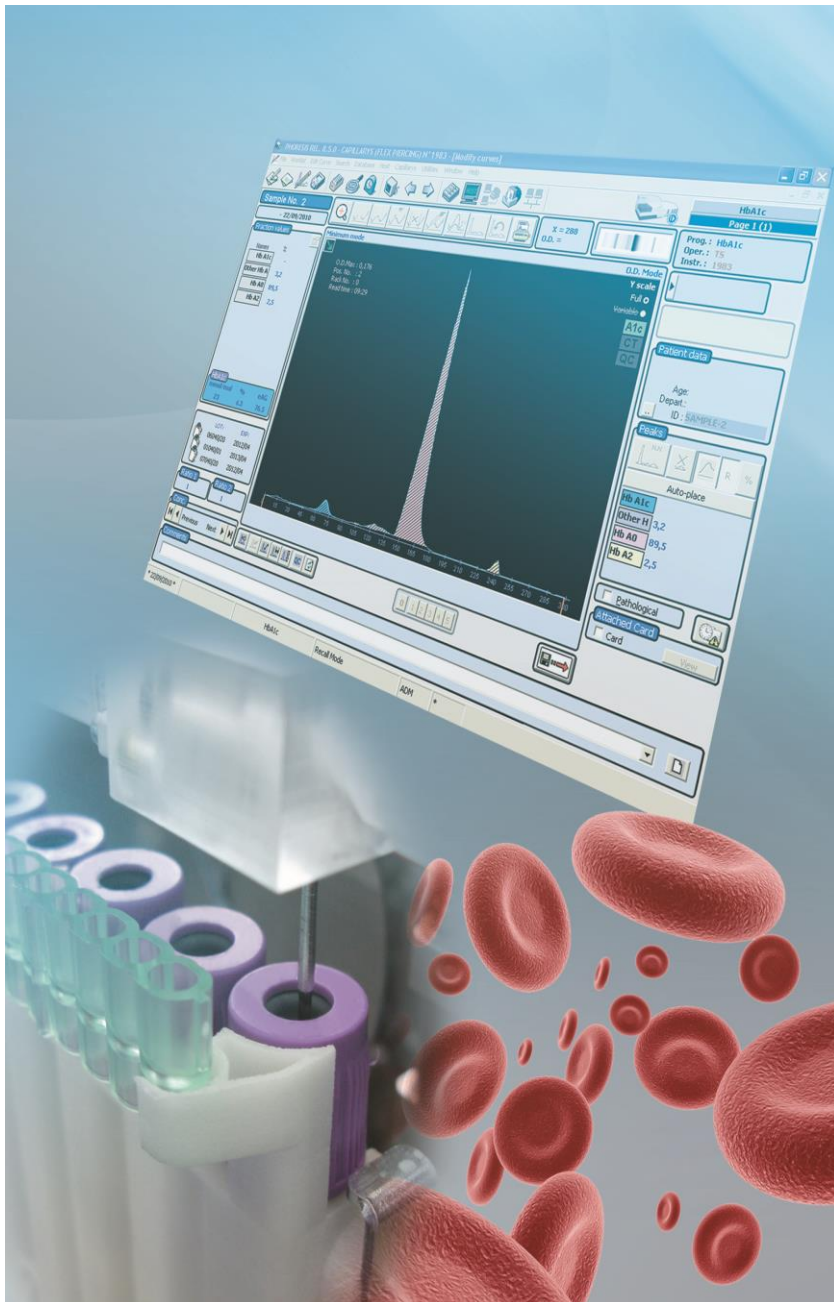




Electroforesis de HEMOGLOBINA

María de las Nieves Sanz
Asesor Científico

nsanz@sebia.com

sebia

Composición del kit

MINICAP FLEX PIERCING (Ref 2207)	CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING (Ref 2007)
Tampón (listo para usar)	
Solución hemolisante (lista para usar)	
Solucion de lavado (solucion concentrada)	
Segmentos de dilucion	
Filtros	
Cajas para segmentos de dilución usados	
Etiquetas para la solución hemolisante	

Tampón

- Conservar en nevera de 2-8°C. Estable hasta la fecha de caducidad indicada en el vial
- No conserve el tampón cerca de una ventana o de una fuente de calor



Antes de usar el tampón, es necesario llevarlo a temperatura ambiente (3 horas)

NO ATEMPERAR EL TAMPON A BAÑO MARIA

- Después de cada uso, el tampón debe conservarse obligatoriamente en nevera (2 - 8 °C) lo antes posible
- Un vial de tampón abierto e instalado en el instrumento, es estable un **máximo de 30 días (acumulativos)** a temperatura ambiente (de 15 a 30 °C)

Solución hemolisante

USO: Dilución y hemólisis de los glóbulos rojos

- Capillarys 2 FP: La solución hemolisante puede conservarse a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) o en nevera (entre 2 y 8 °C)
- Minicap FP: La solución hemolisante debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C)
- Un contenedor de solución abierto e instalado en el instrumento, es estable un **máximo de 3 meses (acumulativos)**

Solución de lavado

USO: Para lavar los capilares antes de la separación electroforética de las hemoglobinas

- **Capillarys 2 FP:** El vial de solución de lavado concentrada debe completarse hasta 750 mL con agua destilada
- **Minicap FP:** El vial de solución de lavado concentrada debe completarse hasta 250 mL con agua destilada



Antes de llenar el contenedor de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada en abundancia el cuello del contenedor, el tapón-conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

- La solución de lavado concentrada y diluída debe conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados (para evitar la evaporación)
- La solución diluída es **estable durante 3 meses**

Filtros

- USO: Filtrado del tampón, la solución hemolisante, la solución de lavado y el agua destilada



- Cambie sistemáticamente los filtros al empezar un nuevo kit utilizando guantes limpios para la manipulación y la colocación de los filtros

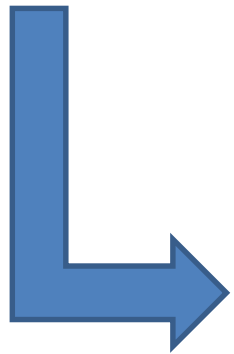


Reactivos necesarios no suministrados en el KIT

MINICAP FLEX PIERCING	CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING
Control HbA2 Normal OBLIGATORIO	
Control HbA2 Patologico	
Control AFSC	
Tubos y tapones para Controles (Ref 9205)	
Aros de centrado (Ref 1612)	Adaptadores para los tubos control (Ref 9203)
Etiquetas "LOW VOLUME AUTOMÁTICO" (Ref 9208)	Caja plástica para conservación de controles hemolisados (Ref 2082)
Etiquetas "LOW VOLUME MANUAL" (Ref 9209)	

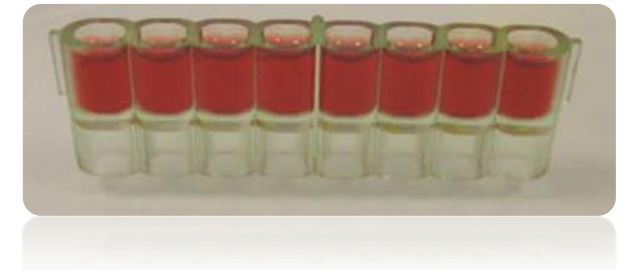
Control HbA2 Normal (Ref 4778)

- **Uso:** Control de migración de los perfiles y control de calidad de la técnica
- **Conservación:**
 - Antes de la reconstitución: entre 2-8°C (estable hasta la fecha de caducidad)
 - Luego de la reconstitución: entre - 18 °C y - 30 °C (estable máximo 6 meses)
 - **CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING:** Almacenar los segmentos de dilución entre -18°C y -30° (**estable máximo 1 mes**) *No congele y descongele más de 2 veces un segmento de dilución*



Antes de su uso, el segmento de dilución congelado debe ser colocado en nevera (2 - 8 °C) **mínimo de 30 minutos antes del análisis**

Homogenizar el contenido de cada pocillo del segmento de dilución mediante pipeteos sucesivos evitando la formación de burbujas de aire. *No agitar el segmento de dilución en el vortex!*



Control HbA2 Normal (Ref 4778)

- 1) Reconstituya el vial liofilizado de Control Hb A2 Normal con agua destilada
- 2) Deje reposar 30 minutos y agite suavemente (evite la formación de espuma)

MINICAP: Preparar **2 alícuotas de 800 µL** en tubos control SEBIA

- 1 alícuota = 5 análisis

CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING: Preparar **4 alícuotas de 400 µL** en tubos control SEBIA

- 1 alícuota = 2 diluciones automáticas
- 1 segmento hemolisado = 3 diluciones manuales

CONTRÔLE Hb A2 NORMAL (valeurs attendues - pourcentages)
NORMAL Hb A2 CONTROL (expected values - percentages)

REF 4778

LOT 28087/xx

2021/06

Volumes de reconstitution avec eau distillée ou déminéralisée / Volumes of reconstitution with distilled or deionized water

HYDRASYS & HYDRASYS 2 instruments	
HYDRAGEL 7 & 15 HEMOGLOBIN(E).....	2.0 mL
K20 electrophoresis chamber	
HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20.....	2.0 mL
CAPILLARYS 2 instrument	
CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).....	1.0 mL
MINICAP instrument	
MINICAP HEMOGLOBIN(E).....	1.0 mL
CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument	
CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).....	1.6 mL
MINICAP FLEX-PIERCING instrument	
MINICAP HEMOGLOBIN(E).....	1.6 mL
CAPILLARYS 3 TERA instrument	
CAPI 3 HEMOGLOBIN(E).....	1.6 mL



¿ Cuando analizar el control normal HbA2 ?

- **1 análisis**

- Antes de iniciar una nueva serie de muestras (configurado anteriormente en técnica Hb)

- **2 análisis**

- Cambio del vial o lote de tampón
- Cambio de técnica
- Luego de un ciclo de limpieza Capiclean
- Actualización del software Phoresis
- Activación de capilares

- **3 análisis**

- Primer uso de la técnica Hb
- Paro prolongado del instrumento (> 1 semana)

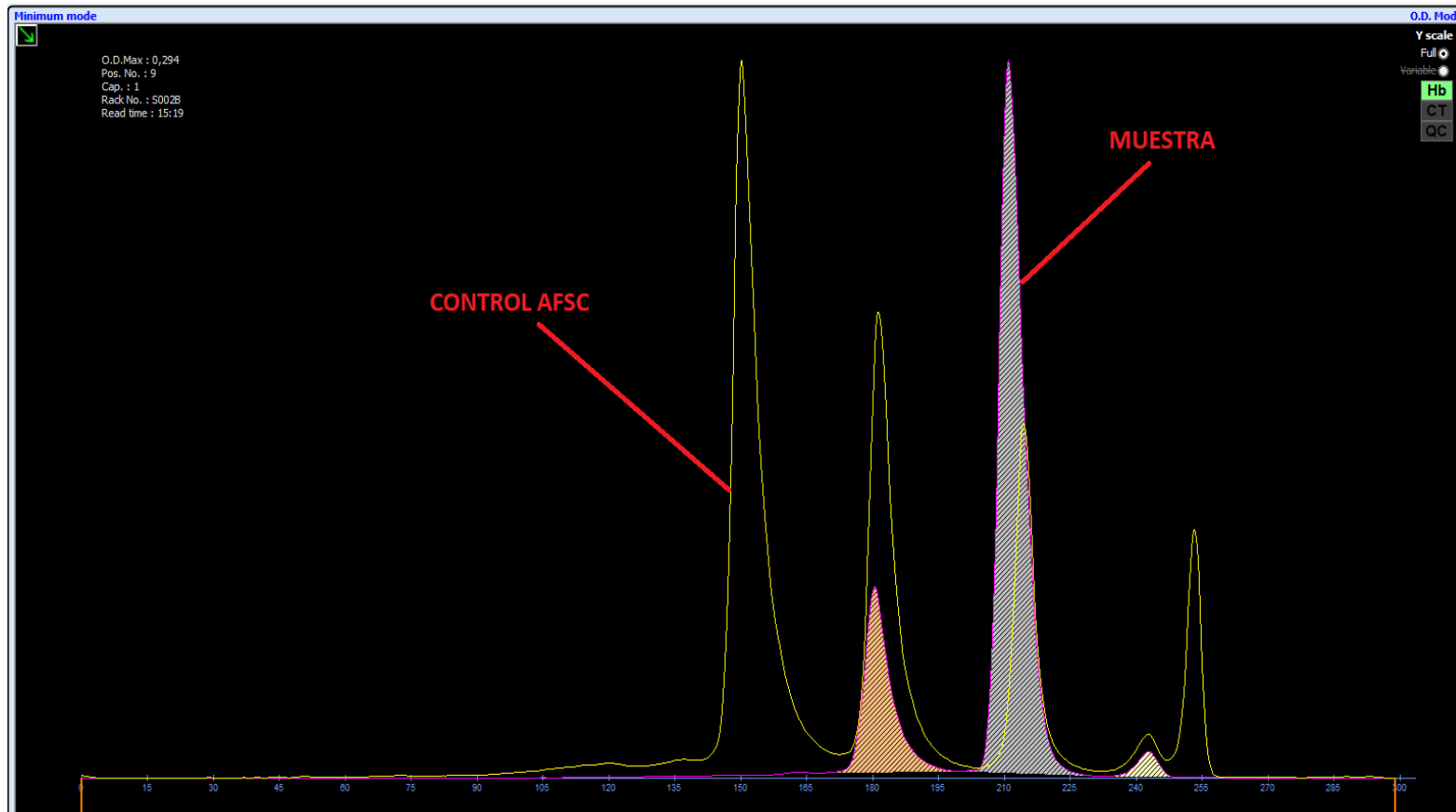
Control HbA2 Patológico (Ref 4779)



