

	INSTRUCTIVO PARAMETRIZADO	VERSION: 1
		CODIGO: IT-QU-133
Tamizaje neonatal-Determinación hemoglobinopatías		FECHA: 24/Oct/2024

1. Objeto

Determinación de diferentes tipos de hemoglobinas, presentes en muestras de sangre seca sobre papel filtro 903, como test para el screening de bebés con hemoglobinopatías utilizando el sistema Ultra2 Genesys.
2. Alcance

Aplica desde que se reciben las muestras en papel de filtro hasta que se emite el resultado.
3. Enfoque diferencial

Instructivo para la atención con enfoque diferencial
4. Talento humano

Los bacteriólogos que tienen la competencia para realizar esta prueba y está avalada por la dirección de acuerdo con los entrenamientos proporcionados y la evaluación de competencias. Esta prueba solo va a ser procesada en la sede Tesoro.
5. Equipo biomédico

Ultra2 analyzer
6. Medicamentos

No aplica
7. Dispositivos médicos e insumos

Reactivos: Reactivos de dilución, fase móvil 1 y 2, Reactivo wash

Calibrador: F A S C

Controles bajo y alto

Software

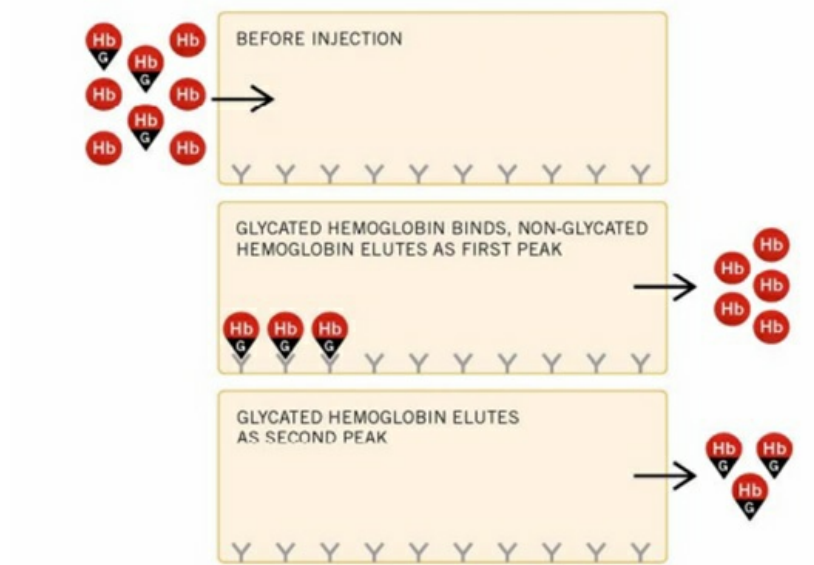
Columna

Gradillas: 205,206,209
8. Principio del procedimiento

La hemoglobina está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo.

El ultra2 utiliza los principios de afinidad al boronato y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las bombas transfieren los reactivos a través de la columna analítica. La columna analítica contiene ácido aminofenilborónico unido a un soporte de polímero poroso (gel). Las muestras se inyectan automáticamente en la columna durante el flujo del Reactivo de elución nº 1 (tampón 2A). El componente glucosilado se une al boronato, mientras que el componente no glucosilado pasa a través de la columna al detector espectrofotométrico, en el que es detectado a 413 + 2 nm. Después de la elución del componente no glucosilado, el ultra2 bombea el Reactivo de elución nº 2 (tampón 2A), que desplaza al componente glucosilado de la columna. El componente glucosilado pasa a continuación a través del detector.

El ordenador procesa la señal procedente del detector espectrofotométrico y calcula la concentración de hemoglobina o de proteína plasmática glucosiladas como un porcentaje del total detectado



9. Muestra recomendada

La muestra recomendada es sangre tomada de talón del menor, 24 horas post lactancia. Se debe realizar una punción de la zona medial o lateral del sitio.

La muestra debe secarse al aire libre durante mínimo 3 horas, en posición horizontal y a temperatura ambiente (18-22 °C), apartada del sol directo o de fuentes de calor y evitando el contacto con otras superficies.

El almacenamiento de la muestra por cortos periodos de tiempo se realiza a temperaturas de 2-8 °C protegidas de la humedad. la estabilidad es de 3 meses, si se va a almacenar por periodos de tiempo más extensos de sugiere hacerlo a -20°C .

Los criterios de rechazo son: Muestra insuficiente, diluida, hemolizada, coagulada, sobresaturada.



