

Cuantificación de Hemoglobina S en Catlab

Justificación de la técnica

Recientemente se ha solicitado la cuantificación de la Hemoglobina S (HbS) para seguimiento de pacientes con drepanocitosis transfundidos (en el contexto de prevención de fenómenos vasculares cerebrales). Se ha validado la técnica y se ha introducido en el catálogo de Catlab.

Introducción

La hemoglobina S es una variante de cadenas beta de la globina (sustitución de ácido glutámico por valina en la posición 6). Este cambio altera sus características físico-químicas lo que conlleva una polimerización de las cadenas de hemoglobina en situaciones especiales. La hemoglobinopatía S es una patología hereditaria y clínicamente puede presentarse en forma heterocigota y homocigota, así como combinada con otras mutaciones. Presenta amplia distribución geográfica con predominio en el África subsahariana.

Clínicamente la forma homocigota (denominada **anemia de células falciformes o drepanocitosis**) es la más grave, presentando complicaciones potencialmente fatales como crisis vasooclusivas, secuestro esplénico, síndrome torácico agudo e incluso accidentes cerebrovasculares.

Como tratamiento de estas complicaciones los pacientes precisan transfusiones con frecuencia, incluso de modo profiláctico, para mantener el porcentaje de Hb S bajo, en torno al 25%, e impedir estos fenómenos de polimerización. En un paciente heterocigoto el porcentaje de HbS oscila entre un 30-45% y en un paciente homocigoto puede llegar al 95% (Guía de práctica clínica sobre enfermedad de células falciformes pediátricas, de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas, SEHOP, 2010).

Por ello es importante cuantificar, en un paciente con HbSS conocida, el porcentaje de esta hemoglobina anómala con respecto a su hemoglobina total.

Motivos de solicitud:

El objetivo de realizar esta determinación, por tanto, es:

- Cuantificar el porcentaje de hemoglobina S en un paciente afecto de drepanocitosis para seguimiento de terapia hipertransfusional.
- Secundariamente también se puede utilizar para detectar o descartar la presencia de HbS en un paciente sospechoso de portador de HbS
- Para estudio familiar (consejo genético) de gestantes o cuando en una pareja un progenitor es portador de betatalasemia, se recomienda estudio de hemoglobinopatía aunque el hemograma sea normal, ya que un portador de HbS puede no tener alteraciones en el hemograma, y un doble heterocigoto HbS/betatalasemia puede presentar un cuadro grave.

Catlab Informa

Técnicas analíticas

Muestra: sangre total anticoagulada con EDTA.

La Hemoglobina S, en nuestro laboratorio, se puede cuantificar por dos métodos principales: HPLC y electroforesis. Los analizadores HPLC son un D-100 y un D-10 de Bio-Rad Laboratories SA. El analizador de electroforesis es el Hydrasis de Sebia.

En los equipos D-100 y D-10 se detecta y cuantifica un pico de HbS en aquellos pacientes portadores o afectados de Hemoglobinopatía S.

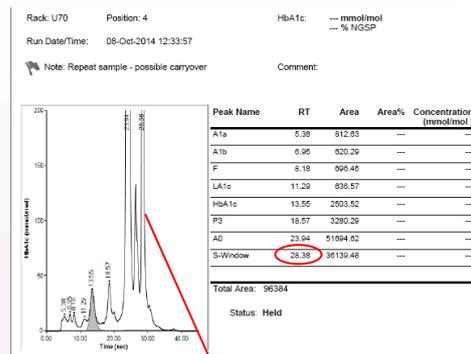
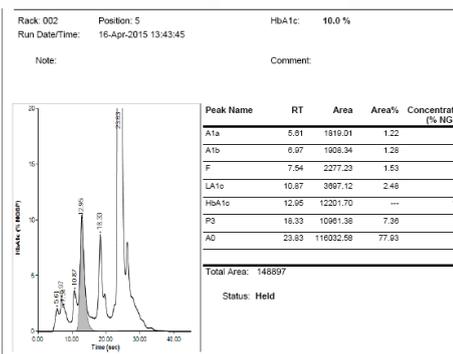
En el analizador D-100 el tiempo de elución es de 45 segundos, es el equipo que analiza las HbA1c, se procesan muestras todos los días. En el analizador D-10 en modo talasemia el tiempo de elución es de 6 minutos, analiza HbA2 y F, y se procesan muestras una vez por semana.

