

Detección de variantes de hemoglobina en los estudios de hemoglobina glicosilada en gestantes.

Desde el inicio de la pandemia por CoVid-19, y dentro de las medidas adoptadas para limitar los contagios, se ha sustituido en algunos casos el test de O'Sullivan por la determinación de HbA1c para valorar el estado glucémico de la gestante.

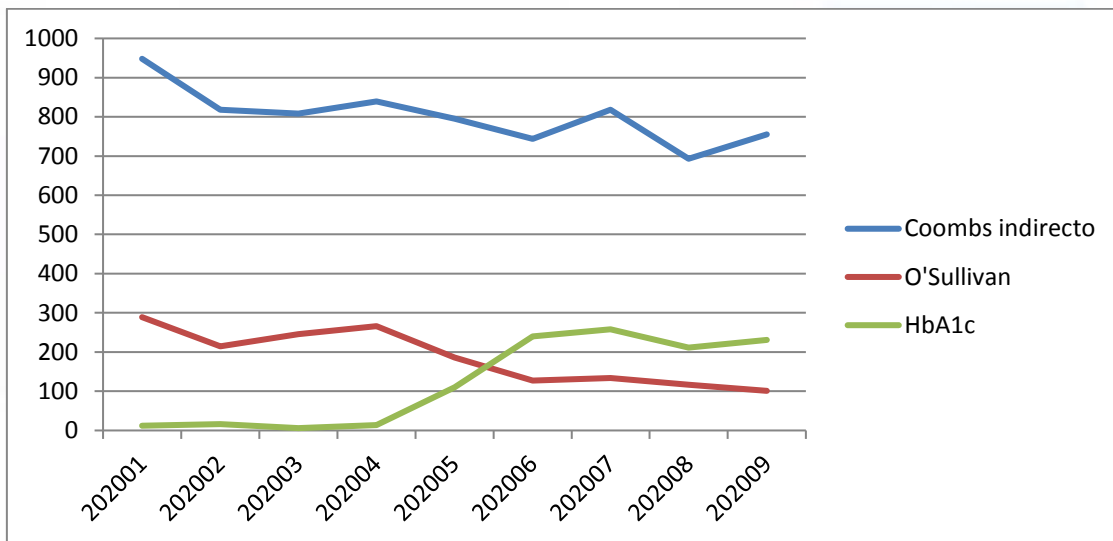


Fig 1.- Evolución mensual de los test de Coombs indirecto analizados en nuestro laboratorio y el número de test de O'Sullivan y determinaciones de HbA1c en estas analíticas.

La **HbA1c** es una molécula de hemoglobina a la que se le ha unido un radical glucosa en el grupo N-amino terminal de la cadena beta; es una unión estable, irreversible. Depende de los niveles de glucemia y del tiempo durante el que se han mantenido elevados (hasta llegar al final de la vida del hematíe). Refleja los niveles de glucemia en los últimos 2-3 meses.

Se han establecido distintos valores de referencia para la población adulta no gestante:

- < 5,6 %: normal
- 5,7 – 6,4%: prediabetes
- > 6,5%: diabetes
- >7%: mal control de diabetes

Niveles altos de HbA1c están correlacionados con una mayor tasa de complicaciones asociadas a diabetes, fundamentalmente afectación, ocular y vascular periférica.

Durante la gestación la Hb glicosilada se ha de interpretar con precaución.

Catlab Informa

Los estudios observacionales en diabetes previa y embarazo muestran menos resultados fetales adversos en asociación con A1c $<6-6,5\%$ (42–48 mmol / mol) al principio de la gestación. Los ensayos clínicos no han evaluado los riesgos y beneficios de lograr estos objetivos, y los objetivos del tratamiento deben tener en cuenta el riesgo de hipoglucemia materna al establecer un objetivo individualizado de $<6\%$ (42 mmol / mol) a $<7\%$ (53 mmol / mol). Debido a los aumentos fisiológicos en el recambio de glóbulos rojos, los niveles de A1c caen durante el embarazo normal. Además, como la A1C representa una medida integrada de glucosa, es posible que no capture completamente la hiperglucemia posprandial, que impulsa la macrosomía. Por lo tanto, aunque la A1c puede ser útil, debe usarse como una medida secundaria de control glucémico en el embarazo, después del autocontrol de la glucosa en sangre.

