

Riscontro occasionale di varianti emoglobiniche nel corso della determinazione di HbA_{1c} in elettroforesi capillare: Hb Bleuland e Hb La Desirade

Melania Olivieri¹, Marco Rosetti¹, Giovanni Poletti¹, Massimo Maffei², Domenico Coviello², Manuela Fiuzzi¹,
Francesca Capalbo¹, Valentina Polli¹, Alice Clementoni¹, Evita Massari¹, Marta Monti¹, Virginia Libri¹, Tommaso Fasano¹

¹UO Patologia Clinica, Laboratorio Area Vasta Romagna, Pievesestina (FC)

²Laboratorio di Genetica Umana-IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova

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 Bleuland and Hb La Desirade

Haemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) is a test routinely used to monitor long-term glycemic control in diabetic patients as well as for the diagnosis of diabetes. Capillary electrophoresis (CE) is an accurate and valid method to separate and quantify HbA_{1c} and to detect HbF, HbA₂ and haemoglobin variants. The purpose of this study is to report three Hb variants accidentally observed during HbA_{1c} testing. HbA_{1c} tests had been carried out using Capillarys 3 TERA "HbA_{1c} kit" (Sebia, France) in the Hub Laboratory of AUSL Romagna. To screen for Hb variants interfering with HbA_{1c} determination, Capillarys 3 TERA "Hemoglobine kit" was used. Molecular analysis of globin genes was performed by Next Generation Sequencing (NGS) technology. During routine HbA_{1c} testing, we observed three cases of interference with HbA_{1c} assay that led to the suspicion of Hb variants that subsequently were not detectable by the specific "Hemoglobine kit" assay. NGS identified a woman with Hb La Desirade (β 129(H7) Ala \rightarrow Val), a man with Hb Bleuland (α 108(G15) Thr \rightarrow Asn). Genetic analysis for the third case is still in progress. The two identified Hb variants are clinically asymptomatic; however, if they co-exist with other Hb variants or thalassemia, they could cause clinical symptoms. HbA_{1c} testing performed by CE is an essential part of routine management of diabetes and in addition has proven to be an effective and powerful method to detect rare or silent Hb variants. We suggest laboratory personnel to be aware of the limitations of their method with respect to the identification of Hb variants.

Parole chiave: varianti emoglobiniche, emoglobina glicata, elettroforesi capillare

CASI CLINICI

L'emoglobina glicata (HbA_{1c}) è un marcatore biochimico utilizzato nella diagnosi e nel monitoraggio del diabete. Per la sua determinazione vengono utilizzati diversi metodi analitici che possono essere raggruppati, sulla base del principio utilizzato, nelle seguenti categorie: immunochimici, in cromatografia liquida a scambio ionico o di affinità e basati sulla mobilità elettroforetica come l'elettroforesi capillare (CE) (1).

L'Unità Operativa di Patologia Clinica del AUSL della Romagna è organizzata secondo un modello Hub e Spoke, in una rete di 8 laboratori e fornisce attività diagnostica ad un'area di circa 1200000 abitanti. Nel laboratorio di riferimento (Hub) (esterno alle strutture ospedaliere) è centralizzata la determinazione di HbA_{1c}: ogni anno

vengono eseguite circa 200 000 determinazioni di HbA_{1c} per diagnosi o monitoraggio dei pazienti diabetici con tecnologia CE (Capillarys 3 Tera con HbA_{1c} kit – Sebia, Lisses, Francia). In particolare, nel periodo luglio 2021–giugno 2022, il riscontro occasionale di alcune varianti emoglobiniche (Hb) interferenti con la misurazione di HbA_{1c} ha portato all'approfondimento diagnostico in tre casi selezionati.

Nella Figura 1A è riportato il tracciato elettroforetico relativo ad un paziente diabetico di 55 anni originario del Bangladesh; l'elettroferogramma si è rivelato atipico per la presenza di uno sdoppiamento dei picchi relativi alle frazioni dell'emoglobina A₀ (HbA₀) e dell'emoglobina A₂ (HbA₂), condizione che lasciava presumere la presenza di una variante alfa. La frazione HbA_{1c} è risultata non quantificabile.

