

INFORMES GRÁFICOS DE ESTUDIOS DE HEMOGLOBINOPATÍAS

Desde este mes de Enero podréis ver que en los estudios de hemoglobinopatías (hemoglobinas A2 y F, electroforesis), además de proporcionar el porcentaje de hemoglobina variante como resultado numérico, adjuntaremos un informe gráfico, con los cromatogramas obtenidos por HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia) en los analizadores D-100 y D-10, y la imagen escaneada de la placa de electroforesis alcalina si se ha efectuado esta técnica.

El objetivo es proporcionar mayor detalle al resultado, ya que en muchos casos este es más bien “cualitativo” que cuantitativo, y facilitar una interpretación de resultados, sin necesidad de buscar en archivos históricos en papel, cuando nos consultáis telefónicamente alguna duda.

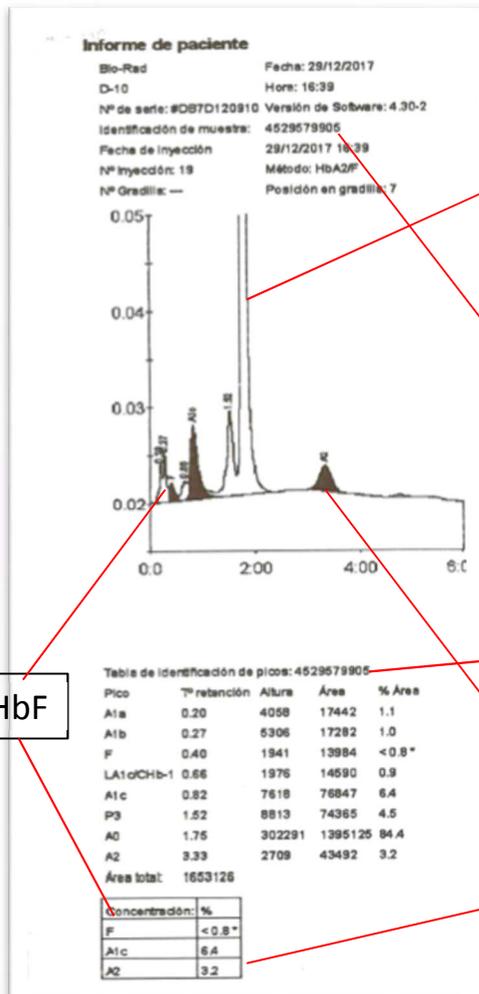
Os recuerdo la revisión de las distintas alteraciones de la Hemoglobina que elaboró mi compañero Jorge Medina, hematólogo de este área del laboratorio, y que podéis encontrar en la web www.catlab.cat en la sección “Catlab informa”, boletín nº66 de Enero de 2016. Adjunto el enlace que podéis copiar en la barra del navegador: http://www.catlab.cat/uploads/20160122/CI_66_Hemoglobinopatias.pdf

Algunos conceptos:

- HPLC, cromatografía líquida de alta eficiencia. Método de separación de proteínas, hemoglobinas en este caso, que se basa en la hemólisis de la muestra, separación de sus distintos componentes en una columna de resinas de intercambio iónico, y elución (liberación) de estas fracciones mediante agentes eluyentes inyectados a presiones determinadas.
- Cromatograma: gráfico obtenido tras la cuantificación de estos componentes. El valor obtenido es proporcional al área bajo la curva de cada fracción de hemoglobinas.
- Tiempo de retención: es el tiempo en segundos en el que una determinada fracción de hemoglobinas eluye (se libera) y puede ser cuantificada.
- Pico: cada una de las fracciones obtenidas por HPLC.
- Electroforesis alcalina: método de separación de proteínas que se basa en la diferente movilidad de las distintas fracciones de hemoglobinas (hemolizado de la muestra original) sometidas a un gradiente eléctrico en un medio con pH alcalino.
- Banda: cada una de las fracciones identificadas por electroforesis.
- D-100: analizador D-100 de Bio Rad diagnostics. Diseñado para el análisis de hemoglobina glicosilada. Tiempo de elución (procesado) de una muestra: 45 segundos. Es capaz de detectar hemoglobinas C, S, Fetal, D, E. En ocasiones la hemoglobina variante la detectamos por la presencia de picos “desconocidos” o por un pico P3 superior al 10%. Si en el análisis de HA1c se detecta la presencia de un pico sospechoso

