

## Refertazione dell'emoglobina glicata in presenza di varianti emoglobiniche

Mariarosa Carta<sup>1</sup>, Renata Paleari<sup>2</sup>, Anna Caldini<sup>3</sup>, Alessandro Terreni<sup>3</sup>, Andrea Mosca<sup>2</sup> per il Gruppo di Studio Intersocietario SIBioC-SIMeL Diabete Mellito

<sup>1</sup>Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, ULSS 6, Vicenza

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano

<sup>3</sup>Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

### ABSTRACT

**Glycated hemoglobin reporting in presence of hemoglobin variants.** Measurement of glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) is a key-role laboratory test in the management of diabetic patients. Clinicians need reliable and accurate measurements, with negligible pre-analytical and post-analytical errors. Among the pre-analytical variables, the presence of hemoglobin variants is a challenge to the laboratorians: the purpose of this document is to give some practical advices on how to report HbA<sub>1c</sub> values in presence of hemoglobin variants. Reporting is quite simple if measurement are carried on by HPLC and other similar analytical methods, when the Hb variant is well separated and does not interfere with HbA or HbA<sub>1c</sub>, such as in case of heterozygosis for HbS, HbC, HbD and HbE. In case of homozygosis or double heterozygosis for such variants the HbA<sub>1c</sub> values should not to be reported. Unusual HbA<sub>1c</sub> values, typically <4% or >15% (<20 mmol/mol or >142 mmol/mol), could indicate the presence of hemoglobin variants. In these cases other approaches to the retrospective evaluation of glyceic control, based on the measurement of the glycation of different proteins, such as albumin, should be followed.

### PREMESSA

L'emoglobina glicata (HbA<sub>1c</sub>) è un importante marcatore biochimico utilizzato nella diagnosi e nel monitoraggio del diabete, ma la presenza di varianti emoglobiniche può interferire con la sua determinazione rendendo i risultati dell'analisi non attendibili o di difficile interpretazione (1). Infatti, la presenza di una variante emoglobinica può determinare sulla misura della HbA<sub>1c</sub> un'interferenza sia positiva che negativa, che può essere di tipo strettamente analitico o, più in generale, di tipo biologico/preanalitico. A quest'ultima situazione possono essere ricondotti i casi in cui sono presenti varianti emoglobiniche che non formano addotti stabili col glucosio o che mostrano cinetiche di glicazione diverse rispetto alla HbA o che hanno una vita media eritrocitaria ridotta. Si concorda nel ritenere che l'interferenza legata alla presenza di una variante emoglobinica debba essere valutata per ogni singola variante e per ogni singolo metodo utilizzato per la determinazione della HbA<sub>1c</sub> (2).

### VARIANTI EMOGLOBINICHE E INTERFERENZA NELLA MISURAZIONE DI HbA<sub>1c</sub>

Le varianti emoglobiniche più comuni sono HbS, HbC, HbD e HbE. I soggetti omozigoti (HbSS, HbCC,

HbDD) e doppi eterozigoti HbSC presentano un'anemia emolitica marcata e pertanto, dal momento che la concentrazione di HbA<sub>1c</sub> dipende dalla vita eritrocitaria, è opportuno utilizzare parametri differenti per valutare il controllo glicemico in questi pazienti. Inoltre, nei soggetti omozigoti manca totalmente HbA e quindi non si può formare HbA<sub>1c</sub>, anche se potrebbe essere presente la componente glicata della variante. Nei soggetti portatori di queste varianti in forma eterozigote, la sopravvivenza eritrocitaria è normale, anche se in casi isolati pare che i soggetti con eterozigosi HbAC abbiano una vita eritrocitaria lievemente ridotta (3). La HbA<sub>1c</sub> può quindi essere utilizzata in questi pazienti se la presenza di queste varianti non interferisce con il metodo utilizzato.

I metodi attualmente più utilizzati per la determinazione della HbA<sub>1c</sub> possono venire raggruppati sulla base del principio analitico nelle seguenti categorie.