10. Papel filtro utilizado para toma de la muestra

Para la recolección de la muestra, se debe utilizar papel filtro 903.

Se debe asegurar que la gota de sangre penetre y sature el papel filtro delimitado para la toma de la muestra, no se deben aplicar gotas sucesivas en el mismo círculo y se debe evitar ejercer presión en el sitio de punción, pues ocasiona hemólisis y diluciones de la muestra.

11. Instrumento de medición y reactivos requeridos

- . Reactivos: Reactivos de dilución, fase móvil 1 y 2, Reactivo wash
- . Calibrador: F A S C
- . Controles bajo y alto
- . Software
- . Columna
- . Gradillas: 205,206,209

A tener en cuenta:

- Los reactivos están listos para su uso, se deben conservar a temperatura ambiente.
- No utilizar una vez superada la fecha de caducidad que figura en la etiqueta.
- Las botellas sin abrir de los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad que figura en el envase.

- Después de abrir las botellas de reactivos, éstos son estables al menos durante 8 semanas a temperatura ambiente
- Mantenga cerrados los tapones de los reactivos cuando los está utilizando.
- Los reactivos deberían ser transparentes e incoloros.
- No los utilice si están turbios o han cambiado de color.
- No ingerir ni pipetear con la boca. Evitar el contacto con los ojos.
- Si no se va a instalar de inmediato la columna, se debe conservar en nevera a una temperatura de 2° - 8 °C.
- Deje que la columna alcance la temperatura ambiente antes de instalarla en el sistema.
- Si se sabe que no se va a usar el instrumento durante un periodo de 7 días o más, retire la columna después de desactivar el instrumento.
- Tape los extremos y consérvela refrigerada hasta su nuevo uso.

12. Interferencias

- . Patologías que influyan sobre la supervivencia normal de vida de los eritrocitos
- . Muestras lipémicas (mayor a 6.000 mg/dl)
- . Muestras ictéricas (bilirrubinas mayores a 48 mg/dL)
- . Hemo cromos formados durante el almacenamiento

13. Intervalos biológicos de referencia

Hemoglobina A: 15 % a 40 %
 Hemoglobina A2: 0 % a 1 %
 Hemoglobina F: 58 % a 84 %
 Otro tipo de hemoglobina ausente

La hemoglobina es un compuesto proteico que se encuentra en el interior de los glóbulos rojos y que contiene hierro; su función es el transporte del oxígeno por todo el cuerpo. Está formada por el grupo hemo, que es la porción que contiene hierro, y por las cadenas de globina, que son proteínas. La proteína globina consta de cadenas de aminoácidos, que son como los "bloques de construcción" de las proteínas. Hay varios tipos diferentes de cadenas de globina, denominadas alfa, beta, delta y gamma. Los tipos normales de hemoglobina incluyen:

Hemoglobina A (HbA): constituida por dos cadenas Alfa y dos cadenas beta. Presente en el 97% de la población adulta.

Hemoglobina A2 (HbA2): constituida por dos cadenas Alfa y dos cadenas Delta. Presente en el 2.5% de la población adulta.

Hemoglobina fetal (HbF): constituida por dos cadenas Alfa y dos cadenas gamma. Presente en el 0.5% de la población adulta y el 98% de la población fetal.

Hemoglobina Portland: constituida por dos cadenas Delta y dos cadenas gamma

Hemoglobina gower I (HbGI): constituida por dos cadenas Delta y dos cadenas épsilon

Hemoglobina gower II (HbGII): constituida por dos cadenas Alfa y dos cadenas épsilon

Los cambios genéticos de la globina provocan alteraciones en la proteína de dicha globina, lo que produce una hemoglobina estructuralmente alterada.

Son cuatro los genes que codifican las cadenas de globina alfa y dos genes (cada uno) codifican las cadenas de globina beta, delta y gamma.

Los glóbulos rojos que contienen una hemoglobina anormal no pueden transportar el oxígeno de manera eficiente y el organismo puede destruirlos antes de lo normal, ocasionando una anemia hemolítica.

Se han documentado varios cientos de variantes de hemoglobina, pero solo unas pocas son frecuentes y clínicamente significativas. Algunas de las variantes de hemoglobina más comunes incluyen (6)

. Hb S: Pueden presentarse dos formas en la enfermedad homocigota (Hb S - Hb S) o heterocigota (Hb A - Hb S), siendo común que se presente en población de raza negra y/o su mestizaje, causando la anemia falciforme, la cual se caracteriza por el cambio en la estructura biconcava del eritrocito, a una forma de hoz, razón por la cual una vez se libera el oxígeno, el eritrocito pierde su flexibilidad, causando obstrucción en los vasos sanguíneos pequeños.