Corrispondenza a: Melania Olivieri, UO Patologia Clinica, Laboratorio Area Vasta Romagna, Pievesestina (FC).
Email: melania.olivieri@auslromagna.it

Ricevuto: 01.03.2023

Revisionato: 19.03.2023

Accettato: 24.03.2023

Publicato on-line: 06.04.2023

DOI: 10.19186/BC_2023.018

Il secondo caso riguarda una donna gravida di 30 anni originaria del Burkina Faso. Il tracciato elettroforetico (Figura 1B) si è rivelato anomalo tanto per la presenza di due picchi relativi alla frazione HbA₀ quanto per la mancata quantificazione di HbA₂ e di HbA_{1c}. Nella Figura 1C è riportato il tracciato del terzo caso relativo ad una donna di 56 anni originaria della Grecia che ha eseguito la determinazione di HbA_{1c} come approfondimento in seguito ad un precedente riscontro di valori di glicemia al limite di norma. Il tracciato elettroforetico si è rivelato atipico per una lieve interferenza in corrispondenza del picco HbA₀, e per la mancata quantificazione di HbA_{1c}; il picco relativo all' HbA₂ non ha presentato alcuna anomalia. In tutti e tre i casi descritti la presenza di un tracciato elettroforetico anomalo e l'impossibilità di quantificare l'HbA_{1c} ha suggerito la presenza di una variante Hb; pertanto, il laboratorio ha allertato i soggetti e i relativi medici curanti rispetto alla possibile presenza di una variante Hb in grado di interferire nella determinazione di HbA_{1c}. Nel caso della donna gravida è stato anche suggerito un approfondimento diagnostico per diabete gestazionale.

Nel medesimo settore analitico del laboratorio vengono eseguite anche le determinazioni di HbA₂, HbF e varianti Hb, utilizzando gli stessi strumenti (Capillarys 3 Tera) dotati del kit specifico per la ricerca di emoglobine patologiche (Capi3 Hemoglobine). Pertanto, si è ritenuto opportuno approfondire i tre casi studiando le frazioni emoglobiniche nello stesso prelievo di sangue già utilizzato per la misura di HbA_{1c}. A completamento

del quadro laboratoristico e per una corretta interpretazione dei dati, sono stati effettuati l'esame emocromocitometrico (Sysmex XN, Sysmex, Germania) e gli esami per lo studio dell'assetto marziale (Cobas, c702, Roche Diagnostics, Germania). Il kit specifico per lo studio dell'assetto emoglobinico non ha evidenziato alcuna anomalia nei tracciati elettroforetici dei tre casi, mentre la misura di HbA₂ (rispettivamente 2,6%, 3,2% e 3,1%) è risultata all'interno dell'intervallo di riferimento (2,2-3,5) (Figura 1D, E, F). I risultati dell'emocromo del primo paziente hanno mostrato anemia, microcitosi e ipocromia lievi rispettivamente con valori di Hb 123 g/L (i.r. 135-170), volume corpuscolare medio (MCV) 79,7 fL (i.r. 80- 95) e contenuto emoglobinico medio (MCH) 25,2 pg/mL (i.r. 27-32) con un normale assetto marziale. Le altre due pazienti presentavano normali indici eritrocitari e assetto marziale. La persistenza del dubbio rispetto alla presenza di varianti Hb, anche in seguito al mancato riscontro di esse con l'utilizzo di uno specifico kit diagnostico, ha posto le basi per un approfondimento molecolare. L'analisi molecolare eseguita utilizzando il sequenziamento con metodica Next Generation Sequencing (NGS) e l'utilizzo del kit Devyser Thalassemia (2), presso il Laboratorio di Genetica Medica dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova ha evidenziato: nel primo caso la variante alfa Hb Bleuland [α 108(G15) Thr→Asn], nel secondo caso la variante beta Hb La Desirade [β 129(H7) Ala→Val], mentre per il terzo caso i risultati della caratterizzazione molecolare sono tuttora in corso.