Catlab Informa

CROMATOGRAMA D-10 NORMAL



HbAo

Número de petición

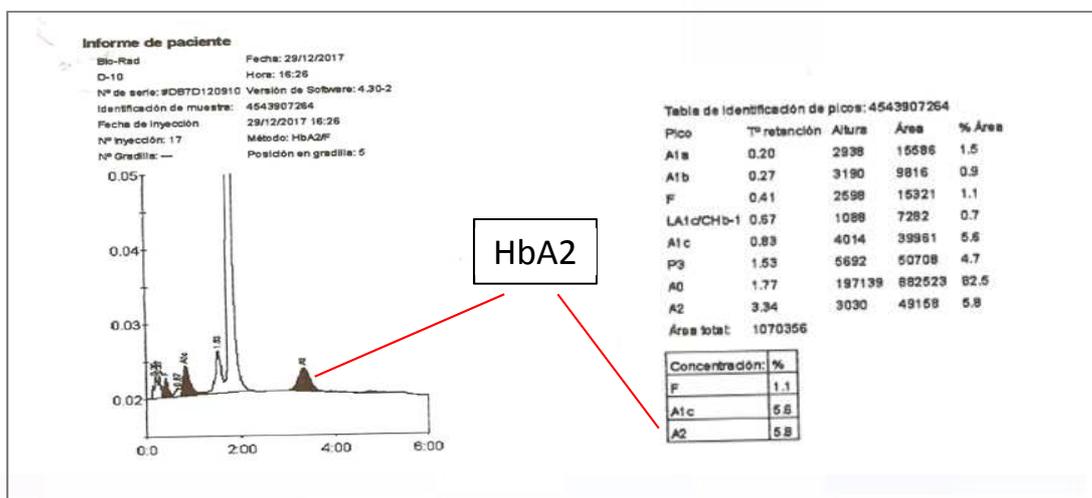
HbF

HbA2

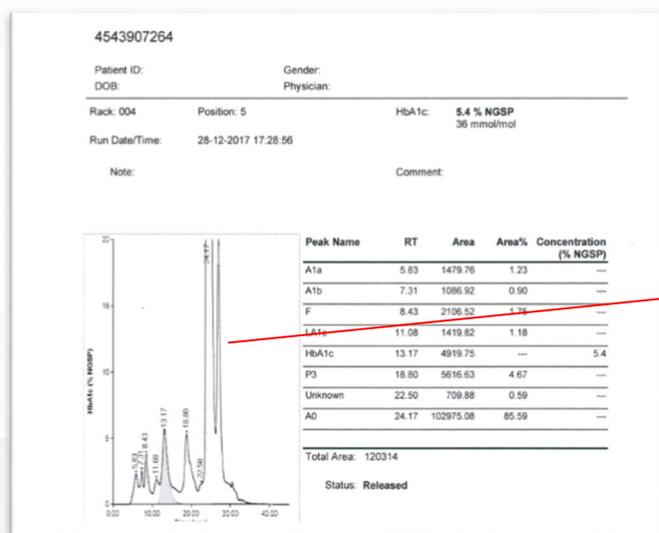
En ocasiones el analizador no llega a cuantificar el pico de HbF y en estos casos introducimos de forma manual un valor <0.7

Catlab Informa

Beta talasemia menor encontraremos en el analizador D-10 un aumento de HbA2 (superior al 4%) con HbF normal o ligeramente elevada y sin otros picos variantes. Valores de 3.5-4% son borderline y se incluye comentario.



El analizador D-100 no cuantifica HbA2.



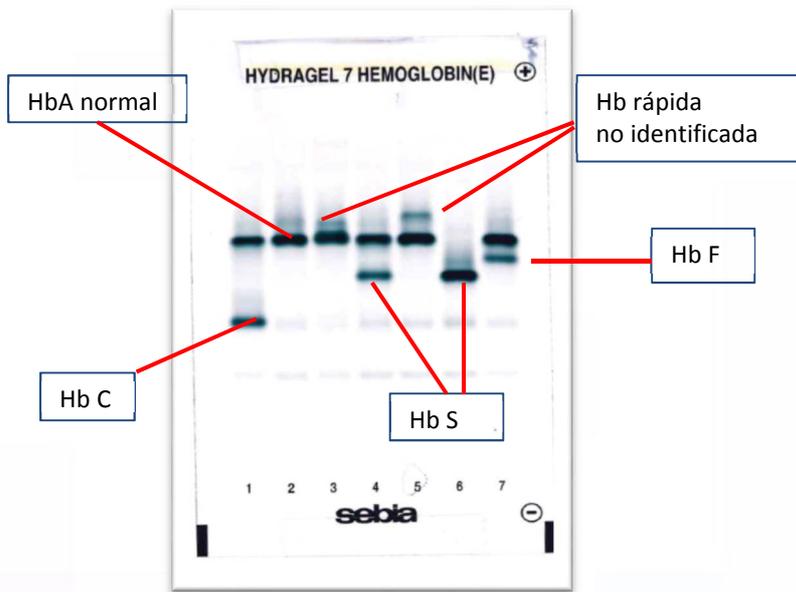
HbA2: incluida dentro del pico de HbA0, no cuantificada

DETECCIÓN DE PICOS DE HEMOGLOBINAS VARIANTES:

En ocasiones durante el análisis de la HbA1c para el control de diabetes y en algunos casos en pacientes a los que se les solicita estudio de hemoglobinopatías, se detectan picos de hemoglobinas variantes. El protocolo que se sigue en estos casos es analizarlos por los dos equipos de HPLC disponibles y posteriormente realizar electroforesis alcalina.

