DIAGNOSTICO DE LA ESFEROCITOSIS HEREDITARIA CON PRUEBAS DE GLICEROLISIS

Walter E. Rodríguez, German F. Sáenz*, Jessie Orlich***

RESUMEN

Se analizó a 18 pacientes con esferocitosis, 30 mujeres embarazadas, 3 pacientes bajo hemodiálisis y 51 controles normales, mediante tres pruebas de glicerolisis. La prueba de Vettore (Pink test) resultó tener un 100 por ciento de especificidad y sensibilidad con sangre fresca y con sangre incubada durante 24 horas a temperatura ambiente. La glicerolisis ácida presentó una específicidad que decayó al 85,7 por ciento tras la incubación a temperatura ambiente, pero fue un 100 por ciento específica y sensible con sangre fresca. Sólo con esta prueba se obtuvo valores "tipo esferocitosis" en mujeres embarazadas con más de 26 semanas de gestación. Debido a su baja sensibilidad y especificidad, no se recomienda usar la prueba original de gilcerolisis a pH 7,4. La prueba clásica de fragilidad osmótica resultó ser más sensible postincubación (94,1%) que al fresco (88,2%), con una especificidad global del 100 por ciento. Por lo anterior, se recomienda el método de Vettore et al como método de elección para el diagnóstico de la esferocitosis hereditaria, por su especificidad y sensibilidad elevadas, su bajo costo, la facilidad para su realización y la ventaja de poder realizarse igualmente en sangre fresca o en sangre incubada a temperatura ambiente durante 24 horas. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1989; 10(2):57-72].

* Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA), Cátedra de Hematología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Hospital San José, Costa Rica.

** Centro Nacional de Docencia e Investigación en Salud y Seguridad Social (CENDEISSS), San José, Costa Rica.

INTRODUCCION

Desde hace mucho tiempo se sabe que la esferocitosis hereditaria (EH) constituye un grupo heterogéneo de trastornos, tanto en sus alcances hereditarios y moleculares como en la severidad de la enfermedad (9). De allí que se use hablar de síndromes de esferocitosis (18).

En la literatura, se han mencionado tres tipos de defectos estructurales en la membrana eritrocítica (2, 3, 4, 7, 10, 14, 15, 22). Todos se relacionan con las cantidades de proteína estructural, espectrina, y algunos con su proteína ligadora, la ankarina (6, 7, 15).

La deficiencia de espectrina, sea cual sea su causa, es el factor primario en la patogénesis del esferocito, y la magnitud de su deficiencia se correlaciona con la severidad de la enfermedad y con la anormalidad de las pruebas de la fragilidad osmótica. El déficit de espectrina en la EH podría dar como resultado la conformación de un citoesqueleto inadecuado para saportar adecuadamente todas las regiones de la bicapa lipídica, llevando a la pérdida de pequeñas áreas compuestas de material lipídico y de proteínas integrales de membrana, bajo un proceso microvesiculación (13, 20) que origina

microvesículas que contienen lípidos de membrana y proteínas integrales, pero no espectrina (14).

La disminución relativa del área de superficie con relación al volumen celular da como resultado una sensibilidad incrementada a la lisis hipotónica, como se manifiesta en la gran mayoría de los síndromes de esferocitosis, a través de las pruebas de fragilidad osmótica (F.O.) (9), incluidas las recientes que incorporan al glicerol a las soluciones tampón hipotónicas (8). Es bien conocido que la F.O. de los eritrocitos no es más que un reflejo de su habilidad para embeberse de agua sin que ocurra lisis osmótica, y que esta propiedad está determinada por la razón área de superficie sobre volumen. La capacidad de los eritrocitos normales para resistir un medio hipotónico es producto de su forma bicóncava, que permite que su volumen aumente hasta un 70 por ciento, sin que ocurra lisis (8).

En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos con tres pruebas de glicerolisis aplicadas al diagnóstico de la esferocitosis hereditaria, junto con una prueba de escrutinio según el método clásico de la fragilidad osmótica. Se relatan también los hallazgos que se observaron en otras condiciones clínicas.

MATERIAL Y METODOS

Las investigaciones hematológicas de rutina se realizaron de acuerdo con la literatura (8, 18, 19). La prueba de la fragilidad osmótica (F.O.) incluyó el uso de sangre fresca (menos de 6 horas luego de recolectada) obtenida con EDTA. 2 Na (1-2 mg/ml de sangre), confrontada con tres soluciones salinas tamponizadas (0,45, 0,50, y 0,55 % de NaCl) (8).

La F.O. se registró como normal, dudosa (un solo tubo positivo) o aumentada (dos o más tubos positivos). La F.O. postincubación se llevó a cabo con soluciones de 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, y 0,80 por ciento de NaCl, aplicándose un criterio similar al citado para la interpretación de la prueba al fresco. Para efectuar las pruebas de glicerólisis, se utilizaron los métodos de Gottfried y Robertson (11), de Zanella et al (23), y “pink test” de Vettore et al. (21). Estos dos últimos se detallan en el anexo, por ser recientes, poco conocidos y más sensibles y específicos que el de Gottfried y Robertson. La sangre fue obtenida con EDTA. 2 Na en una relación de 1-2 mg/ml de sangre. La heparina sódica (0.1 mg/ml de sangre) se usó en pocas oportunidades, para sangre venosa y dactilar. Para medir el efecto de la incubación se usó sangre fresca (menos de 6 horas de obtenida), y luego de 24 horas a temperatura ambiente y a 4º C.

