

Aplicación de la prueba de elución para la visualización de la Hb-S en extensiones de sangre en el pesquisaje de la hemoglobinopatía S*

Por el Dr.: RAFAEL MACHADO GARCÍA-SIÑERIZ**

Machado García-Siñeriz, R. *Aplicación de la prueba de elución para la visualización de la Hb-S en extensiones de sangre en el pesquisaje de la hemoglobinopatía S*. Rev. Cub. Ped. 46: 3, 1974.

Se presentan los resultados obtenidos al comparar la prueba de elución para la visualización de Hb-S en extensiones de sangre (propuesta por V. Yakulis y P. Heller^{1,2}), con las pruebas de falciformación simple y la de falciformación con metabisulfito, analizando las posibilidades de su empleo como método de pesquisaje. Se resumen las posibles causas de error al utilizar dichas pruebas y el modo de evitarlas.

INTRODUCCION

Es nuestro objetivo reportar los resultados de un trabajo realizado en nuestro hospital,³ durante el periodo 1969 a 1970 en el que comparamos la prueba de elución para la visualización de la Hb-S en extensiones de sangre, propuesta por V. Yakulis y P. Heller^{1,2}, con dos variantes de la prueba de falciformación; y analizar las ventajas y desventajas de esas pruebas con vistas a su posible utilización como procedimientos para el pesquisaje de la hemoglobinopatía "S" en laboratorios donde no existan todavía equipos electroforéticos.

* Trabajo presentado en el taller sobre "La Sickleemia en Cuba y su prevención", Ira. Jornada Científica de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de La Habana, febrero 23-25, 1973. Año del XX Aniversario.

** Especialista de primer grado en laboratorio clínico. Jefe del departamento de laboratorio clínico del hospital provincial Clínico Quirúrgico de Santa Clara, Las Villas.

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 510 casos (adultos y niños mayores de dos años), cuya hemoglobina se clasificó de la siguiente manera: SS: 12, SC: 6, AS: 39, AA: 130, y AC: 3. Esta clasificación se basó en el resultado del estudio electroforético en gel de agar, con buffer de barbital pH 8,6 F.I. 0,05, y en los casos en que se halló una hemoglobina con movilidad tipo "S", se confirmó la misma por la demostración de la falciformación en los hematíes, y estudio de los familiares.

Para la prueba de elución (PE) se siguió la técnica recomendada por sus autores^{1,2}, con elución durante 10 minutos en el buffer de fosfatos 2,10 M. con coloración de eosina y lectura a simple vista.

Para la prueba de falciformación (PF) se utilizaron las dos técnicas normadas en los laboratorios clínicos de nuestro país²: el método clásico, o simple (PFS), con la observación microscópica a las 24 horas;

y el método que emplea el metabisulfito de sodio como agente reductor (PFM) con lectura a los 15 minutos.

En las tres pruebas comparadas se informaron los resultados como "positivos", "negativos" o "dudosos".

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de las tres pruebas comparadas fueron "negativos" en los fenotipos AA y AC, y "positivos" en los SS y SC, con la excepción de un resultado "dudoso" de la PE en un SC.

Para valorar la utilidad de estas pruebas en pesquisajes masivos con fines preventivos, es fundamental analizar sus resultados en los heterocigóticos simples (AS), los cuales mostramos en los cuadros I y II. En este grupo la PE fue más exacta (no mostró falsos negativos) que la PFS y la PFM (que mostraron un 10,3 y 12,9% de falsos resultados negativos, respectivamente). La positividad de la PFS se incrementó, al efectuarse observaciones posteriores de las preparaciones que fueron "negativas" o "dudosas" a las 24 horas, lográndose a las 72 horas un resultado "positivo" en todas las muestras de este grupo (Cuadro III).

Consideramos posible que en una muestra mayor aparezcan falsos resultados "negativos" y "positivos" de la PE: otros investigadores nos han reportado el hallazgo de tales fallas.¹

Con los datos obtenidos en una reciente revisión que hicimos de la literatura⁵, y teniendo en cuenta los fundamentos de las pruebas comparadas y nuestra experiencia con ellas, hemos reunido en el cuadro IV sus posibles causas de error, en cuanto a detectar Hb-S.

CUADRO I

Prueba de Elución	Prueba de Falsificación Simple. Lectura: 24 horas			
	+	±	-	Total
+	33	1	4	38
±	1	0	0	1
-	0	0	0	0
Total	34	1	4	39

CUADRO II

Prueba de Elución	Prueba de Falsificación con Metabisulfito			
	+	±	-	Total
+	32	1	5	38
±	1	0	0	1
-	0	0	0	0
Total	33	1	5	39

CUADRO III

Prueba de Falsificación simple Tiempo de lectura	RESULTADOS			
	+	±	-	Total
24 horas	34	1	4	39
48 horas	36	0	3	39
72 horas	39	0	0	39