La **electroforesis alcalina** la realizamos en placas con capacidad para 7 muestras. Periodicidad quincenal. Un ejemplo de placa de electroforesis es el siguiente:

Catlab Informa

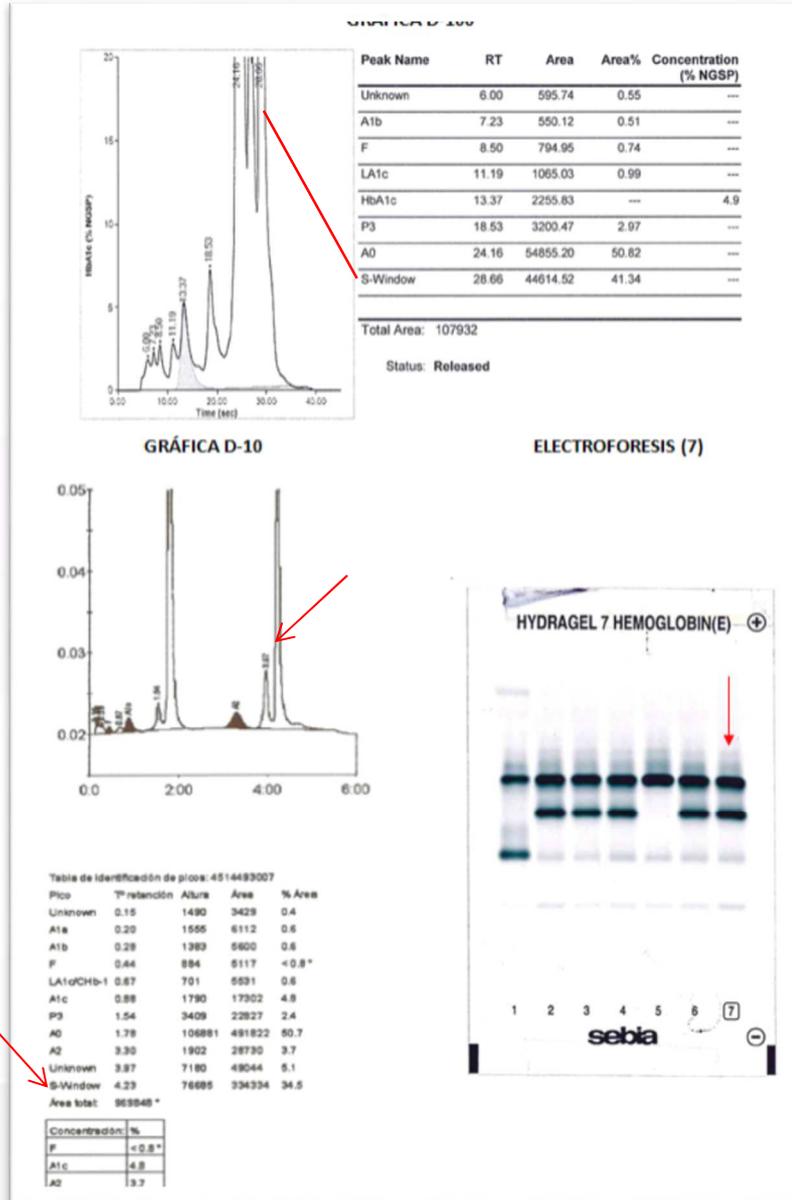


Si solo se presenta una banda de Hemoglobina A diremos que no se detectan bandas anómalas. Si aparece una banda en la región de la HbA y otra en región de HbC, HbS... diremos que es una hemoglobina S o C heterocigota. Si, como en la calle 6, solo se aprecia la banda de HbS diremos que se trata de una HbS homocigota. La hemoglobina Fetal es la predominante en la etapa prenatal, encontrando porcentajes relevantes hasta el año de edad.

Catlab Informa

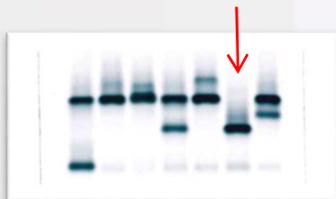
EJEMPLOS:

HbS heterozigota



Presencia de picos de Hb variante por HPLC y banda variante por electrofóresis.

