

## Riscontro occasionale di varianti emoglobiniche nel corso della determinazione di HbA<sub>1c</sub> in elettroforesi capillare: eterozigosi composta Hb S e persistenza ereditaria di HbF

Claudia Canali<sup>1</sup>, Simone Canovi<sup>2</sup>, Tommaso Trenti<sup>1</sup>, Manuela Varani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, AUSL-AOU di Modena

<sup>2</sup>Laboratorio analisi chimico-cliniche aziendale, Azienda USL-IRCCS di Reggio Emilia

*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<sub>1c</sub> in capillary electrophoresis: double heterozygosity HbS and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin

We report the case of a diabetic woman from west Africa with a presumptive diagnosis of HbSS previously suggested in another laboratory. However, during analysis for HbA<sub>1c</sub> with a novel instrument for capillary electrophoresis capable of both HbA<sub>1c</sub> and hemoglobin variants analysis, we suspected and later confirmed (with a centralized molecular study) the presence of a double heterozygosity for a beta gene defect, namely HbS and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HbS/HPFH). Our case highlights the importance of ruling out any possible interference affecting the HbA<sub>1c</sub> measurement that could compromise its interpretation, posing a risk for erroneous clinical management of diabetes mellitus. The availability of both high resolution HbA<sub>1c</sub> and hemoglobin variants analysis on the same instrument could lead to a rapid presumptive identification of previously unknown or misdiagnosed hemoglobinopathies.

**Parole chiave:** varianti emoglobiniche, emoglobina glicata, elettroforesi capillare

### CASO CLINICO

Una paziente diabetica di 62 anni, originaria dell'Africa occidentale e non nota presso il nostro laboratorio, giungeva alla nostra attenzione per la richiesta di misurazione di emoglobina glicata (HbA<sub>1c</sub>) per la valutazione del controllo glicemico.

L'esame veniva eseguito su campione di sangue intero raccolto in provetta con K<sub>2</sub>EDTA, mediante tecnica separativa basata su cromatografia liquida a scambio ionico (HPLC D-100, BioRad, Hercules, CA, USA): lo strumento forniva un risultato di 62 mmol/mol (i.r. 20-38; obiettivo terapeutico per adulto diabetico <53) ma mostrava un valore particolarmente elevato di HbF, pari al 29,9% (v.r. per l'adulto <1), evidenziando al contempo la presenza di picchi aggiuntivi e non risolti delle varie forme

di emoglobina e segnalando con un allarme analitico la presenza di una possibile variante emoglobinica (Figura 1a).

In assenza di risultati precedenti della stessa paziente disponibili presso il nostro laboratorio, veniva eseguita una ricerca di informazioni cliniche mediante consultazione dell'archivio del sistema informatico di Laboratorio (LIS). L'esame emocromocitometrico della paziente eseguito su strumentazione DXH 900 (Beckman Coulter Inc., Brea, California) non rilevava alterazioni di rilievo mostrando solo una lieve microcitemia (volume corpuscolare medio: 79,2 fL; i.r. 80-99) senza anemia (concentrazione emoglobina: 135 g/L; i.r. 120-160).

Dall'archivio del LIS risultava inoltre un valore di HbA<sub>1c</sub> refertato in occasione di un precedente controllo presso un laboratorio periferico impiegante la nostra stessa

Corrispondenza a: Claudia Canali - Dipartimento di Medicina di Laboratorio, AUSL-AOU di Modena, via Pietro Giardini 1355, 41126, Baggiovara (Modena), E-mail: c.canali@ausl.mo.it

Ricevuto: 22.03.2023

Revisionato: 01.04.2023

Accettato: 04.04.2023

Publicato on-line: 12.04.2023

DOI:10.19186/BC\_2023.019

tecnologia analitica in HPLC, nonostante un assetto emoglobinico già studiato in un terzo Laboratorio, ove si concludeva per un quadro di drepanocitosi omozigote (HbSS).

