

Riscontro occasionale di varianti emoglobiniche nel corso della determinazione di HbA_{1c} in elettroforesi capillare: Hb Alessandria

Lara Calcagno, Monica Maccarini, Daniele Zambon, Fabiola Martino, Nicol Francesca Trincheri, Maria Matilde Ciriello
S.C. Laboratorio Analisi, A.O.S.S. Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria (AL)

Questo lavoro è stato in parte presentato al 54° Congresso Nazionale SIBioC - Genova, 5-7 ottobre 2022, ricevendo il Premio SEBIA ITALIA AWARD

ABSTRACT

Incidental detection of hemoglobin variants during the determination of HbA_{1c} in capillary electrophoresis: Hb Alessandria

A new β -globin variant was found in a 68-year-old woman of Sicilian origin living in Alessandria, Italy. This variant was detected by capillary electrophoresis (CE) method during the measurement of HbA_{1c}; other separative methods, particularly those based on high-performance liquid chromatography (HPLC), were inconclusive. Molecular characterization of the defect on the beta globin gene by direct DNA sequencing revealed a G>T transversion at codon 37 and thus the substitution of a tryptophan residue (Trp) for a leucine residue (Leu). The new hemoglobin variant was named Hb Alessandria [β 37(C3) Trp>Leu; *HBB*: c.113G>T]. The oxygen tension at which hemoglobin is 50% saturated (P50) was slightly decreased while the stability test at 37°C in isopropyl alcohol and the main erythrocyte parameters were normal. This finding confirms the importance of electrophoretic or chromatographic methods in the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus, as well as the use of alternative confirmatory methods in case of the detection of hemoglobin variants.

Parole chiave: varianti emoglobiniche, elettroforesi capillare, HbA_{1c}

CASO CLINICO

Una donna siciliana di 68 anni, residente ad Alessandria (Italia), è giunta in Laboratorio per effettuare esami di controllo, in particolare la quantificazione dell'HbA_{1c}. Campioni di sangue periferico sono stati raccolti in provette K₃EDTA per misurare HbA_{1c} e per l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico. La misura dell'HbA_{1c} è stata eseguita mediante elettroforesi capillare (CE) (Capillarys 3 Tera, kit Capi3 HbA_{1c}; Sebia). Il sistema ha rilevato la presenza di una variante dell'emoglobina (Hb) senza rilasciare un valore calcolato di HbA_{1c} segnalando la presenza di un "profilo atipico" (Figura 1A). Successivamente, per ottenere una misura dell'HbA_{1c}, si è utilizzata la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con il VARIANT II™ Dual Kit Program (Bio-Rad Laboratories). In questo caso, lo strumento ha indicato un valore di HbA_{1c} di 27 mmol/mol

(4,7%) (i.r. 20-42 mmol/mol, 4-6%) ma non ha mostrato alcuna variante dell'Hb, mentre l'HbA₂ risultava 2,6% (i.r. 2,2-3,2%). Poiché la glicemia a digiuno era stata valutata nella paziente 148 mg/dL (8,22 mmol/L) (i.r. 70-106), si è concluso che 27 mmol/mol dell'HbA_{1c} doveva essere considerato un valore sottostimato. Per confermare poi la presenza della variante Hb, abbiamo utilizzato il sistema in HPLC premier™ Hb9210 Resolution (Trinity Biotech). Tale sistema nella modalità ad alta risoluzione non ha rivelato alcun picco anomalo, mentre l'HbA₂ risultava del 3,0%. Per accertare la presenza di una variante Hb abbiamo eseguito anche l'analisi mediante CE (kit Capillarys 3 Tera Hemoglobin(e); Sebia). L'Hb anomala è stata confermata e osservata nella "zona (F)", ben separata dall'HbA₀, in una quantità del 39,9% e l'HbA₂ è risultata 3,1% (Figura 1B). Tutte le procedure analitiche sono state condotte secondo le raccomandazioni dei produttori. I parametri eritrocitari sono stati valutati con

Corrispondenza a: Lara Calcagno, Via Ambrogio Doria 101, 15060 Montaldeo (AL), Email: lcalcagno@ospedale.al.it

Ricevuto: 04.01.2023

Revisionato: 13.01.2023

Accettato: 24.01.2023

Pubblicato on-line: 07.02.2023

DOI:10.19186/BC_2023.006

analizzatore automatizzato (ADVIA 2120 Hematology System; Siemens): conta degli eritrociti $4,76 \times 10^{12}/L$ (i.r. 4,20-5,40), Hb 141 g/L (i.r. 120-160), volume corpuscolare medio 92,8 fL (i.r. 82,0-90,5), Hb corpuscolare media 29,6 pg (i.r. 26,0-34,0) ed ematocrito 0,44 L/L (i.r. 0,37-0,47). La paziente risultava clinicamente asintomatica senza eritrocitosi o altre anomalie ematologiche. È stata inoltre misurata con emogasanalisi (ABL90 FlexPlus - Radiometer Medical) su un campione di sangue venoso dedicato, una pressione parziale per l'ossigeno (p50) lievemente ridotta corrispondente a 23,9 mmHg (i.r. 25,5-30,8). Questo risultato è stato messo in relazione alla lieve diminuzione dell'affinità per l'O₂ dell'emoglobina *in toto*. Il test di stabilità a 37°C con alcol isopropilico (1), eseguito presso l'UOC di Medicina di Laboratorio dell'Ospedale di Treviso, è risultato negativo.