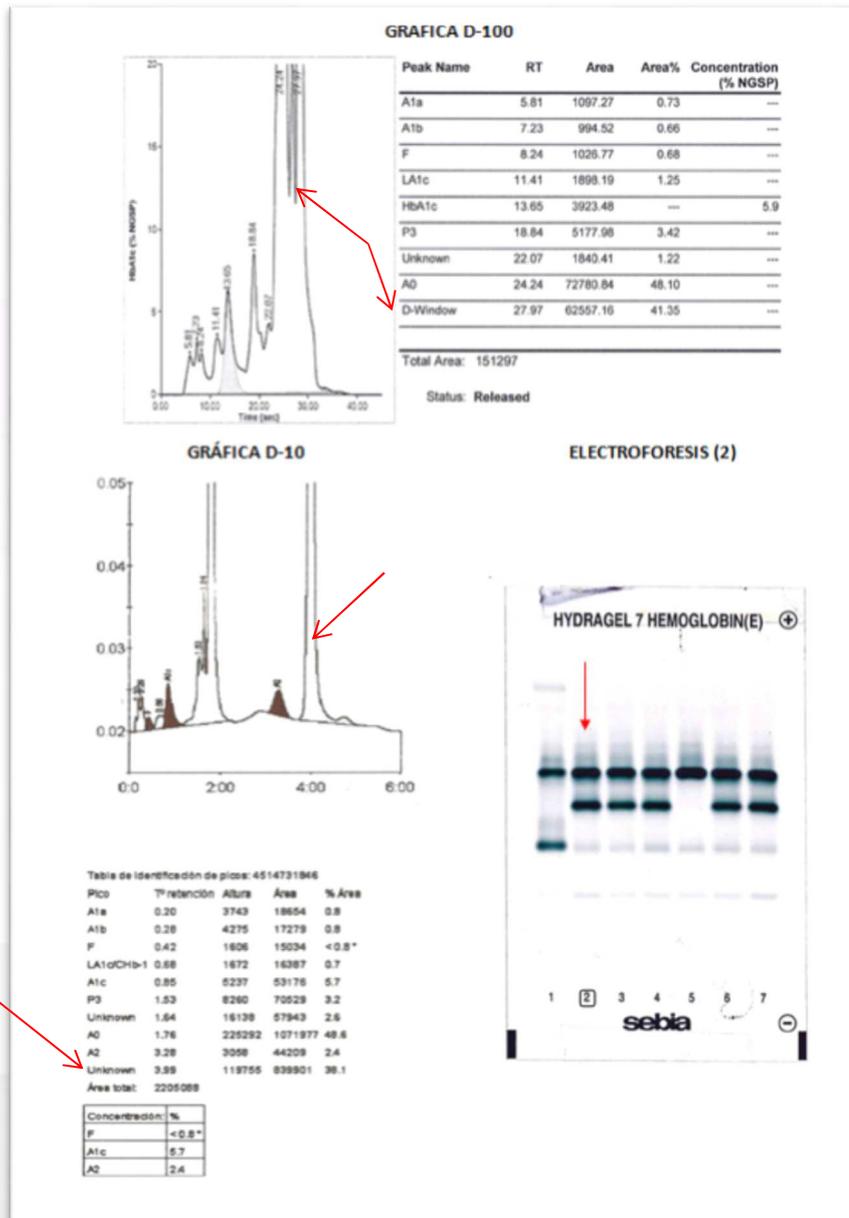
En HbS homocigota: ausencia de HbA, solo banda de HbS



Catlab Informa

Si se solicita cuantificación de HbS se informa el resultado del analizador D-10 (más preciso). Si HbS < 30% se sospecha asociación con alfa talasemia. Se recomienda estudio familiar y consejo genético si procede.