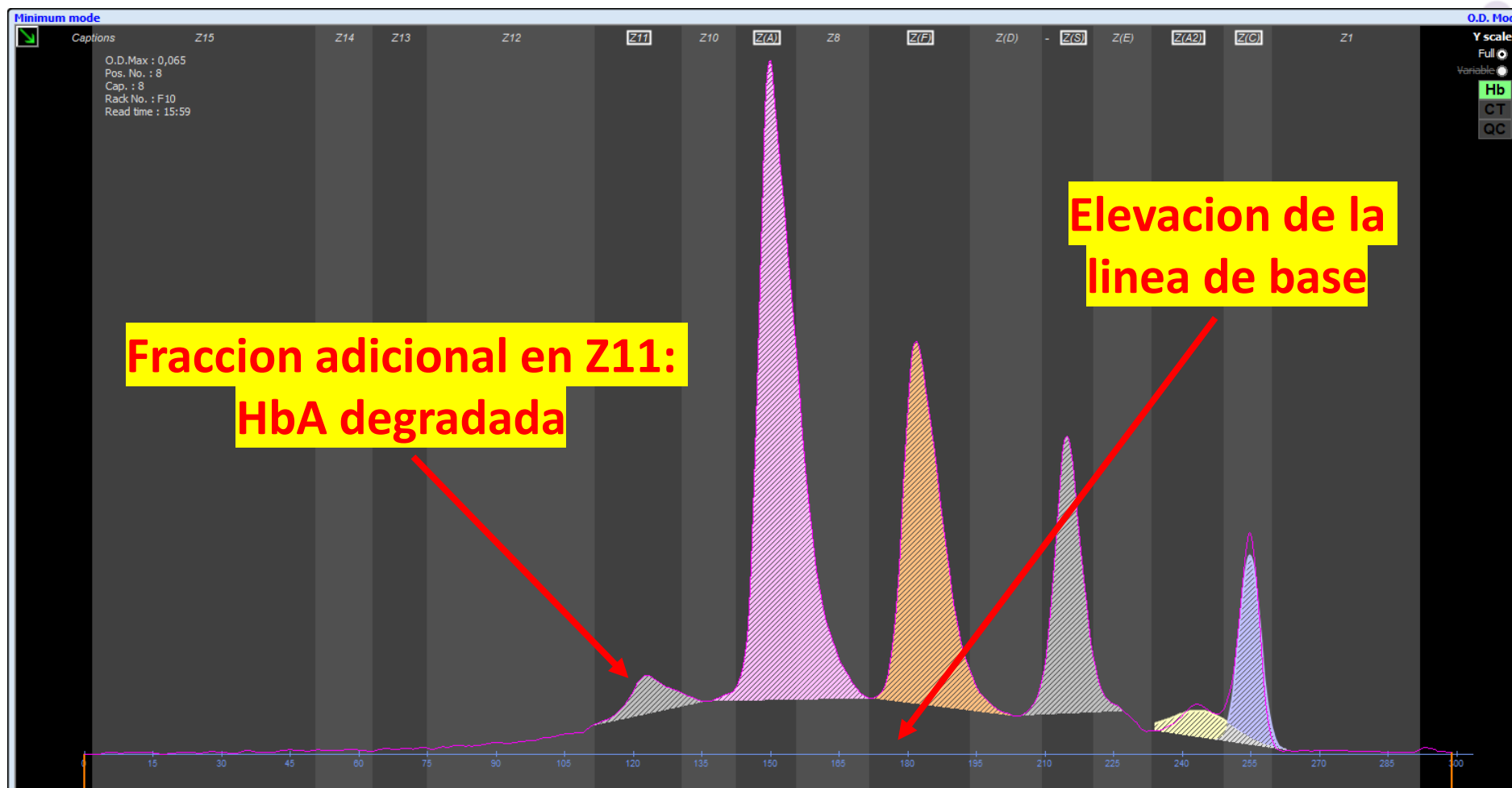
- **Versión Phoresis < 9.15:** Utilizado solo como control de calidad de la técnica
- **Versión Phoresis > 9.15:** Utilizado como control de calidad + control de migración
 - Se recomienda analizar el control HbA2 normal al principio de la serie de muestras y el control HbA2 Patológico al final de la serie de muestras

Control AFSC (Ref 4792)

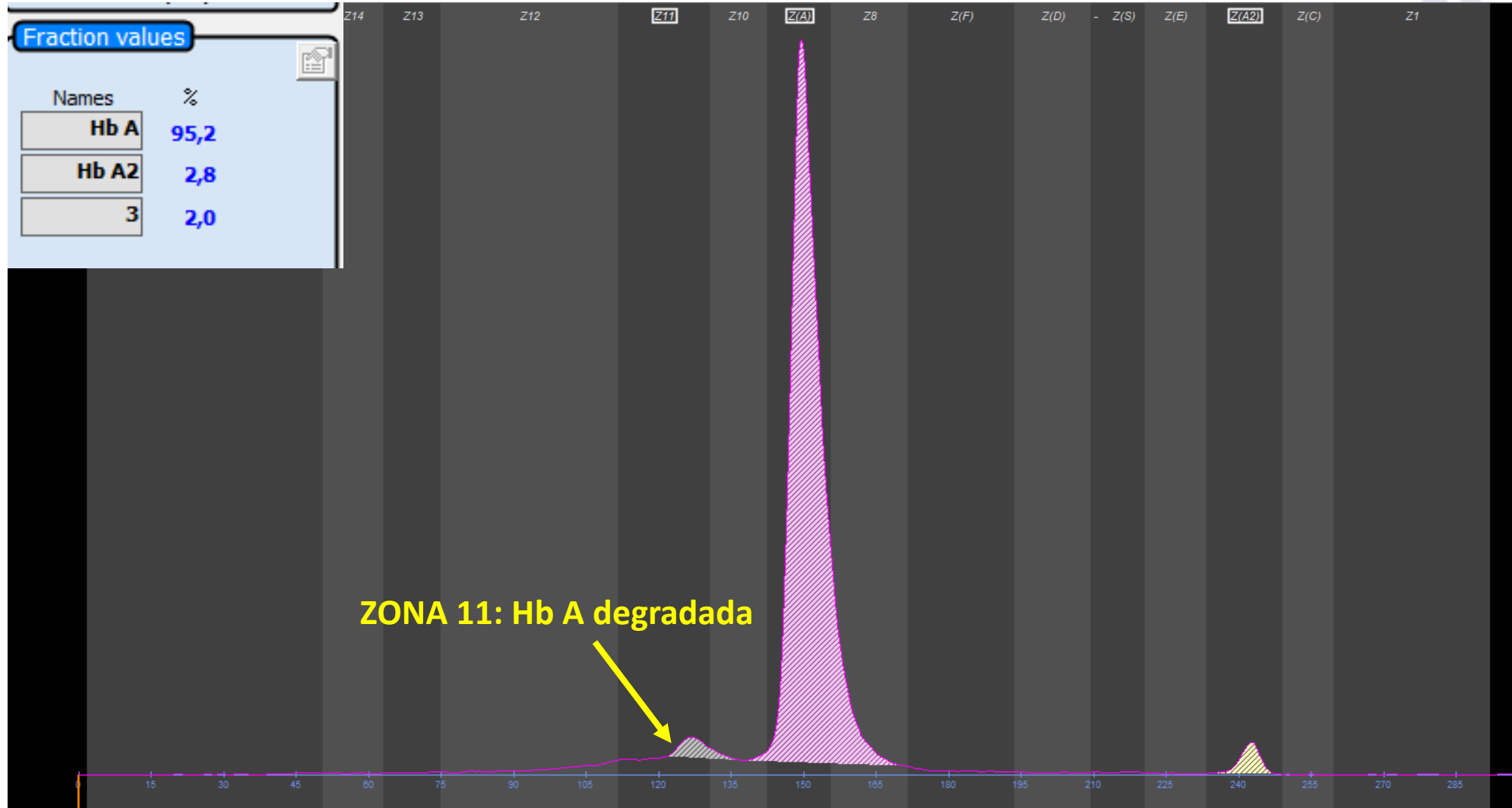
- Se debe utilizar UNICAMENTE como control de calidad de la técnica
- No utilizar el control AFSC para identificar picos en un perfil no centrado (fondo negro)



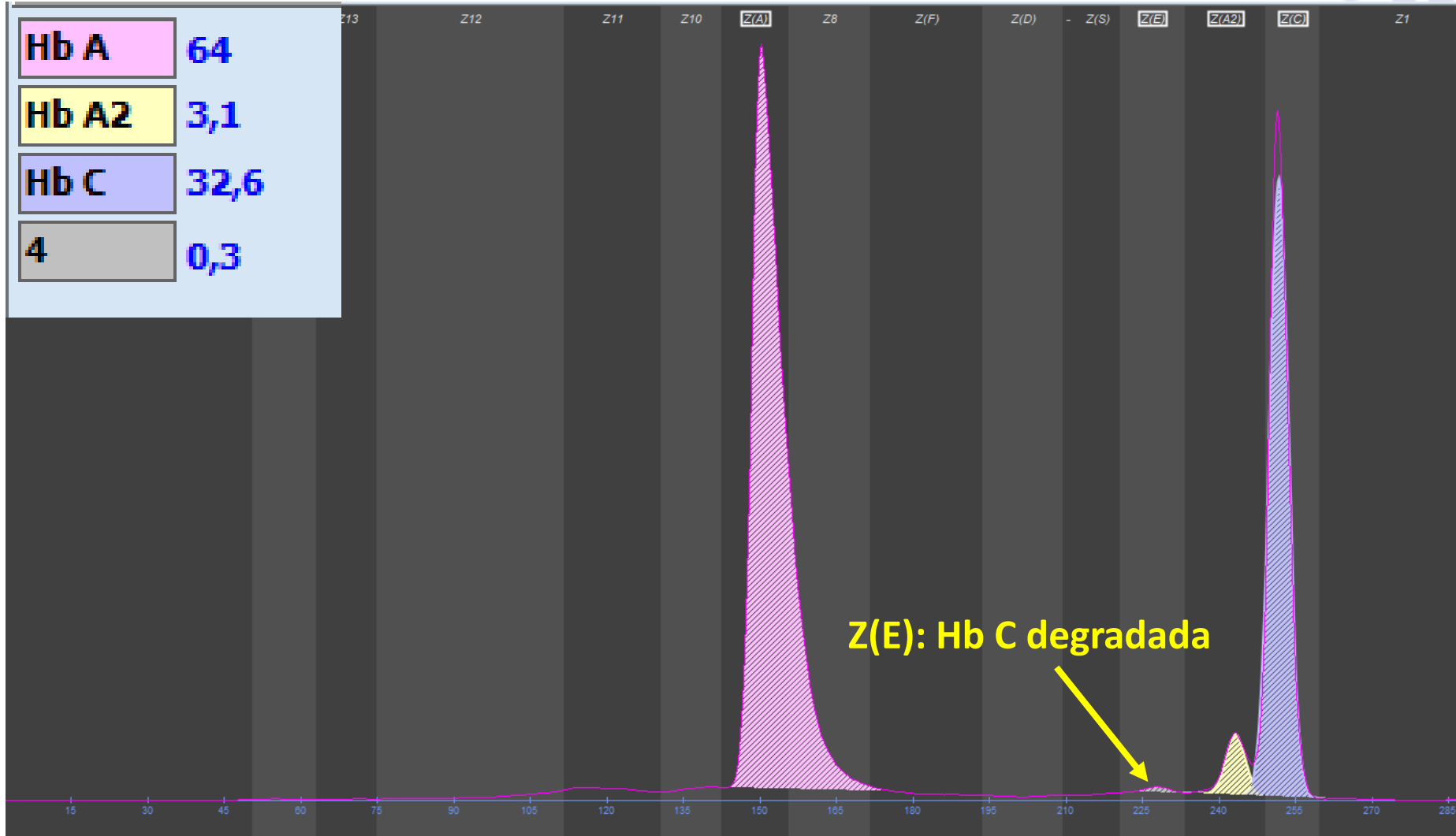
Control AFSC conservado >7 días en nevera



