

UNIVERSIDAD DE LA HABANA
ICBP "VICTORIA DE GIRON", FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

La prueba de solubilidad en ampulas para la detección de hemoglobina S.

Demostración de su eficiencia en 3 000 muestras de sangre analizadas*

Por:

Dr. LUIS HEREDERO,** Lic. HILDA GRANDA,***
Dra. AIDA DORTICOS,**** Téc. JOSE A. SUAREZ*****

Herederó, L. et al. *La prueba de solubilidad en ampulas para la detección de hemoglobina S. Demostración de su eficiencia en 3 000 muestras de sangre analizadas.* Rev Cub Ped 48, 5, 1976.

Se describe una nueva forma de distribución comercial de la prueba de solubilidad para el diagnóstico de hemoglobina S, la cual consiste en ampulas de vidrio de 1 ml de capacidad que contienen los reactivos en solución listos para ser utilizados. Se señala que el tiempo de conservación de la solución es por más de un año en refrigeración a 4°C aproximadamente. Se concluye que la comparación del análisis de 3 000 muestras de sangre estudiadas por electroforesis de la hemoglobina y por la prueba de solubilidad en ampulas fue altamente satisfactorio, con un 99,36% de sensibilidad y un 99,96% de especificidad.

INTRODUCCION

En aquellos países con alta incidencia del gen de la hemoglobina S, la detección de portadores de dicha hemoglobinopatía se ha convertido en una necesi-

dad con el objetivo de lograr una disminución de los efectos producidos por la drepanocitemia a través de las medidas preventivas del consejo médico a los portadores y el consejo genético a las familias con "alto riesgo".^{1,2,3,4} Esto ha determinado el desarrollo de nuevas técnicas para la detección de hemoglobina S, con sus diversas formas comerciales, encaminadas a hacerlas seguras, económicas, rápidas y de fácil manejo; citando entre ellas las pruebas de sickling,⁵ las pruebas de elución diferencial,⁶ las pruebas de solubilidad con urea o sin ésta,^{7,8,9,10,11,12} en las formas comerciales de SCAT, Sickle Cell Anemia/Trait

* Este trabajo se presentará, además, en una revista especializada en el extranjero.

** Médico. Especialista en genética bioquímica humana. Jefe del departamento de genética médica del ICBP "Victoria de Girón". FCM.

*** Licenciada en ciencias biológicas. Especialista en genética bioquímica humana.

**** Médico. Aspirante a especialista en genética bioquímica humana.

***** Técnico de laboratorio.

Test Kit, Sickledex SickleScrene, Sik-L-Stat, Sickle-I.D., Sickle-Sol¹² y las conocidas técnicas electroforéticas.

Nosotros hemos publicado recientemente un económico sistema de búsqueda electroforética, de alta velocidad para la detección de hemoglobina S y otras proteínas,¹¹ y propuesto el mismo como solución técnica para pesquisajes masivos; sin embargo, señalamos la necesidad de confirmar siempre el diagnóstico de la hemoglobina S en los casos variantes que se detecten durante dicho pesquisaje, para lo cual resulta de gran valor la prueba de solubilidad de la hemoglobina.

Presentamos en este trabajo una nueva variante de la prueba de solubilidad, que consiste en envasar los reactivos en solución, listos para ser utilizados, en ampulas de vidrio de 1 ml de capacidad, lo que evitó problemas en la conservación y demostró su eficacia en 3 000 muestras de sangre analizadas, y cuyos resultados fueron comparados utilizando también la técnica electroforética.

MATERIAL Y METODO

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción digital, y fue realizada la prueba de solubilidad inmediatamente durante un pesquisaje efectuado en el Banco de Sangre Provincial de La Habana y en el Hospital Pediátrico de Marianao. Las muestras de pacientes previamente seleccionados se obtuvieron en el departamento de bioquímica del Instituto de Hematología e Inmunología del Ministerio de Salud Pública, y de pacientes detectados anteriormente en nuestro laboratorio, utilizando para ello capilares heparinizados o muestras colectadas por punción venosa con EDTA como anticoagulante.