HbD heterocigota

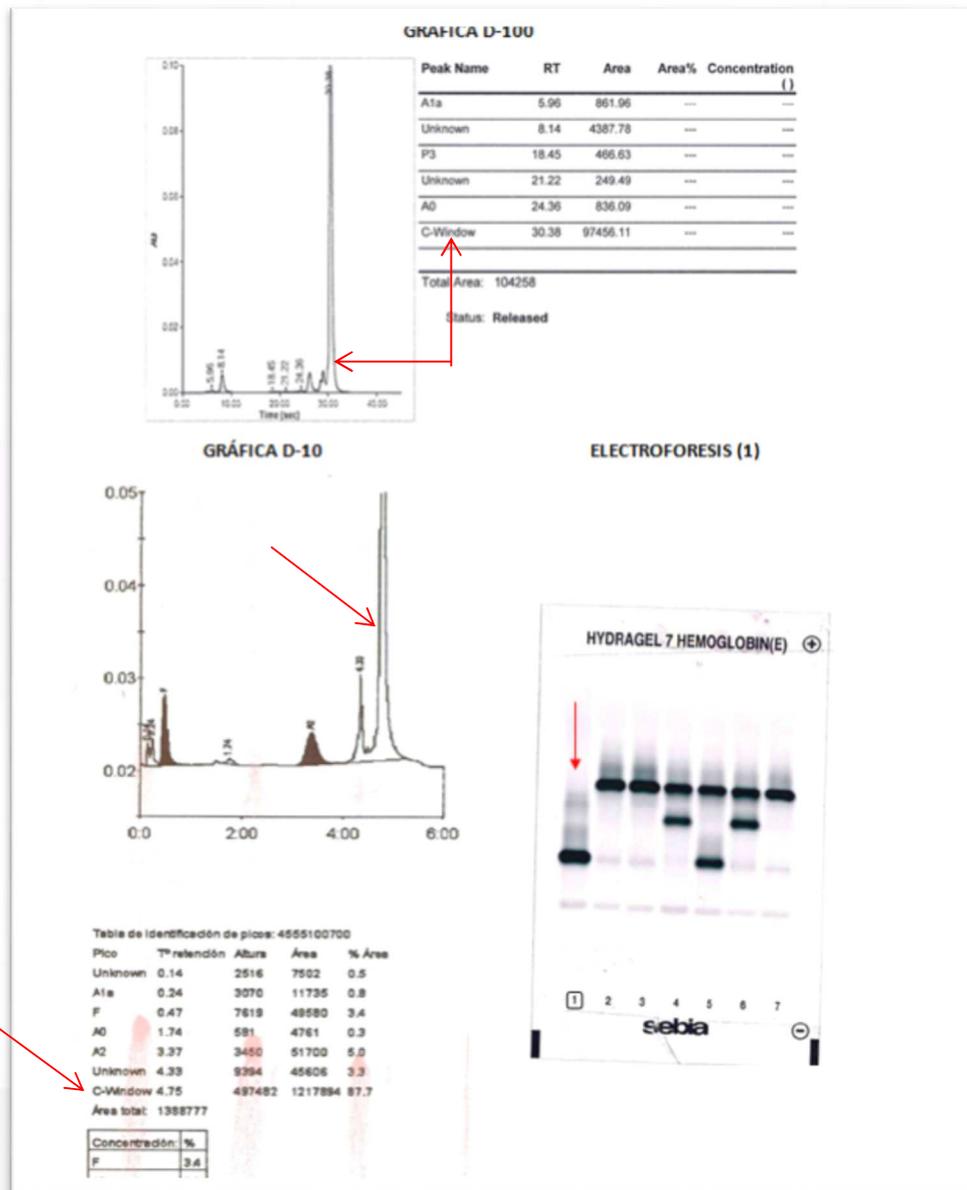


Por HPLC y electroforesis puede confundirse con HbS, pero la morfología del pico variante en el analizador D-10 es distinta, en el caso de la HbS hay un pequeño pico previo.

