

Nieves SANZ
Asesora Científica

ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINAS

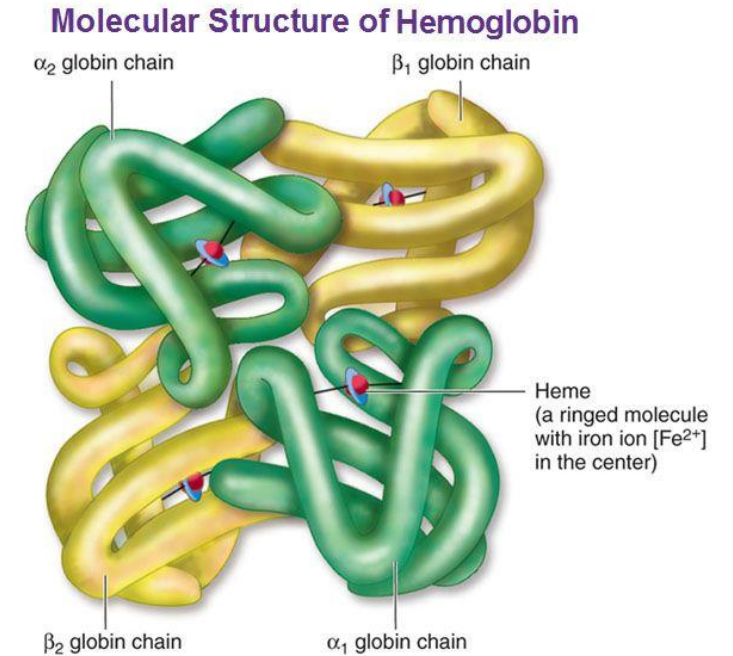
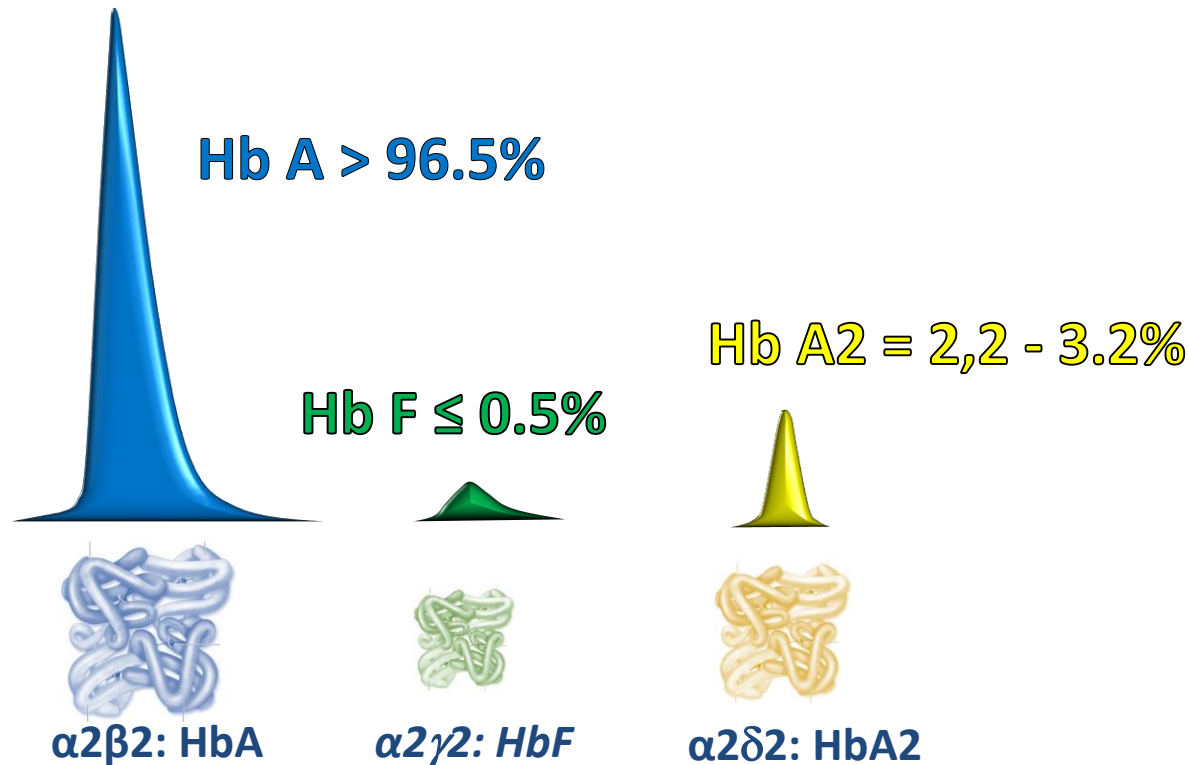
Interpretación de resultados



The new language of life

Estructura de la hemoglobina

- La hemoglobina es una molécula compleja compuesta por cuatro tipos de cadenas de globina (α , β , δ , γ)



Electroforesis de hemoglobinas

- Separación de las hemoglobinas, permite investigar:
 - **Anomalías cualitativas (o estructurales) → HEMOGLOBINOPATIAS**
 - **Anomalías cuantitativas (o de síntesis) → TALASEMIAS**

¿Cuándo se solicita el análisis de hemoglobina?

- Parámetros hematológicos inexplicablemente anormales
- Presencia de anomalías morfológicas (células diana, cuerpos de Heinz ...)
- Estudios familiares durante el embarazo (en países de alto riesgo)
- Programas de prevención: cribado prematrimonial, cribado neonatal (en países de alto riesgo)

Elementos necesarios para establecer un diagnóstico de hemoglobinopatías / talasemias:

- ✓ Electroforesis de hemoglobina
- ✓ Parámetros hematológicos (Hb total, MCV, MCH...)
- ✓ Perfil férrico (hierro, transferrina, ferritina ...)
- ✓ Búsqueda de anomalías morfológicas

Electroforesis de Hb: Control de calidad





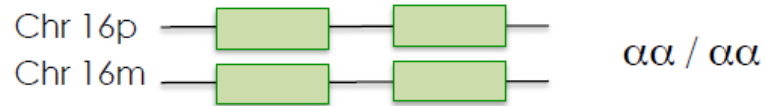
Alfa talasemia

sebia 
The new language of life

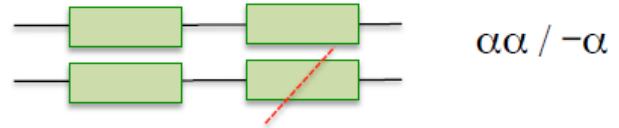
Alfa talasemia: Clasificación



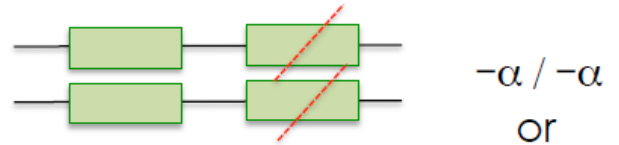
GENES ALFA



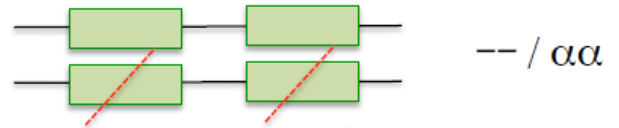
Normal



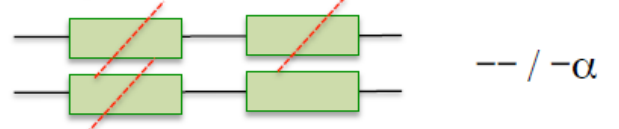
Alfa talasemia silente



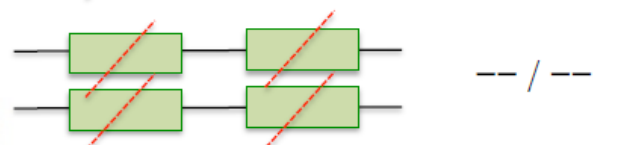
Alfa talasemia menor (Rasgo talasemico)



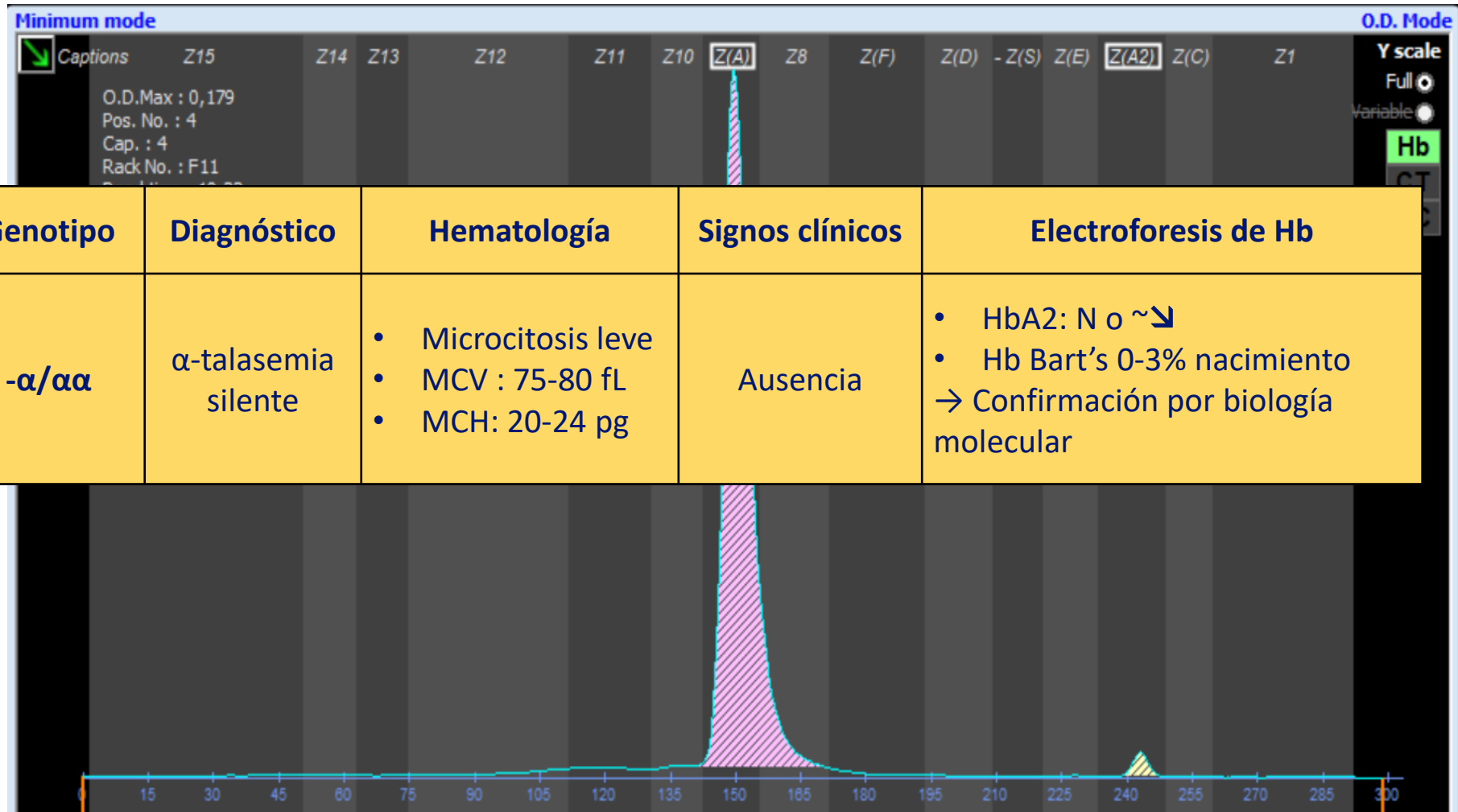
Alfa talasemia mayor (Enfermedad de la HbH)



Sindrome de *Hidrops fetalis*



Alfa talasemia silente



Genotipo	Diagnóstico	Hematología	Signos clínicos	Electroforesis de Hb
$-\alpha/\alpha$	α -talasemia silente	<ul style="list-style-type: none"> • Microcitosis leve • MCV : 75-80 fL • MCH: 20-24 pg 	Ausencia	<ul style="list-style-type: none"> • HbA2: N o ~\searrow • Hb Bart's 0-3% nacimiento <p>→ Confirmación por biología molecular</p>

O.D. Mode

Y scale
Full
Variable
Hb

Patient data

Age: 47
Depart.: ONCOLOGICO
ID : 20001062264C2

Peaks

Auto-place

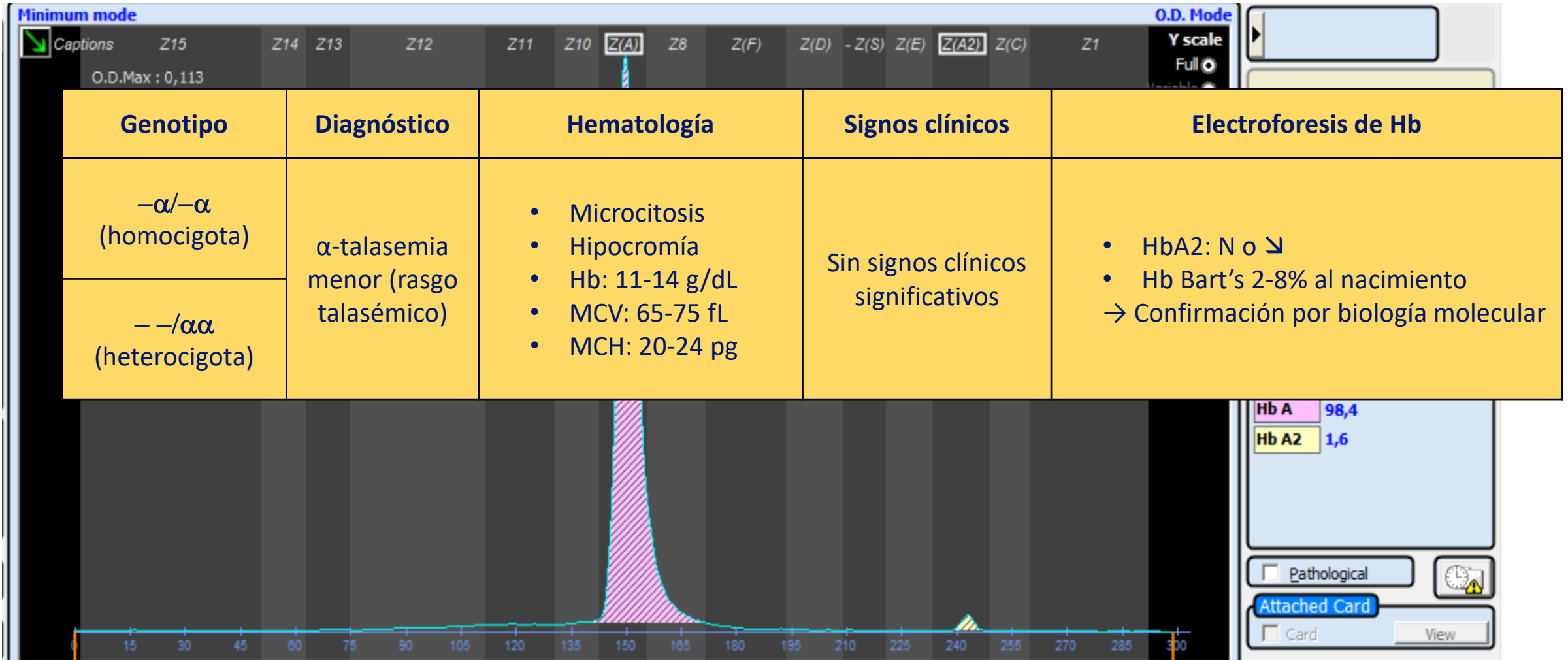
Hb A 98
Hb A2 2

Pathological

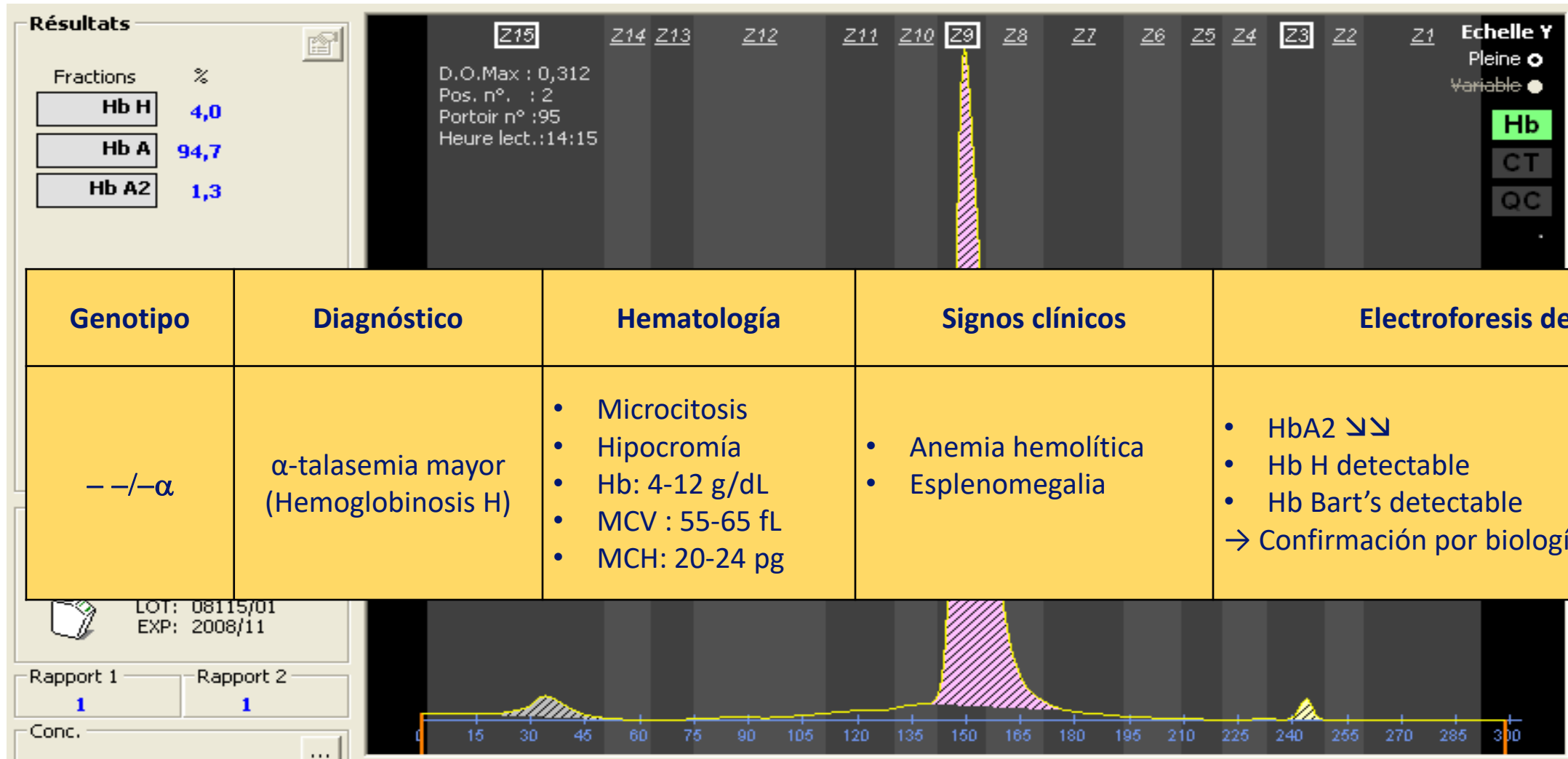
Attached Card

Card View

Alfa talasemia menor



Alfa talasemia mayor

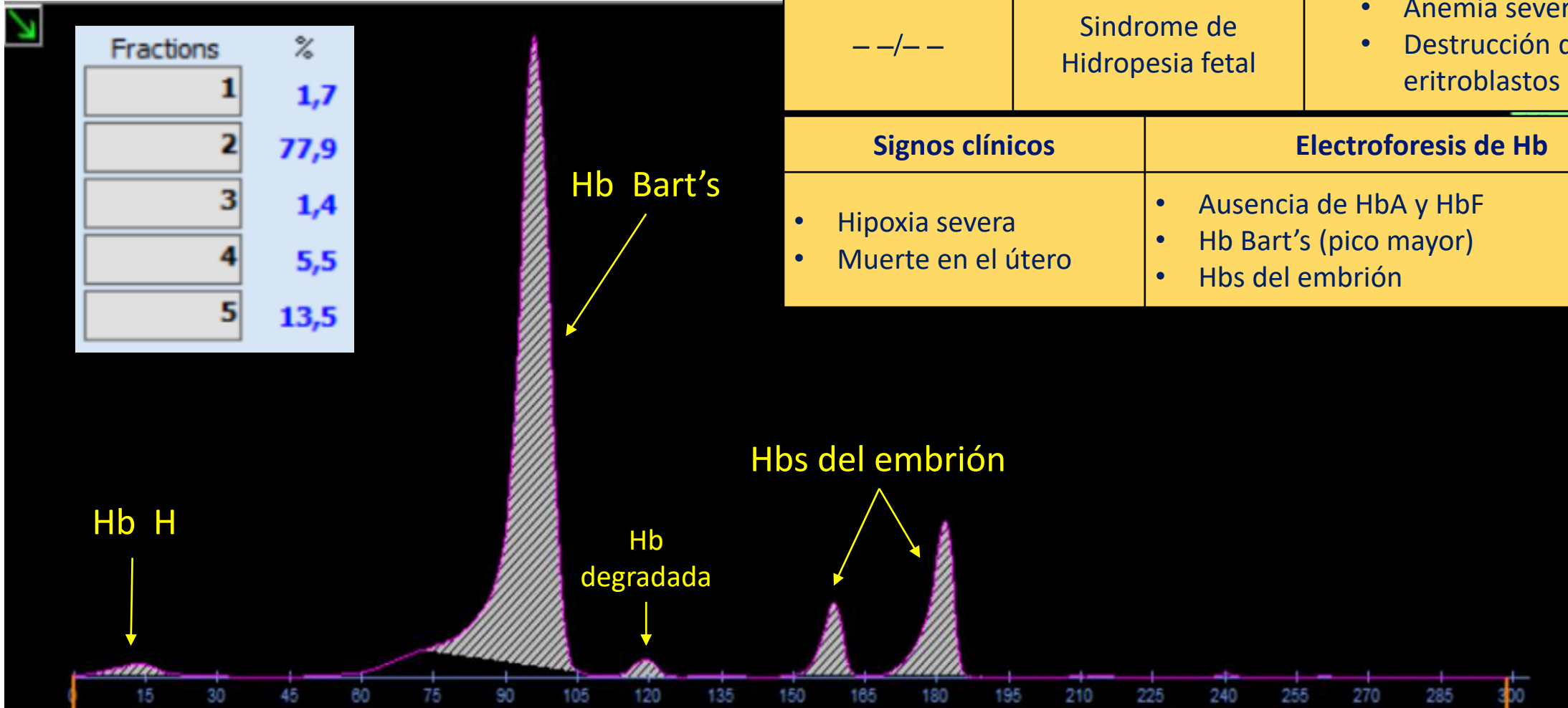


Alfa talasemia mayor



Hydrops fetalis

Genotipo	Diagnóstico	Hematología
--/--	Síndrome de Hidropesía fetal	<ul style="list-style-type: none"> Anemia severa Destrucción de eritroblastos
Signos clínicos	Electroforesis de Hb	
<ul style="list-style-type: none"> Hipoxia severa Muerte en el útero 	<ul style="list-style-type: none"> Ausencia de HbA y HbF Hb Bart's (pico mayor) Hbs del embrión 	