Preparación de la solución

| | |
|---|----------|
| Fosfato monobásico de potasio <i>anhidro</i> | 13.00 g. |
| Fosfato dibásico de potasio <i>anhidro</i> | 22.50 g. |
| Ditionita de sodio | 2.00 g. |

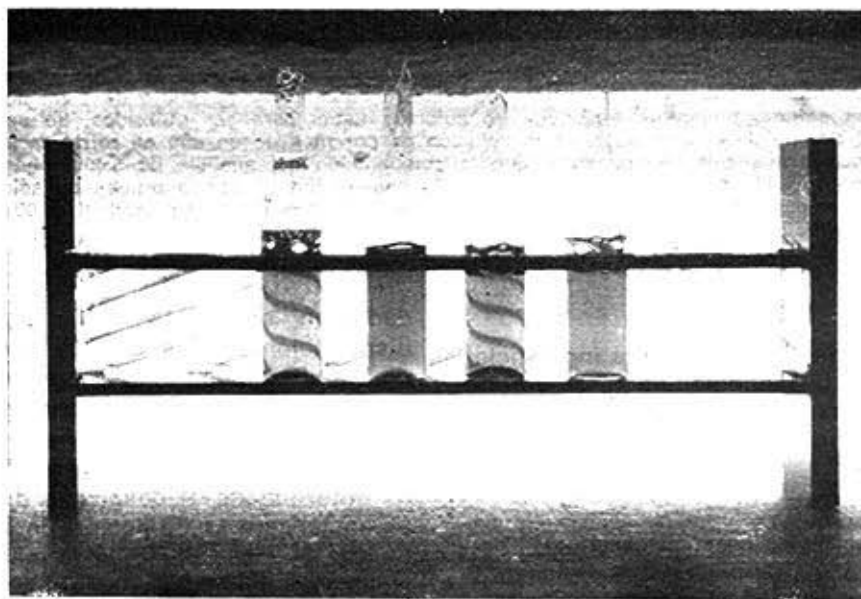


Figura 1. Ampulas colocadas en su gradilla después de añadirles 15 microlitos de sangre total a cada una. Los resultados (de izquierda a derecha) son: Negativo (Hb. AA); positivo (Hb. AS); negativo (Hb. AA) y positivo (Hb. SS).

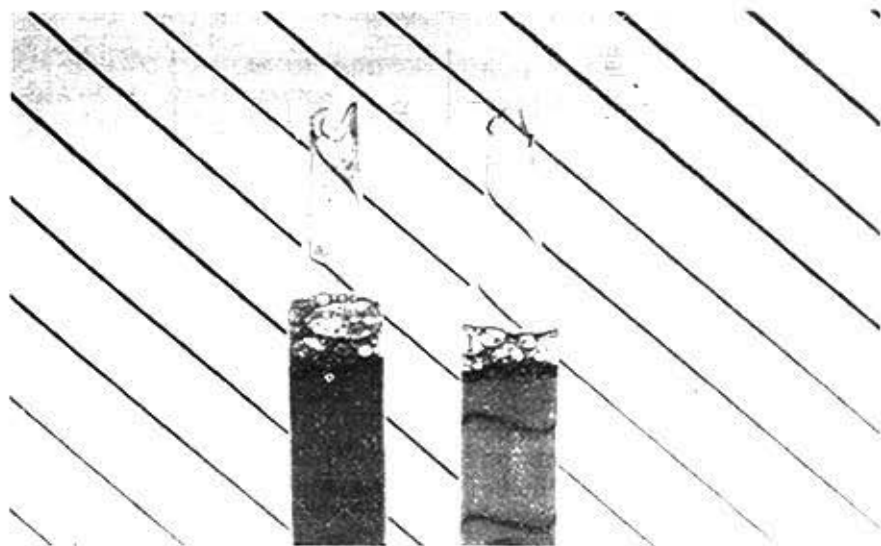


Figura 2. Detalle de las ámpulas. A la izquierda una prueba positiva (Hb. AS); y la derecha una prueba negativa (Hb. AA).

Saponina blanca 2.00 g.

Llevar a 100 ml con H₂O desionizada, pH 7.

Envase y conservación. La solución se envasó en ámpulas de vidrio de 1 ml de capacidad (9 mm diámetro y 54 mm de h), y se desplazó el aire residual con gas nitrógeno al momento de sellar las mismas. Se conservaron en refrigeración a 4°C, aproximadamente.

Desarrollo de la técnica. Las ámpulas ya destapadas, se colocan en una gradilla diseñada al efecto (figura 1) y se añaden 15 microlitros de sangre capilar, se mezcla bien por agitación manual y se realiza la lectura 2 ó 3 minutos después. La transparencia de la solución, o no, definirá los casos positivos y negativos y se utilizará de fondo la propia gradilla apropiadamente impresa y con fuente de luz natural (figura 2).