El grupo control lo constituyó un grupo de 51 personas normales, de uno y otro sexo. Se estudió un total de 18 casos de esferocitosis hereditaria, 8 de los cuales formaban parte de un grupo familiar que ya había sido diagnosticado (17). El resto de los casos (10/18) fue detectado con base en un seguimiento analítico intencionado. Del total de casos, cinco habían sido esplenectomizados. Se estudió un total de 30 mujeres embarazadas con un período gestacional entre 9 y 42 semanas, el 50 por ciento con más de 26 semanas. Se incluyó a tres pacientes bajo diálisis por enfermedad renal crónica. Finalmente, se incluyó un total de 24 casos de carácter misceláneo, incluyendo hemoglobinopatías y tras-

tornos hemoproliferativos, entre otros. Cuando fue posible, se estudió a la familia del paciente afectado, con el fin de determinar si el trastorno era dominante, aparentemente no dominante, o recesivo.

RESULTADOS

De los 18 casos de EH, 16 tuvieron una herencia dominante; un propositus fue el único caso en 12 familiares normales, incluyendo a padre y madre sin relación de consanguinidad (herencia no dominante); y en un caso aislado, no hubo estudio familiar. Por lo tanto, no se demostró algún patrón de herencia recesiva (padres normales, consanguíneos)

El cuadro I muestra los resultados obtenidos con las tres pruebas de glicerolisis, en pacientes con EH, mujeres embarazadas y controles normales. Puede observarse que con el método de Gottfried y Robertson (GLTS), hay traslape de valores entre las muestras control, las esferocíticas y las de mujeres embarazadas, lo que hace que este método tenga sensibilidad y especificidad bajas. Por el contrario, los métodos de Vettore y AGLT permiten discriminar claramente entre estas muestras.

CUADRO 1

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE LA GLICEROLISIS AL FRESCO EN 51 CONTROLES NORMALES, 18 PACIENTES CON ESFEROCITOSIS HERITARIA Y 30 MUJERES EMBARAZADAS

Método	Sujetos normales	Pacientes con esferocitos hereditaria	Mujeres embarazadas
Gottfried y Robertson (11) (GLTS)			
x̄	29,20	21,44	26,10
D.E.	5,93	2,96	4,82
Ambito	23,97-34,43	18,48 - 24,40	21,28 - 30,92
"Pink Test" (21) de Vettore et al (%)			
x̄	8,77	37,87	6,91
D.E.	5,10	14,65	5,97
Ambito	3,97 - 13	23,22 - 52,22	0,94 - 12,88
Zanella et al. (23) (segundos) (AGLT)			
x̄	>300	47,05	96,57
D.E.	-	8,65	30,87
Ambito	-	38,40 - 55,70	65,70 - 127,44

x̄ Promedio: D.E. = desviación estándar.

Al aplicar la t de Student a los resultados con la prueba de Vettore, se encontró que a un 95 por ciento del nivel de confianza no hay diferencias significativas entre los pacientes esplenectomizados y los no esplenectomizados, pero sí las hay al nivel de 90 por ciento. Esto significa que, desde el punto de vista analítico, hay mayor hemólisis *in vitro* en los pacientes no esplenectomizados.

En las mujeres embarazadas, no se detectó caso alguno de hemólisis superior a lo normal mediante el método de Vettore; con el método de la AGLT siete mujeres embarazadas (23, 3%) tuvieron un patrón tipo esferocitosis (promedio de 96,57 segundos, D.E. de 30,87 segundos). Estos hallazgos anormales se presentaron en el 71,5 por ciento de las mujeres embarazadas con más de 26 semanas de gestación.

Los Gráficos 1 y 2 señalan los efectos de la incubación a temperatura ambiente y a 4°C en tres muestras de EH, según los métodos de Vettore y AGLT. Con ambos procedimientos aumenta la sensibilidad, especialmente cuando se incubó las muestras a temperatura ambiente durante 24 horas. Con el método de Vettore el promedio pasó de 31,01 por ciento de hemólisis a 45,5 por ciento a 4°C, y a 56,5 por ciento a temperatura ambiente. Con la AGTL se observa un aumento semejante en la sensibilidad a temperatura ambiente, pues al fresco, el valor promedio de 60 segundos disminuyó a 36 segundos a las 24 horas.

La corrida simultánea de 14 controles normales (Gráficos 3 y 4) mostró que con la AGLT, la especificidad baja en un 14,3 por ciento (2/14) a temperatura ambiente, con dos valores menores de 300 segundos (70 y 150 seg). A 4º C, todos los resultados fueron mayores de 300 segundos.

En la F.O. clásica (9), se obtuvo valores de hemólisis de referencia en 10 sangres normales. Al analizar 17 casos de EH con muestras frescas, 14 de los 17 casos mostraron una fragilidad osmótica aumentada con las tres soluciones de NaCl, un caso lo dió con dos de ellas (0,45 y 0,50) y las dos restantes lo fueron únicamente con la solución al 0,55 por ciento. Con estos resultados, se deduce que la sensibilidad para los 17 casos estudiados de EH fue de 88,2 por ciento. Al Analizar la muestra postincubación, 14 de los casos presentaron una F.O. aumentada con las cinco soluciones de NaCl, una con todos excepto la de 0,80 por ciento, otra no mostró una FO. aumentada al 0,75 y 0.80 por ciento, y finalmente, dos de ellas mostraron una fragilidad dudosa en el escrutinio con NaCl al 0,60 por ciento. Con estos resultados se deduce que la sensibilidad de la prueba de F.O. postincubación fue del 94,1 por ciento.

La especifidad fue de 100 por ciento para las dos condiciones de incubación (n=30).

