

## Riscontro occasionale di varianti emoglobiniche nel corso della determinazione di HbA<sub>1c</sub> in elettroforesi capillare: Hb Lepore

Maria Stornaiuolo<sup>1\*</sup>, Enrico Coccorullo<sup>1\*</sup>, Mariela Marinova<sup>1</sup>, Sara Altinier<sup>1</sup>, Carlo Artusi<sup>1</sup>, Massimo Maffei<sup>2</sup>, Domenico Coviello<sup>2</sup>, Daniela Basso<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Laboratorio di Genetica Umana, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCSS) Giannina Gaslini, Genova, Italia

*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: Hb Lepore

The growing prevalence and heterogeneity of genetic variations of hemoglobin in the Italian population requires essential information about the patient condition for a correct diagnostic laboratory approach. Lack of anamnestic data could compromise the correct interpretation of the laboratory result. One example is the case of a 52-year-old man with a medical request of HbA<sub>1c</sub> determination performed by the separative method in capillary electrophoresis (CE) with a result of 71 mmol/mol (r.i. 20-42). The separation of the Hb components with a dedicated CE method reported a minor peak of 1.1% in “(D) zone” and HbF 5.7% (r.i. 0-1.1%). This peak was not identified with an alternative HPLC method, because of coelution with a HbA<sub>2</sub> peak of 3.4% (r.i. 2.2-3.0). The blood count was not particularly altered except for a moderate anemia (hemoglobin=103 g/L; r.i. 140-175). The requesting clinician later informed the laboratory that the patient had been transfused many times for an undefined hemoglobinopathy. The subsequent molecular analysis revealed the presence of a hemoglobin variant, specifically Hb Lepore in homozygosis. This case allows to set out some considerations: first, the use of a separative method for HbA<sub>1c</sub> makes it possible to observe atypical profile and therefore allows the measurement of glycosylated hemoglobin and the detection of possible Hb variants at the same time; second, the request for HbA<sub>1c</sub> measurement in transfused patients should be considered inappropriate; third, the absence of pre-test information may trigger presumptive and erroneous conclusions or useless and expensive laboratory second-level laboratory tests.

**Parole chiave:** varianti emoglobiniche, elettroforesi capillare, HbA<sub>1c</sub>

### CASO CLINICO

Un uomo di origine Italiana di 52 anni si rivolge presso l'U.O.C. Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedale Università di Padova per eseguire esami di routine che comprendevano emocromo, indici biochimici ed emoglobina glicata per il monitoraggio del diabete mellito.

L'esame emocromocitometrico eseguito sull'analizzatore Sysmex Dasit (Sysmex XE 2100 e 5000, Kobe, Japan) evidenziava un lieve stato anemico: conteggio degli eritrociti (RBC) 3,22 10<sup>12</sup>/L (i.r. 4,50-5,90), volume corpuscolare medio (MCV) 87,9 fL (i.r. 80-96),

contenuto di emoglobina medio (MCH) 28,9 pg (i.r. 26-33), emoglobina (Hb) 103 g/L (i.r. 140-175), ematocrito (HCT) 0,283 L/L (i.r. 0,410-0,500). Allo striscio di sangue periferico si notava una lieve anisopoichilocitosi con ipocromia delle emazie, rari frammenti eritrocitari ed anisocitosi piastrinica. La serie granulocitaria non presentava anomalie morfologiche e non sono state evidenziate atipie dei linfociti e monociti.

I parametri biochimici valutati su campioni di plasma con strumentazione Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) presentavano valori alterati di transferrina 1,48 g/L (i.r. 1,75-3,75), recettore solubile

*\*Gli autori hanno contribuito, in egual misura, alla stesura del caso clinico*

Corrispondenza a: Maria Stornaiuolo, U.O.C. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova, Email: maria.stornaiuolo@aopd.veneto.it

