Determinación y cuantificación de hemoglobina S por dos analizadores HPLC y por electroforesis

Mercedes Senar Ponte, María Carmen Puntí Fiestas, Laura Redondo López, Arantxa Cejudo Lara, M Libòria López Yeste, Teresa Villalba Hernández
Catlab, Terrassa.

INTRODUCCIÓN:

La hemoglobina S es una variante de la hemoglobina con una sustitución de ácido glutámico por valina en la posición 6 de la cadena polipeptídica de la betaglobina. Este cambio altera sus características físico-químicas lo que conlleva una polimerización de las cadenas de hemoglobina en situaciones especiales.

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 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 30%, 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%. Por ello es importante cuantificar, en un paciente con HbS conocida, el porcentaje de esta hemoglobina anómala con respecto a su hemoglobina total.

OBJETIVO:

Analizar diversas muestras con presencia de HbS por los distintos métodos y analizadores disponibles en nuestro laboratorio (electroforesis alcalina y HPLC en dos modelos de analizadores) y determinar el grado de concordancia entre los distintos resultados

MÉTODOS:

La HbS en nuestro laboratorio se puede cuantificar por dos métodos principales: HPLC y electroforesis.

Entre los analizadores de HPLC se dispone de dos equipos D-100 y un equipo D-10 de Bio-Rad Laboratories SA. Electroforesis de hemoglobinas: analizador Hydrasis de Sebia.

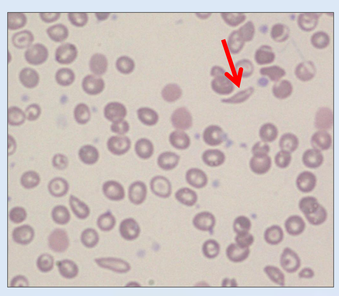
Analizador D-100: tiempo de elución 45".

Analizador D-10 en modo talasemia: tiempo de elución 6 minutos.

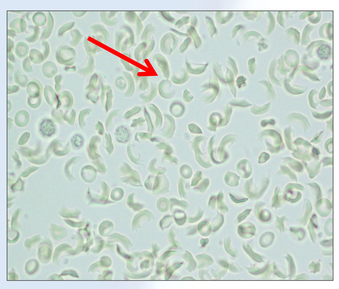
Se decidió analizar los resultados de varias muestras (mínimo 20) procesadas por los tres analizadores y ver las diferencias numéricas y grado de concordancia entre los resultados. Para el estudio de imprecisión se procesó 20 veces el control alto de HbA1c (que presenta un pico de Hb S variante) y una muestra con un porcentaje elevado de HbS (paciente homocigoto).

RESULTADOS:

En primer lugar se obtuvieron gráficas de resultados por los tres métodos. (Se señalan en los gráficos los hematíes anómalos o los picos o bandas de HbS con una flecha de color rojo)