Sulla base delle informazioni clinico-laboratoristiche ottenute e del tracciato cromatografico risultato in sede di analisi per HbA<sub>1c</sub>, la diagnosi di drepanocitosi omozigote veniva però messa in dubbio a causa dell'elevato valore di HbF segnalato dallo strumento.

Il campione per la misurazione di HbA<sub>1c</sub> veniva quindi analizzato con diverso strumento e con diversa tecnologia analitica basata su elettroforesi capillare (Capillarys 3 Tera con kit Capi3-HbA<sub>1c</sub>, Sebia, Lisses, France) (Figura 1b).

L'elettroferogramma ad alta risoluzione riportava in questo caso i seguenti risultati: HbF o Hb variante 39,8%, HbS 54,8%, HbA<sub>2</sub> 2,0% HbS<sub>1c</sub> 3,4%. Il tracciato mostrava inoltre chiaramente l'assenza di HbA<sub>0</sub> (non riportando quindi un valore di HbA<sub>1c</sub>) e il profilo veniva classificato dal software dello strumento come "atipico".

Il campione veniva rianalizzato sullo stesso strumento con modalità analitica per varianti emoglobiniche (Capillarys 3 Tera con Hemoglobine kit, Sebia, Lisses France), con i seguenti risultati: HbF 38,6%, HbS 59,2% e HbA<sub>2</sub> 2,2% (Figura 2).

Nel sospetto di una doppia eterozigosi per mutazione a carico del gene beta globinico, il campione veniva successivamente inviato per approfondimento diagnostico ad un laboratorio di secondo livello per l'analisi molecolare, dove veniva confermata un'eterozigosi composta con HbS [NM\_000518.4(HBB): c.20A>T] e persistenza ereditaria di HbF dovuta a delezione di tipo 2 del cluster genico beta globinico (NG\_000007.3:

g.54867\_139178del84312; HPFH-2 Ghanaian).

In conclusione, il valore di HbA<sub>1c</sub> non veniva riportato in referto ma era consigliato, mediante commento interpretativo, un biomarcatore alternativo (albumina glicata) per la valutazione del controllo glicemico della paziente.

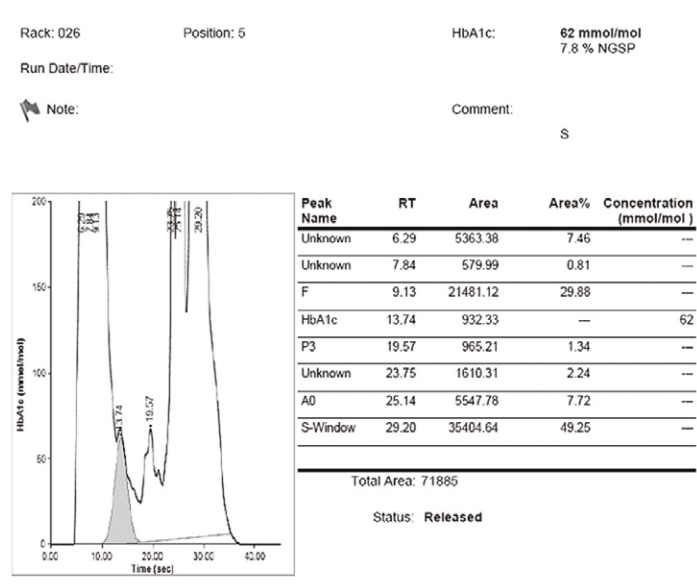
**DISCUSSIONE**

L'HbA<sub>1c</sub> rappresenta un biomarcatore di controllo glicemico a lungo termine fondamentale per la diagnosi e il monitoraggio del diabete mellito (1,2), patologia che in Italia ha una prevalenza stimata del 5,9% (oltre 3,5 milioni di individui), con una tendenza all'aumento negli ultimi anni (3).