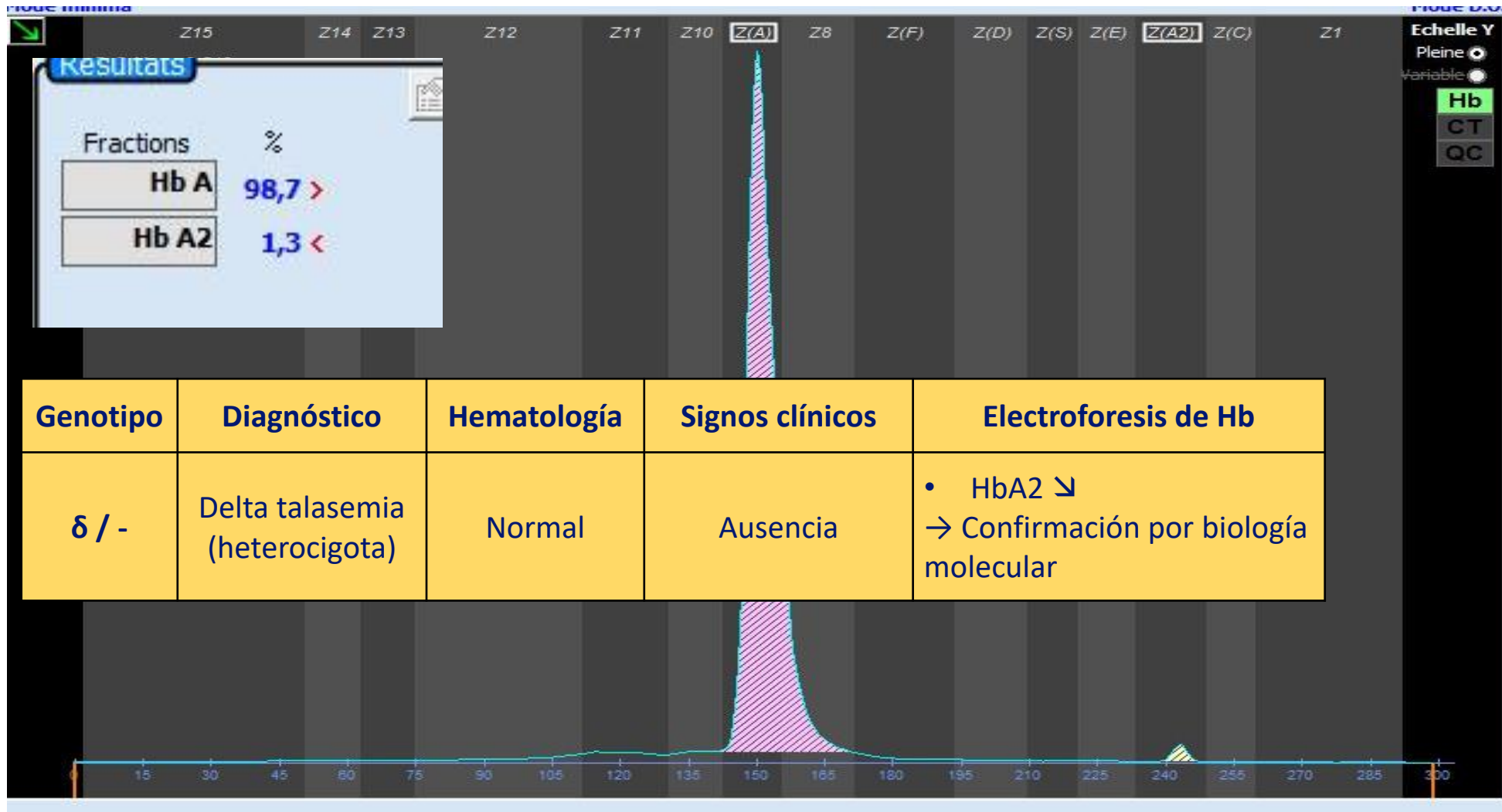
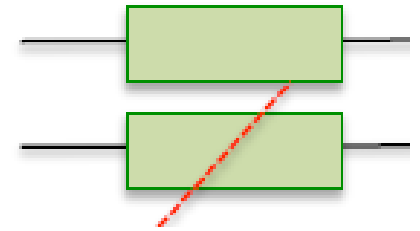




Delta talasemia

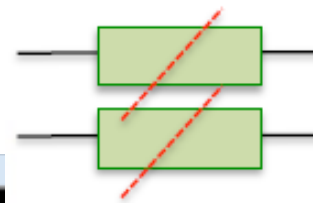
Delta talasemia (heterocigota)

δ genes



Delta talasemia (homocigota)

δ genes



Fraction values

Names	%
Hb A	100,0

Minimum mode

O.D.Max : 0,341
 Pos. No. : 5
 Cap. : 5
 Rack No. : F13
 Read time : 08:49

Y scale

Full

Variable

Hb

CT

QC

⚠

Genotipo	Diagnóstico	Hematología	Signos clínicos	Electroforesis de Hb
- / -	Delta talasemia (homocigota)	Normal	Ausencia	<ul style="list-style-type: none"> Ausencia de HbA2 → Confirmación por biología molecular

LOT:	EXP:
21059/80	2022/05
01079/01	2022/07
03079/01	2022/07

Ratio 1
1,00

Ratio 2
1,00

Conc.

15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 195 210 225 240 255 270 285 300



Atención

sebia 
The new language of life

Posibles fuentes de interpretación incorrecta

Fuente	Que hacer?
La HbA2 es baja en los niños pequeños	Se debe tener en cuenta la edad del paciente

* 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

¹Represents 2.5th to 97.5th percentiles

**Valores de referencia
en niños**

¹ Children's National Medical Center, George Washington University School of Medicine and Health Sciences, Washington, DC

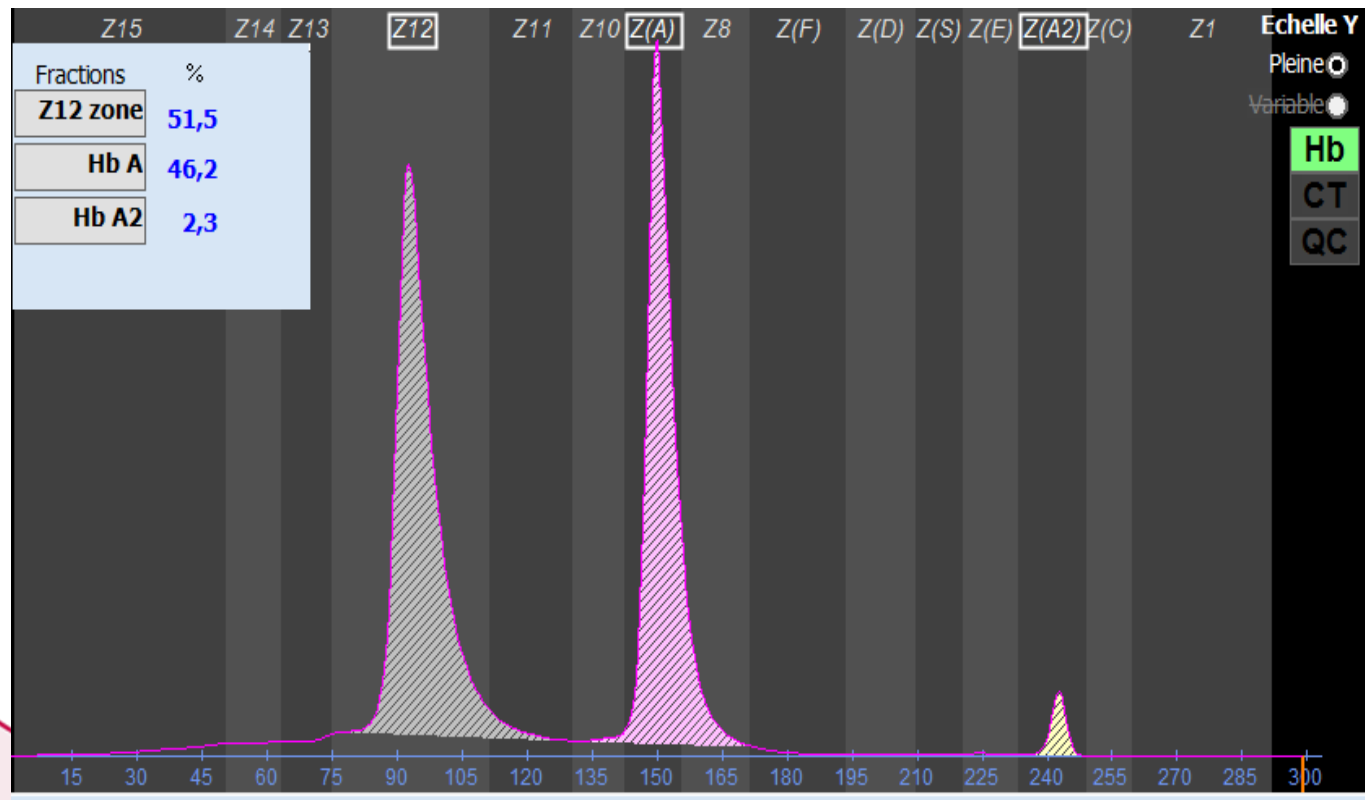


Posibles fuentes de interpretación incorrecta

Fuente	Que hacer?
La deficiencia de hierro conduce a disminución de HbA2 y microcitososis	El perfil férrico del paciente permite distinguir entre la deficiencia de hierro y la alfa talasemia menor
La δ-talasemia conduce a la disminución de HbA2	La δ -talasemia es asintomática y los parámetros hematológicos son normales

Posibles fuentes de interpretación incorrecta

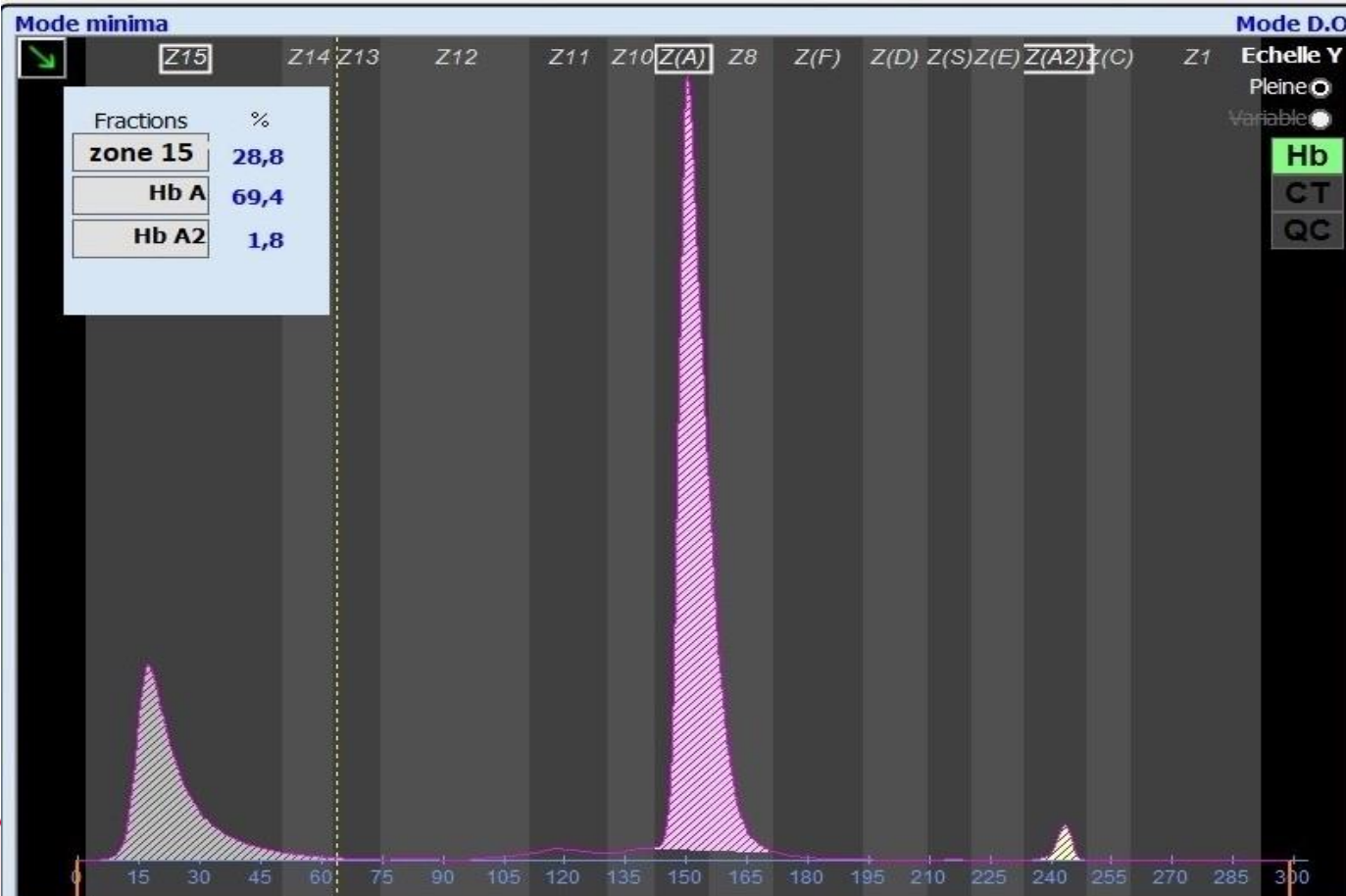
Fuente	Que hacer?
Variante de hemoglobina que migra en Z12 se puede confundir con Hb Bart's	Verificar si los parámetros hematológicos y la concentración de HbA2 son compatibles con alfa talasemia



- HbA2 normal
- Parámetros hematológicos normales
- HbF no detectable (las cadenas γ no están expresadas)
- **Conclusión:** Presencia de una variante de hemoglobina

Posibles fuentes de interpretación incorrecta

Fuente	Que hacer?
Variante de hemoglobina que migra Z15 se puede confundir con Hb H	Verificar si los parámetros hematológicos y la concentración de HbA2 son compatibles con alfa talasemia



Parámetros hematológicos: NORMALES

- HB 15,8 g/dL
- MCV 88 fL
- MCH 29 pg

➤ HbA2 disminuida

➤ **Conclusión: Presencia de una variante de hemoglobina**



Beta talasemia

sebia 
The new language of life

Beta talasemia

- Disminución de la síntesis de cadenas **beta**
- Afecta la síntesis de la fracción **HbA**
- Para compensar, se aumenta la síntesis de cadenas delta y gamma
 - Aumento de Hb A2 ($\leq 10,5\%$)
 - Aumento de Hb F

Beta talasemia: Clasificación



Normal



β^0 Thal heterozygote
(β Thal minor)



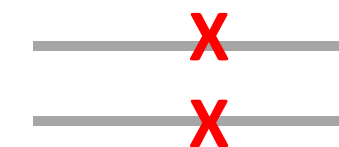
β^+ Thal heterozygote
(silent β Thal)



β^+ / β^0 Thal heterozygote
(β Thal intermedia)

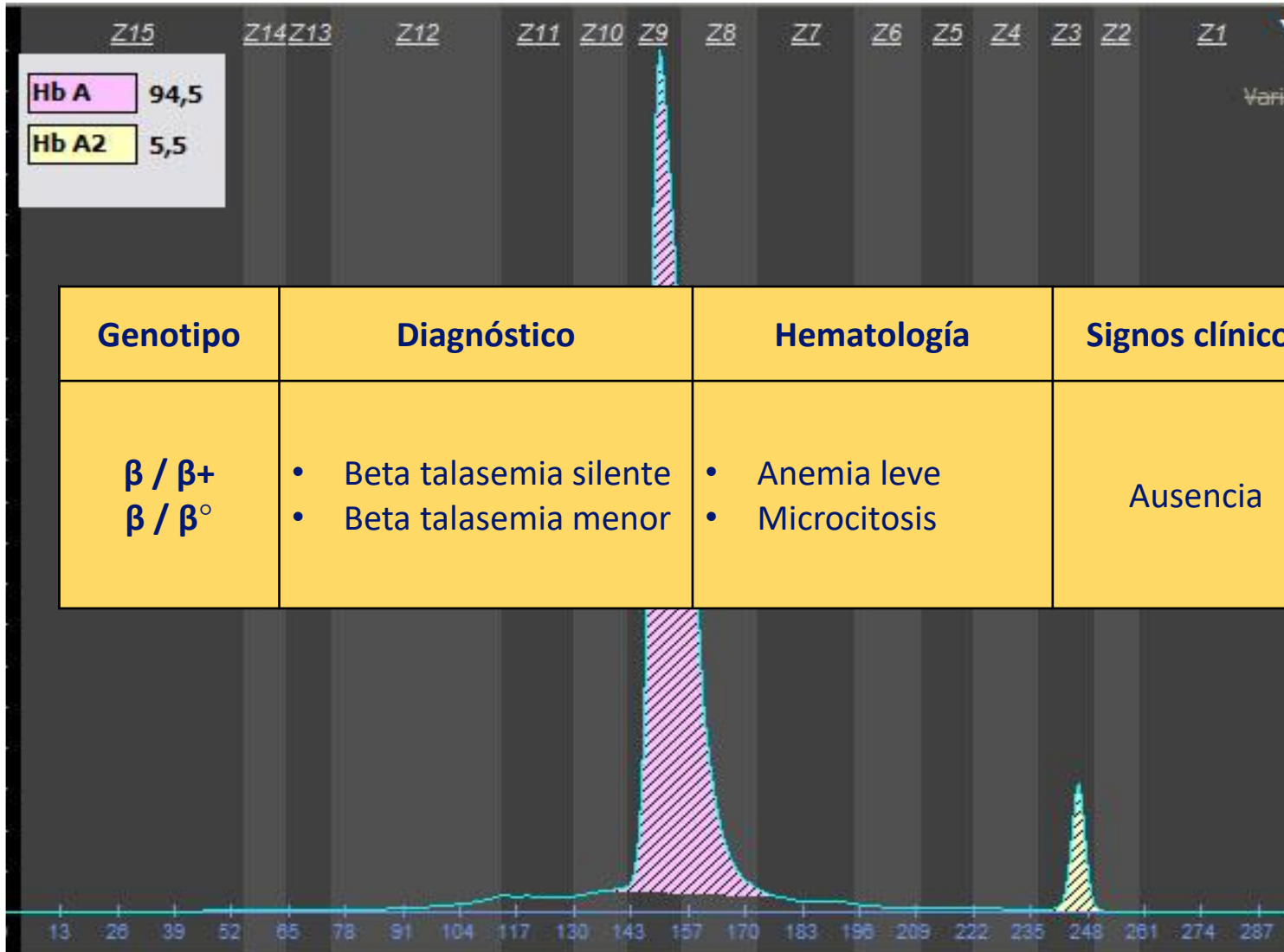


β^+ Thal homozygote
(β Thal intermedia)



