

## Hemoglobina Raleigh en Costa Rica detectada como un valor falsamente elevado de Hemoglobina glicosilada

Wálter E. Rodríguez-Romero<sup>1</sup>, Johnny Villalobos-Fernández<sup>2</sup>, Patricia Salas-Abarca<sup>2</sup>, Luo Hong-yuan<sup>3</sup>, David H. K. Chui<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines, CIHATA, Universidad de Costa Rica, Costa Rica. <sup>2</sup>Laboratorios Clínicos, Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS), Costa Rica. <sup>3</sup>Boston University, School of Medicine, Medical Center, USA

### RESUMEN

**Introducción.** Las hemoglobinas anormales forman parte de los trastornos hereditarios de la hemoglobina (Hb) y, por su frecuencia, son considerados en muchas regiones del mundo como problemas de Salud Pública. Aunque algunas presentan problemas clínicos, una gran proporción son inocuas y muchas veces su diagnóstico se realiza en forma casual mediante métodos altamente especializados.

El caso de la Hb Raleigh, variante de cadenas beta, ha sido reportada por interferir con la detección de la Hb glicosilada y dar valores falsamente elevados. En este reporte, se publica el hallazgo de la Hb Raleigh en Costa Rica, detectada inicialmente como un valor extremadamente alto de Hb glicosilada.

**Caso clínico.** Paciente masculino caucásico, sin manifestaciones hematológicas. El sujeto es un diabético conocido, con repetidas determinaciones altas de hemoglobina glicosilada (HbA1c), evaluadas inicialmente con un método de cromatografía de intercambio iónico (Stambio). Se cambió la metodología de la detección de HbA1c para utilizar el equipo de BioRad D-10 HPLC, obteniéndose valores superiores al 30% de Hb glicosilada y se realizaron estudios bioquímicos y genéticos determinándose la presencia de la Hb Raleigh. Esta variante se puede detectar bioquímicamente sólo mediante cromatografía líquida de

alta resolución (HPLC) y no por la electroforesis de hemoglobina.

**Discusión.** La Hb Raleigh es una variante poco frecuente de cadenas  $\beta$ , con una mutación en el primer codón y un cambio a nivel de aminoácidos de Val1.Ac-Ala. Este caso es reportado inicialmente como un valor muy alto de HbA1c y, finalmente, identificada como Hb Raleigh. Este hallazgo es importante por la interferencia con la determinación de Hb glicosilada y llama la atención a que los laboratorios clínicos dispongan de una metodología alterna al HPLC para confirmar valores extremadamente elevados de Hb glicosilada.

**Palabras clave:** hemoglobina Raleigh, hemoglobina glicosilada, hemoglobinas anormales, HbA1c

### ABSTRACT

**Hemoglobin Raleigh in Costa Rica detected as false high glycosylated hemoglobin levels**

**Introduction.** Abnormal hemoglobins (Hb) are a part of hereditary hemoglobin defects.

They cause significant Public Health problems in many countries. While some abnormal hemoglobins present clinical problems, the majority are innocuous. Often they are diagnosed by chance

**Autor para correspondencia:** Dr. Wálter E. Rodríguez-Romero, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: werodrigrom@yahoo.com

**Recibido:** el 18 de noviembre de 2011. **Aceptado para publicación:** el 7 de febrero de 2012

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb122314.pdf>

Rodríguez-Romero *et al.*

using highly specialized methods.

Hb Raleigh, a beta chain variant, has been reported to interfere with the detection of glycosylated hemoglobin HbA1c, giving falsely elevated values. This report describes the first findings of Hb Raleigh in Costa Rica, initially detected by abnormally high glycated Hb levels.

**Clinical case.** Adult Caucasian male without hematological manifestations: The subject was a known diabetic, with repeatedly elevated glycated Hb determinations, initially estimated by ionic interchange chromatography (Stambio). Definitive HbA1c levels were subsequently determined using HPLC based technology (Biorad D-10 HPLC) resulting in 30% elevated results for glycated hemoglobin. Biochemical and genetic analyses were also performed to determine the presence of Hb Raleigh. This variant can be detected biochemically only by high performance liquid chromatography (HPLC) and cannot be identified by hemoglobin electrophoresis.

