



PERCENTILES DE NORMALIDAD DE LAS HEMOGLOBINAS NEONATALES.

Variación con la edad gestacional, días de vida y origen
étnico materno.

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

CAROLINA PLA CORTÉS

Director de tesis

Dr. Ernesto Cortés Castell

Codirector de tesis

Dr. Vicente Gil Guillén





AUTORIZACIÓN







CERTIFICADO





AGRADECIMIENTOS:

A mi familia por apoyarme en los momentos decisivos de mi vida.

A Alex por devolverme la luz.

A mi abuelita, el ángel que cuida de mí incondicionalmente.

A la VIDA por brindarme una gran segunda oportunidad.

Al servicio de Análisis Clínicos del Hospital General Universitario de Alicante por hacer esta tesis doctoral posible.

A los verdaderos profesionales que luchan por su profesión y que mantienen la pasión y el interés por su trabajo durante toda su carrera. A aquellos no ven solo muestras biológicas sino pacientes.

Todos ellos son los que dan honorabilidad a la profesión y los que me hacen estar orgullosa de la misma.





INDICE DE MATERIAS

**PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS
DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES**

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



ÍNDICE DE MATERIAS:

1.- INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. HEMOGLOBINA: ESTRUCTURA Y FUNCIONES	18
1.2. TIPOS DE HEMOGLOBINAS.....	22
1.3. EVOLUCIÓN DE LAS HEMOGLOBINAS: EMBRIÓN, FETO Y RECIÉN NACIDO.....	23
1.4. GENÉTICA Y SÍNTESIS DE HEMOGLOBINA	25
1.5. HEMOGLOBINOPATIAS Y TALASEMIAS.....	27
1.5.1. Hemoglobinopatías estructurales	28
1.5.2. Hemoglobinopatías cuantitativas. Talasemias	31
1.5.3. Variantes de Hb talasémicas.....	33
1.5.4. Persistencia hereditaria de la Hb fetal.....	35
1.5.5. Hemoglobinopatias adquiridas.....	36
1.6. ENFERMEDAD DREPANOCITOSIS	36
1.6.1. Forma heterocigota o rasgo falciforme.....	40
1.6.2. Forma homocigota o anemia falciforme	41
1.6.3. Forma doble heterocigota HbS/ β -talasemia	42
1.6.4. Forma doble heterocigota HbS/HbC	43
1.6.5. Otras formas de asociación de HbS con distintas hemoglobinopatías.....	43

1.7. PREVALENCIA E INCIDENCIA ANEMIA FALCIFORME Y OTRAS HEMOGLOBINOPATÍAS	44
1.7.1. Incidencia en el extranjero	45
1.7.2. Incidencia en España	46
1.8. FISIOPATOLOGÍA DE LA DREPANOCITOSIS	48
1.9. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD	50
1.10. DIAGNÓSTICO DE LA ANEMIA FALCIFORME	51
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	57
2.1. JUSTIFICACIÓN DEL CRIBADO NEONATAL DE ANEMIA FALCIFORME	57
2.2. JUSTIFICACIÓN DEL CRIBADO NEONATAL DE ANEMIA FALCIFORME EN NUESTRO MEDIO	59
3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
3.1. HIPÓTESIS.....	69
3.2. OBJETIVO GENERAL.....	69
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
4.1. POBLACIÓN	73
4.1.1. Criterios de inclusión de las muestras	73
4.1.2. Criterios de exclusión de las muestra.....	74

4.1.3. Muestreo.....	74
4.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	76
4.2.1. Método de identificación de hemoglobinas	76
4.2.2. Expresión de resultados	78
4.2.3. Controles de calidad del método	79
4.2.4. Criterios de aceptabilidad de las determinaciones.....	80
4.2.5. Limitaciones de la técnica	80
4.2.6. Criterios de rechazo y repetición de las determinaciones.....	81
4.3. TÉCNICA DE CONFIRMACIÓN	82
4.3.1. Análisis y expresión de los resultados	82
4.3.2. Control de calidad del método: control interno.....	83
4.3.3. Criterios de aceptación y evaluación de resultados.....	83
4.3.4. Criterios de repetición	84
5. RESULTADOS.....	87
5.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA TOTAL ESTUDIADA	87
5.2. ESTUDIO DE LAS MUESTRAS NORMALES	88
5.2.1. Porcentajes de las hemoglobinas normales en grupo control.....	90
5.3. ESTUDIO DE LOS PORTADORES ENCONTRADOS	108

5.3.1. Porcentajes de las distintas hemoglobinas en los niños portadores analizados.....	115
6. DISCUSIÓN	125
6.1. DISEÑO DE LA MUESTRA	125
6.2. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	127
6.3. INFLUENCIA DE LA EDAD GESTACIONAL EN LOS PORCENTAJES DE HEMOGLOBINA NEONATAL.....	130
6.4. INFLUENCIA DE LOS DÍAS DE VIDA EN LOS PORCENTAJES DE HEMOGLOBINA NEONATAL.....	132
6.5. INFLUENCIA DEL ORIGEN MATERNO EN LOS PORCENTAJES DE HEMOGLOBINA NEONATAL.....	134
6.5.1. Influencia del origen materno en los porcentajes de hemoglobina neonatal en ausencia de formas de hemoglobinas anómalas	134
6.5.2. Influencia del origen materno en los porcentajes de hemoglobina neonatal en portadores de hemoglobinas anómalas.....	137
7. CONCLUSIONES.....	145
8. ABREVIATURAS.....	149
9. BIBLIOGRAFÍA.....	155
10. ANEXOS.....	177



1. INTRODUCCIÓN

PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



1.- INTRODUCCIÓN

Los hematíes o eritrocitos son las células más numerosas presentes en sangre periférica, su vida media se sitúa en torno a los 120 días. La principal función de los eritrocitos es transportar e intercambiar gases, gracias a su alto contenido de hemoglobina (Hb) y el mantenimiento del pH del medio interno. Tienen forma de disco bicóncavo y su estructura básica es la de una membrana semiimpermeable que envuelve a una solución proteica que contiene hemoglobina.

La hemoglobina (Hb) es una proteína globular encargada de:

-El transporte de O₂ del aparato respiratorio hacia los tejidos periféricos y de CO₂ y protones (H⁺) de los tejidos periféricos hasta los pulmones con la finalidad de su excreción a nivel respiratorio. (Schultz, 1993; Telen, 1994)

-Mantenimiento del pH sanguíneo.

Los valores normales en sangre son de 13 - 18 g/dl en el hombre y algo menores en el caso de la mujer, aproximadamente 12 - 16 g/dl.

Las alteraciones estructurales de la molécula de hemoglobina, que tienen como resultado las alteraciones de sus funciones, suponen un gran problema de salud pública. Aproximadamente, 250 millones de personas (más del 4,5% de la población mundial) son potencialmente portadores de una hemoglobina patológica, y unos 300.000 niños nacen cada año con importantes desórdenes hemoglobínicos, de los cuales los más comunes son la talasemia mayor y la anemia falciforme. (Angastiniotis, 1995; Roper, 2009)

1.1. HEMOGLOBINA: ESTRUCTURA Y FUNCIONES.

La hemoglobina es una proteína con estructura cuaternaria, una fracción proteica y una no proteica o grupo prostético, su estructura se estableció en 1960 (Perutz, 1976). La fracción proteica está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas o subunidades, en función de la naturaleza de las mismas se distinguen diferentes tipos, los principales se conocen como alfa (α), beta (β), gamma (γ) y épsilon (ϵ) (Baldwin, 1975).

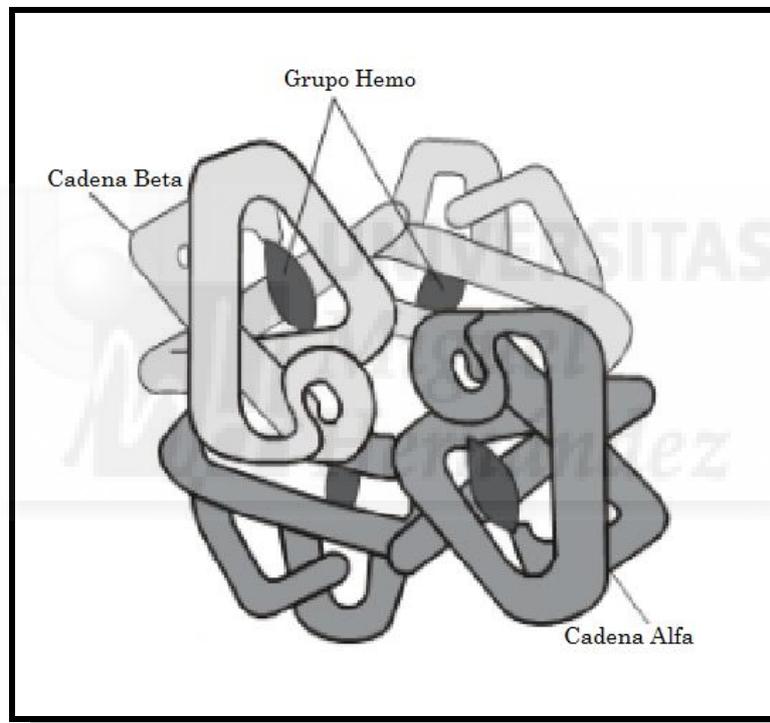


Figura 1. Estructura oligomérica de la Hb.

Las cadenas polipeptídicas α contienen 141 aminoácidos, las cadenas diferentes a ellas, es decir β , γ , δ , contienen 146 y difieren de la estructura de las cadenas α en la secuencia de aminoácidos. La estructura primaria de las cuatro

cadena de Hb normales se conoce desde hace años (Lehmann, 1969; Longo, 2012).

Cada una de las cuatro cadenas polipeptídicas de la Hb contiene un grupo prostético, denominado grupo Hem o hemo, el cual dota del color rojizo característico a los hematíes. El grupo hemo está situado en una hendidura de naturaleza hidrofóbica de la estructura terciaria de la proteína (Longo, 2012). Existen dos partes bien diferenciadas del mismo:

-**La orgánica:** estructura tetrapirrólica o porfirina, resultado de la fusión de cuatro anillos pirrólicos, que por su especial configuración en el caso de la Hb recibe el nombre de Protoporfirina IX (Alain, 2006; Pequeñuela, 2014). La estructura se representa según la figura siguiente:

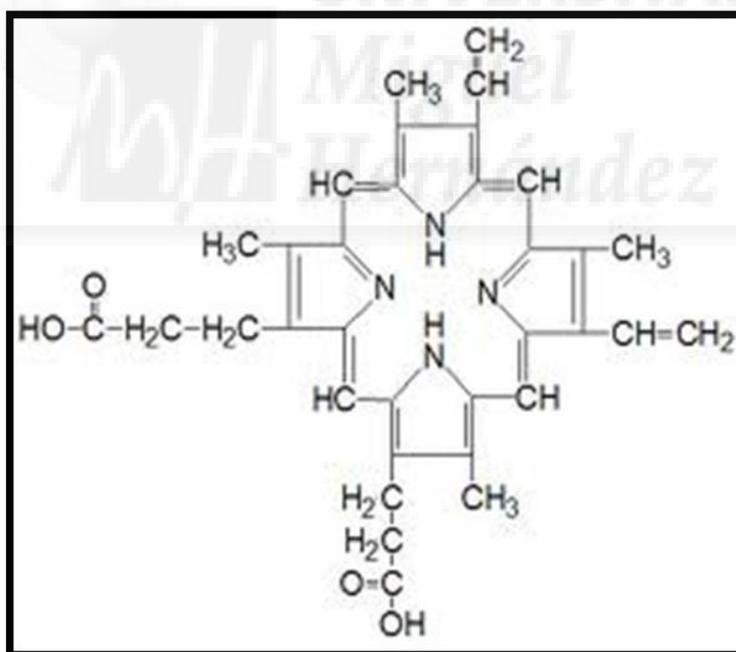


Figura 2. Estructura de la Protoporfirina IX.

-La **inorgánica**: un átomo de hierro en estado de oxidación ferroso (+2) y puede formar 5 ó 6 enlaces de coordinación dependiendo de la unión de oxígeno a la Hb, caso de la oxiHb o no unión caso de la desoxiHb.

La afinidad de la Hb por el oxígeno se ve afectada por diferentes variables: la temperatura (T_p), la concentración de protones, el Dióxido de Carbono (CO_2) y el 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG) (Chanutin, 1967; Kilmartin, 1976).

La afinidad de la Hb se ve afectada por la T_p , de forma que a T_p s menores, la fijación es de mayor intensidad, de forma que desplaza la clásica curva de fijación de O_2 de la Hb hacia la izquierda. Un sentido totalmente opuesto tiene el aumento de T_p , de forma que ante ello, la curva ase desplaza hacia la derecha, disminuyendo la afinidad por el O_2 .

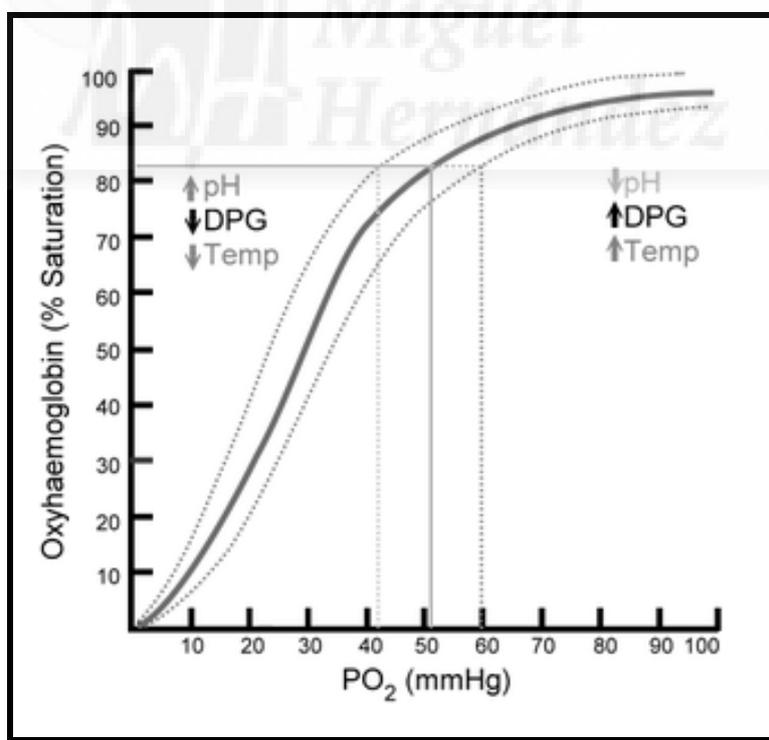


Figura 3. Curva de saturación de O_2 de la Hb.

La concentración de protones, iones hidrógeno o pH influye notablemente sobre la afinidad frente al O₂, de forma que una disminución de pH desplaza la curva de saturación de oxígeno de la Hb hacia la derecha, facilitando la cesión de O₂. El efecto contrario tiene el incremento de pH, el cuál desplaza el equilibrio hacia la izquierda, dificultando la cesión de O₂. A este tipo de modificación de la afinidad se le conoce como Efecto Bohr y se representa por la ecuación: $H-Hb + O_2 \rightarrow Hb-O_2 + H^+$ (Atha, 1976; Onkojo, 2014).

Es esta misma ecuación la que demuestra cómo, del mismo modo que la oxigenación de la Hb aumenta la acidez del medio, la desoxigenación de la misma, aumenta la basicidad.

Al contrario de lo que sucede con el transporte intraeritrocitario de O₂, en el caso del CO₂, no se lleva a cabo unido al grupo Hem y tiene una estrecha relación con el mantenimiento del pH sanguíneo. Difunde libremente en el interior de los eritrocitos donde el enzima Anhidrasa Carbónica lo transforma en Ácido Carbónico (H₂CO₃) mediante la reacción: $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3$. A continuación se da la ionización para originar ión bicarbonato (HCO₃⁻) y un H⁺ de forma espontánea. El protón generado interaccionará con la desoxiHb mediante el proceso conocido como el efecto Bohr.

En el eritrocito el compuesto fosforilado mayoritario es el 2,3-Difosfoglicerato o 2,3-Bisfosfoglicerato (2,3-DPG), posee carga negativa y deriva del intermediario de la glucólisis 1,3-difosfoglicerato. Dicho compuesto actúa como efector alostérico negativo en las propiedades de unión del oxígeno a la hemoglobina (Perutz, 1989).

En la conformación desoxi (también conocida como, estructura cuaternaria T o tensa) (Daugherty, 1991) existe una cavidad suficientemente grande para admitir al 2,3-DPG entre las cadenas β. Esta cavidad cargada

positivamente, atrae y fija en su interior así una molécula de 2,3-DPG. Cuando la Hb se oxigena, adquiere una configuración cuaternaria R o relajada.

Las variaciones de la concentración del 2,3-DPG desempeñan un papel fundamental en la adaptación a la hipoxia, de manera que en la hipoxemia aumenta el 2,3-DPG eritrocitario, la afinidad por el oxígeno disminuye y el aporte a los tejidos se facilita (Lenfant, 1968).

La Hb además de su importante papel en el intercambio y transporte gaseoso, presenta un papel fundamental en la regulación del pH sanguíneo. Existen dos mecanismos fundamentales:

-Los grupos ionizables de la Hb (imidazoles) que junto con los fosfatos orgánicos de los eritrocitos y de las proteínas plasmáticas llevan a cabo el 60% del amortiguamiento del pH sanguíneo.

-La absorción del ácido (H^+) que se produce por el transporte del CO_2 supone aproximadamente el 40% restante del amortiguamiento.

1.2. TIPOS DE HEMOGLOBINAS

Existen diferentes tipos de hemoglobinas, según la composición de sus cadenas polipeptídicas, entre las más frecuentes (Huisman, 1993), se pueden citar:

-Hemoglobina adulta tipo A o HbA: constituida por dos cadenas α y dos β , es la mayoritaria en el adulto y en niños mayores de 7 meses, supone aproximadamente el 98% del total de Hb presente.

-Hemoglobina adulta tipo A2 o HbA2: constituida por dos cadenas α y dos δ , es la forma minoritaria en adultos y supone aproximadamente el 2% del total.

-Hemoglobina fetal o HbF: dos cadenas α y dos δ , conforman este tipo de Hb que está presente durante el tercer trimestre del desarrollo fetal.

-Hemoglobina fetal acetilada o HbF1: variante acetilada de la anterior, caracterizada por la acetilación a nivel de las regiones N-terminal, aspecto que le confiere una mayor afinidad por el oxígeno que a la HbF.

-Hemoglobina Gower I: formada por dos cadenas ζ y dos ϵ , es la mayoritaria Hb presente durante el primer trimestre del desarrollo fetal.

-Hemoglobina Gower II: constituida por dos cadenas α y dos ϵ , ésta es la que predomina durante el segundo trimestre.

-Hemoglobina Portland: dos cadenas ϵ y dos γ , como las dos anteriores, presente en el embrión (Randhawa, 1984; Dumoulin, 1997; He, 2001).

1.3. EVOLUCIÓN DE LAS HEMOGLOBINAS: EMBRIÓN, FETO Y RECIÉN NACIDO

El ser humano, sintetiza hasta siete moléculas de hemoglobina diferentes: cuatro son hemoglobinas embrionarias transitorias denominadas Hb Gower 1, Hb Gower 2, Hb Portland 1 y Hb Portland 2, la hemoglobina A (HbA o $\alpha_2\beta_2$) y la hemoglobina A₂ (HbA₂ o $\alpha_2\delta_2$), y la hemoglobina fetal o F (HbF o $\alpha_2\gamma_2$) (Rapaport, 1979; Hempe, 1994; Malcorra, 2001; Salazar-Lugo, 2004; Lewis, 2008).

Las hemoglobinas Gower I, Gower II y Portland son de origen embrionario y únicamente están presentes durante el primer y segundo

trimestre de gestación (Hardison, 2001, Manning 2007). La Hb Gower II en concreto, es la más importante y alcanza entre 50% y 60% del total de Hb embrionaria. Las cadenas polipeptídicas ϵ y ζ se sintetizan en el saco vitelino.

La HbF es el componente principal de la Hb del recién nacido. Posee dos cadenas γ en lugar de dos cadenas β y se representa $\alpha_2 \gamma_2$. La HbF está adaptada al ambiente materno-fetal. Para poder captar el O_2 de la Hb materna, la HbF necesita poder fijarlo con mayor fuerza que la Hb materna. Hecho que se refleja en la siguiente figura donde se puede observar cómo, su curva de saturación, está desplazada a la izquierda respecto de la materna, pasando el oxígeno de la materna a la fetal en condiciones de menor presión parcial del mismo en el feto.

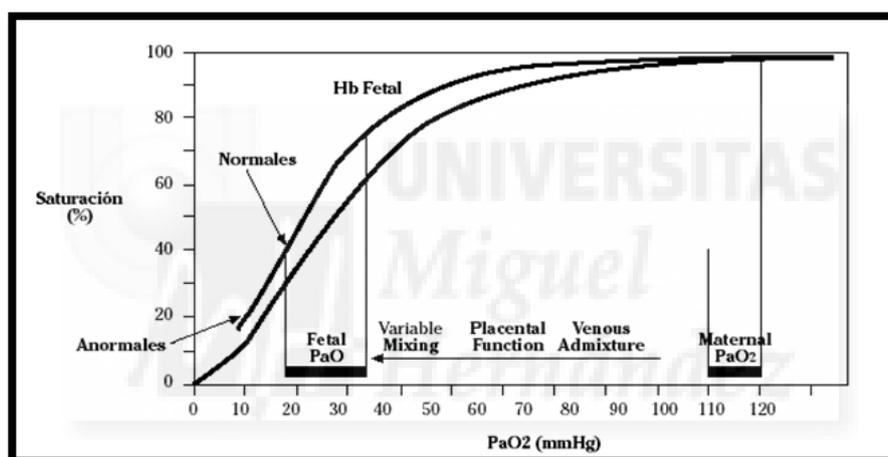


Figura 4. Curva de disociación de la Hb fetal respecto de la materna.

Esta característica es debida a que la Hb tiene capacidad de interacción con el 2,3-difosfoglicerato, producto de la fase intermedia de la glicólisis y que está presente en los glóbulos rojos en cantidad de unos 5 mmol/l. Se une con mayor afinidad a la hemoglobina deoxigenada y provoca cambios espaciales en la Hb tras su interacción, tiene un efecto alostérico negativo, es decir, disminuye

la afinidad de la hemoglobina por el O₂. Como consecuencia de estos cambios ayuda a la liberación del O₂ en los tejidos que necesitan ser oxigenados.

Dos de los grupos que recubren la cavidad de la HbF en que se produce la fijación tienen cadenas laterales neutras, a diferencia de la HbA en la que están cargadas positivamente. Este hecho posibilita que el 2,3-DPG, cargado negativamente, se una menos a la HbF y en lugar de ello, se fije más fuerte el O₂.

Además, entre 15% y 20% de la HbF está acetilada en sus N-terminales y se denomina HbF1; siendo conocido desde hace tiempo que esta variante no fija 2,3-DPG, característica por la cual tiene una afinidad por el O₂ aún mayor que la HbF (Telen, 1994; Manning, 2001; Pequeñuela, 2005).

La disminución de HbF en condiciones normales es rápida tras el nacimiento, se considera que a los 6 meses de vida supone únicamente el 5% del total. La síntesis de HbA comienza aproximadamente en el segundo mes de la edad fetal y tras el parto aumenta notablemente.

1.4. GENÉTICA Y SÍNTESIS DE HEMOGLOBINA

La biosíntesis de la Hb guarda estrecha relación con la eritropoyesis. La expresión genética y el contenido de Hb acompañan la diferenciación de las unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) en precursores eritroides. En condiciones normales la producción de cadenas α y β de globina en el adulto o α y γ en la vida fetal se realiza de forma equilibrada, lo que permite la formación de tetrámeros $\alpha_2 \beta_2$ que constituyen la HbA, o tetrámeros $\alpha_2 \gamma_2$ o Hb fetal (Bunn, 1986; Huisman, 1993).

Cada una de las cadenas polipeptídicas de la Hb cuenta con genes propios: α , β , γ , δ y ϵ . Los genes α y β son independientes y están ubicados en cromosomas distintos.

El grupo α , se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 y contiene los codificadores de las cadenas α y ζ . El grupo β se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 e incluye a los genes de las cadenas β , γ , δ , y ϵ .

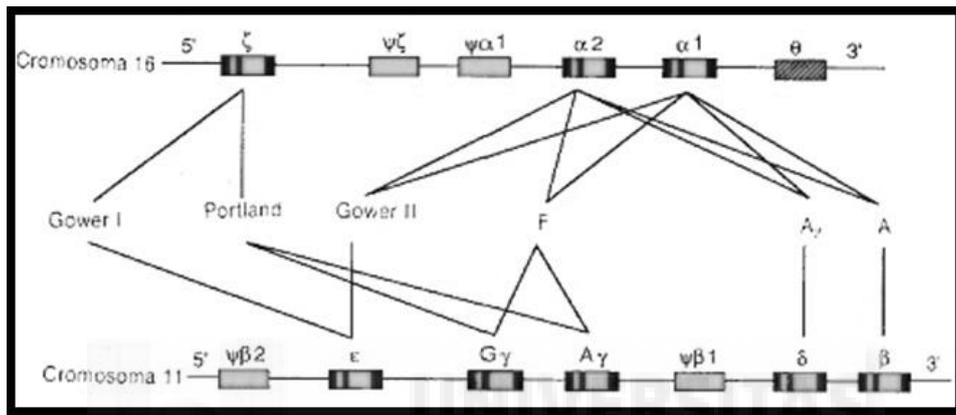


Figura 5. Localización de los genes Hb en los cromosomas 16 y 11.

Todos los genes funcionales de la globina comparten una estructura general la cual consiste en 3 exones (secuencias codificadoras) y 2 intrones (secuencias que no se traducen). Existen dos secuencias claves en la iniciación de la transcripción: TATA y CAT; las mutaciones que las afectan limitan la transcripción de ARNm. La porción distal del tercer exón (AATAAA) finaliza la transcripción.

La transcripción primaria del ARNm incluye copias de toda la secuencia del ADN genómico (intrones y exones). Antes de su transporte al citoplasma se procesa por clivaje del extremo 5', hay separación de las secuencias transcritas de los intrones y poliadenilación del extremo 3'.

Los puntos de consenso son secuencias de nucleótidos adyacentes que perfeccionan la síntesis del ARNm. Las mutaciones que involucran tanto los puntos de unión, así como los de consenso, alteran la separación y crean ARNm anormales. La causa más común de las hemoglobinopatías es la mutación puntual, es decir, la sustitución de un nucleótido de ADN por otro, lo que puede inducir un cambio en un aminoácido de la globina resultante.

La traducción es un proceso ribosómico, en donde se sintetiza una cadena polipeptídica de acuerdo al patrón de codones del ARNm. La terminación se produce cuando se llega a un codón de finalización UAA, la cadena polipeptídica se completa y se separa del ribosoma. Los polipéptidos libres forman de inmediato dímeros $\alpha\beta$ y tetrameros $\alpha_2\beta_2$.

El grupo Hem se sintetiza virtualmente en todos los tejidos, pero su síntesis es más pronunciada en la médula ósea y el hígado, debido a la necesidad de incorporarlo en la Hb y en los citocromos. Es una molécula plana que consta de un hierro ferroso y un anillo tetrapirrólico, la protoporfirina III o IX. El Hem es un factor fundamental en la regulación de la tasa de síntesis de la globina. Su principal efecto se ejerce en la iniciación de la traducción, donde bloquea la acción de un inhibidor de la producción de globina. También participa en la transcripción y el procesamiento del ARNm. (Pequeñuela, 2005)

1.5. HEMOGLOBINOPATIAS Y TALASEMIAS

En condiciones normales la producción de cadenas α y β de globina en el adulto o α y γ en la vida fetal se realiza de forma equilibrada, lo que permite la formación de tetrameros $\alpha_2\beta_2$ que constituyen la HbA, o tetrameros $\alpha_2\gamma_2$ de la HbF. (Oski, 1982)

Se denomina hemoglobinopatía a cierto tipo de defecto de carácter hereditario, que tiene como consecuencia una estructura anormal en una de las cadenas de las globina de la molécula de Hb. Las hemoglobinopatías constituyen un amplio grupo de enfermedades genéticas, causantes de un alto grado de morbimortalidad. Son las alteraciones monogénicas frecuentes, las cuales siguen un patrón de herencia autosómico recesivo. Se producen como consecuencia de alteraciones cualitativas de la molécula de globina, dando lugar a las hemoglobinopatías estructurales ó bien por alteraciones cuantitativas lo que da lugar a las talasemias. Puede ocurrir que ambas alteraciones coexistan, produciendo lo que se conoce como hemoglobinopatías talasémicas (Villegas, 2001; De las Heras, 2008).

En la actualidad se conocen más de 600 hemoglobinopatías, aunque no todas producen problemas clínicos. Las hemoglobinopatías por afectación de la cadena β son algo más frecuentes que las de la α . Existen diferentes tipos de hemoglobinopatías entre las que destacan:

1.5.1. Hemoglobinopatías estructurales:

Las hemoglobinopatías estructurales constituyen las alteraciones monogénicas, más frecuentes en el mundo junto con las Talasemias. Se producen por mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en los genes que codifican las cadenas de globina, modificando la secuencia de aminoácidos que constituyen la cadena de globina y, dando lugar de esta forma, a variantes de hemoglobina anormal de diferentes tipos (Vives 2001):

1.5.1.1. Disminución de la solubilidad:

Hb S. La Hb S se originada por una mutación en el cromosoma 11, dando lugar a la sustitución en la posición 6 de la cadena β de globina, del Ácido

Glutámico por la Valina. Se caracteriza por tener herencia autosómica recesiva. La Hb S es la alteración estructural más frecuente y afecta a millones de individuos en África tropical, y subtropical, Península Arábiga, India y América Central.

Le siguen en frecuencia las Hb C, D y E, que se presentan en poblaciones del oeste de África, India y suroeste de Asia (Villegas, 2006; Fucharoen, 2011).

Hb C. La Hb C se caracteriza por la sustitución del ácido glutámico, de la posición 6 de la cadena β , por lisina.

Es una hemoglobinopatía propia del África occidental, pero puede encontrarse con cierta frecuencia en España. El estado homocigoto con ambos genes alterados (FC), se caracteriza por una ligera anemia hemolítica crónica con esplenomegalia.

El estado heterocigoto (FAC), los que tienen un solo gen anormal, son solo portadores. Este estado no produce trastorno alguno (Travi, 1992).

Aunque la HbC tiende a cristalizar en condiciones de hipoxia, no produce crisis vasoclusivas como las de la HbS. La morfología eritrocitaria se caracteriza por la aparición de dianocitos (Brandan, 2008).

1.5.1.2. Afinidad por el O₂ alterada:

Se producen por mutaciones situadas a nivel de las áreas de contacto entre las subunidades α y β de la molécula de Hb o de la zona de unión del 2,3-DPG a la cadena β . De acuerdo con la naturaleza de la mutación, pueden observarse aumentos o disminuciones de la afinidad de la Hb por el oxígeno, siendo los primeros mucho más frecuentes que los segundos. Se heredan con carácter autosómico dominante, siendo la forma homocigota incompatible con la vida (Reissmann, 1961).

1.5.1.3. Hemoglobinas M:

Estas hemoglobinas se caracterizan por la presencia del hierro del grupo Hemo en estado férrico (+3) en lugar de estar en estado ferroso (+2). Son mutaciones que se caracterizan mayoritariamente por una sustitución del aminoácido Histidina, situado en la cavidad del grupo Hemo, por el aminoácido Tirosina. Esa sustitución, modifica las características físicoquímicas e impide la unión reversible al oxígeno, ya que estabiliza su forma oxidada. La cadena afectada puede ser tanto del tipo α como β y tras la mutación pierde su capacidad funcional y la Hb se comporta como metaHb. Se heredan con carácter autosómico dominante y debido a ello las personas heterocigotas son portadoras de cianosis y poliglobulia (Malcorra, 2001).

1.5.1.4. Hemoglobinas inestables:

Se denominan Hb inestables a las variantes con mutaciones que provocan la sustitución de un aminoácido situado en el interior de la cadena globínica por otro, sufriendo a consecuencia de dicho cambio, una disminución de la solubilidad. La mayoría de las Hb inestables dan sintomatología en los homocigotos, aunque también se han descrito en pacientes heterocigotos. Se transmiten con carácter autosómico dominante y cursan con un cuadro de anemia hemolítica, generalmente crónica y de intensidad variable.

Las hemoglobinas inestables suelen tener tendencia a la formación de Cuerpos de Heinz. Dichas estructuras son precipitados intraeritrocitarios, resultado de la desnaturalización de la hemoglobina y de la formación de hemicromos.

Los hemicromos se generan cuando el grupo Hemo sale de la estructura que lo contiene, y se une en un lugar diferente, después de que las cadenas α o β hayan sufrido cierto grado de desnaturalización.

Los Cuerpos de Heinz se unen a la superficie interna de la membrana eritrocitaria, principalmente a la porción citosólica N-terminal de la Banda 3, por uniones hidrofóbicas (Sans-Sabrafen, 2006).

Los eritrocitos que contienen estas inclusiones, al atravesar los sinusoides esplénicos son destruidos por un mecanismo conocido como “pitting”, en el cual una porción de la membrana es eliminada. Así, los eritrocitos sufren un proceso de deformación, a través del cual su forma deja de ser bicóncava y paulatinamente se transforman en esferocitos, los cuales serán eliminados de la circulación (Feliú, 2009).

1.5.2. Hemoglobinopatías cuantitativas: Talasemias

Las Talasemias constituyen junto a las hemoglobinopatías estructurales las alteraciones monogénicas más frecuentes en el mundo. En las talasemias el déficit de síntesis de una de las cadenas de globina produce una hemoglobinización deficiente de los hematíes (Weatherall, 1981, Villegas, 1992; Villegas, 2001). Este déficit surge a partir de mutaciones que alteran la producción o la traducción del ARNm de la globina, lo que lleva a una biosíntesis deficiente de la misma. El exceso de cadena sobrante, no apareada, precipita en el interior de las células eritroides y condiciona el cuadro clínico de la enfermedad (Harrison 2013).