Dentro del grupo de trastornos misceláneos que se estudió, cabe destacar tres casos de enfermedad renal crónica bajo tratamiento de diálisis, dando uno de ellos resultados positivos con los tres métodos de glicerólisis, en tanto que del estudio de tres pacientes con leucemia granulocítica crónica, dos de ellos fueron positivos sólo con el método de la AGLT. Igual resultado se obtuvo en uno de tres casos de leucemia linfocítica crónica. Resultaron negativos los siguientes padecimientos: 6 hemoglobinopatías (SS, AS, AC C/B tal), 6 síndromes talasémicos menores, una eliptocitosis hereditaria, un cuadro ligero de acantocitosos de causa desconocida, tres leucemias linfocíticas agua y un caso de mielona múltiple.

La sensibilidad especificada de las pruebas de glicerólisis y de la F.O. practicadas en este estudio, se resumen y comparan en el Cuadro II.

CUADRO 2

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD (*) DE LA AGLT, LA PRUEBA DE VETTORE Y F.O. EN CINCO ESTUDIOS

REFERENCIA	AGLT Sensibilidad	AGLT Específica	Vettore et al Sensibilidad	Vettore et al Específica	F.O Sensibilidad	F.O Específica
Zanella et al. (23)	100%	100%	-	-	81%	-
Vettore et al. (21)	-	-	100%	100%	74%	-
Rutherford et al.(16)	92.3%	80,8%	-	-	-	-
Bucx et al. (5):						
fresco	81,6%	100%	97,4%	94,7%	100%	100%
24 hs a T.A.	100%	100%	100%	72,1%		
Presente estudio:						
fresco	100%	100%	100%	100%	88,2%	100%
24 hs a T.A.	100%	85,7%	100%	100%	94.1% (37 ºC)	100%

(*) concerniente sólo a las muestras normales utilizadas como control.
TA =Temperatura ambiente.

DISCUSION

Las pruebas de glicerólisis para el diagnóstico de la EH han venido tomando auge en el último lustro. El fundamento básico de las mismas está relacionada con el hecho de que el glicerol, constituyente de diversos tipos de soluciones tampón, retarda el grado de entrada de moléculas de agua a los eritrocitos, por lo que el tiempo que toma la lisis osmótica puede ser convenientemente medido o registrado. Aquellos eritrocitos con una razón disminuida entre al área de superficie y el volumen, como es el caso de los esferocitos, resisten por menos tiempo el embebimiento con relación a las células normales. Este comportamiento osmótico normal es común a todo tipo de esferocito, sean estos de carácter hereditario o adquirido.

Estos procedimientos han resultado particularmente útiles para la identificación de familiares de pacientes con EH, en quienes los cambios citomorfológicos no son concluyentes.

Las pruebas de glicerólisis han sido objeto de controversias desde que se publicaron en la literatura. Los autores de cada versión metodológica han afirmado que la sensibilidad y especificidad para la detección de la esferocitosis es del 100 por ciento para ambas cualidades, lo que ha sido cuestionado (1, 5, 12, 16, 21), en especial la prueba de la GLTS (23, 24). En muchas de las discrepancias, es posible que la calidad de los reactivos utilizados jueguen un papel importante, así como las condiciones que se han seguido para la realización de las pruebas, incluida la propia F.O. (5). Por ejemplo, el método de la AGLT de Zanella et al. (23) supone que la prueba se puede llevar a cabo a temperatura ambiente dentro de las primeras 24 horas luego de obtenidas las muestras de sangre. Por otro lado, otros autores consideran que la sensibilidad del método en cuestión se incrementa si se practica a 3°C (1), o a temperatura ambiente luego de 24 horas de obtenida la muestra (5).

No hay duda alguna que el pH de las soluciones, así como las osmolaridad de las soluciones tampón y la calidad y cantidad de glicerol, son variables críticas en estos procedimientos. Finalmente, el efecto de la incubación de las muestras, así como el tiempo transcurrido entre la recolección de las mismas y su análisis, tendrán una fuerte influencia en los resultados de las pruebas. Estas variables se ha intentado estudiar en este reporte.

Con la excepción de lo obtenido con la GLTS, en los resultados de este estudio con la AGLT y el Pink Test caen dentro de lo reportado en la literatura y resultan ser claramente discernibles en los resultados patológicos que brindan los 18 casos de esferocitosis estudiados.

Pudo demostrarse, al igual que Bucx et al. (5), que para esos dos métodos la sensibilidad para la detección de EH aumenta considerablemente a temperatura ambiente, silos análisis se practican luego de 24 horas de incubación (Gráfico 3), sin que se modifique en ese sentido el Pink Test (Gráfico 4). El estudio de especímenes de mujeres en estado gestacional permitió reconocer las alteraciones de estas pruebas, particularmente con la AGLT, pues de 30 casos, siete de ellos (23,3%) resultaron con una fragilidad celular aumentada a la glicerólisis, en especial con las muestras de mujeres con más de 26 semanas de embarazo. Estos hallazgos atípicos de la glicerólisis en condiciones de embarazo ya habían

sido reportados en la literatura (1, 23). La prueba de la F.O. aumentada en 17 casos de esferocitosis hereditaria permitió distinguir la bondad de este procedimiento, pues al fresco la sensibilidad fue de un 88,2 por ciento, subiendo a 94,1 por ciento en condiciones de postincubación de las muestras durante 24 horas a 37º C, con una especificidad del 100 por ciento.