**Discussion.** Hb Raleigh is an infrequent  $\beta$  chain variant, with a single mutation in codon 1 position, and a Val1.Ac-Ala change. This case was initially reported as an unusually high HbA1c level, and ultimately identified as Hb Raleigh. This finding is important because the positive interference with glycated hemoglobin determinations should draw attention to the need for clinical laboratories to have an alternative to HPLC methodology, when confirming extremely elevated glycated Hb values.

**Key words:** Raleigh Hemoglobin, glycated hemoglobin, abnormal hemoglobins, HbA1c

## INTRODUCCIÓN

Las hemoglobinas anormales forman parte de los trastornos hereditarios de la hemoglobina (Hb) y, por su frecuencia, son considerados en muchas regiones del mundo como problemas de Salud Pública (1,2). Dentro de las tres más importantes a nivel mundial, por su frecuencia y problemas clínicos, se reportan la Hb S ( $\alpha_2\beta_2$  glu-val), la Hb C ( $\alpha_2\beta_2$  glu-lis) y la HbE ( $\alpha_2\beta_2$  glu-lis). La Hb C es una variante típicamente africana, la

Hb E es un marcador de grupos orientales y la Hb S, aunque no es exclusiva, sí es muy sugestiva de grupos africanos. En el Continente Americano, la Hb S es la principal hemoglobinopatía, encontrándose hasta 8-10% de portadores en sujetos de ascendencia africana (1,3). Además de las citadas, hay una importante cantidad de hemoglobinas anormales con repercusiones clínicas, aunque una gran proporción son inocuas y muchas veces su diagnóstico se realiza en forma casual, mediante métodos de gran especialización (4-6).

La detección adecuada de una hemoglobinopatía incluye técnicas de electroforesis de Hb a distintos pH y medios de soporte (alcalino, ácido, neutro), isoelectroenfoque, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), determinación de 2,3 DPG, afinidad por el oxígeno, estudios genéticos y otros. Dependiendo de la mutación presente y de los cambios que ella produzca en la proteína, uno o varios de estos métodos pueden ser útiles para una determinada detección (1,7,8).

El uso de equipos basados en tecnología HPLC, para la cuantificación de Hb glicosilada (HbA1c), se ha difundido en diversas regiones de Latinoamérica; en Costa Rica, la mayor parte de los Hospitales y Clínicas del Sistema Nacional Público de Salud (Caja Costarricense del Seguro Social, CCSS) lo han implementado con éxito. Estos equipos, además de la determinación de la HbA1c, poseen alarmas para Hb S, Hb C y otras. Sin embargo, hay hemoglobinas poco frecuentes que migran en la región donde el equipo detecta la HbA1c y, por lo tanto, se reportan como Hb glicosilada (9-11). En el caso de las variantes de cadenas  $\beta$ , estos falsos positivos son más fáciles de detectar ya que, por la naturaleza de los genes de globina  $\beta$  ( $\beta/\beta$ ), se pueden alcanzar niveles cercanos al 40% de la variante. En las variantes alfa, al tener 4 genes, los porcentajes pueden ser mucho menores y, por lo tanto, pueden pasar inadvertidos (12-16). En el caso de la Hb Raleigh, esta variante de cadenas beta ha sido reportada por interferir con la detección de Hb glicosilada y dar valores falsamente elevados, muy por encima de los niveles usuales que presentan los pacientes diabéticos. En

este reporte se publica el hallazgo de la Hb Raleigh en Costa Rica, detectada inicialmente con un valor extremadamente alto de Hb glicosilada (5,10,14).