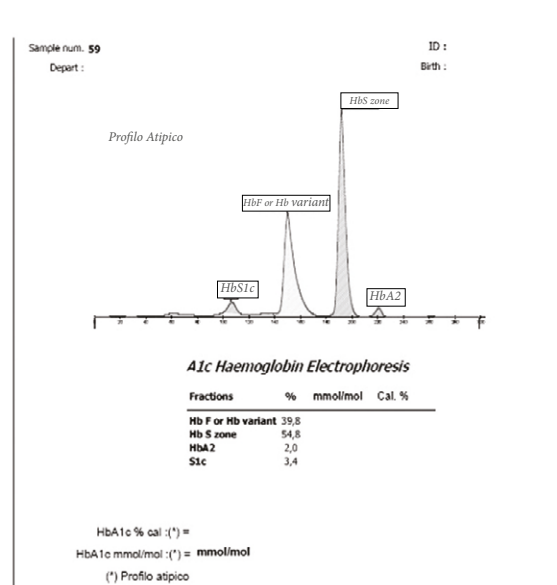
Rappresentando il prodotto di glicosilazione non enzimatica (glicazione) tra glucosio e valine N-terminali della catena β globinica dell'emoglobina A<sub>0</sub>, la misurazione dell'HbA<sub>1c</sub> è soggetta a interferenze causate dalla presenza di eventuali varianti emoglobiniche, in modo metodo- e variante- dipendente (4).

In particolare, vista la rilevanza epidemiologica del diabete mellito, è possibile il riscontro occasionale di una variante emoglobinica precedentemente sconosciuta o misconosciuta in occasione della misurazione dell'HbA<sub>1c</sub>, evenienza resa ancora più probabile dai flussi migratori attuali.

Il caso clinico riportato descrive un riscontro emblematico in corso di misurazione dell'emoglobina glicata (5). La rilevanza epidemiologica dell'effetto delle varianti emoglobiniche sulla misurazione dell'HbA<sub>1c</sub> è in effetti ben evidenziata anche dalla casistica osservata nella nostra popolazione. Nella provincia di Modena, nel



**a**  
**Figura 1**  
Traccati emoglobinici in corso di analisi per HbA<sub>1c</sub> del caso in esame.  
a) Cromatogramma HPLC (D-100, BioRad)  
b) Elettroferogramma (Capillarys 3 Tera con kit Capi3-HbA<sub>1c</sub>, Sebia).



**b**

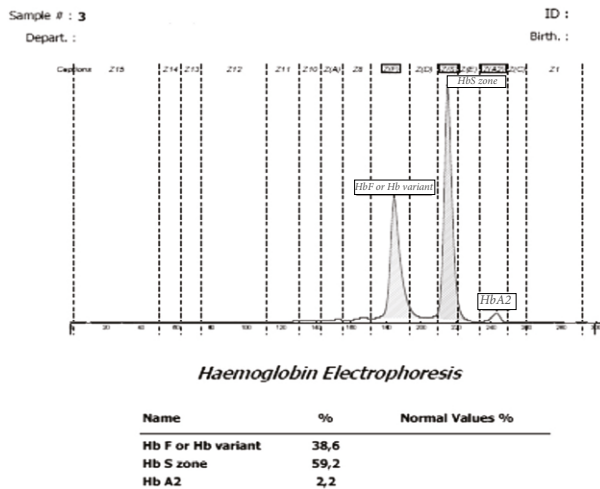


Figura 2

Elettroferogramma Capillars 3 Tera con Hemoglobine kit (Sebia)

corso dell'anno 2022 sono state refertate 124 120 HbA<sub>1c</sub> a fronte di una popolazione residente di poco superiore ai 700 000 abitanti. In 218 di queste è stata segnalata una possibile variante non interferente con la corretta quantificazione della HbA<sub>1c</sub> e sulla base dei dati presenti su LIS, tale variante non era nota in 43 di questi casi. In 6 casi invece si è riscontrata la presenza di una variante interferente con la quantificazione di HbA<sub>1c</sub>, ed è stato quindi consigliato mediante commento interpretativo un biomarcatore alternativo (albumina glicata) per la valutazione del controllo glicemico.