De los resultados obtenidos se infiere que la prueba de la lisis con glicerol de Gottfried y Robertson (11) no es recomendable para el estudio o diagnóstico de la EH, por su sensibilidad y especificidad bajas.

Por otra parte el método de Vettore et al. (21) (Pink Test) tiene una sensibilidad y especificidad del 100 por ciento, siendo un procedimiento que utiliza una única solución de pH constante y de osmolaridad fácilmente comprobada. Asímismo, es una prueba simple, fácil de realizar y de bajo costo, de utilidad diagnóstica tanto al fresco como en muestras de 24 horas de incubación a temperatura ambiente. En nuestra opinión, este método es el de elección para el diagnóstico de EH.

La prueba de Zanella et al. (23) de la glicerólisis ácida tiene una sensibilidad del 100 por ciento tanto a fresco como a temperatura ambiente luego de 24 horas de incubación, aunque en este último caso la especificidad decae al 85,7 por ciento. Aún así, se trata de un procedimiento adecuado, que siempre dio resultados claramente tipificados para E.H. La prueba de F.O. resulta ser sensible en un 88,2 por ciento al fresco yen un 94,1 por ciento postincubación, sin que se altere su especificidad.

ABSTRACT

Eighteen patients with hereditary spherocytosis (HS), 30 pregnant women, 3 patients under hemodialysis, and 24 patients with diverse disorders, such as hemoglobinopathies and leukemia were studied. Fitty one normal subjects were included as controls. Whenever possible, family members were also studied, in order to determine heredity patterns of spherocytosis.

Blood samples were analyzed by the classic osmotic fragility test as well as three modified glicerolysis tests (Gottfried and Robertson, Zanella et al., and Vettore et al. s “pink test”), both with fresh blood and postincubation for 24 hours at room temperature.

In the 18 Hs cases, 89 percent (16/18) had a classic dominant heredity, one was not dominant, and the other was not determined, for lack of family studies.

With repect to the glycerolysis tests, the Pink Test was 100 percent specific and sensitive with fresh samples and postincubation for 24 hours at room temperature. The acid glycerolysis test was 85.7 specific after 24 hours incubation, and 100 sensitive for both incubation times. This test was the only one that yielded “spherocytosis type” results for pregnant women. The original glycerolysis test at pH 7,4 is not recommended due to its low sensitivity and specificity. The classic osmotic fragility was most sensitive postincubation (94,1%) that with fresh samples (88,2%), with a global specificity of 100 percent. In the other cases, the results were varied.

The Pink Test is recommended for diagnosis and follow up of SH patients, due to it low cost, simplicity and high sensitivity and specificity.

GRAFICO 1

EFECTO DE LA INCUBACION SOBRE LA GLICEROLISIS EN 3 MUESTRAS DE ESFEROCITOSIS HEREDITARIA, DE ACUERDO AL METODO DE "Pik Test"

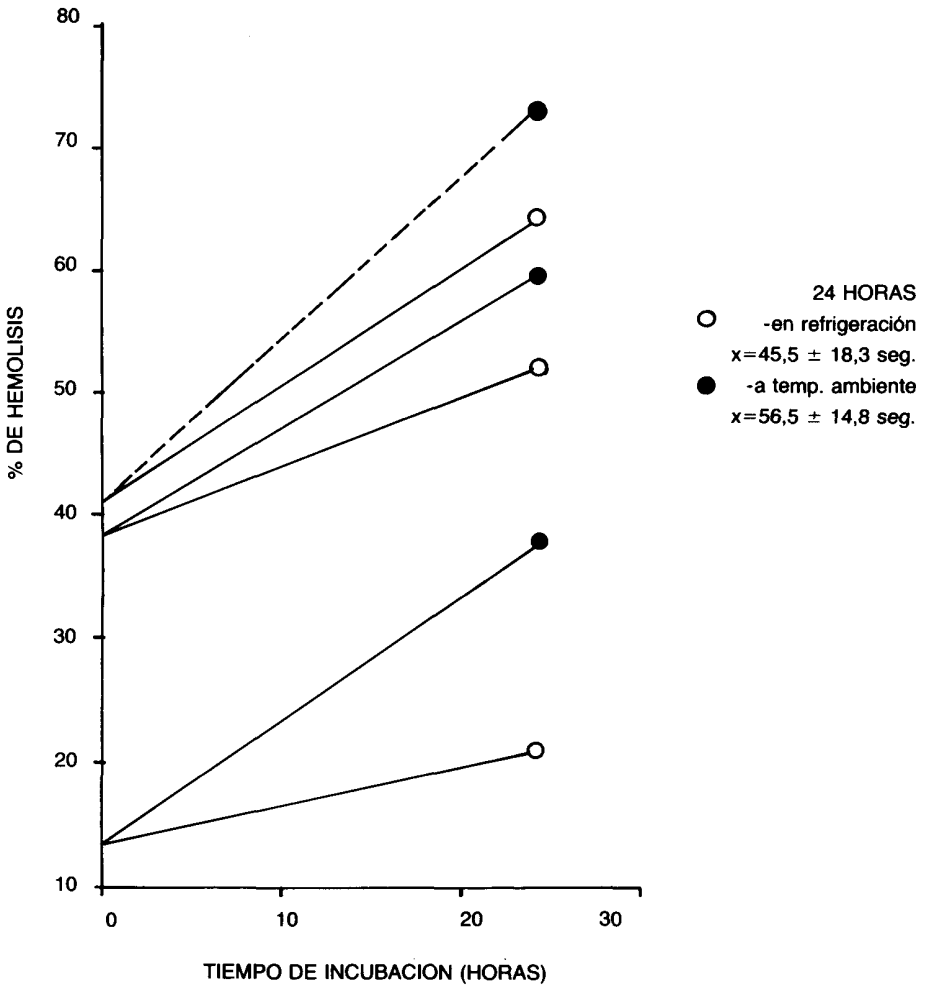


GRAFICO 2

EFECTO DE LA INCUBACION SOBRE LA GLICEROLISIS EN 3 MUESTRAS DE ESFEROCITOSIS HEREDITARIA DE ACUERDO CON EL METODO DE LA AGLT