Control de calidad. Las ámpulas fueron chequeadas quincenalmente utilizando un patrón conocido de hemoglobinas AA y AS. Se analizaron 2 980 muestras de sangre por la prueba de solubilidad

en ámpulas y por electroforesis vertical de la hemoglobina en gel de poliacrilamida con pH alcalino: de éstas, 2 777 durante un pesquisaje, y 203 muestras previamente seleccionadas (cuadro I). Las ámpulas fueron siempre releídas por un segundo investigador 24 horas después de realizada la prueba. Un último control fue realizado, para el que se utilizaron ámpulas un año después de haber sido selladas y conservadas, como se explicó antes, en el análisis de 40 muestras de sangre con fenotipo de hemoglobina AA y 40 con fenotipo AS (previamente conocidos) (cuadro II).

RESULTADOS

Las 2 980 muestras analizadas fueron siempre comparadas por electroforesis de hemoglobina. En el grupo de pacientes estudiados durante el pesquisaje, fue detectada una hemoglobina D Punjab (en estado heterocigoto AD), la cual se pensó se trataba de un caso falso negativo hasta que fue caracterizada. Otros dos casos con patrón electroforético AS y pruebas de solubilidad dudosa (±) y negativa (—), respectivamente, en la

CUADRO I

RESULTADOS DE 2 980 MUESTRAS DE SANGRE ESTUDIADAS POR ELECTROFORESIS Y PRUEBA DE SOLUBILIDAD EN AMPULAS PARA LA DETECCION DE HEMOGLOBINA S

| | No. de muestras de sangre | Técnica utilizada | Fenotipos de hemoglobina | | | | | | | Variantes raras | |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|-------|----|----|----|--------|------|-----------------|----|
| | | | AA | AS | AC | SS | SC | S/Btal | Btal | | |
| | | Electroforesis | 2 673 | 92 | 10 | 1 | | | | 1 A/D Punjab | |
| Screening | 2 777 | Prueba de solubilidad | + | — | 91 | — | 1 | | | — | |
| | | | ± | — | 1* | — | — | | — | | |
| | | | — | 2 673 | — | 10 | — | | — | 1 | |
| | | Electroforesis | 77 | 83 | | 2 | 1 | 1 | 2 | 37 | |
| Pacientes seleccionados | 203 | Prueba de solubilidad | + | 1** | 83 | | 2 | 1 | 1 | — | — |
| | | | ± | — | — | | — | — | — | — | — |
| | | | — | 76 | — | | — | — | — | 2 | 37 |
| Total | 2 980 | | | | | | | | | | |

* La hemoglobina por debajo de 8 g/100

** Falso positivo por hiperlipemia

- + Positiva
- ± Dudosa
- Negativa.

CUADRO II

EFICIENCIA DE LAS AMPULAS UN AÑO DESPUES DE SU CONSERVACION

| Fenotipo de Hemoglobina | No. de Muestras | Prueba de solubilidad | | |
|-------------------------|-----------------|-----------------------|----|---|
| | | + | - | ± |
| AA | 40 | 0 | 40 | 0 |
| AS | 40 | 40 | 0 | 0 |

CUADRO III

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE SOLUBILIDAD EN AMPULAS

| | | Positivos esperados | Negativos esperados |
|------------|---|---------------------|---------------------|
| | | 180 | 2 800 |
| Resultados | + | 179 | 1 |
| Observados | ± | 1 | 0 |
| | - | 0 | 2 799 |

Sensibilidad: *Personas enfermas con la prueba positiva* $\times 100 = 99,36\%$ divididas entre todas las personas con la enfermedad en la población.

Especificidad: *Personas no enfermas con la prueba negativa* $\times 100 = 99,96\%$ divididas entre todas las personas sin la enfermedad en la población.

primera lectura, resultaron positivas (+) en la relectura realizada 24 horas después, fenómeno observado otras veces en nuestro laboratorio y señalado por otros autores¹⁵ (¿falciformación retardada?).

Se destaca un caso señalado como dudoso con patrón electroforético AS que fue explicado por cifras bajas de hemoglobina, y que al duplicar el volumen de sangre utilizado en la prueba, el resultado fue positivo. Se detectó también un caso falso-positivo por hiperlipemia (cuadro I).

El control de calidad efectuado cada 15 días, para el que se utilizó hemoglobina de fenotipo conocido, arrojó resultados absolutamente satisfactorios hasta 18 meses después de selladas las ampulas con la solución de la prueba de solubilidad. El análisis de 40 muestras de sangre con fenotipo de hemoglobina AA y otras 40 con fenotipo de hemoglobina AS, mediante el uso de ampulas de un año de conservación, ofreció absoluta seguridad en el diagnóstico (cuadro II).

Con los datos referidos anteriormente, concluimos que la prueba de solubilidad en ampulas tiene una sensibilidad del 99,36% y una especificidad del 99,96% (cuadro III).

