

Estudio Comparativo de Métodos para el Diagnóstico de la Drepanocitosis

DR. RAFAEL JIMÉNEZ*

DR. GERMAN F. SÁENZ**

DR. FERNANDO ATMETLLA**

DRA. MARÍA DE LOS ANGELES ALVARADO**

El término drepanocitosis se aplica a la anemia hemolítica en la cual existe la hemoglobina S en los eritrocitos, siendo las manifestaciones clínicas dependientes del tipo de herencia (homocigota o heterocigota) que presente el paciente. Los homocigotos o enfermos (SS) presentan una anemia crónica usualmente severa que permite el diagnóstico a temprana edad. Los heterocigotos o portadores de la tara AS, no presentan manifestaciones clínicas evidentes y el diagnóstico de estos casos pasa inadvertido en un porcentaje muy alto. De ahí la importancia de identificar a estos portadores, pues en situaciones de hipoxia, pueden sufrir crisis vaso-oclusivas que pueden poner en juego su vida. Las situaciones de hipoxia pueden presentarse durante infecciones severas (10), en la administración de anestesia (7), con el ejercicio violento (6), al vivir en grandes alturas (8), o por viajar en aviones sin presión controlada (3, 4). Queda evidente, entonces, la trascendencia que tiene el detectar hemoglobina S con base en métodos sensibles.

La presente comunicación compara la inducción de drepanocitos con metabisulfito de sodio (1), con una prueba de solubilidad para hemoglobina S (4), y evalúa la sensibilidad de cada uno de ellos en la detección de portadores, confirmándose los resultados por métodos electroforéticos.

MATERIAL Y METODOS

El material clínico se obtuvo de pacientes del Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera", de población estudiantil de Santa Cruz de Guana- caste, zona conocida como endémica en hemoglobina S (15), y de estudiantes de la Universidad de Costa Rica, a quienes previamente se les había diagnosticado la presencia de hemoglobina S por métodos electroforéticos.

Se analizó un total de 174 personas, de las cuales 168 correspondieron a heterocigotos AS, 5 homocigotos para hemoglobina S y un doble heterocigoto SC.

* Laboratorio de Hematología, Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera". San José, Costa Rica.

** Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Las muestras de sangre del Hospital Nacional de Niños se recolectaron con EDTA al 5% y las de Guanacaste y la Universidad con ACD, mantenidas en refrigeración durante el estudio.

La inducción de drepanocitos (1), se estandarizó diluyendo la sangre 1:20 con metabisulfito de sodio en una pipeta de glóbulos blancos la cual se incubó por dos horas a 37° C., haciéndose análisis a diferentes tiempos (15', 30', 1 hora y 2 horas). Inicialmente se hizo la prueba por duplicado, incubando una pipeta a temperatura ambiente y otra a 37° C., pero al no obtenerse variaciones importantes entre una y otra, la prueba se siguió realizando sólo a 37° C.

La prueba de solubilidad se efectuó siguiendo en un todo el trabajo original (4), obtiéndose por el uso de hemolizado en vez de sangre total, por la ventaja que representa el poder guardar los hemolizados en refrigeración por varios días. Estos últimos se prepararon con tolueno y algunos pocos con tetracloruro de carbono.

En todas las muestras se realizó electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa a pH 8.6 y algunas pocas, además, en gel de agar a pH 6.3. Los hemolizados para las electroforesis en acetato fueron preparados según la modificación de Sáenz et al (15).

RESULTADOS

En las 174 muestras individuales se obtuvieron pruebas de solubilidad positivas y características, esto es, sobrenadante rosado en los heterocigotos AS y en el doble heterocigoto SC y sobrenadante incoloro en los homocigotos SS. En todos los pacientes la electroforesis de hemoglobina demostró la presencia de hemoglobina S.

La prueba del metabisulfito de sodio dio positiva en todos los homocigotos y en el doble heterocigoto SC y, en varios grados, desde negativa hasta positiva fuerte, en los heterocigotos AS. Por lo tanto nosotros dividimos a estos pacientes en tres categorías: los que dieron la prueba negativa, los que presentaron menos del 10% de drepanocitos (positiva débil) y aquellos con más de 10% en la preparación (positiva fuerte). Los resultados de los AS fueron los siguientes (Cuadro 1): 4 casos negativos (2.3%), 46 con un porcentaje inferior a 10% de drepanocitos (27.3%) y 118 pacientes con la prueba francamente positiva (70.4%).