Ejemplo de gráficos obtenidos

NORMAL

HbS

D-100



Hemoglobina S

D-10

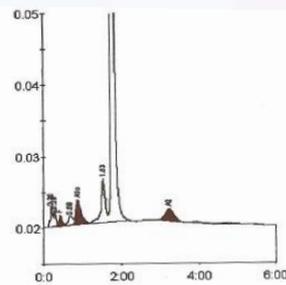


Tabla de identificación de picos: 4544816771

| Pico | Tª retención | Altura | Area | % Area |
|------|--------------|--------|--------|--------|
| A1a | 0.20 | 2928 | 12683 | 1.2 |
| A1b | 0.28 | 2322 | 7234 | 0.7 |
| F | 0.42 | 1464 | 8916 | <0.8* |
| LA1c | 0.68 | 1245 | 10934 | 1.1 |
| A1c | 0.88 | 3451 | 34076 | 5.0 |
| P3 | 1.53 | 8209 | 44750 | 4.3 |
| A0 | 1.75 | 211992 | 887808 | 86.1 |
| A2 | 3.23 | 1630 | 25003 | 3.3 |

Area total: 1031293

| Concentración | % |
|---------------|-------|
| F | <0.8* |
| A1c | 5.0 |
| A2 | 3.3 |

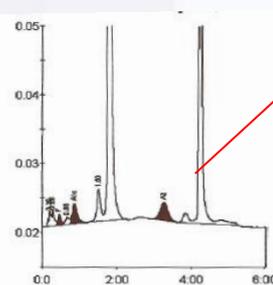


Tabla de identificación de picos: 4527472866

| Pico | Tª retención | Altura | Area | % Area |
|----------|--------------|--------|--------|--------|
| A1a | 0.20 | 2215 | 11007 | 0.8 |
| A1b | 0.28 | 2321 | 9591 | 0.7 |
| F | 0.46 | 1621 | 8615 | <0.8* |
| LA1c | 0.68 | 1048 | 8177 | 0.6 |
| A1c | 0.86 | 2985 | 27459 | 4.7 |
| P3 | 1.50 | 4754 | 34548 | 2.7 |
| A0 | 1.78 | 150123 | 748030 | 57.8 |
| A2 | 3.27 | 2864 | 38936 | 3.9 |
| S-Window | 4.24 | 91387 | 413698 | 91.8 |

Area total: 1300512

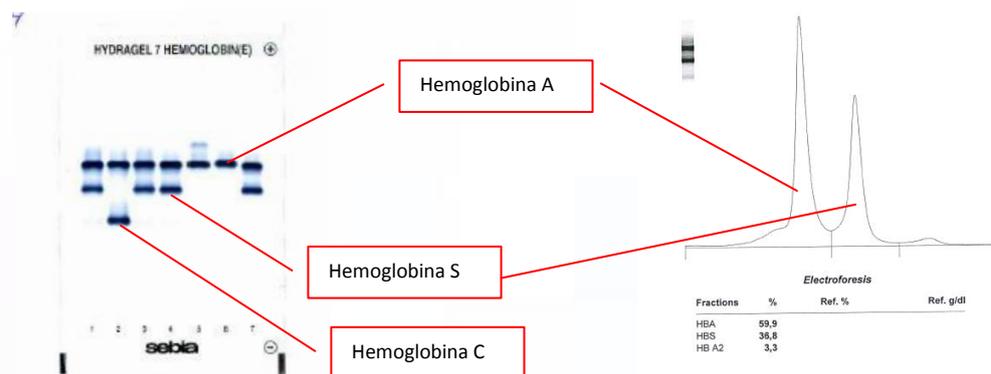
| Concentración | % |
|---------------|-------|
| F | <0.8* |
| A1c | 4.7 |
| A2 | 3.9 |

Catlab Informa

En el analizador D-10, el control de calidad para el nivel alto de HbA2, presenta un pico de HbS que permite el control de la técnica.