CUADRO IV

CAUSAS DE ERROR EN LAS PRUEBAS DE ELUCION Y FALCIFORMACION

Prueba de Elución

Pruebas de Falciformación

FALSOS RESULTADOS POSITIVOS

<p>¹¹⁶ cHarlem</p> <p>¹¹⁶ cGeorgetown</p> <p>¹¹⁶ H</p> <p>Otras Hb inestables</p> <p>Extensiones muy gruesas</p> <p>Ext. de más de 24 horas</p> <p>Mala preparación del <i>buffer</i></p>	<p>¹¹⁶ cHarlem</p> <p>¹¹⁶ cGeorgetown</p> <p>¹¹⁶ Bart's</p> <p>¹¹⁶ Philadelphia y ¹¹⁶ oArab</p> <p>(con metabisulfito al 4%)</p> <p>Ovalocitos, Poiquilocitos,</p> <p>Burr cells, y otros cambios morfológicos eritrocitarios</p>
--	--

FALSOS RESULTADOS NEGATIVOS

<p>"AS" con bajo % de Hb-S por: anemia megaloblástica</p> <p>anemia por déficit de hierro</p> <p>nefropatías</p> <p>postransfusión de sangre</p> <p>Hb F elevada en: recién nacidos y lactantes</p> <p>adultos con persistencia</p> <p>Mala preparación del <i>buffer</i></p>	<p>"AS" con bajo % de Hb-S por: anemia megaloblástica</p> <p>anemia por déficit de hierro</p> <p>nefropatías</p> <p>postransfusión de sangre</p> <p>Hb F elevada en: recién nacidos y lactantes</p> <p>adultos con persistencia</p> <p>Marcada leucopenia</p> <p>Aislamiento no hermético de la preparación. Burbujas de aire.</p> <p>Uso de sangre almacenada</p> <p>Baja temperatura ambiente</p> <p>Situar las preparaciones a 37°C</p>
---	--

Los errores técnicos en la PE están en relación con el grosor de la extensión, el tiempo transcurrido entre la extensión de la sangre y la elución, y (al igual que todas las variantes de la prueba de solubilidad) la mala preparación del *buffer*. Tales errores se evitan haciendo extensiones finas, haciendo la elución en el día, empleando controles positivos y negativos, y con una cuidadosa preparación y conservación de la solución de fosfato¹, para la que se utilizan productos de buena calidad, exactitud en la pesada, control del pH, almacenaje en refrigeración, etc.

En la PFS los errores relacionados con el sellaje de la preparación disminuyen si se sellan dos gotas separadas sobre el mismo portaobjetos: los relacionados con una lenta velocidad de falciformación disminuyen con la observación de las preparaciones negativas o dudosas hasta por lo menos 72 horas; y la presencia de cambios de la morfología eritrocitaria parecidos a la falciformación se descartan porque se observan en las preparaciones recién hechas, y no se modifican con el tiempo. Las preparaciones no deben hacerse con sangre almacenada, y se evitarán las temperaturas extremas.

Nos ha llamado la atención que en la literatura revisada no hayamos encontrado otras referencias a la PE, además de los dos reportes de sus autores, ya mencionados. No sabemos si ello es debido al fracaso de otros investigadores al tratar de reproducirla, o la difusión de los métodos electroforéticos, así como de varias microtécnicas cualitativas de la prueba de solubilidad en tubo de ensayo, que utilizan sangre total.

CONCLUSIONES

La electroforesis de hemoglobina es el método ideal para el pesquiasaje de la hemoglobinopatía "S". Con la utilización de modernos equipos y medios de soporte, sis-

temas tampones perfeccionados, y microtécnicas, se ha hecho posible el procesamiento de un gran número de muestras en un corto tiempo; sin embargo, requiere equipos y reactivos especializados que todavía no están disponibles en todos los laboratorios, por lo que se mantienen vigentes otros métodos más sencillos, aunque menos exactos, como los basados en la falciformación de los hematíes y en la menor solubilidad de la Hb-S en tampones de fosfatos de alta molaridad.

Hemos presentado aquí los resultados obtenidos al comparar la prueba de elución para la visualización de la Hb-S en extensiones de sangre (propuesta por *V. Yakulis* y *P. Heller*) con las pruebas de falciformación simple y la de falciformación con metabisulfito, analizando las posibilidades de utilizarlas como procedimiento de despistaje.

Las tres pruebas que se compararon no mostraron falsos resultados "positivos" en 483 muestras "S-negativas", ni falsos "negativos" en 12 con hemoglobina SS, y 6 con SC.

En un grupo de 39 heterocigóticos simples (AS), la prueba de elución fue más exacta que las pruebas de falciformación, las cuales tuvieron un porcentaje significativamente elevado de falsos resultados "negativos".

Se resumen las posibles causas de error de dichas pruebas y el modo de evitarlas.

Las principales desventajas de la prueba de elución son los requisitos que deben observarse en relación con la extensión de la sangre, el tiempo transcurrido antes de la elución, y ante todo (igual que en todas las variantes de la prueba de solubilidad) los cuidados requeridos para la preparación y conservación de la solución tampón, y el gasto de cantidades relativamente grandes de fosfatos cuando se utiliza masivamente. Actualmente existen varias microtécnicas

cualitativas también basadas en la prueba de solubilidad, que se realizan en tubos de ensayo utilizando sangre total, que pueden usarse como procedimientos de despistaje, con ventajas y desventajas similares a las de la prueba de elución.