DISCUSION

Las pruebas de solubilidad, por su sencillez, bajo costo, seguridad y especificidad, son las más utilizadas para comprobar el diagnóstico de hemoglobina S en los casos detectados por electroforesis y para el diagnóstico en la propia consulta médica, aunque recientemente se han desarrollado pruebas de solubilidad automatizada con fines de muestreos masivos.^{11,9}

Podemos, sin embargo, señalar algunas de sus principales deficiencias: la solución, después de preparada, sólo puede conservarse por un mes en refrigeración a 4°C; falsas interpretaciones por reactivos en mal estado (fosfatos no anhidros, ditionita parcialmente oxidada, etc.); presencia de falsos positivos por poliglobulia, hiperlipemia, transfusiones recientes, etc.; presencia de falsos negativos por anemia, alto porcentaje de hemoglobina F, transfusiones recientes, etc.^{16,17,10,12,18,10}

La prueba de solubilidad, en ampulas descrita en este trabajo ha superado algunas de las dificultades señaladas anteriormente y permite:

- La conservación de los reactivos en solución, listos para ser utilizados, hasta por lo menos un año después de haber sido envasados.

- Su comercialización en forma sencilla, lo que elimina los errores por mala calidad de los reactivos, manipulación inadecuada de los mismos, etc.
- Que el propio envase sea utilizado como tubo de ensayo estandarizado y desechable, con el consiguiente ahorro en tiempo y facilidad de manipulación.
- Que por su simplicidad, un técnico pueda analizar aproximadamente 30 muestras por hora, incluida la colección de sangre.
- Que el costo (no comercial) por cada prueba sea de 1 a 2 centavos.

La referida prueba ofrece perspectivas para su empleo en laboratorios de hospitales, para la determinación ocasional de hemoglobina S; en la consulta médica, como auxilio diagnóstico; como prueba de confirmación, después de los hallazgos de un pesquisaje por electroforesis; y como alternativa para pesquisajes masivos, en aquellos lugares donde no sea posible el método electroforético y mucho menos la prueba de solubilidad automatizada por el bajo nivel técnico del lugar, por barreras geográficas, etc., problemas relativamente

frecuentes en los países con alta incidencia del gen de la hemoglobina S.

Esta técnica, por su simplicidad, economía, seguridad y óptima forma de distribución comercial, incrementa el arsenal tecnológico utilizado en la detección de hemoglobina S, necesario en aquellos países con alta incidencia del gen, y viene a ser un complemento ideal o la alternativa (en caso de pocas muestras a analizar, por ejemplo) del sistema de búsqueda electroforética descrito por nosotros y propuesto como solución técnica para análisis masivos.

Agradecimiento

Damos las gracias a los compañeros del Banco de Sangre Provincial de La Habana, del Hospital Pediátrico de Marianao, y del departamento de bioquímica del Instituto de Hematología e Inmunología del Ministerio de Salud Pública, así como a los compañeros de la industria farmacéutica por el suministro y sellado de las ampulas utilizadas.

La caracterización de la hemoglobina D Punjab fue realizada en el departamento de bioquímica, antes señalado.

Nota: Este método ha sido patentado. Se intenta la producción industrial.

SUMMARY

Herederó, L. et al. *Solubility test in ampullas for hemoglobine S determination. Demonstration of their effectiveness in 3 000 blood samples analyzed.* Rev Cub Ped 48: 5, 1976.

A new way of commercial distribution of the solubility test for diagnosing hemoglobines, composed by 1 ml-capacity glass ampullas which contain ready-for-use reactivities in solution is described. The expiring time of the solution, under 4°C storage conditions is about a year. Finally, it is pointed out that the analysis of 3 000 bloods samples studied by hemoglobine electrophoresis and by solubility test in ampullas was highly satisfactory, with a 99.36% of sensitiveness and a 99.96% of specificity.

RESUME

Herederó, L. et al. *L'épreuve de solubilité dans des ampoules pour la détection de l'hémoglobine S. Démonstration de son efficacité dans 3 000 échantillons de sang analysés.* Rev Cub Ped 48: 5, 1976.

Une nouvelle forme de distribution commerciale de l'épreuve de solubilité pour le diagnostic de l'hémoglobine S est décrite, qui consiste en ampoules en verre de 1 ml de capacité contenant les réactifs en solution prêts à être utilisés. Il est à souligner que le temps de conservation de la solution est de plus d'un an en réfrigération à 4°C ap-

proximativement. La comparaison de l'analyse de 3 000 échantillons de sang étudiés par l'électrophorèse de l'hémoglobine et par l'épreuve de solubilité dans des ampoules fut hautement satisfaisante, avec 99,36% de sensibilité et 99,96% de spécificité.