CUADRO

	PATRON ELECTROFORETICO		
	SS	SC	AS
Nº de casos	5	1	168
Prueba de Solubilidad	homocigota 5(100%)	heterocigota 1(100%)	heterocigota 168(100%)
Inducción Drepanocitos (Na ₂ S ₂ O ₅)	Negativo	0	4(2.3%)
	Pos. débil	0	46(27.3%)
	Pos. fuerte	5(100%)	118(70.4%)

DISCUSION

La molécula de hemoglobina S presenta ciertas características que la hacen muy peculiar dentro de las hemoglobinas anormales. En primer lugar, la hemoglobina S presenta una movilidad electroforética diferente a la de la hemoglobina A. Esto se debe a que en su molécula el ácido glutámico cargado negativamente, ha sido sustituido por una valina de carga neutra. Esta pérdida neta de carga negativa hace que dicha hemoglobina sea más lenta que la hemoglobina A a un pH alcalino, en donde la migración es hacia el ánodo (9). Asimismo la hemoglobina S cuando se encuentra en el estado reducido es la más insoluble de las hemoglobinas conocidas. Esta propiedad, demostrada por Itano (5), es la base de las modernas pruebas de solubilidad y al mismo tiempo la génesis de la patología que presenta el paciente drepanocítico, es decir del que posee una doble dosis del gene anormal. Por el mismo motivo la hemoglobina S en presencia de agentes reductores, se organiza en tactoides internos, alteración molecular que se refleja en el eritrocito como un todo al tomar la forma drepanocítica.

Estas tres características han permitido que se haya desarrollado una variedad de pruebas para detectar esta hemoglobina, como también para que el estudio bioquímico de su molécula haya sido el más exhaustivo de todas las hemoglobinas anormales. Esta situación ha provocado que el investigador se olvidara —al ser la drepanocitosis una característica racial—, de buscar en años pasados un tratamiento efectivo contra la enfermedad al concentrarse en el diagnóstico y en la caracterización molecular.

Las mencionadas propiedades de la hemoglobina S han permitido que los métodos para su diagnóstico se dividan en dos grupos: electroforéticos y no electroforéticos. Para los primeros puede usarse un variado número de medios de sostén para la electroforesis, citándose como los más adecuados el acetato de celulosa y el gel de agar.

Dentro de los no electroforéticos podemos citar la morfología eritrocitaria (que muchas veces es lo que primero llama la atención), la inducción de drepanocitos con el uso del metabisulfito de sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1), las pruebas de solubilidad de Huntsman et al. (4), Wei-Ping Loh (17), Murayama (11), Nalbandian et al. (13), y una prueba comercial de la casa Ortho, el Sickledex (2).

El metabisulfito de sodio es una prueba muy sencilla de ejecutar, pero lamentablemente tiene un porcentaje alto de falsos negativos (16), y además, puede dar falsos positivos puesto que otras hemoglobinas como las C-Harlem, C-Georgetow y la I, dan positiva la inducción (18).

Para las pruebas de solubilidad no se han descrito estos inconvenientes, excepto con el Sickledex (12), razón por la cual hasta la fecha son las más efectivas y rápidas para detectar la hemoglobina S.

Nosotros escogimos la prueba de Huntsman et al. ya que presenta algunas ventajas sobre las otras. En primer lugar necesita un mínimo de sangre (0.2 ml.) la cual puede obtenerse fácilmente por punción dactilar. Por otra parte, también permite hacer la prueba con la misma cantidad de sangre hemolizada que puede mantenerse en el congelador. Pero tal vez su principal ventaja es que en un tiempo no mayor de 10 minutos nos diferencia un heterocigoto de un homocigoto, con sólo observar el color del sobrenadante o del filtrado.

De los resultados obtenidos se desprenden algunos hechos importantes. Como se indicó, la electroforesis de hemoglobina y la prueba de solubilidad detectaron todos los casos con hemoglobina S y, además, ambas se correlacionaron perfectamente en cuanto al carácter homocigoto o heterocigoto de las muestras.

La prueba del metabisulfito de sodio por otra parte, no logró detectar el 2.3% de los heterocigotos AS y dio débilmente positiva en el 27.3% de ellos. Algunos de estos positivos débiles fueron analizados por otras personas de laboratorio, la mayoría de las cuales señalaron que el resultado era de pruebas negativas. Esto nos indica que con la prueba de metabisulfito hecha aisladamente, puede existir el riesgo de no detectar gran número de personas AS, lo cual es sumamente serio dada la importancia médica de este problema (7).

Por lo tanto, se concluye, de que la prueba de metabisulfito de sodio nunca debe practicarse en forma aislada pues puede dar tanto falsos negativos como falsos positivos, por lo que en los lugares donde sólo se puede hacer una prueba de escrutinio, ésta debería ser cualquiera de las de solubilidad, recomendándose con entusiasmo la usada en este trabajo.