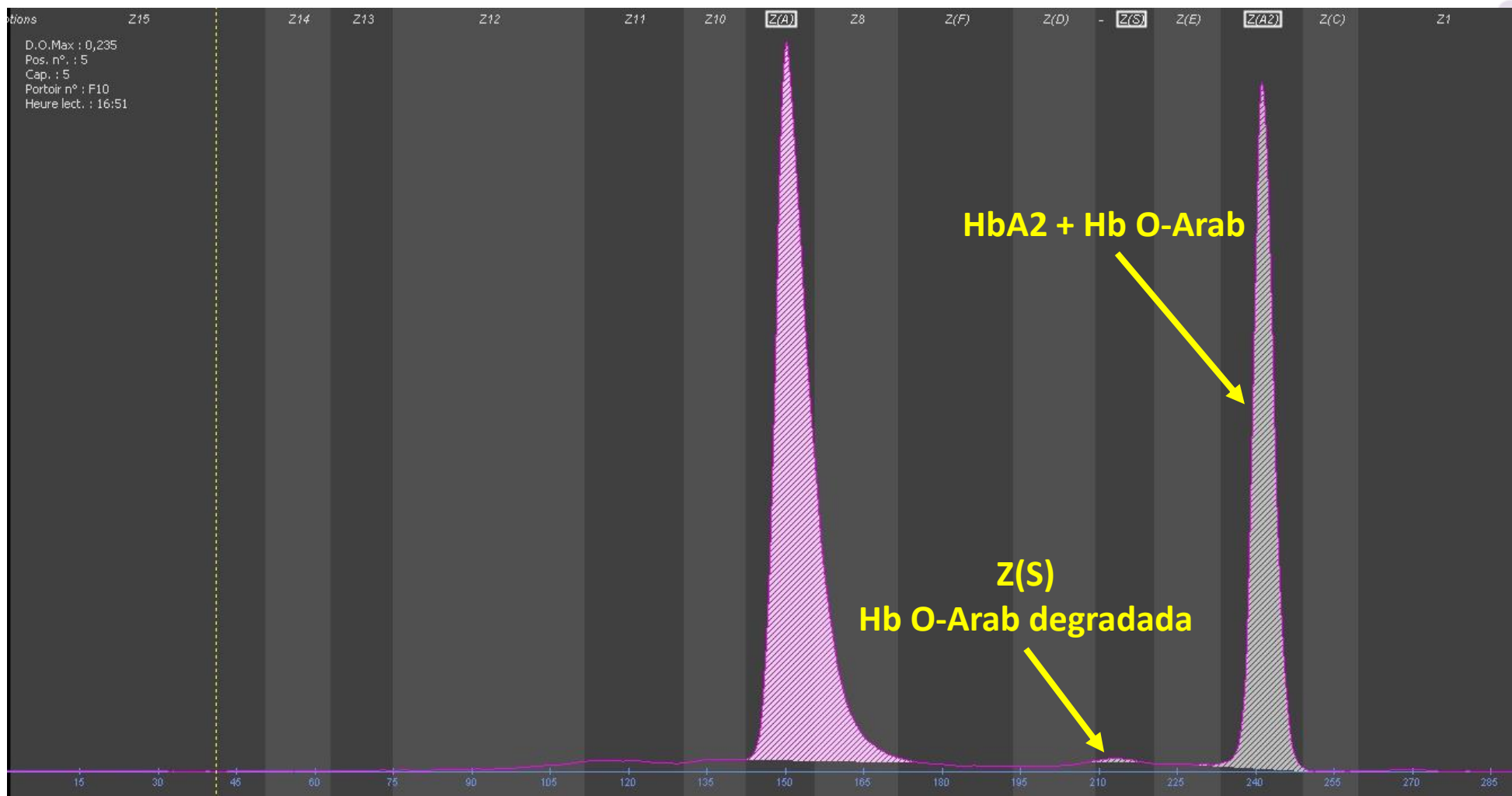
Muestra conservada >7 días en nevera



Muestra con HbC conservada >7 días en nevera

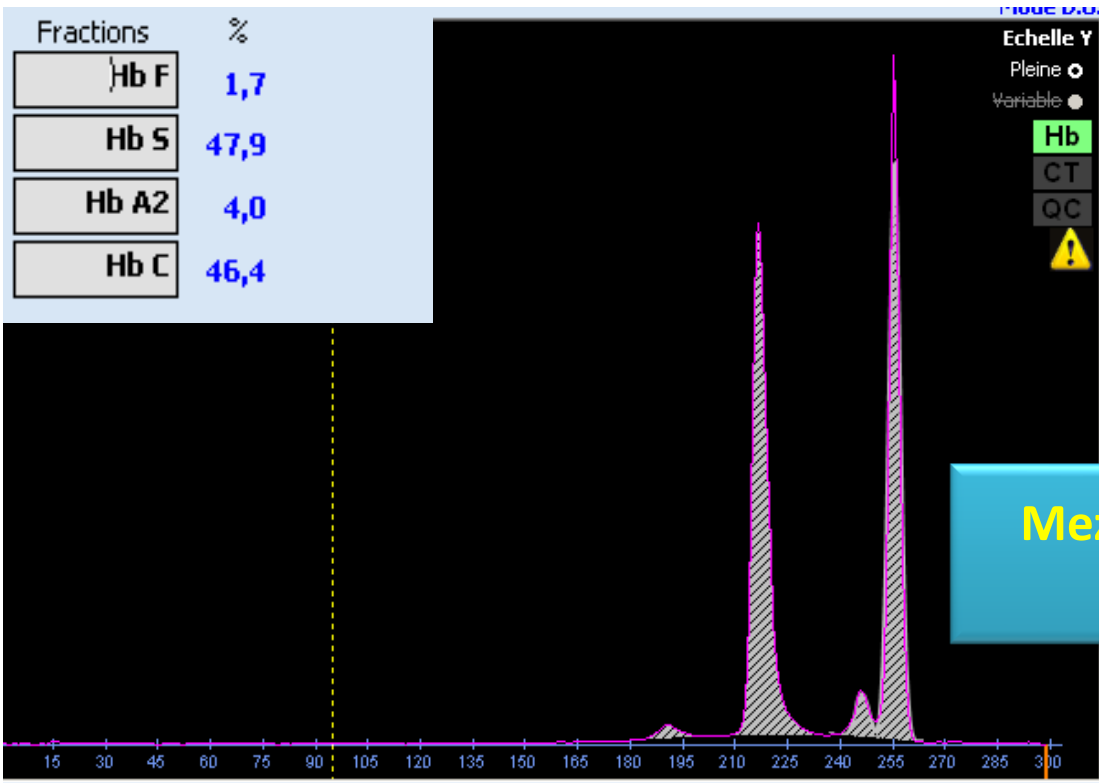


Muestra con Hb O-Arab conservada > 7 días en nevera



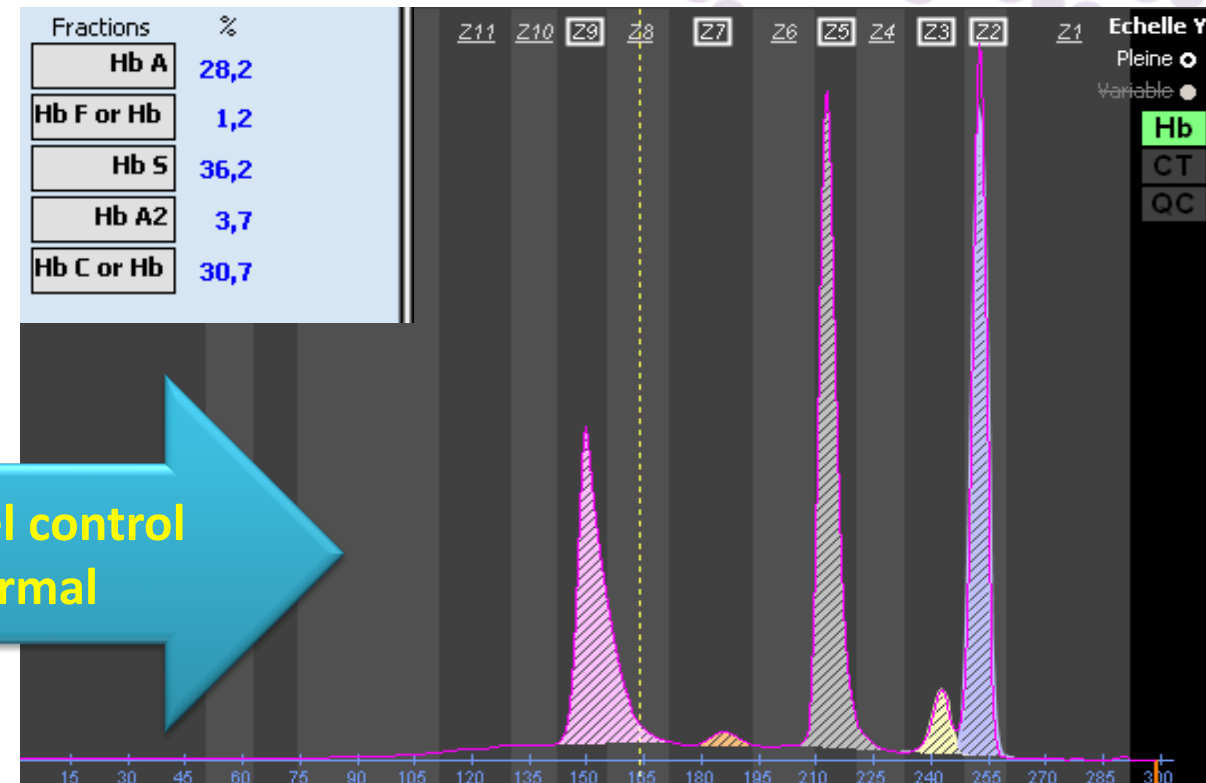
Muestras sin HbA o HbA2

1° ANALISIS



Mezcla con el control
HbA2 normal

2° ANALISIS



Renombrar las fracciones y reportar

Muestras sin HbA o HbA2



PHORESIS 9.15

En ausencia de HbA, el perfil puede ser centrado utilizando las fracciones de HbF y la HbA2 y mostrar las zonas de migración:

**LAS ZONAS SE
MUESTRAN**

HbF > 3%

**LAS ZONAS SE
MUESTRAN A VECES**

HbF 1% - 3%

**LAS ZONAS NO SE
MUESTRAN**

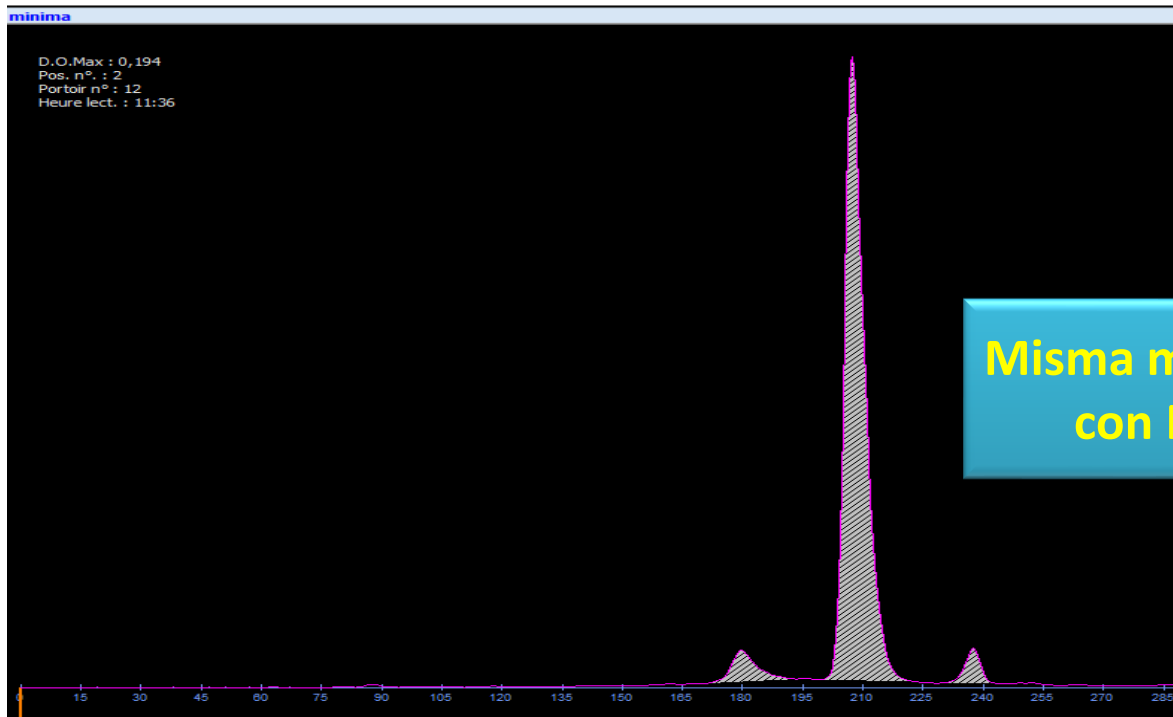
HbF < 1%

Reducción de reanálisis en un 80%

Muestras sin HbA o HbA2

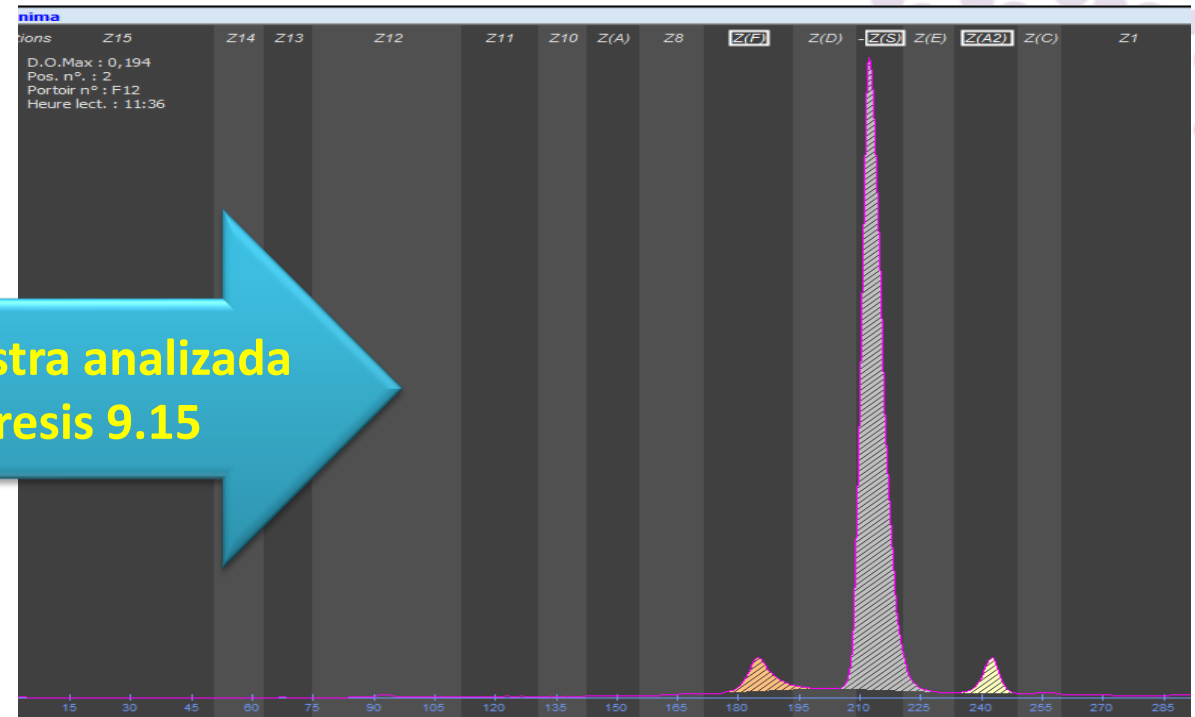


PHORESIS < 9.15



Misma muestra analizada
con Phoresis 9.15

PHORESIS 9.15



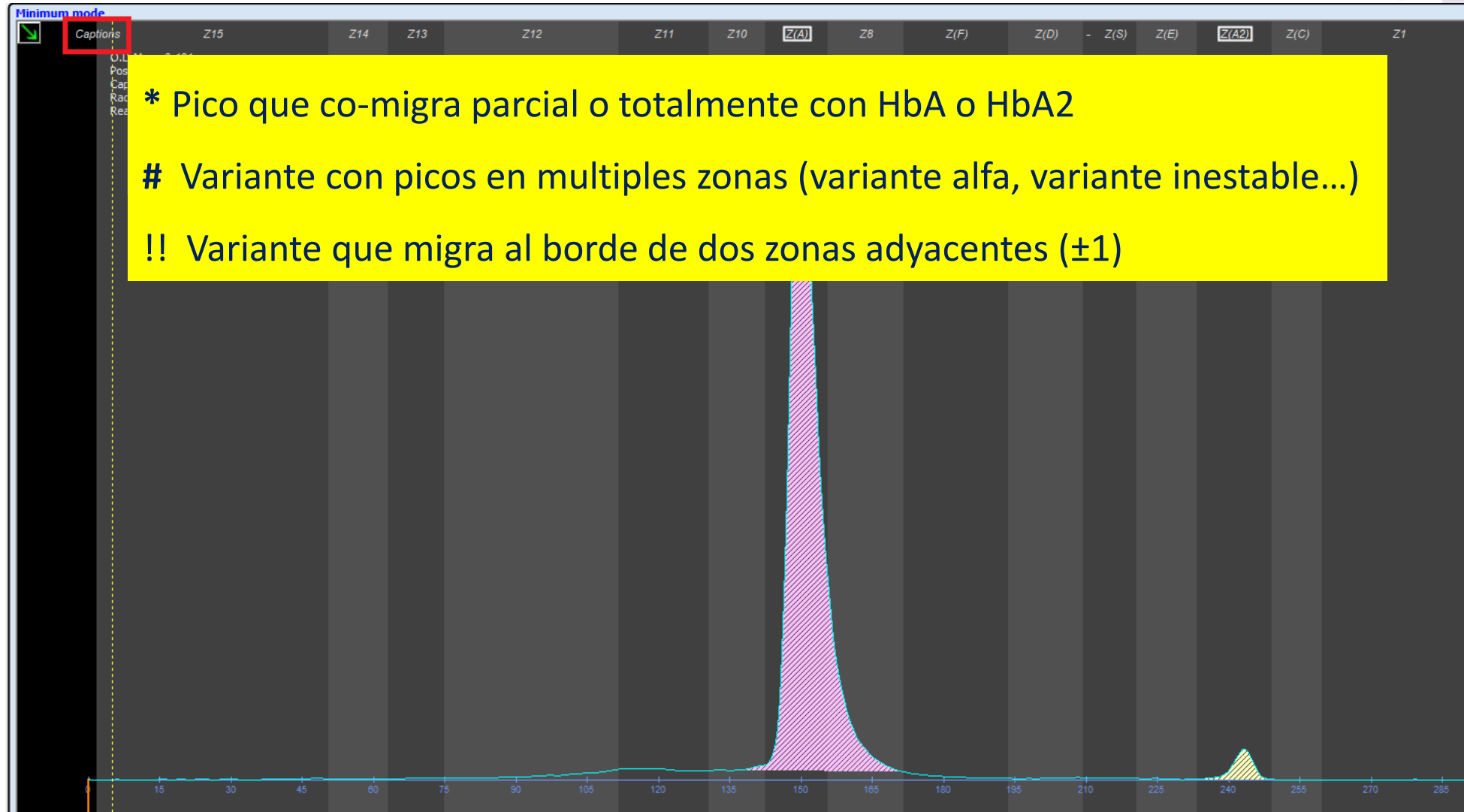
- Las zonas no se muestran
- Se requiere mezclar con el control HbA2 normal y reanalizar

- HbF 5,7% = Las zonas se muestran
- El resultado se puede informar directamente

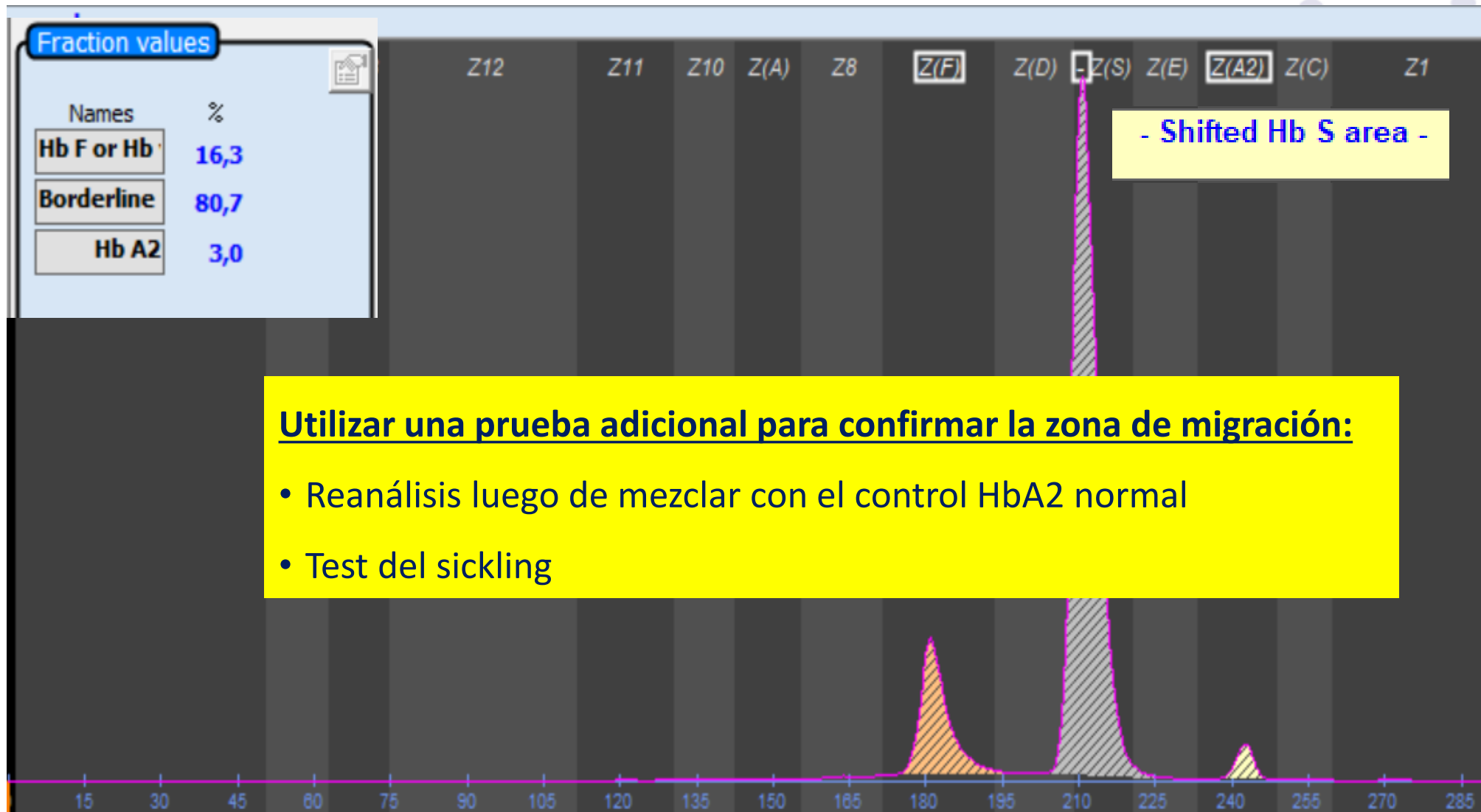
Base de datos ampliada



Agregado de símbolos a la lista de variantes



Agregado de la zona « Shifted Hb S area »



Etiquetas Multi-System en Phoresis 9.15



Permiten la identificación automática de:

- Tipo de reactivo
- Numero de lote
- Fecha de expiración

1 -----> Hb A2 NORMAL CONTROL

Concentration: g/dl

QC:

Lot number: /

Exp. date: /

analyse number:

Interpretación de resultados

Observación detenida del perfil

- Tipo de variante: alfa, beta, delta?
- % del pico extra?
- Aumento/disminución HbA2?
- Aumento de HbF?
- Ausencia de HbA o HbA2?

Hemograma completo

- Hb
- VCM
- MCH
- MCHC
- Perfil férrico
- Vitamina B12
- Acido fólico

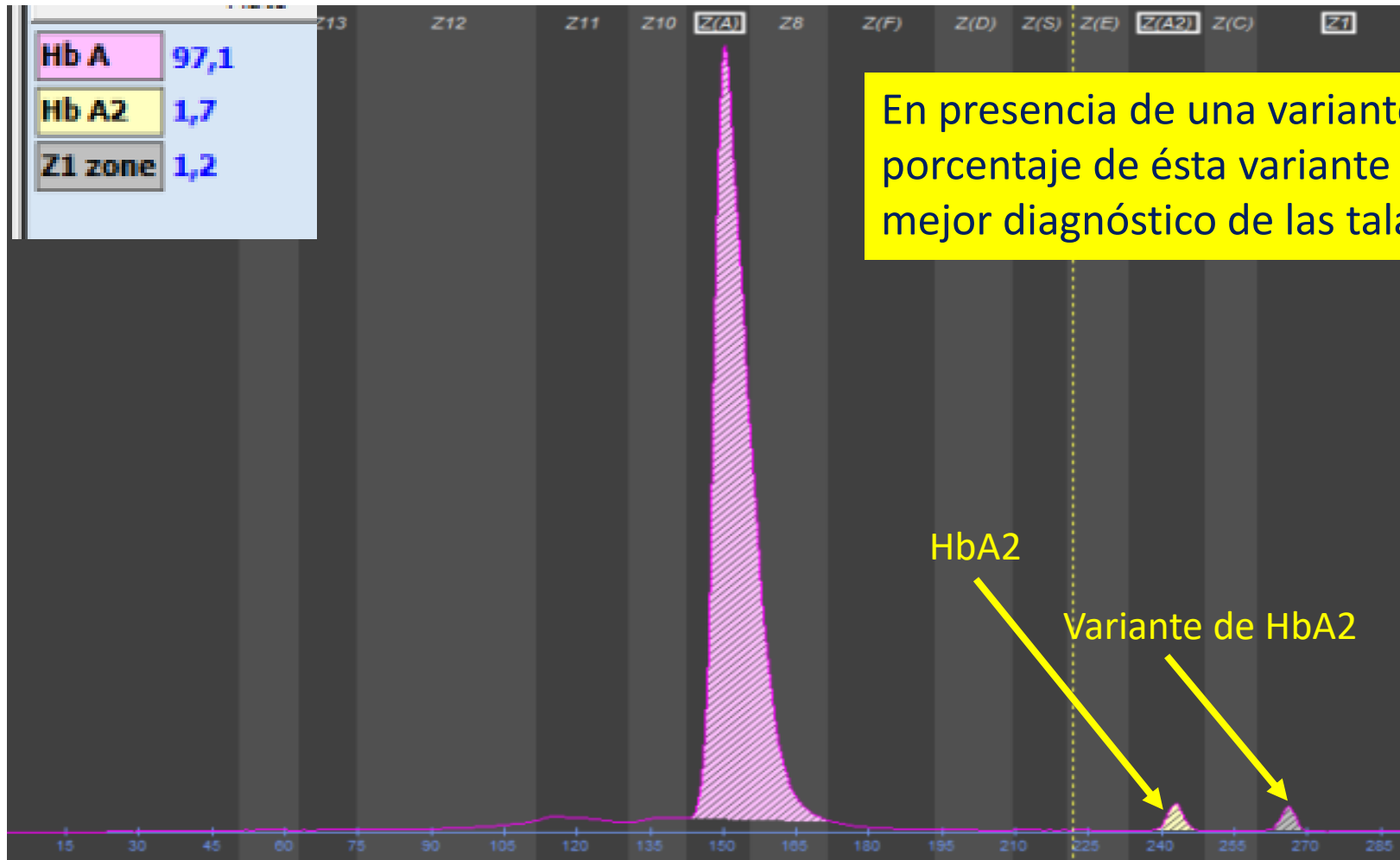
Interpretación de resultados

Uso de técnicas complementarias para confirmar la naturaleza de la variante de Hb:

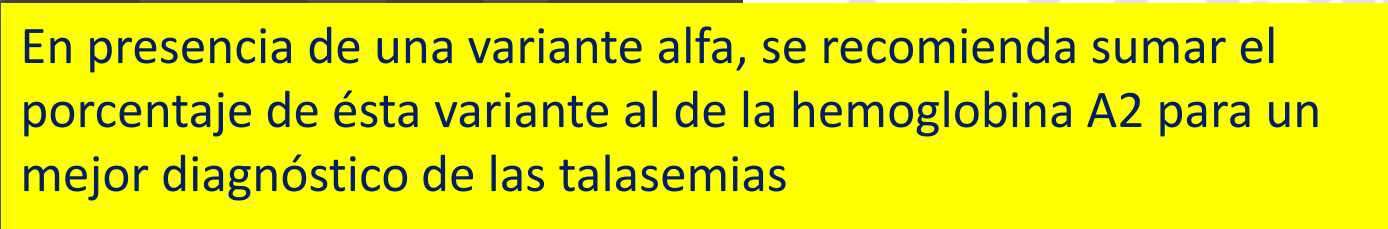
- Electroforesis en geles de agarosa (acido-alcalino)
- HPLC
- Test del Sickling
- Desnaturalización con Isopropanol para Hb inestables
- Desnaturalización alcalina para confirmar la presencia de HbF

- Edad
- Sexo
- Origen étnico
- Historia familiar

Variante de hemoglobina delta



El valor real de HbA2 es $1,7\% + 1,2\% = 2,9\%$ VALOR NORMAL



El valor real de HbA2 es 2,1% + 0,6% = 2,7% VALOR NORMAL

Pico adicional en Z(C): Hb Constant Spring o proteínas plasmáticas?

