



- REVISTA DE -

# MEDICINA DE LABORATORIO

**Detección de la Hb J-Baltimore  
durante la medición de la HbA1c  
por HPLC**

**Detection of Hb J-Baltimore  
during HbA1c measurement by  
HPLC**

10.20960/revmedlab.00146

03/16/2023

## **Detección de la Hb J-Baltimore durante la medición de la HbA1c por HPLC**

### ***Detection of Hb J-Baltimore during HbA1c measurement by HPLC***

Nancy Elizabeth Larocca González, MA Álvarez Rueda, EM Deschamps Mosquera, FJ Peteiro-Cartelle

Hospital Materno Infantil Teresa Herrera. A Coruña

Correspondencia: Nancy Elizabeth Larocca González. Hospital Materno Infantil Teresa Herrera. Avenida da Pasaxe, 67. 15006 La Coruña

e-mail: nancy.elizabeth.larocca.gonzalez@sergas.es

Recibido: 19/08/2022

Aceptado: 22/02/2023

### **INTRODUCCIÓN**

La hemoglobina glicada (HbA1c) se utiliza para el diagnóstico y el seguimiento del tratamiento de los pacientes con prediabetes y diabetes *mellitus* de tipo 1 y de tipo 2. Su medición en el laboratorio por la cromatografía líquida de alta eficacia puede verse afectada por la presencia de variantes de hemoglobina.

A continuación exponemos las mediciones de la HbA1c realizadas en cinco pacientes no consanguíneos procedentes del municipio de Vimianzo, de la provincia de A Coruña, que acudieron al servicio de laboratorio de análisis clínicos para descartar diabetes. Estos pacientes fueron seleccionados al observarse en los cromatogramas obtenidos durante una primera determinación de la HbA1c picos anómalos (> 10 %) y con un patrón similar en cada uno de ellos.

### **CASO CLÍNICO**

Se utilizaron muestras de sangre total recogidas en tubos con EDTA procesadas mediante el HPLC DC-100™ Biorad calibrado de acuerdo con la referencia de la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC).

Los resultados se presentaron con la generación de un gráfico con los diferentes picos de hemoglobina (cromatograma) acompañado del informe correspondiente. El área bajo la curva de la HbA1c se llevó a cabo mediante un

algoritmo de Gauss modificado tomando en cuenta el tiempo de retención (RT) y el volumen de elución en cada una de las muestras.

Los valores de hemoglobina, de hematocrito, de glucemia en ayunas y los valores de la HbA1c de los individuos estudiados se muestran en la tabla I. En cada caso se obtuvo un gráfico en el que se identificaban las fracciones de hemoglobina HbA1a, Hb1b, Hb1c, la HbF y la HbA0, además de la presencia de dos picos anómalos (> 10 %): un pico antes de la elución de la HbA1c y otro pico antes de la elución de la HbA0 (Fig. 1A), lo que nos hizo sospechar la presencia de una variante de hemoglobina en estos individuos al compararlo con un cromatograma de un paciente sin estas variantes (Fig. 1B).

Con la finalidad de investigar la presencia de una posible variante de hemoglobina, se enviaron las cinco muestras al Servicio de Hematología del Hospital San Carlos de Madrid para la comparación del resultado obtenido por HPLC con un método alternativo y para el diagnóstico molecular. Como método alternativo, se comprobó que se observaba un pico anómalo mediante electroforesis capilar de zona, realizada en el Capillarys Flex (Sebia). La caracterización molecular se realizó mediante extracción genómica del ADN y amplificación selectiva del gen de la cadena  $\beta$  de hemoglobina utilizando el método automatizado Biorobot® EZ1 (Quiagen GmbH, Hilden, Alemania), la cuantificación mediante NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.) y la posterior secuenciación mediante el método de Sanger utilizando un secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Foster City, Ca, EE. UU.). El estudio mostró la mutación GGC→GAC en el codón 16, que determina un cambio de glicina por ácido aspártico en heterocigosis en todos los casos. Esta variante se corresponde a la hemoglobina J-Baltimore (beta 16 (A13) Gly> Asp).