El defecto de síntesis puede involucrar a cualquier cadena de globina, aunque debido al predominio de HbA en la vida postnatal los principales tipos de talasemia se producen por defecto de síntesis de cadena α (α -Talasemia) y β (β -Talasemia). Las talasemias presentan diferentes frecuencias según las zonas geográficas, presentando una especial prevalencia en las poblaciones del área mediterránea. Dentro de la misma destaca un predominio de la β -Talasemia y

predominio de la α -Talasemia en zonas como Oriente Medio, Sudeste Asiático y China (Vives, 2001).

1.5.2.1. α -Talasemia:

La Alfa-Talasemia o α -Talasemia es una patología a nivel de la hemoglobina caracterizada por un fallo en la síntesis de cadenas alfa de la Hb, de forma que hay una síntesis disminuida de dichas cadenas. Dada la disminución del número de cadenas α , generalmente se detectan menores niveles de HbA₂. El cuadro clínico que provoca es variable y depende del número de alelos que se encuentren afectados ya que la síntesis de globina alfa está regulada por cuatro genes de globina-alfa, dos en cada copia del cromosoma 16 (16p13.3).

La enfermedad puede clasificarse en subtipos clínicos de gravedad creciente: α -Talasemia Silente, Rasgo de α -Talasemia (o α -Talasemia menor), Enfermedad de la hemoglobina H (HbH), e Hidropesía fetal con Hb de Bart (Origa, 2006; Fucharoen, 2009).

1.5.2.2 β -Talasemia:

La Beta-Talasemia o β -Talasemia es un trastorno que se caracteriza por el déficit de síntesis a nivel de la cadena β de la hemoglobina, de forma que no se pueden formar en las proporciones adecuadas los tetrámeros de globinas y existen excedentes de cadenas α libres, las cuales se caracterizan por su toxicidad, ya que provocan apoptosis a nivel de los eritroblastos. La síntesis de globina beta está regulada por dos genes, uno en cada copia del cromosoma 11 (Benito, 1996; Shih, 2009).

La síntesis defectuosa, únicamente es sintomática cuando los dos genes β han sustituido a los genes que codifican la γ -globina fetal, es decir, es asintomática al inicio de la vida. El intercambio comienza a tener lugar desde la

trigésima semana de vida fetal, y concluye de forma total hasta aproximadamente los 5 años de edad (Nathan, 1998).

La presencia o no de clínica dependerá del grado de disminución en la síntesis de cadenas β pudiendo ir desde formas asintomáticas hasta más importantes como la Anemia de Cooley (Park, 2002; Saetung, 2013).

La frecuencia de β talasemia en España, aunque alta (del 0,1 al 2%) es muy inferior a la de otros países mediterráneos. La distribución no es homogénea con frecuencias mayores entre la comunidad gitana (5,6%) y la isla de Menorca (3,8%) y rara en la población de origen vasco (Oliva, 1998; Villegas, 2006). La prevalencia global promedio en España se ha estimado en el 0,4%, que corresponde a un caso de β -talasemia por cada 250 habitantes (Pérez-Sirvent, 1999).

Existen otros tipos de talasemias menos frecuentes como la Talasemia δ - β o la Talasemia α - β .

1.5.3. Variantes de Hb talasémicas. Hb estructuralmente anormal vinculada con la herencia de un fenotipo talasémico: combinan las Características de la Talasemia y de las hemoglobinopatías estructurales.

- **Hb E.** La HbE es la segunda hemoglobina anómala más común después de la hemoglobina falciforme (HbS).

Es común en el Sudeste Asiático, donde su prevalencia puede alcanzar el 30-40% en algunas zonas de Tailandia, Camboya y Laos (Orphanet; Vichinsky, 2007). La HbE también se puede encontrar en Sri Lanka, en el noreste de la India (Malcorra, 1993), Bangladesh, Pakistán, Nepal, Vietnam y Malasia. La HbE es una variante de la Hb con una mutación en el gen de la β -globina, que

causa la sustitución de ácido glutámico por lisina en la posición 26 de la cadena de β -globina (Vives-Corróns, 2005; Olivieri, 2010 y 2012; Sharma, 2013).

La cadena beta de la HbE (β E) se sintetiza a velocidad reducida en comparación con la de la Hb normal del adulto (HbA), ya que la mutación crea un sitio de splicing alternativo dentro de un exón. En consecuencia, los heterocigotos (HbAE), los heterocigotos compuestos o dobles heterocigotos (HbSE) y los homocigotos (HbEE) muestran algunas características de la β -Talasemia. Únicamente aquellos sujetos que presenten HbE combinada con β -Talasemia requerirán tratamiento (Wiwanitkit, 2013).

Los sujetos heterocigotos y homocigotos para HbE (HbAE y HbEE, respectivamente) tienen una enfermedad asintomática caracterizada por una mínima anemia microcítica sin relevancia clínica y una esperanza de vida normal, excepto por el riesgo de transmisión de HbE / β -Talasemia, si el otro padre es portador de β -Talasemia. En el caso de HbE / β -Talasemia los sujetos suelen presentar una clínica variable, frecuentemente asociada a anemia severa que debe ser tratada dentro de un programa de cuidados multidisciplinar (Gulbis, 2005).

Entre las diferentes clínicas que se pueden presentar, existen casos exentos de síntomas clínicos y otros, sin embargo, que llegan a depender de la realización periódica de transfusiones (Rees, 1998). Estos síndromes mixtos no siempre son fáciles de diagnosticar y, en ocasiones, son erróneamente diagnosticados como homocigotos de HbE. En esos casos es muy importante el estudio conjunto con los niveles de Hb, el hematocrito y el volumen corpuscular medio (VCM), todos ellos significativamente menores en el caso de HbE/ β -Talasemia en comparación con los presentes en el caso de homocigotos. Del mismo modo, también es de notable importancia el estudio de los niveles de HbF, los cuales son marcadamente superiores respecto a los encontrados en homocigotos. El perfil de HbF > 5% en combinación con VCM <55 fL, Hb <100

g/L, y el hematocrito <0,30 L/L es altamente sugestivo de HbE/ β -talasemia y podría ser utilizado para su cribado (Pornprasert, 2013).

- **Hb Constant Spring.** Una mutación en el gen α -globina convierte el codón de parada UAA a un codón de Glutamina (CAA) de modo que la proteína termina siendo 31 aminoácidos más larga de lo normal. La proteína resultante α -globina en Hb Constant Spring no sólo está alterada cualitativamente sino que es inestable por lo que se considera también una anomalía cuantitativa.
- **Hb Lepore.** Es una Hb en la que existe un entrecruzamiento con intercambio de material genético entre un gen δ -globina y un gen β -globina y la consecuente formación de un gen híbrido δ - β globina. La síntesis de la Hb Lepore está reducida, por este motivo se relaciona con los síndromes β -talasémicos (Gulbis, 2005).

1.5.4. Persistencia hereditaria de la Hb Fetal:

La persistencia hereditaria de HbF, conocida con las siglas PHHP, se caracteriza por una elevada concentración de HbF y un elevado número de hematíes que transportan en su interior dicha HbF.

Durante el desarrollo humano, si el cambio de la cadena γ -fetal a β -globina de adultos en el cromosoma 11p no es completo, se obtiene como resultado la expresión de γ -globina residual en una subpoblación de eritrocitos denominadas "F-células". Los determinantes genéticos que son responsables de un mayor nivel de HbF, incluyen diversas mutaciones dentro de los genes que codifican la β -globina, así como polimorfismos de nucleótido en otros loci asociados con la Hb F y también determinados mecanismos epigenéticos (Musielak, 2011).

Rara vez se da de forma aislada, ya que generalmente va asociada a hemoglobinopatías las cuales a su vez, se asocian a con profundos cambios en la estructura del eritrocito, como sería el caso de la anemia falciforme o β -Talasemia. Se desconoce la prevalencia de esta alteración (Thein, 1998).

1.5.5. Hemoglobinopatias adquiridas:

Comprenden las modificaciones de la molécula de Hb por toxinas (por ejemplo, MetaHb adquirida) y la síntesis anómala de Hb (por ejemplo, la producción de cantidades elevadas de HbF en el caso de preleucemia o α -Talasemia en los trastornos mieloproliferativos): MetaHb debida a exposición a tóxicos; SulfoHb debida a exposición a tóxicos; CarboxiHb; HbH en eritroleucemia; HbF altas en estado de estrés eritroide y displasia de médula ósea, etc.

1.6. ENFERMEDAD DREPANOCITOSIS

La anemia falciforme o drepanocitosis es uno de los trastornos de la hemoglobina mejor conocidos. Los niños afectos de anemia falciforme, son muy susceptibles a infecciones bacterianas severas y presentan un alto grado de morbimortalidad por secuestro esplénico y septicemia bacteriana. La presencia de hemoglobina fetal en recién nacidos da lugar a que, en condiciones normales, no se presenten manifestaciones clínicas antes de los 3 meses de vida.

Las manifestaciones clínicas son muy diferentes entre individuos y se producen generalmente en momentos diferentes.

Tabla 1. Descripción de la patología (Orphanet, 2013).

Número de Orphanet	ORPHA232	CIE-10	D57.0 D57.1 D57.2
Sinónimos	Anemia de células falciformes, Siclemia	OMIM	603903
Prevalencia	1-5/10.000	UMLS	C0002895
Herencia	Autosómico recesivo	MeSH	D000755
Edad de inicio o aparición	Variable	MedDRA	10040641
		SNOMED CT	127040003 417357006

Las infecciones debidas a *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* suponen la complicación más frecuente de la anemia falciforme, y son responsables de un alto porcentaje de fallecimientos en estos enfermos, especialmente en la infancia (Arrizabalaga, 2011; Fernández, 2012; Marín, 2010).

La anemia falciforme es debida a la presencia de la HbS, variante patológica de la HbA de adultos. Como se ha comentado anteriormente, se originada por una mutación en el cromosoma 11, dando lugar a la sustitución en la posición 6 de la cadena β de globina, de una molécula de Ácido Glutámico por una de Valina, su herencia es de tipo autosómico recesivo.

Como consecuencia de la mutación, al desoxigenarse la Hb sufre un proceso de polimerización espontáneo formando un gel cristalino. Cada polímero está formado por 14 haces longitudinales de deoxi-Hb que se disponen formando el llamado Cuerpo Tactoide que consiste en una estructura cilíndrica insoluble y rígida. La formación de dichas estructuras conduce a la rotura del citoesqueleto del eritrocito, adoptando este la forma característica del drepanocito (Svarch, 2009; Schechter ,2008).

El fenómeno de la falciformación en principio es reversible aunque, entre el 5 y el 50% de los eritrocitos falciformes, no consiguen recuperar su forma original. Dichos eritrocitos no funcionales serán eliminados por el sistema mononuclear fagocítico (Sans-Sabrafen, 2001).

Los eritrocitos alterados presentan un gran descenso del volumen corpuscular y un gran aumento de la concentración de hemoglobina. Esto es debido a que la deoxi-Hb induce alteraciones de la membrana eritrocitaria (modificación de la composición y distribución de los fosfolípidos en la bicapa lipídica), fenómenos que conducen a una marcada deshidratación. Los drepanocitos presentan además una fuerte tendencia a adherirse al endotelio vascular, favoreciendo la formación de microtrombos y oclusiones vasculares periféricas. Dicha alteración puede inducir tres tipos de complicaciones importantes: anemia grave, infecciones bacterianas graves y accidentes vasooclusivos (VOA) isquémicos, como consecuencia de la obstrucción que causan los glóbulos rojos alterados en los vasos sanguíneos pequeños y capilares (Rodríguez, 1995; Berguer, 2009). La anemia falciforme predispone a un niño a las infecciones por diversas razones, entre ellas el aumento de recambio celular a nivel de la médula ósea, la mala perfusión y asplenia o hipoesplenismo funcional. Este último conduce a la disminución de la opsonización de microorganismos encapsulados polisacáridos, como serían: *H.*

influenzae tipo b, S. pneumoniae, N. meningitidis, estreptococos del grupo B, K. pneumoniae, S. typhi.

Las bacterias y los virus que con mayor frecuencia causan infecciones graves en los niños con enfermedad de células falciformes son *S. pneumoniae, H. influenzae tipo b, Salmonella spp., Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Parvovirus B19* y los virus de hepatitis A, B y C (Wong, 2001). La profilaxis con penicilina ha disminuido la incidencia de la morbilidad relacionada con la infección y la mortalidad de manera significativa en los niños con anemia de células falciformes o SCA.

Los VOA causan isquemia focal hiperálgica y, en ocasiones, microinfartos cuando se producen en músculos o esqueleto. Con el transcurso del tiempo, los VOA pueden comprometer la integridad de tejidos u órganos (Burnett, 1998; Mosqueda 2009).

Las complicaciones cardiovasculares como insuficiencia cardiaca y la hipertensión pulmonar se pueden desarrollar de forma independiente, la aparición de cada una de estas alteraciones contribuye a una mayor mortalidad. Es el resultado de ambos factores de riesgo el que compromete seriamente el pronóstico y supone un indicador determinante de mortalidad (Rojas-Jimenez, 2013).

Se estima que la prevalencia de portadores de células falciformes en los estados europeos es de aproximadamente 1/150. En África central y occidental (15-25%), en las Indias occidentales francesas (10-15%) y en zonas mediterráneas (1-15%). Se ha observado una mayor prevalencia en zonas que están o han estado afectadas por malaria, porque el rasgo ofrece protección contra malaria perniciosa (Lamonte, 2012). Existen diferentes estudios que defienden la teoría de que tanto HbC y la HbS afectan el desarrollo temprano de la inmunidad adquirida de forma natural contra la malaria (Modiano, 2001;

Verra, 2007). La presencia de un único gen anormal puede conferir protección contra el paludismo, la herencia de dos genes anormales produce hemoglobinopatía y hace que desaparezca dicha protección (OMS, 2006).

La presencia de altos niveles de HbF en el recién nacido implica que la enfermedad no se manifiesta hasta después de los 3 meses. Las manifestaciones clínicas son muy variables entre individuos y se producen en momentos diferentes.

La transmisión se caracteriza por ser autosómica recesiva. La anemia de células falciformes se produce por combinaciones de dos alelos anormales del gen de la β globina entre los cuales, al menos uno es portador de la mutación β 6 Glu-Val (HbS). Los individuos portadores del gen de la HbS y el gen de la talasemia β se ven afectados por talasodrepanocitosis. La forma β S/ β C (β 6 Glu-Lys) también es frecuente.

1.6.1. Forma heterocigota o rasgo falciforme:

La mutación afecta a un solo alelo de los dos que codifican la cadena β : genotipo β A / β S. Los pacientes presentan un 40% de HbS y generalmente no presenta manifestaciones clínicas. Los portadores de este trastorno son asintomáticos. Ocasionalmente sufren hematurias e infartos esplénicos cuando se exponen a situaciones de hipoxia prolongada (anestesia general y procesos neumónicos). La morfología eritrocitaria es normal y no se observan drepanocitos en el frotis de sangre.

1.6.2. Forma homocigota o anemia falciforme:

La mutación afecta a los 2 alelos que codifican la cadena β : genotipo $\beta S / \beta S$. Los pacientes presentan el síndrome drepanocítico con graves síntomas clínicos.

Los fenómenos de oclusión vascular y la anemia hemolítica son las características clínicas de la enfermedad de células falciforme. Ocurren como resultado de vasooclusión en episodios dolorosos recurrentes y una variedad de complicaciones graves que pueden conducir a discapacidades permanentes e incluso la muerte.

Hay una variedad de otros síndromes de células falciformes que resultan de la herencia del gen de células falciformes en la heterocigosidad con otros genes mutantes de globina, que conduce a trastornos tales como la enfermedad de la HbSC hoz y talasemia de células β , aunque las manifestaciones posibles de la enfermedad, en estos casos son menos graves que en los pacientes homocigotos HbSS.

Se caracteriza por una anemia hemolítica grave, que aparece a los pocos meses de nacer cuando la HbS reemplaza a la HbF, que predomina al nacer y durante los primeros meses de vida. En los niños es frecuente encontrar una esplenomegalia, que desaparece a medida que se producen infartos esplénicos produciéndose una verdadera atrofia esplénica.

A la exploración física se aprecia un tinte ictérico conjuntival. La anemia es de tipo hemolítico crónico. Los valores de Hb oscilan entre 6 y 8 g/dl y se acompaña de una intensa reticulocitosis. En el frotis de sangre se observan drepanocitos, que son claves en el diagnóstico. Éste se confirma con la electroforesis de Hb en medio alcalino y en agar-citrato a pH ácido. La HbF en

los homocigotos se encuentra elevada en proporción variable y parece actuar como mecanismo protector impidiendo la falciformación.

En la anemia drepanocítica son frecuentes dos tipos de crisis:

-Crisis vasculares oclusivas o crisis de dolor: por acumulación de drepanocitos que determina éstasis arterial e infartos. Las crisis vasculares se inician bruscamente, con intenso dolor y fiebre (Sargento, 1994). En los niños, los lugares más frecuentes son los huesos de las manos y los pies. Son frecuentes los procesos osteomielíticos por *Salmonella spp.* En los adultos predominan los infartos pulmonares. Puede presentarse priapismo.

-Crisis aplásicas: por interrupción brusca de la producción de eritrocitos, secundario, generalmente, a infecciones por parvovirus y deficiencias de ácido fólico. No se dispone actualmente de tratamiento específico. Algunas precauciones y medidas generales contribuyen a reducir el número de crisis, por ejemplo, evitar los cambios de temperatura, la deshidratación y las infecciones a las cuales son muy susceptibles, por la hipoesplenía a la que generalmente desembocan los infartos repetidos del bazo.

1.6.3. Forma doble heterocigota HbS / β -talasemia:

En el paciente coexisten 2 alelos anormales del gen de la cadena β , uno presenta la mutación de la HbS y el otro una mutación de β -Talasemia. La clínica no es tan grave como en la forma homocigota S.

1.6.4. Forma doble heterocigota HbS / HbC:

En el paciente coexisten 2 alelos anormales del gen de la cadena β , uno presenta la mutación de la HbS y el otro la mutación de la HbC: genotipo β^S / β^C . La expresión clínica suele ser menos severa.

1.6.5. Otras formas de asociación de HbS con distintas hemoglobinopatías:

Pueden darse combinaciones con otras alteraciones como HbE, HbD, α -Talasemia (Marín Soria, 2009). Todas las variantes posibles podrán presentar clínica diversa dependiendo de que otro tipo de alteración se encuentre presente.

Desde el nacimiento, el tratamiento debe integrar prevención de infecciones, dolor y posibles complicaciones, con apoyo social y psicoeducativo en centros multidisciplinarios equipados con cuidados intensivos, como el acceso inmediato a transfusión de sangre si fuera requerido. Se ha obtenido la autorización comercial en Europa de un medicamento huérfano basado en Hidroxicarbamida, también conocido como Hidroxiurea, para las formas graves de la enfermedad (Darbari, 2013). El mecanismo de aumento de la producción de HbF por Hidroxiurea no se entiende completamente. Algunos estudios confirman que dicho fármaco contribuye a la producción de óxido nítrico, un factor relajante endotelial potente, que a su vez reduce la polimerización de la HbF (Cokic, 2003; Steinberg, 2003; King, 2004).

Las transfusiones periódicas u ocasionales siguen siendo un método terapéutico esencial. El trasplante de médula ósea está indicado en algunos casos, como los pacientes con vasculopatía cerebral. El pronóstico es generalmente difícil de predecir. Los accidentes vasooclusivos graves o fallo orgánico pueden ser una causa relativamente frecuente de muerte.

1.7. PREVALENCIA E INCIDENCIA ANEMIA FALCIFORME Y OTRAS HEMOGLOBINOPATIAS

La anemia falciforme es una patología de carácter endémico en aquellas regiones tanto tropicales como subtropicales, en las cuales la malaria es endémica. Este fenómeno se debe al carácter protector del estado heterocigoto de esta patología (Aidoo, 2002; Verra, 2007). La tasa de portadores es muy elevada en determinadas regiones de África (hasta un 40% de la población), sobretodo en el área subsahariana. Otras zonas caracterizadas por su alta tasa de heterocigosidad son la India, la península arábiga, la cuenca mediterránea y, con un menor predominio, la zona de latinoamérica (Gómez-Chiari, 2003).

Los mecanismos a través del cual se lleva a cabo la protección siguen sin estar claros. Se han propuesto una serie de mecanismos bioquímicos e inmunitarios y es probable que los responsables de la protección observada sean un conjunto de mecanismos complejos (Gong, 2013).

La detección precoz de la enfermedad de células falciforme y otras hemoglobinopatías, se incluía históricamente, como parte de los programas de cribado neonatal, única y exclusivamente, en zonas geográficas cuya población estaba constituida por diversas etnias pertenecientes a grupos de riesgo.

El movimiento poblacional a lo largo del mundo y su establecimiento en países diferentes a los de origen, está teniendo como consecuencia la aparición de nuevas patologías, más o menos graves, asociadas con nuevos problemas de salud en determinadas zonas geográficas en las que tradicionalmente no existían (Hernández, 2002; González, 2002).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 1995 una prevalencia del 0.51% de la enfermedad de las células falciformes.

Fue nuevamente la OMS en la 59ª Asamblea Mundial de la Salud del año 2006 la que determinó la prevalencia de anemia por células falciformes, y encontró aproximadamente un 5% de la población portadora de genes causantes de hemoglobinopatías. El porcentaje de portadores puede llegar hasta el 25% en determinadas regiones. La tasa de natalidad anual de niños con hemoglobinopatías importantes es de aproximadamente 300.000, de los cuales más de 200.000 son africanos con anemia falciforme (Organización Mundial de la Salud: 59ª Asamblea mundial de la Salud, 2006; De las Heras Flórez, 2008). Debido al aumento de los fenómenos migratorios, estas enfermedades están apareciendo con mayor frecuencia en muchas zonas no endémicas (Vives, 2001).

1.7.1. Incidencia en el extranjero:

En un estudio publicado en 2008 se estimó la incidencia mundial (o prevalencia al nacimiento) durante el año 2003 en 2.28‰ nacimientos (Modell, 2008).

En otro estudio previo publicado por Modell en 2007, se llevó a cabo la estimación de la incidencia de la enfermedad de células falciformes en Europa, cuya distribución, como en el resto del mundo, no es homogénea en los diferentes países. Los países con la prevalencia más elevada son Albania (0,99 ‰), Chipre (0,78 ‰) e Inglaterra y Gales (0,63 ‰), seguidos de Holanda (0,32 ‰), Portugal (0,31 ‰) y Francia (0,30‰). Por otro lado, países como Finlandia, Escocia, Dinamarca, Luxemburgo, Alemania, Austria, Noruega y Suecia presentan prevalencias muy bajas, aproximadamente de $\leq 0,10\%$. Bulgaria, Rumania, Yugoslavia y Malta tuvieron una estimación de 0 ‰. La incidencia estimada para España fue de 0,11 casos‰ (Modell, 2007).

Estos datos deben recogerse de forma cautelosa ya que la distribución es altamente variable en función de las zonas de estudio, ello hace que la incidencia global no sea aplicable a zonas concretas con incidencias significativamente superiores o inferiores. En este mismo estudio se destaca la mayor incidencia en África, correspondiente a 10.68‰ nacimientos, seguida por la menor incidencia en la región este del Mediterráneo, la cual se reduce drásticamente hasta 0.07‰ nacimientos.

En la incidencia de la distribución de portadores de variantes significativas (tomando como tales HbS, HbC, HbE, HbD, β -Talasemia...), se obtiene un patrón similar con un 18,2% de portadores en África y 1,1% en Europa.

El número estimado de personas con enfermedad de células falciformes en los Estados Unidos de América es de 97.930, con una incidencia en población afroamericana de 1/365 nacimientos (2,74‰) y de 1/16.305 nacimientos (0,06‰) en población hispana (Hassell, 2010).

1.7.2. Incidencia en España:

Los estudios realizados respecto a la incidencia de hemoglobinopatías estructurales en España demuestran que esta incidencia es poco elevada.

Cuatro son los estudios realizados antes de la era de la inmigración y publicados, en sangre del cordón umbilical, los cuales demostraron unas tasas que oscilaron entre 1,25‰ y el 1,47‰. Las variantes más frecuentemente observadas fueron Hb S heterocigota, Hb Lepore, Hb Hofu, Hb D Punjab heterocigotica, Hb C heterocigótica y otras (Baiget, 1981; De Pablos, 1988; Risueño, 1995; Martín Núñez, 1995).

Más recientemente se han realizado diferentes estudios:

-En la Comunidad de Madrid en 2003 con una incidencia de 1/5512 para la anemia falciforme y 1/233 casos portadores de la enfermedad, la incidencia real es desconocida (López-Escribano, 2009).

- En un estudio realizado por Calvo-Villas, llevado a cabo en 2005 en la isla de Lanzarote en 2005, se analizaron 2.436 gestantes, obteniendo como resultado que el 9,44‰ presentaban hemoglobinopatías estructurales en estado heterocigoto (Calvo-Villas, 2006).

- En el año 2006 se analizaron en Cataluña, un total de 3.189 muestras de sangre del Programa de Detección Neonatal Catalán de Enfermedades Metabólicas de ellas se encontraron 2 casos homocigotos y 45 de heterocigotos o portadores de HbS, lo que supone el 0.63‰ y el 14.11‰ respectivamente.

-En el caso del estudio llevado a cabo por Cela de Julián en 2007, se analizaron 190.238 niños y se detectaron 1.060 variantes de hemoglobina (5,57 por cada 1.000 nacimientos). Un total de 31 de ellas fueron variantes de enfermedad falciforme (0,16 por cada 1.000 nacimientos) (Cela de Julián 2007).

-En el año 2009 fue publicado por Mañu-Pereira un estudio en el cual se estimó la prevalencia al nacimiento de la anemia falciforme en las comunidades autónomas españolas, con datos del año 2006. La prevalencia más elevada correspondió a Aragón (0,30‰), seguida de Melilla, Baleares y Cataluña, con prevalencias superiores a 0,20‰. Las comunidades autónomas con una prevalencia estimada $\leq 0,05\%$ fueron Extremadura, Asturias, Galicia, Cantabria, Castilla y León, Castilla La Mancha y Andalucía (Mañu- Pereira, 2009).

Tanto la incidencia como la prevalencia de hemoglobinas anormales en España están aumentando como resultado de la inmigración, sobre todo de origen africano dado que presentan una alta prevalencia de hemoglobinopatías

(Cabot, 1998). Este hecho a su vez, hace necesaria la adaptación de las instituciones sanitarias para intentar frenar en la medida de lo posible el curso de la enfermedad. De las 19 regiones de España, 13 presentaban más de 1% de los residentes de dicho origen. La incidencia de hemoglobinopatías fue heterogénea en las diferentes comunidades. Algunos casos de enfermedad de células falciformes (ECF) y de rasgo de células falciformes fueron encontrados en población autóctonas, pero fueron hallazgos muy poco frecuentes. La mayoría de los estudios de prevalencia ECF en España son incompletos o centrados en unas pocas regiones geográficas. Cuando la detección fue llevada a cabo sin tener en cuenta el origen étnico, la prevalencia global de hemoglobinopatías ha variado de 0.14% a 0.94% y la prevalencia estimada de ECF fue desde 0.001 (en Extremadura) a 0,03 (en Aragón). Un registro de ECF mantenido por la Sociedad Española de Hematología Pediátrica muestra que en los últimos 4 años previos al estudio la prevalencia de la ECF se triplicó (Mañu-Pereira, 2009).

-En el estudio piloto llevado a cabo en el País Vasco en Abril de 2011, la incidencia de anemia falciforme ha resultado ser de 1/2.432 y de 1/211 casos con alguna variante de Hb (Estébanez, 2011).

1.8. FISIOPATOLOGÍA DE LA DREPANOCITOSIS

La anemia falciforme, constituye el grupo más frecuente y de mayor interés clínico de las hemoglobinopatías estructurales. Clínicamente, la forma homocigota o anemia falciforme con fenotipo neonatal FS, cursa con anemia hemolítica y crisis vasooclusivas. En ella existe una hemoglobina anormal denominada hemoglobina S, originada por una mutación en el cromosoma 11, dando lugar a la sustitución en la posición 6 de la cadena β de globina, del

Ácido Glutámico por la Valina. Dicha modificación, produce un tetrámero de hemoglobina ($2\alpha\beta_2$) que es poco soluble cuando está desoxigenada.

La polimerización de la desoxiHbS es esencial para que se den fenómenos vasooclusivos. El polímero toma la forma de una fibra de alargada que por lo general se alinea con otras fibras, lo que provoca una distorsión de los glóbulos rojos afectados originando así la forma de media luna clásica o forma de hoz y una marcada disminución de la deformabilidad de los glóbulos rojos (Bunn, 1997).

La polimerización por sí sola no es responsable de la fisiopatología de la enfermedad. Los cambios posteriores en la estructura de la membrana celular y su función, el control de volumen celular alterado, y el aumento de la adhesión al endotelio vascular también juegan un papel importante (Kaul, 1997).

Determinados factores como son el nivel de oxígeno, el pH y la temperatura, favorecen la polimerización de la hemoglobina S falciforme, provocando alteraciones en la morfología de los hematíes (falciformación), aumento de la viscosidad sanguínea e infartos en distintos órganos, ocasionando las importantes manifestaciones clínicas y complicaciones típicas de la anemia falciforme.

La presencia de hemoglobina A (HbA) o hemoglobina fetal (Hb F) junto a la hemoglobina S (Hb S), aumenta la solubilidad de ésta, lo que constituye una de las bases del tratamiento.

El gen falciforme generalmente sólo produce manifestaciones clínicas en el estado homocigoto o en los dobles heterocigotos; la forma heterocigota, se denomina rasgo falciforme, con fenotipo FAS; los bebés con rasgo falciforme, por lo general, son asintomáticos y no presentan anemia.

1.9. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

El porcentaje de mortalidad que se produce en niños con anemia falciforme menores de 5 años es del orden de 25-30%. La mayoría de las muertes en este grupo se producen de forma secundaria a infecciones fatales, secuestro esplénico o crisis aplásicas.

En el caso de las formas más graves (anemia falciforme o estado homocigoto) en las que los síntomas comienzan generalmente en el primer año de vida, el diagnóstico neonatal, permite el inicio precoz de la profilaxis antibiótica siendo posible evitar o paliar las siguientes complicaciones:

a) Crisis de dolor muy intenso por oclusión de vasos, muy difíciles de diagnosticar en lactantes si no se sabe que padecen la enfermedad (Stinson, 2003; Richard 2009).

b) Infecciones graves (neumonías, sepsis y meningitis bacteriana), a las que estos enfermos son especialmente proclives y que les pueden llevar a la muerte (Wong, 2001, Quinn, 2004; William, 2009).

c) Accidentes cerebrovasculares, cuyas secuelas son devastadoras para el niño, y suelen provocar deficiencias en el desarrollo psicomotor.

d) Crisis de secuestro esplénico, frecuente en niños pequeños.

e) Complicaciones pulmonares como el síndrome torácico agudo, que puede producir insuficiencia respiratoria grave (Gladwin, 2008).

f) Complicaciones visuales, cardiacas, renales y en otros órganos.

Todas ellas pueden retrasar su aparición si se sigue al enfermo precozmente.

Las formas leves (rasgo falciforme) son generalmente asintomáticas. Sin embargo la enfermedad puede manifestarse en situaciones de disminución de la presión parcial de oxígeno-ambiental (hipoxia por altitud, submarinismo o anestesia).

Las manifestaciones clínicas en la forma heterocigota (en los casos en que se presentan) se refieren siempre a alteraciones vasooclusivas, pudiendo afectar al riñón por microinfarto de la médula renal (hipostenuria con hematuria) (Allon, 1990) o presentar dolor abdominal intenso por microinfarto esplénico.

Los bebés y los niños pequeños son especialmente vulnerables a sufrir septicemia neumocócica, con una tasa de incidencia de 10 por cada 100 pacientes/año. Por lo tanto, la profilaxis mediante el uso de penicilina puede ser aconsejable para esta población (Falletta, 1995; Hirst, 2012). Se ha observado que la profilaxis con penicilina reduce significativamente el riesgo de infección neumocócica en niños homocigotos, y se asocia con reacciones adversas mínimas, más concretamente, reduce la incidencia de septicemia por neumococo en el 84% (Galbe Sánchez-Ventura, 2009). Así mismo, se ha descrito que el índice de mortalidad en niños con anemia falciforme es menor en los casos diagnosticados en el periodo neonatal respecto a los diagnosticados después de los 3 meses de edad (Platt, 1994).

1.10. DIAGNÓSTICO DE LA ANEMIA FALCIFORME

El diagnóstico se basa en el análisis de Hb utilizando isoelectroenfoque, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en ingles), prueba de solubilidad (prueba de Etanol) y análisis molecular.

Debe realizarse estudio familiar para identificar a los portadores y hacer un consejo genético prospectivo. El diagnóstico diferencial incluye otras

enfermedades hemolíticas hereditarias. Puede realizarse diagnóstico prenatal, mediante análisis molecular en una muestra de vellosidad coriónica o líquido amniótico (Mañú-Pereira, 2007).

- El cribado neonatal generalmente se inicia a partir de la detección de variantes de Hb en muestra de sangre impregnada en papel: HbFA, HbC, HbD, HbE, HbS y sus posibles combinaciones.

- Una vez que se determina la presencia de alguna de las variantes estructurales de Hb (casos positivos), se enviarán a los diferentes centros hospitalarios de procedencia. Todos aquellos casos positivos se estudiarán nuevamente junto con su grupo familiar para confirmar la presencia de estas enfermedades según el protocolo establecido en la Comunidad Valenciana.