Hemograma sin alteraciones relevantes

Catlab Informa

HbC homocigota



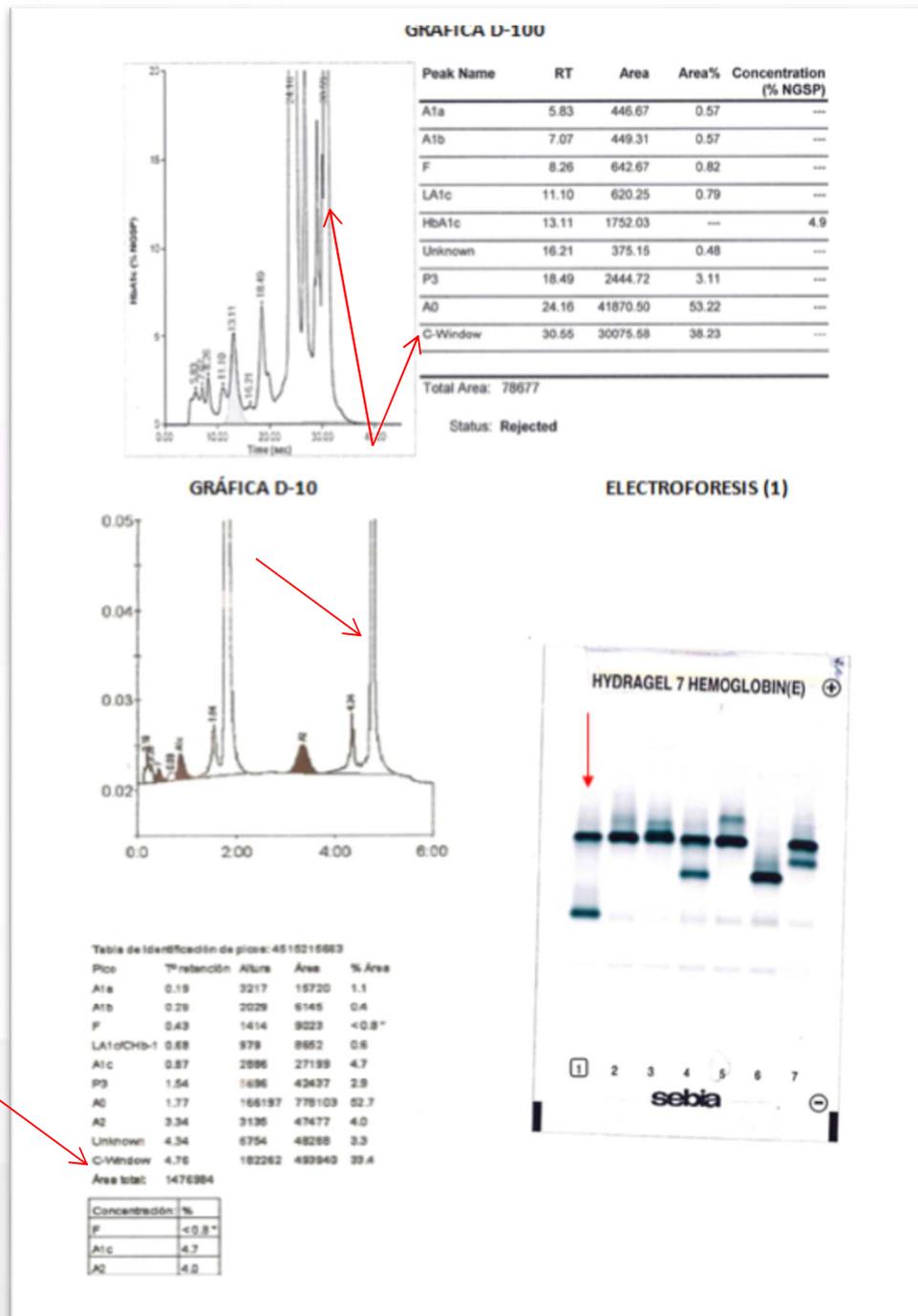
Ausencia de picos o bandas de HbA normal. Solo se detectan pico o banda de HbC.

La HbA2 no es valorable en presencia de hemoglobinas C o S, suele estar falsamente