La diabetes gestacional se define como la diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre de la gestación que no había tenido un diagnóstico claro de diabetes previamente.

Habitualmente se realiza un cribado mediante la prueba de O'Sullivan (test de tolerancia oral de glucosa) en el primer trimestre si existen antecedentes o sospecha clínica, y en las semanas 24-28 de gestación en las pacientes no diagnosticadas previamente. Para la confirmación se recomienda un test de sobrecarga oral de glucosa.

Estos test requieren un tiempo prolongado de estancia en el centro sanitario, de extracciones, y es por ello que, de forma temporal, se han publicado recomendaciones de manejo de DM gestacional que recomiendan, en el primer trimestre, la determinación de HbA1c y de glucosa aleatoria para diagnosticar diabetes previa o identificar gestantes de alto riesgo, y en el 2º trimestre, alrededor de la semana 28, determinación de HbA1c, glucosa aleatoria y glucosa en ayunas.

En un documento de consenso publicado en Endocrinología, diabetes y nutrición, se proponen para el diagnóstico de diabetes gestacional un valor de HbA1c $\geq 5.7\%$, glucemia basal ≥ 95 mg/dl y de glucemia plasmática al azar $\geq 165-199$ mg/dl. Si los valores son HbA1c $\geq 6.5\%$, glucemia basal ≥ 126 mg/dl y de glucemia plasmática al azar ≥ 200 mg/dl estaríamos hablando de diabetes franca.

Existen diversos **métodos de medida de la HbA1c**, los más usados son HPLC, electroforesis capilar y turbidimetría.

En los dos primeros obtenemos una separación de las distintas fracciones de hemoglobinas y cuantificación del pico de HbA1c, y el resultado se expresa en porcentaje sobre el total de la HbA normal. Por turbidimetría únicamente obtenemos el porcentaje de la HbA1c sin otra información sobre las moléculas de hemoglobinas.

Catlab Informa

En esta imagen vemos un cromatograma normal, con la descripción y localización de cada pico.

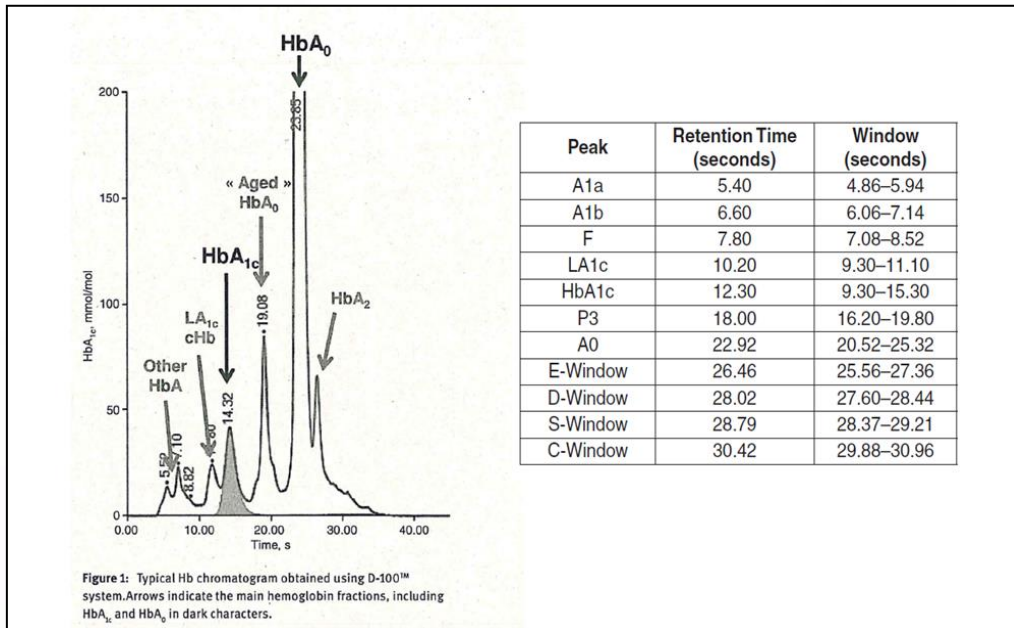


Fig 2.- Cromatograma normal, con la identificación de cada pico, y en la tabla adyacente podemos ver los intervalos de tiempo de retención asociados a los picos “normales” y a los picos “variantes”

Hemoglobinas variantes

Existen más de 1500 variantes de hemoglobinas pero no todas tienen significación clínica. Las hemoglobinopatías más relevantes son las talasemias, en las que hay un déficit de síntesis de cadenas de globinas, y las hemoglobinopatías estructurales, y de ellas la más importante es la Hemoglobinopatía S homocigota, drepanocitosis o anemia de células falciformes.