. Hb C: La enfermedad de la hemoglobina C ocurre principalmente en personas con ascendencia africana o afroamericana. En Estados Unidos, en el 2 al 3% de las personas con ascendencia africana o afroamericana está presente una copia del gen que causa la enfermedad de la hemoglobina C. Sin embargo, para desarrollarla, es necesario que una persona herede dos copias del gen anormal. En general, los síntomas son escasos. La anemia varía en gravedad. Los individuos que padecen esta enfermedad, en especial los niños, pueden cursar con episodios de dolor abdominal y articular, bazo agrandado e ictericia leve, pero no sufren crisis graves, como en la anemia drepanocítica. Los cálculos biliares son una complicación común de la enfermedad por la hemoglobina C. (7)

. Hb D: La expresión clínica de la HbD se caracteriza por anemia hemolítica moderada con esplenomegalia; la morfología eritrocitaria incluye hipocromía, microcitosis, células en blanco de tiro y eventualmente esferocitos. Hay disminución de la fragilidad osmótica y de la afinidad de la hemoglobina al oxígeno.

. Hb E: La enfermedad de la hemoglobina E afecta principalmente a personas naturales o ascendentes del sudeste asiático. Esta enfermedad causa anemia leve, pero ninguno de los otros síntomas que se dan en la anemia drepanocítica y en la enfermedad de la hemoglobina C. (7)

Entre otras, siendo la Hb S y Hb C las más frecuentes.

Después del nacimiento, la hemoglobina fetal (HbF), disminuye constantemente hasta alcanzar los niveles adultos. La velocidad a la que los recién nacidos convierten HbF en HbA varía mucho entre pacientes, por lo que se espera una amplia gama de valores de HbF y HbA. Al nacer, el nivel promedio de la HbF es de un 80%.

14. Precauciones de seguridad

Se debe tener en cuenta las precauciones de seguridad universales para la manipulación de muestras de origen humano.

Como ningún método de ensayo puede ofrecer una seguridad completa sobre la ausencia de agentes infecciosos, se deben considerar todas las muestras, controles y calibradores clínicos como potencialmente infecciosos. y se deben manipular de acuerdo con las pautas de seguridad de los riesgos biológicos.

15. Fuentes de variabilidad

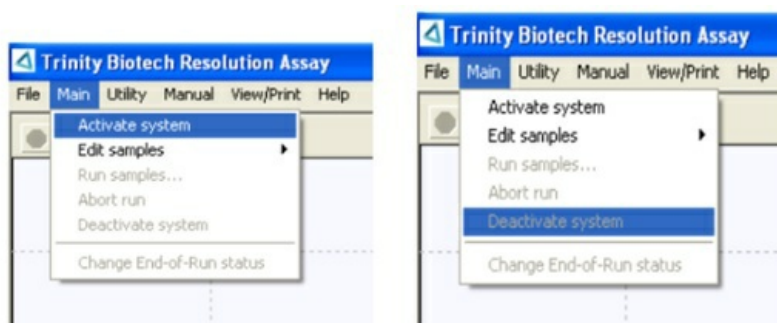
Las contaminaciones cruzadas de los reactivos o muestras pueden causar falsos resultados.

Seguir estrictamente recomendaciones de estabilidad y uso de reactivos.

Antes de realizar punción de la zona, limpiar con alcohol isopropílico 70% y dejar secar bien la zona.

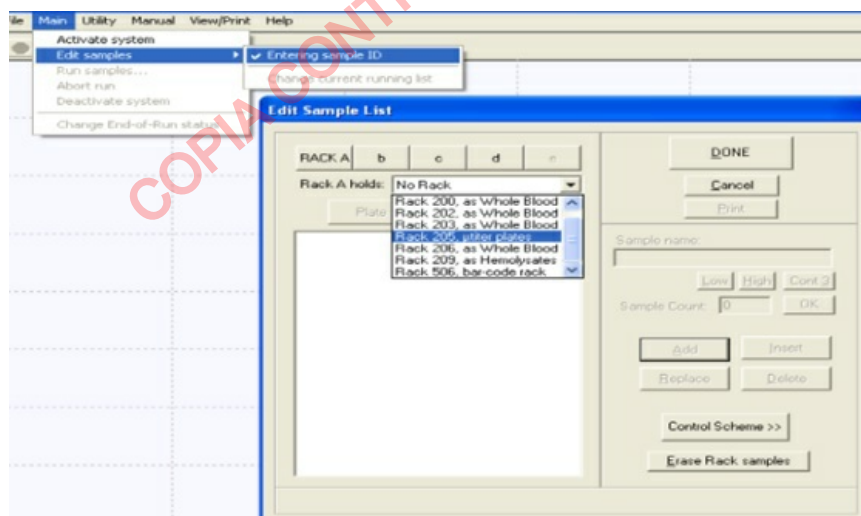
16. Procesamiento

. Abra el programa Genesys. Se visualizará la pantalla de inicio, seleccionar la opción main, active system y esperar 28 minutos para iniciar corrida