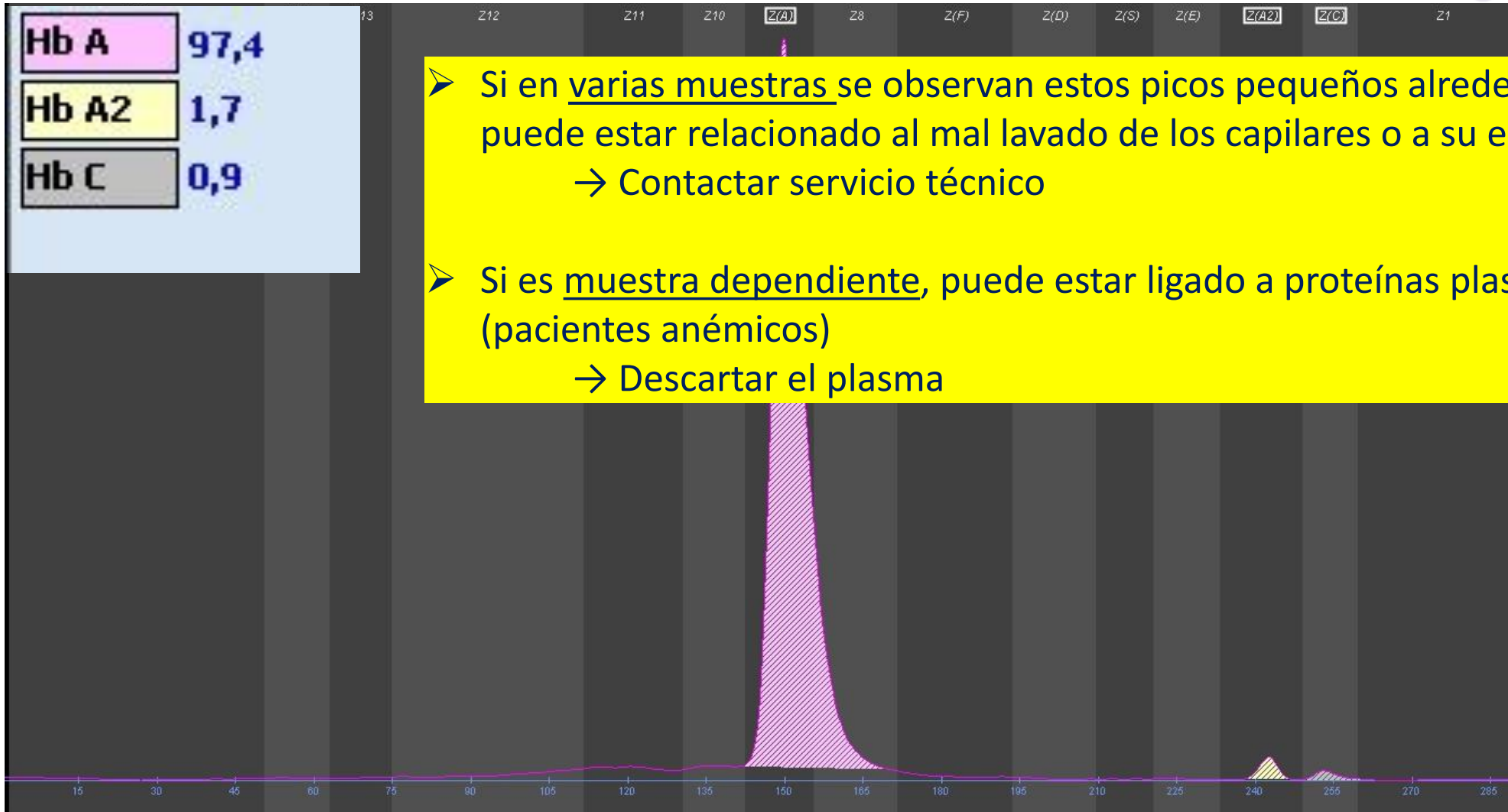
Hb A	97
Hb A2	2,1
Hb C zor	0,9

El análisis de los glóbulos rojos sin proteínas plasmáticas, permitirá confirmar la presencia de ésta variante:

- 1) Centrifugue la sangre total y elimine el plasma
- 2) Mezcle 50 µL de glóbulos rojos y 400 µL de solución hemolisante
- 3) Agite en vortex 5 segundos
- 4) Dispense 100 µL del hemolisado preparado en el pocillo de un segmento de dilución
- 5) Coloque el segmento en un rack F0 e introdúzcalo en el instrumento
- 6) Seleccione en la ventana que aparecerá en pantalla «Sample» en «dilución manual» y valide

Hb Constant Spring?

Picos adicionales alrededor de HbA2: Proteínas plasmáticas o problema de lavado de los capilares?



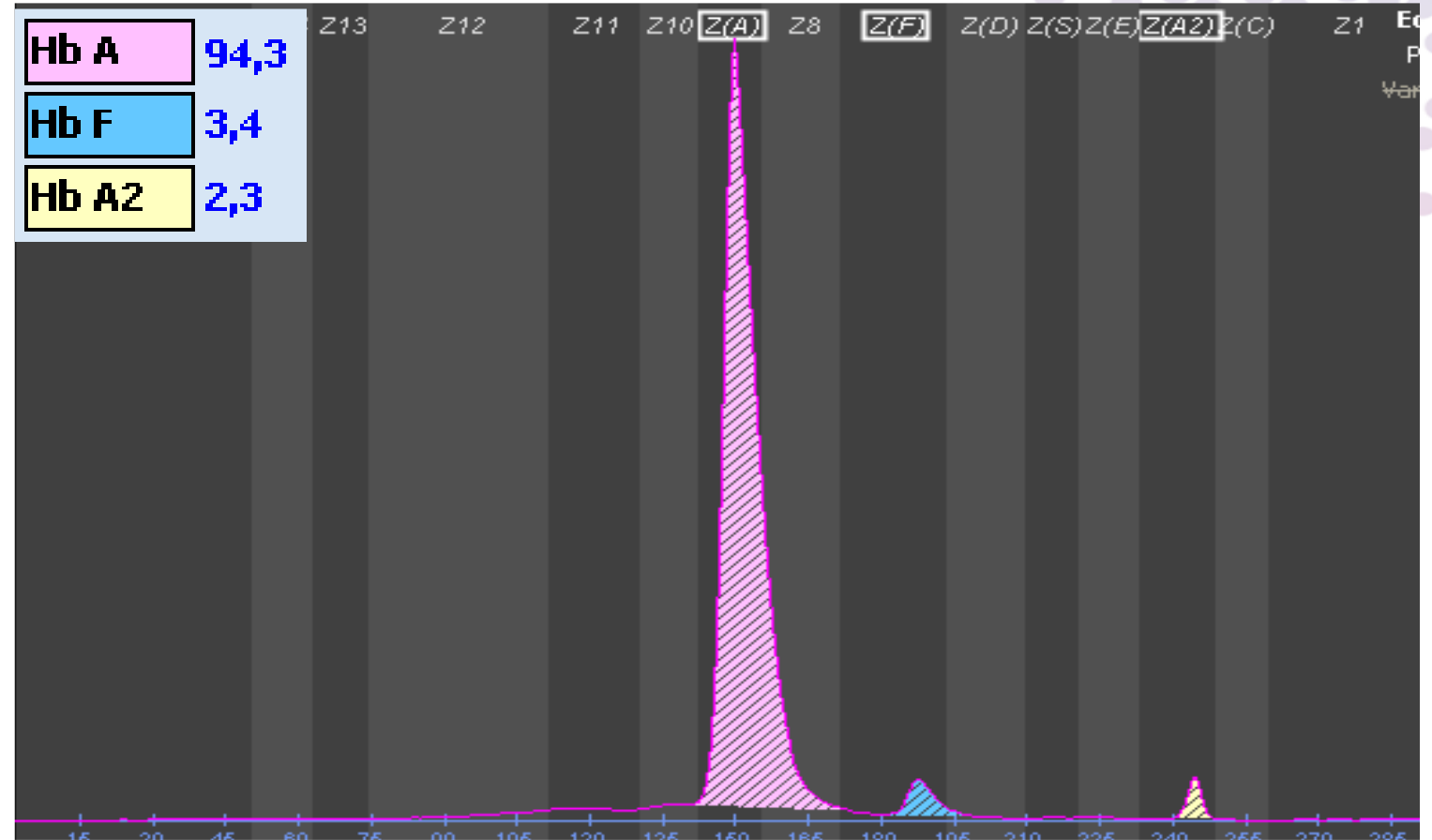
HbF aumentada

HbF 1-5%

- HbA2 Normal
- MCH >27pg

- Embarazo
- Diabetes
- Hipertiroidismo
- Quimioterapia

Leve Persistencia
hereditaria de HbF en
el adulto (HPFH)