Para mayor información sobre los cuadros clínicos y diagnóstico podéis consultar los documentos “Catlab Informa” relacionados con hemoglobinopatías

https://www.catlab.cat/uploads/20160122/CI_66_Hemoglobinopatias.pdf

https://www.catlab.cat/uploads/20170127/CI_77_Hemoglobina_S.pdf

https://www.catlab.cat/uploads/20180321/CI_87_Informes_grnOficos_de_estudio_de_hemoglobinopatias..pdf

Catlab Informa

The screenshot shows the Catlab Informa website interface. At the top, there is a navigation bar with the Catlab logo, a search bar, and a 'Cercar' button. Below the navigation bar, there are menu items: 'Inici', 'Empresa', 'Línies de Treball', 'Catàleg', 'Qualitat', 'Catlab Informa', and 'Contactar'. The main content area is titled 'Hematologia' and features a sidebar with a 'Notícies' menu. The main text includes three articles: 'Butlletí N°101 - Octubre 2019' about Von Willebrand disease, 'Butlletí N°87 - Gener 2018' about hemoglobinopathies, and 'Butlletí N°77 - Gener 2017' about Hemoglobin S. A right-hand sidebar contains utility links like 'Extens catàleg de proves diagnòstiques', 'Cercador avançat de proves', 'Instruccions de recollida de mostres pels usuaris', and 'Convertidor d'Unitats Convencionals (UC) a Sistema Internacional (SI)'. A 'Consulta el catàleg' button is also present.

Fig 3.- En la web www.catlab.cat podéis encontrar todos los documentos informativos elaborados por las distintas secciones.

Los cuadros clínicos severos son la Betatalasemia Major, una hemoglobina S homocigota o un cuadro drepanocítico, y una enfermedad de hemoglobina H o un hydrops fetalis por Hb Bart's. Para hacer un diagnóstico prenatal supone detectar madres con hemoglobinopatías o portadoras de hemoglobinopatías y en los casos de riesgo hacer un estudio del padre biológico.

Situaciones maternas en las que se requiere analizar al padre biológico

- Hemoglobinopatías maternas
 - Hb SS
 - Hb SC
 - Hb SD^{punjab}
 - Hb SE
 - Hb SO^{Arab}
 - Hb S/Lepore y Hb Lepore/ β talasemia
 - Hb S/ β talasemia
 - Hb S/ $\delta\beta$ talasemia
 - Enfermedad de HbH ($-\alpha/\alpha$)
 - β talasemia mayor/intermedia
 - Hb E/ β talasemia

Catlab Informa

- Madre portadora de hemoglobinopatía
 - o Hb S (HbAS)
 - o Hb C (HbAC)
 - o Hb D^{punjab} (HbAD^{punjab})
 - o Hb E (HbAE)
 - o Hb O^{Arab} (HbAO^{Arab})
 - o Hb Lepore
 - o β talasemia
 - o $\delta\beta$ talasemia
 - o α^0 talasemia ($--/\alpha\alpha$)
 - o Persistencia hereditaria de Hb fetal (PHHF)
- Cualquier compuesto heterocigoto de dos o mas de las alteraciones anteriores
- Cualquier estado homocigoto de cualquiera de las anteriores alteraciones

Un vez sabemos qué hemos de detectar o descartar hemos de ver que técnicas podemos emplear.

1.- Hemograma:

Las talasemias tienen un hemograma característico, con aumento de hematíes, hemoglobina generalmente baja (puede ser normal en algunos casos), VCM bajo, generalmente inferior a 80 fL, en ocasiones muy inferior, y HCM bajo, inferior a 27. La HbE y HbLepore heterocigotas también tienen un hemograma "talasémico".

Las hemoglobinopatías estructurales (HbS, HbC, HbOArab, HbDPunjab) heterocigotas pueden presentar un hemograma completamente normal.

2.- Técnicas de análisis de proteínas

Los más usados son HPLC, electroforesis capilar y turbidimetría.

En nuestro centro analizamos la HbA1c por HPLC, cromatografía líquida de alta eficiencia. Es un 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.