Las pruebas de falciformación son mucho más sencillas, pero son menos exactas para detectar a los heterocigóticos (AS); además, el resultado se obtiene (en el método simple) en un tiempo mucho más prolongado (21 horas) que en la prueba de elución (15 minutos); su exactitud puede incrementarse, pero a expensas de una mayor demora en el resultado (hasta 72 horas). Cuando se utiliza el metabisulfito de sodio como agente reductor, el resultado es mucho más rápido (15 minutos), pero el porcentaje de falsos "negativos" en heterocigóticos no mejora.

Recomendamos la prueba de elución para aquellos laboratorios donde existan condiciones para cumplimentar los requisitos que exige la misma, mientras que en aquellos lugares donde no existan tales condiciones pueden utilizarse las pruebas de falciformación que, si bien son menos exactas para detectar heterocigóticos, pueden realizarse en cualquier medio.

SUMMARY

Machado García-Siñeriz, R. *Application of elution test for the visualization of Hb S in blood smears for hemoglobinopathy-S screening.* Rev. Cub. Ped. 46: 3, 1974.

Results obtained in comparing the elution test for the visualization of Hb S in blood smears (proposed by V. Yakulis and P. Heller) with the simple sickling test and the sickling test with metabisulfite are presented, and the possibilities of using the first-mentioned test analyzed. Possible cause of error and the way to avoid them in performing these tests are summarized.

RESUME

Machado García-Siñeriz, R. *Application de l'épreuve d'éluion pour visualiser le Hb-S en extensions de sang dans la recherche de l'hémoglobinopathie S.* Rev. Cub. Ped. 46: 3, 1974.

Les résultats obtenus en comparant l'épreuve d'éluion pour visualiser le Hb-S en extensions de sang (proposée par V. Yakulis et P. Heller), avec les épreuves de falciformation simple et celle de falciformation avec metabisulfite sont présentés, analysant les possibilités de son emploi comme méthode de recherche. On résume les causes qui peut-être peuvent faire commettre une erreur en employant ces épreuves, ainsi que la façon de les éviter.

DISCUSSION

Es necesario destacar el hallazgo de falsos "negativos" con estas pruebas de Sickling y aun de elución diferencial, reportado por otros autores, incluso en pacientes sicklé-micos con pocos síntomas y en S-B tala-zémicos.

La rigurosidad en la preparación de las soluciones de fosfato, el ajuste del pH de la solución para mantener la molaridad son necesarios para obtener nuevos resultados, así como la utilización de fosfatos previamente desecados para la preparación de las soluciones.

La prueba de solubilidad automatizada de la Technicon Analyser, a pesar de que supera las dificultades en la documentación, desde el punto de vista económico, deja mucho que desear por lo costoso que resultan los equipos, y además la velocidad que alcanza no es mayor de 40 muestras X hora. Es necesario comenzar a utilizar sangre total para dicha prueba y realizar micro-técnicas.

La prueba de elución no es una prueba que se pueda utilizar para estudios masivos, ya que resulta poco segura y lenta, así como por la necesidad de trabajar con sangre y soluciones frescas.

RESUME

Мачадо Р. Применение теста элиции для визуализации Hb-S в пробах крови при исследовании гемоглобинопатий S. *Rev. Cub. Ped.* 46: 3, 1974.

Приводятся результаты сравнения теста элиции для визуализации Hb-S в пробах крови (предложенного В. Якулис и П. Геллер) с тестами простой ложной формации или ложной формации с помощью метабисульфита. Проводится анализ возможностей применения в качестве метода исследования. Отмечаются вероятные причины ошибок при использовании указанных тестов, а также способы предотвращения их.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—*Colombo, B.* Comunicación personal.
- 2.—Grupo Nacional de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud Pública de Cuba: Manual de Técnicas para Laboratorios Clínicos, pág. 77, Instituto del Libro, La Habana, 1969.
- 3.—*Heller, P., V. Yakulis.* A simple and Reliable Test for Sickling *J.A.M.A.*, 203: 990, 1968.
- 4.—*Hoxter, G., V. Maspes, J. T. Araujo y M. Jamra.* Solubilidad de las hemoglobinas anormales. Método. Valoración y significación en diversas hemopatías. *Sangre*, 11: 83, 1966.
- 5.—*Machado García-Siñeriz, R.* Nuestra experiencia con la prueba de elución para la visualización de la Hb-S en extensiones de sangre. Trabajo presentado para optar por el título de Especialista de Primer Grado en Laboratorio Clínico. Hospital Provincial Clínico-Quirúrgico de Santa Clara, Cuba, 1971. (No publicado).
- 6.—*Yakulis, V. J., y P. Heller.* An Elution Test for the Visualization of Hemoglobin S in Blood Smears. *Blood*, 24: 198, 1964.

Recibido el trabajo: Enero 17, 1974