### CASO

Paciente masculino caucásico de 40 años, sin manifestaciones hematológicas, sin conocimiento del origen de sus familiares. El sujeto (MA) era un diabético conocido, con determinaciones de hemoglobina glicosilada (HbA1c), cuantificadas inicialmente por un método de cromatografía de resina de intercambio iónico (Stambio). Se cambió la metodología de detección de HbA1c para utilizar el equipo de BioRad D-10 HPLC y se detectaron niveles muy elevados (comparado con los reportados anteriormente en el historial clínico del paciente), que el equipo indicaba como Hb glicosilada; estos valores oscilaban entre 30 y 40%. Estas pruebas iniciales fueron realizadas en el Laboratorio Clínico de la Clínica Dr. Jorge Volio, Área de Salud Belén-Flores (CCSS), Heredia, Costa Rica. La muestra es referida al CIHATA, para evaluación por hemoglobinopatías, donde se practicó un estudio completo por electroforesis a pH alcalino, pH neutro y pH ácido. Además, se procedió a analizar la muestra por HPLC (Perkin Elmer) y se obtuvieron valores cercanos al 50%. La cuantificación de fracciones se realizó por HPLC (Perkin Elmer) y se reconfirmaron por el método de desnaturalización alcalina de Singer para Hb Fetal y de electroforesis-elución para Hb A2 (8).

Se solicitó estudio familiar, que abarcó a dos hijas (RA y AA), y se detectó la misma concentración de Hb en una de las hijas. Ante la sospecha de una posible variante de Hb, se extrajo el ADN mediante la técnica de la desalinización. Luego de unos estudios genéticos iniciales, la muestra fue referida a Boston University, School of Medicine, para su caracterización final, por métodos cromatográficos (BioRad Variant II HPLC) y genéticos. Se realizó la secuenciación directa del gene de  $\beta$  globina y se estudiaron las mutaciones a tal tipo (-3.7 y -4.2 kb).

### RESULTADOS

Los estudios electroforéticos en acetato de celulosa a pH alcalino, pH neutro y en gel de agar ácido mostraron un patrón catalogado como normal (Hb A) (Figura 1). Los valores de Hb A2 y Fetal fueron normales para el propósito (2.9% y 0.2%, respectivamente). El reporte inicial del cromatograma del HPLC mostró un pico de Hb A en 43.2 % y de la variante de hemoglobina en 44.4%, sugestivos de una variante de cadenas  $\beta$