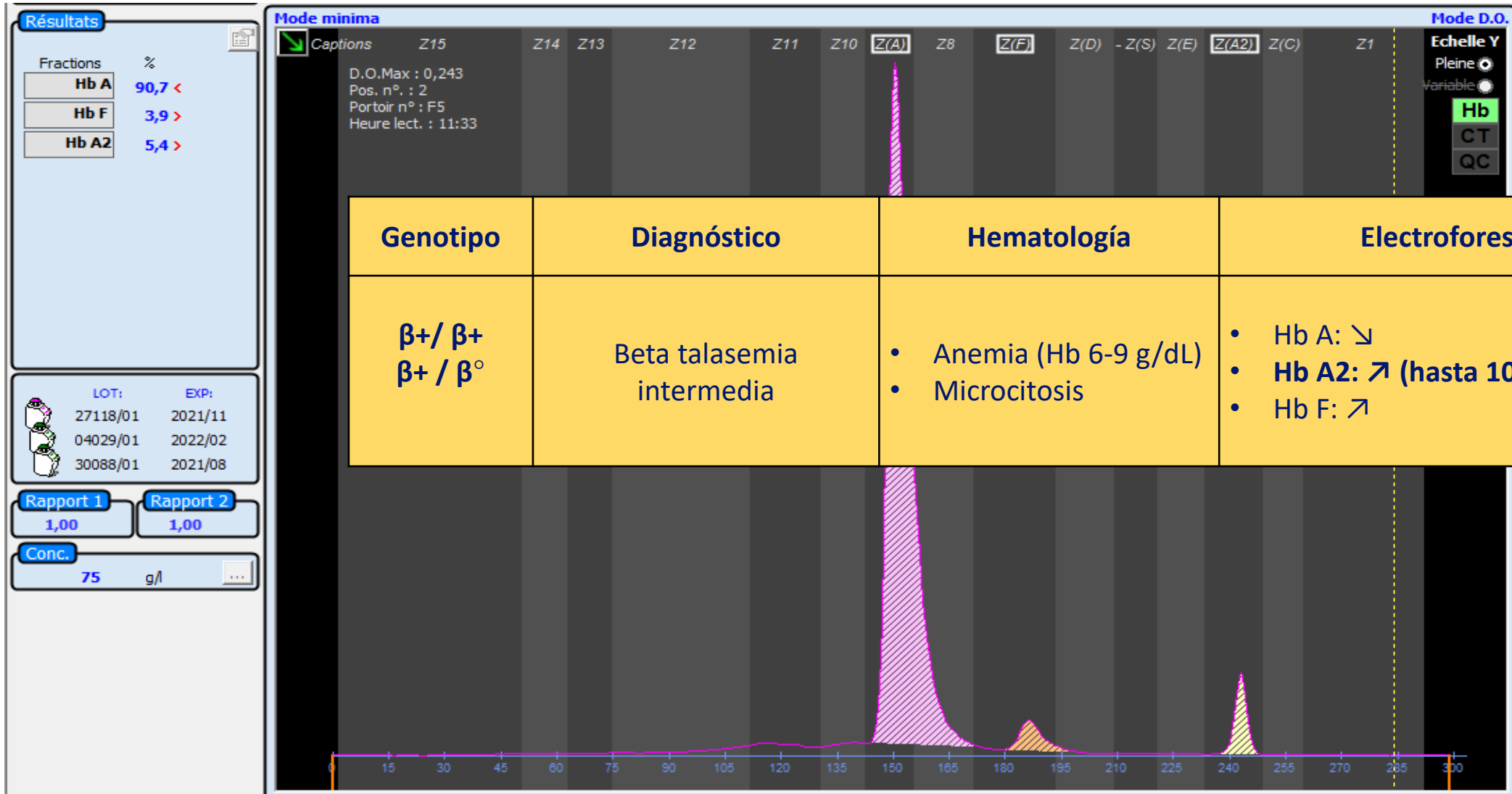
β^0 Thal homozygote
(β Thal major)

Beta talasemia silente y beta talasemia menor

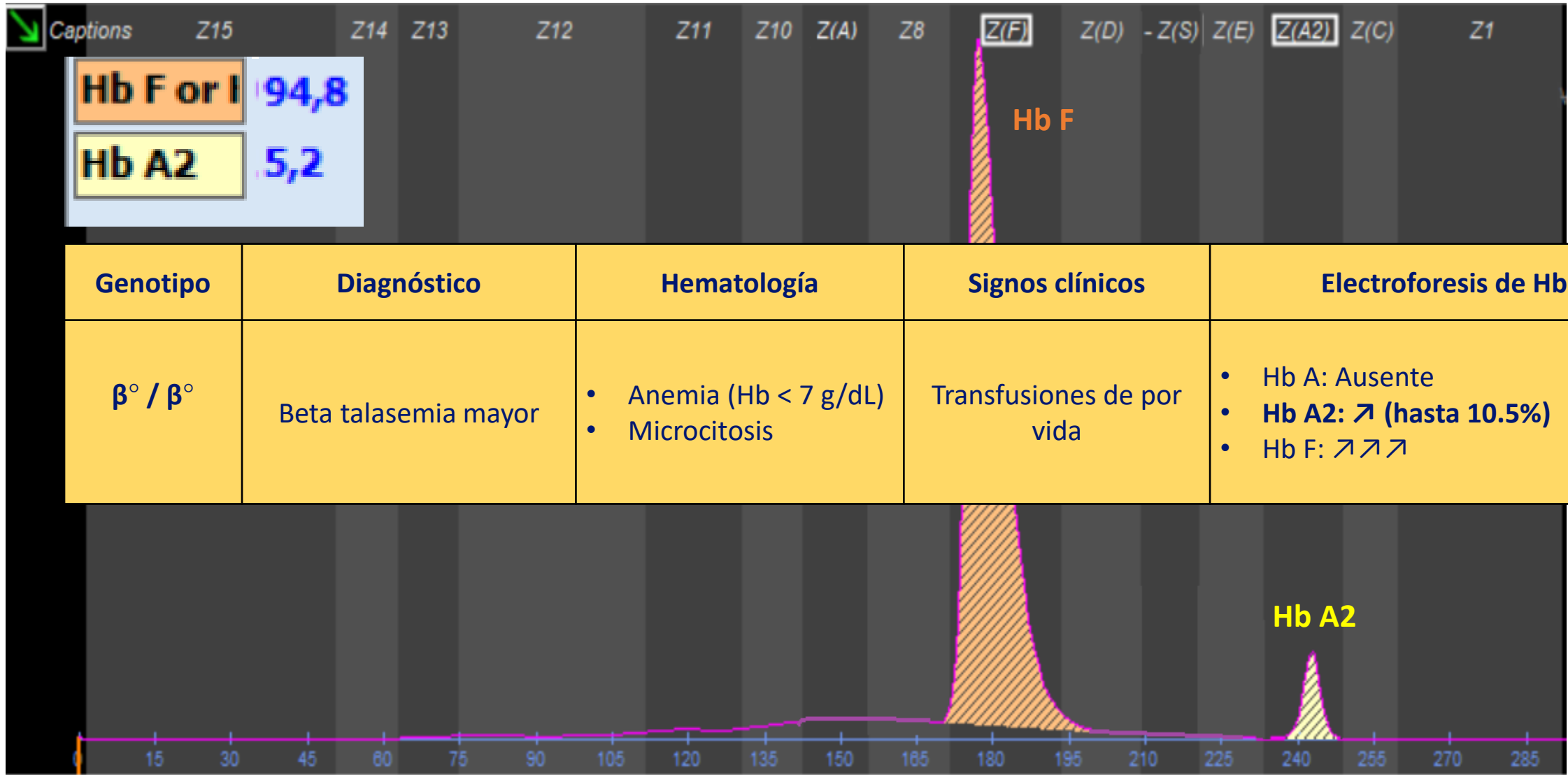


Genotipo	Diagnóstico	Hematología	Signos clínicos	Electroforesis de Hb
β / β^+ β / β^0	<ul style="list-style-type: none"> Beta talasemia silente Beta talasemia menor 	<ul style="list-style-type: none"> Anemia leve Microcitosis 	Ausencia	<ul style="list-style-type: none"> Hb A: \simeq 85-95% Hb A2: \geq4% Hb F: ausente o ligeramente \nearrow (2-7%) → Confirmación por biología molecular

Beta talasemia intermedia



Beta talasemia mayor





Atención

sebia 
The new language of life

Posibles fuentes de interpretación incorrecta

Fuente	Que hacer?
La Hb A2 puede aumentar en caso de deficiencia de folato o vitamina B12	Verificar parámetros hematológicos y niveles de folato y vitamina B12
Algunas afecciones pueden enmascarar el aumento de HbA2 (deficiencia de hierro, δ-talasemia, edad temprana)	Tener en cuenta siempre: el perfil férrico del paciente, los parámetros hematológicos y la edad del paciente
La Hb F puede aumentar en condiciones distintas a la β -talasemia: HPFH, embarazo, diabetes...	Evaluar el contexto clínico del paciente, parámetros hematológicos, sexo, edad



Hb F elevada

sebia 
The new language of life

Causas de elevación de HbF

- Hb F = 1 - 5%
- Hb A2 = Normal
- MCH >27pg

- Diabetes
- Embarazo ($\leq 5\%$)
- Hipertirpoidismo
- Quimioterapia
- ...

- Persistencia hereditaria de Hb F (HPFH) moderada

- Hb F = 5 - 35%
- Hb A2 = Normal o ↓

- Hb F = 5-15%
- MCH < 27 pg
- $\delta\beta$ talasemia (heterocigota)

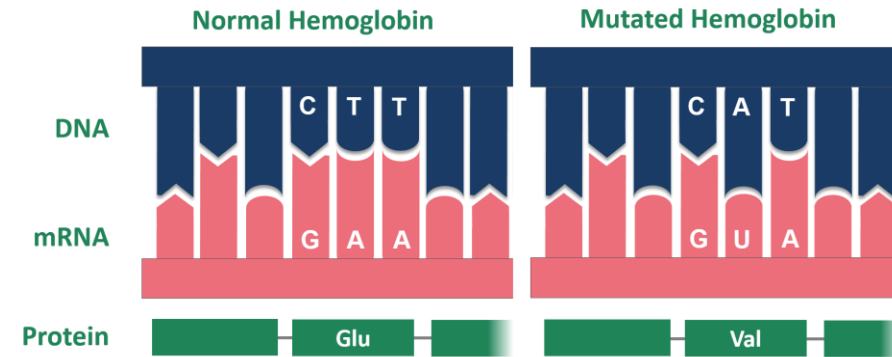
- Hb F = 15-35%
- MCH = Normal
- Persistencia hereditaria de Hb F (HPFH)



Hemoglobinopatías

Hemoglobinopatías

- Estructura y producción anormal de la molécula de Hb debido a mutaciones de algunos aminoácidos
→ **VARIANTE DE HEMOGLOBINA**
- La mutación implica una carga de superficie diferente y por lo tanto, movilidades diferentes en la electroforesis
- Se reportaron mas de 1400 mutaciones en las cadenas α , β , γ , δ



GLOBIN GENE SERVER → <https://globin.bx.psu.edu/>

Summaries of mutation categories

Query	Count of results	Button to view results
Total entries in database	1841	<input type="button" value="View summary table"/>
Total hemoglobin variant entries	1403	<input type="button" value="View summary table"/>
Total thalassemia entries	534	<input type="button" value="View summary table"/>
Total entries in both variant and thalassemia categories	69	<input type="button" value="View summary table"/>

Hemoglobinopatías

- La mayoría de las variantes de hemoglobina son raras y no están asociadas con ningún síntoma clínico.
- Algunas tienen afinidad por el oxígeno aumentada o disminuida, o son inestables.
- Existen 4 variantes de Hb que son las más frecuentes:
 - Hb S
 - Hb C
 - Hb D
 - Hb E

GLOBIN GENE SERVER

→ <https://globin.bx.psu.edu/>

Hematology and Clinical Presentation

	Clinical presentation	Laboratory findings
Heterozygote	• Normal	• Hb X 12 - 15 % of total Hb

Functional studies

Study

Cooperativity
Oxygen affinity

Results

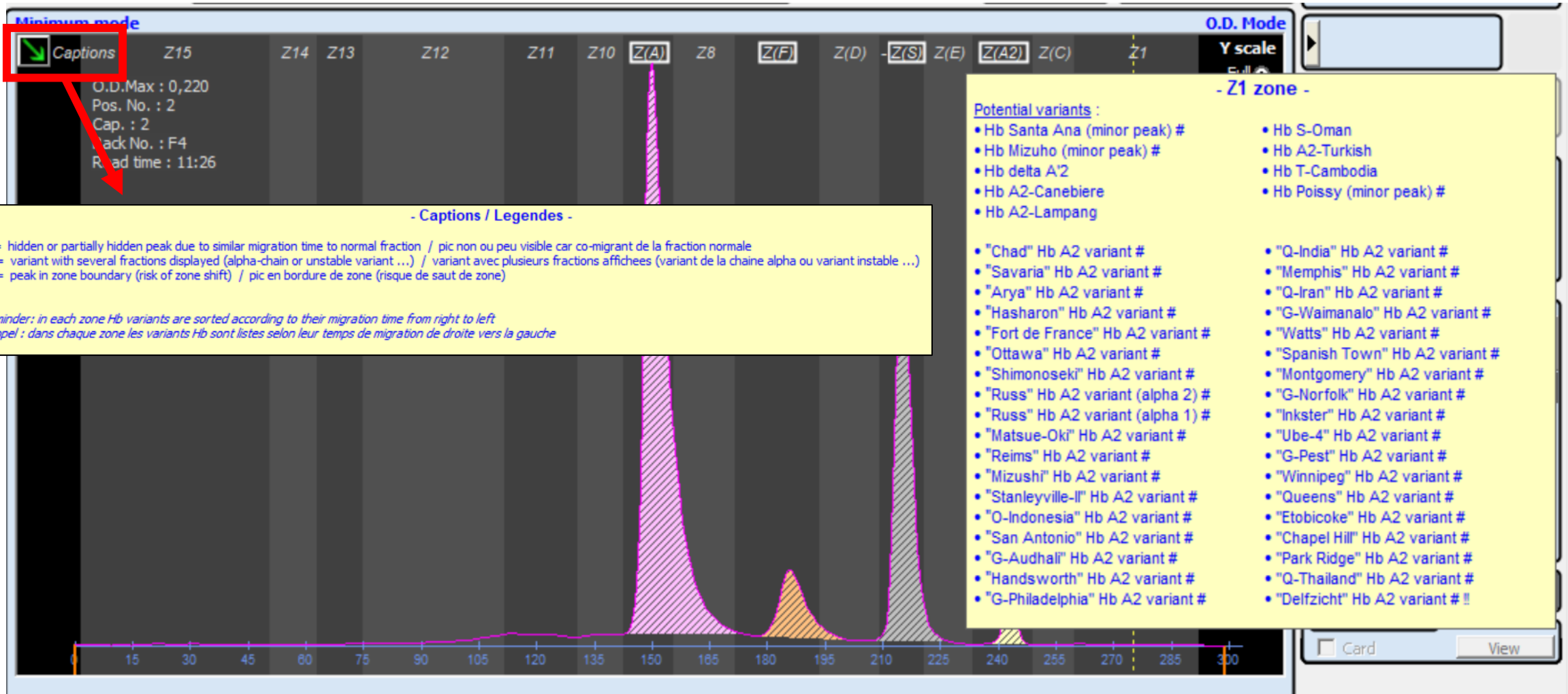
Decreased
Normal

Stability

Relative stability

- Unstable

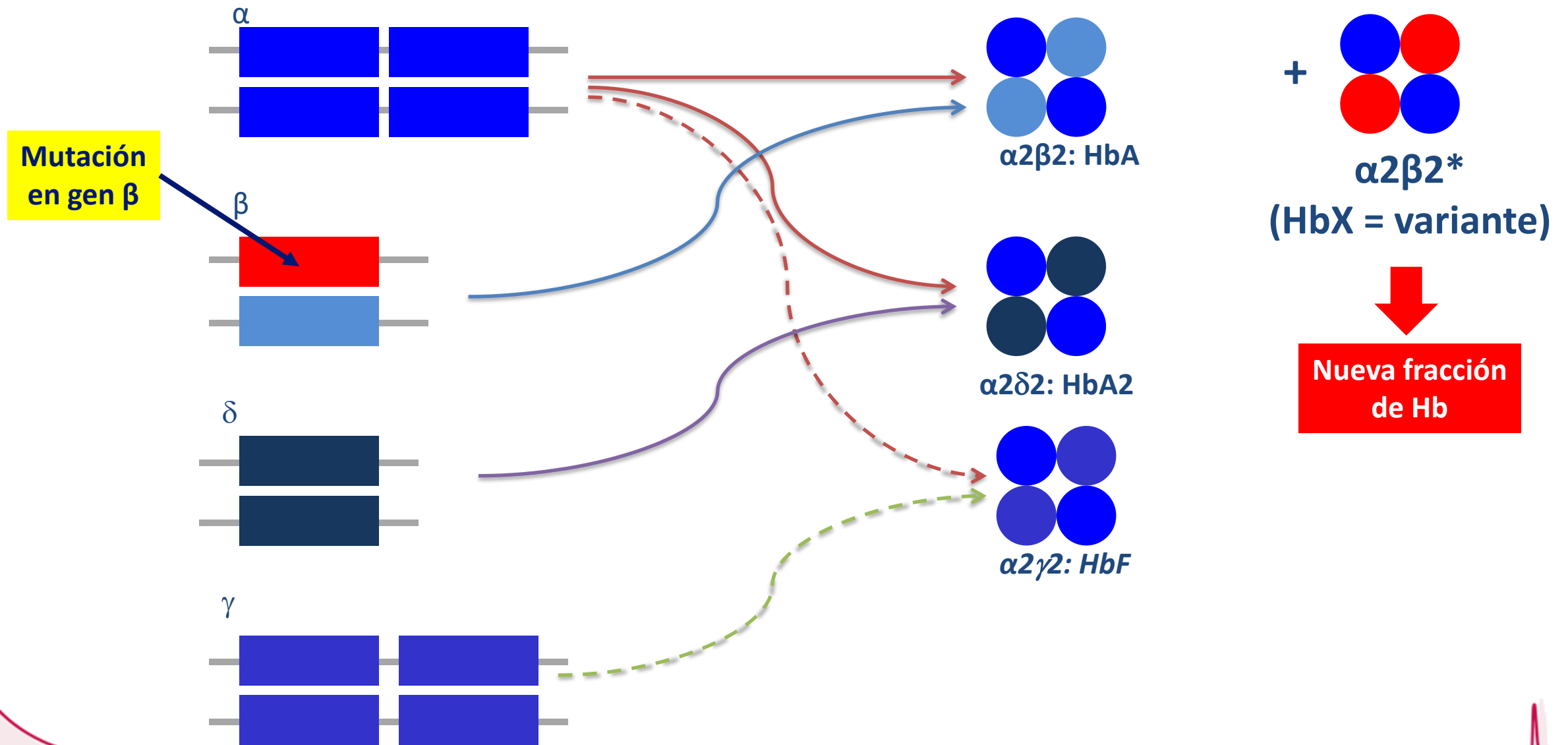
Base de datos Phoresis: 525 variantes de Hb



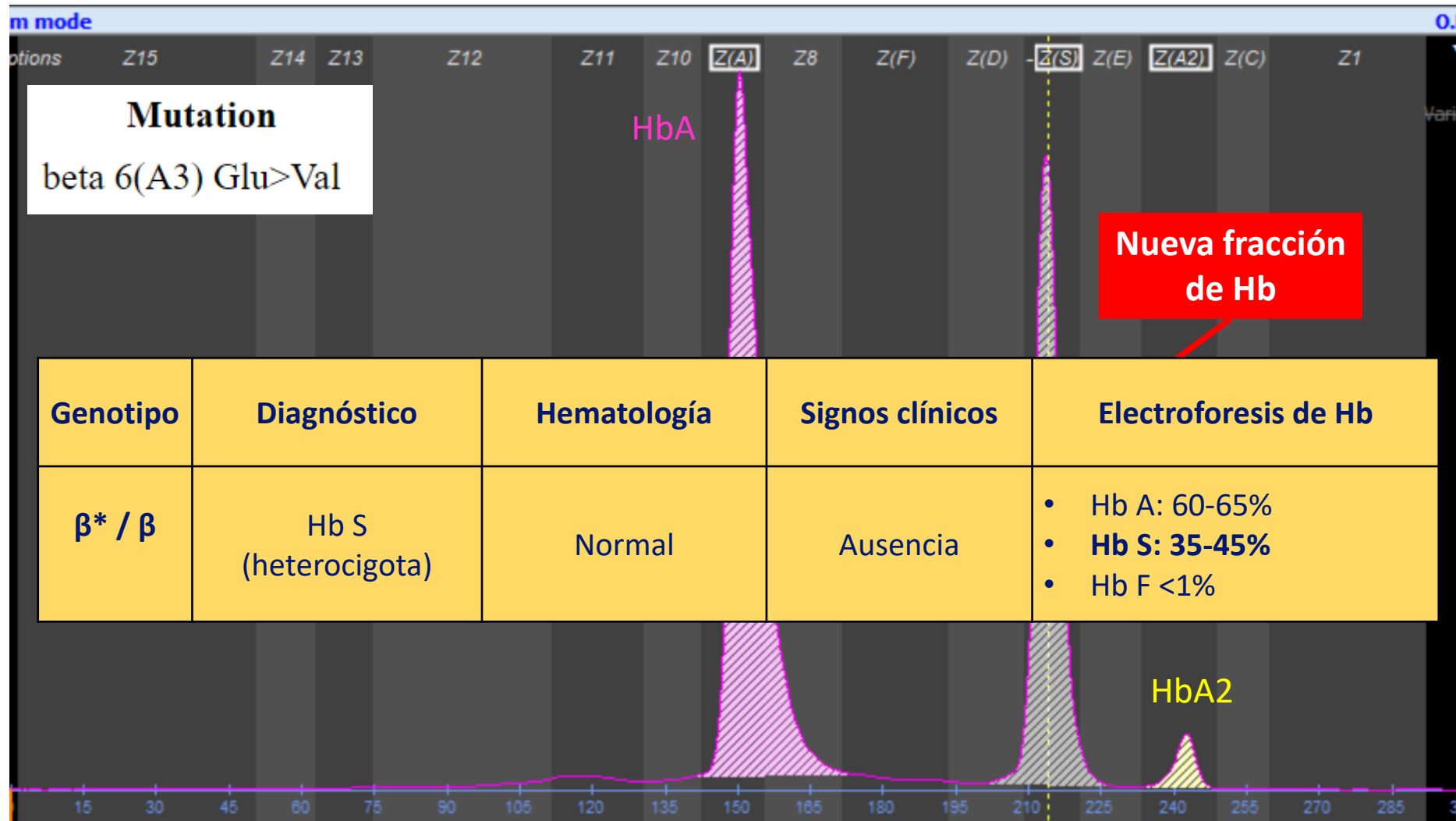


Variante de Hb: TIPO BETA

Variante de Hb: TIPO BETA (heterocigota)