R E S U M E N

Se compararon la prueba de solubilidad de Huntsman et al. y la prueba del metabisulfito de sodio en 174 personas con hemoglobina S en diversas combinaciones. Con la segunda prueba se encontraron falsos negativos y positivos débiles en el 29.6% de las personas AS, mientras que la primera detectó todos los casos, razón por la cual se recomienda como prueba aislada de escrutinio.

S U M M A R Y

We compared the solubility test with sickling test in 174 persons with haemoglobin S. The first one detected all cases but the second one gave false negative and weak positive results in 29.6% of AS heterozygous. As screening test we recommend the solubility instead of sickling test.

B I B L I O G R A F I A

- 1.—DELAND, G. A., CASTLE, W. B.
A simple and rapid method for demonstrating sickling of the red blood cells: the use of reducing agents. *J. Lab. Clin. Med.* 33:1082-1088, 1948.
- 2.—DIGGS, L. W., SCHORR, J. B., ASCARI, W. Q., ET AL.
A new diagnostic test for hemoglobin S. Presented as an exhibit before the 22nd joint annual meeting of the American Society of Clinical Pathologist and the College of American Pathologist. Miami Beach, Fla. Oct., 1968.
- 3.—GREEN, R. L., HUNTSMAN, R. G., SERJEANT, G. R.
The sickle cell and altitude. *Brit. Med. J.* 4:593-595, 1971.
- 4.—HUNTSMAN, R. G., BARCLAY, G. P. T., CANNING, D. M., YAWSON, G. I.
A rapid whole blood solubility test to differentiate the sickle-cell trait from sickle-cell anaemia. *J. Clin. Path.* 23:781-783, 1970.
- 5.—ITANO, H. A.
Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin. *Arch. Biochem.* 47:148-159, 1953.
- 6.—JONES, S. R., BINDER, R. A., DONOWHO, E. M.
Sudden death in sickle-cell trait. *New Engl. J. Med.* 282:323-325, 1970.
- 7.—KONOTÉY, F. I. D.
Anaesthetic deaths and the sickle-cell trait. *Lancet* 1:267, 1969.

- 8.—LANGE, R. D., MIUNICH, V., MOORE, C. V.
Effect of oxygen tension and of ph on the sickling and mechanical fragility of erythrocytes from patients with sickle-cell anemia and the sickle-cell trait. *J. Lab. Clin. Med.* 37:789-802, 1951.
- 9.—LEHMANN, H., HUNTSMAN, R. G.
Man's haemoglobins. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. Pág. 245, 1966.
- 10.—MC CORMICK, W. F.
Abnormal hemoglobins II. The pathology of sickle cell trait. *Am. J. Med. Sci* 241:329-335, 1961.
- 11.—MURAYAMA, M.
Structure of sickle cell hemoglobin and molecular mechanism of the sickling phenomom. *Clin. Chem.* 14:578, 1967.
- 12.—NALBADIAN, R. M., HENRY, R. L., LUSHER, J. M. ET AL.
Sickledex test for hemoglobin S. A critique. *JAMA* 218:1679-1680, 1971.
- 13.—NALBADIAN, R. M., NICHOLS, B. M., CAMP, F. R. JR., ET AL.
Dithionite tube test a rapid, inexpensive technique for the detection of hemoglobin S and non S sickling hemoglobin. *Clin. Chem.* 17:1028-1032, 1971.
- 14.—ROTTER, R., LUTTGENS, W. F., PETERSON, W. L., ET AL.
Splenic infarction in sicklemlia during airplane flight: pathogenesis, hemoglobin analysis and clinical features of six cases. *Ann. Intern. Med.* 44:257-270, 1956.
- 15.—SAENZ, G. F., ALVARADO, M. A., ATMETLLA, F., ARROYO, G., JIMENEZ, R., VALENCIANO. E.
1973 Investigación de hemoglobinas anormales en población costarricense del Guanacaste. *Act. Med. Cost.* 16:147-159.
- 16.—SCHNEIDER, R. G., ALPERIN, J. B., LEHMANN, H.
Sickling tests pitfalls in perfomance and interpretation *J. Am. Med. Ass.* 202:419-421, 1967.
- 17.—WE - PING LOH.
Evaluation of a rapid test tube turbidity test for the detection of sickle cell hemoglobin. *Am. J. Clin. Path.* 55-55-57, 1971.
- 18.—WINTROBE, M. M.
Clinical Hematology. Lea & Febiger Philadelphia. Sixth Edition, pag. 705, 1968.