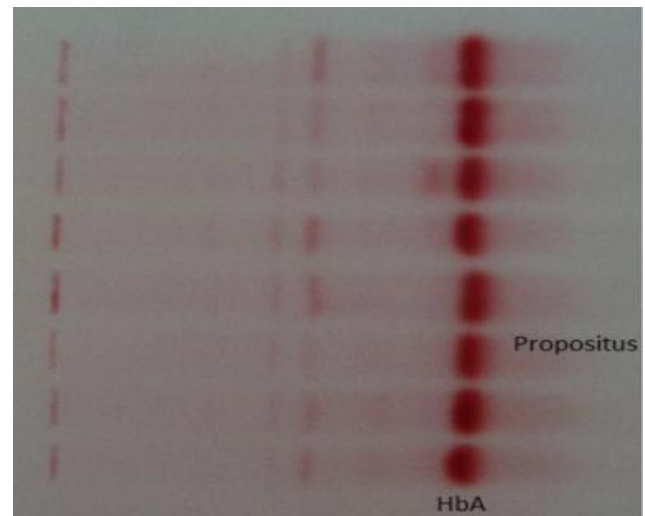


Figura 1. Electroforesis en acetato de celulosa a pH alcalino

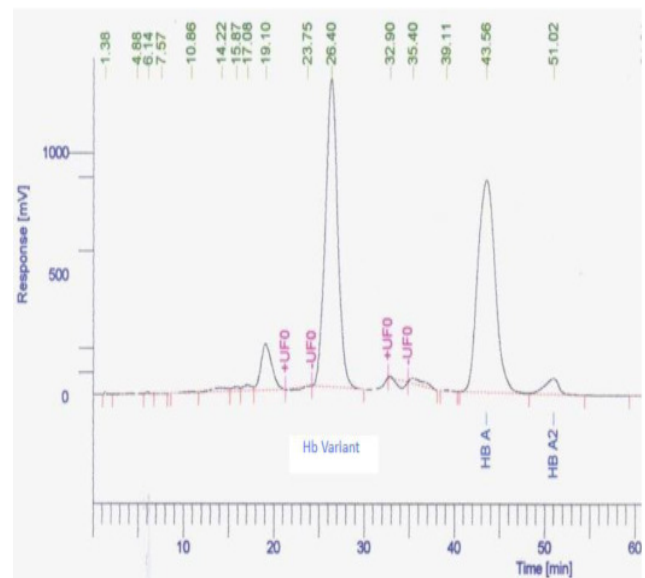


Figura 2. Detección de Hb Raleigh por HPLC de intercambio iónico

**Cuadro 1**  
Resumen de los hallazgos de la familia con Hb Raleigh

	Propositus	Hija(RA)	Hija(AA)
Edad	63	38	36
Hb (g/dl)	14.9	13.2	12.0
VCM (fl)	86	83	82
HbA%	43.2	96	47
Variante	53.2	---	47.9
HbA <sub>2</sub> %	2.9	2.9	3.4
HbF%	0.2	0.4	---

(Figura 2) y que en cuantificaciones posteriores de esta fracción se determinó finalmente en 53.2%. Hallazgos similares se encontraron en una de las hijas (AA) (Cuadro 1). Otros hallazgos generales del hemograma fueron: leucocitos 9000/ul, con un diferencial normal, y eritrocitos en 5040000/ul.

Los estudios moleculares detectaron la mutación en el codón 1 del gene de  $\beta$  globina (GTG>GCG), que a nivel proteico induce un cambio de aminoácidos de Val1.Ac-Ala, identificándose la variante como la Hb Raleigh. No se detectaron otras alteraciones a nivel de los genes de alfa globina ni otras alteraciones adicionales en el gene  $\beta$ . Los estudios moleculares no determinaron las mutaciones de -3.7 kb y -4.2 kb de los genes de alfa globina. Además, se realizó secuenciación de los genes  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  para descartar mutaciones no de delección.

## DISCUSIÓN

La determinación de Hemoglobinas anormales no es sencilla. Las variantes usuales como la Hb S o la Hb C se diagnostican fácilmente mediante diversas técnicas, como la electroforesis de Hb. Sin embargo, hay variantes de Hb que no son detectadas por electroforesis de Hb, o por isoelectroenfoque, pero sí lo son por HPLC. Por el contrario, también hay variantes que son visualizadas mejor en la electroforesis de Hb. Por lo tanto, lo recomendable es tener, al menos, dos metodologías diferentes que se puedan complementar (7,8).

De la gran cantidad de variantes de Hb des-

critas, la mayoría corresponden a mutaciones puntuales de una simple base. Ejemplos de éstas son las clásicas Hb S y C, pero se añaden a esta lista otras poco frecuentes, como la Hb J-Cubujuquí, Hb Costa Rica, M Boston y otras. Otras hemoglobinas raras tienen doble mutación, como es el caso de la C Harlem y la S-Travis (1,5). La Hb Raleigh se incluye, por tanto, entre aquellas variantes poco frecuentes, que se originan de una mutación puntual, en este caso en el codón 1 del gene de  $\beta$  globina (GTG>GCG), con un correspondiente cambio de aminoácidos de Val1.Ac-Ala (9,10,14, 17). Esta Hb presenta una afinidad disminuida por el oxígeno y se ha asociado con grupos caucásicos. En el caso presente, el sujeto y su familia indican no conocer el origen de sus ancestros (5).

Variantes de Hb como la Hb S o la Hb C se catalogan como hemoglobinas con agregación alterada o insolubles. Otras se caracterizan por una síntesis desbalanceada (talasemias) o por ser inestables (Hb Zürich). Un grupo además se caracteriza por tener una función anormal del grupo heme (Hb Cheesepeake) y otras presentan algún grado de afinidad variable por el oxígeno (1,3,5).

Afortunadamente, el grupo principal de trastornos de la hemoglobina no presenta alteraciones fisiológicas relevantes y su importancia es a nivel bioquímico, genético y antropológico. En este grupo se incluyen, entre muchas otras, a la Hb Costa Rica y la Hb Raleigh. La Hb Raleigh ha sido reportada en algunas partes del mundo, siempre ligada a grupos caucásicos y asociada con valores falsamente elevados de Hb glicosilada. En el caso indicado, se cumple con el mismo patrón (5,9,17).