Successivamente, un campione di sangue in K₃EDTA è stato inviato al Laboratorio di Genetica Umana dell'IRCCS, Istituto Giannina Gaslini di Genova, dove il DNA genomico è stato estratto dai leucociti del sangue periferico per eseguire lo studio molecolare. Il gene *HBB* è stato amplificato mediante PCR utilizzando primer specifici e secondo i metodi standard (2). Il sequenziamento del gene della β-globina, effettuato con l'analizzatore ABI PRISM® 3130xl (Applied Biosystems), ha rivelato una mutazione missenso allo stato eterozigote al codone 37 (TGG>TTG) con conseguente sostituzione amminoacidica triptofano-leucina (Trp>Leu) [β37(C3) Trp>Leu; *HBB*:c.113G>T] (Figura 2). Tale sostituzione risultava associata ad una nuova variante Hb che è stata denominata Hb Alessandria.

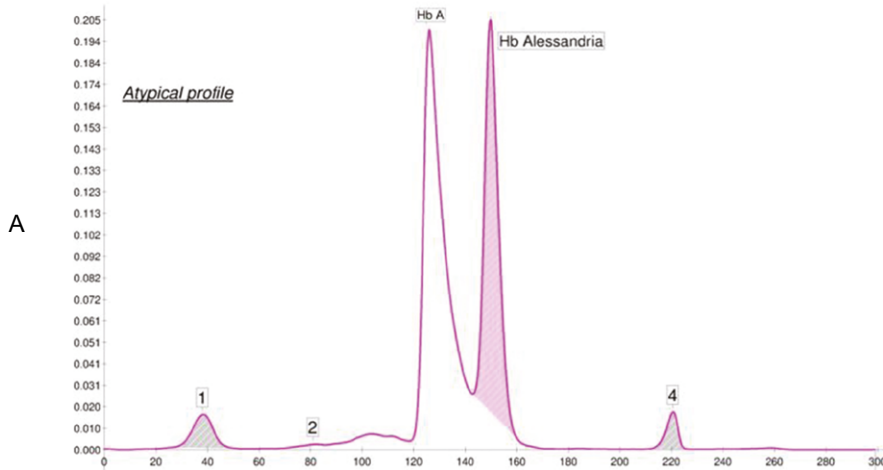


Figura 1A

Electropherogram of the patient performed on Capillarys 3 Tera (Sebia) with program for the measurement of glycosylated hemoglobin (Capi 3 HbA_{1c}). The system detects the presence of a hemoglobin variant signaling "an atypical profile". In this case the system has not released a calculated value of HbA_{1c}.

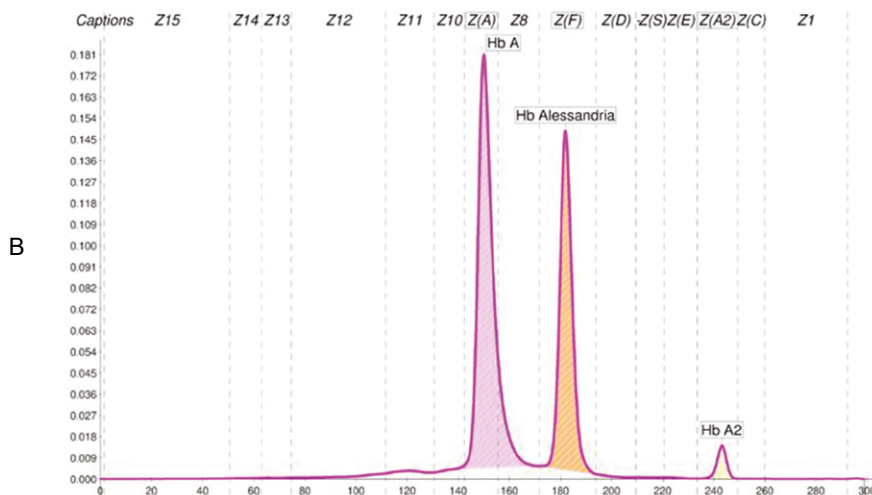


Figura 1B

Electropherogram of the patient performed on Capillarys 3 Tera (Sebia) with program for hemoglobin electrophoresis (Capi 3 Hemoglobin(e)). The presence of an abnormal hemoglobin is confirmed and it is observed in the "zone (F)", well separated from HbA₀. The quantification of the abnormal Hb is 39,9% while HbA₂ is 3,1%.

