

## La metodica capillare per la misura della emoglobina glicata consente di rilevare varianti emoglobiniche

Francesca Gabriela Martino<sup>1</sup>, Daniele Frattolillo<sup>1</sup>, Giampaolo Raccosta<sup>1</sup>, Manuela Di Natale<sup>2</sup>, Claudia Codazzo<sup>2</sup>, Rosetta Lecce<sup>2</sup>, Maria Cristina Muzi<sup>2</sup>, Marina Vitillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Patologia Clinica HUB 3, PO San Filippo Neri, ASL ROMA 1

<sup>2</sup>UOSD Genetica Medica, Centro Sant'Anna, ASL ROMA 1

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

### ABSTRACT

#### Capillary method for measuring glycated hemoglobin allows the detection of hemoglobin variants.

Diabetes mellitus is a worldwide disease and glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) is the gold standard for the diagnosis and monitoring. Hemoglobin variants can interfere with HbA<sub>1c</sub> measurement in both preanalytical and analytical phases, and their incidental detection is continuously increasing, due to the recent migration waves. In the Roma 1 HUB Laboratory, HbA<sub>1c</sub> is measured by capillary electrophoresis (CE). A 51-year-old man from Bangladesh underwent HbA<sub>1c</sub> analysis and a variant was evident in the electrophoretic pattern. After informed consent for further analysis was given, a hemoglobin electrophoresis by CE was performed. A suspected HbE was found and then confirmed by molecular testing. The patient showed mild microcytosis and hypochromia, but no anemia. The presence of the variant HbE was without influence on HbA<sub>1c</sub> measurement by CE. This technique offers the advantage to detect hemoglobin variants as well as a reliable measurement of hemoglobin A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>). These features allow a correct diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies without interfering with HbA<sub>1c</sub> measurement.

**Parole chiave:** varianti emoglobiniche, emoglobina glicata, diabete mellito

### CASO CLINICO

Un paziente diabetico di 51 anni originario del Bangladesh aveva eseguito il prelievo per la misura della emoglobina glicata (HbA<sub>1c</sub>) in un Centro Prelievi della ASL Roma 1.

La misura dell'HbA<sub>1c</sub> è stata eseguita presso il Laboratorio di Patologia Clinica HUB dell'Ospedale San Filippo Neri di Roma della ASL Roma 1 con tecnologia capillare (CE) (Capillarys 3 Tera con HbA<sub>1c</sub> kit – Sebia, Lisses, Francia). Il valore della HbA<sub>1c</sub> era di 57 mmol/mol; 7,4% (i.r. 20-38 mmol/mol; 4-5). Il tracciato elettroforetico risultava atipico per la presenza di un picco aggiuntivo, migrante in posizione 226 (prima dell'HbA<sub>2</sub>); la quantificazione del picco era 21,9%, mentre HbA<sub>2</sub> risultava leggermente aumentata (3,4%, i.r. 2,5-3,2) e correttamente

risolta; i picchi relativi all'emoglobina A<sub>0</sub> (HbA<sub>0</sub>) e all'HbA<sub>1c</sub> presentavano forma regolare (Figura 1, pannello A). Il valore di HbA<sub>1c</sub> del paziente corrispondeva ad una glicemia media stimata (eAG) di 165 mg/dL, coerente con il diario glicemico. Abbiamo commentato nel referto la presenza di variante emoglobinica, consigliando la ricerca delle emoglobine patologiche e ribadita l'opportunità di esami specifici sia al paziente, che al Diabetologo, preoccupato della possibile interferenza nella misura di HbA<sub>1c</sub>.