## **DISCUSIÓN**

Desde hace varias décadas la medición de la HbA1c se ha usado para el diagnóstico y el seguimiento del control glucémico a largo plazo en pacientes con prediabetes y diabetes *mellitus* de tipo 1 y de tipo 2 de acuerdo a las pautas de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), que recomienda su inclusión como prueba diagnóstica para la diabetes *mellitus* si sus valores son  $\geq 6,5$  % en dos ocasiones (1).

La hemoglobina del adulto está compuesta por tres fracciones, llamadas

hemoglobina A, hemoglobina A2 y hemoglobina F. La hemoglobina A (HbA) es la más abundante de todas. Representa aproximadamente el 97 %. A través de una reacción bioquímica conocida como reacción de Maillard, parte de esta HbA puede combinarse en forma covalente y no enzimática con residuos de azúcares, como la glucosa, convirtiéndose en glucohemoglobina o glicohemoglobina (HbA1). Dependiendo del azúcar que incorpore, se obtienen las diferentes subfracciones, conocidas como hemoglobinas menores o rápidas (HbA1a, HbA1b y HbA1c) por ser las que primero eluyen en los procesos de HPLC usados habitualmente para identificarlas. La HbA1c, que es la que medimos en el laboratorio, representa aproximadamente el 80 % de la HbA1 (2,3).

Los niveles de HbA1c se han relacionado con el desarrollo y la progresión de las complicaciones crónicas de la diabetes *mellitus*, por lo que mantener unos valores bajos es el principal objetivo del tratamiento en pacientes diabéticos (3).

Los valores de la HbA1c pueden estar alterados en algunas situaciones clínicas que afecten a la vida media de los eritrocitos (embarazo, hemorragia reciente, anemia hemolítica, terapia de reemplazo de hierro o tratamiento con vitamina B<sub>12</sub>) y en presencia de variantes estructurales de la hemoglobina cuando se realiza su medición por el método de la HPLC. Se han descrito más de mil variantes de hemoglobina, la mayoría con un patrón de herencia recesivo, con una mutación puntual en una de las cadenas de la Hb. En la mayoría de los casos estas hemoglobinas estructurales no se diagnostican y pueden conducir a falsos valores de HbA1c durante el ensayo, lo que origina errores de diagnóstico y un manejo inadecuado del paciente diabético (3,4).

Una de las variantes de la hemoglobina es la Hb J-Baltimore. Su presencia puede causar picos anómalos e interferir con los valores de la glicohemoglobina medida por HPLC (4,5). La Hb J-Baltimore fue descrita por primera vez en 1963 por Baglioni y Weatherall en una familia afroamericana (5). Desde entonces, se han reportado varios casos en distintos grupos raciales, con una baja prevalencia en Europa (0,06 %) en comparación con la descrita en África (33 %). La mayoría de estos casos fueron descubiertos de manera incidental durante el estudio de otras patologías, como la talasemia (6-8).

En los casos que presentamos, observamos la presencia de esta variante en

cinco individuos no consanguíneos que acudieron a nuestro laboratorio para el cribado de diabetes *mellitus* procedentes de la misma zona geográfica dentro la provincia de A Coruña, en el municipio de Vimianzo (en el noroeste de España). La Hb J-Baltimore es relativamente infrecuente pero no excepcional en España, donde se han descrito hasta la fecha cinco familias con la forma heterocigota (8,9). También llama la atención que los casos de este estudio son de Vimianzo. La aparición de esta variante en los habitantes de este municipio pudiera explicarse por ancestros de origen africano, donde es frecuente, que emigraron a esta zona de España. A pesar de ello, no se han reportado en la literatura evidencias sobre la presencia de esta hemoglobina en sujetos procedentes del municipio de Vimianzo o de otras regiones de Galicia. Este hallazgo pudiera ser la base para futuras investigaciones.

El impacto analítico de esta rara variante es bien conocido en la medición de la HbA1c por HPLC (10). Barakat y cols. sugieren que la carga negativa, debida al cambio por una glicina en la posición 16 de la cadena  $\beta$  de la hemoglobina, no permite la adecuada separación de la Hb J-Baltimore o de su fracción glicada de la HbA o HbA1c, respectivamente, mediante HPLC, originando picos anómalos y valores falsamente disminuidos de la HbA1c (6).