Ricevuto: 30.03.2023

Revisionato: 05.04.2023

Accettato: 28.04.2023

Pubblicato on-line: 15.05.2023

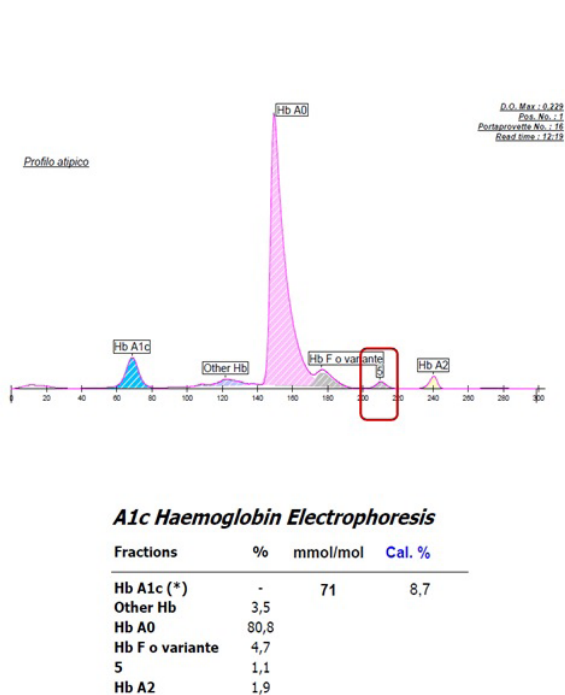
DOI: 10.19186/BC\_2023.032

della transferrina 8,55 mg/L (i.r. 0,76-1,76), ferritina 577 µg/L (i.r. 31-409), bilirubina totale 33,8 mmol/L (i.r. 1,7-17,0), bilirubina coniugata 9,7 mmol/L (i.r. 0,0-5,1), bilirubina non coniugata 24,1 mmol/L (i.r. 3,4- 13,7), lattato deidrogenasi (LDH) 486 U/L (i.r. 135-214) e glucosio a digiuno 4,1 mmol/L (i.r. 3,7-5,6).

La presenza di queste alterazioni orientava verso uno stato di anemia ipocromica normocitica di non chiaro inquadramento diagnostico.

La determinazione dell'HbA<sub>1c</sub> eseguita su campione di sangue in provetta K<sub>3</sub>EDTA mediante elettroforesi capillare (CE) (Capillarys 3 Tera con HbA<sub>1c</sub> kit (Sebia, Lisses, Francia) evidenziava un profilo atipico caratterizzato dalla presenza di una frazione anomala dell' 1% e di una frazione di HbF del 4,7% (i.r. 0-1,1%). L' HbA<sub>1c</sub> risultava 71 mmol/mol (i.r. 20-42) (Figura 1).

Il successivo assetto emoglobinico eseguito in CE (Capillarys 3 Tera con Hemoglobine kit, Sebia, Lisses, France) confermava la presenza della frazione di Hb anomala con un picco pari a 1,1% in "Z(D)" con HbA<sub>2</sub> pari a 3,4% (i.r. 2,2-3,0). Tale frazione non era evidenziata in cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) (Bio-Rad Variant II Hemoglobin testing system Dual Kit) a

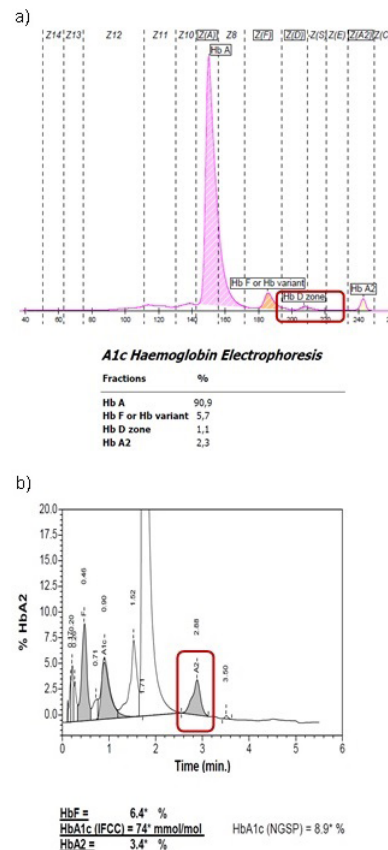


**Figura 1**  
Analisi dell'HbA<sub>1c</sub> ottenuta tramite elettroforesi capillare (CE) (Capillarys HbA<sub>1c</sub> kit - Sebia). Si evidenzia un "profilo atipico" caratterizzato dalla presenza di picco minore dell' 1,1% e HbF di 4,7%. L'HbA<sub>1c</sub> risulta 71 mmol/mol.

causa della sovrapposizione della stessa con il picco HbA<sub>2</sub>. La concentrazione di HbA<sub>1c</sub>, concordava tra le due tipologie di analisi (rispettivamente 71 e 74 mmol/mol) (1) (Figura 2).

Una prima possibile interpretazione dei tracciati indicava la presenza di una variante emoglobinica delle catene gamma in un soggetto con Hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH), ma non era possibile escludere anche la presenza di una variante delta. Il campione è stato quindi inviato presso un Centro di Riferimento di 2° livello per la caratterizzazione molecolare. Il DNA estratto da leucociti di sangue periferico in K<sub>3</sub>EDTA è stato amplificato con primer dedicati per la ricerca dei difetti delezionali dei geni delta globinici mediante la tecnica Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA). Quindi è stato eseguito il sequenziamento diretto del gene *HBB* secondo Sanger per confermare lo stato omizigote e l'assenza di variazioni beta talassemiche (2).

L'approfondimento diagnostico molecolare mostrava la presenza in omizigosi del difetto delta-globinico attribuibile alla variante Hb Lepore Boston-Washington (ibrido delta 87-beta116).