RESUMEN

Este estudio comparó el análisis de 3000 muestras de sangre en ampollas para la prueba de solubilidad de la hemoglobina y por el método de la electroforesis de la hemoglobina. Los resultados fueron altamente satisfactorios, con una sensibilidad del 99,36% y una especificidad del 99,96%.

Приведена новая форма упаковки для продажи препарата в ампулах, по сравнению с прежней для выявления гемоглобине S в крови: это облегчило работу выделение раствора и упростило процедуру. Продолжительность хранения этого раствора более 4 месяцев, следовательно около 4 тридцати по Цельсию. В заключении говорится, что результат скрининга анализов 3000 проб крови, исследованной электрофорезом и при помощи препарата раствора в ампулах, был высоко удовлетворительным: чувствительность—99,36%, специфичность—99,96%.

BIBLIOGRAFIA

1. *Culliton, B. J.* Sickle Cell Anemia National Program Raises Problems as Well as Hopes. *Science* 178, 283-286, 1972.
2. *Nalbandian, R. M. et al.* Automated Mass Screening for Hemoglobin S. A. Rational Method Health Services Reports, 88, No. 2, 165-173, 1973.
3. *Herederó, L.; Granda, H.* Editores. Taller: La sicklemia en Cuba y su prevención. La Habana, Feb. 23-24 1973. *Rev Cub Ped* 46 Nos. 2 y 3, 1974.
4. *Giorgio, A. J.; Boggs, D. R.* Large Scale Screening for hemoglobinopathies. Utilizing Electrophoresis. *AJPH* Oct. 64, No. 10, 993-995, 1974.
5. *Daland, G. A.; Castle, W. B.* A simple and rapid method demonstrating sickling of the red blood cells. *J Lab Clin Med* 33, 1082-1088, 1948.
6. *Yakulis, V. J.; Heller, P.* An elution test for the visualization of hemoglobin S in blood smears. *Blood* 24, 198-201, 1964.
7. *Huntsman, R. G. et al.* A Rapid Whole blood solubility Test to differentiate the Sickle-Cell trait from Sickle-Cell anemia. *J Clin Pathol* 23, 781-783, 1970.
8. *French, E. A.* An Alternative to the Sickling Test. (Letter to the editor). *J Clin Pathol* 24, 91, 1971.
9. *Nalbandian, R. M. et al.* Dithionite Tube Test A Rapid, Inexpensive Technique for the Detection of Hemoglobin S and Non-S Sickling Hemoglobins. *Clin Chem* 17, 1028-1032, 1971.
10. *Nalbandian, R. M. et al.* Automated Dithionite Test for Rapid, Inexpensive Detection of Hemoglobin S and Non-S Hemoglobinopathies. *Clin Chem* 17, 1033-1037, 1971.
11. *Canning, D. M. et al.* An Automated Screening Technique of the Detection of Sickle-Cell Hemoglobin *J Clin Pathol* 25, 330-334, 1972.
12. *Raper, A. B.* Solubility test for Hemoglobin S (Letter). *Br Med J* 1, 460, 1971.
13. *Schmidt, R. M.; Wilson, S. M.* Standardization in Detection of Abnormal Hemoglobins. Solubility Test for Hemoglobin S. *JAMA* sept. 3 225, No. 10, 1225-1230, 1973.
14. *Herederó, L. et al.* An Economic High Speed Electrophoretic Screening System for Hemoglobin S and Other Proteins *Humangenetik* 21, 167-177, 1974.
15. *Colombo, B.* Comunicación personal 1974.
16. *Henry, R. L.* Evaluation of Tests for Sickling Hemoglobins in Maumen, E. F., Anderson, G. T., Barnhat, M. I. Sickle Cell Disease. Transaction of the 20th Annual Symposium on Blood. Wayne State University School of Medicine, Detroit Michigan, Jan 20-21, 1972. F. V. Slattamer Verlag-Stuttgart, New York 1973.
17. *Hicks, E. J. et al.* Comparison of Results for three Methods of Hemoglobin S Identification. *Clin Chem* 19, 533-535, 1973.
18. *Serjeant, B. E.; Serjeant, G. R.* Whole blood solubility and centrifugation test for sickle-cell hemoglobin. *Clinical triol, J Clin Pathol* 58, 11, 1972.
19. *Willcox, M. C.* An assesment of a whole blood solubility test for hemoglobin S in a West African population, *Med Lab Technol* 30, 205-210, 1973.

Recibido el trabajo: junio 11, 1976.