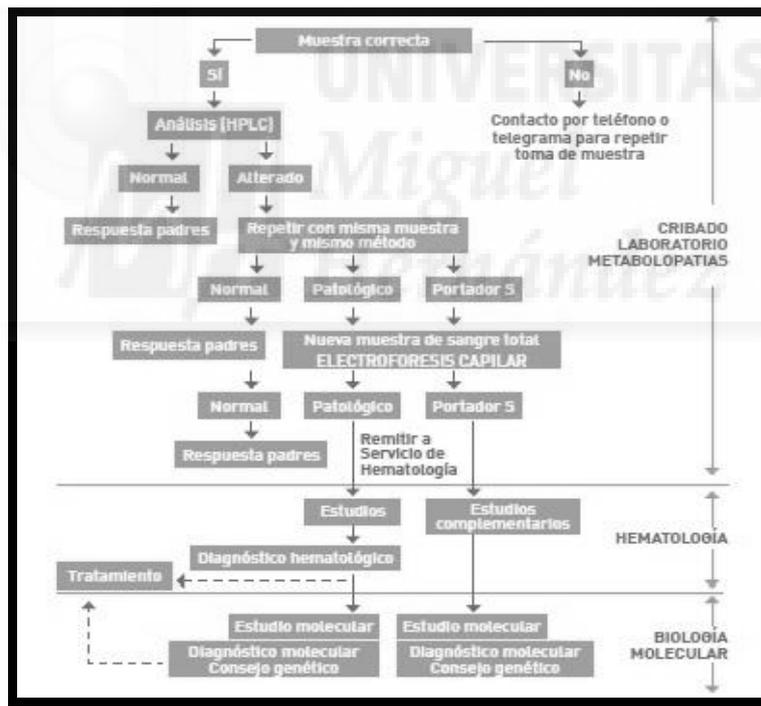


Figura 6. Algoritmo del protocolo cribado neonatal de drepanocitosis en la Comunidad Valenciana.

- El seguimiento de los pacientes detectados con anemia falciforme, se lleva a cabo según el protocolo consensuado y establecido por la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (Anexo 1)







2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

2.1. JUSTIFICACIÓN DEL CRIBADO NEONATAL DE ANEMIA FALCIFORME

En la actualidad se conocen más de 600 hemoglobinopatías, aunque solo algunas provocan problemas clínicos: las talasemias α y β y la hemoglobina S provocan enfermedad por sí mismas, mientras que las hemoglobinas E y C solo causan enfermedad con otras alteraciones (Abarca 2008, Fernández Águila 2012).

La demostración en 1986 de que el uso de penicilina profiláctica reduce notablemente la incidencia de la sepsis neumocócica supuso un aliciente más para la aplicación generalizada del cribado neonatal para la enfermedad de células falciformes.

La experiencia posterior ha ido demostrando que un cribado neonatal riguroso, unido a las pruebas de diagnóstico oportunas, educación de los padres de neonatos afectos y unos cuidados adecuados, reducen marcadamente la morbilidad y mortalidad de la enfermedad de células falciformes, sobre todo en los primeros años de vida (Sanchaisuriya 2005, Unesco, 2006).

Las hemoglobinopatías afectan desde hace años a millones de personas en todo el mundo y provocan un alto grado de morbimortalidad. Se considera el error congénito más frecuente en poblaciones africanas, del área mediterránea y sudeste asiático, siendo ya en 1969 las poblaciones con más prevalencia la de África subsahariana 1'18%, Afrocaribeña 0'2% y Norte de África 0'05% (Lehmann, 1969). Los intensos flujos migratorios que se están

dando en los últimos años en nuestro país, suponen un importante incremento de la prevalencia de hemoglobinopatías estructurales, y en menor proporción de α y β talasemias, tanto en sus formas leves (heterocigotas) como en sus formas severas (homocigotas y dobles heterocigotas). Han pasado de ser poco frecuentes a formar parte de la práctica clínica rutinaria, sobre todo las hemoglobinopatías estructurales. Actualmente están llegando a ser un serio problema de salud pública (López- Escribano 2009).

La población de inmigrantes procedentes de regiones como: África subsahariana, Magreb, Sudamérica, sudeste asiático y este de Europa, se han establecido y concentrado en todo el territorio español especialmente en las grandes ciudades como Madrid, Barcelona o Valencia (Villegas, 2006; Galbe Sánchez-Ventura, 2009).

Por ello, como ya se demostró desde años atrás, es interesante realizar campañas de detección en embarazadas, neonatos, escolares, con el objeto de conocer la prevalencia de estas enfermedades emergentes en las diferentes comunidades y prevenir las formas severas y tratarlas precozmente (Villegas 2006, Sanchaisuriya 2005).

Desde finales de la década de 1990, España ha sido escenario de un importante fenómeno inmigratorio que ha invertido la tasa de migración neta, hasta entonces negativa (ONU, 2010). Según datos del Instituto Nacional de Estadística, la población inmigrante pasó de representar el 7% de la población española en 2004 al 12,2% en 2010 (INE, 2010).

A partir de este año y debido a la crisis económica que atraviesa el país, se ha visto disminuido paulatinamente el número total de inmigrantes que recibe. A pesar de este hecho el fenómeno inmigratorio sigue siendo muy patente en la Comunidad Valenciana y de los mayores porcentajes de España.

Tanto en el año 2012 como en el 2013 el número total de nuevos inmigrantes acogidos por nuestra comunidad, según datos publicados por el INE fue de más de 37.000 por año. (INE, 2013).

2.2. JUSTIFICACIÓN DEL CRIBADO NEONATAL DE ANEMIA FALCIFORME EN NUESTRO MEDIO

En la Comunidad Valenciana se ha producido durante los últimos años un crecimiento paulatino del número de hijos de inmigrantes, que está referido en la tabla 2. Dicho crecimiento se ha visto frenado en los dos últimos años debido a la crisis económica y la vuelta a sus países de algunos inmigrantes.

La Comunidad Valenciana es la cuarta comunidad autónoma española que más ha crecido y la segunda en cuanto a porcentaje de población extranjera en España, según se desprende de los datos provisionales del avance del padrón realizado por el INE, lo que sitúa la población valenciana en casi 5.000.000 personas, según datos de finales de 2012. De dicho total de población, más de 37.300 personas, engloban el flujo migratorio publicado en ese momento. En la siguiente se presenta la comparación del número de población española respecto de la extranjera y la importancia dentro del global de población total a finales del año 2012 en nuestra comunidad.

Tabla 2. Población española, extranjera y total en las diferentes provincias de la Comunidad Valenciana a finales de 2012.

Provincia	Españoles	Extranjeros	Población total
Alicante	1.471.300	472.610	1.943.910
Castellón	604.564	111.598	716.162
Valencia	2.580.792	298.804	2.879.596

Si se observa el origen de los grupos con mayores flujos migratorios, se detecta como los grupos mayoritarios son el europeo, seguido del africano, sudamericano y asiático. Los grupos de inmigrantes provenientes de África, América (mayoritariamente Sudamérica) y Asia, son los que a priori pudieran presentar mayores diferencias étnicas respecto de la población autóctona y teniendo en cuenta la importancia que tienen dentro de flujo migratorio total se considera importante su estudio exhaustivo dentro del presente trabajo.

Es importante para el presente estudio, evaluar la distribución por edad de cara a la prevención de enfermedades o detección precoz de las mismas mediante la realización de un cribado neonatal. La distribución por edades de la población extranjera de la Comunidad Valenciana queda reflejada en la siguiente tabla:

Tabla 3. Población inmigrante de la Comunidad Valenciana Enero 2013.
Distribución por edad y origen. INE

Edad (años)	Europa	África	América	Asia	Oceanía	Apátridas
0-15	60481	32155	18251	8036	70	12
16-44	230152	73026	95900	27227	172	57
45-64	141867	15444	26757	5863	89	8
65	122648	1211	3896	539	29	1
Total	555148	121836	144804	41665	360	78

El grupo de edad que comprende a los inmigrantes cuyas edades oscilan entre los 16 y los 44 años, es el grupo mayoritario en todos los orígenes

estudiados. Dicho conjunto de sujetos posee mayor esperanza reproductiva y por tanto estos podrían ser futuros padres, cuyos hijos se beneficiarían del cribado neonatal de células falciformes.

A continuación se presentan los datos correspondientes a la población inmigrante de la provincia de Alicante, obtenidos del padrón publicado en Enero de 2013. El patrón observado anteriormente de forma global en toda la Comunidad Valenciana se repite en el caso particular de la provincia de Alicante: el grupo mayoritario es el europeo, seguido del africano, americano (mayoritariamente población de América latina) y asiático. En cuanto a los grupos de edad sigue siendo el mayoritario el que engloba a los inmigrantes cuyas edades se comprenden entre los 16 y 44 años.

Estos datos han sido obtenidos de las publicaciones realizadas por el Instituto Nacional de Estadística, al igual que los anteriores y que están disponibles en su página web www.ine.es.

Tabla 4. Estadística del padrón de Alicante a 1 de enero de 2013 referida a la población extranjera. Distribución por edad y origen. Datos recogidos del INE.

Edad (años)	Europa	África	América	Asia	Oceanía	Apátridas
0-15	29814	14145	7260	2998	18	3
16-44	101954	32915	38126	10515	37	22
45-64	96099	7409	11452	2295	44	3
65	111544	608	1891	244	20	1
Total	339411	55077	58729	16052	119	29

Realizando un estudio del número de nacimientos en función del origen de la madre durante los últimos años (datos recogidos en la tabla 5), se detecta una ligera disminución del número de nacimientos. Dentro de los resultados reflejados se perfila como mayoritario el grupo de madres originarias de Europa (principalmente de Europa del este), seguido por los grupos de América Central y del Sur y África del Norte.

Tabla 5. Evolución de los nacimientos según área de procedencia de la madre. Comunidad Valenciana.

	2.010	2.011	2.012	2.013
España	39.033	37.966	36.738	34.149
África del Norte	2.964	2.674	2.552	2.318
África Subsahariana	519	433	407	392
América Central y del Sur	3.667	3.468	3.138	2.870
América del Norte	31	21	25	17
Asia	552	568	521	510
Europa del Este	3.061	2.807	2.743	2.447
Europa Occidental	1.176	1.047	1.021	875
Oceanía	9	9	8	9
Oriente Medio	157	270	246	216

A continuación se presenta un diagrama de barras correspondiente a la distribución de la población nacional y extranjera con edades inferiores a los 18 años:

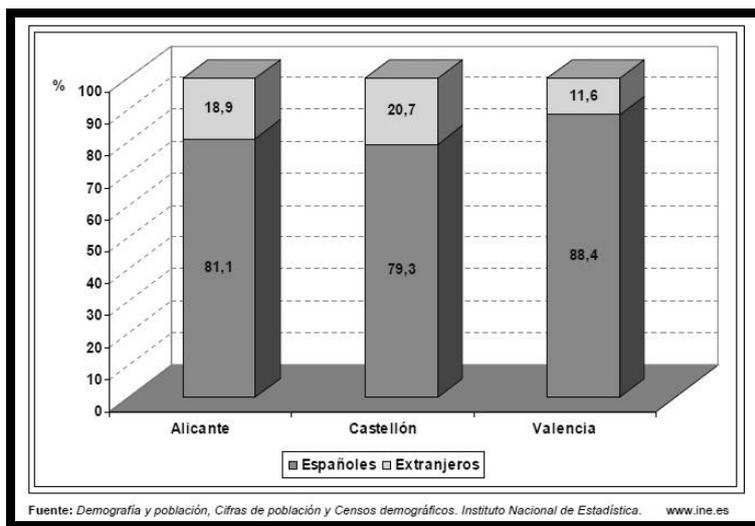


Figura 7. Distribución de la población menor de 18 años de progenitores extranjeros de la Comunidad Valenciana, 2011 OSIP.

Se observa un porcentaje de población con edades inferiores a los 18 años notablemente superior en las provincias de Alicante y Castellón con valores de 18.9% y 20.7% respectivamente respecto de la Valenciana, la cual supera levemente el 11,5%.

Centrando el estudio a continuación del total de población comprendido entre los 0 y 4 años (población que incluiría a aquellos niños que serían candidatos a beneficiarse del cribado neonatal) en el periodo de 2000 a 2011 se observa un aumento notable del porcentaje de población extranjera.

Tabla 6. Porcentaje de población según nacionalidad en la Comunidad Valenciana, 2000-2011. OSIP.

Residentes 0- 4 años		
Año	% Españoles	% Extranjeros
2000	98.30	1.70
2001	97.59	2.41
2002	95.72	4.28
2003	93.68	6.32
2004	92.39	7.61
2005	90.95	9.05
2006	89.91	10.09
2007	88.31	11.69
2008	86.30	13.70
2009	85.37	14.63
2010	84.97	15.03
2011	84.56	15.44

Estos datos han sido publicados por Observatorio de Salud Infantil y Perinatal (OSIP) y están disponibles en su página web: www.sp.san.gva.es/osip/.

Todos estos datos han conducido a la implantación del Cribado Neonatal de Anemia Falciforme en la Comunidad Valenciana desde febrero del

año 2012, así como su progresiva generalización en España, siendo una de las siete enfermedades que se consideran deben figurar en la "Cartera de Servicios" por el Ministerio de Sanidad.

Realizar un cribado neonatal correctamente es esencial. Para poder llevarlo a cabo, es imprescindible disponer de valores de normalidad específicos, que tengan en cuenta al menos, las variables más importantes. La obtención de percentiles y valores de normalidad en la población y su instauración en los programas de cribado neonatal, facilitará el posterior estudio de nuevos recién nacidos, posibilitando la automatización del proceso con el consiguiente aumento en la velocidad de obtención y comunicación de los resultados.

La consecución de percentiles de normalidad para las diferentes poblaciones estudiadas posibilitará tanto evitar la realización de estudios posteriores de confirmación, como el consiguiente ahorro económico para el sistema sanitario. Todo ello a través de acciones como el establecimiento precoz de tratamientos preventivos, ya sean farmacológicos como de tipo higiénico sanitarios. De esta forma se podría mejorar la calidad de vida de los niños afectados y disminuir, en la medida de lo posible, futuros problemas de salud más complejos.

Una vez obtenido el diagnóstico de una hemoglobinopatía y llegados los recién nacidos afectados a la madurez (siempre y cuando den su consentimiento) se puede llevar a cabo el consejo genético cuando se planteen tener descendencia. Esta es una cuestión de especial importancia, sobre todo a nivel de los pacientes heterocigotos, ya que la ausencia de clínica en la mayoría de casos puede dar lugar a que el problema sea tenido en baja consideración y sea pasada por alto la posibilidad de tener descendencia homocigota en el caso de que el otro progenitor también sea portador de una hemoglobina anormal (Grossman, 1985; Yang, 2000).

Tan importante o más que el asesoramiento a nivel de descendencia futura en un portador, es el asesoramiento de los padres de un niño afecto. La importancia radica especialmente en el hecho de que un buen conocimiento del problema del recién nacido y la puesta en marcha de terapias preventivas son esenciales para la calidad de vida del neonato (Tchernia, 2008). Actuaciones como la palpación de bazo, el uso profiláctico de antibióticos o el buen abordaje de los procesos febriles, realizadas antes de los 4 meses de edad, ya se recomendaban años atrás por expertos (Miller, 1990).

En la actualidad se recomiendan como intervalo de tiempo óptimo para instaurar el tratamiento de la anemia falciforme desde el momento del nacimiento hasta el mes de vida (Ministerio de sanidad: Grupo de trabajo de la Comisión de Salud Pública para el desarrollo del Sistema de Información sobre Cribado Neonatal, 2013).

Un cribado neonatal posibilita el diagnóstico precoz, el cual asociado a un programa de educación paterna, ayuda a disminuir notablemente la morbilidad y mortalidad provocadas por alteraciones hemoglobínicas, por tanto son esenciales para la calidad de vida del recién nacido (Lang, 2009).



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

**PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS
DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES**

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Como hipótesis de trabajo se propone que: las proporciones de las diferentes hemoglobinas en el neonato varían con la edad gestacional, los días de vida y el origen étnico materno, así como con la presencia de hemoglobinas anómalas.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Se ha definido como objetivo general del presente trabajo, el estudio de los percentiles de normalidad en las proporciones de las diferentes hemoglobinas presentes en el neonato analizadas mediante el cribado neonatal y su variación causada por la presencia de hemoglobinas anómalas.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estudiar la variación de los porcentajes de las diferentes hemoglobinas en sangre desecada sobre papel en recién nacidos con la edad gestacional.
- Estudiar la variación de los porcentajes de las diferentes hemoglobinas en sangre desecada sobre papel en recién nacidos con los días de vida.

- Estudiar la variación de los porcentajes de las diferentes hemoglobinas en sangre desecada sobre papel en recién nacidos con el origen étnico materno.
 - Indicar los parámetros automatizables para descartar una transfusión sanguínea en el neonato como motivo de muestra no válida.
 - Analizar las variaciones de los porcentajes de las hemoglobinas normales en presencia de las formas anómalas S, C, D y E.
 - Analizar el riesgo de portadores S, C, D y E según el origen materno.





4. MATERIALES Y MÉTODOS

PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. POBLACIÓN

El presente estudio se realizó con las muestras de sangre desecada sobre papel Whatman 903 para el cribado neonatal de todos los recién nacidos en el HGUA en un periodo completo de un año desde febrero de 2012 a febrero de 2013, estando constituida por n=16483 muestras, todas ellas con consentimiento informado de los padres, según consta en la ficha de obtención de las muestras, y con una cobertura superior al 99% de los recién nacidos en la provincia de Alicante, según años precedentes.

De estas muestras de neonatos se recogieron los datos: edad gestacional, días de vida en el momento de la extracción, origen étnico materno, peso al nacimiento y sexo, todos ellos constan en la ficha del recién nacido entregada a los padres para la realización del cribado neonatal de enfermedades metabólicas, anonimizando a partir de este momento todos los datos de forma que a continuación es imposible su filiación y utilizando los datos únicamente con fines estadísticos.

4.1.1. Criterios de inclusión de las muestras:

Todos los recién nacidos en la provincia de Alicante y cuyas muestras han sido remitidas al Centro de Cribado Neonatal del Servicio de Análisis Clínicos del HGUA, en un periodo completo de un año desde el inicio del cribado neonatal de anemia falciforme: Febrero de 2012 a Febrero de 2013, que cumplan las siguientes condiciones:

- Muestras recibidas de sangre desecada sobre papel en el laboratorio de Cribado Neonatal del Hospital General Universitario de Alicante, lo que supone todas las muestras realizadas a los recién nacidos de la Provincia de Alicante.
- Niños en los que la muestra de sangre desecada sobre papel cumplía con los criterios de calidad preanalítica definidos (Espada, 2001).

4.1.2. Criterios de exclusión de las muestras:

- Recién nacidos cuyos padres no hayan dado su consentimiento firmado para la realización del cribado neonatal.
- Muestras de recién nacidos que correspondan a repeticiones para confirmar diagnóstico.
- Muestras en las que figura que el recién nacido ha sido sometido a transfusión sanguínea antes de la toma de la muestra para el cribado neonatal.

4.1.3. Muestreo:

Las muestras objeto del presente estudio corresponden a todos los recién nacidos en los diferentes hospitales de la provincia, tanto de la red de sanidad pública como de la privada y siguiendo tanto el protocolo de la Consellería de Sanidad de la Comunidad Valenciana, como los criterios de calidad en la toma de muestras (Galbe Sánchez-Ventura, 2009).

Como paso previo a la extracción, se cumplimentó el formulario específico utilizado de rutina por el programa de Cribado Neonatal de la Comunidad Valenciana en el cual constan tanto los datos de identificación como los datos clínicos del niño.

Las muestras obtenidas cada día se conservaron en condiciones adecuadas hasta el envío al laboratorio para su procesamiento. Todos los hospitales tienen al menos dos días semanales de envío al laboratorio de cribado mediante mensajeros específicos.

Una vez en el laboratorio, el procesado de las mismas incluye:

- Numeración/ identificación de las muestras.
- Traslado de los datos del niño recogidos en la ficha en papel proporcionada por la Consellería de Sanidad a la aplicación informática específica de la Consellería (MetaB).
- Análisis de las muestras mediante el método analítico descrito posteriormente.
- Introducción del resultado cualitativo obtenido en la ficha informatizada del niño de la aplicación informática MetaB.

Todo este proceso se realizó siguiendo los protocolos del laboratorio:

- PNT-CN-01: "Recepción de muestras, identificación y registro informático" (Anexo 2).
- PNT-CN-08: "Determinación de Anemia falciforme en sangre desecada en papel de filtro con el VARIANTnbs" (Anexo 3).

Con la finalidad de llevar a cabo el estudio presente de forma rigurosa y ordenada, se creó un archivo Excell al que se trasladaron los resultados cuantitativos de las distintas hemoglobinas de las muestras que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión establecidos, junto con los datos pertinentes (EG, días a la toma de muestra, sexo, peso y origen étnico de la madre) de forma totalmente anónima y no filiable.

Con las muestras obtenidas se definieron distintos subgrupos atendiendo a las variables:

- Sexo: niños y niñas.

- Grupos de edad gestacional: se efectuó la división de las muestras según edad gestacional considerando a los niños con edad gestacional inferior a 32 semanas recién nacidos muy pretérmino (RNMPT), de 32 a 37 semanas pretérmino (RNPT) y de 37 en adelante recién nacidos a término (RNT) (Avery, 1988; Saenz 2008).

- Origen étnico de la madre, para ello se establecieron los grupos según región de origen divididos en: España, Norte de África, Sudáfrica, Latinoamérica, Resto Europa y Asia.

- Tipos de hemoglobinas: normales, patrón anormal de las Hb neonatales y con porcentaje de Hb anormales C, D, E y S, considerando valor anormal igual o superior al 1%.

Pueden no coincidir los totales en cada una de las divisiones por subgrupos, pues puede faltar alguna de las variables en la ficha del recién nacido como edad gestacional, día de extracción o país de origen de la madre.

4.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.2.1. Método de identificación de hemoglobinas de sangre desecada:

La detección y cuantificación de las diferentes hemoglobinas presentes en el neonato se realiza mediante el "kit VARIANT nbs Sickle Cell Program" de Bio-Rad. Dicho kit, proporciona un método integrado para la preparación de

muestras y para la separación y determinación del porcentaje relativo de determinadas hemoglobinas en muestras de sangre eluidas.

El proceso se lleva a cabo sobre muestras de sangre desecadas sobre papel y según el protocolo del laboratorio de análisis clínicos del Hospital General Universitario de Alicante que se presenta en los anexos, siguiendo las normas relativas a la calidad y competencia (AENOR 2007), documento PNT-CN-08 "Determinación de anemia falciforme en sangre desecada en papel filtro con el VARIANTnbs" (Anexo 3).

Utiliza los principios de la cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico (HPLC) para la separación y la determinación de hemoglobinas F, A, C, D, E/A₂ y S. Cada tipo de Hb tiene un tiempo de retención característico, a excepción de HbE y la HbA₂ que eluyen en un mismo pico por tanto son indiferenciables entre sí. El tiempo de retención se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el punto máximo de cada pico. La identificación de hemoglobinas desconocidas se lleva a cabo, comparando su tiempo de retención con el de hemoglobinas conocidas, analizadas en el mismo sistema.

Dos bombas de doble pistón hacen llegar una solución tamponada al cartucho de análisis y al detector. Las muestras se extraen de eluidos de manchas de sangre en pocillos de microplacas y se introducen en el circuito de análisis mediante la inyección automática.

Entre una inyección de muestra y la siguiente, la aguja se lava con una solución especial para eliminar el riesgo de arrastre. La muestra es transportada por el tampón hasta el cartucho de análisis, donde se separan sus componentes.

Los componentes separados atraviesan el detector de longitud de onda doble, donde se mide su absorbancia a 415 nm. Como técnica para minimizar el ruido de fondo, se emplea una longitud de onda secundaria a 690 nm.

Los datos de absorbancia se transmiten del detector al PC y el software GDM los muestra como un cromatograma a tiempo real (gráfico de tiempo frente concentración). Los datos procesados finalmente se incorporan a un informe impreso, que contiene la siguiente información:

- Un resumen completo de los componentes detectados en la muestra (identificación de picos, tiempo de retención, porcentaje relativo, área).
- El cromatograma de la muestra.
- La fecha y la hora del análisis.
- El número del vial y la identificación de la muestra.

4.2.2. Expresión de resultados

Los resultados se expresan en forma de fenotipo.

Tipos de fenotipo:

- FA: resultado normal en neonato, libre de hemoglobinas anómalas.
- FAS: posible portador de Hb S, heterocigoto S o rasgo falciforme.
- FS: posible forma homocigota de Hb S o anemia falciforme.
- FAC: posible forma heterocigota o portador de Hb C.
- FAD: posible forma heterocigota o portador de Hb D.

- FAE: posible forma heterocigota o portador de Hb E.

Y las posibles combinaciones de dos de dichas mutaciones o formas homocigotas.

- AF: indica mayor porcentaje de hemoglobina de adulto frente a la fetal, este es el perfil típico tras una transfusión sanguínea. Este caso es importante tenerlo presente, pues aunque se da como norma en las especificaciones de la toma de muestra indicar las trasfusiones, siendo un caso de exclusión de la muestra para el cribado neonatal. Sirve para descartar muestras que hayan sido tomadas erróneamente y no comunicada dicha circunstancia en la ficha.

4.2.3. Controles de calidad del método

4.2.3.1. Control interno de la calidad

En cada serie analítica se introducen dos marcadores al principio y al final de la placa: FAES y FADC, incluidos en el kit "VARIANTnbs Sickle Cell Program" en forma de liofilizados que son estables hasta la fecha de caducidad sin reconstituir.

Tras la reconstitución con 5 ml de agua destilada, mantienen su estabilidad durante 21 días a 2-8 °C.

Todos los analitos de los marcadores de retención deben ser correctamente identificados. Ello implica que para el control FAES se deben de identificar picos correspondientes a las hemoglobinas F, A, E/ A₂ y S, del mismo modo que para el control FADC deben identificarse los picos correspondientes a F, A, D y C.

4.2.2.2. Control externo de la calidad

Basado en controles externos en los que hay que verificar únicamente la presencia de Hb A, F, C, D, E/A₂, S.

4.2.4. Criterios de aceptabilidad de las determinaciones:

Todos los analitos de los marcadores o controles deben ser identificados correctamente. Tras la aceptación de los controles se evalúan las muestras para comprobar el fenotipo correspondiente. Serán aceptadas e informadas como normales todas aquellas muestras que correspondan al fenotipo FA.

Aquellas que presenten alguna anomalía respecto a dicho fenotipo, son remitidas a su posterior confirmación mediante electroforesis capilar con la misma muestra, siendo descartada si se muestra fenotipo normal FA o repetida en una nueva muestra caso de confirmación de cualquier otro fenotipo.

4.2.5. Limitaciones de la técnica

-El programa Variant Sickle cell Program permite la separación de hemoglobinas normales y de las variantes más comunes de Hb. Con cada serie, se establecen intervalos de tiempo de retención para las Hb F, A, S, D, C y E. Dentro de esos intervalos pueden darse también otras variantes menos frecuentes.

-Para lograr una confirmación positiva de una variante de Hb concreta, quizá resulte necesario el uso de una técnica diferente o, incluso la secuenciación de los aminoácidos de las cadenas de globina en algunos casos puntuales.

-Los resultados de las muestras de pacientes que hayan recibido una transfusión pueden ser engañosos. La sangre de una transfusión puede enmascarar la sangre de paciente normal, de portador de hemoglobina anómala ya sea en calidad de homocigosis como de heterocigosis.

-Los resultados de las muestras de pacientes neonatales prematuros pueden ser engañosos. Los prematuros pueden presentar niveles muy bajos de Hb adulta al nacer, por debajo del límite de detección. En estos casos se debe solicitar una nueva muestra unos meses más tarde, para que haya tenido tiempo el organismo de eliminar los eritrocitos provenientes de la transfusión y haya generado los suyos propios. En concreto, en la documentación facilitada por el fabricante y que acompaña al programa Variant nbs Sickle Cell Program, la recomendación es el análisis de una nueva muestra a los 3-6 meses de edad.

-Los picos identificados como "otros" ("Other") y "desconocidos" ("Unknown") sólo se incluyen a título informativo.

-La aplicación de las reglas de patrón elaboradas por Eastman et. Al. 1996 es opcional (Eastman, 1996). La asignación de patrón resultante del empleo de valores predeterminados o definidos por el laboratorio debe ser validada por el laboratorio antes del uso.

4.2.6. Criterios de rechazo y repetición de las determinaciones:

En los siguientes supuestos se llevará a cabo la repetición de la determinación en la misma muestra:

- Si durante la evaluación de las muestras se detecte un pico dudoso o en caso de que se sospeche de la variación de los picos de retención.

- Si el resultado dado por el equipo es "not determined" o "low area".

- Si aparece algún fenotipo anómalo diferente al normal (FA), en este caso se guardarán las muestras congeladas para comprobar mediante una técnica de confirmación el resultado.

4.3. TÉCNICA DE CONFIRMACIÓN: ELECTROFORESIS CAPILAR

Todas aquellas muestras analizadas mediante el sistema VARIANT, en las cuales se hayan identificado fenotipos anómalos serán sometidas a un reprocesamiento con el sistema autoanalizador "CAPILLARYS 2" de Sebia.

La tecnología utilizada por el equipo es la electroforesis capilar, la cual permite:

- La separación en relación a la relación carga eléctrica mediante la aplicación de un alto potencial eléctrico a través de un capilar de Sílice.

- La identificación de los diferentes tipos de hemoglobinas presentes en la muestra, según su posición o zona de migración respecto a las diferentes hemoglobinas presentes en los controles. Permite la diferenciación de los picos correspondientes a HbE y HbA₂, separación que no es posible mediante HPLC ya que eluyen a la vez dando lugar a un pico indiferenciable.

4.3.1. Análisis y expresión de los resultados:

Las variantes de hemoglobina contenidas en la muestra son identificadas según la zona de migración respecto a la hemoglobina A del control AF.

Fenotipos posibles:

-FA: resultados normales

-FAS, FS, FSC, FAC, FAD, FAE: portadores de hemoglobinas anómalas en forma hetero u homocigota según el caso y sus posibles combinaciones.

-AF: hemoglobina A predominante, indica la existencia de una transfusión sanguínea.

4.3.2. Control de calidad del método: control interno:

En cada serie de determinaciones se ponen dos tipos de controles:

-Control Hb AF: función de marcador de migración.

-Control ASFC: función de identificador de los picos de las diferentes hemoglobinas.

Se presenta en forma de liofilizados cuya estabilidad permanece intacta hasta la fecha de caducidad del envase. Se reconstituyen con 1 ml de agua desionizada, y se conservan a -20 °C.

4.3.3. Criterios de aceptación y evaluación de resultados:

Todos los analitos de los controles deben estar correctamente identificados.

Tras la validación de los controles se evalúan las muestras para identificar el fenotipo de los resultados obtenidos.

Si todos los picos son correctamente identificados y son coincidentes con los identificados mediante HPLC, se acepta el resultado como válido.

4.3.4. Criterios de repetición:

Situaciones ante las cuales se repetiría el análisis:

- Ante la aparición de algún pico dudoso se repite la determinación.
- Si el fenotipo no coincide con el determinado por HPLC.

En aquel caso en que tras la repetición el resultado sigue siendo dudoso, se rechaza la muestra y se solicita una nueva.





5. RESULTADOS

PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



5. RESULTADOS

5.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA TOTAL ESTUDIADA

La muestra estudiada presenta unas distribuciones respecto al sexo, que queda reflejada en la tabla siguiente:

Tabla 7. Frecuencia y porcentaje en función del sexo.

Sexo	Frecuencia	Porcentaje
Niños	8418	51,1
Niñas	8065	48,9
Total	16483	100,0

Por edad gestacional la distribución queda reflejada de la siguiente forma:

Tabla 8. Frecuencia y porcentaje en función de la edad gestacional.

Edad gestacional	Frecuencia	Porcentaje
≤ 32	177	1,1
$> 32 \leq 37$	1893	12
> 37	13780	86,9
Total	15850	100,0

En función del origen étnico de la madre las muestras quedan distribuidas del siguiente modo:

Tabla 9. Frecuencia y porcentaje en función del origen étnico materno.

Origen	Frecuencia	Porcentaje
España	12702	77,1
Resto Europa	1318	8,0
Latinoamérica	1017	6,2
África N	1054	6,4
África S	104	0,6
Asia	285	1,7
Total	16480	100,0

5.2. ESTUDIO DE LAS MUESTRAS NORMALES

De la muestra total estudiada $n=16.483$, se ha encontrado que el 98,8% de las muestras analizadas no requieren un análisis posterior y salen del programa de cribado neonatal como normales según el diagrama de flujo y 1.2% requieren un análisis pormenorizado de las anomalías en las Hb encontradas, al poseer valores de las Hb anormales igual o superior al 1%. Como ejemplo, se presenta un cromatograma de una muestra de sangre normal (Figura 8) y los porcentajes de las Hb encontradas en la misma (Tabla 10).

PERCENTILES DE NORMALIDAD DE LAS HEMOGLOBINAS NEONATALES.

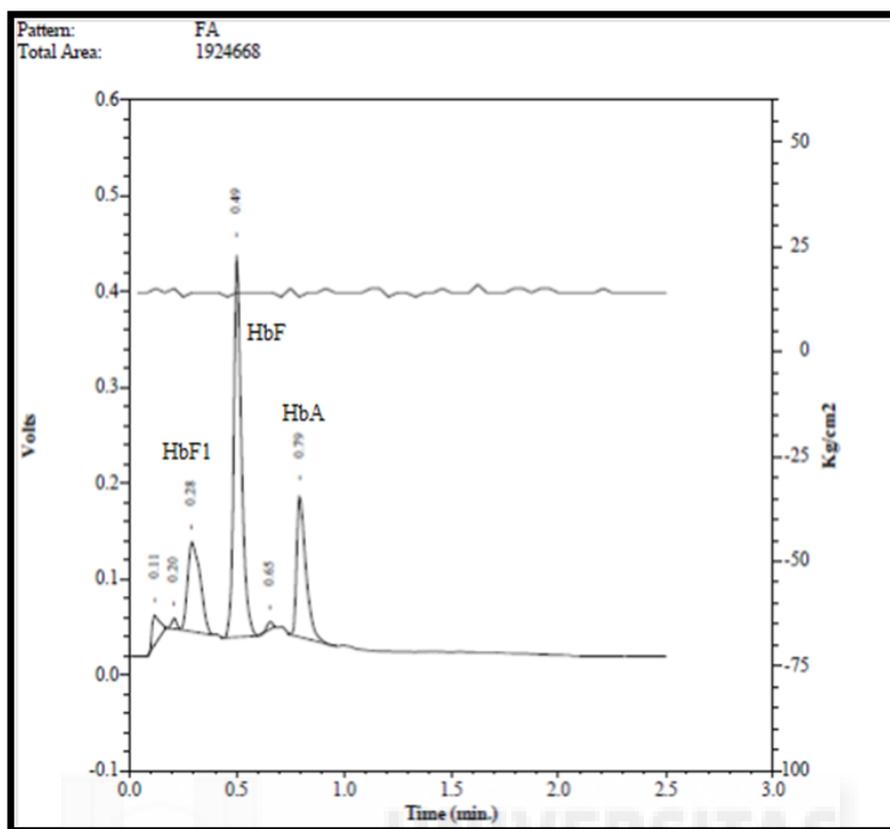


Figura 8. Cromatograma muestra neonatal normal: perfil FA.