La electroforesis alcalina se realiza en series de 7 muestras, una vez que por HPLC se ha detectado un pico sospechoso de hemoglobina variante. Para la identificación de una hemoglobina variante se han de emplear al menos 2 técnicas.

El tiempo de procesado y análisis es de 4 horas y se realiza la técnica con periodicidad quincenal (en general cuando hemos alcanzado el número de 7 muestras para optimizar la técnica)



Para la validación del método, se han estudiado:

- Imprecisión: comprobación de que los resultados de los controles coinciden con los valores asignados y no superan la especificación de calidad establecida.
- Pruebas de Comparación entre equipos: se ha verificado, mediante repeticiones de muestras, la intercambiabilidad de los resultados entre los equipos.

Estudio de Imprecisión

Se han avalado los resultados de imprecisión de los dos equipos de HPLC, repitiendo 20 veces el control alto y una muestra de paciente.

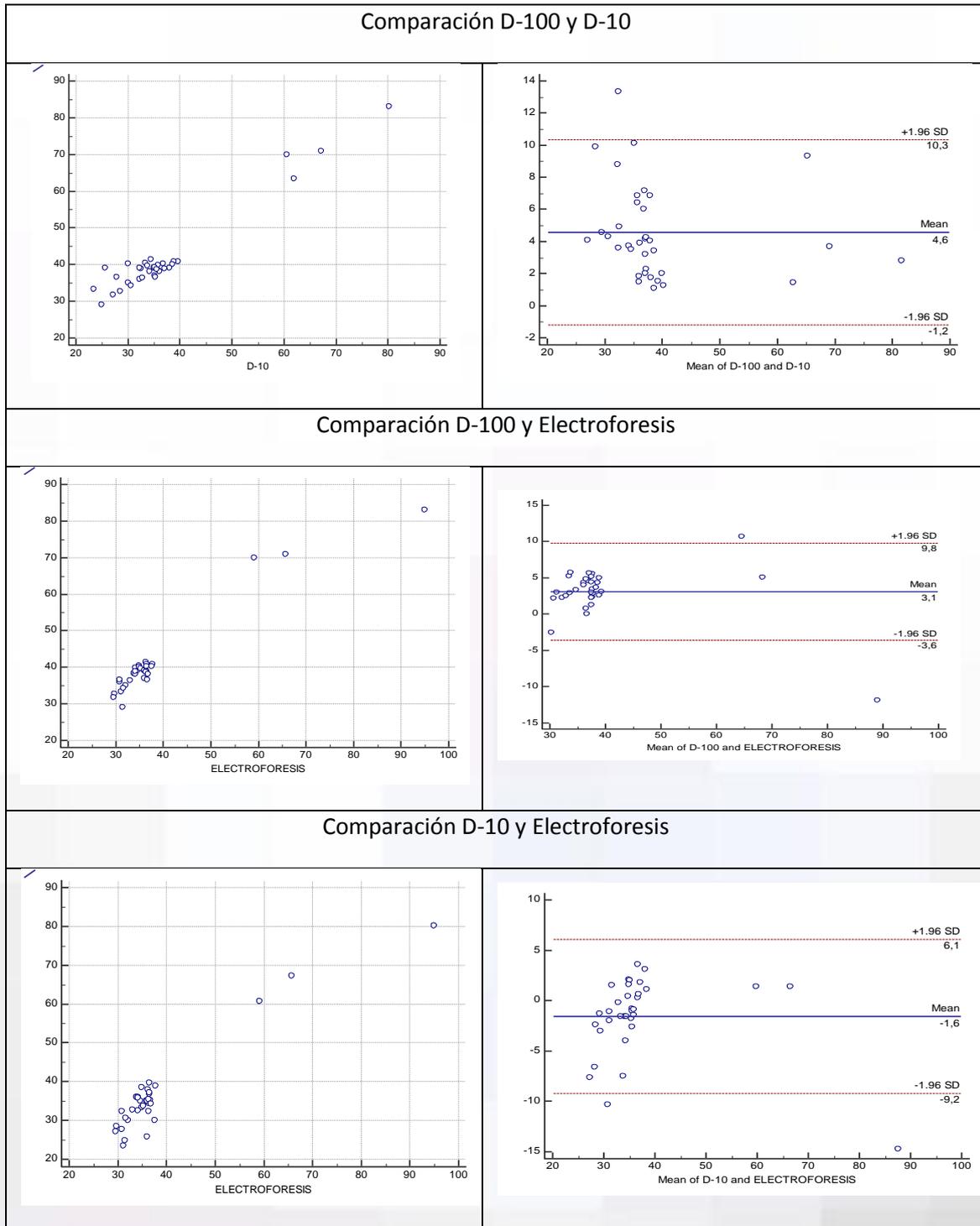
| Control H | D-10 | D-100 |
|----------------|-------------|--------------|
| MEDIA | 28,08 | 31,74 |
| DS | 0,56 | 0,43 |
| CV | 1,98 | 1,34 |
| MUESTRA | D-10 | D-100 |
| MEDIA | 63,21 | 64,85 |
| DS | 0,72 | 0,84 |
| CV | 1,14 | 1,29 |