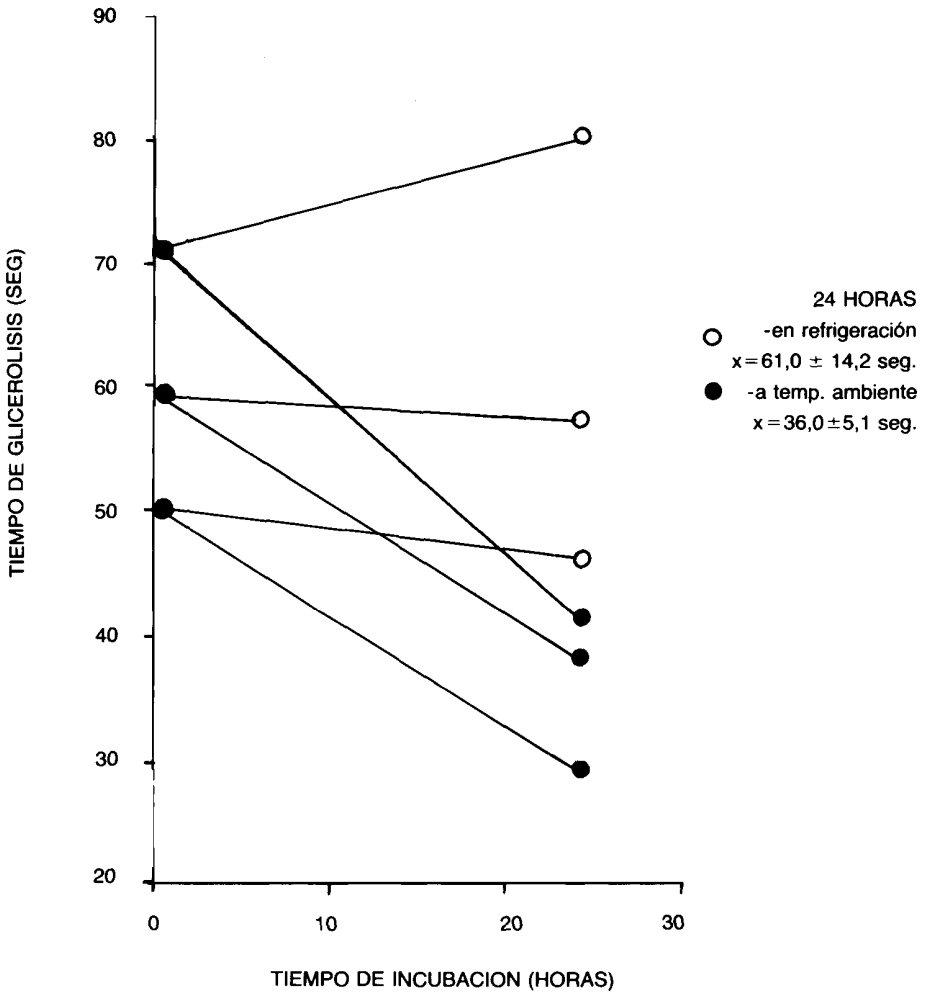


GRAFICO 3

EFECTO DE LA INCUBACION SOBRE LA GLICEROLISIS EN 14 MUESTRAS CONTROL, DE ACUERDO CON EL METODO DE LA AGLT

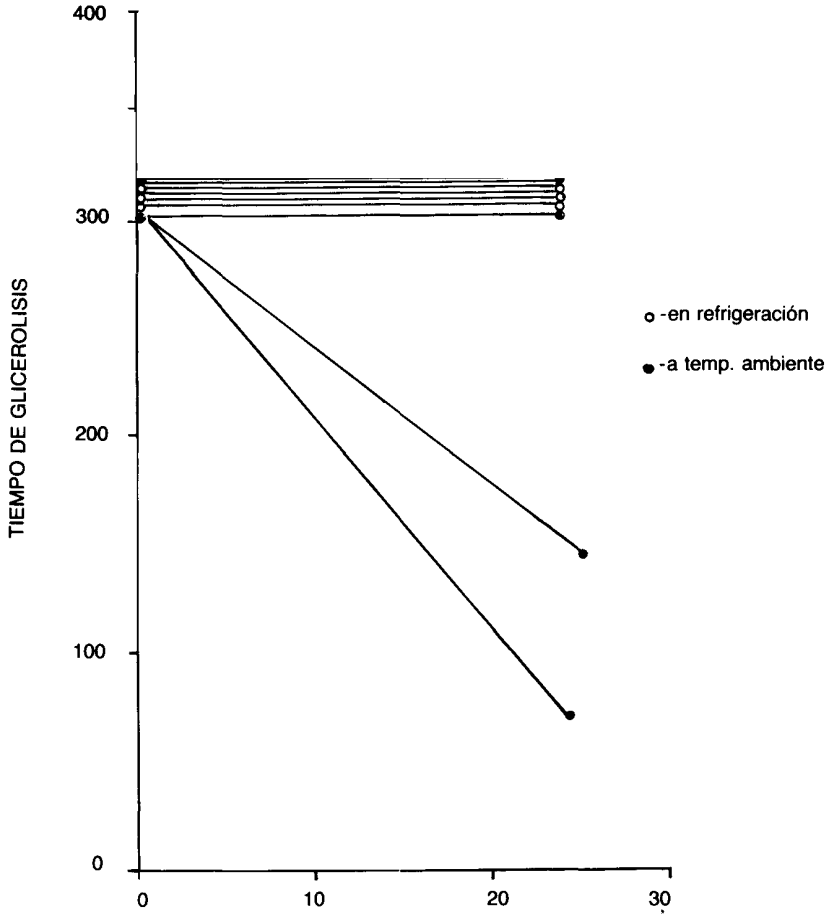
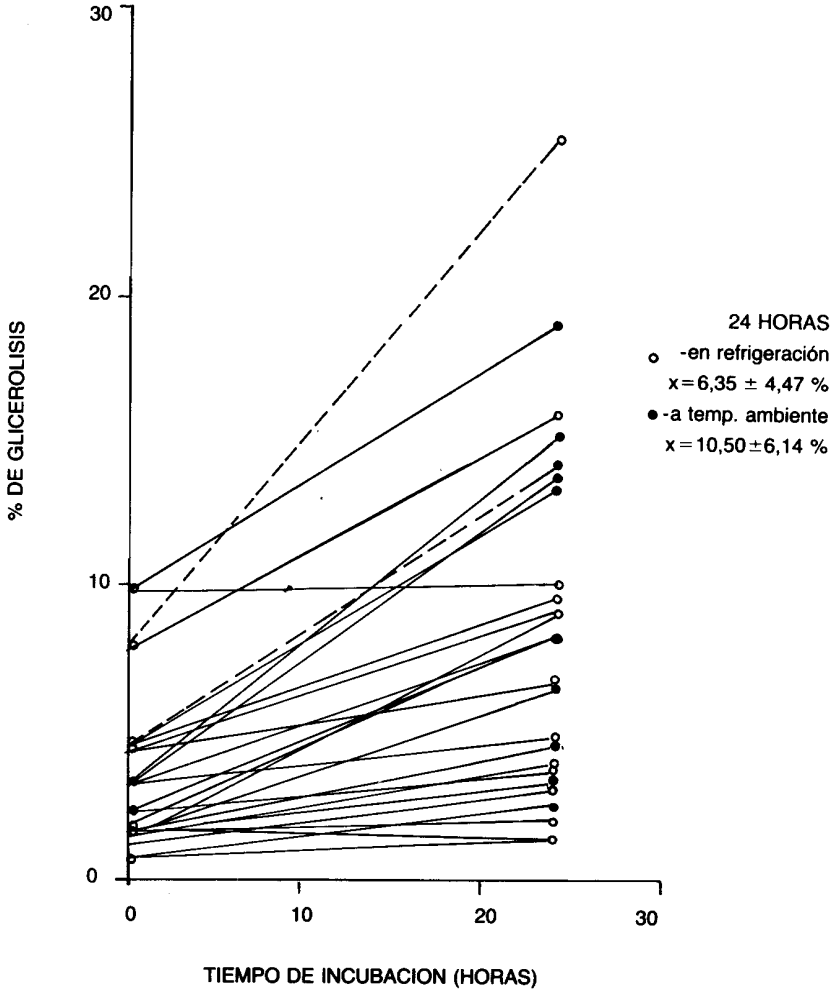


GRAFICO 4

EFECTO DE LA INCUBACION SOBRE LA GLICEROLISIS EN 14 MUESTRAS CONTROL, DE ACUERDO CON EL METODO "Pik Test"



BIBLIOGRAFIA

1. Acharya, J., Ferguson, I.L.C., Cassidy, A.G. & Grimes, A.J. An improved acidified glycerol lysis test (AGLT) used to detect spherocytosis in pregnancy. Brit. J. Haematol., 1987; 65:343-345.

2. Agre, P. Orringer, E.P. & Bennett, V. Deficient red cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. N. Eng. J. Med. 1982; 306:1155-1161.

3. Agre, P., Casella, J.F., Zinkham, W.H., McMillan, C. & Bennett, V. Parcial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. Nature 1985; 314:380-383.

4. Agre, P., Asimos, A., Casella, J.F., Mcmillan, E. Inheritance pattern and clinical response to splenectomy as a reflection of erythrocyte spectrin deficiency in hereditary spherocytosis. N. Eng. J. Med. 1986; 315:1579-1583.