Tabla 10. Representación de los parámetros y %Hb del perfil cromatográfico FA.

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.111	33811	85674	4.5
2	Unknown	0.200	11023	16942	0.9
3	F1	0.284	93602	378671	19.7
4	F	0.494	404795	992579	51.6
5	Unknown	0.648	8987	18255	0.9
6	A	0.786	149268	432547	22.5

5.2.1. Porcentajes de las hemoglobinas normales en grupo control:

- **Distribución de los porcentajes de Hb F1**

Se puede observar, tras la aplicación de la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,000$) con una media de 19,5 y una desviación estándar de 3,3, que los valores de los porcentajes F1 no presentan una distribución normal.

La distribución queda reflejada en la siguiente figura:

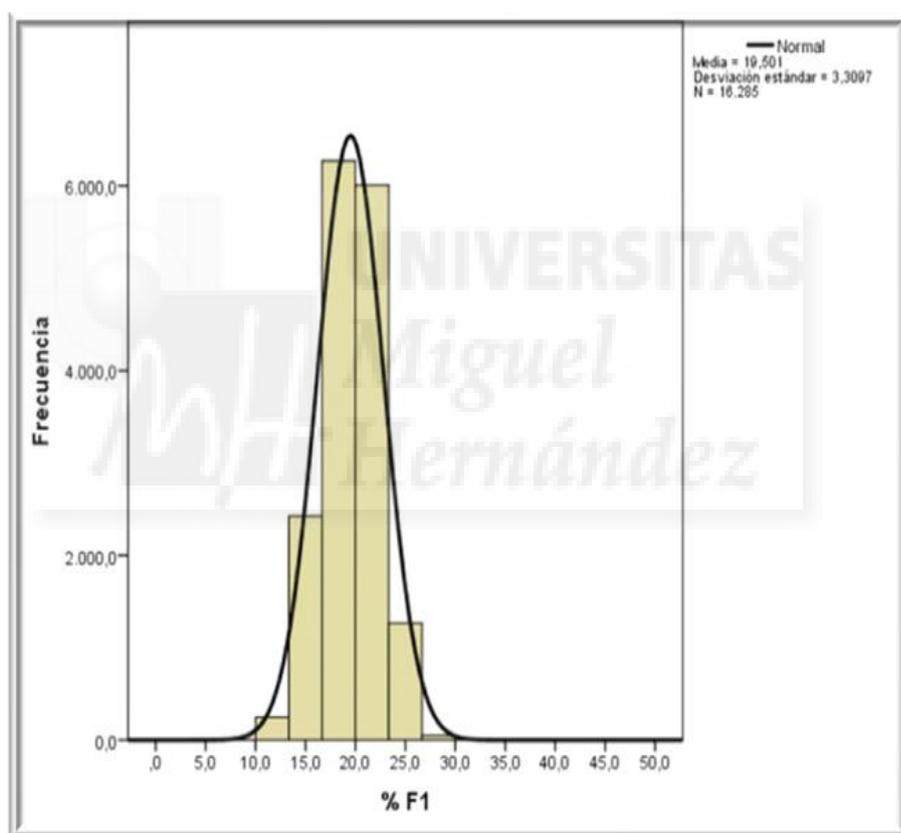


Figura 9. Distribución de los valores de F1 en el grupo control (n= 16286).

- **Proporciones de F**

Los valores de porcentajes de F no presentan una distribución normal según la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,0000$) con una media de 57,2 y desviación estándar de 9,3. Quedando la distribución de F reflejada en la siguiente figura:

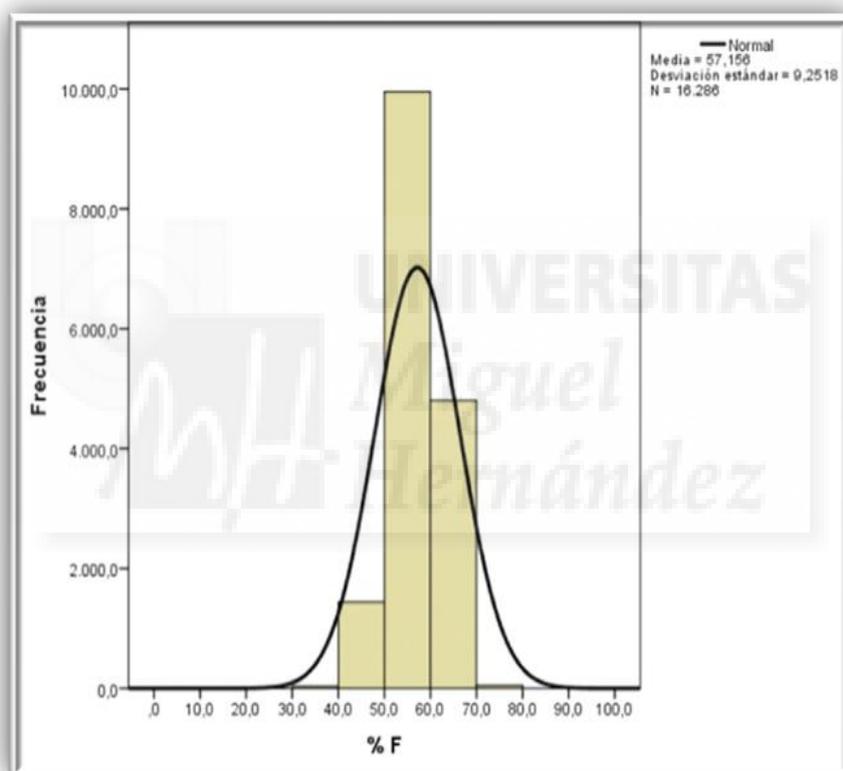


Figura 10. Distribución de los valores de F en el grupo control (n= 16286).

- **Proporciones de A**

Tras la aplicación de la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,000$) con una media de 17,4 y una desviación estándar de 6,3, se puede afirmar que los valores de los porcentajes A no presentan una distribución normal. Quedando reflejada la distribución en la siguiente figura:

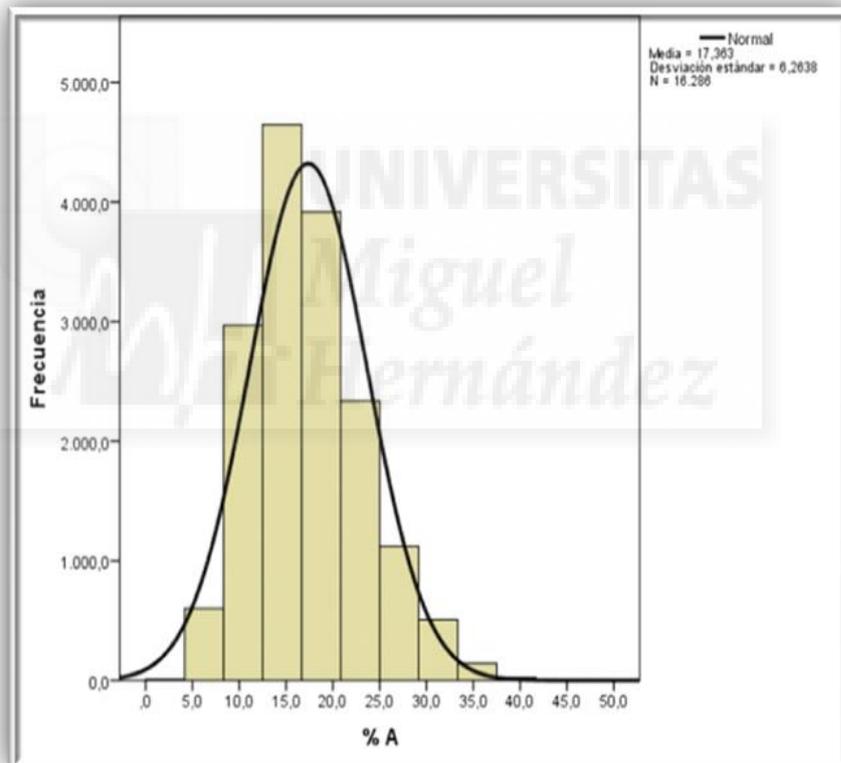


Figura 11. Distribución de los valores de A en el grupo control (n=16286).

Atendiendo a la distribución las citadas hemoglobinas se puede presentar la siguiente tabla, la cual refleja la media y la desviación estándar, junto a la mediana, los mínimos y los máximos de ellas en ausencia de formas anómalas:

Tabla 11. Distribución de % F1, % F y % A en ausencia de formas anómalas.

Hb	Media	SD	Mediana	Mínimo	Máximo
% F1	19,5	2,8	19,6	3,7	37,1
% F	57,0	5,2	57,3	19,8	77,6
% A	17,3	6,0	16,6	2,5	52,1

Se puede observar como tipo predominante de hemoglobina en el neonato el F, seguido del F1 y como minoritario el tipo A.

Calculando los percentiles para el total de las muestras normales se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 12. Percentiles de los valores de % F1, % F y % A en ausencia de formas anormales.

Hb	Percentiles						
	5	10	25	50	75	90	95
% F1	14,8	15,8	17,5	19,6	21,5	23,1	24,0
% F	48,0	50,2	53,7	57,3	60,7	63,4	65,1
% A	8,8	10,3	13,0	16,6	21,0	25,5	28,5

La aplicación los percentiles de normalidad obtenidos, explica el motivo de la necesidad de rechazo de aquellas muestras de pacientes sometidos a transfusión sanguínea.

Con estos valores de normalidad es posible distinguir con facilidad, e incluso automatizar la exclusión de recién nacidos a los que se les ha realizado una transfusión de sangre, que supone una muestra no válida, aunque no lo hayan hecho constar en la ficha informatizable recogida en el momento de la extracción de muestra.

Como ilustración se presenta el cromatograma de un recién nacido al que se le ha realizado dicha transfusión (Figura 12). En la tabla de percentiles de las distintas hemoglobinas de la muestra analizada (Tabla 12), se observa como los valores de HbA de 51,6% están claramente por encima de los percentiles de normalidad. Para mayor seguridad, se observa también que el valor de HbF es de 23,2%, muy inferior al percentil 5 de los valores de normalidad, así como el de HbF1 de 9,4% también inferior al percentil 5 de normalidad.

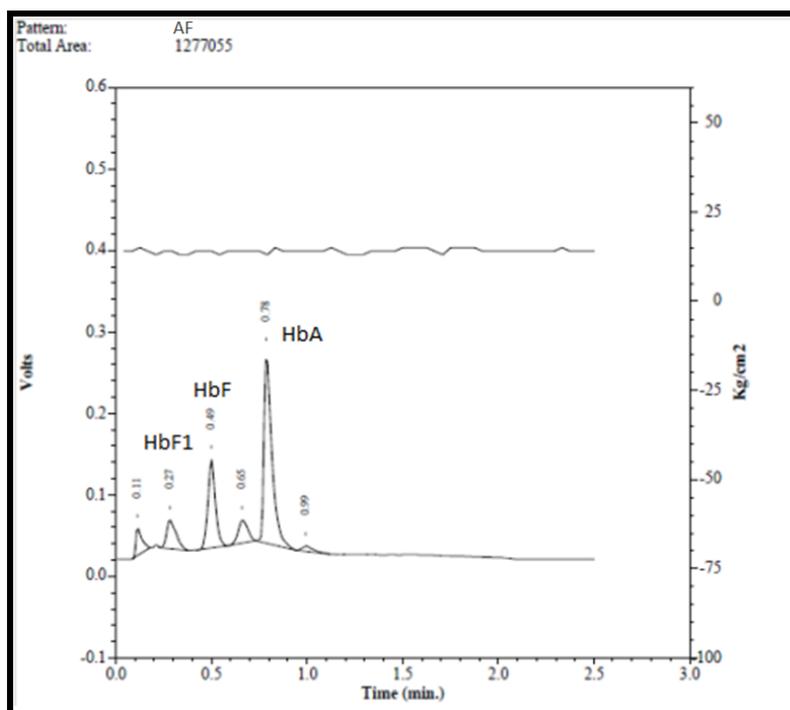


Figura 12. Cromatograma de patrón AF (post-transfusión).

Tabla 13. Representación de los parámetros y % de Hb del perfil cromatográfico AF.

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.107	33758	79068	6.2
2	F1	0.273	34909	119467	9.4
3	F	0.491	108658	295964	23.2
4	OTHER(1)	0.653	28441	99546	7.8
5	A	0.779	234184	659177	51.6
6	E/A2	0.986	6020	23832	1.9

Al comparar los Área % de F, F1 y A se observa claramente cómo sus valores quedan fuera del rango de los percentiles de normalidad obtenidos en el estudio, demostrándose así, que la exclusión de las muestras de neonatos sometidos a transfusión ha sido acertada.

5.2.1.1. Distribución de las hemoglobinas normales en función de la variable cuantitativa: EG

En base al estudio de las muestras según edad gestacional se observan en la siguiente tabla las distribuciones de los porcentajes de las Hb normales. Se estudian tres grupos: EG \leq 32, EG 32-37 y EG $>$ 37.

Aplicando nuevamente la prueba de Kurskal-Wallis para muestras independientes se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 14. Distribución de %F1, %F y %A en función de la EG.

Hb	EG \leq 32 (n=177)	EG = 32-37 (n=1893)	EG $>$ 37 (n=13780)	Kruskal-Wallis(p)
% F1	21,2 (3,5)	20,7 (2,8)	19,3 (2,8)	0,000
% F	60,9 (7,6)	61,2 (4,2)	56,5 (5,0)	0,000
% A	11,1 (8,3)	11,9 (4,1)	18,2 (5,7)	0,000

El resultado de la comparación entre los tres grupos estudiados es la existencia de diferencias muy significativas en función de la edad gestacional (p= 0,000).

Se aprecia cómo, a la vez que aumenta notablemente la presencia de hemoglobina A con la edad gestacional, disminuyen las hemoglobinas F1 y F. Cabe destacar la presencia de un ligero repunte en el %F en el grupo correspondiente a EG= 32-37, este hecho a priori no esperable será analizado en la discusión de los datos.

Un dato importante a tener en cuenta es que, pese a las diferencias tan significativas encontradas en los porcentajes de hemoglobinas neonatales estudiadas respecto de la edad gestacional, en todos los casos los resultados

obtenidos siguen estando comprendidos dentro de los percentiles de normalidad obtenidos en el presente estudio.

Se puede observar claramente en la siguiente tabla como se distribuyen los percentiles de normalidad en los tres grupos de edad gestacional estudiada:

Tabla 15. Comparativa entre los porcentajes de las diferentes Hb en función de EG y los percentiles de normalidad obtenidos.

Hb	EG ≤ 32 (n=177)	EG 32-37 (n=1893)	EG > 37 (n=13780)	Percentil	
				5	95
% F1	21,2 (3,5)	20,7 (2,8)	19,3 (2,8)	14.8	24.0
% F	60,9 (7,6)	61,2 (4,2)	56,5 (5,0)	48.0	65.1
% A	11,1 (8,3)	11,9 (4,1)	18,2 (5,7)	8.8	28.5

5.2.1.2. Distribución de las hemoglobinas normales en función de la variable cuantitativa días de vida:

A partir de los días de vida del recién nacido se obtienen dos subgrupos:

- ≤ 7 días: recién nacidos con siete días de vida como máximo.

- > 7 días: recién nacidos de más de siete días.

En la siguiente tabla se describe la distribución de las distintas hemoglobinas en función de los días de vida del recién nacido:

Tabla 16. Distribución de %F1, %F y %A en función de los días de vida.

Hb	≤ 7 días (n=15398)	> 7 días (n=363)	U Mann-Whitney (p)
% F1	19.4 (2.8)	19.4 (3.2)	ns
% F	57.0 (5.2)	57.8 (6.8)	0.000
% A	17.4 (5.9)	16.3 (7.8)	0.000

Aplicando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney se obtienen los datos contenidos en la última columna de la tabla.

Se observa cómo, para el caso concreto de la HbF1, no se han detectado diferencias ya que permanece constante entre los dos grupos estudiados. En los porcentajes de HbF y HbA si existen diferencias significativas, cabe destacar que los resultados esperables a priori son diferentes a los obtenidos.

Dada la evolución de los porcentajes de Hb estudiados anteriormente y conociendo cómo evolucionan los diferentes tipos de Hb tras el nacimiento, lo esperable en el grupo de > 7 días sería una menor proporción de HbF y HbF1, junto a una mayor proporción de HbA.

Los datos obtenidos no reflejan esta tendencia, la explicación de dicho fenómeno puede deberse a que la prematuridad puede contribuir a diferencias en los días de toma de la muestra. En estos casos de prematuridad, la toma de muestras se suele llevar a cabo unos días más tarde.

5.2.1.3. Distribución de las hemoglobinas normales de muestras obtenidas durante la primera semana, en función de la variable cuantitativa EG:

Se ha realizado el estudio homogenizando respecto a los días de vida en la toma de la sangre y respecto a la EG, tomando únicamente las muestras de sangre obtenidas durante la primera semana. Como resultado se obtienen las distribuciones de porcentajes de Hb representadas en las siguientes figuras:

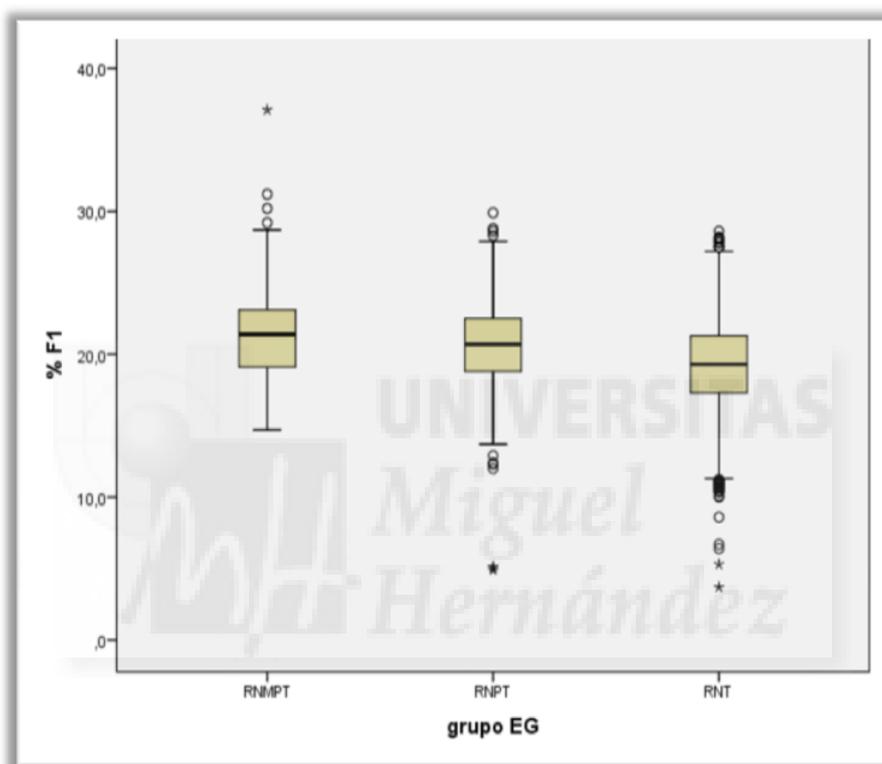


Figura 13. Distribución de % F1 de muestras obtenidas en la primera semana de vida neonatal en función de la EG.

Se puede apreciar gráficamente una clara tendencia a la disminución de los % HbF1 respecto de la EG en el grupo de neonatos de menos de 7 días de vida en la toma de muestra.

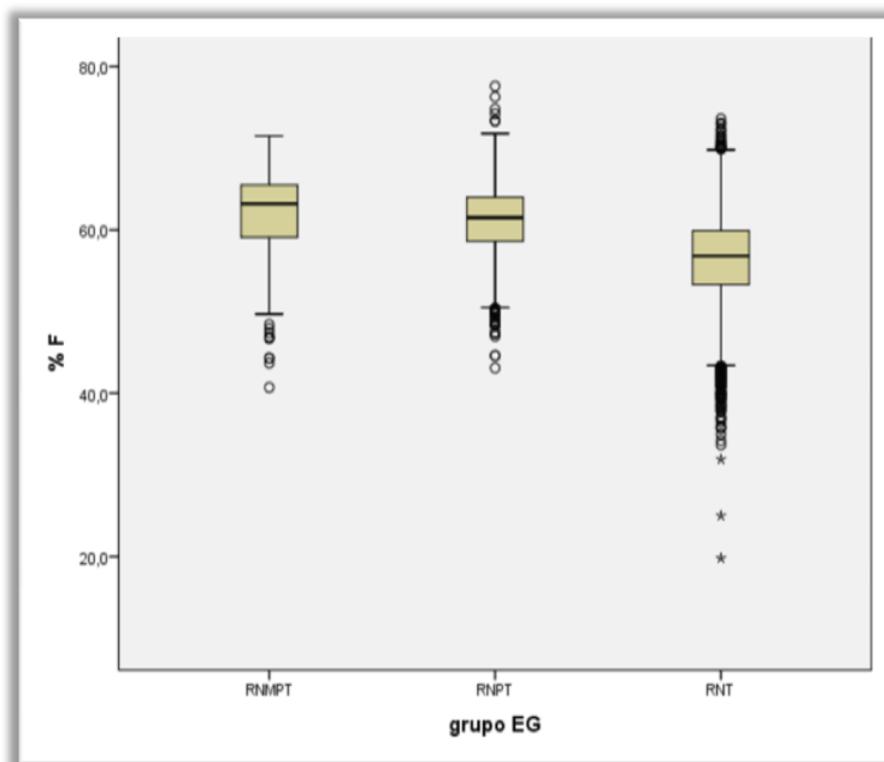


Figura 14. Distribución de % F de muestras obtenidas en la primera semana de vida neonatal en función de la EG.

Nuevamente se aprecia una clara tendencia a la disminución progresiva, en este caso de los % F en el grupo de muestras tomadas dentro de la primera semana tras el nacimiento.

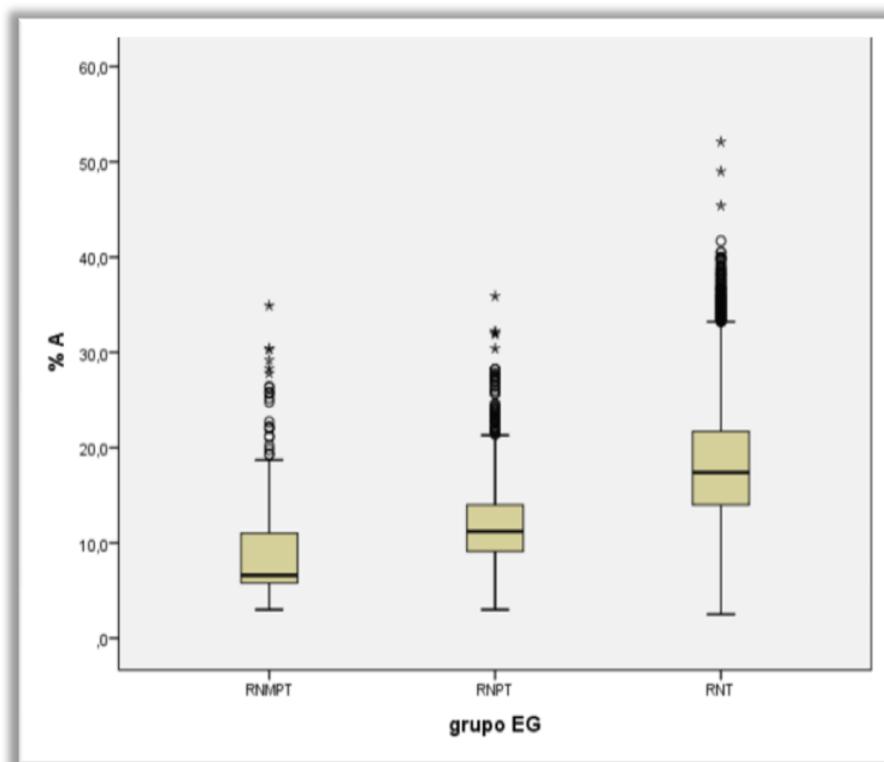


Figura 15. Distribución de % A de muestras obtenidas en la primera semana de vida neonatal en función de la EG.

En este caso se obtiene como resultado del estudio del %A respecto de la EG dentro de los primeros 7 días tras el nacimiento, un notable aumento del %A con el aumento de la misma.

Aplicando en los tres casos la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes obtenemos para todos ellos una $p= 0.000$, confirmando así la gran significación estadística existente.

Queda de este modo patente la fuerte relación inversa existente entre edad gestacional y la presencia de hemoglobinas fetales.

5.2.1.4. Distribución de las hemoglobinas normales de muestras obtenidas de recién nacidos a término, en función de la variable cuantitativa días de vida:

Con la finalidad de eliminar la posible influencia de la edad gestacional en los días a la toma de la muestra, se ha realizado el estudio de los subgrupos: neonatos de días de vida menor o igual a 7 y de días de vida mayor a 7 únicamente incluyendo aquellas muestras provenientes de recién nacidos a término.

Los resultados obtenidos se plasman en los siguientes diagramas y tabla:

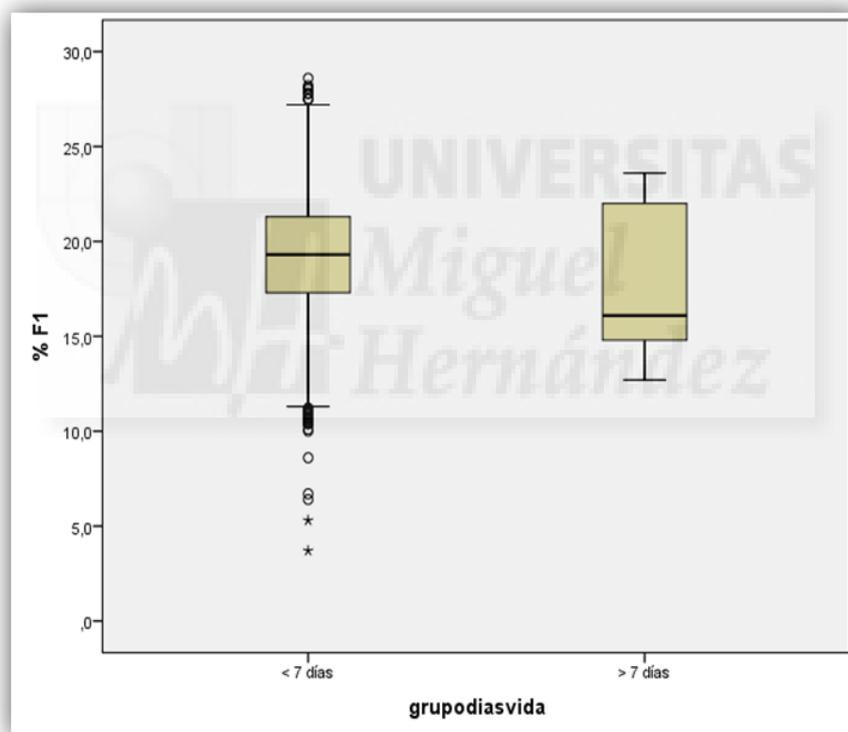


Figura 16. Distribución del %F1 en RNT en función de los días de vida.

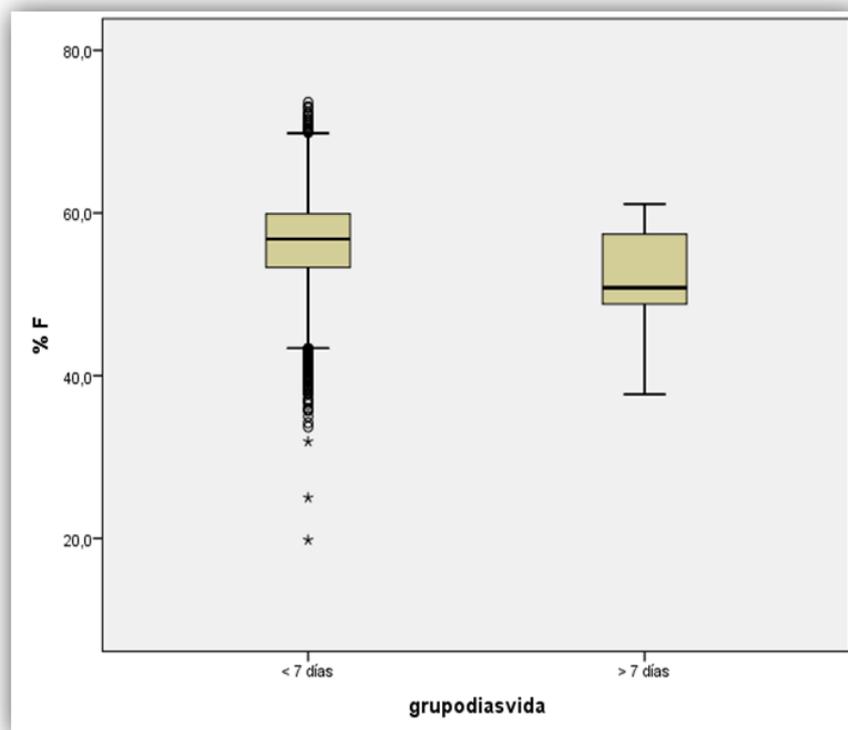


Figura 17. Distribución del %F en RNT en función de los días de vida.

Se observa notablemente una disminución progresiva de los %HbF1 y %HbF con el aumento de días de vida.

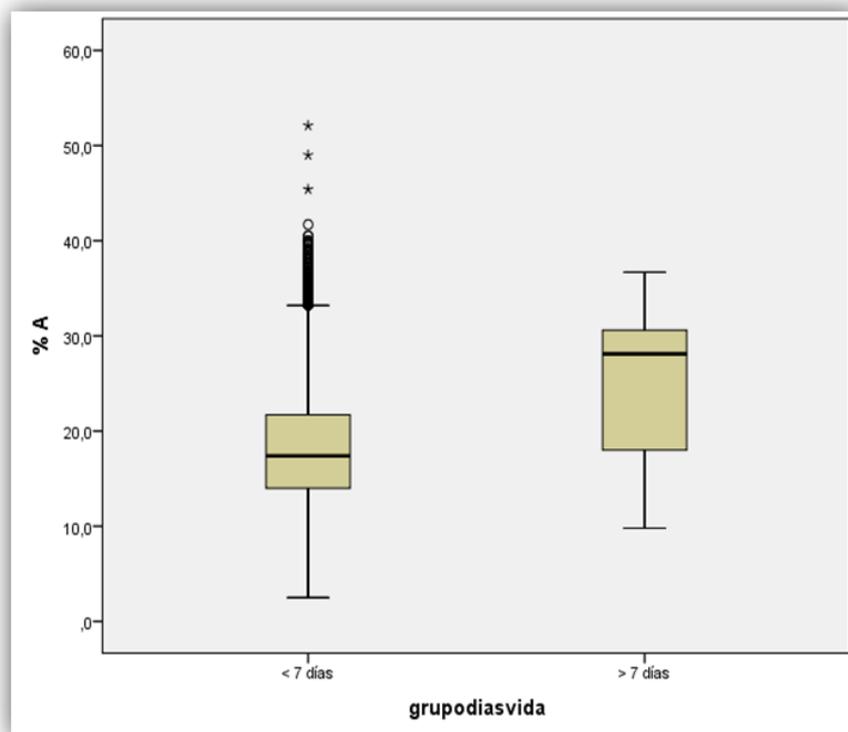


Figura 18. Distribución del %A en RNT en función de los días de vida.

Tras el estudio de las distribuciones de los diferentes tipos de Hb neonatales tanto en el grupo de neonatos con menos de 7 días de vida, como en el de más de 7 días, se pasa a evaluar las diferencias existentes o no entre ambos. Aplicando en este caso la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes obtenemos:

-En el estudio del %F1 $p= 0.07$, por tanto no existe significación estadística relevante.

-En la evaluación de %F se obtiene una $p= 0.004$, existiendo diferencias significativas en este caso.

-En el estudio de %A se ha alcanzado un valor de $p= 0.011$, existiendo nuevamente diferencias significativas entre los dos grupos de población estudiados.

5.2.1.5. Valores respecto a la variable cualitativa origen materno:

Se analiza la posible influencia del origen materno en los valores de las diferentes hemoglobinas neonatales, al no tratarse de distribuciones normales se realiza el estudio estadístico mediante test no paramétrico, encontrando valores que se expresan en la siguiente tabla:

Tabla 17. Distribución de Hb F1, F y A en función del origen materno en ausencia de Hb anómalas:

Origen	% F1	% F	% A
España (n=12607)	19.4 (2.8)	57.2 (5.2)	17.3 (6.0)
Resto de Europa (n=1305)	19.9 (2.7)	56.9 (5.1)	16.8 (5.6)
Latinoamérica (n=989)	19.2 (2.9)	56.7 (5.5)	18.0 (6.3)
África Norte (n=1021)	19.6 (2.8)	56.1 (5.4)	18.0 (6.1)
África Sur (n=82)	18.9 (3.0)	56.9 (5.7)	18.0 (6.6)
Asia (n=278)	18.9 (2.7)	56.3 (4.9)	16.8 (5.7)
Kruskal-Wallis (p)	0,000	0,000	0,000

Tras la aplicación del test de Kruskal-Wallis se obtienen para los tres tipos de Hb presentes en el neonato, diferencias muy significativas. Dejando patente la importancia del origen étnico en la distribución de hemoglobinas expresada por el neonato en sus primeros días de vida.