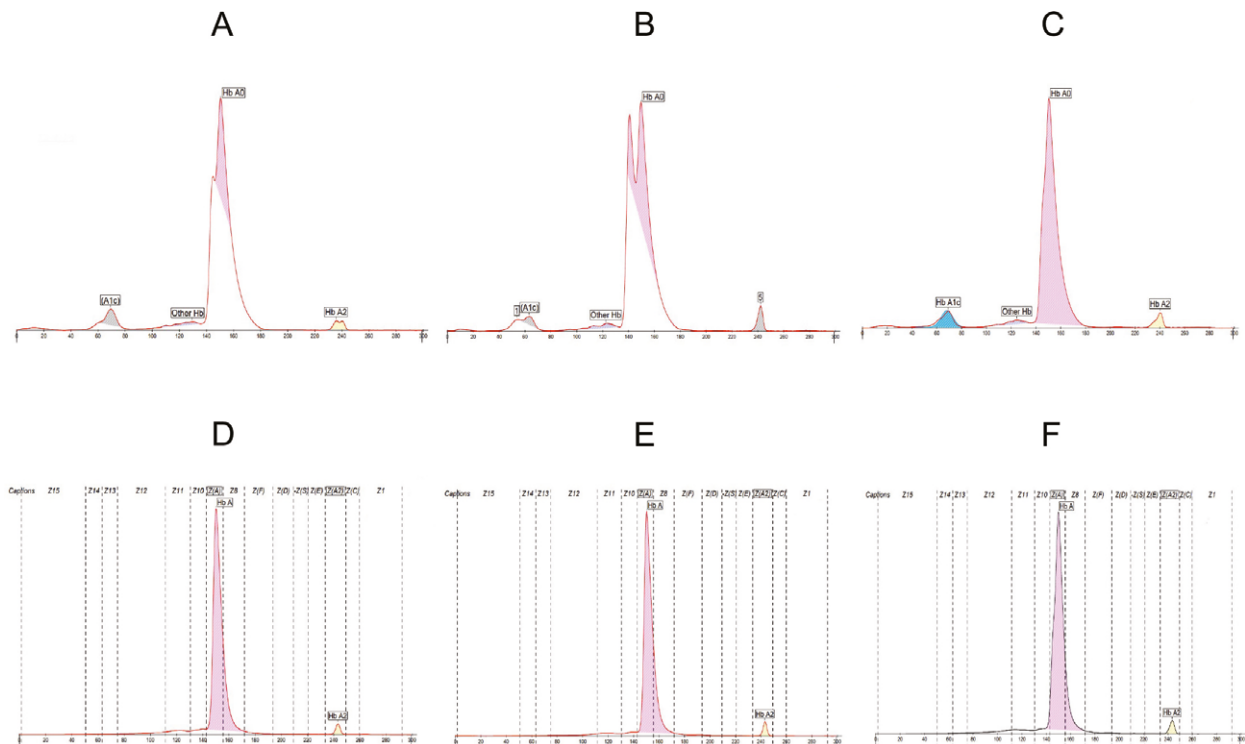


Figura 1

Pannello A-C: elettroferogramma con metodica capillare eseguito con il kit HbA1c kit dei tre casi presentati.

Pannello D-F: elettroferogramma con metodica capillare eseguito con kit per elettroforesi delle emoglobine dei tre casi presentati.

DISCUSSIONE

Il diabete mellito è un disordine metabolico con eziologia eterogena, la cui prevalenza è in continuo incremento come riportato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (3). L'HbA_{1c} rappresenta un parametro di laboratorio fondamentale per monitorare il diabete e più recentemente adottato anche come criterio diagnostico (HbA_{1c} >48 mmol/mol, HbA_{1c} >6,5%) (4). Come tutti i parametri di laboratorio anche l'HbA_{1c} è soggetta a interferenze che possono impedire la sua misura o renderla inaccurata. La presenza di una variante Hb può determinare un'interferenza sulla misura di HbA_{1c}, che può essere di tipo strettamente analitico o, più in generale, di tipo biologico/preanalitico (1). La CE per l'analisi di HbA_{1c} rappresenta una tecnica separativa che oltre a misurare la frazione HbA_{1c}, rende disponibile il livello di HbA₂ e può evidenziare anomalie presuntive di incremento di HbF o presenza di varianti Hb. Secondo quanto riportato dal manuale del produttore e in accordo ai dati descritti in letteratura, incrementi <23% di HbF o la presenza in eterozigosi di una delle più frequenti varianti Hb (HbS HbE, HbC, e HbD), pur evidenziando un atipico profilo non interferiscono con la misura di HbA_{1c} (5,6). La maggior parte delle varianti Hb che interferiscono con la misurazione di HbA_{1c} sono rare o clinicamente asintomatiche; tuttavia, è opportuno non sottovalutare il loro rischio clinico specialmente se queste coesistono con altre varianti o con tratti talassemici (7-9).