Il paziente ha eseguito un nuovo prelievo per la ricerca di emoglobine patologiche (Capillarys 3 Tera con Hemoglobine kit, Sebia, Lisses, France), esame emocromocitometrico (Sysmex XN-20, Sysmex, Germania), misura della ferritina (Cobas e801, Roche, Svizzera), ferro e saturazione della transferrina (Cobas c702, Roche, Svizzera) e ha rilasciato il

Corrispondenza: Francesca Gabriela Martino – ASL Roma 1 – UOC Patologia Clinica Ospedale San Filippo Neri, via Giovanni Martinotti, 20 – 00136 Roma (RM), email: francescag.martino@aslroma1.it

Ricevuto: 23.02.2022

Revisionato: 15.03.2022

Accettato: 19.04.2022

Publicato on-line: 09.05.2022

DOI: 10.19186/BC\_2022.026

consenso per ulteriori approfondimenti di II livello.

L'elettroforesi delle emoglobine ha confermato la presenza di una variante emoglobinica migrante nella zona Z(E) in percentuale pari al 24,9% e il lieve aumento di HbA<sub>2</sub> (3,7%) (Figura 1, pannello B). L'emocromo ha mostrato assenza di anemia Hb 142 g/L, (i.r. 140-180), discreta microcitosi ed ipocromia (MCV 69,5 fL, i.r. 82-98; MCH 22,1 pg/mL, i.r. 25-34). Il bilancio marziale è risultato nella norma.

L'elettroforesi delle emoglobine è stata refertata con il commento "Presenza di variante β, sospetta HbE. Si consiglia caratterizzazione in Laboratorio di secondo livello". Avendo già ottenuto il consenso informato per l'esame genetico, un campione di sangue in K<sub>3</sub>EDTA è stato quindi inviato al Laboratorio di Genetica Medica del Centro S. Anna della ASL Roma 1 per approfondimento molecolare. Qui è stata eseguita l'estrazione del DNA genomico da leucociti di sangue periferico (Kit QIAamp

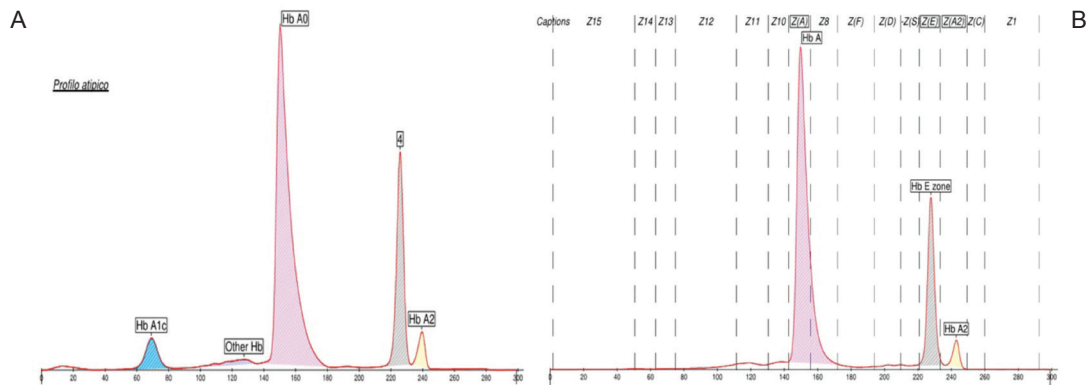
DSP DNA Blood Qiagen), e il sequenziamento diretto per la ricerca delle mutazioni del gene β (3500 DNAAnalyzer, Applied Biosystem, USA).

L'analisi molecolare ha confermato la presenza della variante HbE in eterozigosi (HBB: c.79G>A, β 26 (B8) Glu>Lys) e la presenza di un polimorfismo diffuso in diverse popolazioni, soprattutto in Asia (1,2) (Figura 2).