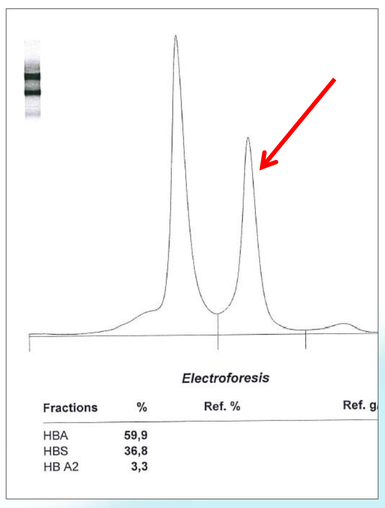


Morfología microscopio óptico, MGG

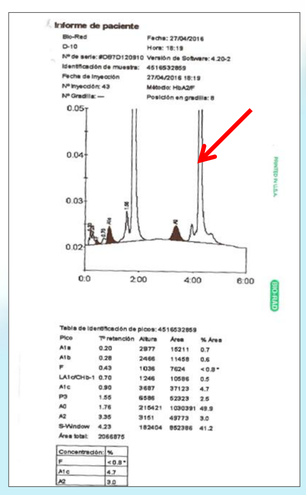


Test de falciformación positivo

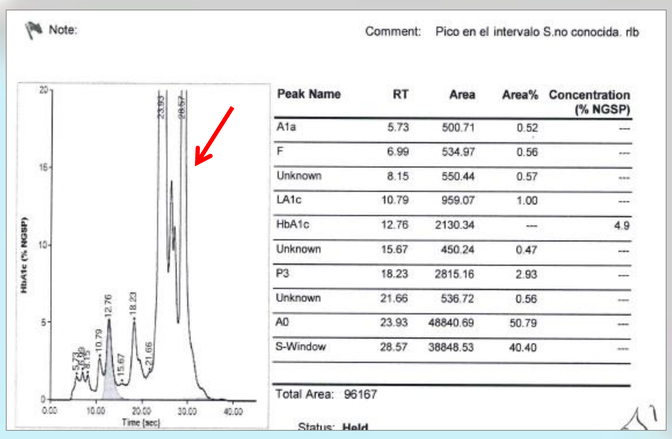
Electroforesis de hemoglobina alcalina



Electroforesis de hemoglobina: lectura por densitometría



HPLC, analizador D-10

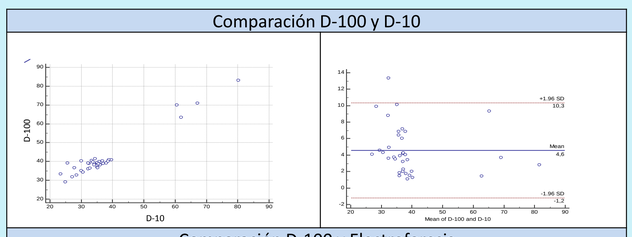


HPLC, analizador D-100

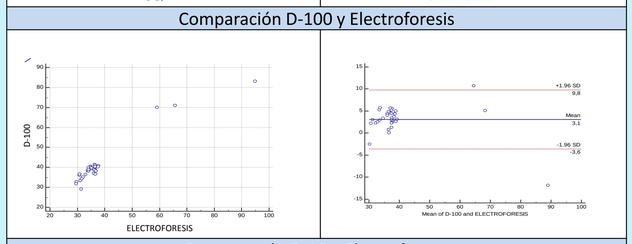
Se analizaron 35 muestras por los tres analizadores, y se calcularon las diferencias en la determinación de HbS entre ellos. Para analizar las diferencias se utilizaron las gráficas de Bland-Altman que facilita el programa MedCalc® y que representan las diferencias de cada pareja de datos, su desviación con respecto al cero y las líneas que limitan el área de dos desviaciones estándar

MUESTRA	D-100	D-10	ELECTROFORESIS
1	36,05	32,3	30,8
2	40,47	33,3	34,9
3	41,34	34,5	36,3
4	36,58	27,8	30,8
5	40,86	39,6	36,5
6	38,28	36	33,9
7	38,13	36,1	34,1
8	39,18	35	34,6
9	32,81	28,5	29,8
10	83,02	80,2	94,9
11	39,83	35,8	34,2
12	70,88	67,2	65,8
13	40,91	38,9	37,8
14	40,04	38,5	34,9
15	39,07	38	36,2
16	69,93	60,6	59,2
17	39,37	35,1	35,9
18	39,73	33,7	35,3
19	38,91	32,5	34,1
20	33,4	23,5	31,1
21	36,92	35,1	36,1
22	36,68	35,2	36,6
23	35,04	30,1	32,1
24	39,17	32,3	36,3
25	39,05	25,7	36
26	40,21	30,1	37,6
27	34,18	30,6	31,7
28	40,21	36,8	36,5
29	31,75	27,2	29,6
30	38,83	37,1	36,5
31	38,69	35,5	36,4
32	36,31	32,8	33
33	38,1	34,2	36,8
34	29	24,9	31,5
35	67,71	60,8	57,9

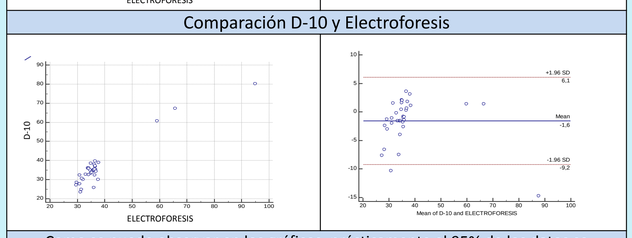
Comparación D-100 y D-10



Comparación D-100 y Electroforesis



Comparación D-10 y Electroforesis



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.

En el estudio de imprecisión los coeficientes de variación para la determinación de Hb S tras 20 replicados de control alto y de una muestra de un paciente homocigoto fueron los siguientes:

Control H	D-10	D-100
MEDIA	28,08	31,74
DS	0,56	0,43
CV	1,98	1,34

MUESTRA HbSS	D-10	D-100
MEDIA	63,21	64,85
DS	0,72	0,84
CV	1,14	1,29

La especificación de calidad analítica definida por nuestro laboratorio para la hemoglobina S es un CV<2.6% (ACCLC). Los valores obtenidos para la imprecisión interserie cumplen sobradamente con este objetivo.

DISCUSIÓN:

El procesamiento por HPLC es más rápido y requiere menos carga de trabajo que por electroforesis. Los valores obtenidos por el analizador D-100 son más altos que los obtenidos por electroforesis y por el D-10. Se consideran más ajustados los valores del D-10 al ser el procesado (tiempo de elución) más prolongado, por lo que se le otorga el carácter de resultado de referencia.

Ambos analizadores (D-100 y D-10) tienen una baja imprecisión, considerando la repetitibilidad muy buena.

CONCLUSIONES:

- El análisis por HPLC proporciona resultados rápidos para el seguimiento del porcentaje de HbS en pacientes portadores o afectos de Hemoglobinopatía S.
- En los casos en los que interese descartar o detectar la presencia de HbS se pueden procesar por ambos analizadores.
- En aquellos casos en los que interese un valor para seguimiento de terapia transfusional (valores entre el 20-35%) se recomienda el procesado por el D-10.