Expresando los anteriores valores en diagramas se obtienen las siguientes representaciones:

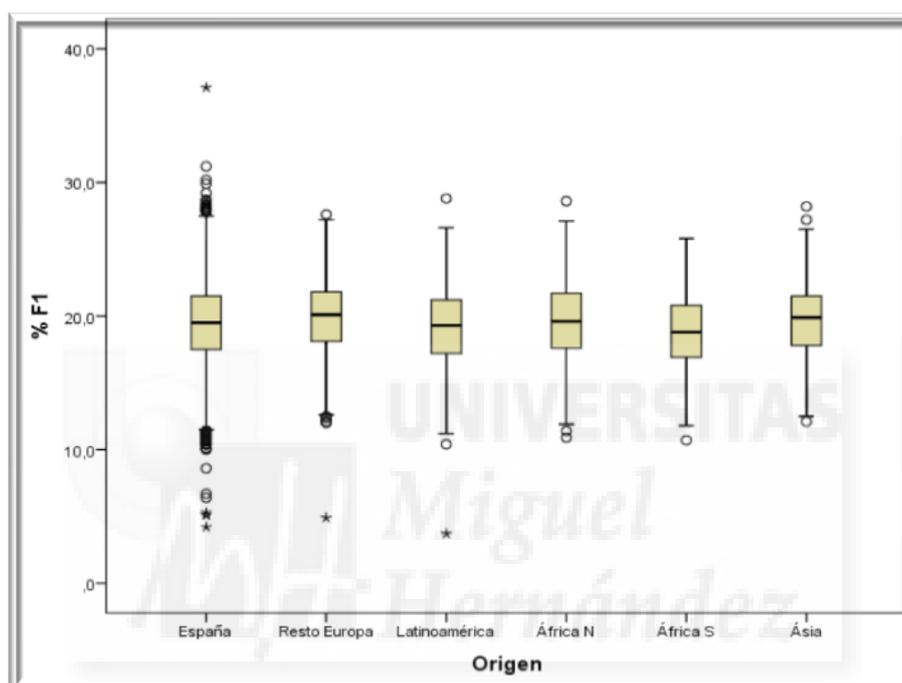


Figura 19. Distribución de HbF1 en función del origen materno en sangre de recién nacidos sin alteraciones en hemoglobinas.

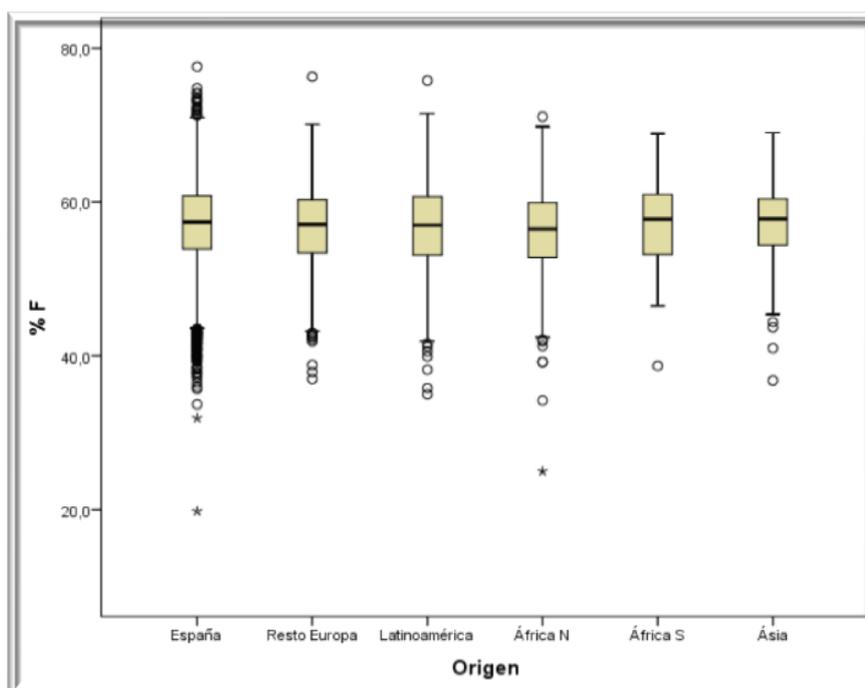


Figura 20. Distribución de HbF en función del origen materno en sangres de recién nacidos sin alteraciones en hemoglobinas.

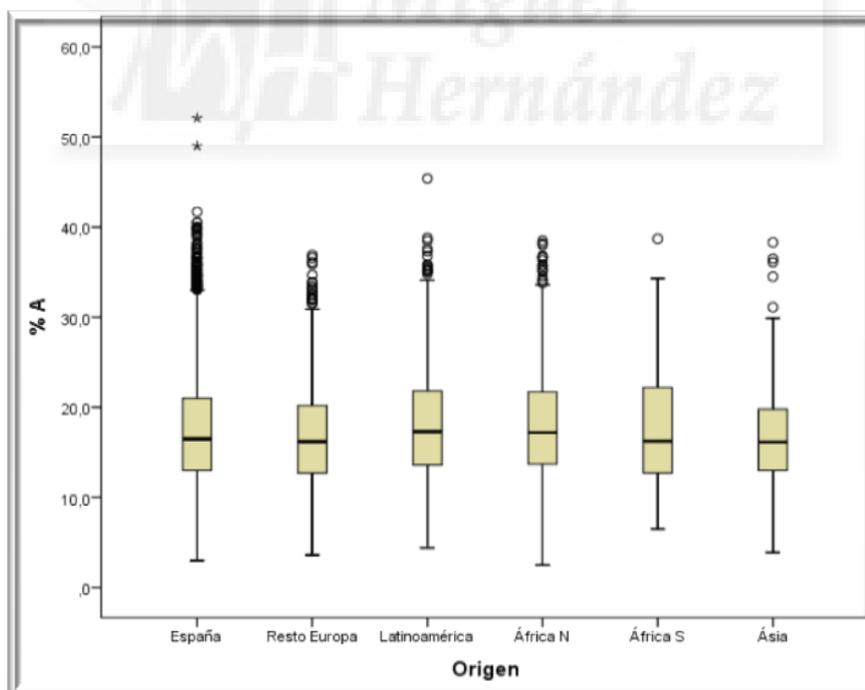


Figura 21. Distribución de HbA en función del origen materno en muestras de recién nacidos sin alteraciones hemoglobínicas.

5.3. ESTUDIO DE LOS PORTADORES ENCONTRADOS:

Los recién nacidos homocigotos o heterocigotos combinados son escasos, en el presente estudio, durante el tiempo de recogida de muestras únicamente se diagnosticó un enfermo FSS, lo cual da una incidencia de drepanocitosis en la provincia de Alicante de 1/16483, aunque dicha incidencia para ser corroborada es necesaria la recopilación de una muestra mucho mayor. Por ello, para obtener factores de riesgo es necesario estudiar los portadores sanos.

Partiendo del total de las muestras incluidas en el presente estudio (n= 16483) se obtienen cinco subconjuntos, un subgrupo de sanos no portadores y cuatro subgrupos con alguna de las alteraciones estudiadas en la hemoglobina.

La división se realiza en función de la ausencia o presencia de hemoglobinas anormales y, en este último caso, de cuál de ellas esté presente. A continuación se presenta cada uno de los subconjuntos acompañados por:

-Una figura, la cual representa el perfil cromatográfico de cada uno de ellos. En cada cromatograma se puede observar a diferentes tiempos de retención, la presencia de diferentes picos, correspondiente cada uno de ellos a un tipo de Hb diferente.

-Una tabla en la cual se representan las diferentes informaciones referentes al cromatograma, como el nombre del pico, el tiempo de retención, el peso, el área y el área%, la cual equivale al porcentaje de Hb a la cual corresponda.

-N: neonatos no portadores hemoglobinas anómalas:

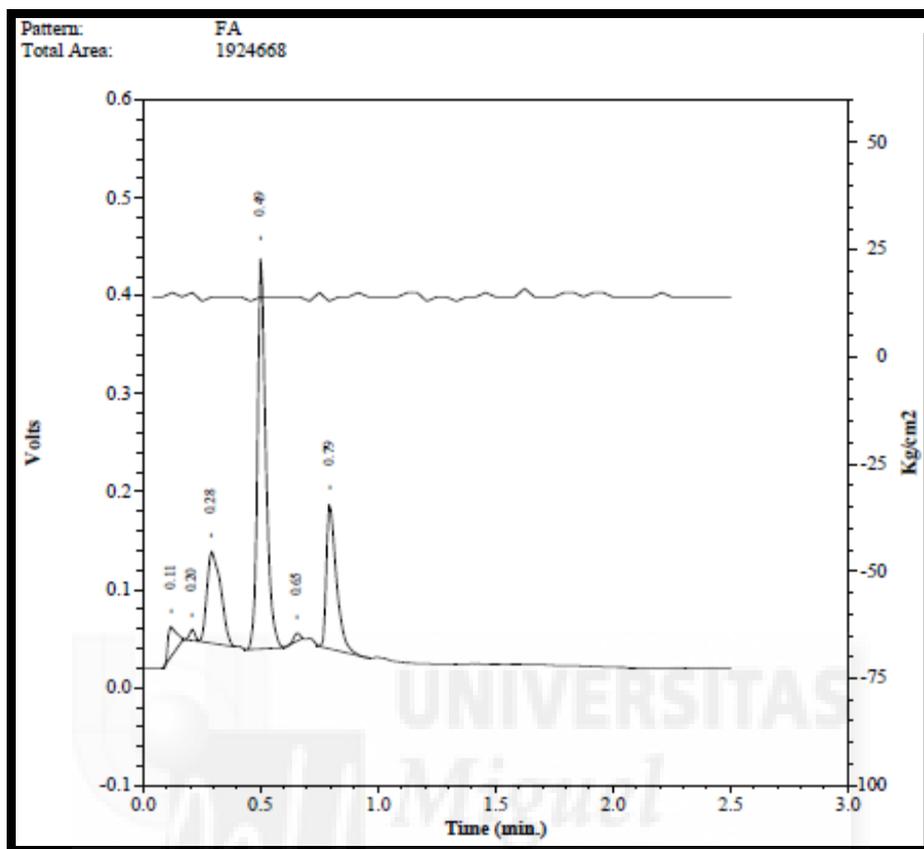


Figura 22. Cromatograma perfil FA.

Tabla 18. Representación de los parámetros y % de Hb del perfil cromatográfico FA.

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.111	33811	85674	4.5
2	Unknown	0.200	11023	16942	0.9
3	F1	0.284	93602	378671	19.7
4	F	0.494	404795	992579	51.6
5	Unknown	0.648	8987	18255	0.9
6	A	0.786	149268	432547	22.5

-C: neonatos portadores de hemoglobina C: a continuación se presenta un cromatograma en el que se observa el pico relativo a la HbC y sus porcentajes en la tabla correspondiente:

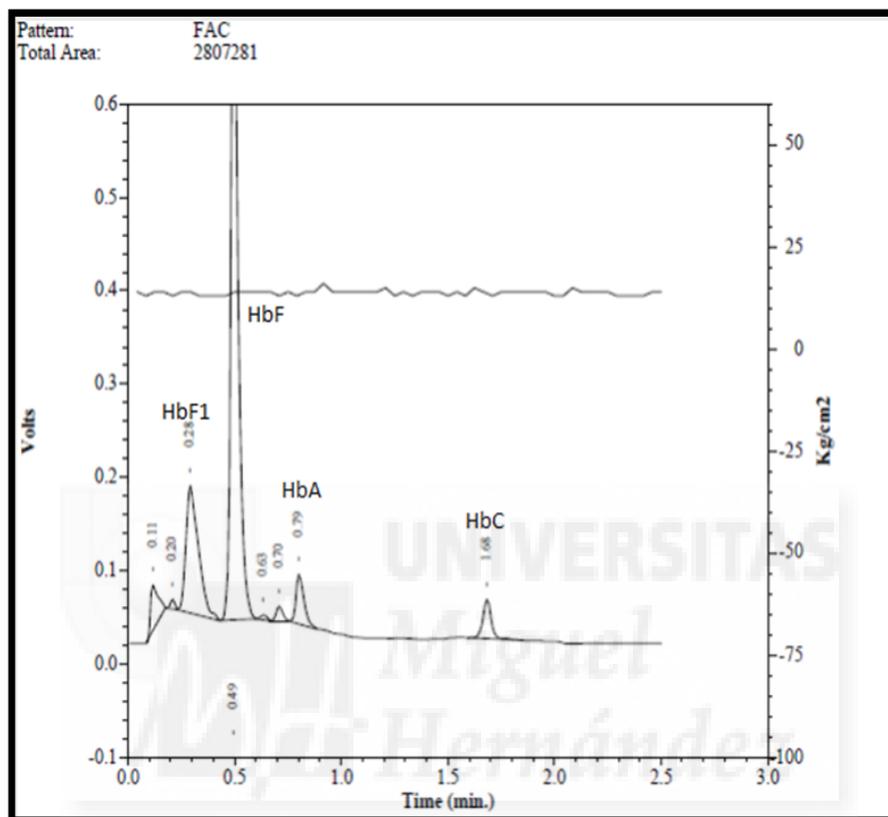


Figura 23. Cromatograma perfil FAC.

Tabla 19. Representación de los parámetros y % de Hb del perfil cromatográfico FAC.

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.109	51396	135839	4.8
2	Unknown	0.199	10026	14083	0.5
3	F1	0.282	136277	549933	19.6
4	F	0.487	796275	1817798	64.8
5	Unknown	0.627	4925	9748	0.3
6	OTHER(1)	0.700	15379	32429	1.2
7	A	0.793	52877	136430	4.9
8	C	1.675	41993	111021	4.0

-D: neonatos portadores de hemoglobina D. Como muestra se presenta un cromatograma en el que se observa el pico relativo a la HbD y sus porcentajes en la tabla correspondiente:

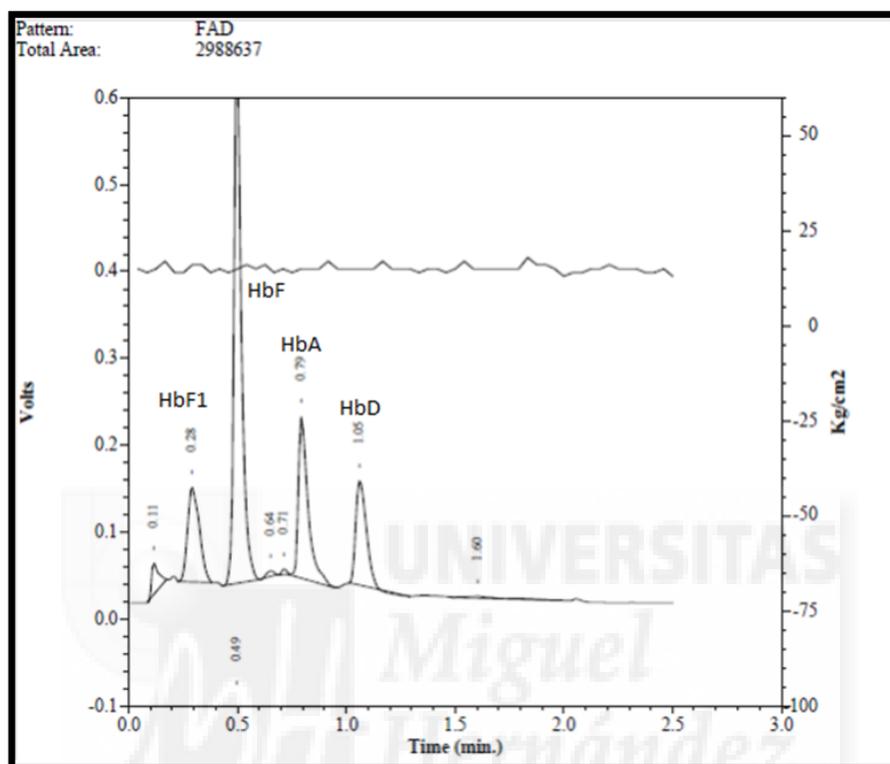


Figura 24. Cromatograma perfil FAD.

Tabla 20. Representación de los parámetros y % de Hb del perfil cromatográfico FAD.

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.108	38065	91317	3.1
2	F1	0.281	109286	412617	13.8
3	F	0.488	621915	1466521	49.1
4	Unknown	0.644	6921	17816	0.6
5	OTHER(1)	0.705	6600	10479	0.4
6	A	0.785	186341	565805	18.9
7	D	1.053	120439	409318	13.7
8	OTHER(S)	1.596	1927	14765	0.5

-E: neonatos portadores de hemoglobina E. Como muestra se presenta un cromatograma en el que se observa el pico relativo a la HbE y sus porcentajes en la tabla correspondiente:

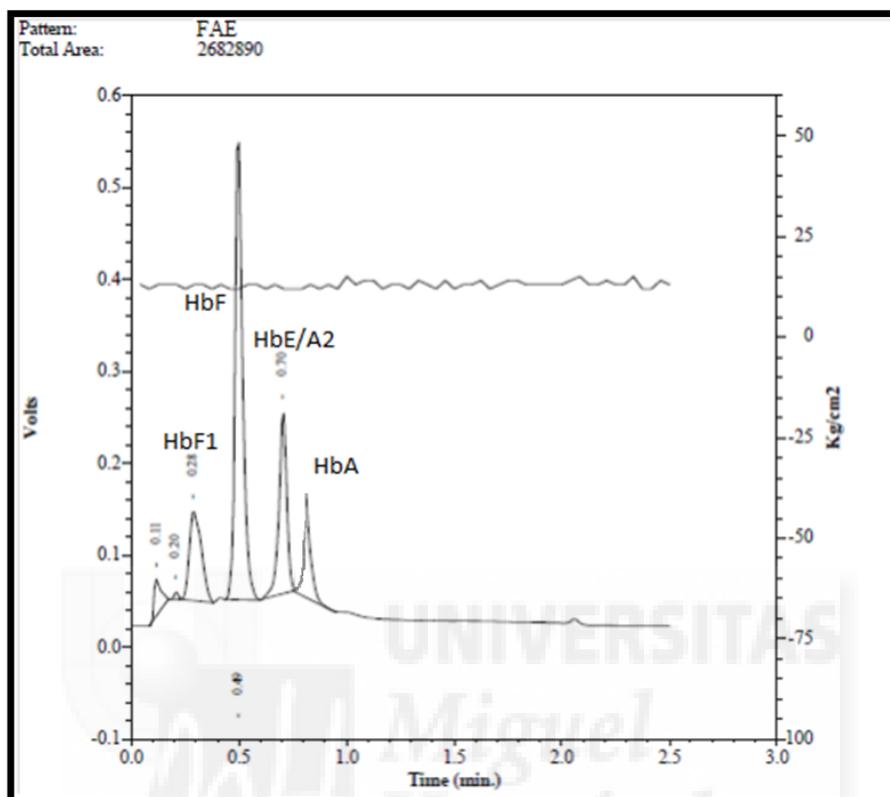


Figura 25. Cromatograma perfil FAE.

Tabla 21. Representación de los parámetros y % de Hb del perfil cromatográfico FAE.

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.109	42133	101595	3.8
2	Unknown	0.199	7662	10694	0.4
3	F1	0.280	97063	379132	14.1
4	F	0.488	508589	1240177	46.2
5	OTHER(1)	0.697	200015	505547	18.8
6	A	0.786	177860	445745	16.6

-S: neonatos portadores de hemoglobina S. Como muestra se presenta un cromatograma en el que se observa el pico relativo a la HbS y sus porcentajes en la tabla correspondiente, así como de un homocigoto S en la figura siguiente, en la que se observa la ausencia total de HbA.

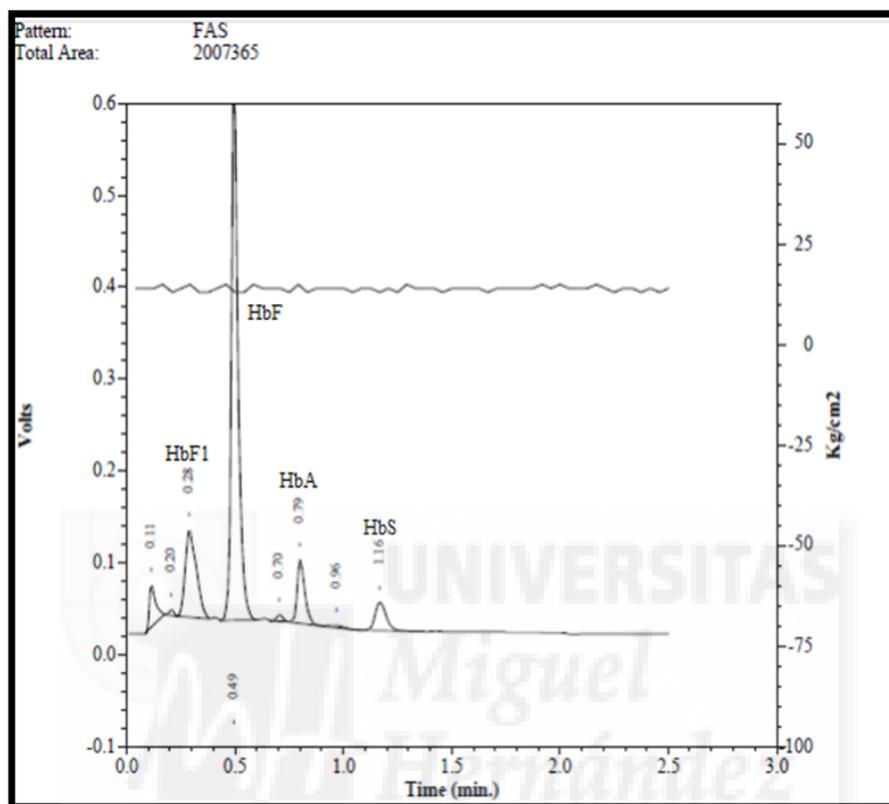


Figura 26. Cromatograma perfil FAS.

Tabla 22. Representación de los parámetros y % de Hb del perfil cromatográfico FAS.

El análisis de las muestras obtenidas da una clara predominancia de los casos de no portadores como era de esperar, siendo en porcentaje el 98,8%. El 1,2% restante corresponde al conjunto de los portadores, siendo el grupo más relevante el correspondiente a los portadores E y el menos prevalente el correspondiente al de portadores D.

Se expresen la frecuencia y porcentajes de cada uno de ellos en la siguiente tabla:

Tabla 24. Frecuencia y porcentaje de muestras normales y con Hb anormales C, D, S y E $\geq 1\%$.

Subgrupo	Frecuencia	Porcentaje
N	16288	98,8
C	47	0,3
D	12	0,1
E	94	0,6
S	42	0,3
Total	16483	100,0

Se observa una clara predominancia de portadores E dentro de los neonatos portadores de Hb anómalas, los siguientes grupos predominantes son el correspondiente a los portadores C, seguido muy de cerca por el correspondiente a Hb S y, por último, el grupo minoritario es el que incluye a los portadores de Hb D.

Es ilustrativo llevar los datos anteriores a un diagrama de barras donde sea más cómoda la comparación de la probabilidad de presentación de cada una de las alteraciones analizadas entre los recién nacidos (Figura 28):

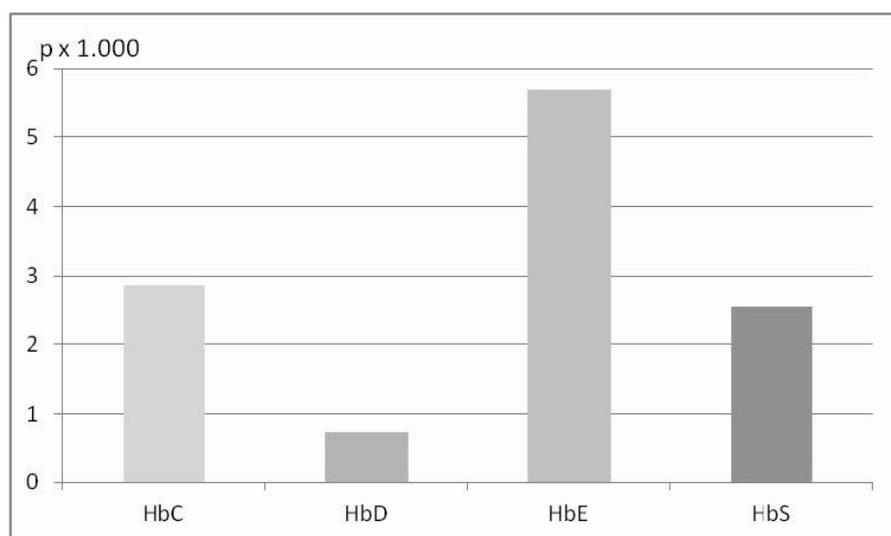


Figura 28. Probabilidad de presencia de portadores de las diferentes Hb anómalas analizadas entre los recién nacidos.

Llama la atención el alto porcentaje de portadores E, por lo que se procede a un estudio caso a caso de los filiados como tales.

5.3.1. Porcentajes de las distintas hemoglobinas en los niños portadores analizados:

De la misma manera que se ha obtenido la media y desviación estándar para las hemoglobinas F1, F y A, en ausencia de formas anómalas de hemoglobina, se ha llevado a cabo el cálculo de los mismos parámetros en presencia de las Hb anómalas.

Se obtienen de este modo medias y desviaciones estándar específicas para cada uno de los casos:

Tabla 25. Distribución de % F1, % F y % A en los diferentes grupos de portadores frente al grupo control de normalidad (media y SD).

Hb	Normal (n=16288)	Portador C (n=47)	Portador D (n=12)	Portador E (n=94)	Portador S (n=42)	Kruskal- Wallis(p)
% F1	19,5 (2,8)	20,9 (2,8)	18,7 (4,2)	13,2 (4,0)	19,2 (2,6)	0,000
% F	57,0 (5,2)	57,0 (5,5)	55,6 (5,4)	38,5 (9,2)	57,3 (5,0)	0,000
% A	17,3 (6,0)	10,8 (5,3)	12,2 (4,9)	39,0 (11,5)	10,6 (3,7)	0,000

Se aplica la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes con la finalidad de demostrar si los porcentajes de las hemoglobinas F1, F y A entre los distintos portadores son iguales. El resultado obtenido refleja que las diferencias entre las tres son muy significativas ($p= 0,000$).

El perfil de los neonatos no portadores se repite para la mayoría de los portadores, siendo la hemoglobina mayoritaria la del tipo F, seguida por la F1 y por último la A.

La excepción es el caso de los portadores E. En dicho grupo el %A supera el calculado previamente para el percentil 95, lo que parece improbable dada la secuencia neonatal de producción de las distintas Hb, por ello se reevaluaron los datos de aquellas muestras, filiadas previamente como portadores E, al ser su porcentaje de HbE $\geq 1\%$.

Al comprobar dichos datos, 89 muestras superaron el 28.5% de HbA (correspondiente al percentil 95), por lo que en principio podrían ser clasificados como transfusiones no constatadas. Eliminados dichos casos, se procedió a calcular las medias correspondientes para las tres Hb neonatales. Y

realmente el número de portadores E, pasaría a ser un número mucho menor, exactamente un total de 5.

Tras esta exclusión, se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 26. Distribución de % F1, % F y % A en los diferentes grupos de portadores frente al grupo control de normalidad una vez eliminadas las posibles transfusiones filiadas como portadores E (media y SD).

Hb	Normal (n=16288)	Portador C (n=47)	Portador D (n=12)	Portador E (n=5)	Portador S (n=42)	Kruskal- Wallis(p)
% F1	19,5 (2,8)	20,9 (2,8)	18,7 (4,2)	16,0 (4,0)	19,2 (2,6)	0,000
% F	57,0 (5,2)	57,0 (5,5)	55,6 (5,4)	60,7 (9,2)	57,3 (5,0)	0,000
% A	17,3 (6,0)	10,8 (5,3)	12,2 (4,9)	11,0 (11,5)	10,6 (3,7)	0,000

Realizando una tabulación cruzada entre los diferentes grupos étnicos se obtiene la distribución de portadores de las diferentes hemoglobinas en función de los mismos para las 16480 muestras de neonatos que contenían este dato reflejado.

Tabla 27. Tabulación cruzada del origen de los portadores.

Origen	Portadores				
	N	C	D	E	S
España	12608	14	8	3	12
Resto Europa	1306	1	0	1	2
Latinoamérica	990	5	0	0	10
África N	1021	20	2	0	5
África S	82	7	0	0	13
Asia	278	0	2	1	0

Para poder observar de una forma más clara la prevalencia de cada uno de los tipos de hemoglobina en función del origen étnico, se ha transformado la tabla anterior, en una expresada en porcentajes. De forma que se obtiene para cada tipo de hemoglobina, el porcentaje del total de casos estudiados que supone para un determinado origen:

Tabla 28. Tabulación cruzada en porcentajes del origen de los portadores.

Origen	% N	% C	% D	% E	% S
España	99.25	0.11	0.06	0.02	0.09
Resto Europa	99.09	0.08	0.00	0.08	0.15
Latinoamérica	97.34	0.49	0.00	0.00	0.98
África N	96.87	1.89	0.18	0.00	0.47
África S	78.84	6.73	0.00	0.00	12.5
Asia	97.54	0.00	0.70	0.35	0.00

Aplicando el test paramétrico Chi cuadrado se obtienen como resultado la presencia de diferencias muy significativas de distribución de las diferentes Hb entre los orígenes de las madres ($p=0,000$). Estas diferencias se ilustran en las figuras siguientes:

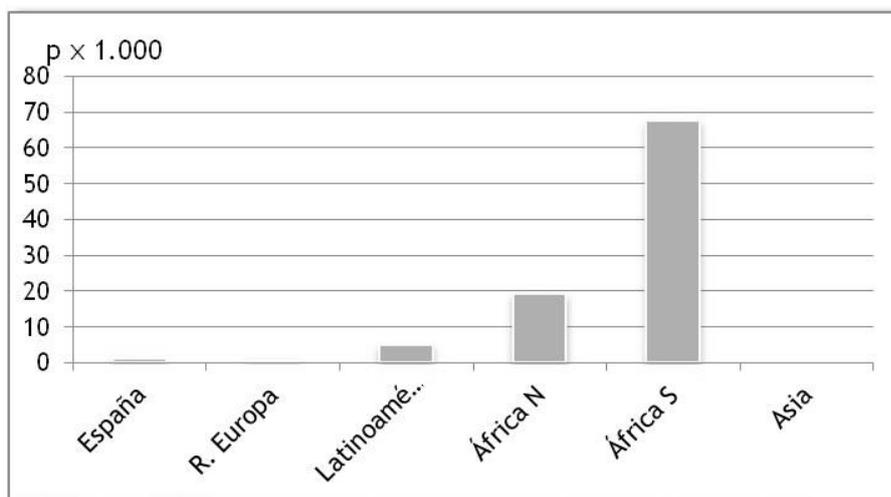


Figura 29. Probabilidad de presencia de un portador de HbC en los recién nacidos según el origen materno.

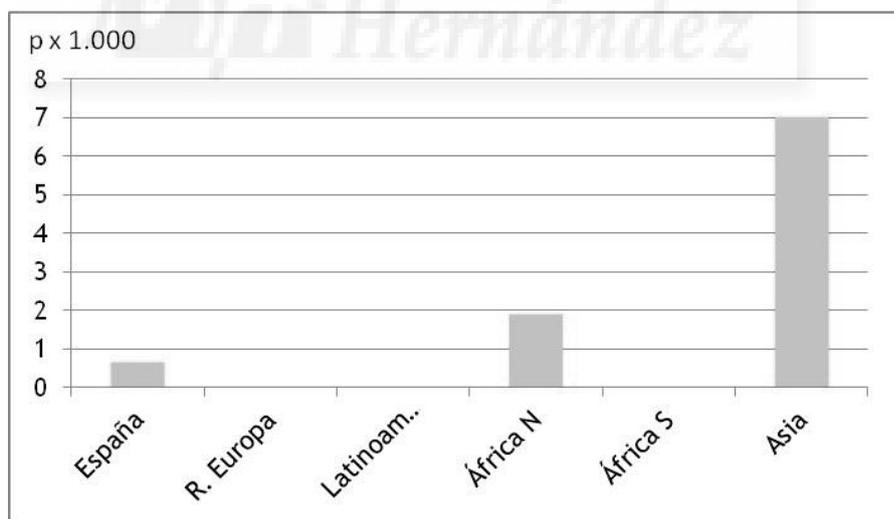


Figura 30. Probabilidad de presencia de un portador de HbD en los recién nacidos según el origen materno.

PERCENTILES DE NORMALIDAD DE LAS HEMOGLOBINAS NEONATALES.

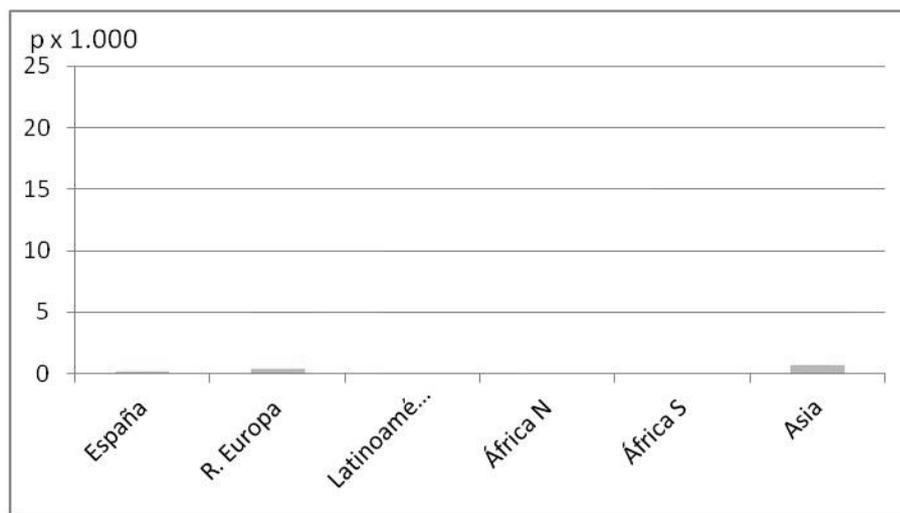


Figura 31. Probabilidad de presencia de un portador de HbE en los recién nacidos según el origen materno.