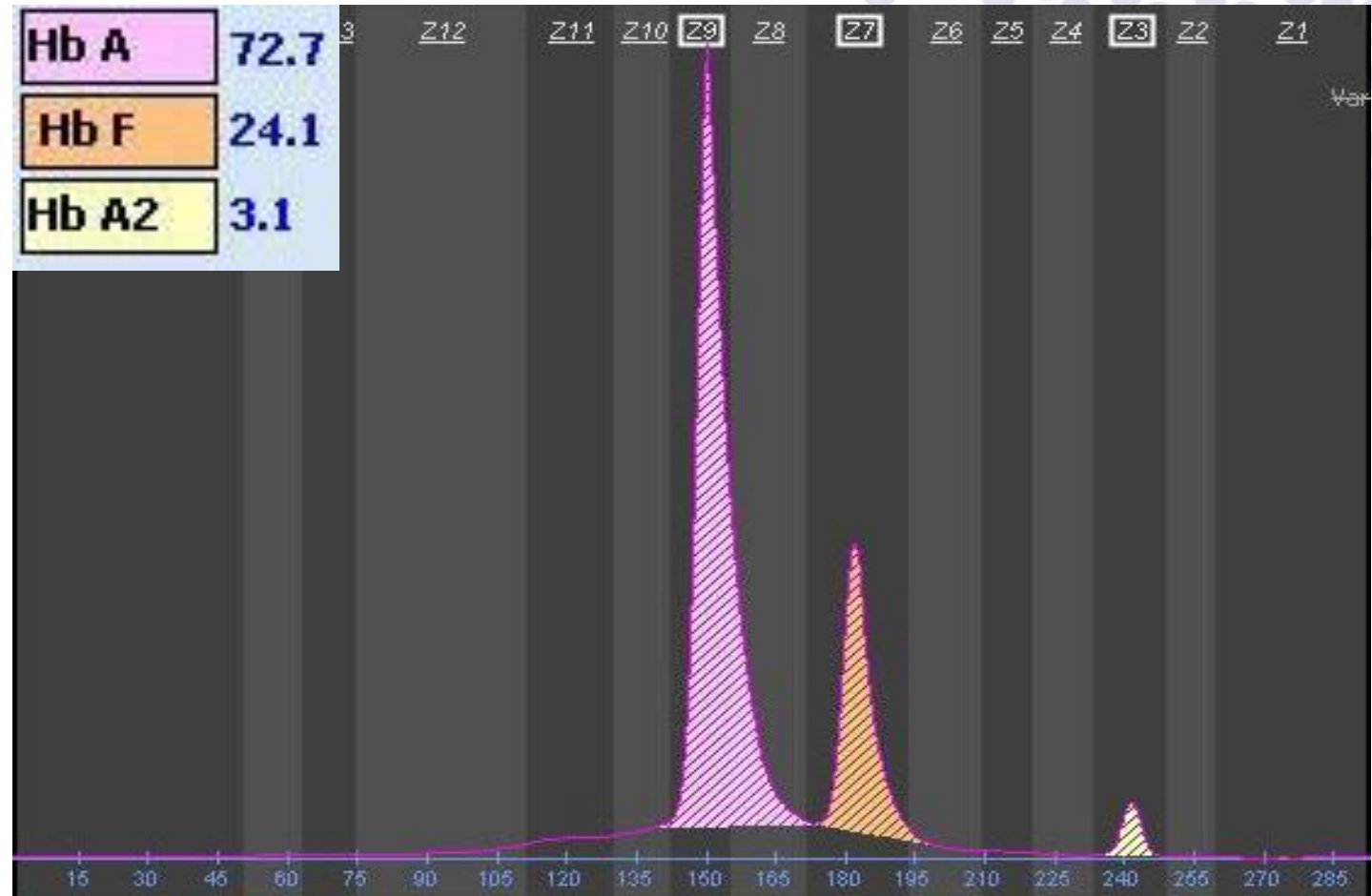
HbF aumentada

HbF 5-35%

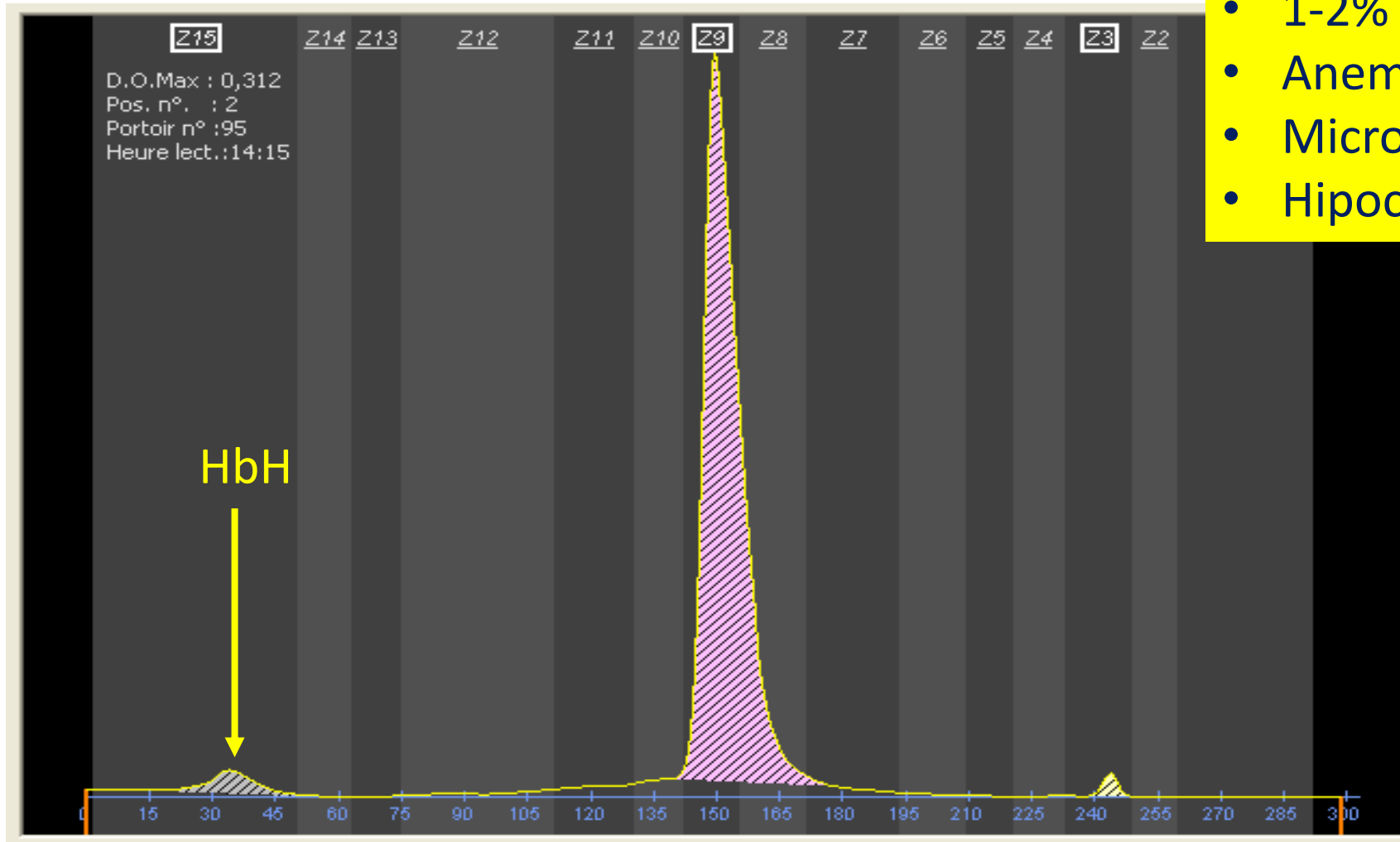
- HbA2 Normal o ↓

→ **δβ-thalassemia heterocigota**
Hb F% (5-15%), MCH <27pg

→ **Persistencia hereditaria de HbF en el adulto (HPFH)**
Hb F% (15-35%), MCH normal

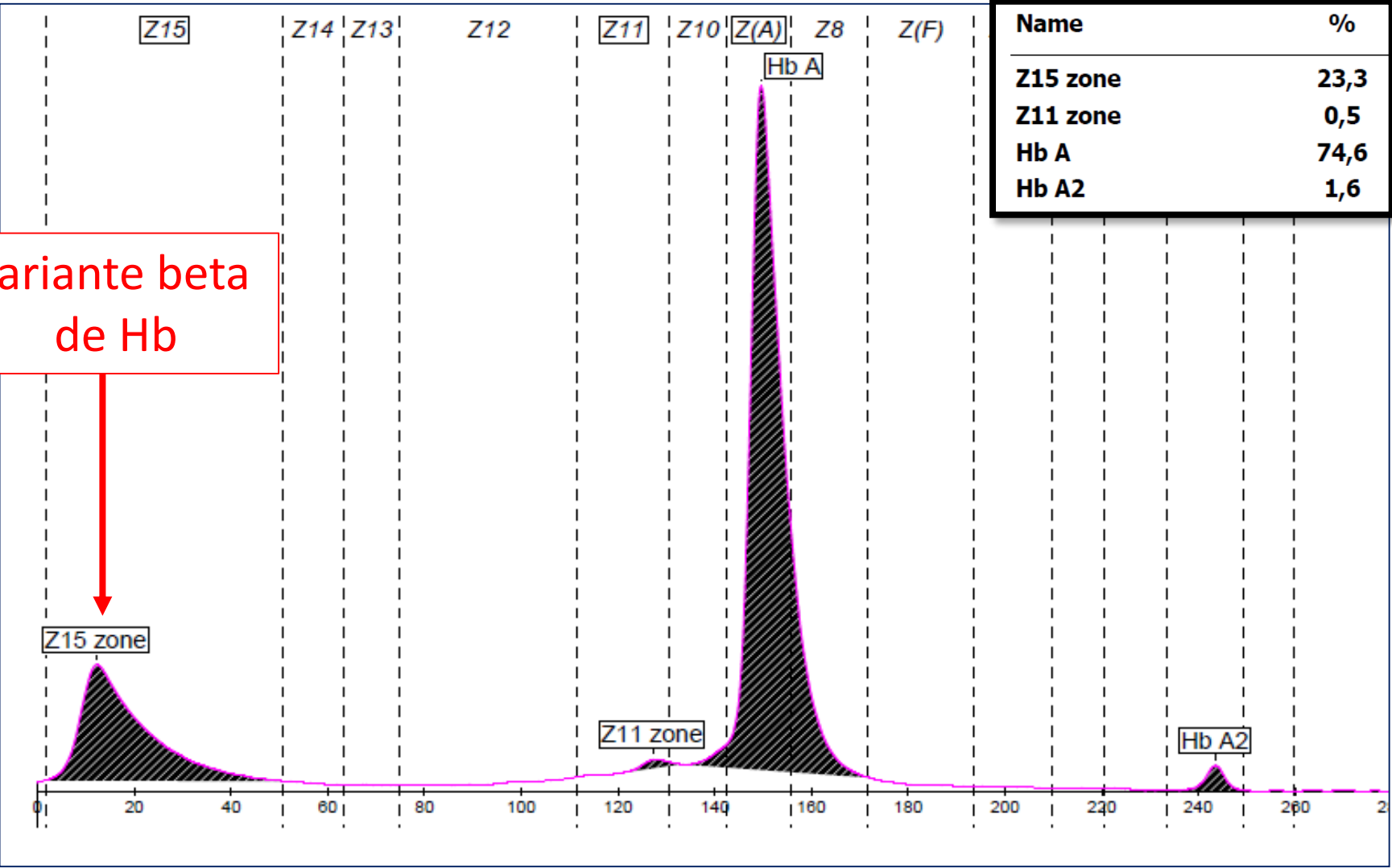


HbH (β4)



- 1-40% HbH en el adulto
- 1-2% HbA2
- Anemia hemolitica
- Microcitosis
- Hipocromia

No todo lo que migra en Z15 es Hb H

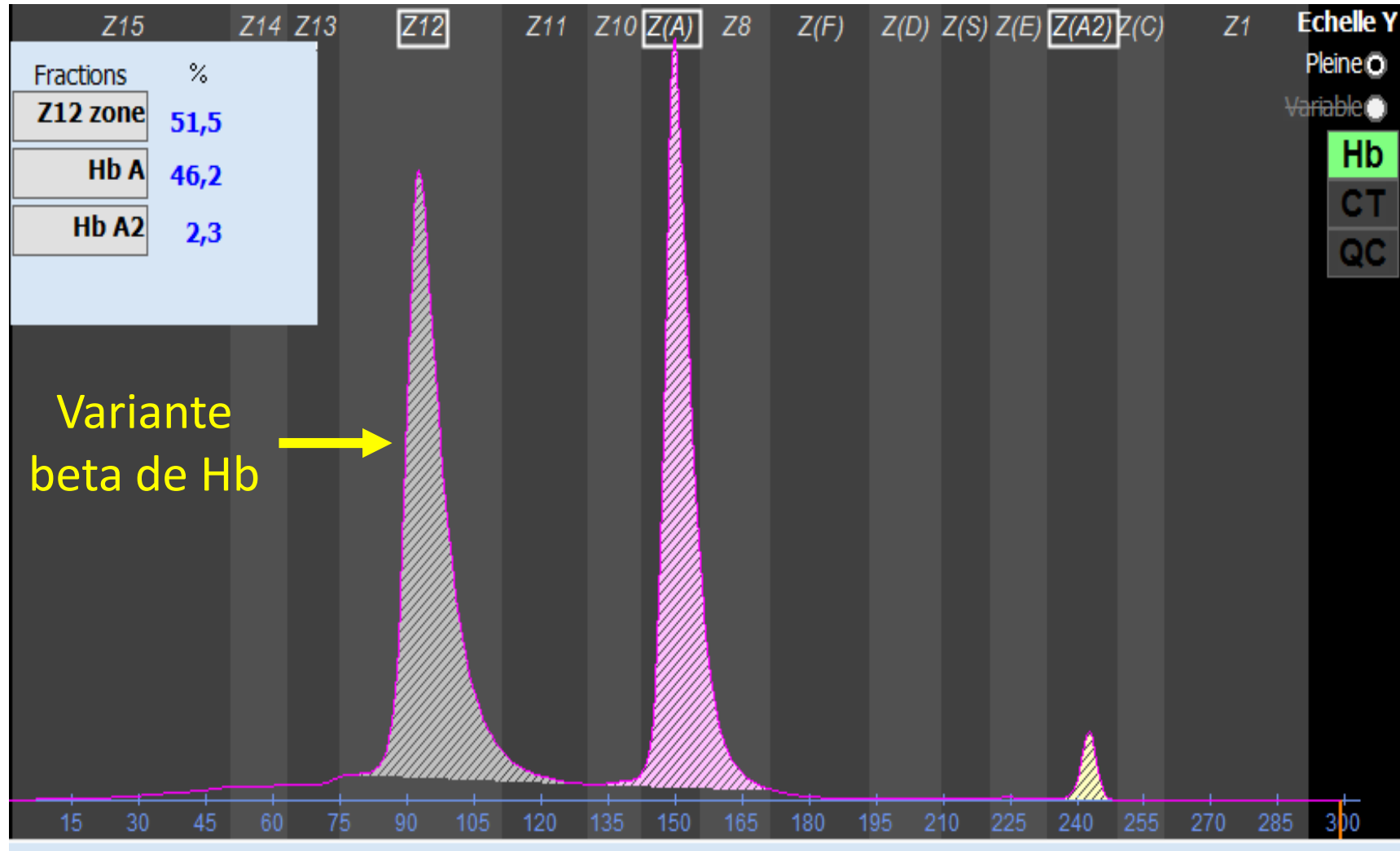


- ✓ HbA2 disminuida
- ✓ Hemograma normal



Presencia de una variante beta de Hb en Z15

No todo lo que migra en Z12 es Hb Bart's



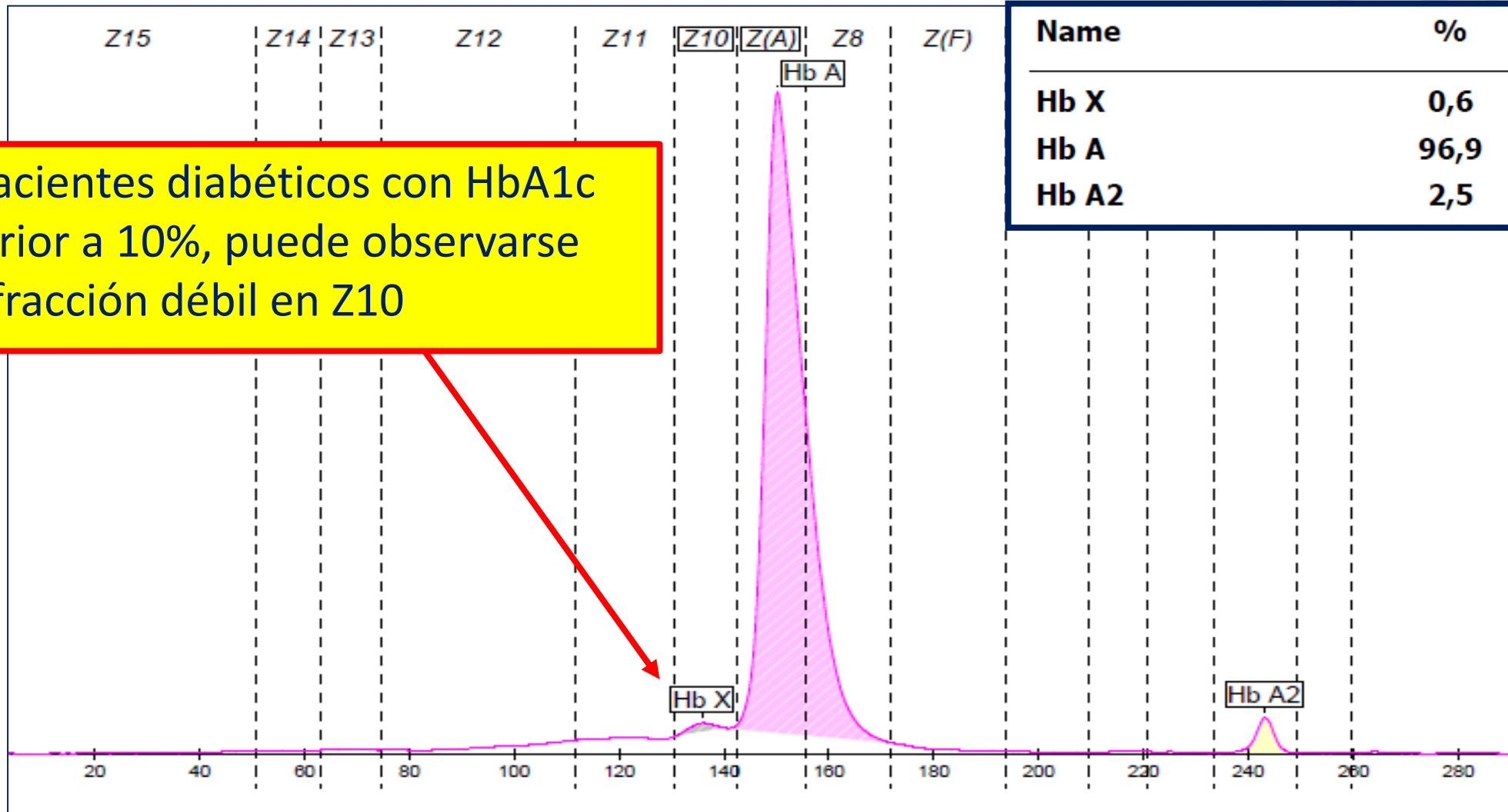
- Ausencia de HbF
- HbA2 normal
- Hemograma normal