5. Bucx, M.J.L., Bread, W.P.M. & Hoffmann, J.J.M. Comparison of acidified glycerol lysis test, pink test and osmotic fragility test in hereditary spherocytosis: effect of incubation. Eur. J. Haematol. 1988; 40:227-231.

6. Coetzer.T.L., Lawler, J., Parchal, J.T., Gualtieri, A., Palek, J. Partial ankirin and spectrin deficiency in severe hereditary spherocytosis (HS). Blood 1986; 68, suppl. 1:54a.

7. Coetzer, T.L., Lawler, J., Lin, S-ch., Parchal, J.T., Gualtieri, R.J., Brain, M.C. Partial ankyrin and spectrin deficiency in severe, atypical hereditary spherocytosis. N. Engl. J. Med. 1988; 318:230-234.

8. Dacie, J.V. & Lewis, S.M. Practical Haematology, Sixth Edition. Churchill Livingstone, London. 1984; 152-159.

9. Dacie, J.V. The haemolytic anaemias, 3rd. Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1985; 134-215.

10. Goodman, S.R., Shiffer, K.A., Casoria, L.A., Eyster, M.E. Identification of the molecular defect in the erythrocyte membrane skeleton of some kimdreds with hereditary spherocytosis. Blood 1982; 60:772-784.