Variante de Hb: TIPO BETA (heterocigota)

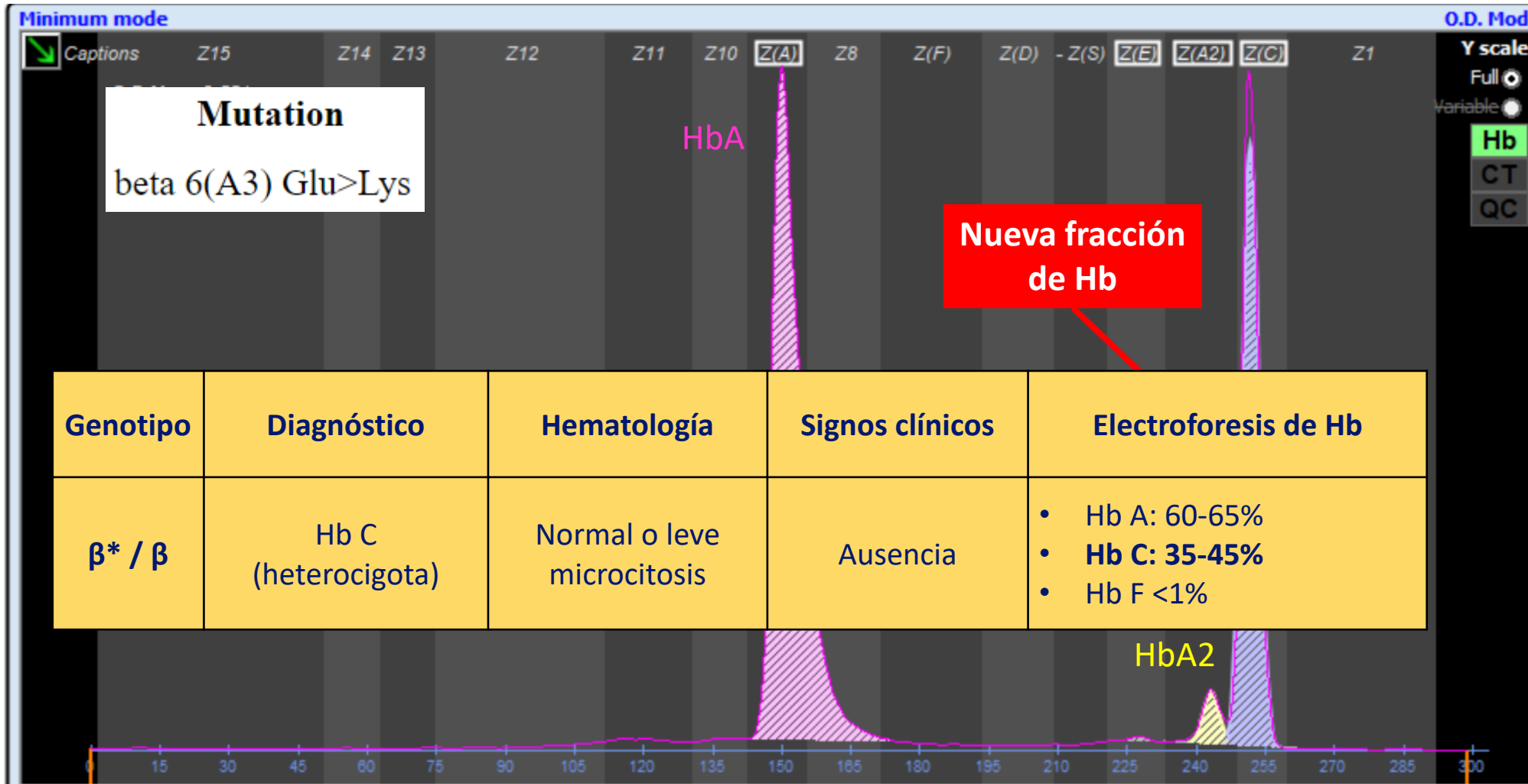


X = 214
O.D. = 0,1971

Hb A 57,5
Hb S 39,5
Hb A2 3

↓
HbS

Variante de Hb: TIPO BETA (heterocigota)

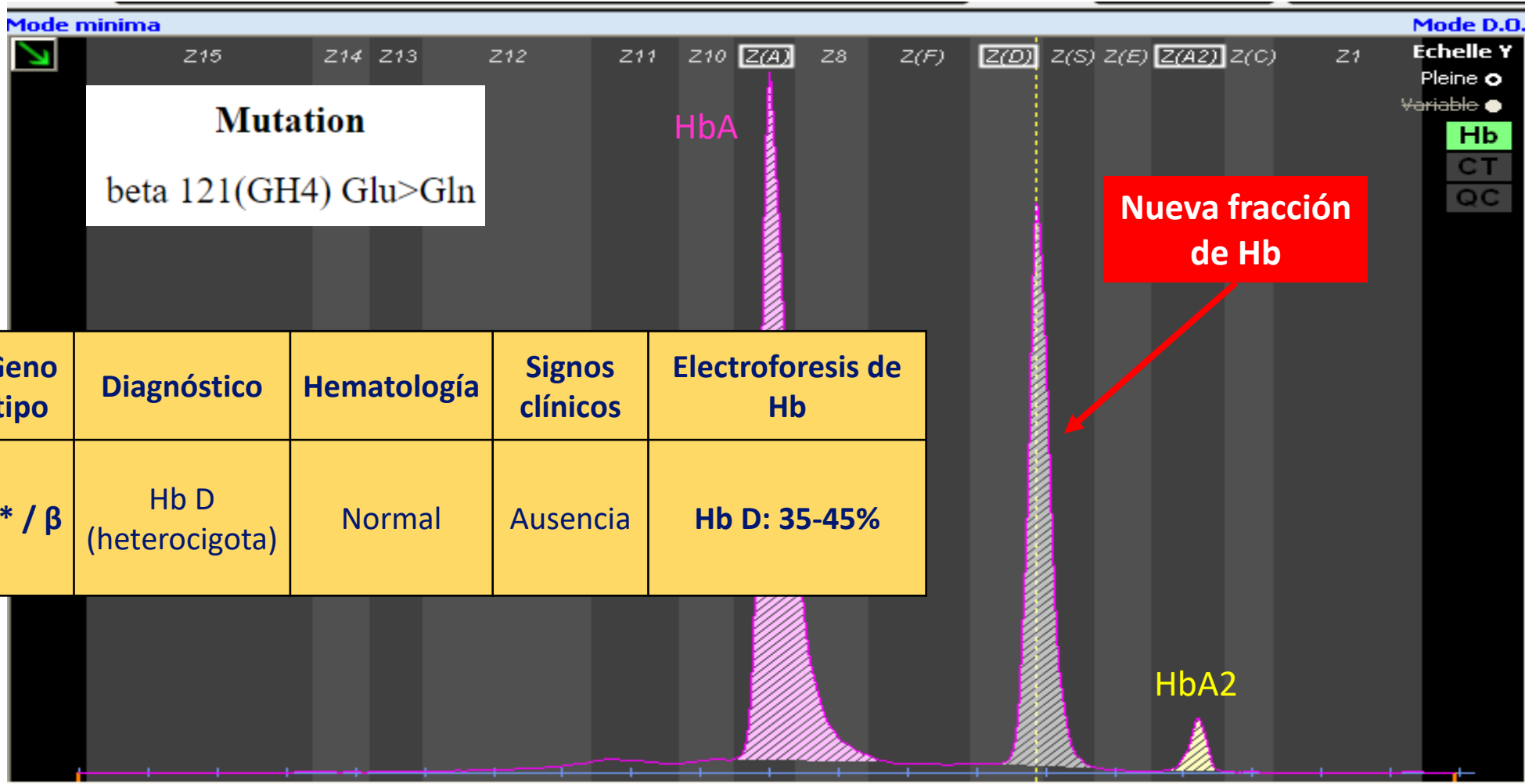


X = 252
O.D. = 0,0005

Hb A 61,8
Hb A2 3
Hb C or I 34,8

HbC

Variante de Hb: TIPO BETA (heterocigota)

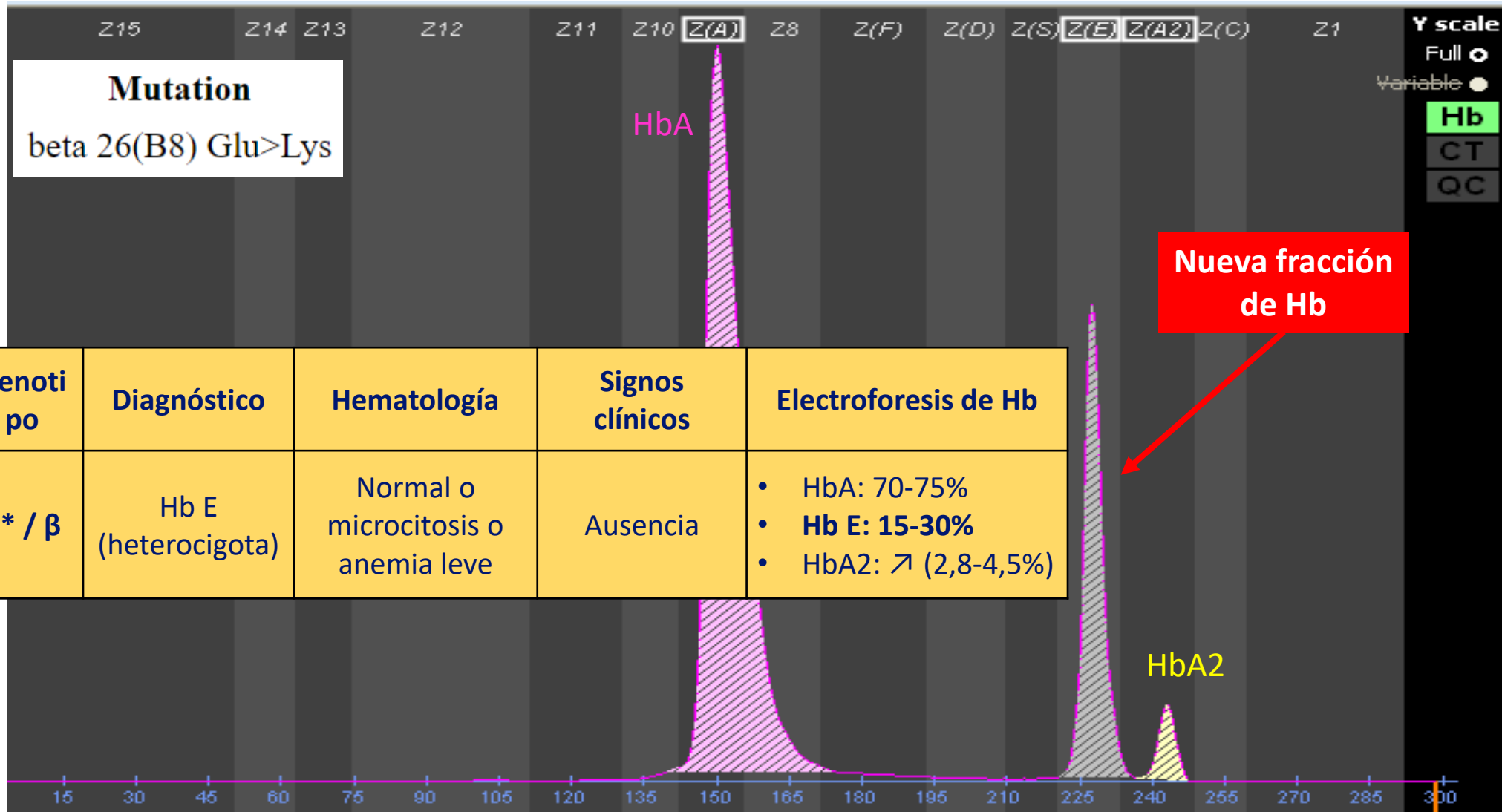


X = 208
O.D. = 0,0057

Hb A	60,4
Hb D zo	36,8
Hb A2	2,8

↓
HbD

Variante de Hb: TIPO BETA (heterocigota)



Mutation
beta 26(B8) Glu>Lys

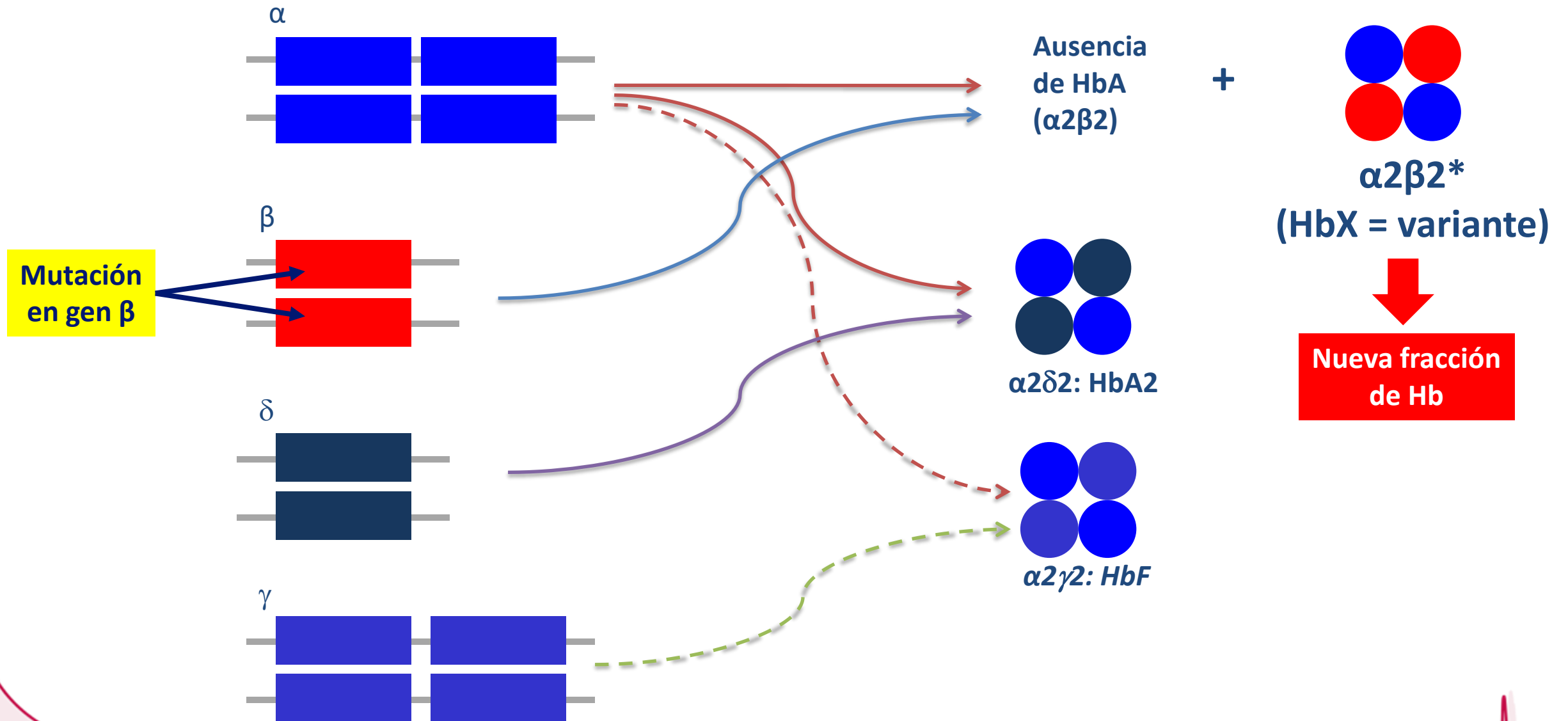
Genotipo	Diagnóstico	Hematología	Signos clínicos	Electroforesis de Hb
β^* / β	Hb E (heterocigota)	Normal o microcitosis o anemia leve	Ausencia	<ul style="list-style-type: none"> HbA: 70-75% Hb E: 15-30% HbA2: \nearrow (2,8-4,5%)

X = 227
O.D. = 0,0011

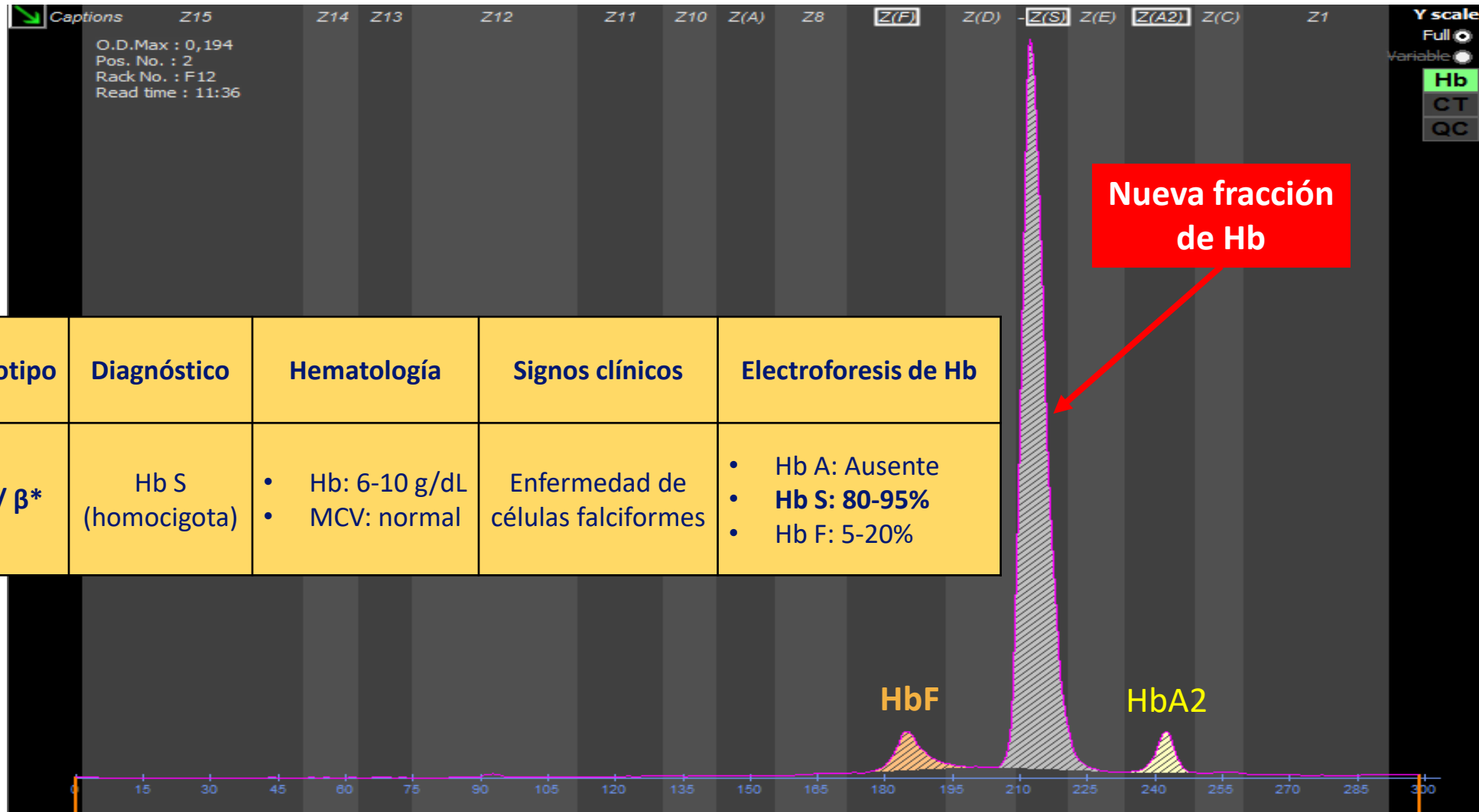
Hb A	71,3
Hb E zo	25,1
Hb A2	3,6

↓
HbE

Variante de Hb: TIPO BETA (homocigota)

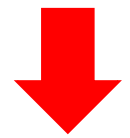


Variante de Hb: TIPO BETA (homocigota)



X = 214
O.D. = 0,1971

Hb F or I 5,7
Hb S zor 90,3
Hb A2 4



HbS/S

Genotipo	Diagnóstico	Hematología	Signos clínicos	Electroforesis de Hb
β^* / β^*	Hb S (homocigota)	<ul style="list-style-type: none"> Hb: 6-10 g/dL MCV: normal 	Enfermedad de células falciformes	<ul style="list-style-type: none"> Hb A: Ausente Hb S: 80-95% Hb F: 5-20%