*Metodi immunochimici.* Vengono utilizzati anticorpi che riconoscono gli ultimi 4-10 amminoacidi dell'estremità ammino-terminale glicata della catena β. Varianti emoglobiniche che presentano mutazioni che interessano questa sequenza amminoacidica (ad es., HbS e HbC) possono influenzare il risultato della HbA<sub>1c</sub> (4). Al contrario, la presenza di varianti in cui la mutazione si trova al di fuori della sequenza riconosciuta dagli anticorpi (ad es., HbE e HbD) tipicamente non

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate (MI). Tel. 0250330422, Fax 0299987559, E-mail [andrea.mosca@unimi.it](mailto:andrea.mosca@unimi.it)

Ricevuto: 10.11.2010

Revisionato: 18.11.2010

Accettato: 19.11.2010

genera problemi sulla misura della HbA<sub>1c</sub> (5). Con queste metodiche non si ha la diretta consapevolezza della presenza di una variante emoglobinica, in quanto forniscono unicamente un valore numerico. Tuttavia, nel caso in cui il risultato della HbA<sub>1c</sub> sia chiaramente al di fuori dell'intervallo fisiopatologico, si può sospettare un'interferenza da varianti emoglobiniche.<sup>1</sup>

*Metodi basati su cromatografia liquida a scambio ionico, con tecnologia HPLC.* La HbA<sub>1c</sub> viene separata dalle altre emoglobine sulla base delle differenze nei rispettivi pl. Tutte le varianti caratterizzate da una diversa carica elettrica rispetto a quella della HbA possono teoricamente essere evidenziate nel cromatogramma ed essere causa di una possibile interferenza. A seconda del tipo di variante emoglobinica presente le conseguenze sulla misura della HbA<sub>1c</sub> possono essere diverse. La HbA<sub>1c</sub> viene espressa con l'equazione:  $[HbA_{1c}] \% = [HbA_{1c}] * 100 / [Hb_{totale}]$ . Se la variante emoglobinica (HbX) e il suo addotto glucidico (HbX<sub>1c</sub>) eluiscono separatamente dalla HbA e dalla HbA<sub>1c</sub>, la loro presenza ha effetti trascurabili sulla determinazione della HbA<sub>1c</sub>, in quanto gli strumenti attuali calcolano l'abbondanza relativa della HbA<sub>1c</sub> con l'equazione:<sup>2</sup>

$$[HbA_{1c}]_{corretta} \% = [HbA_{1c}] * 100 / ([Hb_{totale}] - [HbX])$$

Se invece HbX e/o HbX<sub>1c</sub> non si separano perfettamente da HbA e HbA<sub>1c</sub>, impedendone quindi la corretta integrazione, si possono allora avere sia sottostime che sovrastime del valore di HbA<sub>1c</sub>.

Per quanto riguarda le varianti più comuni (HbC e HbS), esse vengono separate bene con gli strumenti HPLC più recenti (4). Diversa è la situazione in presenza di HbE o HbD: in questo caso si può registrare sia una sottostima che una sovrastima a seconda dello strumento utilizzato (5).

*Metodi basati su cromatografia di affinità (eseguibili con tecnologia HPLC o con metodiche "point-of-care").* Sono basati sull'uso dell'acido aminofenilboronico, che reagisce specificamente con il glucosio legato all'emoglobina. Questi metodi, tuttavia, misurano l'emoglobina glicata totale, ma sono ritenuti i più robusti nei confronti di interferenze legate alla presenza di varianti emoglobiniche.

*Altre tecniche quantitative basate sulla separazione in base alla differenza di carica delle molecole.* Sono incluse in questo gruppo metodiche più vecchie e oggi meno diffuse (ad es., minicolonne cromatografiche, elettroforesi su gel d'agarosio) e altre tecniche emergenti (ad es., l'elettroforesi capillare). Valgono per esse, di principio, le medesime considerazioni fatte per le metodiche HPLC a scambio ionico.

Nella Tabella 1 è riportata l'interferenza delle più

comuni varianti emoglobiniche sui metodi attualmente più utilizzati per la misura della HbA<sub>1c</sub>. Le informazioni sono state ricavate dal sito del "National Glycohemoglobin Standardization Programme" (NGSP), dove è possibile reperire un'ampia documentazione bibliografica sull'argomento (6).

Le possibili interferenze legate alle varianti emoglobiniche devono essere tenute in attenta considerazione da parte sia del clinico che richiede l'esame sia del laboratorista che deve impegnarsi a fornire comunque un risultato attendibile e un'interpretazione non ambigua. Nel caso in cui il paziente abbia già avuto una diagnosi di variante emoglobinica è necessario verificare se tale variante interferisce o meno con la misura della HbA<sub>1c</sub> (come meglio specificato più avanti). Molto più spesso il riscontro della variante è invece occasionale e avviene nel corso di indagini eseguite con tecniche separative ad elevate prestazioni (ad es., è frequente il riscontro casuale di una variante emoglobinica nel corso della determinazione di HbA<sub>1c</sub> con tecnica HPLC).