La Hb glicosilada está compuesta por cuatro pequeños componentes, siendo la más estudiada la HbA<sub>1c</sub>. Su detección es de una gran utilidad en el seguimiento del paciente con diabetes mellitus, por ser un marcador bioquímico que permite evaluar los niveles de glucosa en un tiempo relativamente largo. Por lo tanto, el monitoreo de este parámetro es esencial para evaluar el tratamiento y es de gran utilidad para detectar a diabéticos crónicamente descompensados (18-20).

## Hemoglobina Raleigh en Costa Rica

La glicosilación de proteínas es un fenómeno post-traducciona. Este proceso incluye la formación de una base de Schiff entre la glucosa y el grupo amino de la valina terminal de la cadena  $\beta$ , y luego se produce el arreglo de Amadori con la formación de una cetoamina más estable. Esta reacción es lenta, pero irreversible, y depende de la concentración de la glucosa intraeritrocitaria y, por tanto, de los niveles de la glucosa sérica. Además de la hemoglobina, proteínas como la albúmina pueden glicosilarse (19,21-23).

Se han utilizado diversas metodologías de laboratorio para su detección, como métodos colorimétricos que miden todas las hexosas unidas a la hemoglobina. Además, se han empleado con buen éxito técnicas de microcromatografía en resina de intercambio iónico. En los últimos años, se ha automatizado la determinación mediante equipos que se fundamentan en tecnología tipo HPLC y es excelente para la detección de la Hb glicosilada (12,20,22); sin embargo, hay un pequeño grupo de variantes poco frecuentes de la hemoglobina que causan interferencia en la determinación y son detectadas como si fueran Hb glicosilada. El caso de la Hb Raleigh es el más documentado. Otras variantes de la hemoglobina que se han reportado produciendo valores falsamente elevados de HbA1c son Hb Sherwood Forrest, Hb South Florida, Hb Hope y Hb Camperdown. Es necesario señalar que, en el caso de las hemoglobinas anormales de cadenas beta, lo usual es que las formas heterocigotas se reporten con valores superiores al 40%. En las variantes de cadenas alfa, al heredarse cuatro posibles genes, estos niveles son variables y usualmente inferiores, lo que complica su diferenciación con la Hb glicosilada por HPLC (10, 11,13-16).

A pesar que son diseñados para la determinación de la Hb glicosilada, los basados en la tecnología HPLC poseen alarmas especiales para Hb S o C y Hb fetal. Sin embargo, la presencia de otras variantes de hemoglobina supera la capacidad de detección y alarma de estos equipos, siendo necesario estudios especializados (6,13).

Se reporta, en este caso, la identificación

de la variante de cadenas beta (Hb Raleigh) como un valor extremadamente elevado de HbA1c, y se orienta a prestarle atención a los hallazgos similares en otras regiones de América Latina. Se resalta la importancia de que los laboratorios clínicos puedan disponer de algún método alternativo, que les permita discriminar en aquellos casos similares al descrito, y que pueden estar reportando valores de Hb glicosilada falsamente elevados.