Centrado del perfil en ausencia de HbA

SE DESPLIEGAN
LAS ZONAS

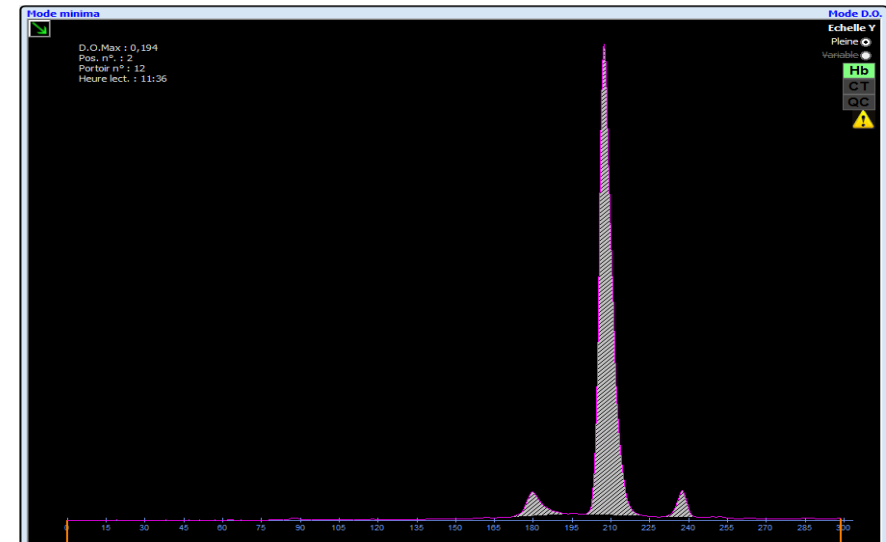
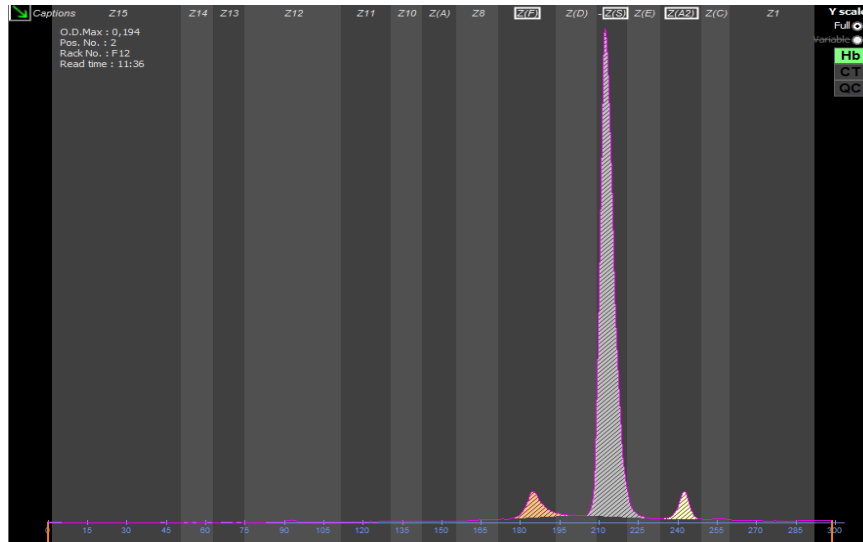
HbF > 3%
HbA2 presente

A VECES SE
DESPLIEGAN
LAS ZONAS

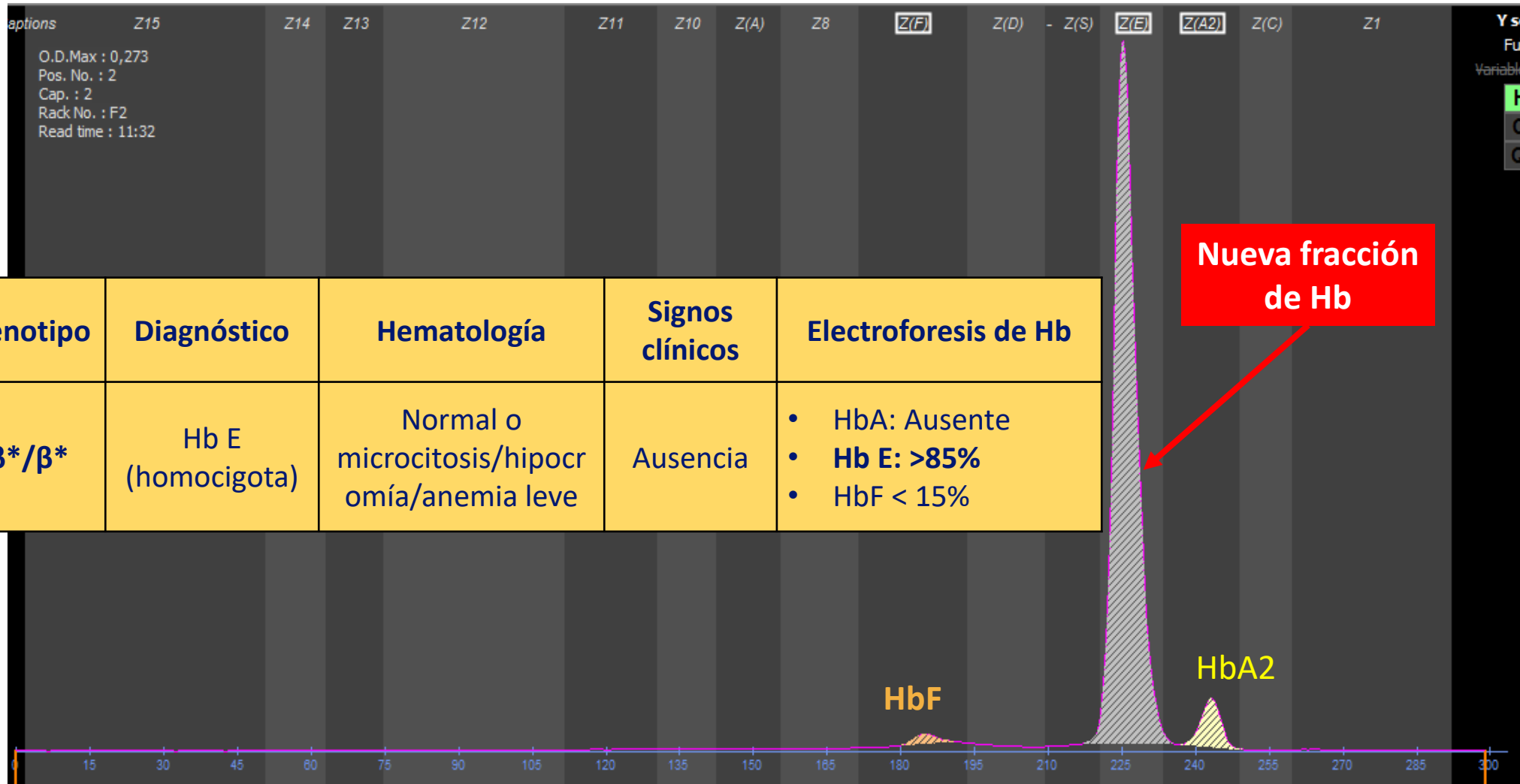
HbF 1 - 3%
HbA2 presente

NO SE
DESPLIEGAN
LAS ZONAS

HbF < 1%
HbA2 presente



Variante de Hb: TIPO BETA (homocigota)



X = 227
 O.D. = 0,0011

Hb F or I 1,3
 Hb E zon 93,3
 Hb A2 5,4

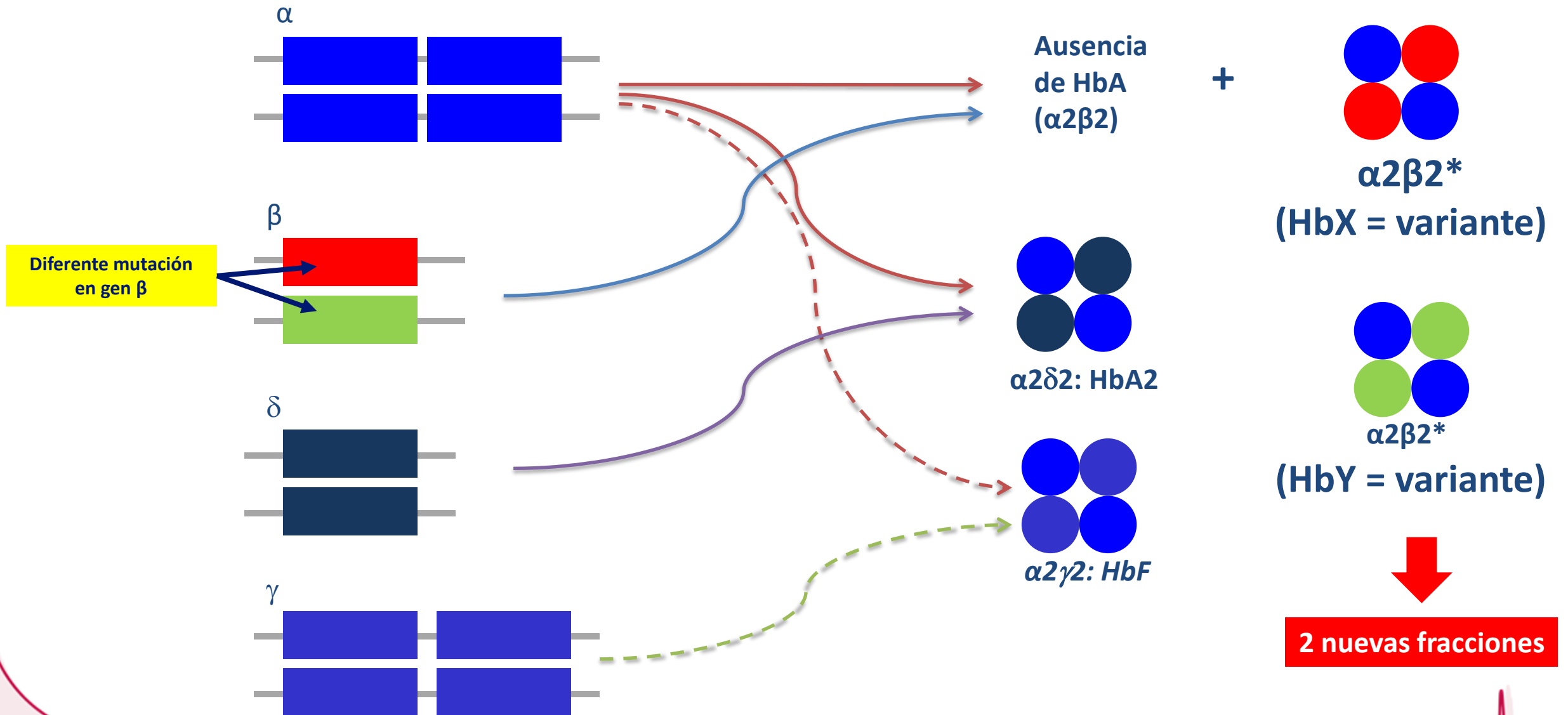


HbE/E

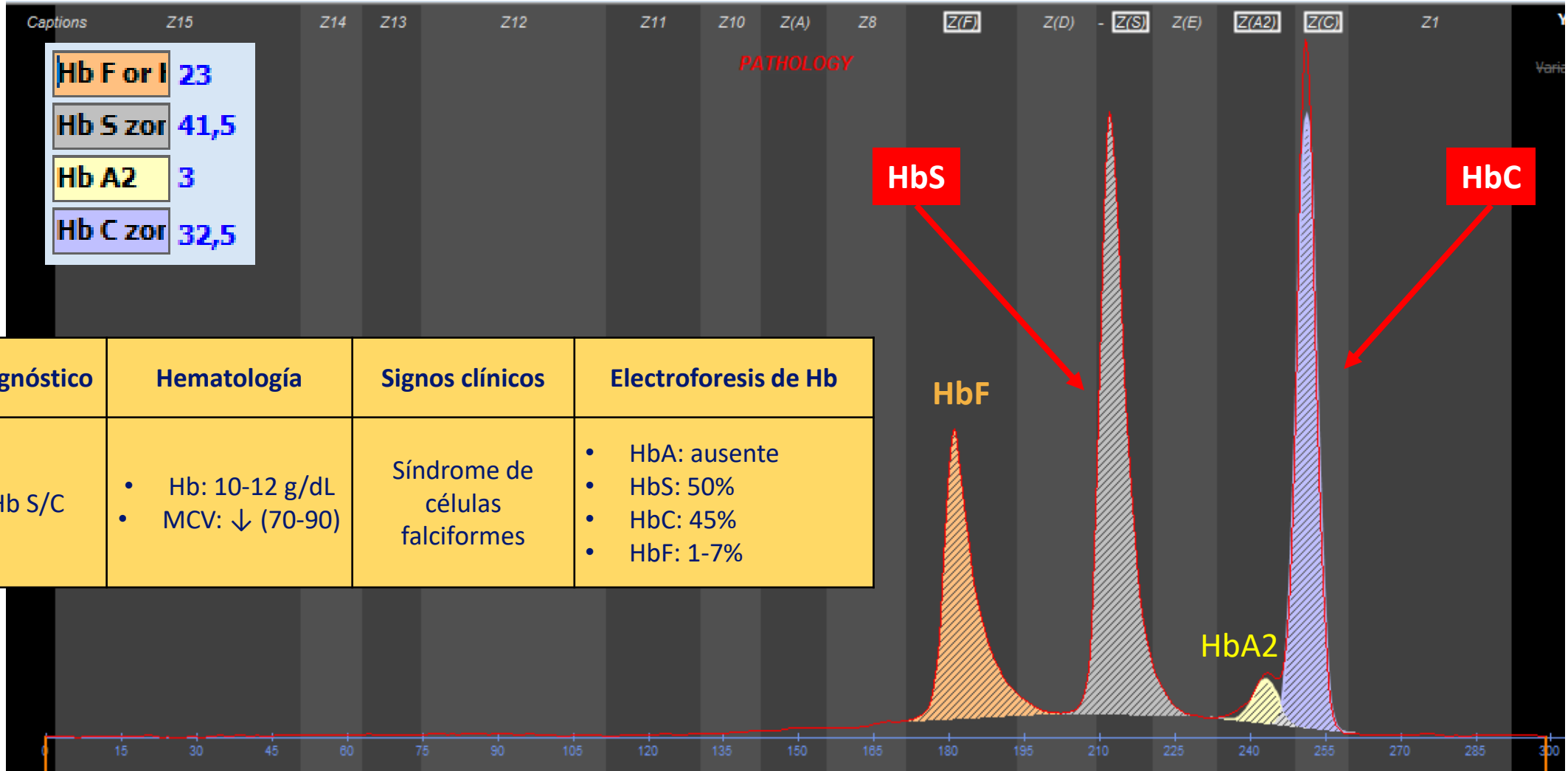


***Combinación de variantes de Hb
más comunes***

Variante de Hb: TIPO BETA (homocigota)

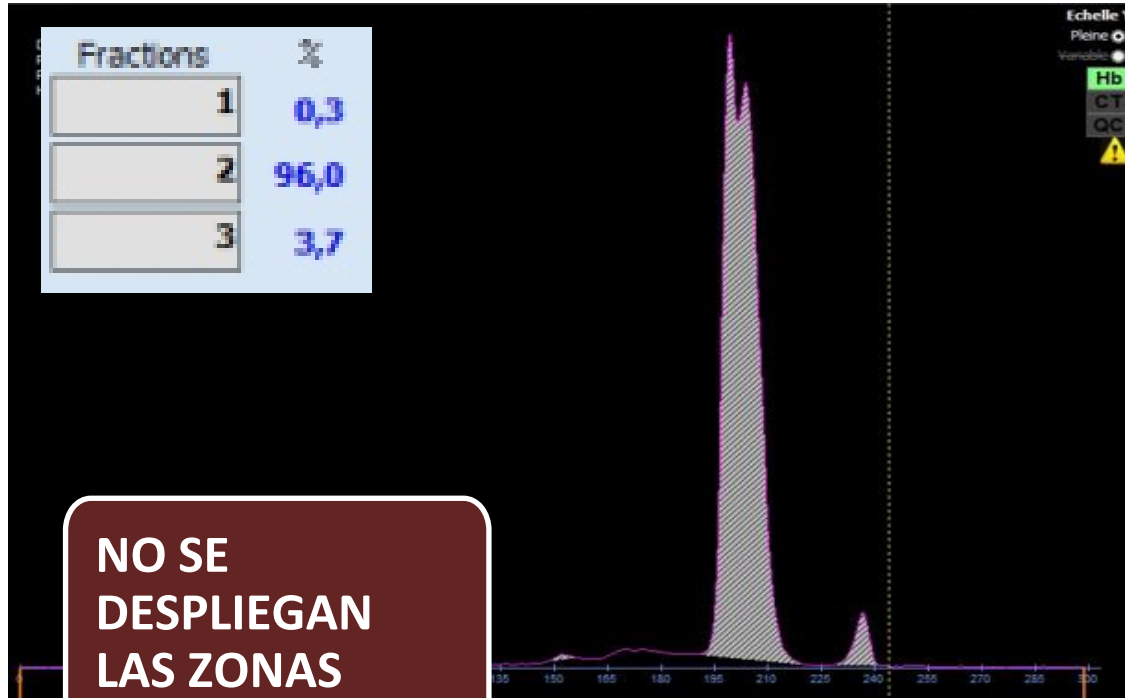


Combinación HbS + HbC



Diagnóstico	Hematología	Signos clínicos	Electroforesis de Hb
Hb S/C	<ul style="list-style-type: none"> Hb: 10-12 g/dL MCV: ↓ (70-90) 	Síndrome de células falciformes	<ul style="list-style-type: none"> HbA: ausente HbS: 50% HbC: 45% HbF: 1-7%

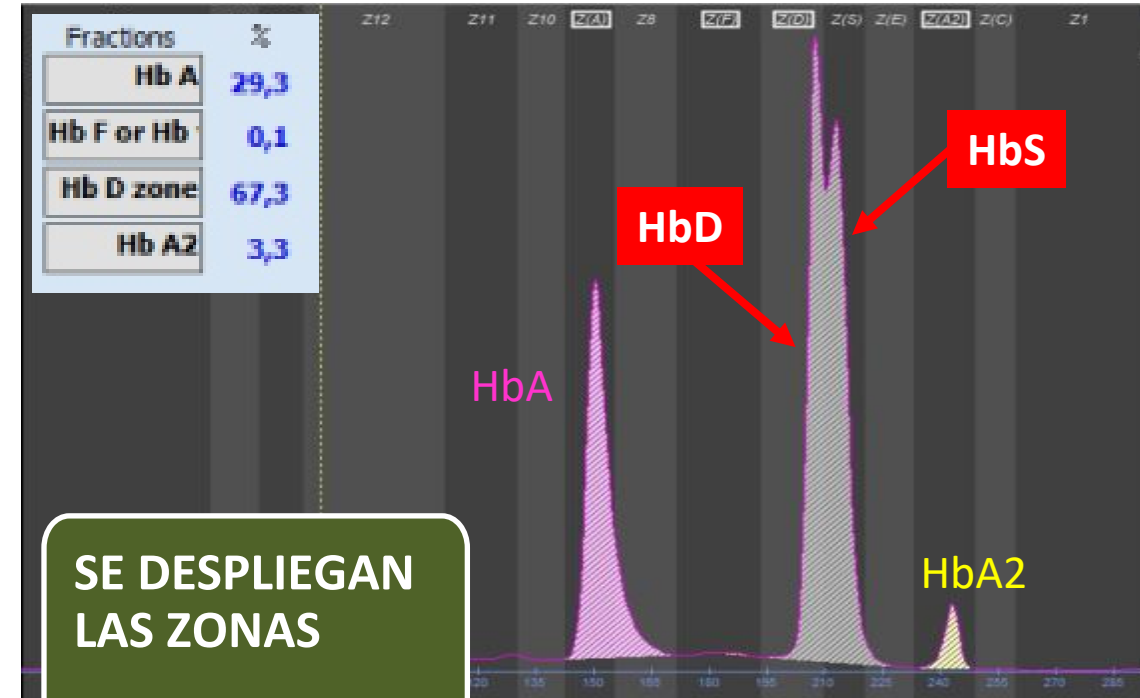
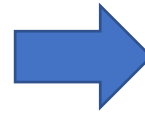
Combinación HbS + HbD