El cromatograma es el gráfico obtenido tras la cuantificación de estos componentes. El valor obtenido es proporcional al área bajo la curva de cada fracción de hemoglobinas.

Utilizamos el analizador D-100 de Bio Rad diagnostics. Diseñado para el análisis de hemoglobina glicosilada. Tiempo de elución (procesado) de una muestra: 45 segundos.

Catlab Informa

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 de hemoglobina variante completamos estudio por el otro analizador HPLC (D-10) y por electroforesis.

Cada pico de hemoglobina se definirá por su tiempo de retención, que es el tiempo en segundos en el que se libera. Repetimos el cromatograma normal que hemos mostrado antes:

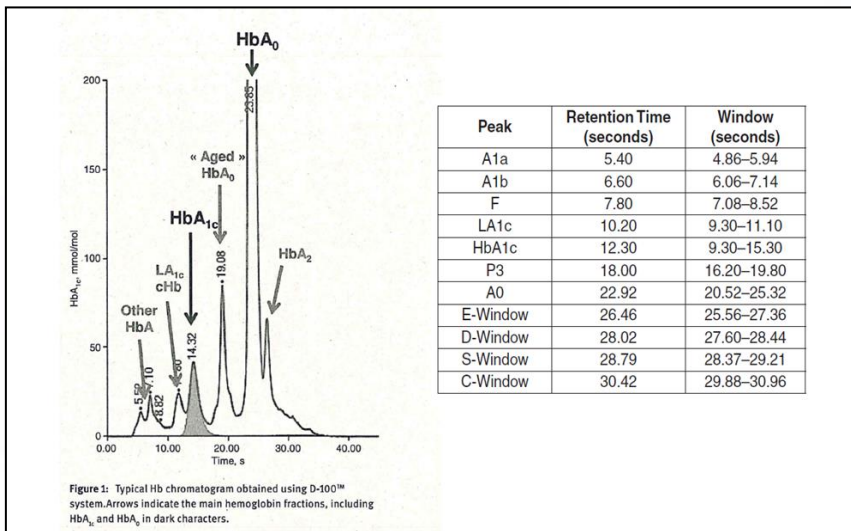


Fig 2 (bis).- Cromatograma normal, con la identificación de cada pico, y en la tabla adyacente podemos ver los intervalos de tiempo de retención asociados a los picos “normales” y a los picos “variantes”

En el caso de variantes de hemoglobinas estructurales detectaremos la presencia de picos anómalos, aquí vemos algunos ejemplos:

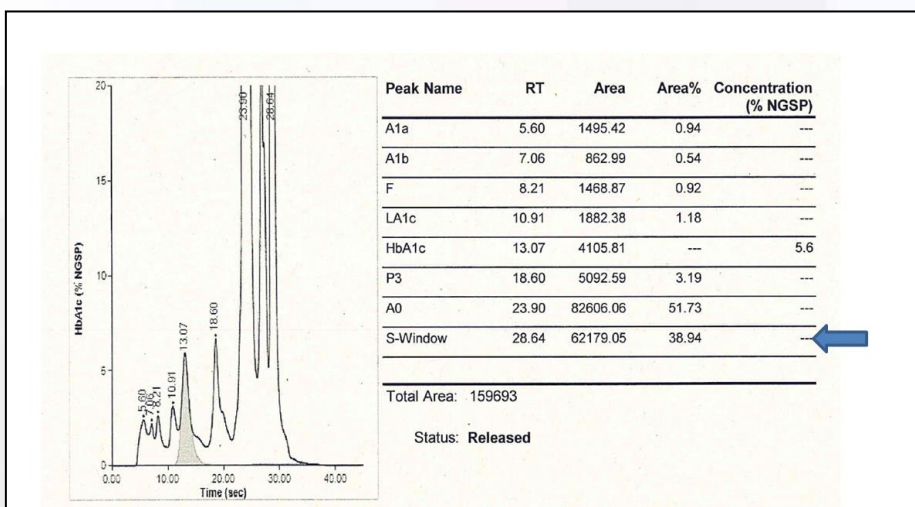


Fig 4.- HbS heterozigota

Catlab Informa

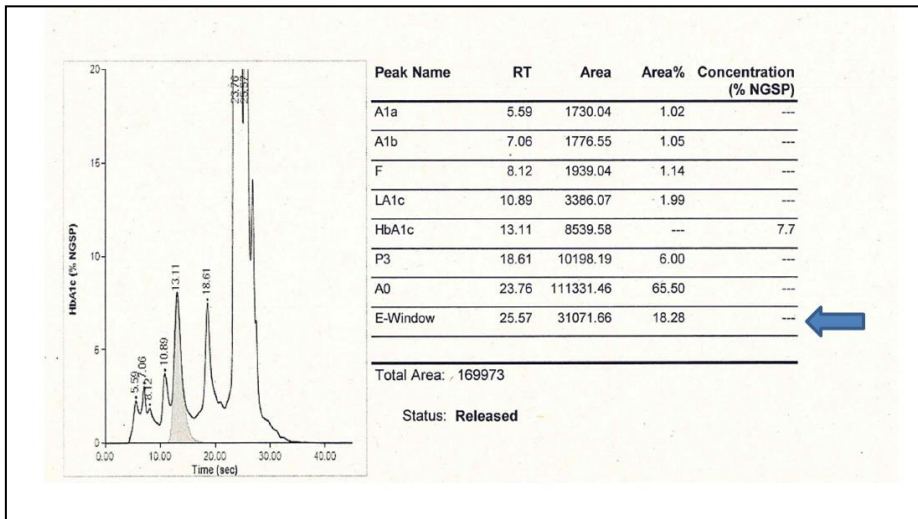


Fig 5.- HbE heterozigota

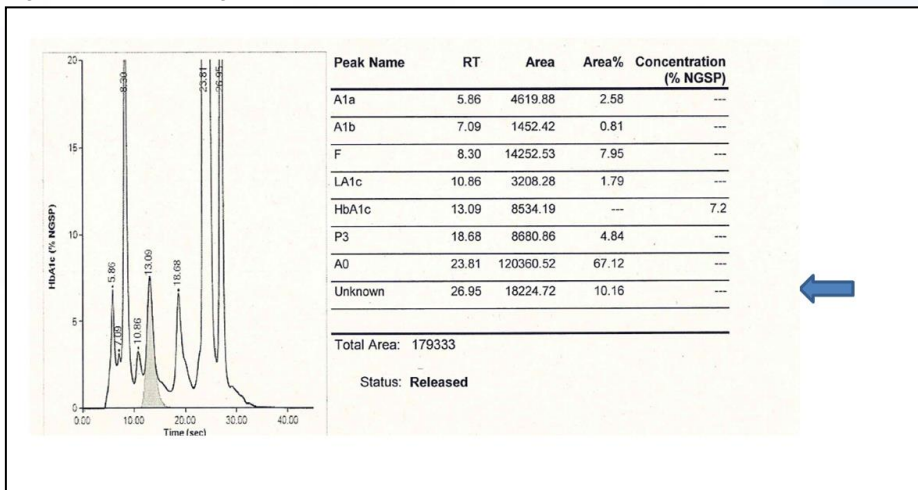


Fig 6.- Pico desconocido, HbF elevada, identificado tras electroforesis como HbLepore heterozigota

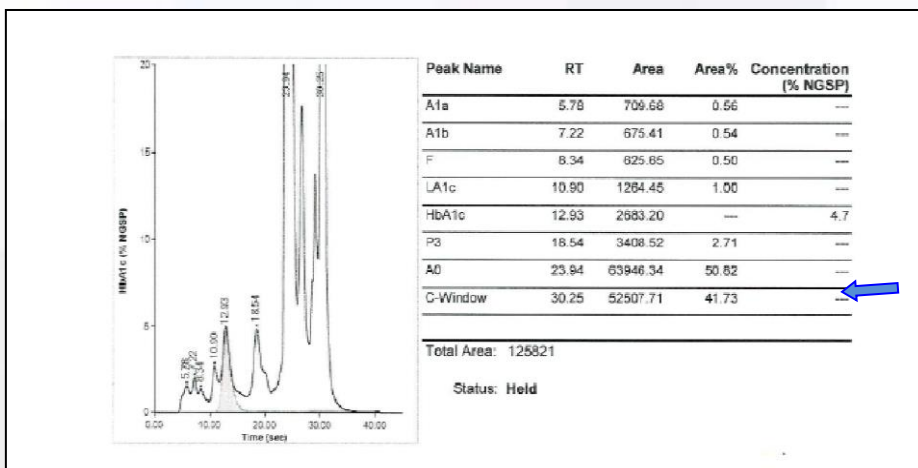


Fig 7.- Hemoglobina C heterozigota

La HbA2, típicamente aumentada en la betatalasemia, no se cuantifica en este analizador, por lo que en los casos en los que sospechamos una talasemia se procesarán esas muestras en el analizador dedicado a ello (D-10 o Variant II).