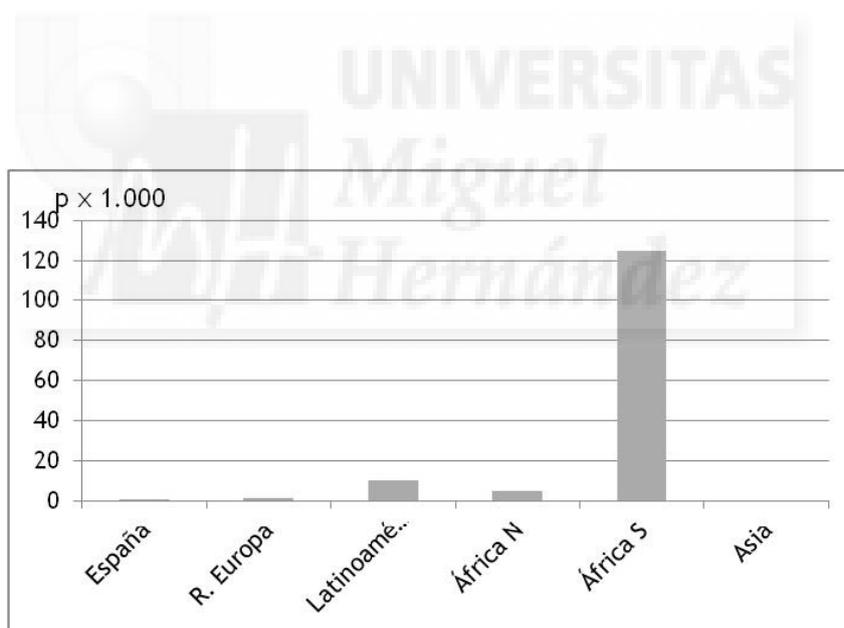


Figura 32. Probabilidad de presencia de un portador de HbS en los recién nacidos según el origen materno.

En conjunto, la probabilidad de presentar una hemoglobina anormal entre los recién nacidos según el origen de las madres está representado en la figura siguiente:

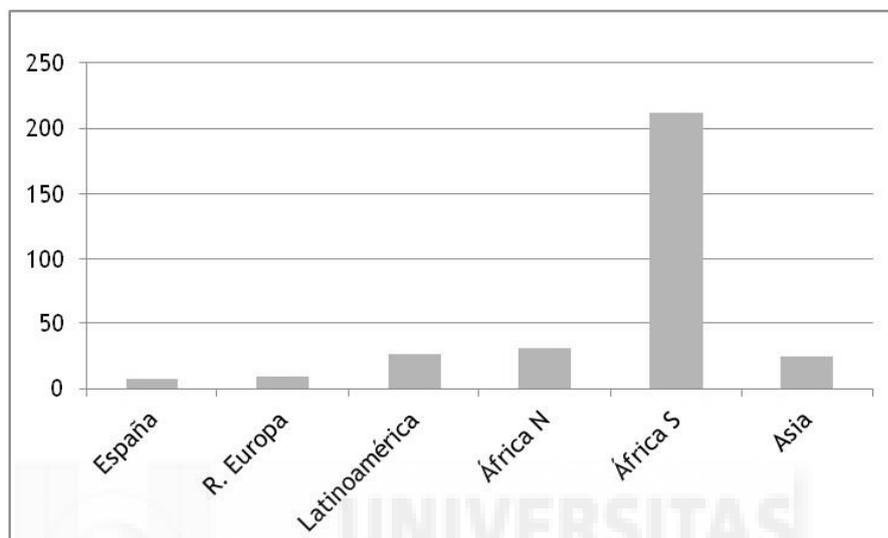


Figura 33. Probabilidad de presencia de un portador de cualquier de las Hemoglobinas anómalas analizadas en los recién nacidos según el origen materno.

A partir de esta distribución se calculan las OR de cada una de las mutaciones respecto a su presencia en la población de madres españolas.

La finalidad es, en esta evaluación, comprobar en el resto de grupos étnicos cuanto mayor es la probabilidad de presentar una alteración hemoglobínica respecto del grupo de recién nacidos de madres españolas.

Tabla 29. Odds Ratio (OR) e Intervalo de Confianza al 95% (IC95%) de la presencia de las Hb anómalas en los recién nacidos de madres inmigrantes respecto a españolas.

Origen madre	C	D	E	S
Resto de Europa	0,7 (0,1-5,2) ns	---	1,4 (0,7-2,9) ns	1,6 (0,4-7,2) ns
Latinoamérica	4,5 (1,6-12,7) 0.001	---	---	10,6 (4,6-24,6) 0.000
África Norte	17,6 (8,9-35,0) 0.000	3,1 (0,7-14,6) ns	---	5,1 (1,8-14,6) 0.000
África Sur	76,9 (30,2-195,4) 0.000	---	---	166,6 (73,8-376,0) 0.000
Asia	---	11,3 (2,4-53,6) 0.000	3,8 (1,5-9,5) 0.002	---



6.DISCUSIÓN

PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



6. DISCUSIÓN

6.1. DISEÑO DE LA MUESTRA

Se ha llevado a cabo un estudio observacional descriptivo de los valores de las diferentes hemoglobinas neonatales obtenidas en el cribado neonatal de todos los recién nacidos en un año en la provincia de Alicante, desde su implantación en febrero de 2012.

Todas las muestras incluidas en el presente estudio cumplieron los criterios de inclusión y exclusión establecidos; además de ello, cumplieron los criterios de calidad preanalítica establecidos en la bibliografía (Espada, 2001; Ministerio de Sanidad, 2013). El proceso de recogida y procesamiento de muestras se llevó a cabo sin ninguna intervención ni modificación sobre las variables establecidas, únicamente procediendo al registro de los datos.

El estudio se realizó de una forma totalmente anónima, utilizándose únicamente los datos de las fichas del cribado neonatal con un carácter meramente estadístico. De esta forma se han obtenido los datos de un total de 16483 muestras, correspondiente a los recién nacidos en un periodo de 12 meses, correspondiente al intervalo del 15 de febrero de 2012 al 15 de febrero de 2013.

La toma de muestras se llevó a cabo en las consultas de enfermería pediátrica especializada de los hospitales en los que se lleva a cabo dicho procedimiento (Hospital General Universitario de Alicante, Hospital Universitario de San Juan, y Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy). En el caso de niños ingresados, la toma de muestras se ha realizado en las unidades de neonatos del centro correspondiente por personal altamente cualificado y con formación específica para dicha tarea, por lo que es muy poco frecuente que se

den el envío de muestras insuficientes, con una impregnación no válida, muestras de mala calidad o conservadas en condiciones no válidas.

En los casos en que la primera muestra recibida ha sido descartada por resultar no válida, se ha empleado la segunda muestra recibida. Dicha muestra es la que se solicita de forma rutinaria para el cribado neonatal de fenilcetonuria y fibrosis quística.

Se han estudiado algunas de las características que podrían influir en los porcentajes de las diferentes hemoglobinas neonatales como son el origen étnico materno, la edad gestacional y los días de vida del recién nacido.

En las muestras en las que se ha obtenido como resultado la presencia de una hemoglobina anómala en situación de homocigosis o bien heterocigosis combinada de rasgo falciforme, se ha realizado la recaptación del neonato por la unidad de cribado neonatal, se le ha practicado una nueva extracción sanguínea con la finalidad de la confirmación de los resultados. Una vez confirmados los mismos, tanto el tratamiento como seguimiento del recién nacido han sido realizados por las unidades de Hematología infantil dispuestas para ello.

Se ha partido de un total de 16483 muestras, las cuales se han dividido en grupos en función de la edad gestacional, el origen étnico materno y los días de vida, con la finalidad de analizar si dichos factores influyen en las variables a estudio (en este caso los porcentajes de los diferentes tipos de hemoglobina del neonato) y en qué sentido tiene lugar.

6.2. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

El análisis en las características de las muestras recogidas durante el periodo de estudio de la población de recién nacidos en la provincia de Alicante, refleja grandes similitudes entre la población estudiada y las características de poblaciones semejantes descritas en la bibliografía. A continuación se presentan algunas de las propiedades sometidas al estudio:

-Expresando en semanas la media de la edad gestacional: 39 semanas.

-La media de los días de vidas en la toma de muestra: 4.4 días.

-El origen étnico de la madre, se estudió llevando a cabo la división en seis subgrupos: España, resto de Europa, Norte de África, Sur de África, Asia y América latina. Obteniéndose los siguientes porcentajes:

Tabla 30. Porcentajes de los diferentes orígenes étnicos.

Origen	Porcentaje
España	77,1
Resto Europa	8,0
Latinoamérica	6,2
África N	6,4
África S	0,6
Asia	1,7
Total	100,0

Estos porcentajes se han comparados con los recogidos por el Programa de Cribado Neonatal de enfermedades congénitas de la Comunidad Valenciana en los que se obtuvo los siguientes porcentajes en el año 2012 y se plasman en la siguiente tabla:

Tabla 31. Comparación del porcentaje de recién nacidos en el presente estudio frente a los reportados para toda la Comunidad Valenciana en 2012.

Origen	C.V. 2012	Presente estudio
España	77.6	77,1
Resto Europa	7.9	8,0
Latinoamérica	6.6	6,2
África N	5.4	6,4
África S	0.8	0,6
Asia	1.6	1,7
Total	99.9	100,0

Se puede apreciar, que el sumatorio de los porcentajes de los diferentes grupos, en la columna de datos referente al citado documento, no corresponde al 100%. Ello es debido a que en el caso de los resultados correspondientes al conjunto de toda la comunidad durante 2012, existía un pequeño porcentaje de neonatos cuyo origen materno era Oceanía, grupo inexistente en el estudio actual según datos contenidos en las fichas de los pacientes.

Se observa que tanto los porcentajes de los diferentes orígenes étnicos maternos del presente estudio como los publicados para el año 2012, por el Programa de Cribado de la Comunidad Valenciana, son claramente

comparables, ya que los porcentajes obtenidos en ambos casos, ajustan casi a la perfección.

La distribución del total de las muestras respecto al sexo presenta homogeneidad. Únicamente se percibe una ligera predominancia del género masculino frente al femenino, no relevante para el estudio. La ligera predominancia del género masculino se ajusta a la descrita en estudios de años anteriores (Roldan, 2013; Rizo, 2013; Manero, 2012).

Respecto a la distribución de la muestra en función de la edad gestacional no se observa homogeneidad, encontrándose, como era de esperar un mayor porcentaje de RNT (86.9%), frente a un 11.9% de RNPT y un 1.1% de RNMPT. Estos datos distan sutilmente de los presentados en un estudio anterior, correspondiente al periodo de 2008-2011 en la provincia de Alicante, en el que se mostraban unas incidencias menores de RNPT (5.95%) y de RNMPT (1.08%) (Cortés, 2013; Rizo, 2013).

Comparando el total de prematuros del presente estudio (13.1%) con del total de prematuridad presentado para toda España en otros estudios supone nuevamente una mayor incidencia de prematuridad: 7.1% (Luque-Fernández, 2008), o 7.9% (Agudelo-Suárez, 2009).

Sin embargo la incidencia si que se aproxima notablemente a los estudios presentados por el National Center of Health Statistics de Estados Unidos en 2009 que databa en un 12.7% la incidencia de prematuros en el año 2007 (National Center of Health Statistics, 2009).

6.3. INFLUENCIA DE LA EDAD GESTACIONAL EN LOS PORCENTAJES DE HEMOGLOBINA NEONATAL

En el subgrupo correspondiente a EG \leq 32 semanas del presente estudio, se observa el mayor porcentaje de HbF1, en concreto un 21.2%. En el caso de HbF el porcentaje medio obtenido es de 60,9% y un 11.1% de Hb A.

En el caso del subgrupo de EG = 32-37 semanas, el porcentaje de HbF1 desciende hasta 20.7% mientras que el porcentaje de HbA asciende hasta un 11.9%. Igualmente se observa un incremento en el porcentaje de HbF, dicho resultado debe ser objeto de evaluación independiente debido a que, teniendo en cuenta la curva de desaparición de las cadenas γ , el incremento de HbF es incoherente en una EG mayor (Figura 34).

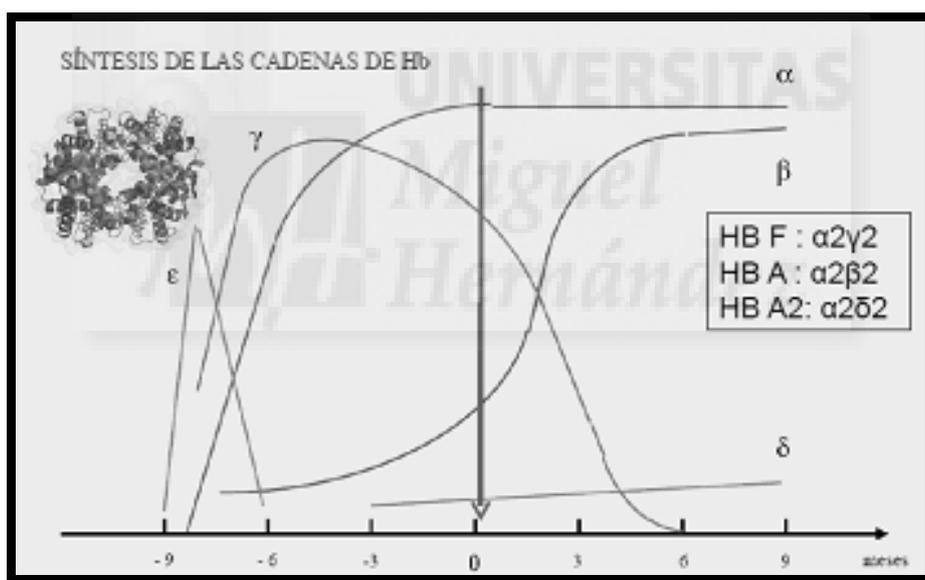


Figura 34. Evolución en la síntesis de cadenas de Hb.

Evaluando por último el subgrupo correspondiente a EG \geq 37 semanas, se obtienen los siguientes porcentajes: HbF1 = 19.3%, HbF = 56.5%, HbA = 18.2%. En este caso todos los porcentajes de las diferentes Hb son coherentes

con lo esperado, con una mayor EG la tendencia es a la disminución de HbF1 y F mientras que para el caso concreto de la HbA lo esperado fisiológicamente es un aumento.

Dada la incoherencia de algunos de los porcentajes obtenidos a nivel de %HbF, se plantea la posibilidad de la búsqueda de fuentes de alteración de los resultados. Como fuente principal de interferencia se identifica la posible inclusión de muestras que no cumplan con las recomendaciones aprobadas para los cribados de enfermedades neonatales, como es el caso de las muestras de recién nacidos cuyos días de vida excedan de los 7.

En los programas de cribado neonatal (Espada, 2001; Eguileor, 2002; Aguado, 2011), las muestras aptas son aquellas que se han obtenido dentro de la primera semana de vida. No obstante, aunque se reciban muestras de más de 7 días de vida, no son rechazadas por el programa de cribado de nuestra comunidad. Esto es debido al hecho de que, para el cribado de otras patologías como el hipotiroidismo o la fenilcetonuria es esencial la determinación temprana y el diagnóstico precoz para poder prevenir cuanto antes daños al neonato. Aun así, aunque la muestra exceda los plazos recomendados, siempre debe llevarse a cabo el cribado ya que la realización de dichas determinaciones permite diagnosticar cuanto antes una posible patología congénita (en el caso de que esté presente).

Tras la evaluación únicamente de aquellas muestras que cumplen con el requisito de tener como máximo 7 días de vidas, se observa una clara disminución de las hemoglobinas fetales F1 y F de forma que guardan una relación inversamente proporcional al aumento de la edad gestacional.

Estos resultados son coherentes y se ven apoyados por la evolución temporal de las cadenas globínicas en el recién nacido. Tal y como aumenta la edad gestacional el feto es más maduro y por tanto se da una disminución de las

cadenas γ de la hemoglobina, cadenas que forman parte de HbF1 y HbF. Esta disminución va asociada a un aumento de cadenas β y por tanto conlleva un incremento de la HbA, tal y como se observa tras el análisis de los %HbA de las muestras analizadas.

6.4. INFLUENCIA DE LOS DÍAS DE VIDA EN LOS PORCENTAJES DE HEMOGLOBINA NEONATAL

En el estudio de la influencia de los días de vida en los porcentajes de hemoglobinas neonatales se obtiene un mayor predominio de la HbF, seguido por la HbF1 y ocupando el último lugar la HbA. Esta tendencia se repite tanto en el grupo constituido por los recién nacidos de cuyos días de vida no exceden los 7 días, como para el grupo constituido por aquellos de más de 7 días. Respecto a la variación de %HbF1 no se han observado diferencias entre los dos grupos.

El %HbF ha sufrido un aumento en el segundo grupo respecto del primero. Dicho resultado resulta incoherente respecto de la curva de transformación de hemoglobinas a lo largo del desarrollo del neonato. Una explicación sencilla de este resultado puede ser la inclusión de muestras provenientes de recién nacidos pretérmino. Dichas muestras presentan, en relación de las provenientes de un neonato a término, mayores proporciones de hemoglobinas fetales, debido a su inmadurez. Es por ello que su evaluación conjunta puede suponer la adulteración de los resultados.

En el caso de los recién nacidos pretérmino, la toma de muestra suele llevarse a cabo unos días más tarde que en el resto de neonatos. Según el Programa de Cribado de la Comunidad Valenciana en el caso de recién nacidos

pretérmino de menos de 32 semanas de EG o de menos de 1500 g de peso, se deberá repetir la toma de muestra a los 15 días y al mes de vida.

La inclusión de recién nacidos pretérmino en el grupo de >7 días podría justificar el ligero aumento de la proporción de HbF y la disminución de los porcentajes de HbA que se observan en el citado grupo. También podría justificar la no alteración de los porcentajes de HbF1, los cuales a priori sería esperable que también disminuyeran a la vez que aumentan de los días de vida.

Analizando la variación de los %HbF1, %HbF y %HbA respecto de los días de vida, únicamente en el grupo de los neonatos a término, se obtienen resultados mucho más exactos y coherentes que realizando el análisis de todos los recién nacidos sin tener en cuenta su nivel de madurez o EG. Se observa un claro descenso de las hemoglobinas fetales, tanto de HbF1 como de HbF, asociado al incremento de HbA. Dichas tendencias son totalmente lógicas ya que las hemoglobinas fetales durante la etapa embrionaria y fetal son las que permiten al feto realizar el intercambio gaseoso con la sangre materna. El citado proceso no sería posible si el neonato no tuviera altas concentraciones de hemoglobina con una mayor capacidad de fijación de oxígeno que la que se encuentra en la madre. Por tanto es normal que disminuya con los días de vida tanto la proporción de HbF como de HbF1, la cual tiene una capacidad de fijación del oxígeno aún mayor que la de HbF (Garlick 1980; Garlick, 1984; Pequeñuela, 2005).

6.5. INFLUENCIA DEL ORIGEN MATERNO EN LOS PORCENTAJES DE HEMOGLOBINA NEONATAL

6.5.1. Influencia del origen materno en los porcentajes de hemoglobina neonatal en ausencia de formas de hemoglobinas anómalas:

Aquellos orígenes maternos en los que se presentan mayores proporciones de HbF1 tras el estudio estadístico realizado son: en primer lugar, el grupo nominado como el resto de Europa ($19.9\% \pm 2.8$), seguido por África del Norte ($19.6\% \pm 2.7$) y a continuación por España ($19.4\% \pm 2.8$). Sin embargo los lugares donde se observan menores proporciones de la misma son África del Sur ($18.9\% \pm 3.0$) y Asia ($18.9\% \pm 2.7$).

En 1980 Robert L. Galick y otros autores (Galick, 1981) ya hacían referencia a la presencia de un porcentaje nada despreciable de hemoglobina fetal en forma acetilada respecto del total de la misma. En dicha publicación se evalúa la mayor síntesis de Hb acetilada o HbF1 en relación con HbF, situando la proporción de la misma respecto del total, en un mínimo de 10-15%. Los autores tras su análisis determinan que la formación HbF1 parece ser un fenómeno general que ocurre en una variedad de muestras de sangre periférica de neonatos. No se analiza en este caso la posible función de la misma en la sangre neonatal, pero ya se intuye que dada la alta proporción presente, dicha fracción de hemoglobina debe estar dotada de alguna característica de interés. En el presente estudio se han obtenido porcentajes algo mayores en comparación con esta primera publicación. En 1984 otra publicación del mismo autor (Galick, 1984) refiere datos sobre las proporciones de HbF1 en diferentes tipos de muestras entre las cuales se incluyeron: cordón umbilical, médula ósea infantil, sangre periférica de adultos con hemoglobina fetal elevada. En esta publicación se habla sobre la proporción de HbF1 en algunas de esas muestras,

la cual llegaba a oscilar entre un 10% y un 20%, en función del grado de maduración de la misma, resultados que se aproximan más a los obtenidos en el presente estudio. En un artículo más reciente, publicado por Óscar Andrés Pequeñuela en 2005 (Pequeñuela, 2005) nuevamente se apunta a la presencia de una proporción importante de HbF1 respecto del total en muestras neonatales. Dicha fracción de hemoglobina no tiene la capacidad de fijación de 2,3-difosfoglicerato, característica a la cual debe su enorme capacidad de fijación del oxígeno.

En el estudio de los porcentajes de HbF se ha encontrado mayor proporción de los mismos en España ($57.2\% \pm 5.2$), seguido por África del Sur ($56.9\% \pm 5.7$) y Resto de Europa ($56.9\% \pm 5.1$). Por el contrario se presentan las menores proporciones en los neonatos cuyas madres son de África del Norte ($56.1\% \pm 5.4$) o Asia ($56.3\% \pm 4.9$).

Estos resultados son coherentes y se ven claramente argumentados si se tiene en cuenta que patologías como son la β -talasemia y la malaria son endémicas de las zonas donde se han encontrado las mayores proporciones de HbF. Y ambas entre sí están íntimamente relacionadas, la alta frecuencia de Talasemia en países con alta prevalencia de malaria está ampliamente descrito (Flint, 1998; Galanello, 2010; Qiu, 2013; Purohi, 2014).

La β -talasemia afecta principalmente a personas con ascendencia griega, italiana, africana, de Medio Oriente, del sudeste asiático y del sur de China (Cooley's Anemia Foundation, 2007). La migración de la población y los matrimonios mixtos entre los diferentes grupos étnicos ha introducido la talasemia en casi todos los países del mundo, incluyendo el norte de Europa, donde la talasemia no tenía tradicionalmente tasas de prevalencia apreciables (Galanello, 2010).

Los mecanismos a través de los cuales las enfermedades talasémicas y la anemia drepanocítica o el rasgo drepanocítico suponen cierta protección contra la malaria severa por *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), no están completamente demostrados. Existe la hipótesis de que los eritrocitos con hemoglobinas alteradas reducen la multiplicación intraeritrocitaria de *P. falciparum*, lo que podría retrasar el desarrollo de la densidad de parásitos que amenazan la vida (Bunn, 2012).

Glushakova y su equipo de colaboradores, en un artículo publicado en Mayo de este mismo año (Glushakova, 2014) confirma que el parámetro de multiplicación intraeritrocitario de *P. falciparum*, un parásito de características virulentas heredables, está correlacionado con los índices eritrocitarios y está reducido en los síndromes talasémicos.

Teniendo en cuenta además que, en el caso concreto de la β -talasemia existe un incremento de HbF debido al déficit en la formación de cadenas globínicas del tipo β , es normal que sus niveles sean superiores en zonas donde tradicionalmente exista alta prevalencia de dicha patología. Este es el caso de los países situados en la cuenca del Mediterráneo, en los que los neonatos presentan concentraciones algo mayores de HbF.

La incidencia anual total de individuos sintomáticos se estima en 1 de cada 100.000 en todo el mundo y 1 de cada 10.000 personas en la Unión Europea (Orphanet (web)). Las frecuencias más altas de portadores se informaron en Chipre (14%), Cerdeña (10,3%) y el Sudeste Asiático (Flint, 1998).

En el caso de la HbA se localizan las mayores concentraciones de la misma en recién nacidos cuyas madres son originarias de África del Sur (18.0% \pm 6.6), África del Norte (18.0% \pm 6.1) o Latinoamérica (18.0% \pm 5.3), siendo en este caso el %HbA idéntico entre los tres grupos, únicamente se observa una ligera diferencia en la desviación estándar. La proporción sin embargo es

mínima en el grupo de madres cuyo origen es el continente asiático ($16.8\% \pm 5.7$) y resto de Europa ($16.8\% \pm 5.6$).

6.5.2. Influencia del origen materno en los porcentajes de hemoglobina neonatal en portadores de hemoglobinas anómalas:

Tras la evaluación de los diferentes porcentajes de hemoglobinas presentes en el neonato en ausencia de formas de hemoglobinas anómalas, se plantea en el presente estudio la evaluación de los mismos cuando se hallan presentes hemoglobinas alteradas. Para ello se evalúan las medias y desviaciones estándar de cada una de ellas obteniéndose en todos los casos resultados comparables a los de neonatos carentes de hemoglobinas anómalas, a excepción del grupo de los portadores de HbE.

Para el resto de grupos de portadores, es decir, portador C, portador D y portador S, el mayor porcentaje de hemoglobina corresponde a HbF, seguido de HbF1 y en último lugar se encuentra la HbA. Estos resultados por tanto son equivalentes a los obtenidos en ausencia de alteraciones hemoglobínicas.

En el caso de portadores de HbE se han obtenido resultados muy diferentes a los de los demás grupos de hemoglobinas anómalas. En este caso la fracción mayoritaria correspondía a HbA (39.0%), seguida por HbF (38.5%) la cual presentaba porcentajes discretamente inferiores a la primera. La hemoglobina minoritaria en este grupo correspondía a la del tipo F1.

Dichos resultados son discordantes con la propia evolución en la formación de cadenas globínicas del recién nacido (Colombo, 1993; Miguel-Morales 2012) y además resulta totalmente incompatible con los resultados obtenidos en estudios anteriores como el de W. Eastman publicado en 1999 por *Clinical Chemistry* (Eastman, 1999). En dicho estudio se evaluaron 4 millones

de muestras de recién nacidos en California con la finalidad de obtener la distribución de las hemoglobinas del neonato dentro de los dos primeros días de vida, obteniéndose para el caso de los portadores de HbE las siguientes medianas: HbF = 61.6%, HbA = 5.3%, HbF1 + Other = 31.1%.

La discrepancia de estos resultados con los del presente estudio, ha llevado al planteamiento de alguna posible interferencia dentro del propio estudio o en el método de análisis de las muestras.

Evaluando cuál podía ser la fuente de error, se llevó a cabo la criba de los resultados, de forma que se planteó la posibilidad de la presencia de aumentos falseados de HbE en aquellas muestras que presentaran altas concentraciones de HbA. Dichas muestras podrían corresponder a neonatos sometidos a transfusiones no informadas.

En los casos de transfusión las muestras, además de presentar altas concentraciones de HbA, también presentan ciertas concentraciones de HbA₂ las cuales en neonatos no sometidos a transfusiones no aparecerían. En HPLC tanto la HbE como la HbA₂ eluyen a la vez, originando un pico único e indiferenciable.

La forma típica del cromatograma que se podría encontrar en estos casos sería la representada en la siguiente figura:

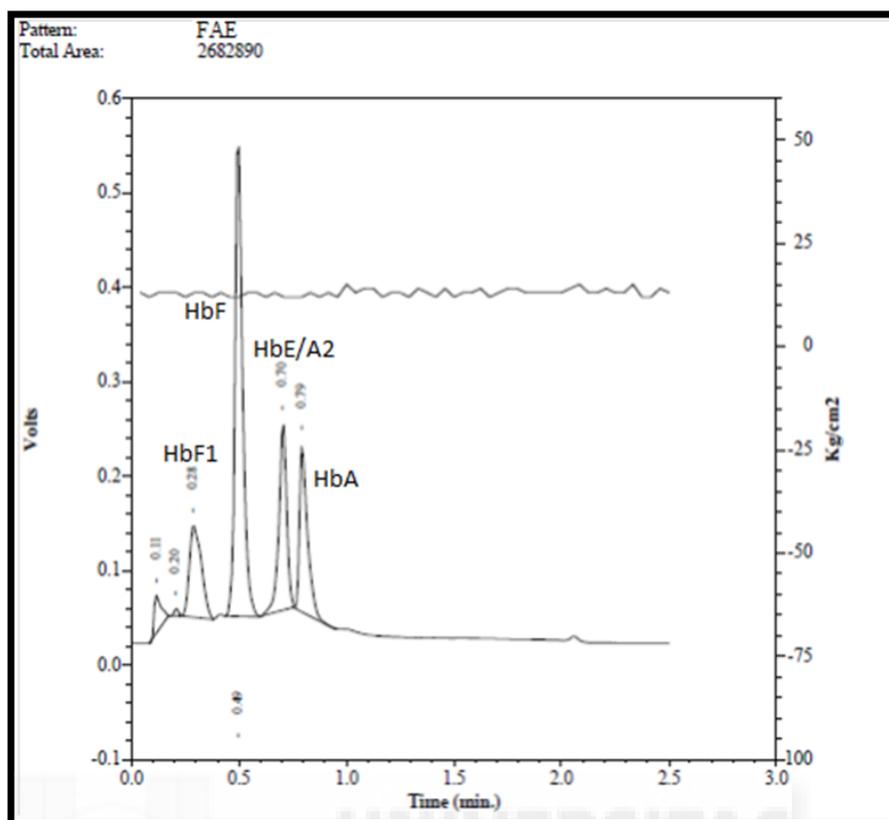


Figura 35. Cromatograma de una muestra de sangre de recién nacido sometido a transfusión sanguínea.

Es sabido, que la única posibilidad de que una muestra neonatal tenga elevadas cantidades de HbA, es que el recién nacido haya sido sometido a una o varias transfusiones sanguíneas, hayan sido constatadas o no. Se optó por eliminar provisionalmente del estudio de portadores FAE, aquellas muestras que pudieran presentar porcentajes de HbA que superaran los correspondientes al percentil 95 calculado en el presente estudio. Tras la eliminación de dichas muestras, se obtuvieron unos porcentajes de hemoglobinas muy diferentes a los originales (F1 = 16.0%, F = 60.7% y A = 11.0%) y que son más coherentes con el estudio realizado por W. Eastman.

Estos resultados evidencian la utilidad del uso de percentiles, para rechazar muestras que puedan tanto falsear los resultados del cribado como provocar molestias a los recién nacidos y a sus padres.

Se ha realizado una tabulación cruzada del origen étnico materno entre los portadores encontrados, para poder determinar claramente la distribución de los diferentes tipos de hemoglobinas anómala en función de los mismos. Como resultado de la misma se obtienen los siguientes resultados:

-Se observa claramente cómo la mayor parte de portadores de hemoglobina C se encuentra en el grupo de neonatos nacidos de madres de África del Sur (6.7%), seguidos por el grupo de África del Norte (1.9%). Las mínimas proporciones de niños portadores de HbC se encuentran en el grupo de Resto de Europa (0.08%) y España (0.11%).

-En el caso de los portadores de HbD se encuentran la mayor predominancia en el grupo de los niños cuyas madres son origen asiático (0.7%). Sin embargo, en los grupos correspondientes al resto de Europa, Latinoamérica y África del Sur, no se encuentra ningún caso.

-En cuanto a la HbE se obtienen los mayores porcentajes en los recién nacidos de madres de Asia un 0.35%, un 0.08% para resto de Europa y un 0.02% para España. Por el contrario no se encontraron portadores FAE para el resto de orígenes étnicos (Pung-Amritt, 1999; Wiwanitkit, 2013).

-Por último, al estudiar las proporciones encontradas en los casos de portadores de HbS se obtiene una predominancia clara de los niños cuyas madres son originarias de África de Sur (12.5%), el resto de grupos presentan una incidencia mucho menor de este tipo de hemoglobina, siendo el grupo con menos frecuencia de aparición de HbS el correspondiente a Asia, en el cual no se ha encontrado ningún caso.

De una forma más gráfica se puede recopilar las diferentes zonas geográficas en las que son frecuentes las diferentes hemoglobinopatías con el mapa que se muestra a continuación (Figura. 36):

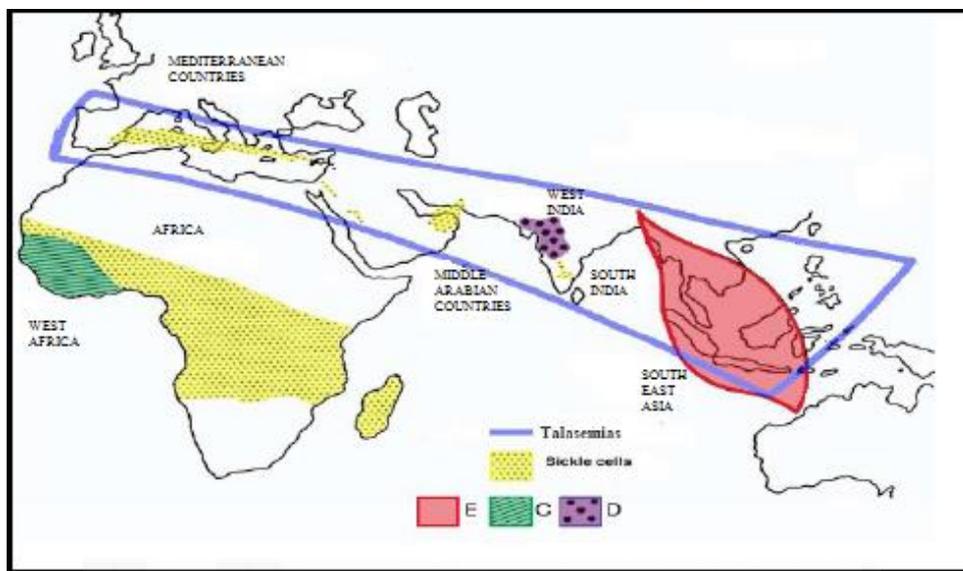


Figura 36. Mapa de distribución mundial de las diferentes hemoglobinas y talasemias.

Se presentan como zonas geográficas más afectadas tanto por talasemias como por incidencia de portadores de hemoglobina S, principalmente los países de la cuenca mediterránea y África; principalmente África del Sur en el caso de HbS.

La zona tradicionalmente más afectada por la presencia de HbE y HbD corresponde a Asia.

Por último, la zona con mayor incidencia de HbC se localiza en África mayoritariamente en las zonas del Oeste y Sur.