NO SE DESPLIEGAN LAS ZONAS

HbF < 1%
HbA2 presente

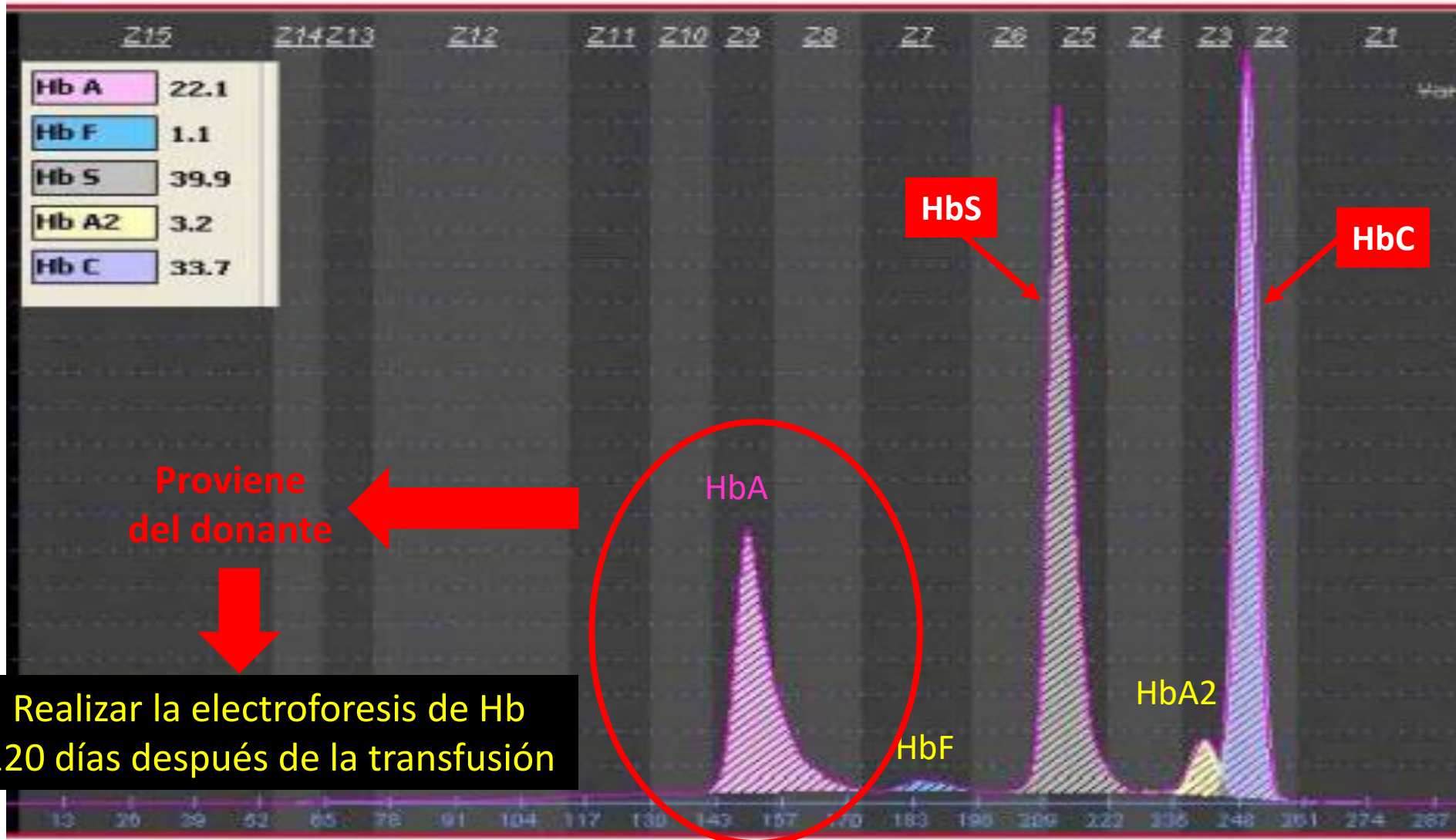
Mezcla con control normal



SE DESPLIEGAN LAS ZONAS

HbA presente
HbA2 presente

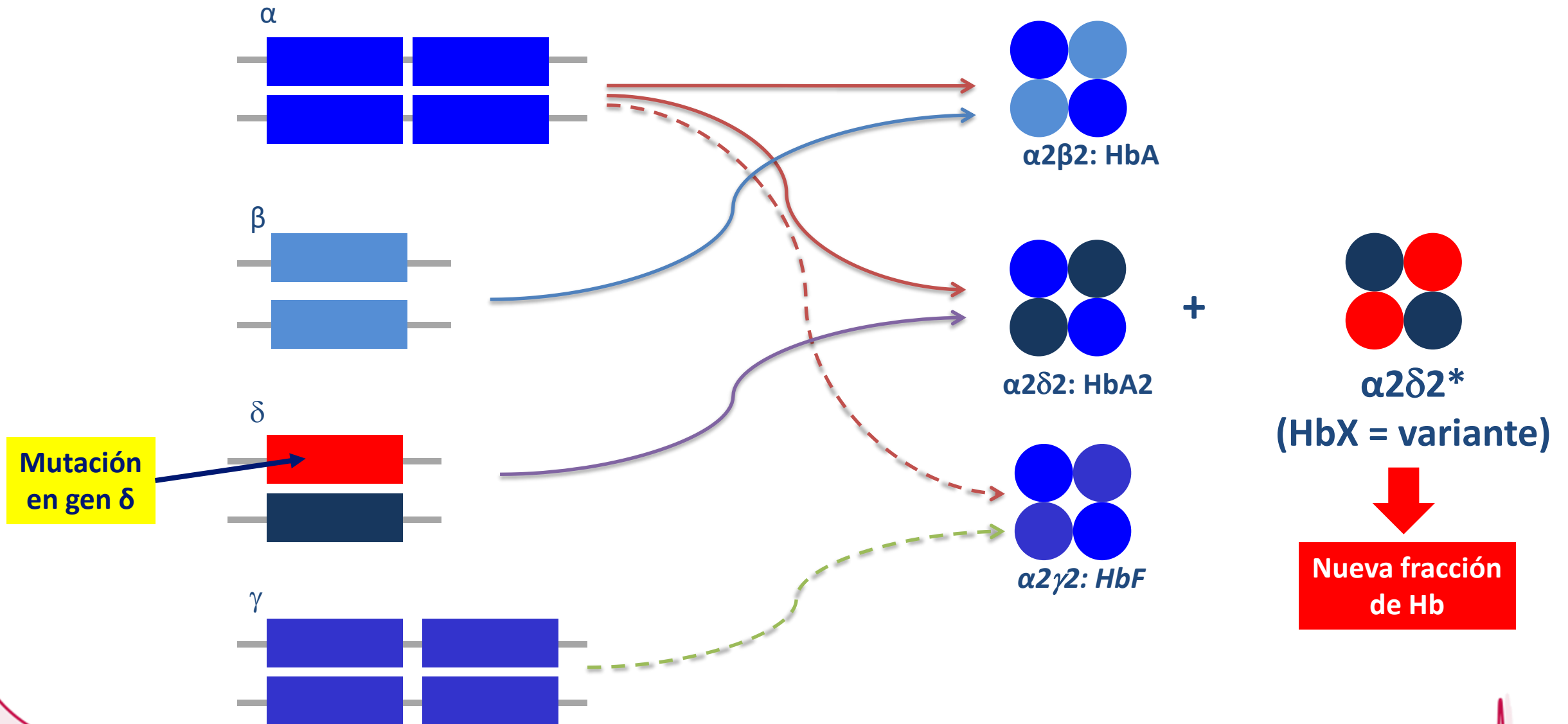
Atención! Paciente transfundido



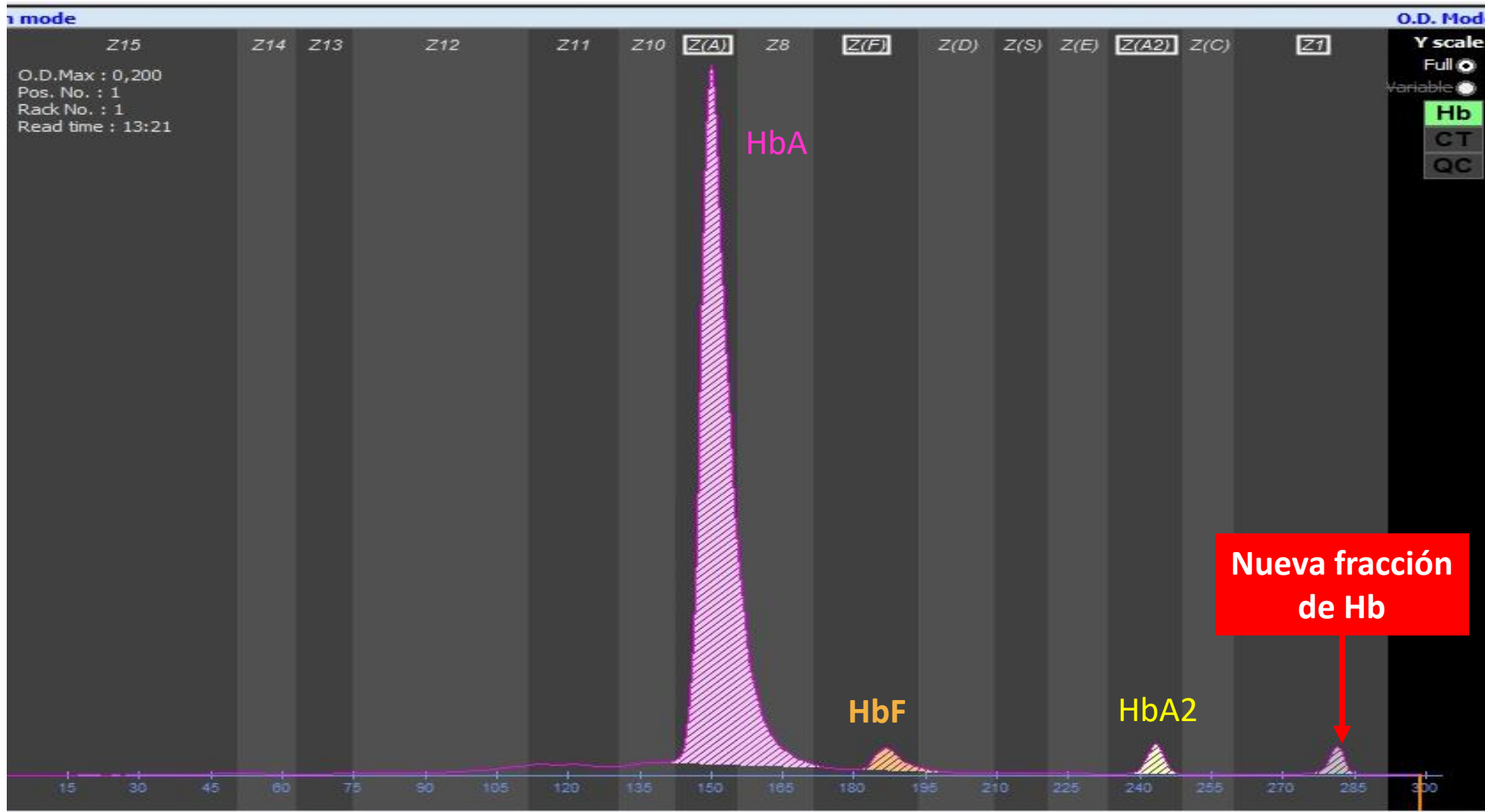


Variante de Hb: TIPO DELTA

Variante de Hb: TIPO DELTA (heterocigota)



Variante de Hb: TIPO DELTA (heterocigota)



Hb A	92,9
Hb F or I	2,9
Hb A2	2,3
Z1 zone	1,9



Valor real de HbA2:
 $HbA2 + HbX = 4,2 \%$
(valor elevado)



Beta talasemia asociada?

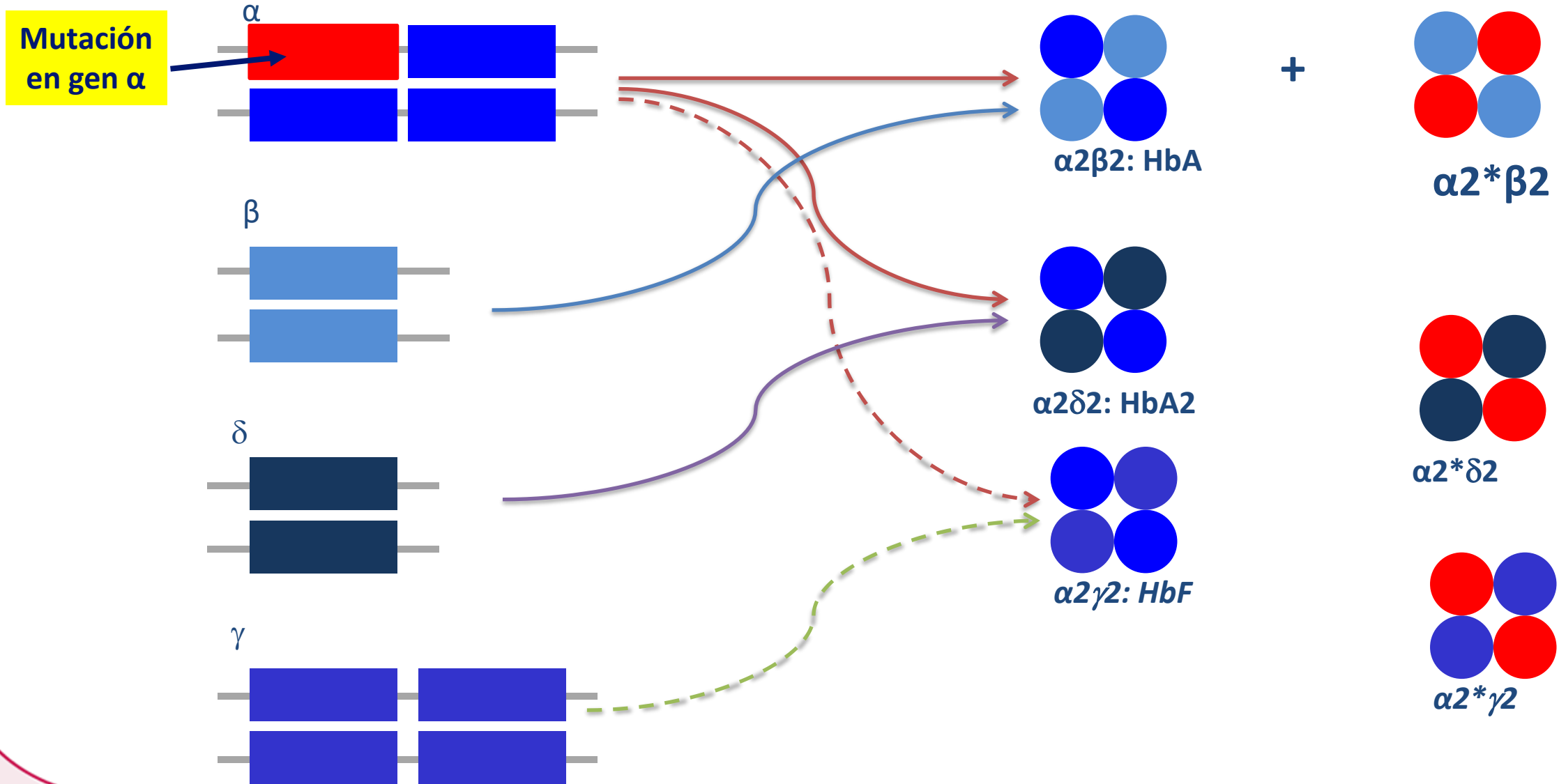
Nueva fracción de Hb



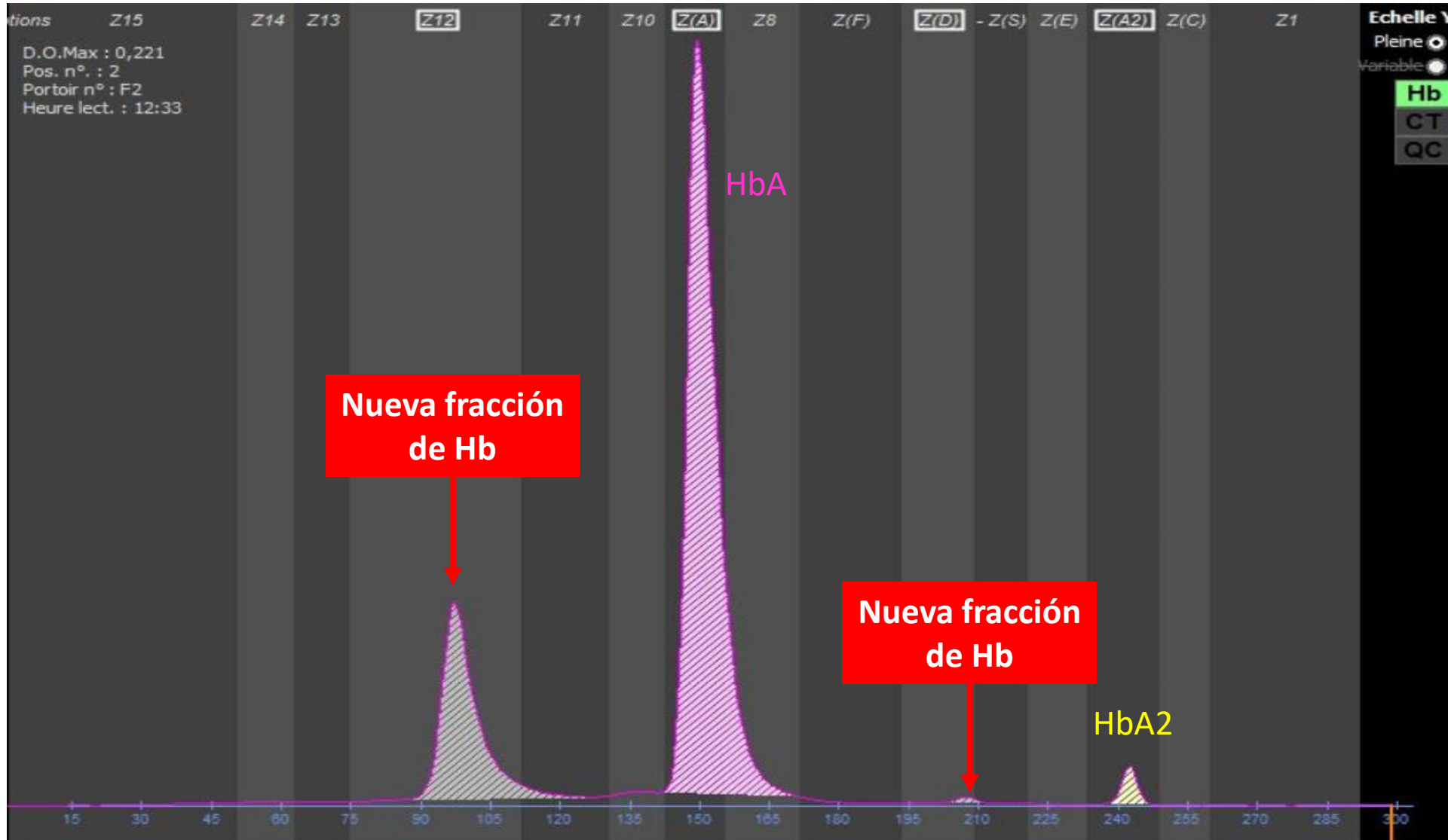
Variante de Hb: TIPO ALFA

sebia 
The new language of life

Variante de Hb: TIPO ALFA (heterocigota)



Variante de Hb: TIPO ALFA (heterocigota)

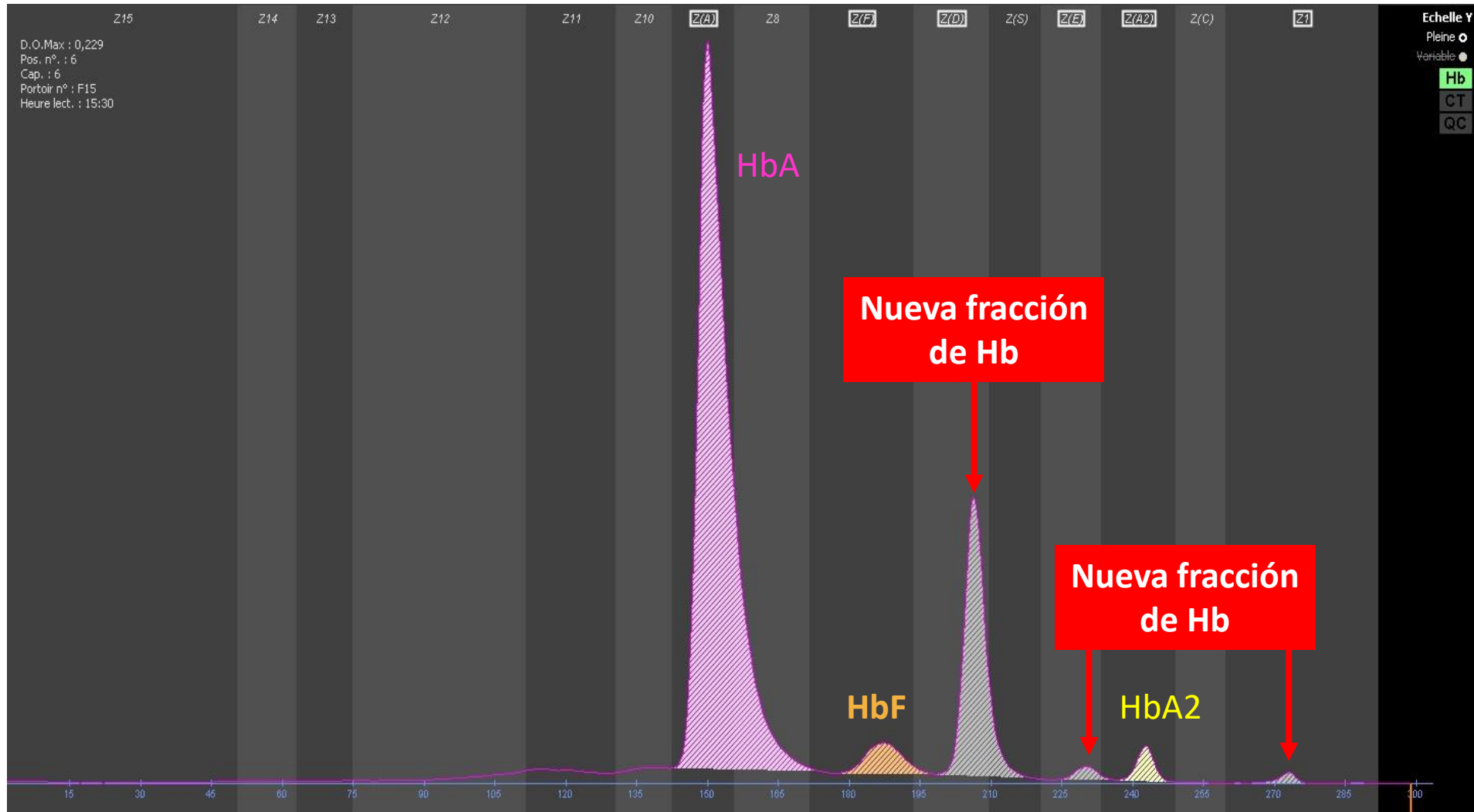


Fractions	%
Z12 zone	22,9
Hb A	74,7
Hb D zone	0,4
Hb A2	2,0



Valor real de HbA2:
 $HbA2 + HbX = 2,4 \%$
(valor normal)

Variante de Hb: TIPO ALFA (heterocigota)