Presencia de una variante beta de Hb en Z12

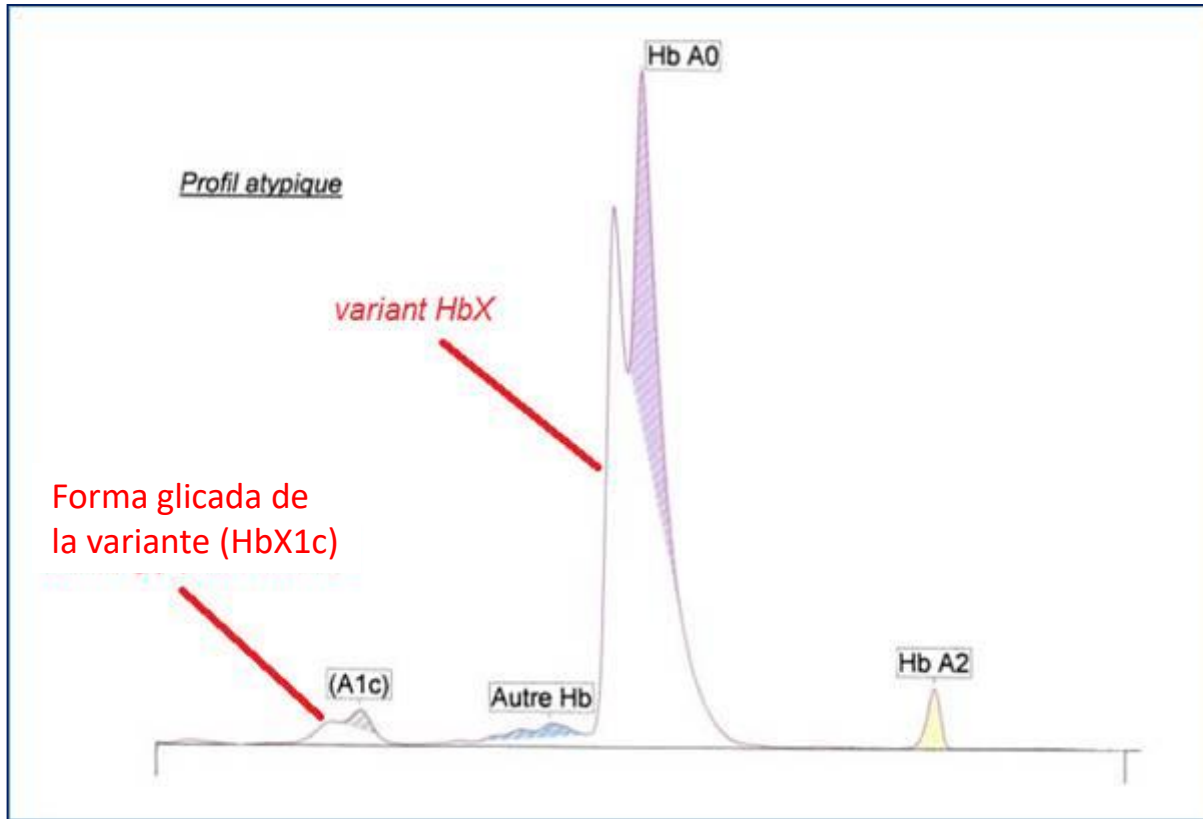
Pico adicional en Z10

En pacientes diabéticos con HbA1c superior a 10%, puede observarse una fracción débil en Z10



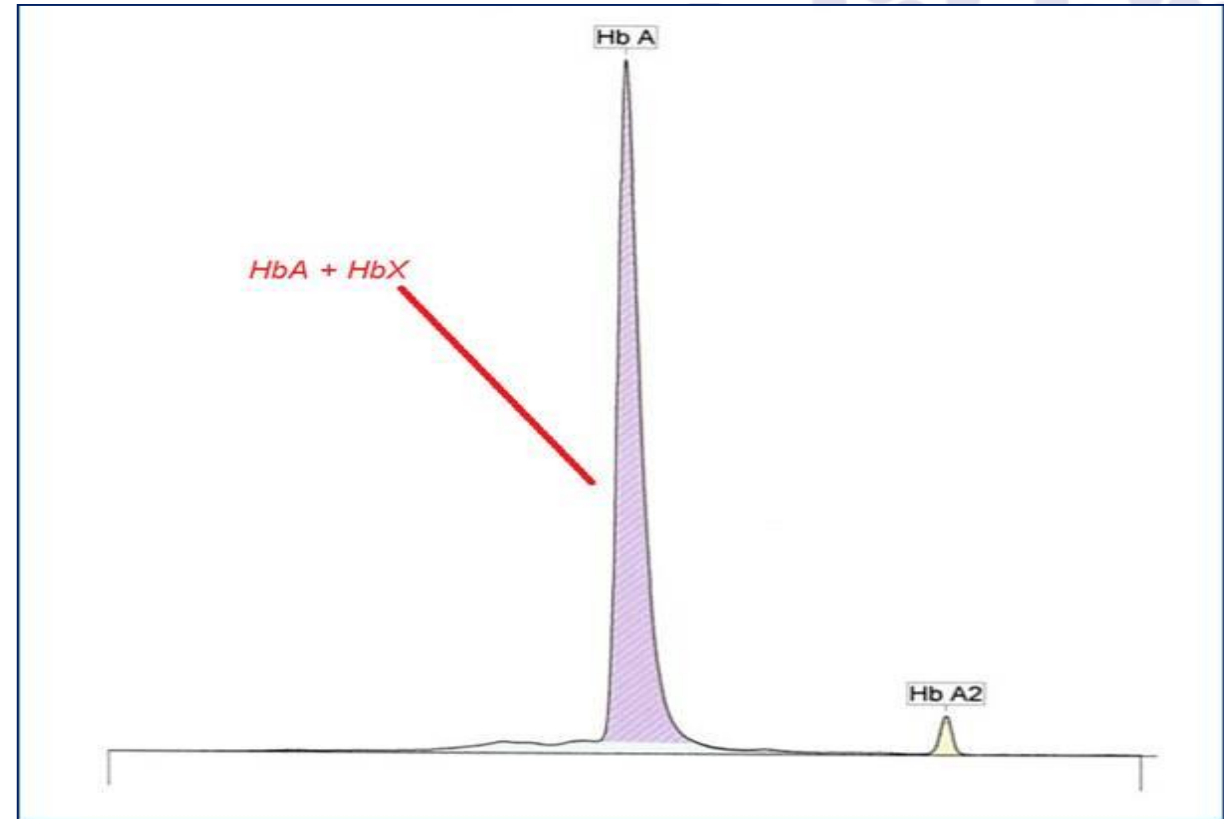
Diferencia de migración entre las técnicas HbA1c y Hb

TECNICA HbA1c



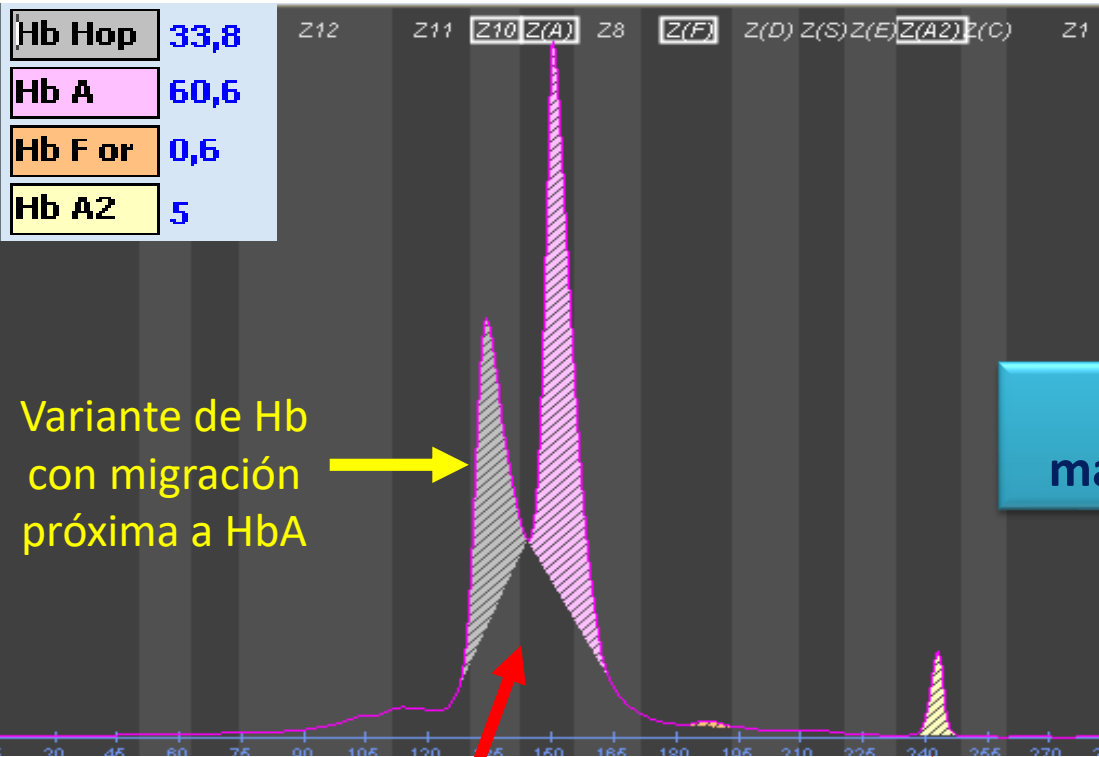
Presencia de una variante de la hemoglobina que migra próxima a la HbA0 y su forma glicada próxima a la HbA1c

TECNICA Hb



Debido a la diferencia de composición del tampón de HbA1c, la movilidad electroforética de la variante, es diferente, co-migrando perfectamente con la HbA, razón por la cual no es detectada → Se recomienda realizar genotipificación para identificar la variante

Cuantificación manual en Phoresis

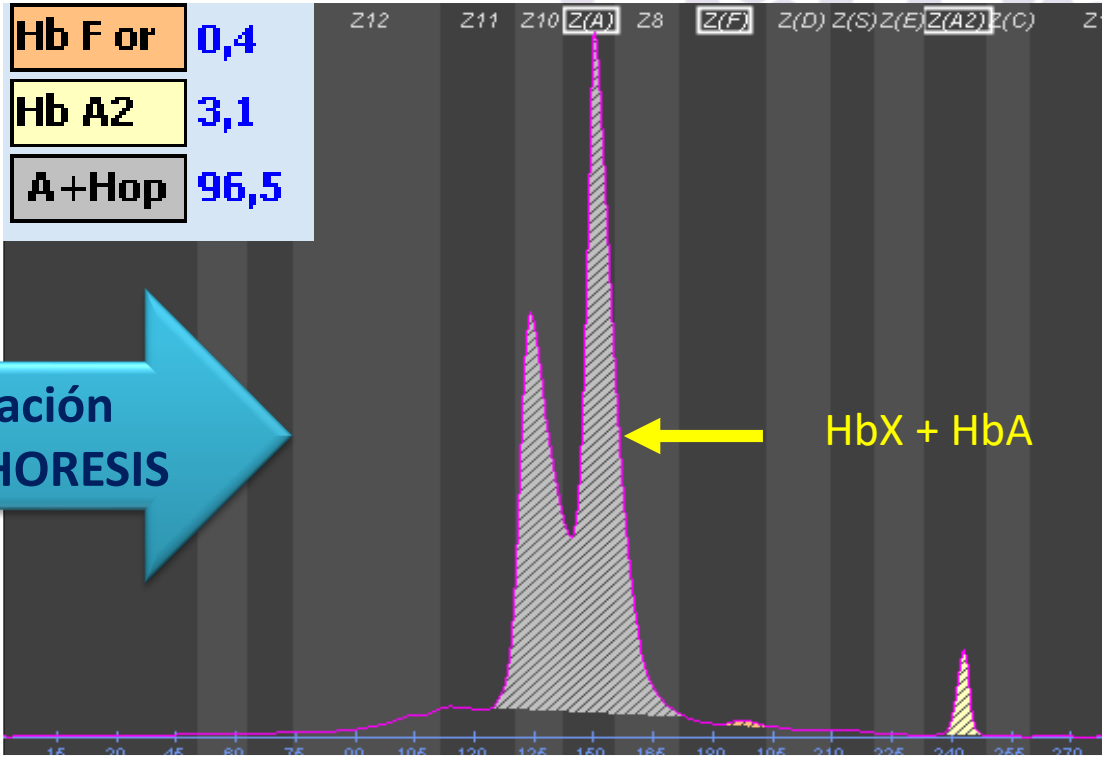


Variante de Hb con migración próxima a HbA

HbA2 sobreestimada

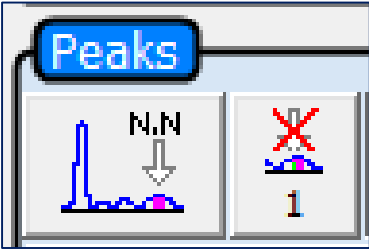
HbA y HbX subestimadas

Re cuantificación manual con PHORESIS



HbX + HbA

Valor real HbA2

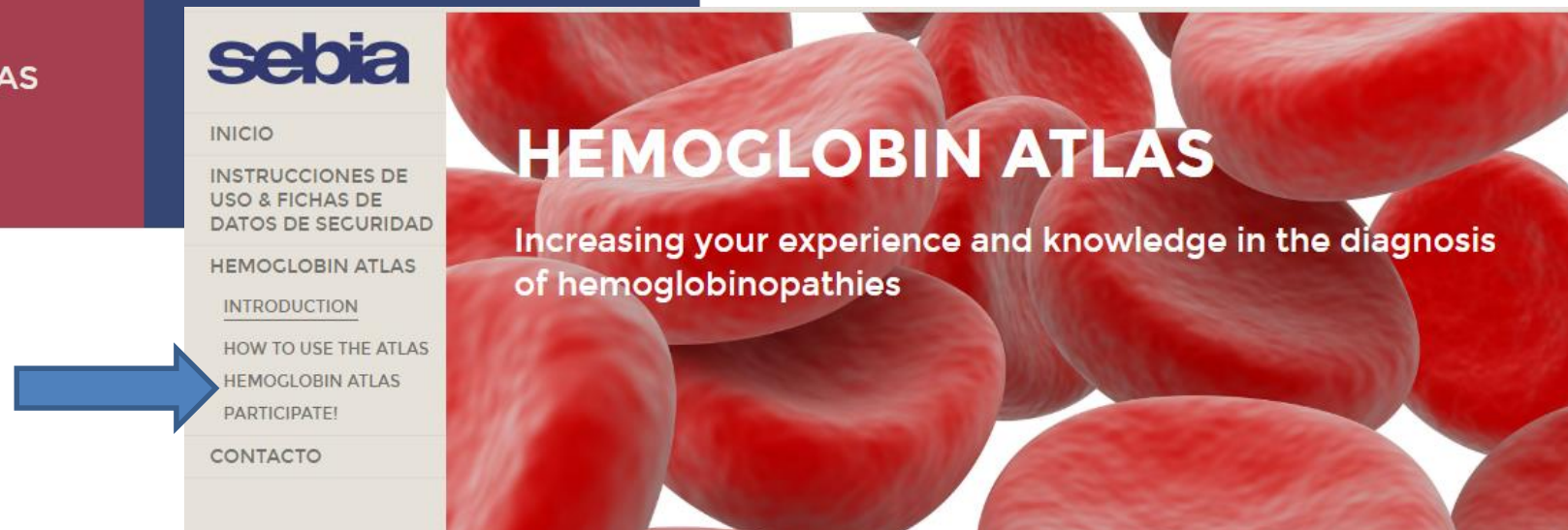


Valores de referencia en niños

* Wong ECC¹, et al. Normal Pediatric Reference Intervals for Hemoglobins A, F, and A2 Using Capillary Zone Electrophoresis Methodology. Published abstract and poster presented at the 2009 meeting of the ISLH.