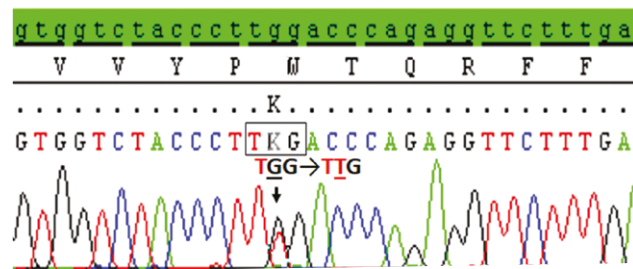


Figura 2

Elettroferogramma del gene HBB.

Il sequenziamento del gene della β -globina rivela una mutazione missenso allo stato eterozigote al codone 37 (TGG>TTG) con conseguente sostituzione amminoacidica Trp>Leu [β 37(C3) Trp>Leu; HBB:c.113G>T]. Tale sostituzione risulta associata ad una nuova variante emoglobinica ora denominata Hb Alessandria.

DISCUSSIONE

Nella molecola di HbA ci sono sei residui di Trp, tre su ciascun dimero $\alpha\beta$. Un residuo Trp si trova sulla catena alfa in posizione 14 e uno sulla catena beta in posizione 15 e occupano posizioni all'interno delle eliche delle rispettive subunità. Un altro residuo Trp è presente in posizione 37 e si trova nella zona di contatto tra le subunità ($\alpha 1\beta 2$ e $\alpha 2\beta 1$). La catena laterale di $\beta 37$ Trp rappresenta un sito sensibile che risente dei cambiamenti strutturali e dei movimenti che si verificano alle interfacce delle subunità $\alpha 1\beta 2$ e $\alpha 2\beta 1$ a causa della transizione da T a R nelle fasi di ossigenazione. Il residuo Trp è in grado di esprimere una parziale caratteristica idrofila che diventa evidente quando viene sostituito dal residuo Leu, come nel caso dell'Hb Alessandria. I fenotipi prodotti dalle varianti che coinvolgono il codone $\beta 37$ Trp, e riportati in letteratura, ci permettono di osservare che Hb Hirose [$\beta 37$ (C3) Trp>Ser; HBB:c.113G>C] (3) e Hb Howick [$\beta 37$ (C3) Trp>Gly; HBB:c.112T>G] (4) hanno un'aumentata affinità per l'ossigeno come è stato valutato nel caso dell'Hb Alessandria che mostra infatti una p50 leggermente diminuita.

Il soggetto non ha figli e non ha più i genitori, solo una sorella che vive in Sicilia e che non è stato possibile contattare: non è stato quindi possibile indagare la familiarità del difetto.

In studi successivi potrebbe essere interessante confrontare i comportamenti di questa nuova variante utilizzando alcuni degli strumenti bioinformatici disponibili oggi (5,6). Questi strumenti possono aiutare a prevedere i possibili effetti della nuova mutazione nel gene della β -globina allo stato eterozigote o in altre condizioni. L'osservazione di nuove mutazioni dovrebbe infatti sempre suggerire una precisa valutazione genotipo-fenotipo per consentire al clinico una adeguata consulenza genetica (7).

L'osservazione di questa nuova variante Hb Alessandria conferma alcune utili considerazioni per lo screening delle emoglobinopatie:

- l'importanza dell'utilizzo di metodi elettroforetici o cromatografici nella diagnosi e nel monitoraggio del diabete mellito, soprattutto in popolazioni con un'alta prevalenza di difetti dell'Hb, come confermato dal ritrovamento occasionale di questa nuova variante misurando l'HbA_{1c} con uno di questi metodi.

- la necessità di metodi alternativi per il controllo e la conferma di dati dubbi nella misurazione dell'HbA_{1c}, ma anche per i valori prossimi al limite dell'HbA₂ e quando si presume la presenza di varianti dell'Hb. Si deve inoltre considerare che l'elevata eterogeneità dei difetti globinici può richiedere esami con strumenti basati su principi separativi diversi alla ricerca di maggiore accuratezza, sensibilità e specificità.

Senza questi supporti, il laboratorio rischia di non rispondere adeguatamente ai quesiti clinici, di non rispettare i principi di appropriatezza richiesti e di non raggiungere gli obiettivi specifici della prevenzione.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol* 1972;23:615-9.
2. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-91.
3. Sasaki J, Imamura T, Yanase T. Hemoglobin Hirose, a human hemoglobin variant with a substitution at the alpha1beta2 interface. Subunit dissociation and the equilibria and kinetics of ligand binding. *J Biol Chem* 1978 253:87-94.
4. Owen MC, Ockelford PA, Wells RM. Hb Howick [beta 37(C3) Trp>Gly]: a new high oxygen affinity variant of the alpha 1 beta 2 contact. *Hemoglobin* 1993;17:513-21.
5. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248-9.
6. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 2019;35:1978-80.
7. G.Barberio, G.Ivaldi. Emoglobinopatie. Dalla diagnosi alle consulenze specialistiche. Padova: Piccin Editore 2020.