L'assetto Hb del primo paziente (HbA₂ 2,8%; HbF 0,3%) ed il suo fenotipo ematologico (lieve anemia, microcitosi e ipocromia, senza alterazioni nel bilancio marziale) potevano suggerire un caso di alfa talassemia lieve. In effetti l'analisi molecolare della variante intercettata durante la misurazione di HbA_{1c} ha evidenziato la presenza di Hb Bleuland, una variante del gene α -globinico associata ad un fenotipo alfa talassemico lieve. Hb Bleuland deriva dalla sostituzione dell'amminoacido treonina con l'amminoacido asparagina (Thr→Asn) in posizione 108 del gene α 2-globinico (10). L'amminoacido treonina, situato nell'elica G della catena α della globina, è normalmente coinvolto sia nel legame covalente tra le catene α 1 β 1 che nell'interazione delle catene α con la proteina stabilizzante le globine α [α Hemoglobin (Hb) Stabilizing Protein, AHSP] (11) e la sua sostituzione con asparagina rende la catena mutata meno adatta alla cooperazione tetrameric. Sebbene tale variante nella maggior parte dei casi sia clinicamente silente, una debole o assente interazione delle catene alfa con AHSP, in combinazione con un allele α 0-thal o con mutazioni nei siti di poliadenilazione del gene α 2, comporterebbe implicazioni cliniche di maggiore entità (10,11).

Nel secondo caso, in fase di esami pre-concezionali, è stato possibile sospettare la presenza di una variante emoglobinica successivamente caratterizzata come Hb La Desirade. Tale variante è determinata dalla sostituzione dell'amminoacido alanina con l'amminoacido valina (Ala→Val) in posizione 129 del gene β globinico. La maggior parte dei casi di Hb La Desirade descritti in letteratura sono clinicamente asintomatici e senza alcuna evidenza di anemia. Tuttavia, recenti studi hanno

messo in evidenza il rischio di sintomi clinici quando Hb La Desirade risulta associata a tratti talassemici o ad altre varianti; in particolare, è stato riportato nei casi di eterozigosi composta Hb La Desirade/HbS un incremento della frazione HbS di circa il 10% rispetto alla sola eterozigosi HbS, rendendo così i dati di laboratorio di difficile interpretazione (12). È stato anche descritto il caso di un soggetto thailandese con eterozigosi composta per Hb Louisville [β 42(CD1)Phe→Leu] e Hb La Desirade che ha mostrato severa anemia con basse saturazione e pressione parziale dell'ossigeno (13).

Si ritiene che sia importante segnalare la presenza di varianti Hb riscontrate occasionalmente durante la misura di HbA_{1c}. Essendo il laboratorio dotato anche del kit Capi-3 Hemoglobine, specifico per lo studio dell'assetto Hb, siamo stati in grado di approfondire tutti i casi sospetti. La discrepanza tra i risultati dei due kit nella capacità di evidenziare le varianti Hb ha portato ad un confronto con la ditta fornitrice, la quale ha evidenziato una differenza nella composizione dei due tamponi utilizzati (HbA_{1c} ed Hemoglobine) che potrebbe spiegare la diversa capacità discriminativa. La presenza dell'acido dicarbossifenilboronico nel tampone del reagente per HbA_{1c} potrebbe conferire al metodo un maggior potere discriminativo rispetto al tampone impiegato nel kit Hemoglobine, che risulta esserne privo. Il potenziale dell'acido borico nella separazione di HbA_{1c} da Hb non glicata è già noto da tempo poiché rappresenta il principio impiegato da altre metodiche quali la cromatografia di affinità (14). Risultati simili ai nostri sono stati descritti anche da Peteeters et al. per la variante rara Hb Melusine [α 144(GH2) Pro→Ser]; tale variante infatti è stata intercettata mediante CE utilizzando un kit per HbA_{1c} ma non con il kit dedicato allo studio delle emoglobinopatie (15). La comparazione di differenti metodi di analisi per HbA_{1c} ha evidenziato che CE è il metodo con le migliori prestazioni, sia nell'identificazione delle varianti rare sia nella corretta quantificazione di HbA_{1c} (16,17).