## INDICAZIONI SU COME REFERTARE HbA<sub>1c</sub> IN PRESENZA DI VARIANTI EMOGLOBINICHE

1. Gli utilizzatori di HPLC o di altre analoghe tecniche separative devono attentamente ispezionare tutti i cromatogrammi prima di refertare la HbA<sub>1c</sub>. In presenza di un quadro di separazione anomalo, per presenza di una possibile variante emoglobinica, ci sono due possibilità:

- il laboratorio non è in grado di approfondire le indagini. In questo caso il dato di HbA<sub>1c</sub> non deve essere refertato e deve essere riportato un commento che inviti a ulteriori approfondimenti (ad es., "HbA<sub>1c</sub> non quantificabile per presenza di variante emoglobinica; si consigliano ulteriori indagini per la caratterizzazione della variante emoglobinica.");
- il laboratorio può procedere ad esami di approfondimento. Il dato di HbA<sub>1c</sub> può essere refertato se la variante viene identificata come S, C, D o E in eterozigosi, è ben separata da HbA e non interferisce col metodo in uso. E' a discrezione del professionista di laboratorio segnalare o meno nel referto la presenza di una variante emoglobinica. Nel caso in cui la variante venga segnalata, è opportuno specificare che la sua presenza non interferisce con la misurazione della HbA<sub>1c</sub>. Nel caso si tratti di una variante più rara, si possono trovare informazioni sui siti dedicati (7). In questo caso, difficilmente si possono dare indicazioni pratiche, universalmente valide, relativamente all'opportunità o meno di refertare il valore misurato di HbA<sub>1c</sub>.

<sup>1</sup> Il lettore può far riferimento all'Appendice del lavoro di Mosca A, "Considerazioni sull'implementazione a livello nazionale delle raccomandazioni per la standardizzazione della misura dell'emoglobina glicata", pubblicata su questo numero di *Biochimica Clinica* a pagina 40 (NdEd).

<sup>2</sup> Questa correzione vale nel caso di varianti che eluiscono dopo la HbA, ma non viene generalmente effettuata nel caso in cui la variante venga eluita prima della HbA.

**Tabella 1**

Interferenza da parte delle più comuni varianti emoglobiniche, quando presenti in eterozigosi, sui metodi più frequentemente utilizzati per la misura della HbA<sub>1c</sub>. Adattata da rif. 2

	Interferenza			
	HbAS	HbAC	HbAE	HbAD
<i>Principio immunochimico</i>				
Abbott Architect/Aerose	Si ↑	Si ↑	ND	ND
Siemens (Metrica) A1cNOW	Si ↑	Si ↑	No	No
Beckman Synchron	No	No	No	No
Siemens Dimension	No	No	No	No
Beckman AU systems	Si ↑	Si ↑	No	No
Ortho Clinical Diagnostics Vitros	No	No	No	No
Point Scientific (applicazione su Modular P Roche)	No	No	No	No
Roche Cobas Integra	Si ↑	Si ↑	ND	ND
Roche Cobas Integra gen2 (Tina Quant)	No	No	No	No
Roche Hitachi Tina Quant	No	No	No	No
Roche Unimate	Si ↑	Si ↑	ND	ND
Siemens Advia A <sub>1c</sub> (versione originale)	Si ↑	Si ↑	ND	ND
Siemens Advia A <sub>1c</sub> (nuova versione)	No	No	ND	ND
Siemens DCA 2000	No	No	No	No
<i>Principio HPLC scambio ionico</i>				
Bio-Rad D-10	No	No	No	No
Bio-Rad Variant (programma A <sub>1c</sub> )	No	No	No	Si ↓
Bio-Rad Variant II (programma A <sub>1c</sub> )	No	No	No	No
Bio-Rad Variant II Turbo (programma A <sub>1c</sub> )	No	No	Si ↑	Si ↑
Menarini HA8140 (modalità diabete)	Si ↑	No	ND	ND
Menarini HA8160 (modalità diabete)	No	No	Si ↓	Si ↓
Menarini HA8160 (modalità talassemia)	No	No	No	ND
Tosoh A <sub>1c</sub> 2.2 Plus	No	No	Si ↓	No
Tosoh G7	No	No	Si ↓	No
Tosoh G8	No	No	Si ↓	No
<i>Principio cromatografia di affinità</i>				
Axis-Shield Affinion	No	No	No	No
Primus HPLC	No	No	No	No
<i>Principio enzimatico</i>				
Diazyme Direct enzymatic A <sub>1c</sub>	No	No	No	No

↑ ↓ indicano, rispettivamente, un aumento o una diminuzione del valore di HbA<sub>1c</sub>; ND, dato di possibile interferenza non disponibile.