Il caso descritto riporta una rara forma di doppia eterozigosi per HbS e HPFH. Gli individui affetti da questa mutazione genetica generalmente non presentano complicanze associate alla falcizzazione delle emazie, che è infatti inibita dalla presenza di livelli aumentati di HbF, né mostrano alterazioni significative dell'esame emocromocitometrico (6). La rilevanza del disordine per il nostro caso è invece dovuta all'interferenza della doppia eterozigosi delle catene globiniche con la misurazione dei livelli di HbA<sub>1c</sub> per il monitoraggio del diabete mellito: in casi come questo la misura dell'emoglobina glicata non deve essere effettuata.

In caso di variante emoglobinica nota, segnalata all'analisi della HbA<sub>1c</sub>, il laboratorio dovrebbe prima di tutto verificarne l'eventuale effetto sulla misurazione dell'emoglobina glicata con il metodo in uso, refertandone la concentrazione solo in caso di assenza di interferenza (7). In caso invece la variante non fosse nota, il laboratorio può consigliare ulteriori esami a completamento diagnostico o, in caso sia dotato delle competenze necessarie, procedere con l'approfondimento separativo autonomamente o affidandosi a Centri di riferimento per tecniche analitiche di secondo livello (biologia molecolare) (8).

I diversi metodi separativi disponibili in commercio per la valutazione degli assetti emoglobinici consentono di identificare la maggior parte delle varianti con alcune differenze dovute al diverso principio chimico-fisico

utilizzato. Di conseguenza, la valutazione attenta di un tracciato e la combinazione di differenti tecniche (per esempio HPLC e elettroforesi capillare) possono dimostrarsi estremamente utili nell'aumentare il riscontro, anche occasionale, di nuove varianti emoglobiniche che, anche se non clinicamente rilevanti, possono dare luogo a fenotipi ematologici importanti se abbinati ad altri difetti delle catene beta e alfa.

In conclusione, il caso clinico descritto è emblematico della rilevanza che esercita una corretta identificazione delle varianti emoglobiniche in corso di refertazione dell'HbA<sub>1c</sub>. In particolare, esso evidenzia l'importanza del ruolo del Laboratorio nel loro riconoscimento e nell'interpretazione della possibile interferenza sulla quantificazione dell'HbA<sub>1c</sub>. In questo contesto, uno strumento in grado di eseguire una metodica separativa di approfondimento in caso di risultato HbA<sub>1c</sub> sospetto per la presenza di varianti emoglobiniche non note avrebbe rilevanza analitica e clinica, permettendo di ridurre il rischio derivabile da una scorretta informazione clinica rivolta al paziente affetto da diabete mellito.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

## BIBLIOGRAFIA

1. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care* 2023;46 Suppl 1: S19-S40.
2. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al. 6. Glycemic Targets: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care* 2023;46 Suppl 1:S97-S110.
3. <https://www.epicentro.iss.it/diabete/epidemiologia-italia> (ultimo accesso: febbraio 2023).
4. Little RR, Roberts WL. A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A<sub>1c</sub> measurement. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3:446-51.
5. Harris NS, Weaver KD, Beal SG, Winter WE. The Interaction between Hb A<sub>1c</sub> and Selected Genetic Factors in the African American Population in the USA. *J Appl Lab Med* 2021;6:167-9.
6. Ngo DA, Aygun B, Akinsheye I, Hankins Js, Bhan I, Luo HY, et al. Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Br J Haematol* 2012;156:259-64.
7. <http://www.ngsp.org/factors.asp> (ultimo accesso: febbraio 2023).
8. Carta M, Mosca A. Refertazione dell'emoglobina glicata in presenza di varianti emoglobiniche. *Biochim Clin* 2011;35:42-5.