Catlab Informa

Los valores de imprecisión son muy buenos y cumplen la especificación de calidad analítica definida por nuestro laboratorio para la hemoglobina S: $CV < 2.6\%$ (ACCLC).

Comparación entre equipos

Se han comparado los resultados de 34 muestras analizadas por los tres equipos. Los resultados han sido los siguientes (gráficos de Bland and Altman, especificaciones basadas en error total):



Catlab Informa

Como se puede observar en los gráficos, prácticamente el 95% de los datos se encuentra dentro de los rangos de aceptación de 2 desviaciones estándar.

Tras el estudio comparativo entre los tres analizadores se detectó que el analizador D-100 daba unos valores superiores (media de 2,5-3) a los obtenidos por electroforesis y por el analizador D-10. En el estudio de imprecisión los dos métodos por HPLC presentaron coeficientes de variación inferiores al 2%.

Establecimiento de la sistemática de rutina.

Tras el análisis de los datos de la validación del método, se decide la siguiente sistemática:

- Valoración de resultado:
 - Si interesa conocer la cantidad de HbS en un paciente sometido a régimen de hipertransfusión (resultado esperado en torno al 25%) se efectuará su análisis por el analizador D-10 de Bio-Rad.
 - Para resultados superiores al 35%, sería válido el resultado por cualquiera de los analizadores
 - Si la determinación se solicita como despistaje de hemoglobinopatía (S o C), para detectar estado de portador, el análisis se puede realizar por cualquiera de los analizadores. Si el resultado es negativo se finalizará el estudio, si se detecta un pico de Hb variante se completará el estudio por electroforesis.

- Introducción de resultados y validación:

Los resultados, después de revisar las gráficas, los introducirá y validará de forma manual el facultativo de hematología. En el comentario técnico o campo "detalle" se introducirá el analizador por el que se ha hecho la determinación.

Teresa Villalba

Responsable Hematología

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35038 / 660.67.63.01

tvillalba@catlab.cat

www.catlab.cat