Hb A	74,1
Hb F	3,6
Hb D	19
Hb A2	1,9
Z1 zone	0,5



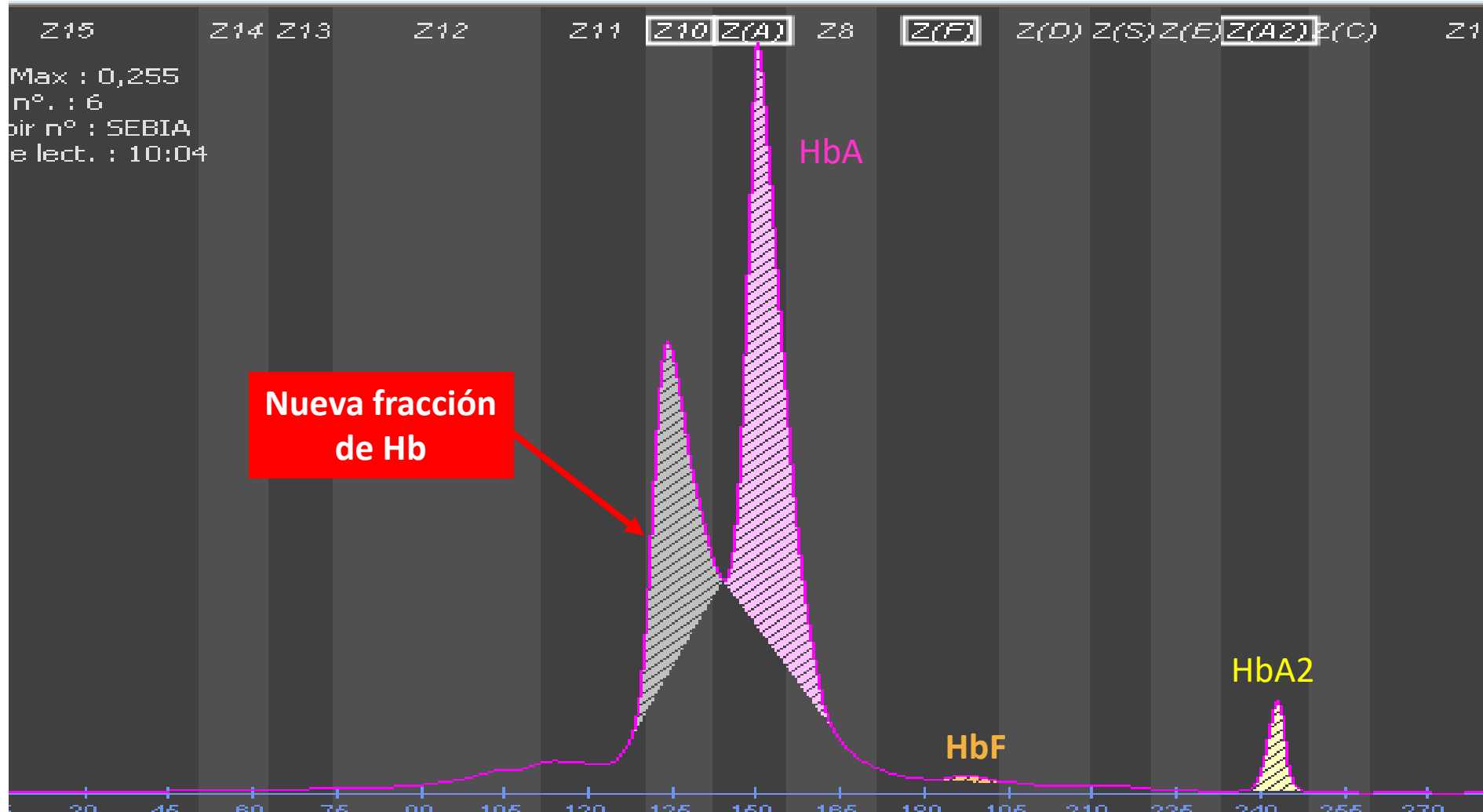
Valor real de HbA2:
HbA2 + HbX = 2,4 %
(valor normal)



Casos

sebia 
The new language of life

Variante de Hb: TIPO BETA



Hb Hop	33,8
Hb A	60,6
Hb F or	0,6
Hb A2	5

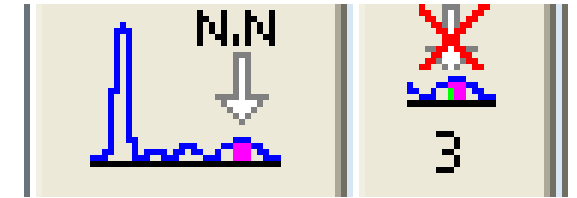
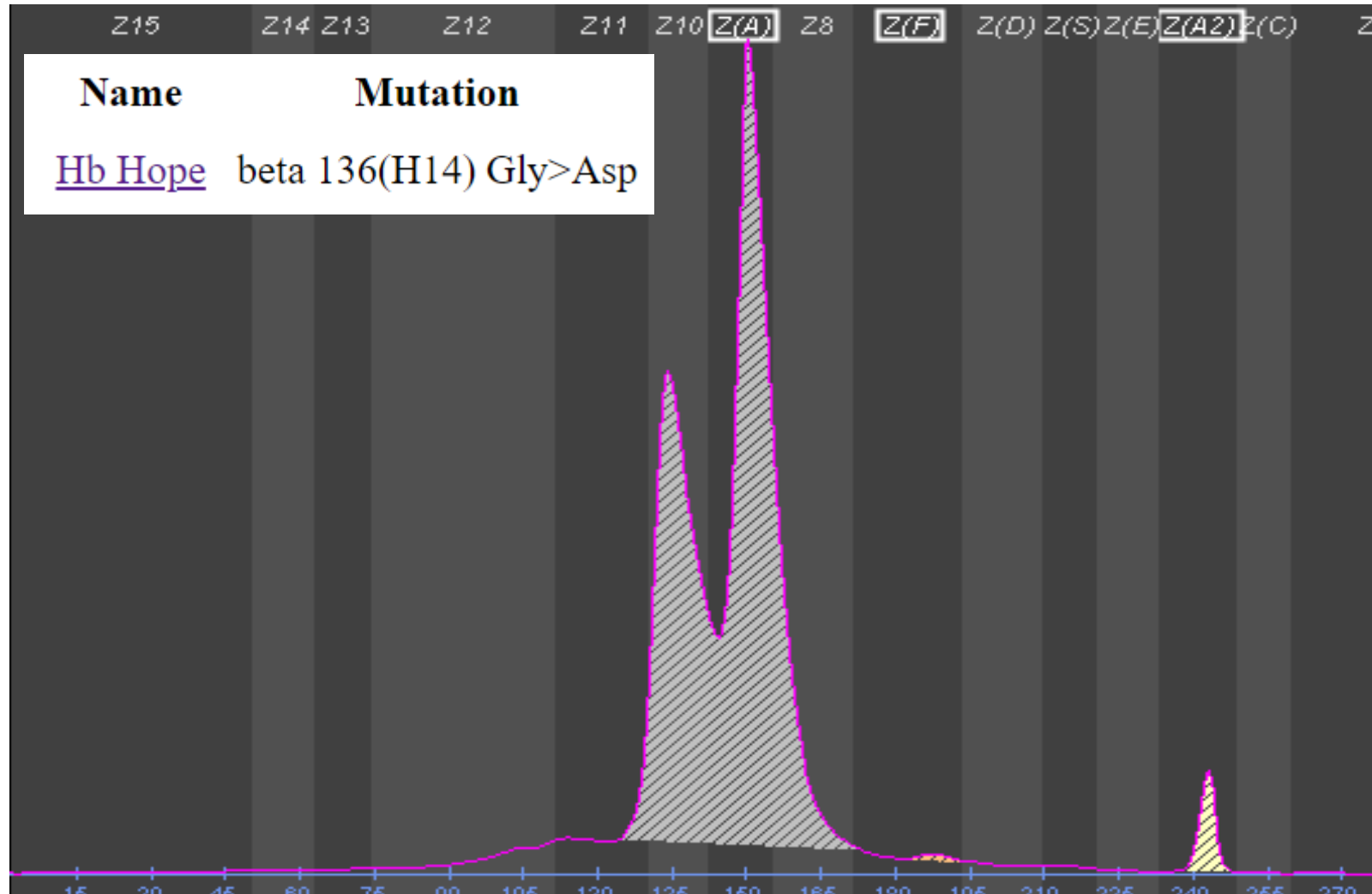


- HbA: subestimada
- HbA2: sobreestimada



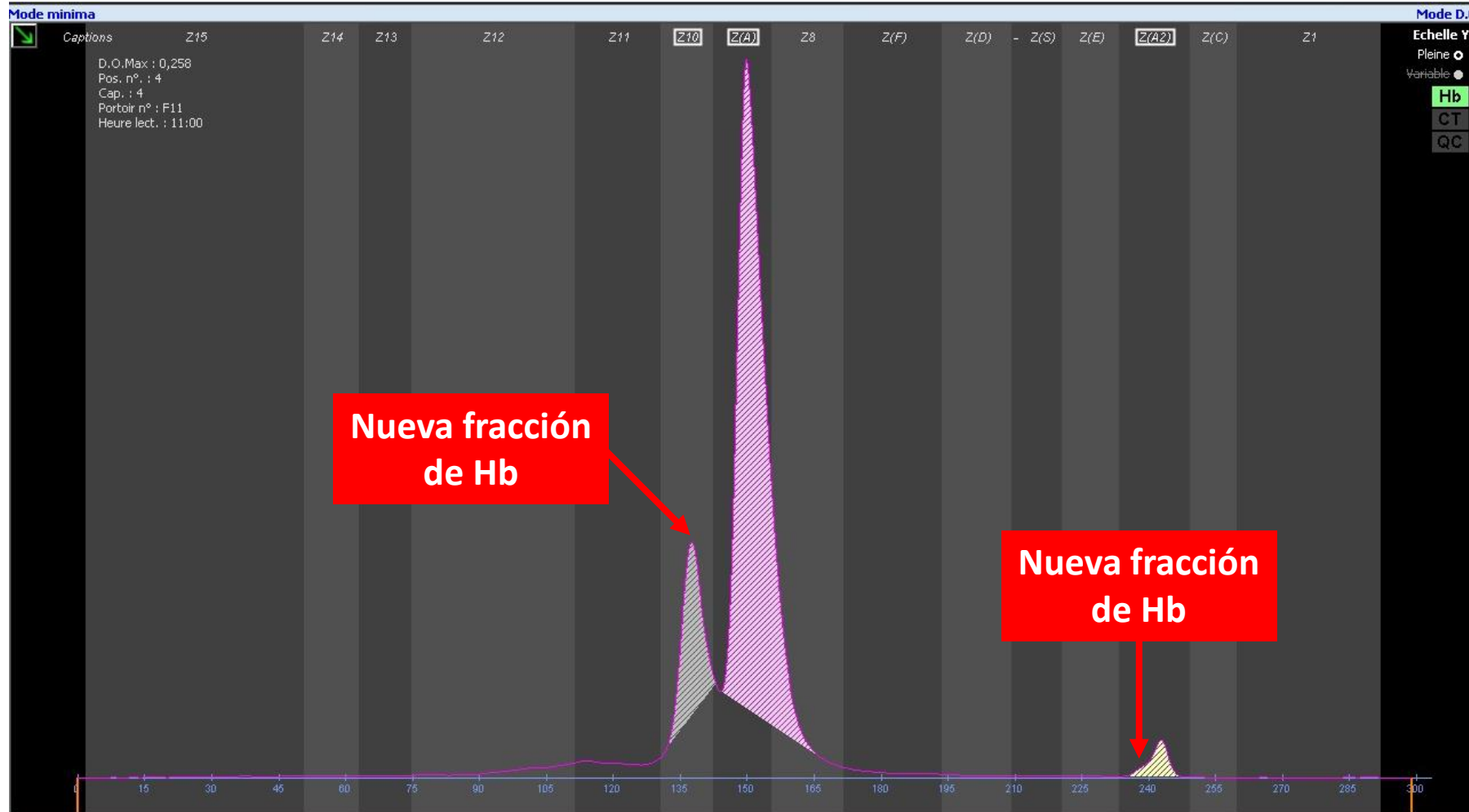
Quantificar
HbX + HbA juntas

Variante de Hb: TIPO BETA



Hb F or	0,4
Hb A2	3,1
A+Hop	96,5

Fracción adicional en Z(10)

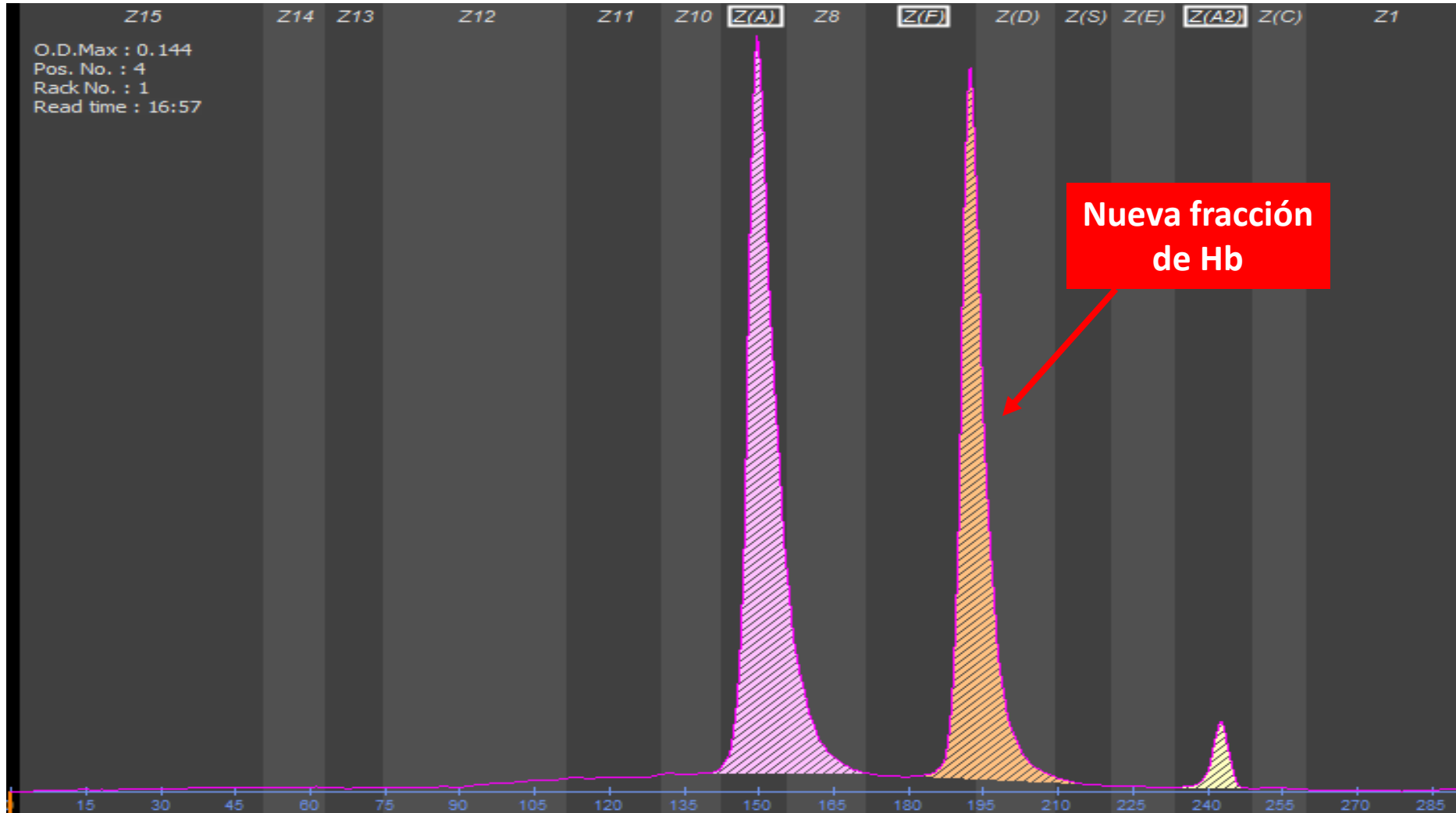


Z10 zone	14,6
Hb A	82
Hb A2	3,4



VARIANTE ALFA

Fracción adicional en Z(F)



Hb A	53.1
Hb F or I	44.3
Hb A2	2.6

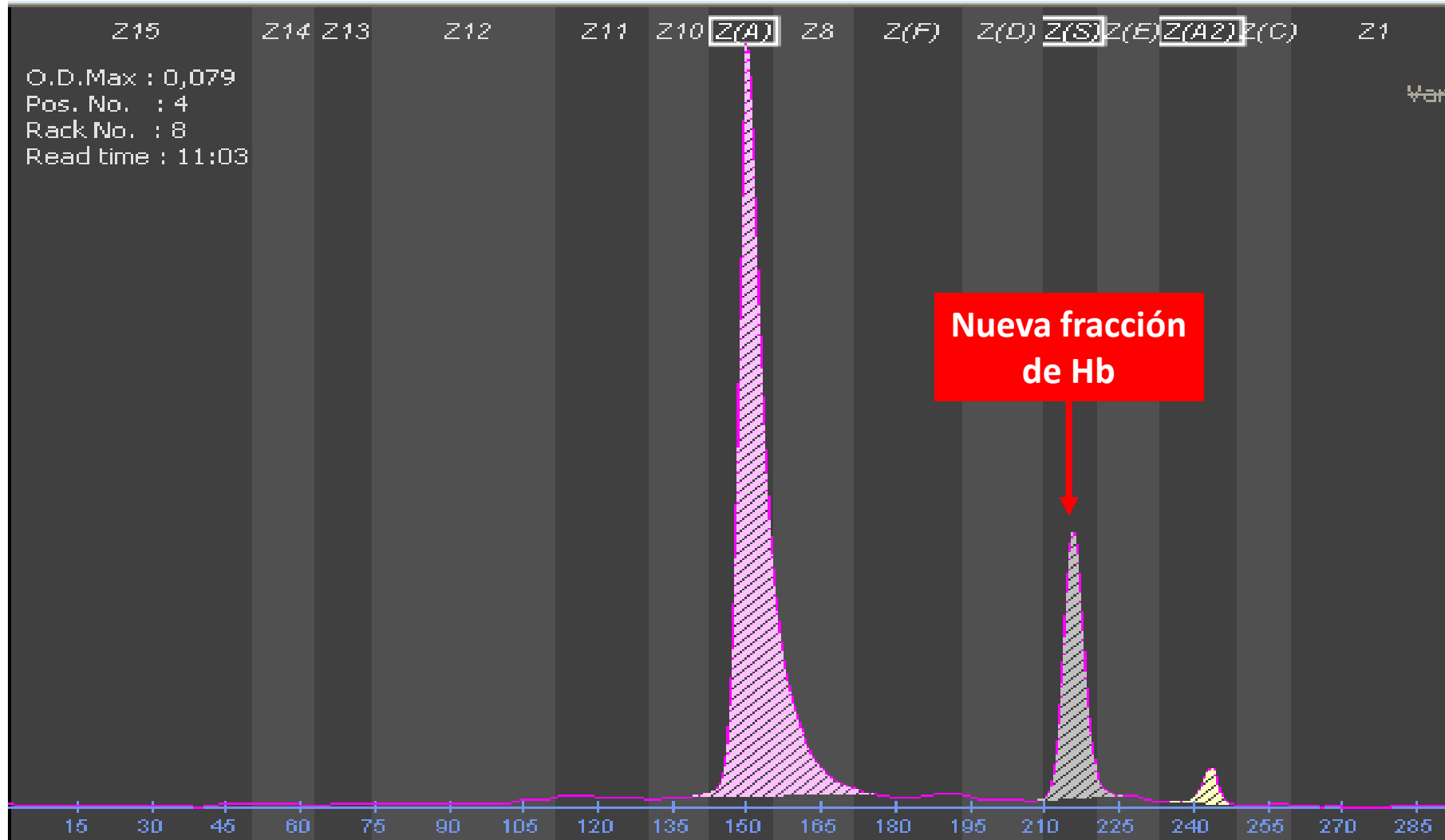


X = 191 O.D. = 0,0015



VARIANTE BETA

Fracción adicional en Z(S)