Catlab Informa

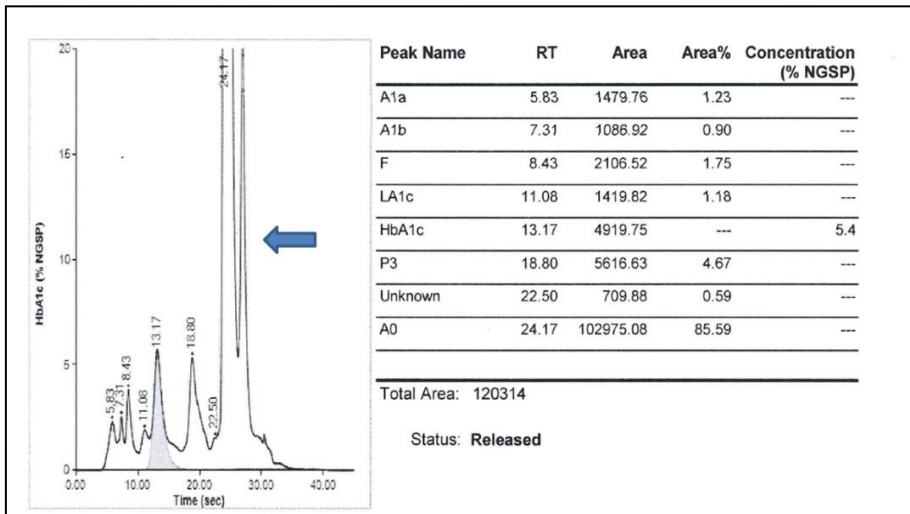


Fig 8.- Pico correspondiente a HbA2, no identificado ni informado en el analizador D-100

En este segundo analizador el tiempo de procesado es mucho mayor (6 minutos versus 45 segundos) y obtenemos una mayor definición de los picos variantes.

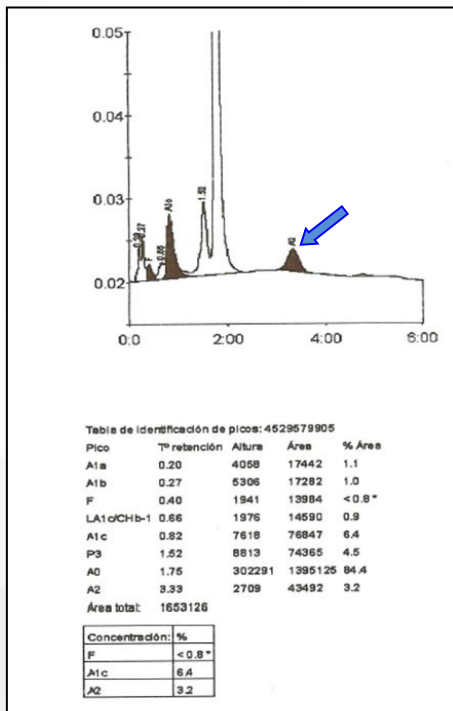


Fig 9.- Cromatograma del analizador D-10, donde cuantifica la HbA2. También se detecta la presencia de picos variantes D, C, E, O Arab, Lepore.....

En el analizador D-10 si la HbA2 es superior al 4% y no se detectan otros picos variantes, con hemograma compatible, se informa como "Compatible con betatalasemia menor".

Catlab Informa

En estos métodos de análisis de hemoglobinas los hallazgos se han de comprobar con un método alternativo:

Método inicial	Método alternativo propuesto
HPLC	Electroforesis alcalina
	Electroforesis ácida
	Isoelectroenfoque
	EC
	Espectrometría de masas
	Técnicas moleculares
Electroforesis Capilar (EC)	Electroforesis alcalina
	Electroforesis ácida
	Isoelectroenfoque
	HPLC
	Espectrometría de masas
	Técnicas moleculares

Sistemática de diagnóstico empleada en Catlab, específicamente en gestantes:

1.- Hemograma sugestivo de talasemia (microcitosis, eritrocitos elevados)

- Añadimos determinación de ferritina

- Añadimos estudio de HbA2 y F por HPLC: Si están elevadas HbA2 y/o HbF y no hay otros picos variantes emitimos un informe de presunción de betatalasemia menor o beta-delta talasemia

- Si HbA2 y F normales, microcitosis mantenida y se descarta ferropenia es sospechoso de portador de alfafalasemia. Como en la alfafalasemia hay 4 genes implicados y una amplia variedad clínica solamente añadimos estudio molecular cuando hay microcitosis importante no aclarada.

