizzata per la diagnosi di diabete e per il monitoraggio glicemico a lungo termine.

## BIBLIOGRAFIA

1. Wang M, Hng TM. HbA1c: More than just a number. Aust J Gen Pract 2021;50:628-32.
2. Farashi S, Hartevelde CL. Molecular basis of  $\alpha$ -thalassaemia. Blood Cells Mol Dis 2018;70:43-53.
3. Barberio G, Ivaldi G. Emoglobinopatie. Dalla diagnosi alle consulenze specialistiche (Vol. 1). Padova: Piccin Nuova Libreria S.p.A., 2020
4. Galanello R, Aru B, Dessì C, et al. HbH disease in Sardinia: molecular, hematological and clinical aspects. Acta Haematol 1992;88:1-6.
5. Fan FS, Chen CH, Yang HC. Haemoglobin A1C levels constantly below lower reference limit in diabetic patient with microcytic anaemia. Eur J Case Rep Intern Med 2019;6:001338

6. Xu A, Ji L, Chen W et al. Effects of  $\alpha$ -thalassemia on HbA1c measurement. *J Clin Lab Anal* 2016;30:1078-80.
7. Bellia C, Zaninotto M, Cosma C, et al. Clinical usefulness of Glycated Albumin in the diagnosis of diabetes: Results from an Italian study. *Clin Biochem* 2018;54:68-72.
8. He D, Kuang W, Yang X, et al. Association of hemoglobin H (HbH) disease with hemoglobin A1c and glycated albumin in diabetic and non-diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1127-32.
9. Carta M, Mosca A, Refertazione dell'emoglobina glicata in presenza di varianti emoglobiniche. *Biochim Clin* 2011;35:42-5.
10. Marinova M, Altinier S, Caldini A, et al. Multicenter evaluation of hemoglobin A1c assay on capillary electrophoresis. *Clin Chim Acta* 2013;424:207-11.