11. Gottfried, E.L. & Robertson, N.A. Glycerol lysis time as a screening test for erythrocyte disorders. J. Lab. Clin. Med., 1974a; 83:323-333.

12. Hoffmann, J.J., Swaak-Lammers, N., Bucx, M.J. Breed, W.P. Evaluation of the acidified glycerol lysis time. Brit. J. Haemat. 1987; 65:252.

13. Lempert, K.D. Gammopathy and spherocytosis (Letters to Editor). Ann. Inter. Med. 1978; 89 (1):145-146.

14. Lutz, H.U., Lin, S.C., Palek, J. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocyte during ATP depletion. I. Characterization of spectrin-free vesicles. J. Cell Biol. 1977; 73:548-560.

15. Palek, J. Hereditary Elliptocytosis, Spherocytosis and related disorders: consequence of a deficiency or a mutation of membrane skeletal proteins. Blood Reviews, 1987; 1:147-168.

16. Rutherford, C.J., Postlewaight, B.F. & Hallowes, M. An evaluation of the acidified glycerol lysis test. Brit. J. Haematol., 1986; 63:119-121.

17. Sáenz, G.F., Orlich, J., Chaves, M., Montero, A.G., Jiménez, J., Azofeifa, B., Muñoz, R. Observaciones sobre una familia con esferocitosis hereditaria y revisión de la literatura. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1981; 2:17-28.

18. Sáenz, G.F. Cuadros de esferocitosis: síndromes y aspectos diagnósticos. *Sangre* 1983; 28:330-339.

19. Sáenz, G.F., Barrantes, A., Chaves, M. *Hematología Analítica*, Editorial U.C.R., Costa Rica, 1987:251-265.

20. Snyder, L.M., Lutz, H.U., Sauberman, N., Jacob, J., Fortsir, N.L. Fragmentation and noyelin formation in hereditary xerocytosis and other hemolytic anemias. Blood 1978; 52:750-761.

21. Vettore, L., Zanella, A., Molano, G., Conetta de Matteis, M., Pavesi, M. & Mariani, M. A new test for the laboratory diagnosis of spherocytosis. Acta Haematol. 1984; 72:258-263.

22. Wolfe, L.C., John, K.M., Falcone, J.C., Byrne, A.M., Lux, S.E. A genetic defect in the binding of protein 4.1 to spectrin in a kindred with hereditary spherocytosis. N. Engl. J. Med. 1982; 307:1367-1374.

23. Zanella, A., Izzo, C., Rebulla, P., Zanuso, F., Perroni, L. & Sirchia, G. Acidified glycerol lysis test: a screening test for spherocytosis. Brit. J. Haemat. 1980; 45:481-486.

24. Zanella, A., Sirchia, G. Screening tests for spherocytosis: Letter to the Editor. Brit. J. Haematol., 1981; 49:489-490.

ANEXO

METODO DE LA GLICEROLISIS DE ZANELLA ET AL (AGLT)

Brit J. Haemalol 1980; 45; 481-486.

Reactivos:

a) Tampón isotónico de solución salina y fosfatos (PBS): mezclar 9 volúmenes de una solución 0,150 M de NaCl (9,0 g/l-), con un volumen de una solución 0,100 M de fosfatos (2 volúmenes de Na_2HPO_4-14,9 g/l más un volumen de KH_2PO_4-13,61 g/l-*)*. El pH de la solución final a temperatura ambiente es *crítico* (6,85 ± 0,05). Ajustarlo con HCl o NACH si fuera necesario. La osmolaridad debe ser entre 290 y 300 mOsm/L. Esta solución es estable por varios meses en refrigeración mantenida en botella ámbar.

b) Reactivo lisante de glicerol (0,30 M): si se utiliza glicerol Merck (87%) mezclar 2,58 ml de glicerol con 30 ml del tampón de PBS en un balón de 100 ml y llevar al aforo con agua destilada. Guardar en refrigeración.

NOTAS:

a) De a que el PH es crítico, es conveniente revisarlo periódicamente. Para mayor facilidad, se puede preparar un litro de la solución de fosfatos 0,100 M (sin NaCl), que correspondería a la solución de reserva. Esta solución debe también guardarse en refrigeración. De ésta, tomar el volumen adecuado para preparar el PBS de trabajo, al anadirle NaCl (0,150 M). Antes de usarlo, dejarlo unos minutos a temperatura ambiental.

b) Es conveniente preparar la solución lisante de glicerol cada 8 días, ya que la estabilidad se pierde con el tiempo, sobretodo por lo crítico del pH. Debe de guardarse en refrigeración y al momento de usarla, esperar a que se equilibre con la temperatura ambiental.

c) Los autores preconizan el uso de glicerol grado reactivo de Carlo Elba (Milano, Italia), el cual es 0,30 M cuando 21,98 ml (27,62 g) se añaden a 300 ml del PBS, pH 6,85; llevándose a volumen final de un litro con agua destilada.

d) La sangre debe anticoagularse con EDTA disódico (1,5 mg/ml), o con heparina (0,15 mg/ml).

