

COD 11077 20 determinaciones	COD 11078 100 determinaciones
CONSERVAR A 15-30°C	
Reactivos para medir la concentración de HbA ₂ Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico	

HEMOGLOBIN A₂



HEMOGLOBINA A₂
INTERCAMBIO IÓNICO - SIN INTERFERENCIA DE HbS

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Después de preparar un hemolizado, las hemoglobinas son retenidas por una resina de intercambio aniónico. La hemoglobina A₂ (HbA₂) se eluye de forma específica bajo estrictas condiciones de pH y fuerza iónica, cuantificándose por lectura fotométrica a 415 nm¹.

CONTENIDO

	COD 11077	COD 11078
1. Reactivo	80 mL	400 mL
2. Microcolumnas	1 x 20	1 x 100

COMPOSICIÓN

1. Reactivo. Tampón biológico 15 mmol/L, detergente 0,1 g/L, pH 7,6.
 2. Microcolumnas. Contienen resina de intercambio aniónico equilibrada.
- Utilizar únicamente Reactivo 1 y Microcolumnas del mismo número de lote.

CONSERVACIÓN

Conservar a 15-30°C.

El reactivo y las microcolumnas son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivo: Presencia de partículas, turbidez.
- Microcolumnas: Ausencia de tampón sobre el lecho de la resina, coloración amarillenta de la resina.

EQUIPO ADICIONAL

- Fotómetro para lecturas a 415 nm (405-425).

MUESTRAS

Sangre total recogida mediante procedimientos estándar.

La hemoglobina A₂ es estable durante 8 días a 2-8°C. Puede utilizarse heparina o EDTA como anticoagulante.

PROCEDIMIENTO

Preparación del hemolizado

1. Pipetear en un tubo de ensayo:

Sangre	50 µL
Agua destilada	200 µL

Agitar. Este hemolizado se utilizará en los pasos 3 y 7.

Separación y lectura de la HbA₂ (Notas 1 y 2)

2. Destapar la parte superior de la Microcolumna (2), romper a continuación la lengüeta inferior y bajar el disco superior hasta el nivel de la resina, evitando comprimirla, con la ayuda del extremo plano de una pipeta. Dejar gotear hasta que el líquido alcance el nivel del disco, desechando el eluido.
3. Aplicar cuidadosamente sobre el disco superior:

Hemolizado	50 µL	Desechar el eluido
------------	-------	--------------------

4. Cuando haya penetrado todo el hemolizado añadir, procurando arrastrar los posibles restos del mismo:

Reactivo (1)	200 µL	Desechar el eluido
--------------	--------	--------------------

5. Colocar la microcolumna sobre un tubo de ensayo y añadir:

Reactivo (1)	3,0 mL	Recoger el eluido (Fracción HbA ₂)
--------------	--------	--

6. Agitar bien y leer la absorbancia (A) de la fracción HbA₂ a 415 nm frente a agua destilada (A_{HbA₂}). La absorbancia es estable al menos durante seis horas.

Lectura de la hemoglobina total (Hb_{TOTAL})

7. Pipetear en un tubo de ensayo:

Agua destilada	12,0 mL
Hemolizado	50 µL

8. Agitar bien y leer la absorbancia (A) a 415 nm frente a agua destilada (A_{Hb TOTAL}). La absorbancia es estable al menos durante seis horas.

CÁLCULOS

El tanto por ciento de HbA₂ en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general.

$$\frac{A_{HbA_2} \times V_{HbA_2}}{A_{Hb\ TOTAL} \times V_{Hb\ TOTAL}} \times \frac{100}{Rec} = \% HbA_2$$

El volumen de HbA₂ (V_{HbA₂}) es 3 mL, el volumen de Hb total (V_{Hb TOTAL}) es de 12 mL y la media de la recuperación (Rec) es 0,82. Se deduce la fórmula siguiente para el cálculo de la concentración:

$$\frac{A_{HbA_2}}{A_{Hb\ TOTAL}} \times 30,5 = \% HbA_2$$

VALORES DE REFERENCIA

Intervalo de referencia: 1,3 - 3,7 %

Rasgo β -Talasémico: 4,0 - 10,0 %

Estos valores² se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de los controles de Hemoglobina A₂, Normal (cod. 10000) y Elevado (cod. 10011), para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

- Repetibilidad (intra-serie):

Concentración media	CV	n
2,5	4,1	25
5,3	5,2	25

- Reproducibilidad (inter-serie):

Concentración media	CV	n
2,5	5,7	25
5,3	5,4	25

- Veracidad: Se comparó este método con HPLC obteniéndose la siguiente correlación:

$$y (\% HbA_2 \text{ -BioSystems}) = 0,950 \times (\% HbA_2 \text{ - HPLC}) + 0,11$$

Los resultados obtenidos con este método no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con HPLC.

Los detalles del estudio comparativo se encuentran disponibles bajo solicitud.

- Interferencias: Las variantes de hemoglobina S y F no interfieren. Lípidos (triglicéridos 10 g/L) y bilirrubina (20 mg/L) no interfieren. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir³.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La β-talasemia es una hemoglobinopatía hereditaria caracterizada por una producción disminuida de cadenas globínicas β. Estas cadenas forman parte de la estructura de la hemoglobina A (α₂β₂).

En el rasgo β-talasémico la concentración de hemoglobina A₂ (α₂δ₂) en sangre se encuentra elevada ya que se produce un aumento de la síntesis de hemoglobinas no constituidas por cadenas β.

En el diagnóstico del rasgo β-talasémico, deben tenerse en cuenta tanto los niveles de hemoglobina A₂ como el historial familiar y los datos de laboratorio, incluyendo el hierro en suero y la capacidad de fijación del hierro, la morfología de los hematíes, la hemoglobina, el hematocrito y el volumen corpuscular medio.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. El almacenaje prolongado de las columnas puede ocasionar un excesivo empacado de la resina que disminuye el flujo. Para evitarlo, colocar la columna en posición invertida unos 10 min, volverla a su posición original y esperar que sedimente la resina antes de romper la lengüeta inferior.
2. La ocasional presencia de burbujas no afecta la determinación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham EC et al. Hemoglobin 1976-77; 1:27-44.
2. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
3. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACCC Press, 1995.