2.- Detección de picos variantes por HPLC, al analizar la HbA1c o en el estudio de talasemia:

- Por HPLC detectamos HbS, HbC, HbE, HbLepore, Hb Fetal elevada, HbD^{punjab}, HbO^{Arab}

Catlab Informa

- Si detectamos cualquiera de estos picos añadimos electroforesis alcalina para confirmar resultado.

- En ocasiones se sospecha de presencia de mutaciones alfa concomitantes y se añade estudio molecular de alfa talasemia.

Si se detecta cualquiera de las hemoglobinas variantes del listado anterior debería hacerse un estudio al padre biológico. Un hemograma normal no descarta que el padre no sea portador de una HbS, HbC...por lo que se tendría que solicitar también HbA2 y F.

El problema de este estudio secuencial es que hay un intervalo de tiempo entre las distintas técnicas y se retrasa la emisión del informe. El análisis de HbA2 y F se hace semanalmente, y la electroforesis quincenalmente.

Propuesta desde Catlab:

- Aumentar la frecuencia de análisis de HbA2 y F a 2 veces/semana.
- Si se detecta que la madre es portadora de betatalasemia o de una hemoglobina estructural se comunicará telefónicamente al médico responsable y se emitirá informe parcial. Solo se podrá hacer si en la solicitud de analítica consta como gestante o hay determinaciones que indiquen que la paciente es gestante.
- El médico solicitante ha de enviar estudio del padre biológico, solicitando hemograma y HbA2 y F, y en diagnóstico ha de constar "pareja de gestante portadora de hemoglobinopatía".

BIBLIOGRAFIA

Management of Diabetes in Pregnancy: *Standards of Medical Care in Diabetes—2020*

American Diabetes Association

Diabetes Care 2020 Jan; 43(Supplement 1): S183-S192. <https://doi.org/10.2337/dc20-S014>

Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes—2020*

American Diabetes Association

Diabetes Care 2020 Jan; 43(Supplement 1): S14-S31. <https://doi.org/10.2337/dc20-S002>

Update of the hyperglycemia Gestational diagnosis during the COVID-19 pandemic.

Codina M, Corcoy R, Goya MM; en representación del GEDE Consenso del Grupo Español de Diabetes y Embarazo (GEDE); GEDE Consenso del Grupo Español de Diabetes y Embarazo (GEDE). Endocrinol Diabetes Nutr. 2020 Oct;67(8):545-552. English, Spanish. doi: 10.1016/j.endinu.2020.05.002. Epub 2020 May 19. PMID: 32553745; PMCID: PMC7236733.

Catlab Informa

Renz PB, Chume FC, Timm JRT, Pimentel AL, Camargo JL. **Diagnostic accuracy of glycosylated hemoglobin for gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis.** Clin Chem Lab Med. 2019 Sep 25;57(10):1435-1449. doi: 10.1515/cclm-2018-1191. PMID: 30893053.

Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, Roper D, Rees DC, de la Salle B, Streetly A; British Committee for Standards in Haematology. **Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis.** Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):35-49. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08054.x. Epub 2010 Jan 13. PMID: 20067565.

Kohne E. **Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment.** Dtsch Arztebl Int. 2011 Aug;108(31-32):532-40. doi: 10.3238/arztebl.2011.0532. Epub 2011 Aug 8. PMID: 21886666; PMCID: PMC3163784.

https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/656094/Antenatal_Laboratory_Handbook.pdf

Teresa Villalba

Responsible Hematologia

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35038 / 660.67.63.01

tvillalba@catlab.cat

www.catlab.cat

Jorge Medina

Hematologia

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35038

jmedina@catlab.cat

www.catlab.cat

Miquel Díaz

Hematologia

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35038 - 35037 / 696.03.22.33

mdiaz@catlab.cat

www.catlab.cat