2. Nel caso in cui si conosca *a priori* il tipo di variante emoglobinica presente è necessario valutare se tale variante interferisca o meno col metodo in uso nel laboratorio (Tabella 1). Se ci fosse interferenza, il risultato della HbA<sub>1c</sub> non va refertato. Si può valutare la possibilità di rivolgersi ad un altro laboratorio che utilizzi per la determinazione di HbA<sub>1c</sub> un metodo che non risenta della presenza della specifica variante.

3. Valori di HbA<sub>1c</sub> molto al di fuori dell'intervallo di riferimento [ $<20$  mmol/mol o  $>142$  mmol/mol ( $<4,0\%$  o  $>15,0\%$ )] o valori marcatamente discrepanti con il quadro clinico devono fare sospettare la presenza di una

variante emoglobinica. In tali casi si suggerisce di effettuare una valutazione completa dell'assetto emoglobinico per valutare la possibilità di refertare il valore della HbA<sub>1c</sub>, seguendo le indicazioni di cui al punto 1.

4. La misura della HbA<sub>1c</sub> in presenza di varianti emoglobiniche in omozigosi o doppia eterozigosi (con un'altra variante o con sindrome talassemica) non deve essere effettuata.

5. In tutti i casi nei quali HbA<sub>1c</sub> non è refertabile (ad es., quello al punto 4.) si deve consigliare di utilizzare un altro esame per la valutazione del controllo glicemico

non basato sull'analisi delle emoglobine (fruttosammina o albumina glicata).

6. Nel caso in cui sia presente una variante emoglobinica non nota e si ritenga di fornire ulteriori informazioni sulla emoglobina interferente è opportuno effettuare analisi con un sistema "dedicato" per le varianti emoglobiniche, i cui risultati vengano valutati da personale specificamente esperto nel settore. Può essere necessario contattare un centro di riferimento per l'eventuale caratterizzazione della variante con tecniche analitiche di 2° livello. Nella Tabella 2 sono elencati alcuni dei centri che si occupano di caratterizzare difetti strutturali dell'emoglobina, ai quali è collegata una struttura di consulenza genetica e clinica per la gestione dei difetti.

#### Tabella 2

*Centri specializzati in grado di fornire approfondimenti diagnostici e consulenza genetica per emoglobinopatie e sindromi talassemiche correlate*

Sede	Ente	Laboratorio
Cagliari	Ospedale Microcitemico	Laboratorio di Genetica Umana
Ferrara	Azienda Ospedaliera Universitaria S. Anna	Laboratorio di Genetica Molecolare, Unità Operativa Genetica Medica
Genova	Ospedali Galliera	Laboratorio di Genetica Umana, Settore Microcitemia
Milano	Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli Regina Elena	Laboratorio di Genetica Medica, Settore Molecolare
Palermo	Ospedale Cervello	Laboratorio Molecolare, Unità Operativa Ematologia con Talassemia
Roma	Centro Studi delle Microcitemie	Laboratorio del Centro

#### RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il Dott. Ferruccio Ceriotti (Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano) e il Dott. Giovanni Ivaldi (Laboratorio di Genetica Medica, Ospedali Galliera, Genova) per la lettura critica del manoscritto. Il Dott. Giovanni Ivaldi ha inoltre fornito le indicazioni sui centri per la caratterizzazione delle varianti emoglobiniche.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bry L, Chem PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001;47:153-63.
2. Little RR, Roberts WL. A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3:446-51.
3. Prindle KH, McCurdy PR. Red cell lifespan in hemoglobin C disorders (with special reference to hemoglobin C trait). *Blood* 1970;36:14-9.
4. Roberts WL, Safar-Pour S, De BK, et al. Effects of hemoglobin C and S traits on glycohemoglobin measurements by eleven methods. *Clin Chem* 2005;51:776-8.
5. Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, et al. Effects of hemoglobin (Hb) E and HbD traits on measurements of glycosylated Hb (HbA<sub>1c</sub>) by 23 methods. *Clin Chem* 2008;54:1277-82.
6. <http://www.ngsp.org/factors.asp>
7. <http://globin.cse.psu.edu>