Existen otros métodos analíticos, como la electroforesis capilar o la turbidimetría, que pueden utilizarse de manera alternativa, ya que no se ven afectados por estas hemoglobinopatías.

En este estudio hemos notado que la Hb J-Baltimore produce unos picos anómalos que generan un cromatograma muy característico. Su visualización y su reconocimiento durante la medición de la HbA1c deben alertar a los técnicos y a los facultativos de laboratorio de la presencia de esta hemoglobina estructural para llevar a cabo la realización del estudio molecular del paciente y de sus familiares, dado su componente hereditario. En el caso de que existan discordancias entre los niveles de HbA1c por HPLC y los valores de glucemia en pacientes diabéticos ya diagnosticados en los cuales quiera hacerse seguimiento de su control metabólico, pueden resultar útiles otros métodos, como la electroforesis capilar, la turbidimetría o la medición de la fructosamina o de la albúmina glicada.

### **PUNTOS A RECORDAR**

- La medición de la HbA1c por HPLC se utiliza para el diagnóstico y el

seguimiento del control glucémico a largo plazo en pacientes con prediabetes y diabetes *mellitus* de tipo 1 y de tipo 2.

- La presencia de variantes estructurales de la hemoglobina puede evidenciarse durante la medición de la HbA1c por HPLC. Estas variantes de la hemoglobina pueden detectarse como picos anómalos en los cromatogramas que sobrepasan el 10 %.

- Ante la sospecha de una posible variante de hemoglobina, debe recomendarse el estudio molecular en pacientes y familiares para su correcta identificación y el uso de métodos alternativos para el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes con diabetes *mellitus* si estas hemoglobinas causan interferencias en la medición e interpretación de la HbA1c.

- El estudio molecular a través de muestras de ADN permite realizar el genotipaje de las hemoglobinas estructurales, identificando el tipo de mutación.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. American Diabetes Association. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes 2022. *Diabetes Care* 2022;45(Suppl.1):S1-S2.
2. Sherwani SI, Khan HA, Ekhzaimy A, et al. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomark Insights* 2016;11:95-104.
3. Kojić Damjanov S, Đerić M, Eremić Kojić N. Glycated hemoglobin A1c as a modern biochemical marker of glucose regulation. *Med Pregl* 2014;67(9-10):339-44.
4. Saw S, Loh TP, Yin C, et al. Identification of hemoglobin variants in samples received for glycated hemoglobin testing. *Clin Chim Acta* 2013;415:173-5.
5. Baglioni C, Weatherall DJ. Abnormal Human Hemoglobins. *Chemistry of Hemoglobin J Baltimore. Biochimica et Biophysica Acta* 1963;78:637-643.
6. Barakat O, Murali Krishnan ST, Dhatariya K. Falsely low HbA1c value due to a rare variant of hemoglobin J-Baltimore. *Primary care diabetes* 2008;2:155-7.
7. Gargallo MA, Ataulfo González F, Villegas A. Abnormally low HbA1c secondary to hemoglobin J- Baltimore [ $\beta$ 16(A13)Gly  $\rightarrow$  Asp]. Family study.

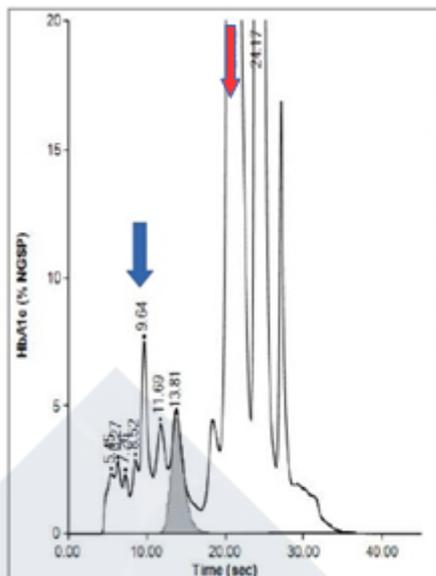
J endocrinol 2010:83-85.