Procedimiento

Mezclar 20 ul de sangre con 5 ml del tampón PBS y homogenizar bien la mezcla. Tomar 1,0 ml de la misma y agregarlo a una cubeta del espectrofotómetro, idealmente equipado con un registrador potenciométrico linear/logarítmico. Colocar la cubeta en la celdilla del aparato y fijar la longitud de onda en 625 nm con el registrador operando. Añadir *rápidamente* 2.0 ml del reactivo lisante de glicerol. Asegurarse de soplar bien la pipeta para que la mezcla sea adecuada. Esta operación se puede facilitar con el uso de una pipeta automática o una jeringa calibrada de 2 ml. Con un cronómetro tomar el tiempo *inmediatamente* después de añadir el reactivo, el cual debe coincidir con la lectura de la absorbancia inicial de la mezcla (A_1) (primera lectura en la pantalla del espectrofotómetro). El grado de hemólisis se observa al apreciarse la caída de la turbidez inicial de la mezcla. Los resulta-

dos se expresan como el tiempo en segundos requerido para que la absorbancia (A_1) caiga a la mitad del valor inicial ($AGLT_{50}$).

NOTAS:

Nosotros utilizamos pipetas corrientes para añadir el reactivo de glicerol, y garantizamos una mezcla adecuada, al soplar fuertemente el reactivo en la cubeta que contiene la mezcla sangre-tampón, leyendo la A_1 inmediatamente. Las cubetas usadas en las determinaciones deben estar limpias y secas. Se recomienda limpiarlas entre cada determinación con agua destilada, y luego añadirle un poco de acetona para evaporar el agua de sus paredes. Se puede utilizar también un espectrofotómetro de pantalla convencional, teniendo el cuidado de hacer las lecturas en unidades de absorbancia. Se observa que el valor de la absorbancia inicial A_1, generalmente oscila entre 0,600-0,700 al utilizarse espectrofotómetros de pantalla digital. Los volúmenes de la suspensión eritrocítica y de glicerol son críticos. Los valores de referencia reportados por los autores del método son de más de 1800 segundos para pacientes sin esferocitosis y entre 25-142 segundos para casos de esferocitosis.

PRUEBA ROSADA DE LA GLICEROLISIS ACIDA (PINK TEST) DE VETTORE ET AL.

Acta Haemalol 1984; 72:258-263.

Reactivos:

a) Solución de bis-tris: bis- (2 hidroxietil)-amino-tris (hidroximetil) metano (Sigma), 70 mmol/l (14,6 g/l); azida de sodio, 1,5 mml/l (0,1 g/l): glicerol al 87% (Merck), 135 mmol/l (11,61 ml) y cloruro de sodio (Fischer) 25 mmol/l (1,46 g/l). Aforar a un litro con agua destilada y ajustar el pH con HCl a 6,66 (rango entre 6,50-6,75). El factor crítico de esta solución es la osmolaridad, cuyo valor debe ser de 290 ± 5 m0sm/1 H_20. La osmolaridad debe ajustarse, cuando sea necesario, con pequeños volúmenes de una solución saturada de cloruro de sodio (30%).

NOTAS:

Se debe mantener siempre la osmolaridad en 290 ± m0sm/1 H_20. Se recomienda primero ajustar el pH del tampón y por último la osmolaridad, cuando apenas falte un pequeño volumen por aforar. La solución se guarda en refrigeración en botella ámbar. Es muy estable, tanto de pH como de osmolaridad. Si se utiliza glicerol grado reactivo (Erba) sus cantidades serán 135 mmol/l (12,43 g/l).

b) Solución lisante: Preparar una solución al 2% de Tritón X-100 (Sigma) en agua destilada. Se guarda en refrigeración y es estable por varias semanas.

c) Se utiliza sangre total anticoagulada con EDTA disódico o potásico (1,5 mg/ml), o con heparina (0,15 mg/mi), de menos de 3 horas luego de recolectada.

Procedimiento:

Tomar 10 ul de sangre y mezclarla con 3 ml de la solución tampón de bis-tris, agitando bien su inversión para homogenizar. Dejar la mezcla 30-45 minutos a temperatura ambiente (20-25º C). Al término del período de incubación, centrifugar los tubos por 5 minutos y proceder de la siguiente manera:

1. Análisis de escrutinio o semicuantitativo: comparar visualmente el sobrenadante del tubo centrifugado (con cuidado de no resuspender el botón eritrocítico), con una solución de referencia del 25 por ciento de hemólisis. Esta referencia se prepara mezclando 10 ul de la muestra de sangre en estudio, con 12 ml de la solución usante de Tritón. Si visualmente se observa que hay más hemólisis rosada en el patrón de 25 por ciento que en la muestra, se descarta la posible esferocitosis. Si la hemólisis de la muestra es mayor o muy semejante al patrón de referencia de 25 por ciento, es necesario efectuar la cuantificación de la siguiente forma:
2. Análisis cuantitativo: leer la absorbancia (A) del sobrenadante de la muestra anterior a 540 nm contra blanco de reactivos, teniendo la precaución de no resuspender el botón eritrocítico. Esta A corresponde a la muestra en estudio (Am). Acto seguido, devolver cuantitativamente el sobrenadante leido al tubo original (que contiene el botón) y resuspender bien. Añadir dos gotas de la solución lisante de Tritón y agitar bien por inversión repetida, para asegurarse que la hemólisis sea total. Leer la A, la cual corresponderá al 100 por ciento de hemólisis (Ap 100).

El resultado expresa el porcentaje de hemólisis de la muestra, calculado de la siguiente manera:

$$\%\text{Hemólisis: } \frac{Am}{Ap\ 100} \times 100$$

Valores de referencia reportados por los autores: 0-30% (12,5 ± 8) en sujetos sin esferocitosis, y más de 28,5% (60,8 ± 16,5) en casos de esferocitosis.