elevada (incluiría fracciones glicadas de las propias hemoglobinas C y S).

Clínicamente presenta un cuadro de moderada hemólisis. En el frotis se pueden observar dianocitos y ocasionales cristales de HbC.

Catlab Informa

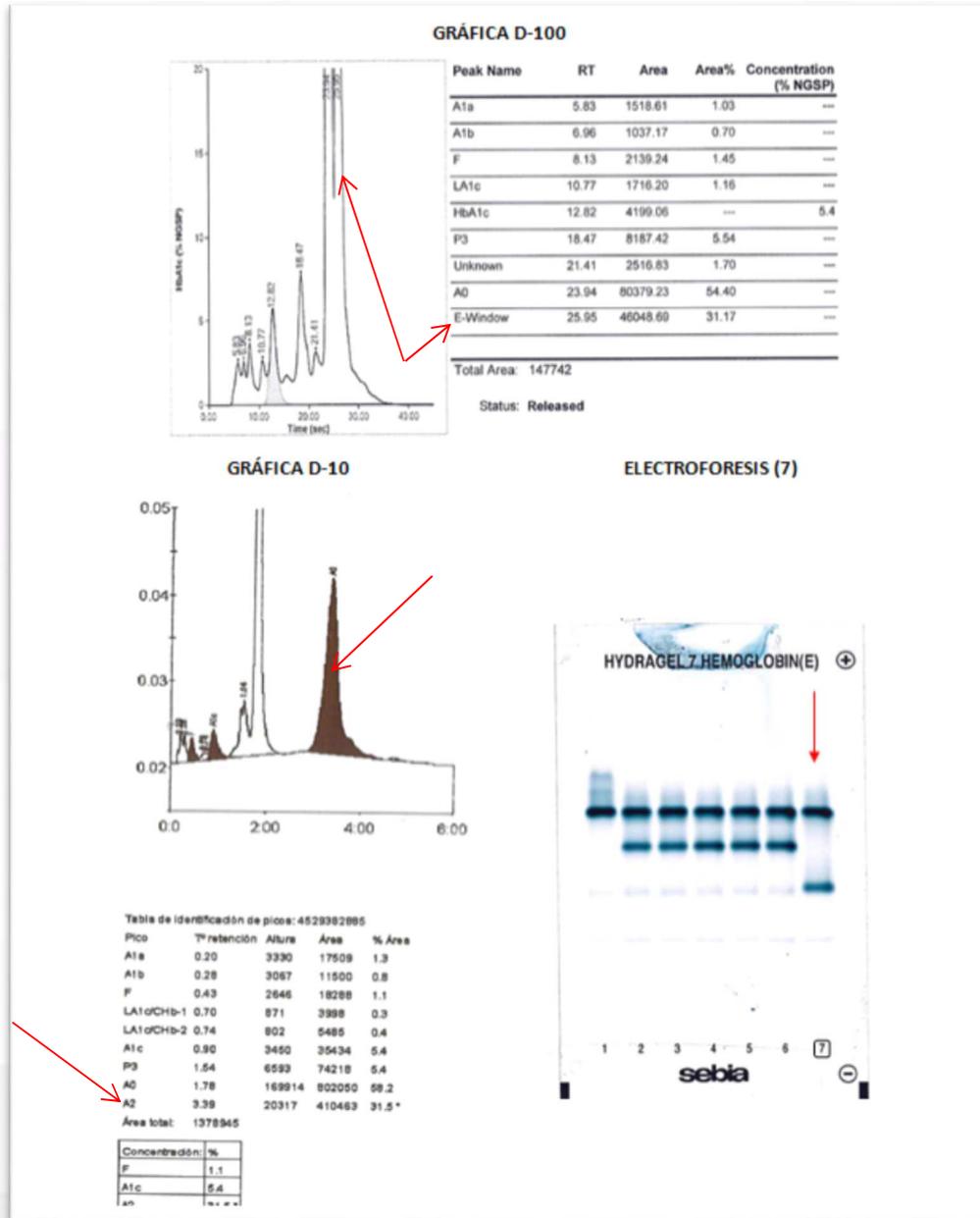
HbC heterozigota:



Hemograma prácticamente normal. En la revisión del frotis se observan ocasionales dianocitos.

Catlab Informa

HbE Heterozigota

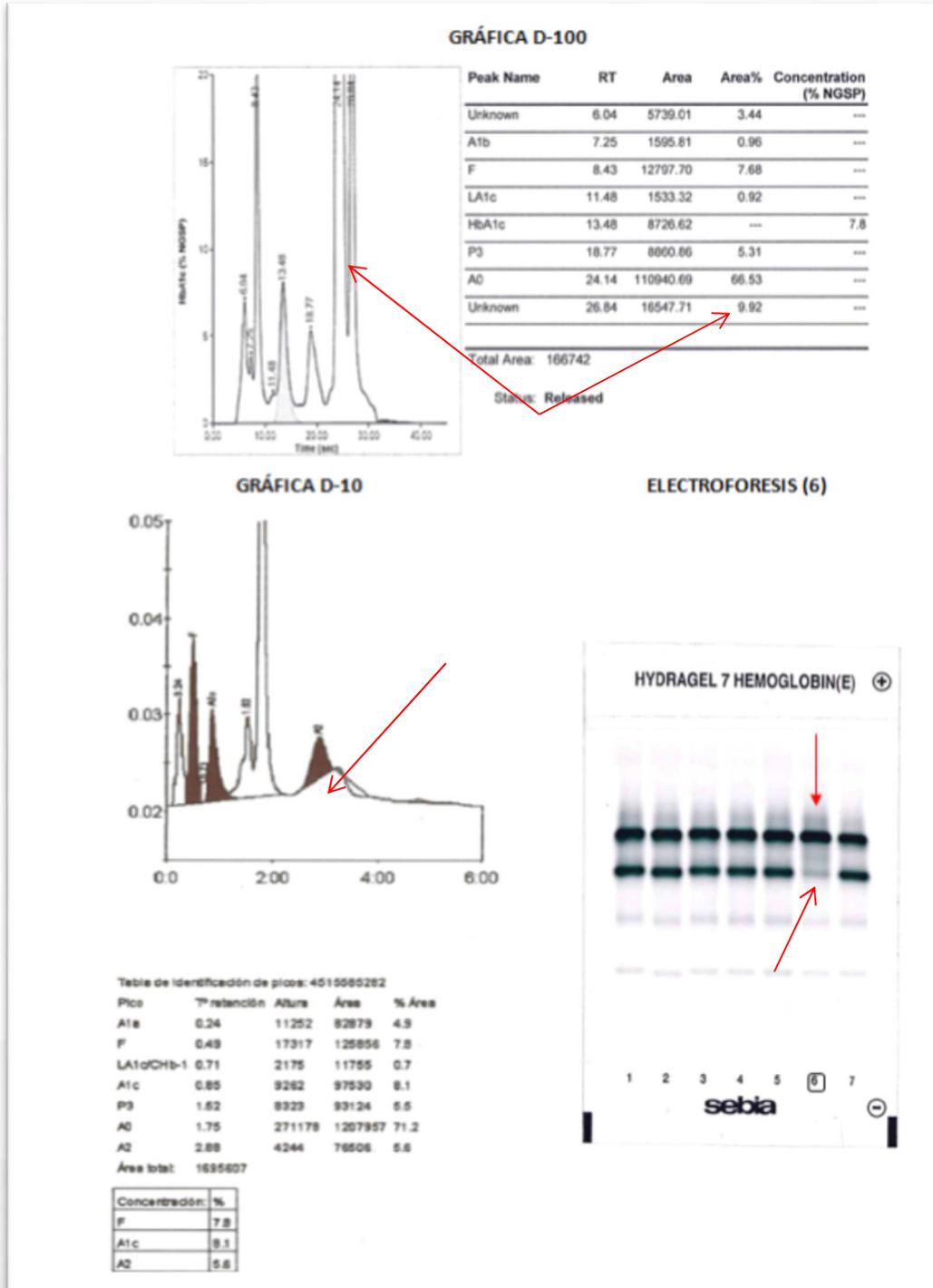


La banda de HbE por HPLC tiene un tiempo de retención similar al de la HbA2 y por electroforesis la banda de HbE corre en la región de la HbC (junto con la A2 y O Arab).

En estado heterocigoto presenta microcitosis y en homocigoto aparece una mayor microcitosis y cierto grado de anemia.

Catlab Informa

Hb Lepore



La hemoglobina Lepore heterocigota se presenta con un hemograma característico de talasemia (hematíes elevados, VCM disminuido, hemoglobina normal o disminuida). Por HPLC se detecta un pico anómalo en tiempo de retención de HbA₂, en ocasiones HbA₂ en torno al 10-20%, y por electroforesis se observa una pequeña banda en la región de

Catlab Informa

la HbS. La morfología del pico detectado en el analizador D-10 es característica de esta hemoglobina variante.

Alfa talasemia

Como se desarrolló en el documento "Catlab informa" nº66 anteriormente citado, el diagnóstico de alfa talasemia parte de un hemograma sugestivo, descartando ferropenia, y precisa de estudios moleculares. Ni las técnicas de HPLC ni la electroforesis son útiles para diagnosticar ni descartar portadores de alfa talasemia.

Hemoglobinas no identificadas:

En ocasiones detectamos picos de hemoglobinas variantes y por técnicas convencionales no somos capaces de identificarlos. Estas muestras se remiten a centro de referencia y en ocasiones se precisa de estudios moleculares o secuenciación de DNA para su identificación.

En los casos de hemoglobinas no identificadas adjuntaremos los gráficos y en el caso de que la variante detectada interfiera con el resultado de la HbA1c lo informaremos y sugeriremos utilizar métodos alternativos (fructosamina, control de glucemias) para el seguimiento del control de diabetes.

Estudio familiar y consejo genético

Se recomienda **estudio familiar** de una variante de hemoglobina cuando el presentar esta variante pueda suponer una alteración en la salud del paciente: anemia, hemólisis... o cuando plantee un diagnóstico diferencial con otras patologías, como talasemia/ferropenia, o cuando pueda interferir con la determinación de HbA1c dando resultados erróneos.

Se recomienda **consejo genético** a aquellos portadores de variantes de hemoglobina que potencialmente puedan derivar en cuadros severos en su descendencia si el otro progenitor es a su vez portador de una variante. Fundamentalmente nos referimos a portadores de beta talasemia, HbS, HbC, Hb O Arab, Hb Lepore, Hb D Punjab...

Como algunas de las variantes descritas pueden presentarse en estado heterocigoto con un hemograma normal no es suficiente para el estudio de la pareja de un portador, de beta talasemia por ejemplo, realizar únicamente un hemograma. Los dobles heterocigotos beta talasemia/HbS, por ejemplo, pueden presentar un cuadro severo de anemia drepanocítica.

Catlab Informa

En estos casos, para el consejo genético, recomendamos solicitar determinación de HbA2 y F ya que las variantes significativas serían detectadas en la revisión de los cromatogramas.

En el caso de estudios familiares de alfa talasemia se ha de solicitar estudio molecular de alfa talasemia. Por la posibilidad de asociaciones de hemoglobinopatías y por la información que proporciona el cromatograma se realizará previamente, y se informará, estudio de hemoglobinas por HPLC.

En los casos en los que se haya solicitado electroforesis de hemoglobinas y por HPLC no se detecten picos anómalos se anulará la electroforesis.

Desde el área de Hematología esperamos que la información que proporcionan estos gráficos os ayude en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes. Ante cualquier duda o necesidad de aclaración no dudéis en contactar con nosotros.

Teresa Villalba

Responsable Hematología

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35038 / 660.67.63.01

tvillalba@catlab.cat

www.catlab.cat

Jorge Medina

Hematología

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 5038

jmedina@catlab.cat

www.catlab.cat