Results			
Age Interval (n)	Hb A (%) ¹	Hb F (%) ¹	Hb A2 (%) ¹
0-6 days (47)	4.7-24.3	79.4-97.9	0.0-0.0
7-14 days (17)	6.6-38.3	66.0-98.4	0.0-0.4
15-45 days (28)	8.1-62.7	49.9-98.4	0.0-1.8
45 days to 3 months (32)	37.3-88.8	10.3-64.6	0.3-2.4
3-6 months (29)	67.0-96.7	5.2-34.5	1.7-2.7
6-9 months (21)	82.4-98.8	1.1-28.5	2.0-3.0
9-15 months (35)	91.9-98.7	0.2-9.9	2.2-3.2
15 months to 2 years (22)	94.9-97.8	0.0-5.5	2.4-3.1
2-6 years (92)	95.9-97.9	0.0-1.6	2.2-3.2
6-17 years (43)	96.4-98.2	0.0-0.0	1.9-3.3
≥18 years (78)	96.8-97.5	0.0-0.0	2.4-2.9
¹ Represents 2.5 th to 97.5 th percentiles			

ATLAS DE HEMOGLOBINAS: <https://extranet.sebia.com/>



ATLAS DE HEMOGLOBINAS: <https://extranet.sebia.com/>

Hemoglobin Atlas

Search by name



Migration position on x-axis

Frequency

Common pattern

Less common pattern

Rare pattern

Type(s) of mutation

Alpha mutation

Beta mutation

Delta mutation

Gamma mutation

Thalassemia

Other

☒ The result will contain AT LEAST one of the selected elements

☐ The result will contain ALL selected elements

Migration Zone(s)

No zone

Z1

Z2 = Z(C)

Z3 = Z(A2)

Z4 = Z(E)

Z5 = Z(S)

Z6 = Z(D)

☒ The result will contain AT LEAST one of the selected elements

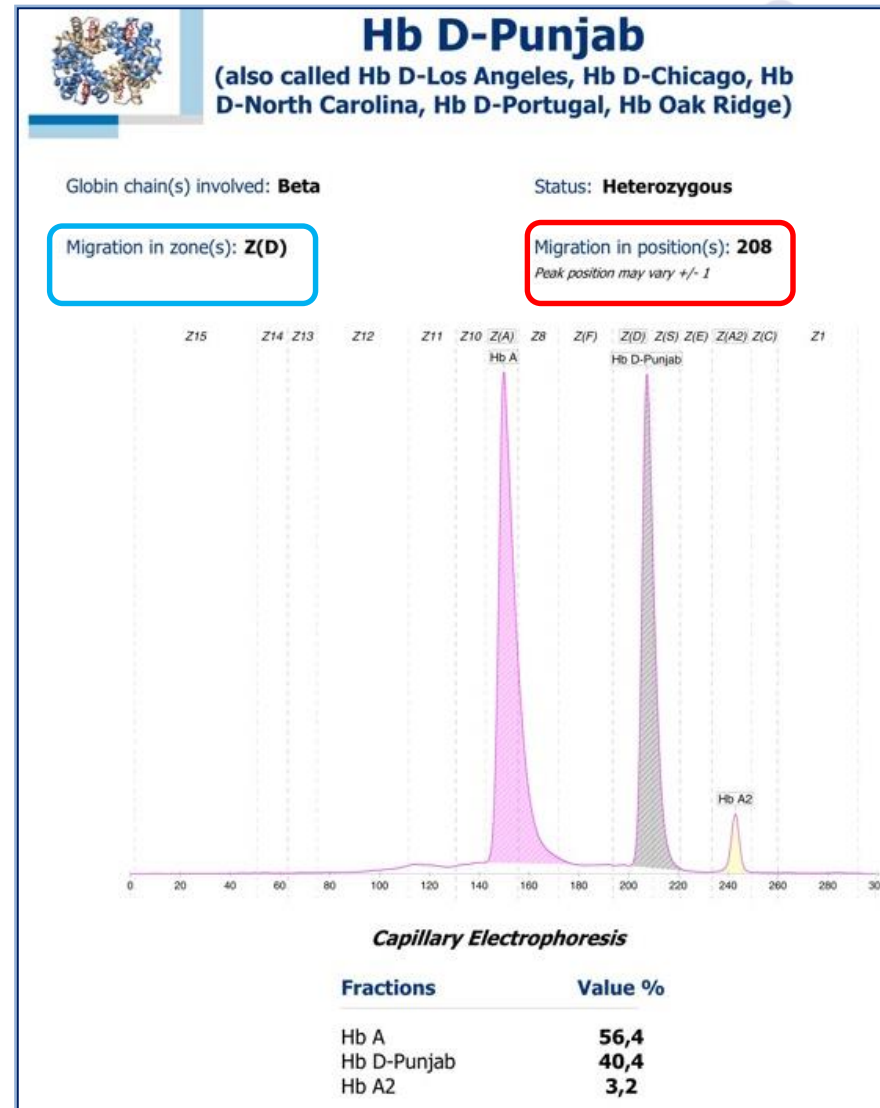
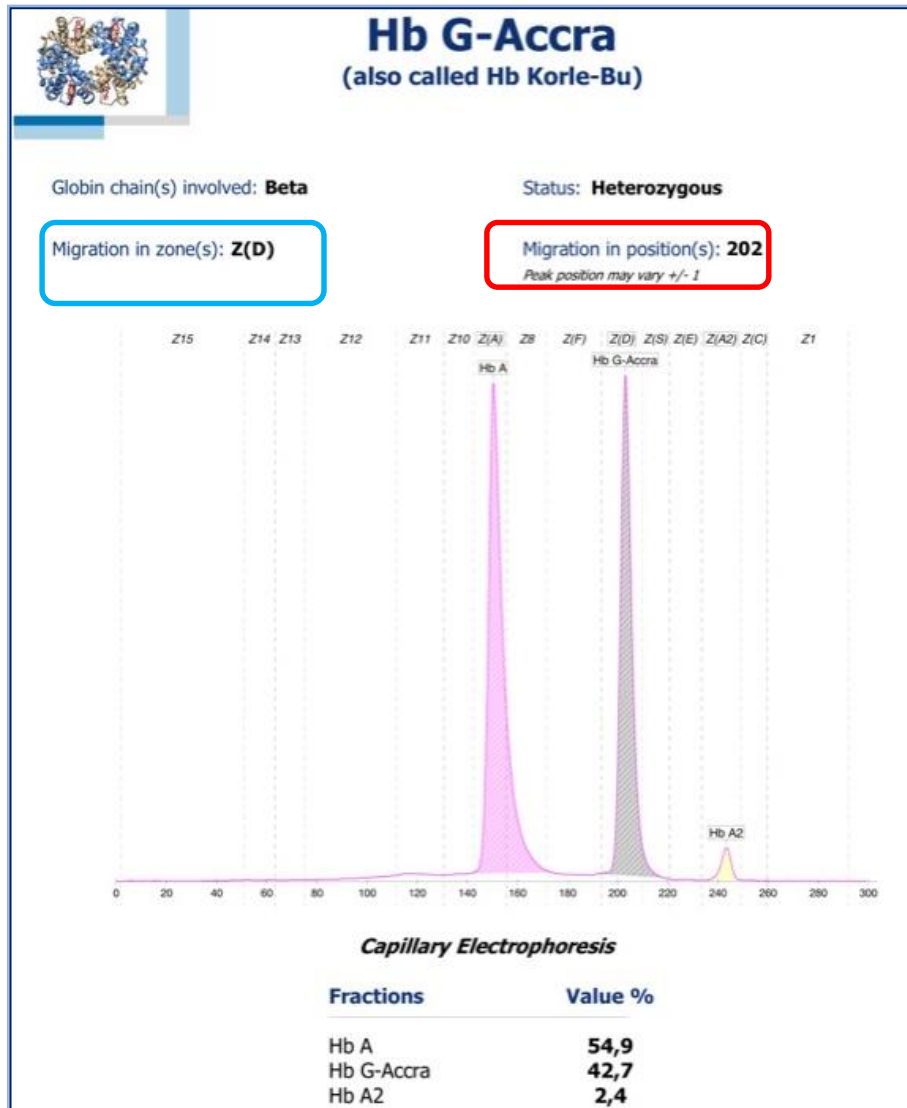
☐ The result will contain ALL selected elements

Restablecer

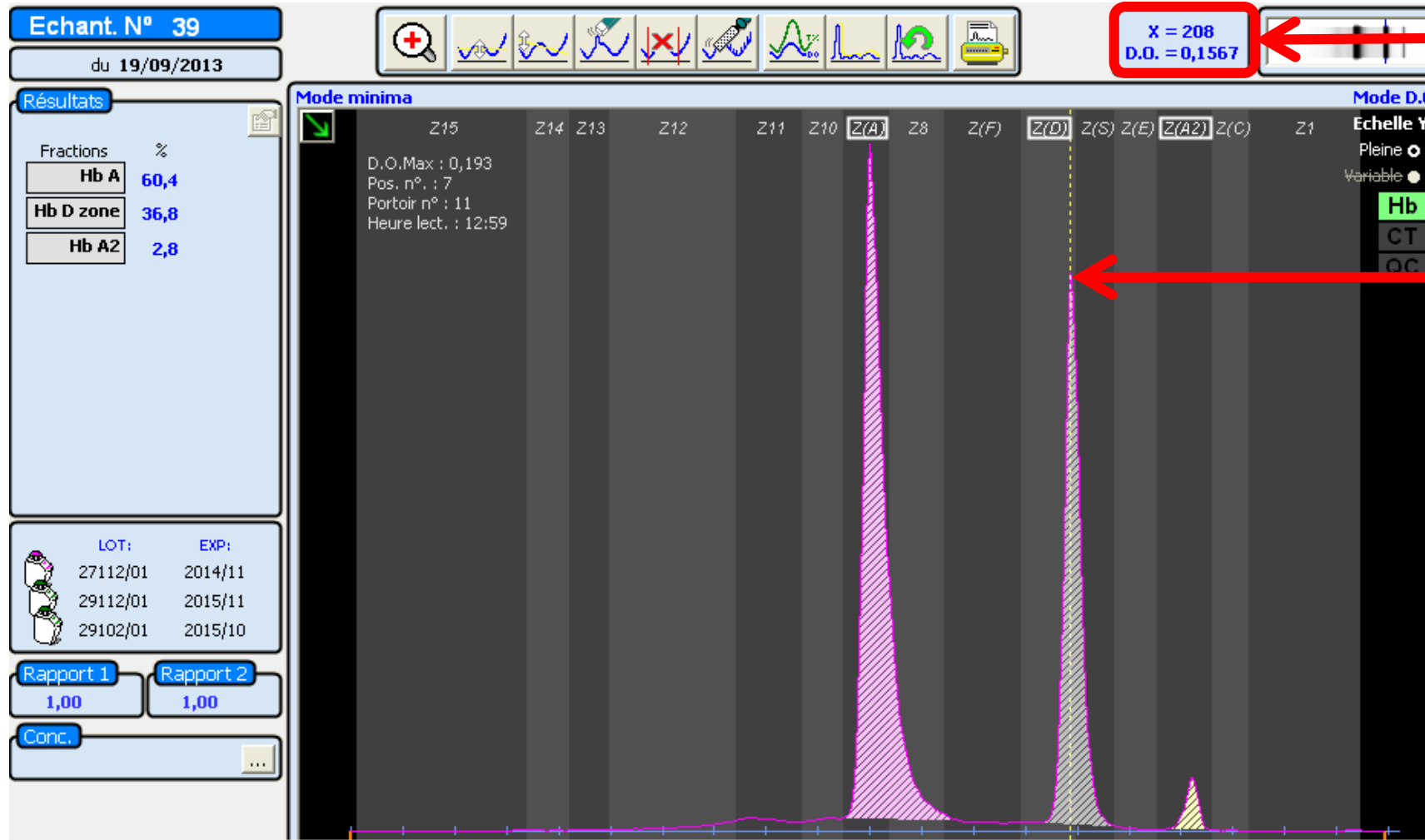
Aplicar



ATLAS DE HEMOGLOBINAS: <https://extranet.sebia.com/>



Como definir la posición de migración de una variante?



Leer la posición del pico

Colocar el cursor en la punta de la variante

sebia

Gracias por su atención



sebia