7. CONCLUSIONES

PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



7. CONCLUSIONES

1. Se han obtenido los percentiles de normalidad para cada una de las hemoglobinas presentes en el recién nacido.
2. Estos percentiles permiten automatizar y diferenciar aquellos recién nacidos a los cuales se les ha realizado una transfusión sanguínea.
3. La variación en los porcentajes de las hemoglobinas F1, F y A en relación a la edad gestacional y a la edad a la toma de muestra (días de vida) muestran una maduración con incremento de HbA y disminución de hemoglobinas fetales.
4. La incidencia de enfermedad drepanocítica es baja entre recién nacidos en la provincia de Alicante.
5. La proporción de portadores de hemoglobinas anormales es de: 0.6% en el caso de FAE, 0.3% para FAC y FAS y para los sujetos FAD un 0.1%.
6. La proporción de homocigosis ha sido de 0.006%, encontrándose un único caso de FS u homocigosis de HbS.
7. La presencia de portadores se puede determinar tanto por la presencia en el cromatograma de hemoglobina anormal como por la variación de los porcentajes de hemoglobinas normales. Se pueden por tanto incluir varias alertas.
8. Hay una gran variabilidad de portadores según el origen materno, siendo mucho más frecuente la HbC y la HbS entre la población de África del Sur, y la HbD y HbE entre la asiática.

9. La población en la que se ha de concentrar el esfuerzo diagnóstico es la población de África del Sur, dada la alta prevalencia de HbS y la gravedad del estado homocigoto o anemia drepanocítica.

10. La inclusión de percentiles de normalidad podría suponer un importante ahorro económico al evitar reanalizar gran parte de las muestras dudosas presentes en la actualidad y a su vez un ahorro a nivel de las molestias ocasionadas los neonatos y a sus familias, ya que no tendrían que sufrir nuevas extracciones sanguíneas innecesarias y supondría una menor incertidumbre por parte de los padres.





8. ABREVIATURAS

PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



8. ABREVIATURAS

ARNm: ARN mensajero

dL: decilitro

C.V.: Comunidad Valenciana

DPG (2,3-DPG): 2,3-Difosfoglicerato

ECF: enfermedad de células falciformes

EG: edad gestacional

fL: femtolitro

g: gramo/s

Glu: ácido glutámico

H: Haemophilus

H⁺: protón/es

Hb: Hemoglobina

HbA: Hemoglobina adulta tipo A

HbA2: Hemoglobina adulta tipo A2

HbD: Hemoglobina D

HbE: Hemoglobina E

HbF: Hemoglobina fetal

HbF1: Hemoglobina fetal acetilada

HbS: Hemoglobina S

HGUA: Hospital General Universitario de Alicante

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

INE: Instituto Nacional de Estadística

L: litro

Lys: Lisina

N-terminal/es: extremo amino terminal

Nm: nanómetro

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONU: Organización de las Naciones Unidas

OSIP: Observatorio de Salud Infantil y Perinatal

P.: Plasmodium

RNMPT: recién nacidos muy pretérmino

RNPT: recién nacido pretérmino

RNT: recién nacidos a pretérmino

S.: Streptococcus

SCA: anemia de células falciformes

SEHOP: Sociedad Española de Oncología y Hematología Pediátrica

Spp: especies

Tp: temperatura

UFC-E: unidades formadoras de colonias eritroides

Val: Valina

VCM: volumen corpuscular medio

VOA: accidentes vasooclusivos







9. BIBLIOGRAFÍA

**PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS
DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES**

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



9. BIBLIOGRAFÍA

-Aguado C, Barona C, Carpio ML, Fullana AM, Mas R, et al. Programa de Cribado Neonatal de Enfermedades Congénitas en la Comunidad Valenciana. Generalitat Valenciana. Consellería Valenciana. 2011.

Agudelo-Suárez AA1, Ronda-Pérez E, Gil-González D, González-Zapata LI, Regidor E. Relationship in Spain of the length of the gestation and the birth weight with mother's nationality during the period 2001-2005. *Rev Esp Salud Publica*. 2009 Mar-Apr;83(2):331-7.

-Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, Kariuki S, et al. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet*. 2002; 359 (9314): 1311-2.

-Alain J. Marengo-Rowe. Structure-function relations of human hemoglobins. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. Jul 2006; 19(3): 239-245.PMCID: PMC148453

-Allon M. Renal abnormalities in sickle cell disease. *Arch Intern. Med*. 1990; 150(3): 501-4.

-Amaratunga C., Lopera-Mesa TM, Brittain NJ, Cholera R, Arie T, Fujioka H, Keefer JR, Fairhurst RM. A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One*. 2011 Apr 12; 6(4): e14798. doi: 10.1371/journal.pone.0014798.

-Angastiniotis M, Modell B, Englezos P, Boulyjenkov V. Prevention and control of haemoglobinopathies. *Bull World Health Organ*. 1995; 73(3): 375-386.

-Arrizabalaga B., Martín-Núñez G. Aspectos actuales de la enfermedad falciforme. *Haematologica / edición española*. 2011; 96 (Extra 1). 91.

-Atha D.H. and Riggs, A. 1976. Tetramer-dimer dissociation in hemoglobin and the Bohr effect. *J. Biol. Chem*. 251: 5537-5543.

-Baiget M, Del Río E, Doménech M, Casals T, Bozzo M, Gimferrer E. Escrutinio

de hemoglobinopatías en sangre del cordón umbilical. *Biol. Clin Hematol* 1981; 3: 251-256.

-Baldwin BA. A model of co-operative oxygen binding to haemoglobin. *Br Med Bull* 1976; 32: 213-218.

-Baldwin JM. Structure and function of haemoglobin. *Prog Biophys Mol Biol.* 1975; 29: 225-330.

-Benito A, Villegas A, Pérez Cano R, Bernal R. β thalassaemia in south western Spain: high frequency of G \rightarrow A (IVS-I-1) mutation. *Br J Haematol* 1996; 92: 336-338.

-Berger E, Saunders N, Wang L, Friedman JN. Sick cell disease in children: differentiating osteomyelitis from vaso-occlusive crisis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2009; 163(3): 251-5.

-Bunn HF and Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetics, and Clinical Aspects. W.B. Saunders. 1986.

-Bunn HF. The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria. *Blood.* 2013 Jan 3; 121(1): 20-5. doi: 10.1182/blood-2012-08-449397. Epub 2012 Nov 1.

-Burnett MW, Bass JW, Cook BA. Etiology of osteomyelitis complicating sickle cell disease. *Pediatrics.* 1998; 101(2): 296-7.

-Cabot Dalmau A, Casado Toda M, Barberán Pérez J, Roqueta Sureda M, Martorell Aymerich O, Bosch Llobet A, et al. Screening neonatal de drepanocitosis en el Consorci Sanitari de Mataró. Justificación y primeros resultados. *An Esp Pediatr* 1998; 49: 157-160.

-Calvo-Villas JM, Zapata Ramos MF, Cuesta Tovar J, De la Iglesia Iñigo S, Ropero Gradilla P, et al. Prevalencia de hemoglobinopatías en mujeres gestantes en el área sanitaria de Lanzarote. *An Med Interna (Madrid)* 2006; 23: 206-12.

- Cantalejo MA, Cela ME, Cervera A, et al (2002). Protocolo de anemia de células falciformes o drepanocitosis. Sociedad Española de Hematología Pediátrica (SEHOP).
- Castilla A.M, Balil S, Valle A, Mendiáldua AM, Etxezarreta B, Espada M. Detección Precoz Neonatal de anemia falciforme y otras hemoglobinopatías en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Estudio Piloto. II Congreso Nacional AECNE 26-28 Noviembre 2009. Valencia. Revista electrónica AECNE en www.aecne.es.
- Cela de Julián E, Dulín Íñiguez E, Guerrero Soler M, Arranz Leirado M, Galarón García P, Meléndez Bieler C, et al. Evaluación en el tercer año de implantación del cribado neonatal universal de anemia falciforme en la Comunidad de Madrid. *An Pediatr (Barc)* 2007; 66 (4): 382-6.
- Chanutin A, Curnish RR. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1967; 121: 96-102.
- Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, Schechter AN. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest*. 2003; 111(2): 231-239.
- Colombo B, Kim B, Atencio RP, Molina C, Terrenato L. The pattern of fetal haemoglobin disappearance after birth. *Br J Haematol*. 1976; 32: 79-87.
- Comité de ética del Instituto de Investigación de Enfermedades Raras. Recomendaciones acerca de los aspectos éticos de los programas de cribado de población para enfermedades raras. *Gaceta Sanitaria*. 2006; 20 (Supl 3):27-32.
- Estébanez M., Zuazagoitia J., Rodríguez-Alarcón J., Arena J.M. Saitá G. Consejo asesor de cribado neonatal de enfermedades congénitas de la capv. *Bol. S Vasco-*

Nav pediatri; 43: 7-10 2011.

-Cooley's Anemia Foundation. About Thalassemia. Actualizado 2007, <http://www.cooleysanemia.org/>.

-Dan L. Longo, Dennis L. Kasper, J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Joseph Loscalzo, Eds. Harrison Medicina interna Ed. 18 2013

-Darbari DS, Nouraie M, Taylor JG, Brugnara C, Castro O, Ballas SK. Eur J Haematol. 2013 Dec 14. doi: 10.1111/ejh.1224

-Daugherty MA. Identification of the intermediate allosteric species in human hemoglobin reveals a molecular code for cooperative switching. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 1110-1114.

-De Las Heras Flórez S., Pérez Hernández L. M. Hemoglobinopatías diagnosticadas en el área sanitaria del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria de Santa Cruz de Tenerife durante un año. An. Med. Interna (Madrid) Vol. 25, N.º 2, pp. 61-66, 2008

-De Pablos JM. Hemoglobinopatías estructurales en España. Biol Clin Hematol 1988; 10: 5-15.

-DeBaun MR, Frei-Jones M, Vichinsky E. Hemoglobinopathies. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. 19th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011: chap 456.

-Dumoulin A, Manning LR, Jenkins WT, Winslow RM, Manning JM. Exchange of subunit interfaces between recombinant adult and fetal hemoglobins. Evidence for a functional inter-relationship among regions of the tetramer. J Biol Chem. 1997 Dec 12; 272(50):31326-32.

-Eastman JW, Wong R, Liao CL, Morales DR. Automated HPLC screening of newborns for sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. Clin Chem. 1996 May; 42(5):704-10.

- Eastman JW, Lorey F, Arnopp J, Currier RJ, Sherwin J, Cunningham G. Distribution of hemoglobin F, A, S, C, E, and D quantities in 4 million newborn screening specimens. *Clin Chem*. 1999 May; 45(5):683-5.
- Eguileor I. Beneficios para la Salud Pública de la CAPV de la existencia del programa. En: Vigésimo Aniversario del Programa de Cribado Neonatal de la CAPV. Documentos Técnicos de Salud Pública. Serie A, N.º 20. Vitoria-Gasteiz: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco; 2002.
- Elseweidy MM, Fadel HE, Abraham EC. Glycosylated and acetylated hemoglobins in relation to gestational age and red cell age. *Hemoglobin* 1984; 8: 363-372.
- Espada M, Dulín E. Sociedad Española de Química Clínica y Patología Molecular. Comité Científico. Comisión de Errores Metabólicos. Procedimiento para la obtención y recogida de muestras de sangre sobre papel de filtro en los programas de detección precoz neonatal de errores congénitos del metabolismo. *Química Clínica (SEQC)*. 2001.
- Falletta JM, Woods GM, Verter JJ, Buchanan GR, Pegelow CH, Iyer RV, Miller ST, Holbrook CT, Kinney TR, Vichinsky E. Discontinuing penicillin prophylaxis in children with sickle cell anemia. Prophylactic Penicillin Study II. *J Pediatr*. 1995 Nov; 127(5):685-90.
- Feliú, *HEMATOLOGIA*, Vol. 13 N° 3: 110-112 Septiembre-Diciembre 2009.
- Fernández Águila J., Pérez Cogle A., Fragoso M., Rivero Jiménez C.S.R. Early diagnosis of sickle cell disease: an unsolved problem in black. *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2012; 28(2): 195-197
- Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB: The population genetics of the hemoglobinopathies. *Bailliere's Clinical Hematology* 1998, 11: 1-50.
- Friedman MJ. Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria.

Nature. 1979; 280: 245-247.

-Fucharoen S, Viprakasit V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009; :26-34.

-Fucharoen S, Winichagoon P. Haemoglobinopathies in Southeast Asia. Indian J Med Res. 2011; 134: 498-506.

-Galanello R., Origa R. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010, 5:11

-Galbe Sánchez-Ventura y Grupo PrevInfad/PAPPS Infancia y Adolescencia. Cribado neonatal de metabolopatías. Screen-viewing abuse impact on mental development. Revista Pediatría Atención Primaria 2012. ISSN 1139-7632 <http://dx.doi.org/10.4321/S1139-76322009000400009>

-Garlick RL, Mazer JS, Himelstein AL, Stamatoyannopoulos G, Shaeffer JR. Acetylation of human fetal hemoglobin occurs throughout erythroid cell maturation. Biochim Biophys Acta. 1984 May 25; 799(1):29-37.

-Garlick RL, Shaeffer JR, Chapman PB, Kingston RE, Mazer JS, Bunn HF. Synthesis of acetylated human fetal hemoglobin. J Biol Chem. 1981 Feb 25; 256(4):1727-31.

-German F. Sáenz, Enrique Blanco, Javier Jiménez, Gerardo Montero, Eliécer Valenciano, Guido Arroyo, Evangelista Sánchez. Diagnóstico neonatal de alfa-talasemia en población caucásica.

-Giardina PJ, Forget BG. Thalassemia syndromes. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SS, et al., eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 5th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2008:41.

-Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell. disease. N Engl J Med. 2008; 359(21): 2254-65.

-Glushakova S, Balaban A, McQueen PG, Coutinho R, Miller JL, Nossal R, Fairhurst RM, Zimmerberg J. Hemoglobinopathic Erythrocytes Affect the

Intraerythrocytic Multiplication of Plasmodium falciparum in Vitro. J Infect Dis. 2014 May 5.

-Gómez-Chiari M.; Tusell Puigbert J.; Ortega Aramburu J. Drepanocitosis: experiencia de un centro. An Pediatr. 2003;58:95-9

-Gong L, Parikh S, Rosenthal PJ, Greenhouse B. Biochemical and immunological mechanisms by which sickle cell trait protects against malaria. Malar J. 2013 Sep 11; 12: 317. doi: 10.1186/1475-2875-12-317.

-González FA, Hojas R, Ropero P, Villegas A. Aumento de la incidencia de hemoglobinopatías estructurales y talasemias en España. Haematologica 2002; 87: 368-372.

-Grupo de estudio de hemoglobinopatías y talasemias. Datos recopilados por M Baiget. Los síndromes talasémicos en España. Datos epidemiológicos preliminares. Sangre 1986; 31: 609-613.

-Gulbis B. y Aguilar. 2005. Disponible en www.Enerca.org

-Hardison RC1, Chui DH, Riemer C, Giardine B, Lehväsliho H, Wajcman H, Miller W. Databases of human hemoglobin variants and other resources at the globin gene server. Hemoglobin. 2001 May; 25(2):183-93.

-He Z. and Russell, J.E. 2001. Expression, purification, and characterization of human hemoglobins Gower-1 ($\zeta 2\epsilon 2$), Gower 2 ($\alpha 2\epsilon 2$) and Portland-2 ($\zeta 2\beta 2$) assembled in complex transgenic-knockout mice. Blood 97: 1099-1105.

-Hempe, J. y Craver, R. 1994. Quantification of hemoglobin variants by Capillary Isoelectric Focusing. Clinical Chemistry, 40: 2288- 2295.

-Hernández JA. Bosch MA, Sauca G, Rovira JM, Clapés V, Del Río N, et al. Hematología e inmigración. Impacto de la inmigración africana subsahariana en la práctica. Haematologica 2002; 87: 373-377.

-Hirst C, Owusu-Ofori S. Prophylactic antibiotics for preventing pneumococcal

infection in children with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Sep 12; 9: CD003427. doi: 10.1002/ 14651858.CD003427.pub2.

-Huisman THJ. The structure and function of normal and abnormal hemoglobins. Ballier. *Clin Hematol* 1993, 6 (1).

-Joyanes B, Moro M, Ropero P, Briceño O, Dulín E, Villegas A. Cribado de hemoglobinopatias en una cohorte de recién nacidos en la Comunidad de Madrid. *An Med Interna (Madrid)* 2006; 23: 203-205.

-Joyanes B, Moro M, Ropero P, Briceño O, Dulin E, Villegas A. Cribado de hemoglobinopatias en una cohorte de recién nacidos en la Comunidad de Madrid. *Med Clin (Barc)* 2006; 126; 290-292.

-Kaul DK, Fabry ME, Costantini F, Rubin EM, Nagel RL. In vivo demonstration of red cell-endothelial interaction, sickling and altered microvascular response to oxygen in the sickle transgenic mouse. *J Clin Invest*. 1995 Dec; 96 (6): 2845-53.

-Kilmartin MA. Interaction of haemoglobin with protons, CO₂ and 2,3-diphosphoglycerate. *Br Med Bull* 1976; 32: 209-212.

-King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radic Biol Med*. 2004 Sep 15; 37(6):737-44.

-LaMonte G, Philip N, Reardon J, Lacsina JR, Majoros W, Chapman L, Thornburg CD, Telen MJ, Ohler U, Nicchitta CV, Haystead T, Chi JT. Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into *Plasmodium falciparum* inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. *Cell Host Microbe*. 2012 Aug 16; 12(2): 187-99. doi: 10.1016/j.chom.2012.06.007.

-Lang CW, Stark AP, Acharya K, Ross LF. Conocimientos y actitudes maternas sobre el recién nacido de cribado para la hoz célula enfermedad y la fibrosis quística. *Am J Med Genet A*. 2009 Nov; 149A (11): 2424-9. doi: 10.1002/ajmg.a.33074.

- Lehmann H, Carrell RW. Variations in the structure of human hemoglobin. With particular reference to the unstable haemoglobins. *Br Med Bull* 1969; 25: 14-23.
- Lenfant C. Effect of altitud on oxygen binding by hemoglobin on organic phosphate levels. *J Clin Invest* 1968; 47: 2652-2656.
- Lewis, S.; Bain, B. y Bates, I. 2008. Hematología práctica. Décima edición. Editorial El Sevier. Barcelona, España.
- Lois MR., J.Russell, Padovan J.C., Chait B.T., Popowicz A., Manning R.S., Manning J.M. Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell *Protein Sci.* 2007 August; 16(8): 1641-1658.
- Longo D.,Kasper D., Jameson J., Fauci A., Hauser S., Loscalzo J. *Harrison Principios de Medicina Interna* 2012; 99; 641-649.
- López- Escribano H, Vila Vidal M, Barceló Bennassar A, Riesco Prieto M, Ayllón Gatnau O. Cribado neonatal de anemia falciforme en la Comunidad Autónoma Balear. Estudio piloto anónimo no relacionado. *An Pediatr.* 2009; 70: 429-33.
- Lorey FW, Cunningham GC, Vichinsky E, Lubin B, Shafer F, Eastman J. Detection of HbE/b-thalassemia versus homozygous EE using high-performance liquid chromatography results from newborns. *Biochem Med Metab Biol* 1993; 49: 67-73.
- Luque-Fernández MA. Trends in the risk of late fetal mortality, prematurity and low birth weight associated with advanced maternal age in Spain 1996-2005. *Gac Sanit.* 2008 Sep-Oct; 22(5):396-403.
- Malcorra JJ, Balda MI, Campo C, Mataix R, Molero T, Castro E. Hemoglobinopatías y talasemias en la colonia hindú afincada en las Islas Canarias. *Sangre* 1993; 38: 342.

- Malcorra JJ. 2001. Hemoglobinopatías y Talasemias. BSCP Can Ped 25,2: 265-278.
- Manero H. Variables que pueden influir en el cribado neonatal de hiperfenilalaninemias y fenilcetonuria. Tesis Doctoral 2012. Universidad Miguel Hernández.
- Manning L.R. and Manning, J.M. 2001. The acetylation state of human fetal hemoglobin modulates the strength of its subunit interactions: Long-range effects and implications for histone interactions in the nucleosome. Biochemistry 40: 1635-1639.
- Mañu- Pereira M.M., Cabot A., Martinez Gonzalez, A., Sitja Navarro, E., Cararach, V. Estudio molecular de la anemia falciforme asociada a alfatalasemia y déficit de G6PD. Medicina clinica. 2007 Jun 30; 129(5): 161-4.
- Manning LR, Russell JE, Padovan JC, Chait BT, Popowicz A, Manning RS, Manning JM. Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. Prot Sci. 2007; 16: 1641-1658.
- Mañu-Pereira M.M., Vives Corrons J. Neonatal haemoglobinopathy screening in Spain. J Clin Pathol. 2009; 62: 22-5.
- Mañu-Pereira M.M, Maya A , Cararach V , Sabrià J , J Boixadera , Quintó L, Vives-Corrns JL . [Cribado neonatal de hemoglobinopatías y glucosa-6-fosfato en Cataluña. Estudio piloto en el anonimato de la población no relacionada]. Med Clin (Barc). 2006 04 de marzo; 126 (8): 281-5.
- Marín Soria JL, Aldamiz-Echevarría L, Castiñeiras Ramos DE et al. Programas de cribado neonatal en España: Actualización y propuestas de futuro. Madrid: Real Patronato sobre Discapacidad, 2010.
- Marín Soria. Programas de cribado neonatal en España: Actualización y

propuestas de futuro Documento de consenso. 2009.

-Martín Núñez G, Ramos Fernández de Soria R, Fernández Galán MA, Sánchez Gil F, Cuesta P, Martín Borregon J, et al. Campañas de detección de hemoglobinopatías y talasemias en la población escolar del Norte de Extremadura. *Sangre* 1995; 40: 459-464.

-McNally E C-TA, Brazell C, Cassiman JJ, Kent A, Lindpaintner K, Lobato de Faria P, Niese D, Roscam Abbing H, Helge Solbakk J, Tack H, Tambuyzer E, Weihrauch TR, Wend E. 25 Recomendaciones de la Unión Europea sobre las repercusiones éticas, jurídicas y sociales de los tests genéticos. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas. 2004.

-Mesquita, M. Lacarrubba, J. Galvan, Let al. Recién Nacidos de extremo bajo peso de nacimiento. Límites de viabilidad, reanimación en Sala de Partos y Cuidados Intensivos Neonatales. *Pediatr. (Asunción)*, ago. 2010, vol.37, no.2, p.127-135. ISSN 1683-9803.

-Miguel-Morales Maydelín, Díaz-Barroso Mabel, Garrote-Santana Heidys, Uley-del Rosario Grisel, Pérez-Diez de los Ríos Graciela, Estrada-del Cueto Marianela. Cuantificación de hemoglobina A2 por electroforesis en gel de agarosa. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2012 Dic; 28(4): 423-427.

-Miller ST, Stilerman TV, Rao SP, Abhyankar S, Brown AK. Newborn screening for sickle cell disease. When is an infant 'lost to follow-up'? *Am J Dis Child.* 1990 Dec; 144 (12):1343-5.

-Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Objetivos y requisitos de calidad del Programa de Cribado Neonatal de enfermedades endocrino-metabólicas del Sistema Nacional de Salud. Grupo de trabajo de la Comisión de Salud Pública para el desarrollo del Sistema de Información sobre cribado neonatal.2013.(<http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/docs/ObjetivosCribadoNeonatal.pdf>)

-Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ.* 2008; 86: 480-7. Hassell KL. Population estimates of sickle cell disease in the U.S. *Am J Prev Med.* 2010; 38 (4 Suppl):S512-21. Modell B, Darlison M, Birgens H, Cario H, Faustino P, Giordano P, et al. Epidemiology of haemoglobin disorders in Europe: an overview. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007; 67: 39-70.

-Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simporé J, Verra F, Konaté A, Rastrelli E, Olivieri A, Calissano C, Paganotti GM, et al. Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2001 Nov 15; 414(6861):305-8.

-Mosqueda PR, Guillén FG, González Granado LI, Negreira CS, Giangaspro CE. Difficult differential diagnosis of bone infarction and osteomyelitis in a girl with drepanocytosis. *An Pediatr (Barc).* 2009; 70(1): 99-100.

-Musielak M. Genetically based states of elevated quantity of foetal haemoglobin (Hb F) in healthy individuals and patients. *Pol Merkur Lekarski.* 2011 Jan; 30(175): 62-5.

-Nathan DG and Orkin SH. *Hematology of Infancy and Childhood*, 5th edition. W.B. Saunders. 1998.

-National Center of Health Statistics (2009) Births: preliminary data for 2007. *Natl Vital Stat Re.* 57:1-4.

-Okonjo KO, Olatunde AM, Fodeke AA, Babalola JO. Bohr effect of human hemoglobin A: Magnitude of negative contributions determined by the equilibrium between two tertiary structures. *Biophys Chem.* 2014 Jun; 190-191:41-9. doi: 10.1016/j.bpc.2014.04.002. Epub 2014 Apr 22.

-Oliva Berini E, Cladera Serra A, Torrent Quetglas M. Campaña para la detección de la betatalasemia minor y prevención de la mayor en la isla de Menorca. Experiencia de diez años. Campaña para la detección de la betatalasemia minor y prevención de la mayor en la isla de Menorca. Experiencia de diez años. *Med Clin*

(Barc) 1998; 110: 361-4.

-Olivieri NF, Pakbaz Z, Vichinsky E. Hb E/beta-thalassaemia: a common & clinically diverse disorder. *Indian J Med Res.* 2011 Oct; 134:522-31.

-Olivieri NF, Pakbaz Z, Vichinsky E. HbE/ β -thalassemia: basis of marked clinical diversity. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010 Dec; 24(6):1055-70.

-OMS (2006). Talasemia y otras hemoglobinopatías. Doc. EB118/5.

-Organización Mundial de la Salud; 59ª Asamblea mundial de la Salud; Punto 11.4; 2006. Disponible en : http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA59-REC1/s/Intro-sp.pdf

-Origa R, Sollaino MC, Giagu N, Barella S, Campus S, Mandas C, Bina P, Perseu L, Galanello R. Clinical and molecular analysis of haemoglobin H disease in Sardinia: haematological, obstetric and cardiac aspects in patients with different genotypes. *Br J Haematol.* 2007 Jan; 136(2):326-32. Epub 2006 Nov 27.

-Orphanet. Consultado en Febrero de 2014. Disponible en http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=232&lng=ES.

-Orphanet. Consultado en Marzo de 2014. Disponible en [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=ES&data_id=51&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=talasemia&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Enfermedade\(s\)/grupo%20de%20enfermedades=Beta-talasemia&title=Beta-talasemia&search=Disease_Search_Simple](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=ES&data_id=51&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=talasemia&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Enfermedade(s)/grupo%20de%20enfermedades=Beta-talasemia&title=Beta-talasemia&search=Disease_Search_Simple).

- Observatorio de Salud Infantil y Perinatal (OSIP): www.sp.san.gva.es/osip/

-Oski FA and Naiman JL. Hematologic problems in the newborn. Third edition. W.B. Saunders. 1982.

-Park SS, Cho HI. Beta-thalassemia in the Korean population. *Int J Hematol.* 2002 Aug; 76 Suppl 2: 93-5.

- Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ, Smith DH, Gilles HM. Fetal haemoglobin and malaria. *Lancet*. 1976; 1 :1269-1272.
- Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ. Effects of foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 1977; 270 :171-173 .
- Pequeñuela O. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador.. *Colombia Médica, North America*, 36, Nov. 2009.
- Pérez Sirvent M, Moreno Miralles I, Bolufer Gilabert P. Alteraciones moleculares de las talasemias en España. Revisión de los estudios existentes. *Med Clin (Barc)* 1999; 113: 789-94.
- Perutz MF Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Q Rev Biophys*. 1989 May; 22(2): 139-237.
- Perutz MF. Structure and mechanism of haemoglobin. *Br Med Bull* 1976; 32: 195-208.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg. MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk. Factors for early death. *N Engl J Med*. 1994; 330(23): 1639-44.
- Pornprasert S1, Moriyama A, Kongthai K, Waneesorn J, Jaiping K, Treesuwan K, Hattori Y. Detection of beta-thalassemia/hemoglobin E disease in samples which initially were diagnosed as homozygous hemoglobin E. *Clin Lab*. 2013;59 (5-6):693-7.
- Pung-amritt P, Tanphaichitr VS, Tachavanich K, Suwantol L, Glomglao W. Prevalence of HB E from cord blood samples and after one year follow-up. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999; 30 Suppl 2:97-9.
- Purohit P., Dehury S., Patel S., Patel DK. Prevalence of deletional alpha thalassemia and sickle gene in a tribal dominated malaria endemic area of eastern India. *ISRN Hematol*. 2014 Mar 11; 2014: 745245. doi:

10.1155/2014/745245. eCollection 2014.

-Queiro Verdes. Informe Avalit 2013.

-Qiu QW, Wu DD, Yu LH, Yan TZ, Zhang W, Li ZT, Liu YH, Zhang YP, Xu XM. Evidence of recent natural selection on the Southeast Asian deletion (SEA) causing α -thalassemia in South China. *BMC Evol Biol.* 2013 Mar 11; 13: 63. doi: 10.1186/1471-2148-13-63.

-Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR. Survival of children with sickle cell disease. *Blood.* 2004; 103: 4023-7.

-Randhawa Z.I., Jones, R.T., and Lie-Injo, L.E. 1984. Human hemoglobin Portland II ($\zeta 2\beta 2$). *J. Biol. Chem.* 259: 7325-7330.

-Rapaport, S. 1979. Introducción a la Hematología. Primera edición. Salvat. Barcelona, España.

-Rees DC, Styles L, Vichinsky EP, Clegg JB, Weatherall DJ. The hemoglobin E syndromes. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Jun 30; 850:334-43.

-Rees DC. Hemoglobin F and hemoglobin E/beta-thalassemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2000 Nov-Dec; 22(6): 567-72.

-Reissmann KR, Ruth WE, Nomura T. A human hemoglobin with lowered oxygen affinity and impaired heme-heme interactions. *J Clin Invest.* 1961; (40):1826-1833.

-Richard RE. The management of sickle cell pain. *Curr Pain Headache. Rep.* 2009; 13(4): 295-7.

-Risueño C, Castro JM, Villegas A, Muñoz JA. Las hemoglobinopatías en la Bahía de Cádiz. *Sangre* 1995; 40: 233-234.

-Rizo Baeza J. Edad y origen de la madre como factores de riesgo de prematuridad. Tesis Doctoral 2012. Universidad de Alicante.

- Rodríguez, W, y Saenz, G. R. Haplotipos de la hemoglobina S: Importancia epidemiológica, antropológica y clínica. Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica. 1995.
- Rojas-Jiménez S, et al. Complicaciones cardiopulmonares en anemia de células falciformes. Arch CardiolMex. 2013.
- Roldán A. Variables condicionantes en el cribado neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva. Tesis doctoral 2013. Universidad Miguel Hernández.
- Ropero P., González F.A., Hernández A., Sánchez H., Cela E., Villegas A. Diagnóstico prenatal de hemoglobinopatías y talasemias. 24 Enero 2009. Medicina clínica Vol. 132. Núm. 02.
- Rockville, MD. Sickle Cell Disease Guideline Panel. Sickle Cell Disease: Screening, Diagnosis, Management, And Counseling In Newborns And Infants. Agency for Health Care Policy and Research, Public Health Service, US Department of Health and Human Services, April 1993; Clinical Practice Guideline No. 6. AHCRP Pub. No 93-0562.
- Ruano A y Jato M. Cribado neonatal de hemoglobinopatías. Santiago de Compostela: Servicio Galego de Saúde. Axencia de Avaliación de Tecnoloxias Sanitarias de Galicia, avalia-t. Avaliación de tecnoloxías. 2004. Informes de evaluación: INF2004/004.
- Saenz-Renauld, German F. Hemoglobinas anormales. Acta méd. costarric, San José , v. 47, n. 4, Oct. 2005.
- Saetung R., Ongchai S., Charoenkwan P., Sanguansermisri T. Genotyping of beta thalassemia trait by high-resolution DNA melting analysis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2013 Nov; 44(6): 1055-64.
- Saez P. Nuevo modelo de alta precoz para el niño pretérmino: impacto sobre el

bienestar psicológico de los padres, calidad y costes asistenciales. Tesis doctoral 2008, Universidad Miguel Hernández.

-Salazar-Lugo, R. 2004. La hemoglobina S en la población venezolana. *Investigación Clínica*, 45: 175- 183.

-Sanchaisuriya K, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya P, Changtrakul, et al. A reliable screening protocol for talasemia and hemoglobinopathies in pregnancy: an alternative approach to electronic blood cell counting. *Am J clin Pathol* 2005; 123: 113-118.

-Sans-Sabrafen, Besses, Raebel. *Hematología clínica*. Edit Hartcourt, 2001. 4a ed. Introducción al estudio de la patología eritrocitaria. Bases bioquímicas y fisiológicas Pp. 66-67. Hemoglobinopatías Pp.188-191. Anemia de células falciformes Pp 221-228.

-Sans-Sabrafen. *Hematología Clínica*. 5ª edición. Doyma Libros. 994. 2006.

-Sargento GR, Ceulen CD , Lethbridge R , Morris J , Singhal A , Thomas PW. The painful crisis of homozygous sickle cell disease: clinical features. *Br J Haematol*. 1994; 87(3): 586-91.

-Schechter A. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008; 12: 3927-3938.

-Schröter W, Nafz C. Diagnostic significance of hemoglobin F and A2 levels in homo- and heterozygous beta-thalassemia during infancy. *Helv Paediatr Acta*. 1981; 36(6):519-25.

-Schultz R. Proteínas fisiológicas. En: Devlin T (ed.). *Bioquímica*. Barcelona: Reverté; 1993. p. 95-133.

-Sharma A, Marwah S, Buxi G, Yadav R. Hemoglobin e syndromes: emerging diagnostic challenge in north India. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2013 Mar; 29(1):21-5. Epub 2012 Jan 31.