**Figura 2**  
Assetto emoglobinico eseguito in CE (Capillarys Hemoglobine kit - Sebia) (a). Si conferma la presenza di una frazione di Hb con un picco pari al 1,1% in "Z(D)", non evidenziabile in HPLC (Bio-Rad Variant II Hemoglobin testing system con Dual kit), poichè sovrapposta al picco HbA<sub>2</sub> pari a 3,4% (b).

## DISCUSSIONE

L'Hb Lepore è una variante emoglobinica strutturalmente anormale che risulta dalla fusione in-frame tra l'estremità 5' del gene della delta-globina e l'estremità 3' del gene della beta-globina, a causa del disallineamento dei cromosomi omologhi durante la meiosi. L'incidenza più alta di Hb Lepore si osserva nell'Italia Meridionale ed in generale nel bacino del Mediterraneo. La condizione eterozigote per lo più risulta asintomatica con leggera anemia normocitica ipocromica e presenza variabile di HbF. La condizione omozigote suscita maggiore preoccupazione, poiché presenta un quadro clinico piuttosto severo e può dare quadri paragonabili alla  $\beta$  talassemia intermedia o major (3-6).

Nel presente caso clinico, l'emocromo non risultava particolarmente alterato ma evidenziava una discreta anemia. La determinazione di HbA<sub>1c</sub> richiesta dal medico curante per il monitoraggio del diabete mellito del paziente ha consentito di osservare, tramite tecnica separativa, una frazione di Hb anomala in zona D, difficilmente inquadrabile anche con tecniche cromatografiche. Il medico richiedente veniva quindi contattato per acquisire ulteriori dati anamnestici, riferendo che il soggetto veniva regolarmente trasfuso per una emoglobinopatia non definita.

Alla luce di questa ulteriore informazione decadevano le ipotesi diagnostiche inizialmente formulate ed il grafico dell'assetto emoglobinico andava interpretato tenendo conto del costante trattamento trasfusionale che permetteva la presenza di picchi relativi alle frazioni emoglobiniche HbA<sub>0</sub> e HbA<sub>2</sub> del donatore. La presenza della piccola frazione, visibile in Hb D zone (1,1%) in CE, lasciava campo alla possibile ipotesi di presenza di variante emoglobinica in un soggetto politrasfuso. La valutazione incrociata del tracciato elettroforetico, del cromatogramma HPLC e delle successive analisi molecolari consentiva di formulare l'ipotesi della presenza della variante Hb Lepore in omozigosi, quantitativamente sottorappresentata a causa della trasfusione.

La crescente prevalenza ed eterogeneità delle variazioni genetiche dell'emoglobina nella popolazione italiana impongono che l'approccio diagnostico di laboratorio, oltre all'utilizzo di strumenti appropriati, si accompagni all'acquisizione di informazioni essenziali sul paziente (7).

E' da sottolineare che l'utilizzo di tecniche separative per la determinazione di HbA<sub>1c</sub> è fondamentale per identificare la presenza di una frazione emoglobinica anomala che può interferire in modo variabile nella corretta valutazione dell'HbA<sub>1c</sub>. Pertanto, si ritiene di raccomandare l'adozione di metodi che siano in grado di segnalare la presenza di frazioni emoglobiniche anomale in modo tale che l'operatore sia allertato nella valutazione del profilo separativo.

In conclusione, la richiesta di determinazione della HbA<sub>1c</sub> in un paziente politrasfuso risulta non appropriata ed appare evidente quanto l'assenza di informazioni pre-test o la segnalazione di trasfusioni recenti possano innescare conclusioni presuntive, non definitive ed erronee o l'attivazione di percorsi di laboratorio inutili e onerosi.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

## BIBLIOGRAFIA

1. Marinova M, Altinier S, Caldini A, Passerini G, Pizzagalli G, Brogi M, et al. Multicenter evaluation of hemoglobin A1c assay on capillary electrophoresis. *Clin Chim Acta* 2013;424:207-11.
2. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-91.
3. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:11.
4. Chaibunruang A, Srivorakun H, Fucharoen S, Fucharoen G, Sae-ung N, Sanchaisuriya K. Interactions of hemoglobin Lepore ( $\delta\beta$  hybrid hemoglobin) with various hemoglobinopathies: a molecular and hematological characteristics and differential diagnosis. *Blood Cell Mol Dis* 2010;44:140-5.
5. Bain BJ.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma$  thalassaemias and related conditions. In: *Haemoglobinopathy Diagnosis*, 2° ed. Oxford: Blackwell Publishing 2006, p. 63-115.
6. Efremov DG, Efremov GD, Zisovski N, Stojanovski N, Kutlar F, Diaz-Chico IC, et al. Variation in clinical severity among patients with Hb Lepore- Boston-beta-thalassaemia is related to the type of beta-thalassaemia. *Br J Haematol* 1988;68:351-5.
7. G.Barberio, G.Ivaldi. *Emoglobinopatie. Dalla diagnosi alle consulenze specialistiche*. Padova: Piccin Editore 2020.