. Coloque en la Gradilla 209 identificada como D :
Posición 1. FASC preparado
Posición 2: Control bajo preparado
Posición 3: Control alto. Preparado

. Programar de la siguiente manera: Main, edit samples, entering samples ID y despliega la siguiente ventana:



. Confirme inicialmente que los racks a,b,c,d,e no tengan muestras programadas.
. Seleccione el Rack 209 en la posición D para programar los controles.
. Opción low corresponde al control 1 y high al 2, adicione los dos en la bandeja D con la ayuda de la opción Add.
. Seleccione la opción Done para guardar el cambio
. El instrumento vuelve a quedar nuevamente en la ventana principal.
. Seleccione la opción Main, Run samples y se despliega una nueva ventana para seleccionar el tipo de metodología por el cual se desea procesar los controles, se selecciona la opción High resolution y se da la opción ok
. Inicia la corrida
. Una vez es aprobada la calibración y los controles se puede realizar procesamiento de muestras.

Siga el mismo paso a paso pero en vez de utilizar el Rack 209 posición D , utilice el Rack 205 en la posición A y con ayuda de la pistola de código de barras matricule las muestras, ponche los spots y acomode la placa según la configuración realizada. Una vez sea dispensado el reactivo diluyente en cada una de las muestras, coloque sobre la placa de muestras la cinta adhesiva.
Espere que la corrida genere los resultados para interpretar.

Al revisar el cromatograma debe tener en cuenta para su análisis, el aspecto de este, el total del área de los picos, la presión y la temperatura del analizador en la corrida.

Durante el análisis, revise la presión esta debe ser estable y mantenerse aproximadamente entre 50 a 100 Bar. Asegúrese de que se obtienen 4 picos en el calibrador y las áreas de conteo deben estar idealmente por encima de 500000.

17. Bibliografía

1 SHEILA BARRIAL FLORES. (Julio 2021). HEMOGLOBINOPATÍAS ESTRUCTURALES: TIPOS, CAUSAS Y TRATAMIENTO. [Tesis doctoral o de maestría, Universidad de Sevilla].

2. Varela, Indira, Sequera, Alida, & Olivero, Rhaiza. (2013). Detección de hemoglobinopatías en recién nacidos del Hospital Materno Infantil "Dr. José María Vargas" de la ciudad de Valencia, Venezuela. Salus, 17(2), 6-12. Recuperado en 12 de octubre de 2023.

3 Cortes García, Mina Gabriela Ortiz Bolivar, Faiver Snaider. (2019-10-05). Determinación de hemoglobinopatías y anemia ferropénica en población estudiantil Afrodescendiente de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. ABA. Bacteriología y Laboratorio Clínico , Repositorio digital, pp.

4. Manual del equipo

5.Teresa Collazo Mesa. (ultima modificaión 2023-09-08). Diagnóstico prenatal de hemoglobinopatías en Cuba en el periodo 2011-2020. Congreso, Congreso, pp. 5

6. labtestonline. (2022, 26 de febrero). ¿Qué son las hemoglobinas anormales? SEQC.

7. Evan M. Braunstein MD PhD Johns Hopkins University School of Medicine. (2022, julio). Enfermedades de la hemoglobina C, S-C y E. Manual MSD.

Si este documento se encuentra impreso no se garantiza su vigencia, por lo tanto es copia NO CONTROLADA, la versión actual se encuentra en Isolución

VERSION	FECHA	RAZON DE LA ACTUALIZACION
01	24/Oct/2024	Se adiciona intervalos biológicos de referencia Se modifica parte del procesamiento.



ELABORO	REVISO	APROBO
Nombre: Yulime Andrea Monsalve Martinez Cargo: Dirección de Calidad Fecha: 24/Oct/2024	Nombre: Elizabeth Gómez Zuluaga Cargo: Bacteriólogo(a) de inmunoquímica Tesoro Fecha: 24/Oct/2024	Nombre: Carlos Gonzalo Robledo Restrepo Cargo: Director General Fecha: 25/Oct/2024