### REFERENCIAS

1. Sáenz GF, Rodríguez WE. Las Hemoglobinas Anormales. En: Sáenz GF, Rodríguez WE, Jiménez R, Salazar L, Valverde B, editores. Hematología Analítica. 5ª ed. San José: EDNASSS; 2008. p 195-3.
2. Stuart MJ, Nagel RL. Sick cell disease. Lancet 2004; 364: 1343-360.
3. Sáenz GF, Granado A, Valverde K. Hemoglobinopatía Clínica. En: Sáenz GF, Rodríguez WE, Jiménez R, Salazar L, Valverde B, editores. Hematología Analítica. 5ª ed. San José: EDNASSS; 2008. p 205-19.
4. Sáenz GF, Rodríguez WE, Chaves MA, Variantes estructurales de la Hemoglobina en Iberoamérica. Rev Biol Trop 1993; 41: 393-8
5. Patrinos, G.P., B. Giardine, C. Riemer, W. Miller, D.H.K. Chui, N.P. Anagnou *et al.* Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. Nucl Acids Res. 32; 537-41. URL: <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>
6. Thomas LB, Agosti SJ, Man MA, Mastorides SM. Screening for hemoglobinopathies during routine hemoglobin A1c testing using the Tosoh G7 Glycohemoglobin Analyzer. Ann Clin Lab Sci 2007; 3:251-5.
7. Kutlar A, Huisman THJ. The detection of Hemoglobinopathies; techniques and diagnostic. Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual. New York: J. Wiley and Sons; 1991.
8. Sáenz GF, Rodríguez WE. Estudios de la hemoglobina por electroforesis y HPLC. En: Sáenz GF, Rodríguez WE, Jiménez R, Salazar L, Valverde B, editores. Hematología Analítica. 5ª ed. San José: EDNASSS; 2008. p 649-61.
9. Moo-Penn WF, Bechtel KC, Schmidt RM, Johnson MH, Jue DL, Schmidt DE Jr *et al.* Hemoglobin Raleigh (beta1 valine replaced by acetylalanine). Structural and functional characterization. Biochemistry 1977; 22: 4872-9.
10. Landin B, Jeppsson JO. Rare beta chain hemoglobin variants found in Swedish patients during HBA1c analysis. Hemoglobin 1993; 4: 303-18.
11. Behan KJ, Storey NM, Lee HK. Reporting variant he-

**Rodríguez-Romero et al.**

- moglobins discovered during hemoglobin A1c analysis. *Clin Chim Acta* 2009; 406: 124-30.
12. **Aldasouqi S, Solomon D, Bokhari S, Khan P, Muneera S, Gossain V.** Glycohemoglobin A1c; a promising screening tool in gestational diabetes mellitus. *Int J Diabetes Dev Ctries* 2008; 28: 121-4.
  13. **Hertel JK, Johansson S, Raeder H, Platou CG, Midthjell K, Molven A, et al.** Evaluation of four novel genetic variants affecting hemoglobin A1c levels in a population based type 2 diabetes cohort. *BMC Med Genet* 2011; 12: 20-5.
  14. **Rai DK, Landin B, Griffiths WJ, Alvelius G.** Identification of N-terminal acetylation in Hb Raleigh (beta1Val-->Ac-Ala) by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 18: 1793-6.
  15. **Castelly, R, Tempesta, A, Bianchi, A., Porro, T, Ivaldi, G., Capellini, MD.** Unreliable estimation of HbA1c due to the presence of Camperdown haemoglobin (beta 104 (G6) Arg-Ser). *Diabet Med* 2004; 21: 377-9.
  16. **King, ME, Rifai, N, Malekpour, A.** Hemoglobin Hope interferes with measurement of glycated hemoglobin by ion exchange chromatography and electrophoresis. *Clin Chem* 1984; 30: 1106-7.
  17. **Chen D, Crimmins DL, Hsu FF, Lindberg FP, Scott MG.** Hemoglobin Raleigh as the cause of a falsely increased hemoglobin A1C in an automated ion-exchange HPLC method. *Clin Chem* 1998; 6: 1296-301.
  18. **Flückinger R, Winterhalter, KH.** In vitro synthesis of hemoglobin A1c. *FEBS Let* 1976; 72: 356-60
  19. **Bunn HF, Gabbay KM, Gallop PM.** The glycosilation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science* 1978; 200: 21-5
  20. **Rahbar, S.** Glycosilated hemoglobins. En: **Schneider, RG.** University of Texas Medical Branch, Galveston. Editorial Texas Reports on Biology Medicine; 1981. Vol 40: 373-96.
  21. **Sáenz GF.** Las Hemoglobinas Glicosiladas. En: Sáenz GF, Chaves, MA, Rodríguez WE, Barrantes, A, Orlich, J. editores. *Hematología Analítica*. 3a. ed. San José: EDNASSS; 1995. P.389-97.
  22. **John WG, Mosca A, Weykamp C, Goodall I.** HbA1c standardization: history, science and politics. *Clin Biochem Rev* 2007; 28: 163-8.
  23. **Dreschsler C, Krane V, Ritz E, März W, Wanner C.** Glycemic control and cardiovascular events in diabetic hemodialysis patient. *Circulation* 2009; 120: 2421-8.