In conclusione, riteniamo che la determinazione di HbA_{1c} eseguita mediante CE sia essenziale tanto come ausilio nelle nuove diagnosi di diabete quanto per la gestione cronica dei pazienti diabetici; è altresì dimostrato come tale metodica rappresenti un mezzo efficace e specifico per rilevare varianti Hb rare o silenti, motivo per cui il professionista di laboratorio deve essere consapevole della possibile interferenza di queste varianti sulla misurazione di HbA_{1c}. Per tali ragioni un'adeguata gestione e refertazione di queste alterazioni al fine di un corretto inquadramento del paziente risulta clinicamente utile. Nonostante la maggior parte delle varianti Hb rare rilevate accidentalmente siano clinicamente asintomatiche, sarebbe opportuno non sottovalutarne il potenziale rischio se combinate con altre varianti o tratti talassemici; a tale scopo può aiutare un percorso diagnostico di secondo livello per lo studio dei difetti dei geni globinici. Il personale di laboratorio dovrebbe adottare un atteggiamento critico nei confronti del metodo impiegato così da riconoscerne potenzialità e limiti oltre che valutare, ove opportuno e possibile, un confronto con una differente metodologia.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Weykamp C. HbA_{1c}: a review of analytical and clinical aspects. *Ann Lab Med* 2013;33:393-400.
2. <https://devyser.com/kits-and-reagents/devyser-thalassaemia-ngs> (ultimo accesso: marzo 2023)
3. Stato delle conoscenze e delle nuove acquisizioni in tema di diabete mellito. Ministero della Salute - Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria Ufficio 8. Legge 16 marzo 1987, n. 115, recante "Disposizioni per la prevenzione e la cura del diabete mellito". Relazione 2021.
4. World Health Organisation (WHO). Use of glycated haemoglobin in the diagnosis of diabetes mellitus. World Health Organisation 2011.
5. Manuale d'uso Sebia, CAPI 3 Hb A_{1c}. Sebia. Ref. 2515; 2019/07.
6. Chen Z, Shao L, Jiang M, Ba X, Ma B, Zhou T. Interpretation of HbA_{1c} lies at the intersection of analytical methodology, clinical biochemistry and hematology (Review). *Exp Ther Med* 2022;24:707.
7. Rhea JM, Molinaro R. Pathology consultation on HbA_{1c} methods and interferences. *Am J Clin Pathol* 2014;141:5-16.
8. Little RR, La'ulu SL, Hanson SE, Rohlfing CL, Schmidt RL. Effects of 49 different rare Hb variants on HbA_{1c} measurement in eight methods. *J Diabetes Sci Technol* 2015;9:849-56.
9. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a011858.
10. Hartevelde CL, Versteegh FGA, Kok PJMJ, van Rooijen-Nijdam IH, van Delft P, Giordano PC. Hb Bleuland [α 108(G15) Thr→Asn, A C C→A A C (α 2)]: a new abnormal hemoglobin associated with a mild α -thalassemia phenotype. *Hemoglobin* 2006;30:349-54.
11. Wajzman H, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I, Giordano PC, Hartevelde CL, Baudin-Creuzza V, et al. Unstable and thalassaemic alpha chain hemoglobin variants: a cause of Hb H disease and thalassemia intermedia. *Hemoglobin* 2008;32:327-49.
12. Alkindi S, Al Zadjali S, Al Rawahi M, Al Haddabi H, Daar S, ElSadek R A, et al. Clinical and laboratory features of hemoglobin La Desirade variant in association with sickle cell and alpha thalassemia genes. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2021;13:e2021010.
13. Kamseng P, Trakulsrichai S, Trachoo O, Yimniam W, Panthan B, Jittorntam P, et al. Low oxygen saturation and severe anemia in compound heterozygous Hb Louisville [β 42(CD1) Phe→Leu] and Hb La Desirade [β 129(H7)Ala→Val]. *Hematology* 2017;22:114-118.
14. Little RR, Roberts WL. A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A_{1c} measurement. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3:446-51.
15. Peeters B, Brandt I, Desmet K, Hartevelde CL, Kieffer D. Hb Melusine and Hb Athens-Georgia: potentially unreported in the Belgian population? Four cases demonstrating the lack of detection using common CE-HPLC methods either for glycated hemoglobin (HbA_{1c}) analysis or Hb variant screening. *Acta Clin Belg* 2016;71:458-461.
16. Martino FG, Frattolillo D, Raccosta G, Di Natale P, Codazzo C, Lecce R, et al. La metodica capillare per la misura della emoglobina glicata consente di rilevare varianti emoglobiniche. *Biochim clin* 2022;46:e15-7.
17. Dessi M, Pieri M, Pignalosa S, Martino FG, Zenobiet R. Per-

formances of capillary electrophoresis and HPLC methods in HbA_{1c} determination: diagnostic accuracy in HbS and HbD-Iran variants' presence. *J Clin Lab Anal* 2015;29:57-60