8. Arribalzaga K, Ricard MP, Carreño DL, et al. Hb-J Baltimore [ $\beta$ 16(A13)Gly  $\rightarrow$  Asp] associated with B+ thalassemia in a spanish family. Hemoglobin 1996;20(1):79-84.
9. Rhea JM, Molinaro R. Rare presumptive Hb variant misidentification prevents appropriate Hb A1c result. Clin Chim Acta 2014;431:111-2.
10. Brunel V, Lahary A, Chagraoui A, et al. Haemoglobin J-Baltimore can be detected by HbA1c electropherogram but with underestimated HbA1c value. Biochemia Medica 2016;26(2):240-2.

**Tabla I.** Valores obtenidos de los cinco individuos estudiados

<b>Individuos</b>	<b>Hemoglobina (VN: 13-18 gr/dl)</b>	<b>Hematocrito (VN: 41-50 %)</b>	<b>Glucosa en ayunas (VN:70-110 mg/dl)</b>	<b>HbA1c (%) (VN por la NGSP*:4,0-6,1)</b>	<b>HbA1c (mmol/mol) (VN por la IFCC†:20,0-43,0)</b>
1	16,3	51,3	112	4,8	29
2	11	34,1	94	4,2	22
3	13,8	39,6	116	4,5	26
4	17,2	48,9	123	4,3	23
5	15,5	47	138	5,9	41

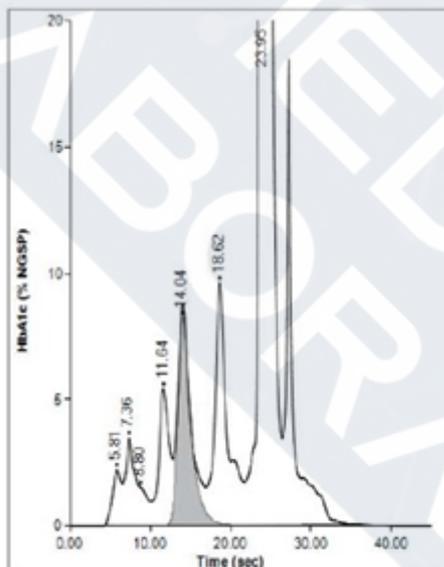
\*NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program. †IFCC: International Federation of Clinical Chemistry.



Peak Name	RT	Area	Area%	Concentration (% NGSP)
A1a	5.45	1380.23	0.94	---
Unknown	6.27	1293.91	0.88	---
A1b	7.26	962.39	0.65	---
F	8.52	1390.60	0.94	---
Unknown	9.64	4103.70	2.78	---
LA1c	11.69	3596.00	2.44	---
HbA1c	13.81	4573.01	---	4.51
Unknown	21.02	64683.88	43.83	---
A0	24.17	65586.95	44.44	---

Total Area: 147571

Status: Released



Peak Name	RT	Area	Area%	Concentration (% NGSP)
A1a	5.81	2724.57	1.10	---
A1b	7.36	4650.93	1.88	---
F	8.80	1890.44	0.76	---
LA1c	11.64	8504.58	3.43	---
HbA1c	14.04	15768.14	---	8.24
P3	18.62	17628.01	7.12	---
A0	23.95	196495.61	79.34	---

Total Area: 247662

Status: Released

**Figura 1.** A. Cromatograma obtenido durante la medición de la HbA1c por HPLC D-100™ Biorad, con presencia de picos anómalos durante la medición de la HbA1c. Se observa un pico que aparece a los 9,64 segundos antes del pico de la HbA1c y que corresponde a la fracción glicada de una variante de hemoglobina (HbXc), señalada con la flecha azul, y un segundo pico que aparece a los 21,02 segundos antes de la HbA0 y que corresponde a la fracción no glicada de una variante de hemoglobina (HbX), señalada con flecha roja. Este patrón se repitió con las mismas características en los cinco individuos estudiados. B. Cromatograma sin variantes de hemoglobina obtenido durante

la medición de la HbA1c por HPLC D-100™ Biorad. El área sombreada corresponde a la fracción de la HbA1c que aparece a los 14,04 segundos y con una concentración de 8,24 %.