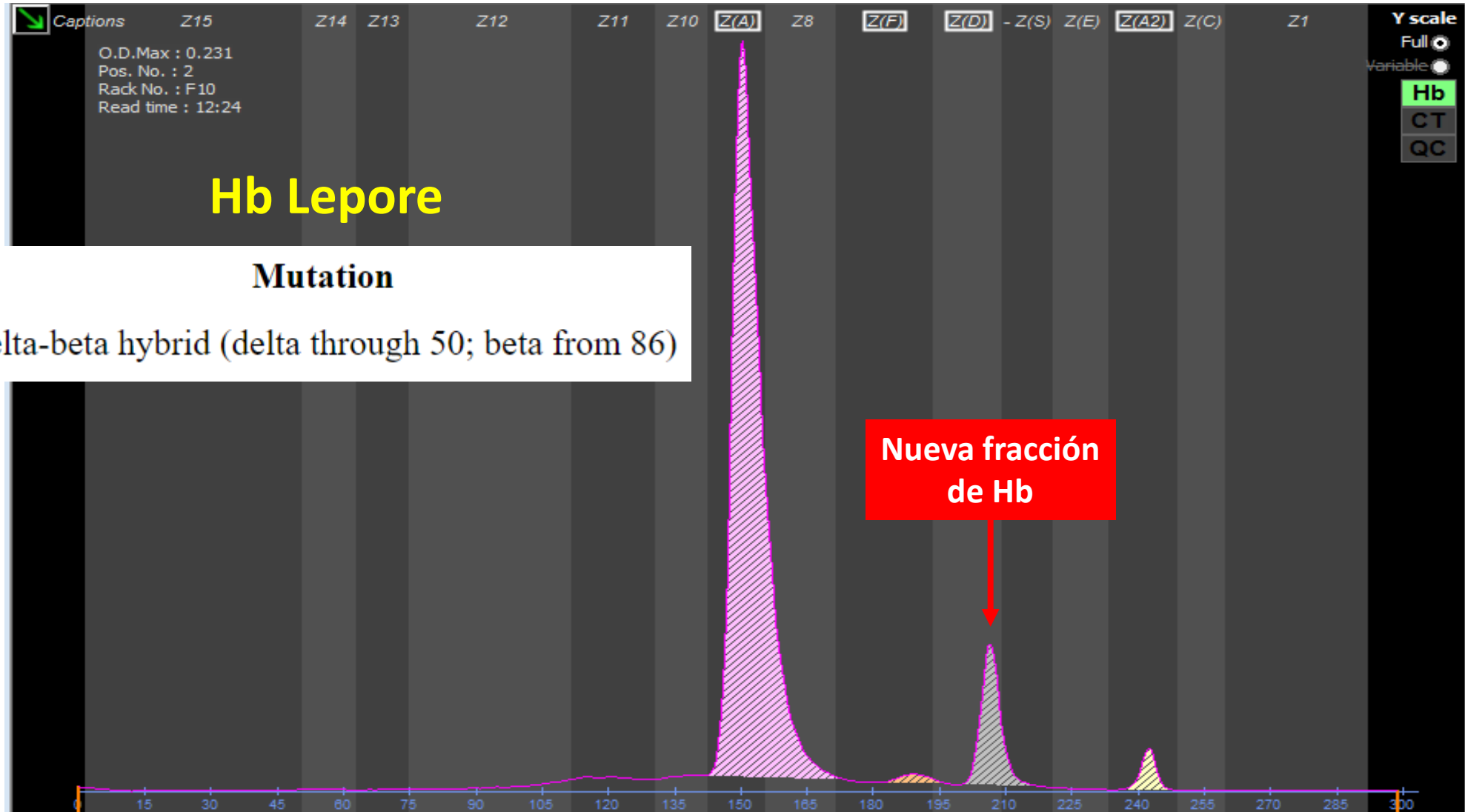


Hb A	78,7
Z	19,1
Hb A2	2,2



**VARIANTE BETA
(no HbS)**

Fracción adicional en Z(D)

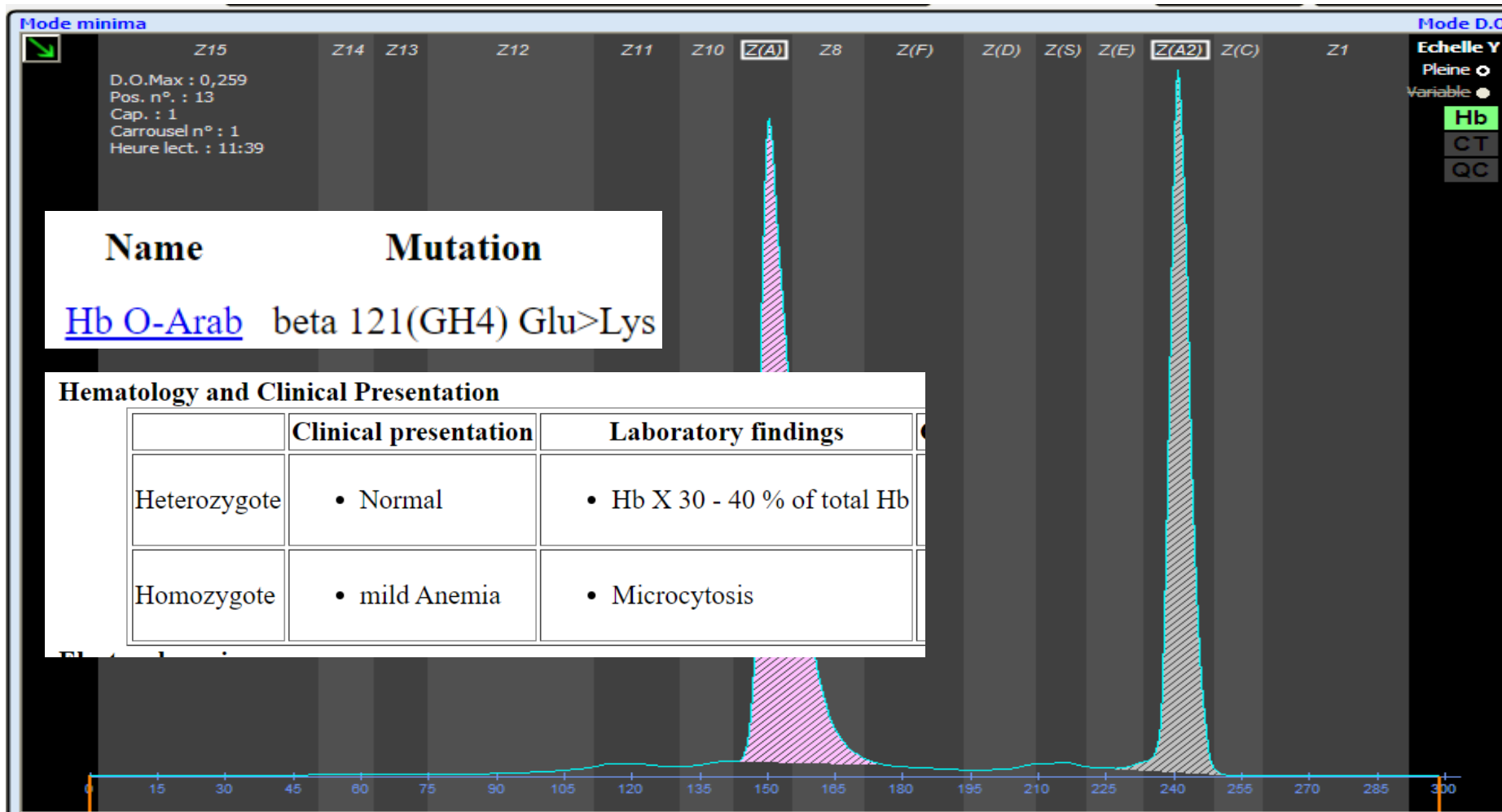


Hb A	85.6
Hb F or I	1.1
Hb D zoi	10.8
Hb A2	2.5



**VARIANTE BETA
(no HbD)**

Fracción adicional en Z(A2)

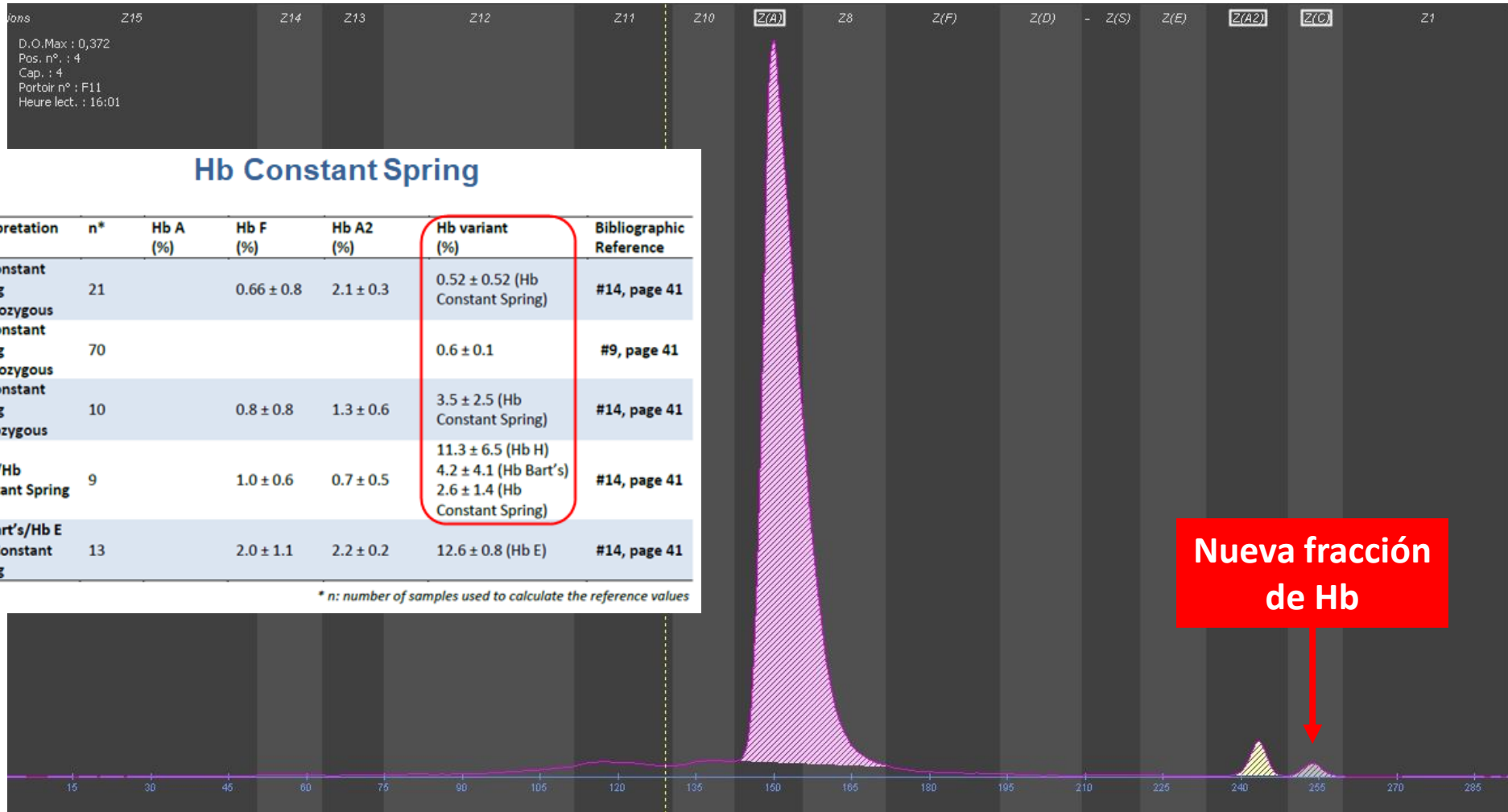


Hb A	59,3
Abnorm	40,7



VARIANTE BETA
(que co-migra con HbA2)

Fracción adicional en Z(C)



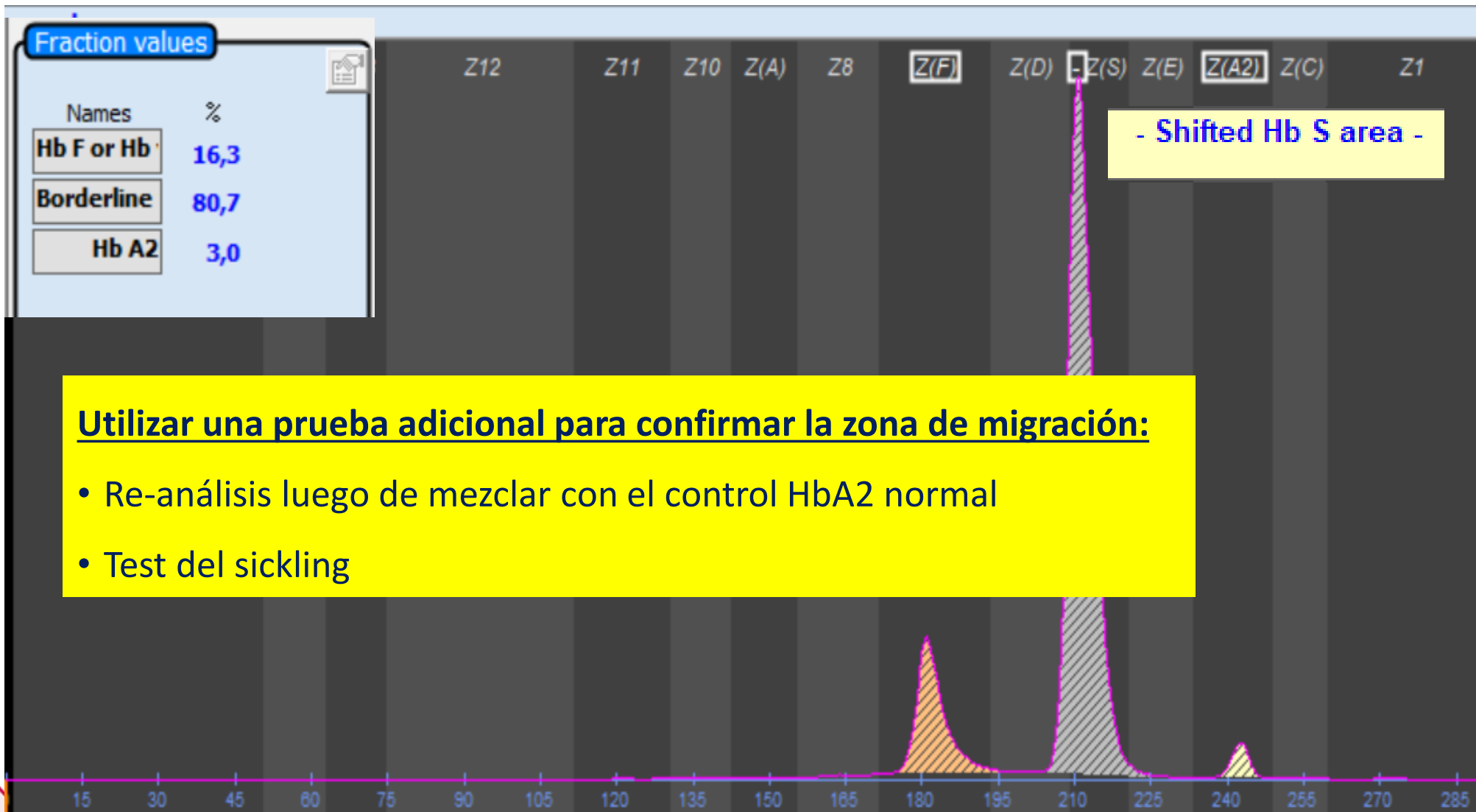
Hb A	97
Hb A2	2,1
Hb C zor	0,9



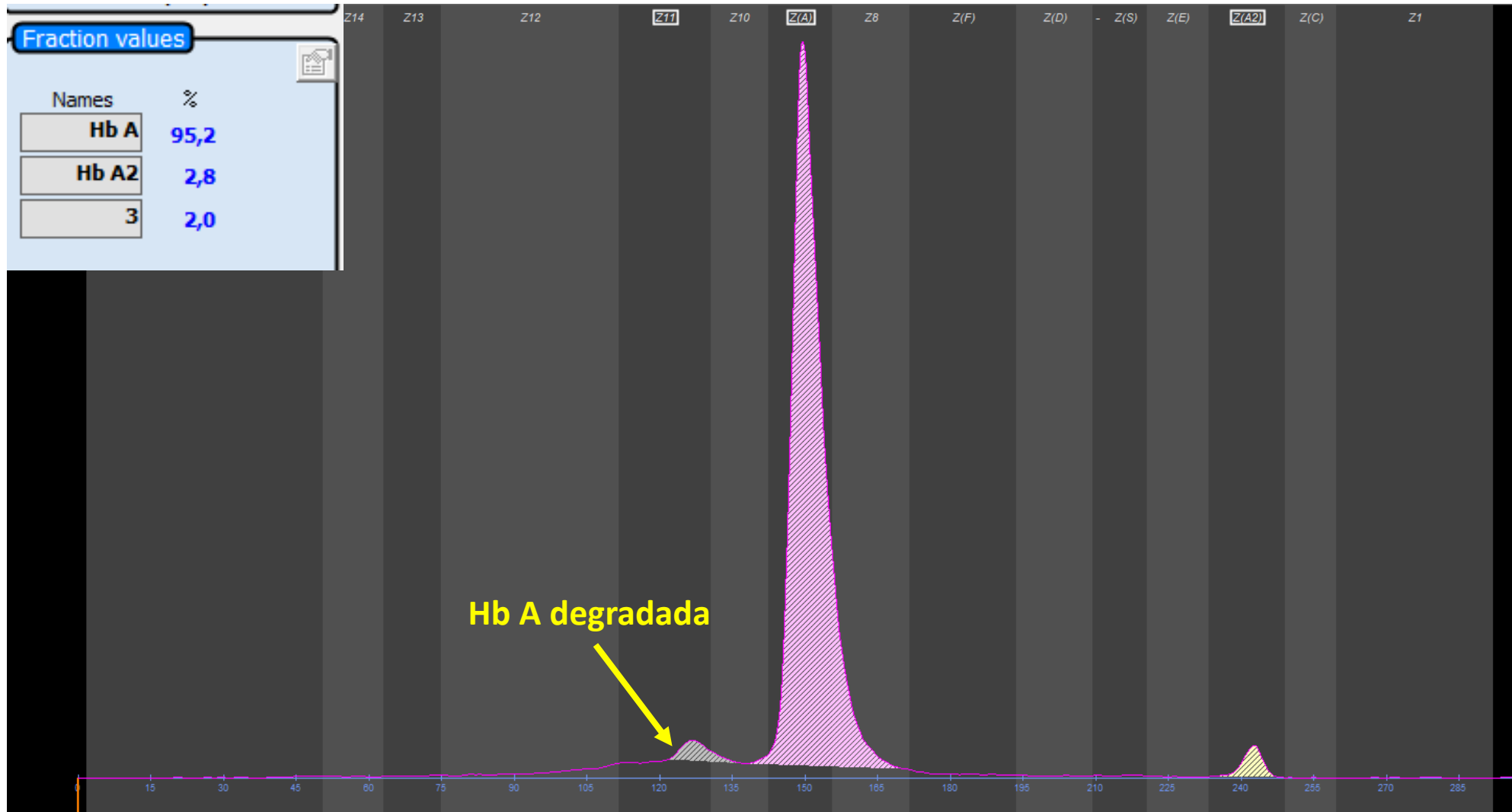
**Hb Constant Spring?
Proteinas plasmaticas?**

**Nueva fracción
de Hb**

Fracción adicional en "Shifted Hb S area"

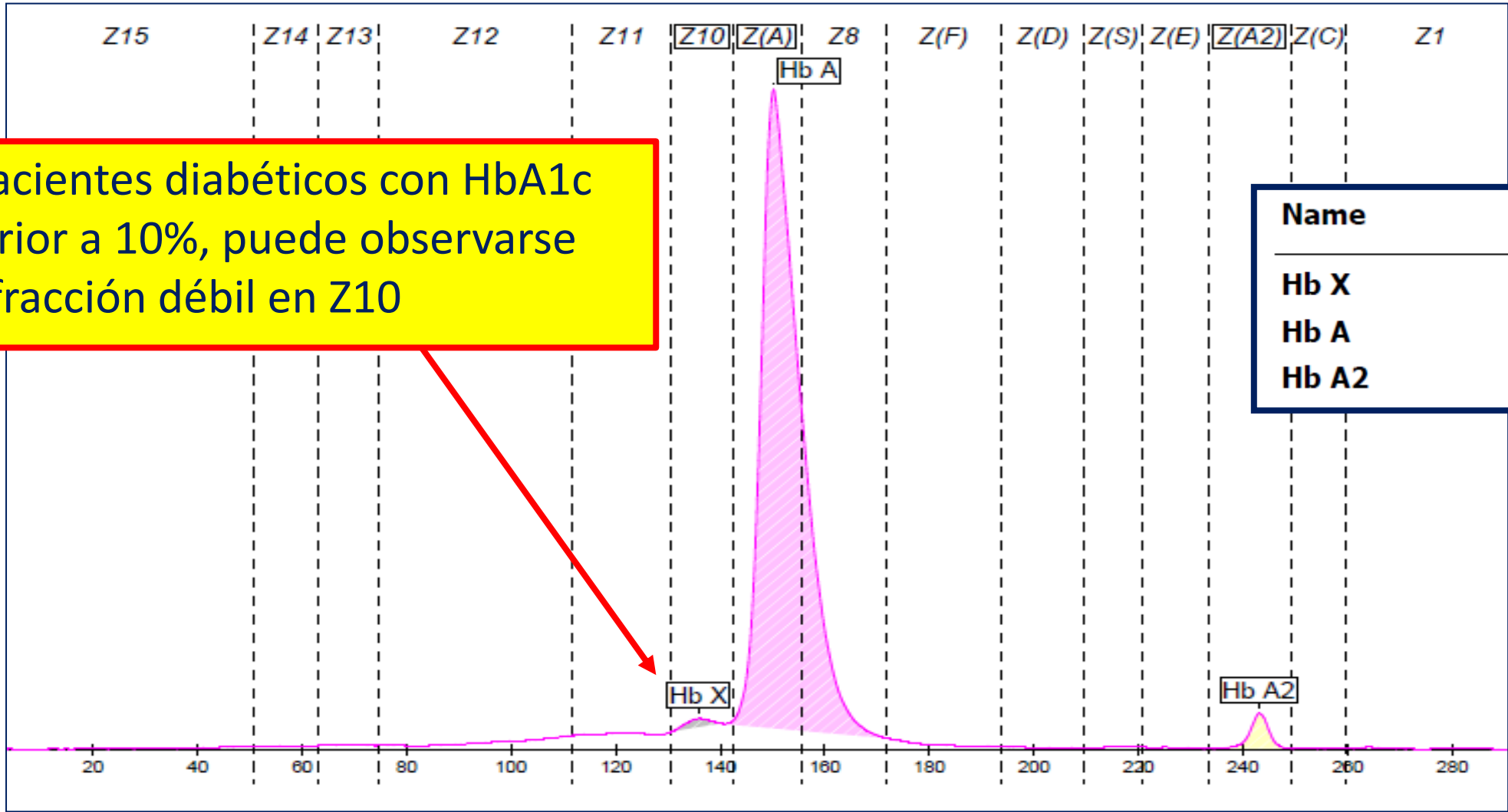


Fracción adicional en Z(11)



Fracción adicional en Z(11)

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



Name	%
Hb X	0,6
Hb A	96,9
Hb A2	2,5



Muchas gracias por su atencion !

sebia 
The new language of life