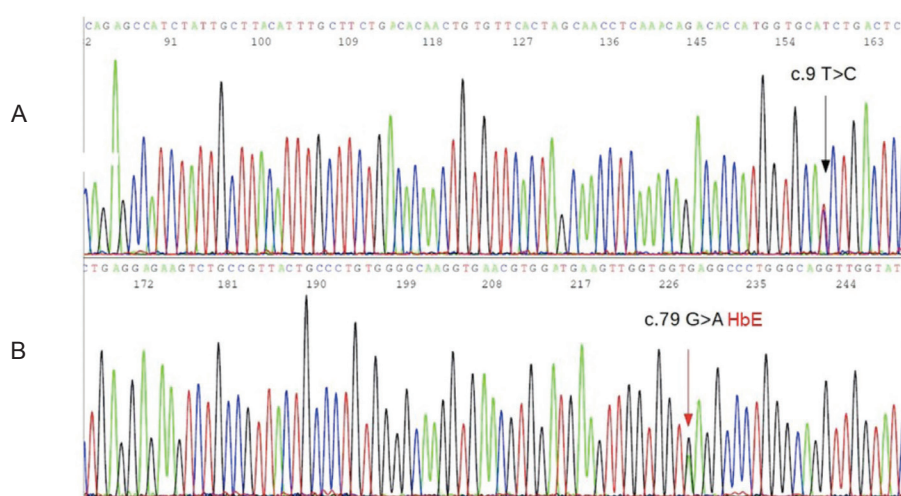
**DISCUSSIONE**

Il diabete mellito è una malattia di rilevanza sociale e presente in tutto il mondo, seppure con notevoli differenze di incidenza e prevalenza tra le diverse nazioni ed etnie. L'emoglobina glicata (HbA<sub>1c</sub>) è essenziale per la diagnosi e per monitorare l'efficacia della terapia (3).

Il riscontro occasionale di varianti emoglobiniche durante la misura della HbA<sub>1c</sub> nella popolazione afferente ai presidi sanitari italiani, è diventato negli ultimi anni



**Figura 1**  
 Pannello A: elettroferogramma con metodica capillare eseguito con Hb A1c kit  
 Pannello B: elettroferogramma con metodica capillare eseguito con kit per elettroforesi delle emoglobine (Hemoglobine kit).



**Figura 2**  
 Parte dell'elettroferogramma del sequenziamento nucleotidico (Sanger) del gene HBB. In A) polimorfismo c.9 T>C; in B) mutazione c.79 G>A (HbE). Entrambe le variazioni sono in eterozigosi e indicate dalla freccia.

sempre più frequente, a causa degli importanti flussi migratori. La presenza di varianti emoglobiniche può interferire con la determinazione della HbA<sub>1c</sub>, causandone una sovrastima o sottostima. L'interferenza può essere di tipo strettamente analitico, dipendente dalla metodica utilizzata, oppure di tipo biologico/preanalitico (4).

L'HbE è per frequenza la seconda emoglobinopatia dopo l'HbS. È comune nell'area del sud-est asiatico (dove lo stato di portatore può arrivare in alcune regioni al 40% della popolazione) (1,2,5). L'HbE è una variante emoglobinica dovuta ad una mutazione del gene della β-globina, che causa la sostituzione di un acido glutammico (Glu) in posizione 26 con una lisina (Lys). La catena β dell'HbE è sintetizzata in quantità ridotta rispetto all'emoglobina A (HbA) a causa dell'attivazione di un sito criptico di splicing al 5' dell'IVS-I; inoltre è moderatamente instabile e si ossida dopo esposizione a farmaci o composti ossidanti (6,7). Poiché è prodotta in quantità inferiore rispetto alle catene α, si comporta clinicamente come una variante talassemica. I pazienti con HbE eterozigote in genere non sono anemici ma presentano lieve microcitosi ed ipocromia; in omozigosi è presente lieve anemia, ipocromia e significativa microcitosi. Se la variante si associa a β-talassemia può produrre un fenotipo di talassemia intermedia (5,7-9). L'assetto emoglobinico del paziente in esame e il suo fenotipo ematologico erano caratteristici di un portatore eterozigote di HbE (assenza di anemia, microcitosi e lieve ipocromia, presenza di variante identificata dallo strumento in zona Z(E) in quantità pari al 25%).

Con metodologia CE, l'HbE è ben separata dalla HbA<sub>1c</sub> e dalla HbA<sub>2</sub> sia quando si utilizza il kit per HbA<sub>1c</sub> che quando si utilizza il kit per elettroforesi dell'emoglobina.