- Soler JIA, Ferrer I, Garrido M, et al (revisado feb. 2007). Hemoglobinopatías. Recopilación de datos de revisiones bibliográficas. Algoritmos diagnósticos de estas anemias en el laboratorio de bioquímica, inmunología y hematología. Generalitat Valenciana. Hospital Virgen de los Lirios, Alcoy. Pp: 239-291.
- Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, Orringer E, Bellevue R, Olivieri N, Eckman J, Varma M, Ramirez G, Adler B, Smith W, Carlos T, Ataga K, DeCastro L, Bigelow C, Sauntharajah Y, Telfer M, Vichinsky E, Claster S, Shurin S, Bridges K, Waclawiw M, Bonds D, Terrin M. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA*. 2003; 289(13): 1645-1651.
- Stinson J, Naser B. Pain management in children with sickle cell disease. *Paediatr Drugs*. 2003; 5(4): 229-41.
- Svarch E. Fisiopatología de la drepanocitosis *Rev cub hematol inmunol* 2009; 25(1): 3.
- Telen M. Eritrocitos maduros. En: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens J, Lukens J (eds.). *Wintrobe Hematología clínica*. Buenos Aires: Intermédica; 1994. p. 80-105.
- Thein, S. y Craig, J.E. 1998. Genetics of Hb F/F cell variance in adults and heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hemoglobin*, 22: 401-404.
- Travi, M.; Cremonesi, L.; Primignani, P.; Di Benedetto, S; Testa, R.; Schiliro, G. y Ferrari, M. 1992. Molecular characterization of hemoglobin C in Sicily. *American Journal of Hematology*, 39: 5- 8.
- UNESCO: Declaración Internacional sobre datos genéticos humanos. Portal.unesco.org/shs/en/file_download.php/022084a4a592c5d4ef2e8dc28972c631Declaration_Sp.pdf.

- Vera L.F. La hemoglobina: una molécula prodigiosa. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp) Vol. 104, N^o. 1, pp 213-232, 2010
- Verra F, Bancone G, Avellino P, Blot I, Simporé J, Modiano D. Haemoglobin C and S in natural selection against Plasmodium falciparum malaria: a plethora or a single shared adaptive mechanism? Parassitologia. 2007 Dec; 49(4): 209-13.
- Verra F, Simporé J, Warimwe GM, Tetteh KK, Howard T, Osier FH, Bancone G, Avellino P, Blot I, Fegan G, et al. Haemoglobin C and S role in acquired immunity against Plasmodium falciparum malaria. PLoS One. 2007 Oct 3; 2(10):e978. Epub 2007 Oct 3.
- Vichinsky E, Hurst D, Earles A, Kleman K, Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: Effect on mortality. Pediatrics 1988; 81:749-55. 4. Githens JH, Lane PA, McCurdy RS, Houston ML, McKinna JD, Cole DM. Newborn screening for hemoglobinopathies in Colorado: The first 10 years. Am J Dis Child 1990; 144:466-70.
- Vichinsky E. Hemoglobin e syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007; 79: 83.
- Villegas A, Ropero P, González FA, Anguita E, Espinós D. The thalassaemia syndromes. Molecular characterization in Spanish population. Hemoglobin. 2001 Aug; 25(3): 273-83.
- Villegas A, Sánchez J, Sal del Río E. α -globin genotypes in a Spanish population. Hemoglobin 1992; 16: 427-429.
- Villegas A. Patología de la hemoglobina en la población española y en la población emigrante. An. Med. Interna (Madrid). 2006 Mayo [citado 2014 Feb 25]; 23(5): 203-205.
- Vives-Corrons JL. Anemias por defectos congénitos de la hemoglobina. Hemoglobinopatías estructurales y talasemias. Medicine. 2001;8:2684-93

- Vives-Corronns, JL. Avance en la detección y diagnóstico de las anemias poco frecuentes. 2005. *Haematologica*, 90: 6- 11.
- Weatherall DJ, Clegg JB. *The thalassaemia syndromes*. 3ª ed. Oxford: Blackwell; 1981.
- Why are hemoglobin F levels increased in HbE/beta thalassemia? Rees DC, Porter JB, Clegg JB, Weatherall DJ. *Blood*. 1999 Nov 1; 94(9):3199-204.
- William TN, Uyoga S, Macharia A, et al. Bacteraemia in Kenyan children with sickle cell anemia: a retrospective cohort and case-control study. *Lancet*. 2009; 374: 1364-70.
- Wiwanitkit V. Hemoglobin E disorder: Newborn screening program. *Indian J Hum Genet*. 2013 Jul; 19(3):279-281.
- Wong WY. Prevention and management of infection in children with sickle cell anaemia. *Paediatr Drugs*. 2001; 3(11): 793-801.
- Yang YM, Andrews S, Peterson R, et al. Prenatal sickle cell screening education effect on the follow up rates of infants with sickle cell trait. *Patient Educ Couns*. 2000; 39: 185-9.
- Grossman LK, Holtzman NA, Charney E, Schwartz AD. Neonatal screening and genetic counseling for sickle cell trait. *Am J Dis Child*. 1985 Mar; 139(3): 241-4.
- Tchernia G, Bardakdjian J, Lainé A, Ly A, Orssaud G, Larnaudie S. A center in Paris for screening and counselling sickle cell patients and carriers. *Bull Acad Natl Med*. 2008 Oct; 192(7): 1349-59; discussion 1359-60.



10. ANEXOS

PERCENTILES DE LOS VALORES DE NORMALIDAD DE LAS DIFERENTES HEMOGLOBINAS NEONATALES

Variación con la edad gestacional, días de vida y grupo étnico



10. ANEXOS

ANEXO 1: GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA DE CÉLULAS FALCIFORMES PEDIÁTRICA SEHOP DE 2010. CAPÍTULO 3: SEGUIMIENTO

Los pacientes diagnosticados de ECF deben tener acceso idealmente a un “cuidado integral” de su trastorno, lo cual implicaría lo siguiente:

- Si existe una urgencia:
 - Poder tener acceso a un hospital local cercano al domicilio con guías específicas para el tratamiento de procesos agudos.
 - Posibilidad de traslado de enfermos graves a un centro con Unidad de Cuidados Intensivos y Cirugía pediátrica.
- Si se produce una hospitalización:
 - Atención por Pediatra o Hematólogo especializados.
 - Acceso a enfermería especializada.
 - Posibilidad de pruebas avanzadas de imagen: TC, RM, medicina nuclear.
 - Existencia de una “Unidad del dolor”.
 - Acceso a otros especialistas pediátricos (ortopedas, neurólogos, gastroenterólogos, cardiólogos, oftalmólogos, neumólogos, ORL, cirujanos, anestesiastas, intensivistas, equipos de trasplante de progenitores hematopoyéticos), y a obstetras y medicina fetal.
 - Conexión con unidades de Hematología de adultos.
 - Existencia de un Banco de sangre.

En el seguimiento ambulatorio:

– Posibilidad de realización de Eco Doppler transcraneal, seguimiento de complicaciones crónicas por otros especialistas pediátricos (nefrólogos, neumólogos, cardiólogos, neurólogos, oftalmólogos, ORL, cirujanos, endocrinos).

– Atención por enfermera especializada, psicólogo, genetista, trabajador social y educadores de apoyo ante dificultades cognitivas.

– Conexión con pediatra de atención primaria y con grupos de soporte (asociaciones de afectados).

– Concienciación ante las autoridades sanitarias de que la ECF debe considerarse una enfermedad crónica con exacerbaciones agudas que causa efectos a largo plazo en la educación, la vida familiar, la integración social y la calidad de vida del niño. Los padres deben tener unas instrucciones claras sobre cuándo acudir a su pediatra de atención primaria y cuándo ir al hospital (ver síntomas de alarma en capítulo 9). Como regla general si no hay complicaciones intercurrentes, el seguimiento se puede realizar del siguiente modo, aunque puede variarse según la gravedad del genotipo y las manifestaciones de la enfermedad, y si toman o no hidroxiurea:

Menores de 1 año: cada 3 meses.

Entre 1 y 5 años de edad: cada 6 meses

A partir de 6 años: cada 12 meses

• **En cada revisión:**

– Anamnesis minuciosa (dolor, ictericia, coluria, priapismo, nicturia, poliuria, síntomas de apnea obstructiva del sueño) y revisar si cumple el tratamiento

prescrito y si está al día en vacunas. Educación sanitaria por enfermería (tratamiento del dolor, síntomas de alarma, ver apartado 6.11).

- Exploración, incluyendo peso y talla (con gráfica de percentiles para valorar la curva estáturo-ponderal) y estadio de Tanner.
- Recuentos capilares, o en su defecto, hemograma.
- Si toma hidroxiurea, cuantificación de HbF, bioquímica y hemograma con reticulocitos como mínimo cada 3 meses.
- Si está en régimen hipertransfusional cuantificación de HbS pretransfusional y hemograma pre y post-transfusión.
- Si fatiga, síncope o dolor torácico o hipoxia basal, sospechar hipertensión pulmonar (remitir a cardiología).
- Si dolor repetido abdominal, Eco abdominal para valorar colecistopatía.
- Consejo genético a los adolescentes. Comentar con los niños el posible retraso puberal, pero si no hay signos puberales a los 13 años remitir a Endocrinología. En niñas, revisión ginecológica si relaciones sexuales y valorar el uso de anticonceptivos si toman hidroxiurea.

- **Anualmente:**

- En la anamnesis incluir el rendimiento escolar. Evaluación psicosocial.
- Hemograma con reticulocitos.
- Bioquímica sanguínea. Si transaminasas o bilirrubina conjugada persistentemente elevadas, biopsia hepática para descartar cirrosis.
- Cuantificación de HbF y S hasta los 2 años, y un control posterior a los 5.

- Orina simple. Microalbuminuria en orina de 24 h para los mayores de 6 años.
- Aclaramiento de creatinina a partir de los 12 años.
- Monitorización de Sat O₂, Tensión arterial.
- Ferritina.
- Revisión oftalmológica a partir de los 8 años (puede ser cada 2 años y anualmente en la adolescencia)
- Eco-Doppler transcraneal para determinar el riesgo de accidente cerebrovascular (ACVA) entre los 2 y 16 años de edad en pacientes con formas SS y S β 0, llevando más de 2 meses sin transfundirse. La causa más frecuente de infarto cerebral es la obstrucción de las arterias carótida interna y cerebral media. Estas lesiones pueden detectarse precozmente con Eco-Doppler transcraneal, ya que la velocidad de la sangre es inversa al diámetro arterial. Se debe registrar el más alto de los valores de velocidad-flujo media (no el pico máximo) ponderada en el tiempo, en incrementos de 2 mm, en la arteria cerebral media (en 3 puntos) y la carótida interna. Se recomienda repetir las exploraciones anormales, dada la trascendencia terapéutica de su diagnóstico. Se considera:
 - NORMAL: todas las mediciones < 170 cm/seg.
 - ANORMAL: > 200 cm/seg en alguna medición en carótida interna o cerebral media.
 - DUDOSO o CONDICIONAL: valores entre 170-199 cm/seg, o no se puede medir en una de las arterias cerebrales medias. Repetir en 3-6 meses.

- **NO INFORMATIVO:** por la maduración ósea puede perderse la ventana para el ultrasonido, o si hay oclusión por enfermedad arterial avanzada no puede interpretarse. En estos casos puede ser útil realizar una angioRM.

Los valores anormales >220 cm/seg son de alto riesgo e implican que el niño debe tratarse con régimen hipertransfusional (simple o exanguino parcial, ver apartado 6.2), para conseguir una HbS pretransfusional $<30\%$. Aunque el tratamiento con hidroxiurea puede disminuir los flujos no se ha demostrado aunque sea útil en la prevención primaria de ACVA. Otros tratamientos posibles son el uso de aspirina, o la CPAP nocturna, aunque de ninguno de ellos se tienen aún resultados en ensayos controlados. Los valores anormales entre 200 y 219 cm/seg deben repetirse en un corto intervalo de tiempo (2 meses), y si persisten en estas cifras, será recomendable igualmente el régimen hipertransfusional.

- **Cada 2 años:**
 - Si ha recibido transfusiones, serología HIV, hepatitis B y C.
 - Eco abdominal a partir de los 6 años, y valorar espaciar a cada 4 años.
 - Valoración neuropsicológica por especialista con tests neurocognitivos, que puedan alterarse cuando hay infartos silentes.
 - Examen por neurólogo pediátrico si existe una Eco-Doppler transcraneal patológica o lesiones en RM o ACVA previo.
 - RM cerebral (T1, FLAIR, T2, difusión, buscando infartos cerebrales silentes) a partir de los 4 años de vida, y si es normal, repetir otra entre los 8-10 años de edad aunque no tenga clínica. Debe realizarse antes de los 4 años o repetir más frecuentemente si hay cefaleas de repetición, síntomas psiquiátricos o neurológicos, retraso escolar, o si la Eco-Doppler transcraneal es anormal, y en

este caso o si se han producido ACVAs, asegurar que se hace angioRM para tener angiogramas de las carótidas y cerebrales medias. Las estenosis deben clasificarse como leves (<25%), moderadas (25-75%), graves (>75%) u oclusión completa.

- Audiometría a partir de los 4 años.
- Pulsioximetría nocturna a partir de los 4 años, especialmente indicado si hay clínica de SAHOS, hipertrofia adenoidea, enuresis nocturna en mayores de 6 años, o Eco- Doppler transcraneal anormal.
- Revisión en odontopediatría a partir de los 5 años.
- Si retraso de talla importante a partir de los 6 años, realizar cariotipo en niñas, anticuerpos de celiaquía, y valorar función tiroidea. Si es a partir de los 10 años, a lo anterior añadir edad ósea y densitometría ósea.
- Rx de tórax si no se ha hecho en los 2 años previos.
- Revisión cardiológica a partir de los 8 años para descartar hipertensión pulmonar, o antes si síntomas. Debe determinarse la velocidad de regurgitación tricuspídea (anormal si >2.5 m/s) y realizar cateterismo cardíaco si sospecha de hipertensión pulmonar.
- Pruebas de función respiratoria a partir de los 8 años, o antes si ha presentado algún episodio de STA.
- Cribado de necrosis avascular de cadera-hombro: si dolor o limitación a la rotación externa, realizar Rx o RM (con esta última la detección es más precoz).

ANEXO 2: PNT-CN-08 DETERMINACIÓN DE ANEMIA FALCIFORME EN PAPEL FILTRO CON EL VARIANT NBS

COPIA Nº:

FECHA DE ENTREGA:

SERVICIO: ANÁLISIS CLÍNICOS

DESTINATARIO:

CARGO:

CONTROL de MODIFICACIONES		
Descripción	Edición	Fecha Edición

REVISADO: Responsable de Calidad **APROBADO:** Jefe de Servicio

Fecha de Revisión: _____ **Fecha de Aprobación:** _____

Firma: _____ **Firma:** _____

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS Y DEFINICIONES
4. DESARROLLO
5. RESPONSABILIDADES
6. FORMATOS/ESPECIFICACIONES
7. INDICADORES
8. REGISTROS
9. ANEXOS



1. Objeto

Describir las actividades desarrolladas por el LABORATORIO de ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE para realizar la determinación cualitativa de anemia falciforme en especímenes de sangre desecada en papel de filtro.

2. Alcance

Describir las actividades empleadas en el **Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General de Alicante** para realizar la separación e identificación de las variantes de hemoglobinas F, A, S, D, C y E, en especímenes de sangre neonatal recogidos sobre papel de filtro. Los patrones serán normales, portadores (FAS, FAC) y afectos (FS y FSC). La condición de inclusión de una variante en el patrón es que tenga un 1% respecto al área de hemoglobina adulta (A). Son pruebas utilizadas en el cribado neonatal.

3. Referencias y definiciones

- UNE-EN-ISO 9001:2008: Sistemas de Gestión de la Calidad (SGC) - Requisitos.
- UNE-EN-ISO 9000:2000: SGC - Fundamentos y Vocabulario.
- UNE-EN-ISO 9004:2000: SGC - Guía de la Mejora Continua.
- Decreto 108/2000 para la Autorización de los Laboratorios Clínicos.
- Manual de la Calidad
- Manual de Instrucciones Variant nbs

4. Desarrollo

Principios del método

VARIANTnbs utiliza los principios de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la separación y la determinación de hemoglobinas F, A, S, D, C y E. Las muestras se extraen de eluidos de manchas de sangre neonatales recogidas en papel de filtro en microplacas y se introducen en el circuito mediante inyección automática. La muestra es transportada por el tampón hasta la columna de análisis, donde se separan sus componentes. Dichos componentes circulan por el detector de doble longitud de onda, donde se mide su absorbancia a $\lambda = 415\text{nm}$. El ruido de fondo se reduce mediante el uso de una $\lambda = 690\text{nm}$. El software GDM muestra los resultados como un cromatograma (gráfico de tiempo frente a voltios).

4.2. Material y Aparatos

Plate Puncher (Taladro automático) Wallac.

- Placas de 96 pocillos con fondo en forma de U
- Lejía 1:10
- Agitador de placas
- Pipetas

4.3. Reactivos y marcadores

Se guardan en la Cámara Frigorífica BG-5 a $5\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6.1

- **Reactivos**

Los reactivos son específicos y exclusivos para la realización del análisis de las variantes de hemoglobina y son suministrados por Bio-Rad. El Kit *VARIANTnbs Sickle Cell Program* contiene:

- Elution buffer 1: dos botellas de 2500 mL de tampón sodio fosfato, pH 6.5. Contiene <0.05% de acida sódica.

- Elution buffer 2: una botella de 2500mL de tampón sodio fosfato, pH 6.6. Contiene <0.05% de acida sódica.

- Columna analítica: dos columnas de intercambio catiónico, 4.6mm ID x 30 mm, para 500 test/columna.

- Solución de lavado: una botella de 1800mL de agua destilada con <0.05% de acida sódica.

- *Primer*: 10 viales de hemolizado celular de sangre liofilizada con gentamicina, tobramicina y EDTA. Conservar en refrigeración a 5 ± 3 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

- CD-ROM: contiene los parámetros del kit.

- **Marcadores de tiempo de retención**

5 viales de marcador 1 (FAES) y 5 viales de marcador 2 (FADC). Contienen hemolizado celular de sangre liofilizado con gentamicina, tobramicina y EDTA. Conservar en refrigeración a 5 ± 3 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

4.4. Desarrollo del método

- **Características de la muestra**

La Sección de Cribado neonatal recibe los especímenes de sangre sobre papel de filtro obtenidos mediante punción en el talón. El procedimiento de extracción y envío de las muestras están descritos en la normativa de la Consellería de Sanidad, la recepción de las muestras está descrita en el documento PNT-CN-01.

Las muestras se conservan en recipientes herméticos en la Cámara Frigorífica BG-5 a 5 ± 3 °C hasta la realización del análisis. Si éste se demorara más de una semana se mantendrán en congelador a -20 ± 5 °C.

- **Operaciones previas**

Reconstituir el *primer* con 500 µL de agua desionizada. Dejar en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitarlo en el agitador de balanceo durante aproximadamente 5 minutos.

Cuando sea necesario, reconstituir de la misma manera que el *primer* los marcadores del tiempo de retención con 5mL de agua desionizada. Apuntar en los viales la fecha de reconstitución. Estos viales son estables durante 15 días desde la fecha de reconstitución cuando son conservados entre 2/8°C.

- **Preparación de la Hoja de trabajo**

Rellenar el R1-PNT-CN-08 Hoja de trabajo de hemoglobinas identificando las muestras por sencillo.

- **Realización**

Obtener discos de 3mm de diámetro de las muestras depositándolos en los pocillos de la placa según su situación en R1-PNT-CN-08 Hoja de trabajo de hemoglobinas, empezando en el pocillo A4 hasta el H10. Preferiblemente utilizar las muestras del paquete de TSH. Añadir 250µL de agua destilada a cada uno de los pocillos que contienen disco. Incubar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente. Agitar 5 minutos en el agitador de placas en la posición "slow".

Tras la agitación agregar 200µL de agua destilada y de marcadores de tiempo de retención en los pocillos destinados a ellos. Preparar una placa aparte con 200µL de *primer* en uno de los pocillos, o en dos pocillos si es la primera vez que se usa la columna analítica.

Crear la lista de trabajo y lanzar el trabajo siguiendo las instrucciones del PNT-CN-07.

4.5. Control de la calidad del método

- **Control Interno (E1-PNT-CN-08)**

En cada placa se incluyen dos marcadores de tiempo de retención al inicio y al final de la placa.

-Criterios de aceptabilidad y reglas de decisión.

Todos los analitos de los marcadores deberán ser identificados correctamente.

-Criterios de repetición.

Una vez revisados los marcadores se comprueba que todos han sido correctamente identificados y se evalúan todos los resultados de muestras para comprobar los fenotipos.

En caso de que aparezca un **pico dudoso** o haya sospechas de que los tiempos de retención hayan variado se repetirá por sencillo. Si el resultado es **“not determined”** la muestra se repetirá con dos discos de 3 mm por sencillo. En ambos casos se anotarán en la hoja de trabajo de la serie siguiente y en R3-PGS-CN “Dietario del año en curso”. Registro repeticiones. Si aparece algún fenotipo no normal (Sec. 9 del manual del Variant nbs), se guardan las muestras en el último cajón del congelador BE1-5 para comprobar mediante electroforesis capilar.

4.6. Expresión de resultados

Los resultados se expresan como fenotipo.

Los fenotipos posibles son:

FA resultados normales.

FAS, FS, FSC y FAC son resultados que indican el posible diagnóstico de una anemia falciforme. Se confirmaran mediante Electroforesis capilar.

A indica hemoglobina adulta (transfusión).

AF indica mayor porcentaje de hemoglobina adulta frente a la fetal.

4.7. Registro de los resultados y comunicación de los mismos.

Los resultados se registran en la ficha informatizada del recién nacido del programa MetaB, mediante la opción registro de resultados, exclusiva del personal facultativo

Las hojas de trabajo, los cromatogramas de los marcadores de tiempo y la lista de resultados (R2-PNT-CN-08 marcadores de tiempo y resultados del Cribado Neonatal de anemia falciforme) se imprimen y guardan en papel durante al menos cinco años, se guardan en las estanterías de la sección por años, los del mes en curso están en un AZ eliminándose consecutivamente.

Una vez introducidos los resultados, se validan, apareciendo para su validación individual, todos aquellos casos que hayan sido dudosos, repetición de muestras por cualquier motivo, valores altos, etc.

Los casos patológicos son comunicados a los padres y centros de seguimiento para que sean sometidos a análisis de confirmación diagnóstica y tratamiento y se guarda un registro en papel en R5-PGS-CN Carpeta registros positivos

5. Responsabilidades

Es responsabilidad del personal técnico de la sección el desarrollo del método en todas sus fases bajo la supervisión del personal facultativo.

Es responsabilidad del personal facultativo de la sección el registro y la validación de los resultados.

La llamada para cita y petición de nuevas muestras una vez indicada por el personal facultativo puede realizarla cualquiera de los estamentos del personal,

únicamente cuando los padres soliciten una información adicional, será el personal facultativo el encargado de dársela.

Se procurará no realizar en viernes o días previos a festivos la comunicación de valores dudosos o altos para no intranquilizar a los padres.

La comunicación de resultados positivos a los centros de seguimiento será realizada por el personal facultativo o bajo su supervisión.

6. Formatos/Especificaciones

E1-PNT-CN-08 Control de calidad interno de anemia falciforme en sangre desecada en el Variant nbs.

7. Registros

- Programa de la Consellería de Sanitat "MetaB".
- R1-PNT-CN-08 Hoja de trabajo de hemoglobinas en Variant nbs
- R2-PNT-CN-08 Marcadores de tiempo y resultados del Cribado Neonatal de anemia falciforme
- R2-PGS-CN Control de reactivos.
- R3-PGS-CN "Dietario del año en curso". Registro repeticiones
- R5-PGS-CN Carpeta registros positivos

➤ **ANEXO 3: PNT-CN-06 DETERMINACIÓN DE ANEMIA FALCIFORME EN CAPILLARIS**

COPIA Nº:

FECHA DE ENTREGA:

SERVICIO: ANÁLISIS CLÍNICOS

DESTINATARIO:

CARGO:

CONTROL de MODIFICACIONES		
Descripción	Edición	Fecha Edición

REVISADO: Responsable de Calidad **APROBADO:** Jefe de Servicio

Fecha de Revisión: _____ **Fecha de Aprobación:** _____

Firma: _____ **Firma:** _____

1. OBJETO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS Y DEFINICIONES
4. DESARROLLO
5. RESPONSABILIDADES
6. FORMATOS/ESPECIFICACIONES
7. INDICADORES
8. REGISTROS
9. ANEXOS



1. Objeto

Describir las actividades desarrolladas por la sección de cribado neonatal del LABORATORIO de ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE para la determinación cualitativa de anemia falciforme en especímenes de sangre desecada en papel de filtro.

2. Alcance

Se aplica como método de confirmación a todas las muestras de sangre neonatal recogidos sobre papel de filtro, en las que en el análisis por cromatografía (Variant nbs) se hayan identificado variantes anormales de hemoglobina. Se separan e identifican las variantes de hemoglobinas F, A, S, D, C, E y hemoglobina de Bart. Los patrones serán normales, portadores (FAS, FAC) y afectos (FS y FSC).

3. Referencias y definiciones

- UNE-EN-ISO 9001:2008: Sistemas de Gestión de la Calidad (SGC) - Requisitos.
- UNE-EN-ISO 9000:2000: SGC - Fundamentos y Vocabulario.
- UNE-EN-ISO 9004:2000: SGC - Guía de la Mejora Continua.
- Decreto 108/2000 para la Autorización de los Laboratorios Clínicos.
- Manual de la Calidad
- Manual de Instrucciones Capillarys.

4. Desarrollo

4.1. Principios del método

Descritos en el PNT-BE2-11 CAPILLARYS, del que existe la copia controlada n° 3 en esta sección.

4.2. Material y Aparatos

Descritos en el PNT-BE2-11 CAPILLARYS .

4.3. Reactivos y Controles

- Reactivos

Se guardan en la Cámara Frigorífica BG-5 a 5 ± 3 °C

-Tampón: vial 700 ml, listo para usar.

-Solución hemolizante para sangre desecada en papel.

-Solución de lavado. Contiene sosa caustica.

-Segmentos de dilución.

-Filtros.

- Controles de migración y control de calidad

Se guardan hasta su reconstitución en la Cámara Frigorífica BG-5.

Una vez reconstituidos se guardan en el arcón-congelador BE2-16.

-Control Hb AF. 1 vial liofilizado. Obtenido a partir de sangres humanas normales. Conservar en nevera (2-8° C) hasta su reconstitución.

Se utiliza como marcador de migración antes de cada serie.

-Control ASFC. Obtenido a partir de sangres humanas normales. Conservar en nevera (2-8° C) hasta su reconstitución.

Se utiliza como control de calidad.

4.4. Desarrollo del método

- **Características de la muestra:**

Sangre sobre papel de filtro obtenida mediante punción en el talón.

Guardadas en congelador BE1-5, en el cajón de abajo.

- **Operaciones previas.**

Preparación de los controles:

- Añadir 1 ml de agua destilada.
- Dejar en reposo 30 minutos y agitar suavemente evitando la formación de espuma. Pasar a un tubo eppendorf. Una vez reconstituido guardar en congelador BE2-16.
- Si los controles ya están congelados, sacarlos del congelador.

- Realización de la lista de trabajo.
- Rellenar el R1-PNT-CN-06 lista de trabajo capillarys con las muestras a analizar.
- Preparación de las muestras:

-Colocar un segmento de dilución en el soporte (cabén un máximo de 12 segmentos).

-Marcar los pocillos del segmento de dilución del 1 al 8, EMPEZANDO POR LA DERECHA (en la parte opuesta al código de barras)

-Dispensar 50 μ l de agua destilada en cada pocillo del segmento de dilución, dejando un pocillo vacío para el control AFSC.

-Obtener las muestras con el perforador manual de Capillarys (guardado en uno de los armarios del cuartito de cribado) depositándolas en los pocillos del segmento de dilución según posición en el R1-PNT-CN-08 Hoja de trabajo de Capillarys, y COINCIDIENDO CON EL NÚMERO MARCADO EN EL POCILLO.

-Poner el soporte con los segmentos en la cámara húmeda Capillarys, guardar la cámara en nevera.

-Dejar que la muestra se impregne con agua destilada un mínimo de 2 horas y un máximo de 72 horas.

4.5. Procedimiento.

Preparación del análisis:

-Encender el aparato: la regleta de enchufes y el ordenador.

-Abrir el programa capillarys desde el icono Sebia del escritorio (contraseña: SEBIA)

-Cuando se enciende el programa aparece una ventana en la que se indica el nivel de reactivo que tiene cada contenedor, se puede modificar, si no es el nivel correcto, cambiar el reactivo o eliminar desechos.

-Cambiar el tampón.

-Se abre una ventana pequeña (ventana de estado del capillary), el aparato hace una serie de operaciones (cebado, calibración...), cuando aparece cebado: cambiar la técnica en el icono de modo de trabajo del programa (arriba a la derecha), poner Neonatal Hb. Cambiar la técnica también en la barra de debajo de la pantalla por Neonatal Hb. Cuando ha terminado la ventana de estado indicará READY y se puede empezar a trabajar.

-Poner el control AF de la siguiente manera:

- Poner el eppendorf con el control AF en el tubo que tiene el código de barras de AF(guardado en la caja del KIT)
- Colocarlo en la posición 1 del cargador 0.
- Poner un tubo con 1ml de solución hemolizante (la que pone papel) en la posición 8 del cargador.
- Poner un segmento de dilución verde en el cargador.
- Introducir el cargador en el aparato.
- Seleccionar Hb AF y dilución automática (en una ventana que aparece).

- Cuando el control termine VOLVERLO A PASAR (HAY QUE PASARLO 2 VECES).
 - Esperar a que salgan los dos controles, si han salido bien (los dos picos de hemoglobina están bien definidos) se pueden pasar las muestras.
 - Poner en el pocillo que se ha dejado vacío del segmento de dilución 35 µl de agua destilada y 10 µl de control ASFC

- Colocar el segmento de dilución con las muestras eluidas y el control en un cargador.
- Poner un tubo con 0.6 ml de solución hemolizante en la posición 8 del cargador.
- Introducir en el Capillarys.
- Cuando el análisis termine volver a cambiar la técnica por Protein (E), cambiar el tampón por el de proteínas y avisar al personal que trabaja habitualmente con el Capillarys.

4.5.2. Análisis de resultados.

- Las variantes presentes en la muestra son identificadas según su posición o zona de migración, centrados respecto a la hemoglobina A del control AF.
- A medida que las muestras se analizan van saliendo en pantalla los perfiles electroforéticos de cada muestra. Para identificar las muestras ir en cada una de ellas a identificación y poner el número de muestra según la lista de trabajo R1-PNT-CN-06.
- Desde el ordenador MAESTRO imprimir un control AF y las muestras y control ASFC (para esto cambiar en la parte de abajo del maestro la técnica a Neonatal Hb), ir a edición de curvas/impresión de informes y seleccionar los que queremos e imprimir.

4.6. Control de la calidad del método

-Control Interno (E1-PNT-CN-06)

En cada serie se pone:

- Control Hb AF como se describe en preparación de análisis, se hacen 16 replicados del control.
- Control ASFC

-Criterios de aceptabilidad y reglas de decisión:

Todas las variantes de los controles deberán ser identificados correctamente.

-Criterios de aceptación:

Una vez revisados los marcadores se comprueba que todos han sido correctamente identificados y se evalúan todos los resultados de muestras para comprobar los fenotipos.

En caso de que aparezca alguna discordancia importante con los resultados del HPLC, se pedirá nueva muestra para confirmar.

-Evaluación Externa de la Calidad (E2-PNT-CN-08)

4.7. Expresión de resultados

Los resultados se expresan como fenotipo.

Los fenotipos posibles son:

FA resultados normales.

FAS, FS, FSC y FAC son resultados que indican el posible diagnóstico de una anemia falciforme. Se confirmaran mediante Electroforesis capilar.

A indica hemoglobina adulta (transfusión).

AF indica mayor porcentaje de hemoglobina adulta frente a la fetal.

4.8. Registro de los resultados y comunicación de los mismos.

Los resultados se registran en la ficha informatizada del recién nacido del programa MetaB, mediante la opción registro de resultados, exclusiva del personal facultativo

Las hojas de trabajo, los perfiles electroforéticos de los controles y las muestras (R2-PNT-CN-06 controles y resultados del Cribado Neonatal de anemia falciforme en Capillarys) se imprimen y guardan en papel durante al menos cinco años, se guardan en las estanterías de la sección por años, los del mes en curso están en un AZ eliminándose consecutivamente.

Una vez introducidos los resultados, se validan, apareciendo en validación manual (individual).

Los casos patológicos son comunicados a los padres y/o centros de seguimiento para que sean sometidos a análisis de confirmación diagnóstica y tratamiento y se guarda un registro en papel en R5-PGS-CN Carpeta registros positivos

5. Responsabilidades

Es responsabilidad del personal técnico de la sección el desarrollo del método en todas sus fases bajo la supervisión del personal facultativo.

Es responsabilidad del personal facultativo de la sección el registro y la validación de los resultados.

La llamada para cita y petición de nuevas muestras una vez indicada por el personal facultativo puede realizarla cualquiera de los estamentos del personal, únicamente cuando los padres soliciten una información adicional, será el personal facultativo el encargado de dársela.

Se procurará no realizar en viernes o días previos a festivos la comunicación de valores dudosos o altos para no intranquilizar a los padres.

La comunicación de resultados positivos a los centros de seguimiento será realizada por el personal facultativo o bajo su supervisión.

6. Formatos/Especificaciones

-E1-PNT-CN-06 Control de calidad interno de anemia falciforme en sangre desecada Capillarys

-Programa de la Consellería de Sanitat "MetaB".

-R1-PNT-CN-06 Hoja de trabajo de hemoglobinas Capillarys

-R2-PNT-CN-08 Controles y resultados del Cribado Neonatal de anemia falciforme en Capillarys.

-R2-PGS-CN Control de reactivos.

-R3-PGS-CN "Dietario del año en curso". Registro repeticiones

-R5-PGS-CN Carpeta registros positivos.

7. Anexos

R1-PNT-CN-06

FECHA y RACK	Nº POCILLO	Nº MUESTRA
	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
	6	
	7	
	8	
	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
	6	
	7	