E' stato deciso di procedere con ulteriori indagini e di caratterizzare dal punto di vista molecolare la variante riscontrata sia per i risvolti clinici significativi che si hanno nel caso in cui la HbE si associ a HbS o a trait β-talassemi e sia per rispondere al quesito del diabetologo confermando l'assenza di interferenza. Dalla letteratura è noto che la presenza di HbE non interferisce con la misura della HbA<sub>1c</sub> eseguita con metodica CE(10).

I fenotipi dei quadri classici di talassemia possono essere facilmente definiti dal laboratorio di I livello, mentre la contemporanea presenza di difetti emoglobinici differenti può dare origine a fenotipi misti di più complessa definizione, richiedendo indagini più approfondite. È dunque importante capire come e quando richiedere indagini di II livello, in un'ottica di appropriatezza, efficacia ed economicità, garantendo il raggiungimento di una corretta diagnosi.

Nella nostra realtà regionale riteniamo importante segnalare un aumento del valore di HbA<sub>2</sub> superiore a 3,2% e la presenza di varianti emoglobiniche nel caso di un riscontro occasionale durante la misura dell'HbA<sub>1c</sub>. Oltre al corretto inquadramento del singolo paziente, riteniamo che una adeguata gestione e refertazione di queste alterazioni, possa contribuire alla prevenzione dei difetti genetici dell'emoglobina, mancando ormai da diversi anni un adeguato programma di screening regionale.

A questo scopo, una completa presa in carico dei

molti pazienti che afferiscono ai centri prelievo della ASL Roma 1, garantisce un percorso coordinato di diagnosi di I e II livello delle emoglobinopatie.

In conclusione, secondo la nostra esperienza, la metodica CE consente di misurare in modo accurato la HbA<sub>1c</sub> permettendone l'uso nella diagnosi e nel monitoraggio del diabete mellito anche in pazienti con varianti emoglobiniche. In generale, il valore aggiunto che si ottiene quando si utilizza un metodo separativo per la misura dell'HbA<sub>1c</sub> risiede nella possibilità di evidenziare, in molti casi, la presenza di varianti emoglobiniche e di avere informazioni sul valore dell'HbA<sub>2</sub>, parametro fondamentale nello screening della β-talassemia.

## CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

## BIBLIOGRAFIA

1. Fucharoen S, Weatherall DJ. The hemoglobin E thalassemias. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a011734.
2. Sahoo SS, Biswal S, Dixit M. Distinctive mutation spectrum of the HBB gene in an urban eastern Indian population. *Hemoglobin* 2014;38:33-8.
3. International Expert Committee, 2009. International expert committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 32:1327-34.
4. Carta MR, Paleari R, Caldini A, et al. Refertazione dell'emoglobina glicata in presenza di varianti emoglobiniche. *Biochim Clin* 2011;35:42-5.
5. Tritipsombut J, Sanchaisuriya K, Phollarp P, et al. Micromapping of thalassemia and hemoglobinopathies in different regions of northeast Thailand and Vientiane, Laos People's Democratic Republic. *Hemoglobin* 2012;36:47-56.
6. Macdonald VW, Charache S. Differences in the reaction sequences associated with drug-induced oxidation of hemoglobins E, S, A, and F. *J Lab Clin Med* 1983;102:762-72.
7. Barberio A, Ivaldi G. Emoglobinopatie. Dalla diagnosi alle consulenze specialistiche. Padova: Piccin Nuova Libreria spa, 2020.
8. Ivaldi G, Barberio A. Raccomandazioni per la diagnostica di primo livello delle emoglobinopatie della Società Italiana Talassemie ed Emoglobinopatie. *Collana Scientifica S.I.T.E.* 2012;1-37.
9. Barberio A, Ivaldi G. Le emoglobinopatie in Italia. Parte II: Prevenzione e diagnostica di laboratorio. *Biochim clin* 2016;40:96-107.
10. Lin CN, Emery TJ, Little RR, et al. Effects of hemoglobin C, D, E, and S traits on measurements of Hb A<sub>1c</sub> by six methods. *Clin Chim Acta* 2012;413:819-21.