

Prueba de la desnaturalización alcalina de la hemoglobina en obstetricia

Drs. Pedro Faneite, Luis Ojeda, Marina Repilloza, Francis Pineda de Molina

Universidad de Carabobo, Facultad Ciencias de la Salud, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital "Dr. Adolfo Prince Lara", Puerto Cabello, Edo. Carabobo, Venezuela

RESUMEN

Objetivo: Evaluar prospectivamente la utilidad de la prueba de la desnaturalización alcalina con hidróxido de sodio en la identificación de la hemoglobina fetal y del adulto.

Método: El fundamento de la prueba es la propiedad de la hemoglobina fetal de ser resistente a la desnaturalización alcalina y la fragilidad de la hemoglobina del adulto. Se recolectaron 100 muestras de sangre del cordón umbilical y 100 de mujeres no embarazadas. Se prepararon hemolizados que fueron sometidos a concentración variable de hidróxido de sodio 0,2 N; 0,4 N; 0,6 N y 0,8 N para determinar cuál era la de mayor utilidad discriminativa. A un grupo de 80 hemolizados, codificados y aleatorios (40 adulto y 40 fetal), se sometieron a identificación de manera ciega con observadores voluntarios.

Ambiente: Hospital "Dr. Adolfo Prince Lara", Puerto Cabello, Edo. Carabobo.

Resultados: El hidróxido de sodio 0,2 N fue la concentración que más evidentemente deslindó las hemoglobinas estudiadas al valorar el tiempo y cambio de color inducido ($p < 0,001$). Todos los hemolizados adultos y fetales probados en ensayos ciegos, fueron identificados correctamente al emplear hidróxido de sodio 0,2 N.

Conclusión: La prueba de desnaturalización de la hemoglobina con hidróxido de sodio al 0,2 N es una prueba sencilla, rápida, económica y segura en la identificación de la hemoglobina fetal y la adulta.

Palabras clave: Desnaturalización alcalina de la hemoglobina. Hidróxido de sodio.

SUMMARY

Objective: To evaluate prospectively the utility of the alkaline denaturation test with sodium hydroxide in the identification of the fetal hemoglobin and adult.

Method: The principle of the test is the property of the fetal hemoglobin to resistant being to the alkaline denaturation and the fragility of the adult hemoglobin. We collected 100 samples of blood of the umbilical cord and 100 of women not pregnant. They get ready hemolyzed, being subjected variable concentration of 0.2 N sodium hydroxide, 0.4 N, 0.6 N, and 0.8 N, in order to determine who it was the utility. To a group of 80 hemolyzed were coded and random (40 fetal and 40 adults), they were valued upon identifying to blind trial with observers volunteers.

Setting: Hospital Dr. "Adolfo Prince Lara" Puerto Cabello, Carabobo State, Venezuela.

Results: The 0.2 N sodium hydroxide was the concentration that more apparently distinguished the studied hemoglobins considering the chance of color and time employed for it. All the hemolyzed with fetal hemoglobin and adult hemoglobin proven in blind trial were identified correctly upon employing 0.2 N sodium hydroxide.

Conclusion: The denaturation of the hemoglobin with 0.2 N sodium hydroxide is a simple, economical, and sure test of identifying the fetal hemoglobin and adult hemoglobin.

Key words: Alkaline denaturation of the hemoglobin. Sodium hydroxide.

INTRODUCCIÓN

Con cierta frecuencia el obstetra, perinatólogo, o el asistente de un parto se ve ante la necesidad de precisar si la sangre que tiene ante sí es de origen materno o fetal; esto se puede presentar durante el embarazo: sangrado materno (placenta previa, desprendimiento prematuro de placenta), luego de

rotura de membranas y sangrado fetal (vasa previa o inserción velamentosa del cordón), otro momento puede ser luego de un procedimiento diagnóstico o terapéutico como la amniocentesis o cordocentesis; por ello la finalidad de identificar el tipo de sangre implica un objetivo pronóstico de morbimortalidad para la madre o el feto, o bien sólo una ayuda en el diagnóstico y/o terapéutica. En el país Agüero (1,2)

Recibido: 20-10-99

Aceptado para publicación: 16-02-00

y Agüero y Ziri (3) han dado a conocer su experiencia.

De una manera ideal se desearía un procedimiento sencillo, rápido, económico, preciso; existen diversos métodos, de lo complejo a lo sencillo tenemos la identificación de la hemoglobina mediante la electroforesis (4), la prueba de Kleihauer-Betke (5,6), la determinación del volumen corpuscular medio; todos requieren de equipos costosos y personal especializado, y consumen importante tiempo. Existe un procedimiento más sencillo desarrollado por Apt y Downey (7), quienes inicialmente lo utilizaron en la identificación de la hemoglobina en la melena de neonatos, este método fue posteriormente modificado y empleado por Moir y Holbrook en la cordocentesis (8).

Estos últimos procedimientos se basan en que la hemoglobina fetal (HbF) a diferencia de la hemoglobina adulta (HbA), es resistente a la desnaturalización alcalina cuando se expone al hidróxido de sodio (NaOH); de tal manera que se pueden diferenciar en base a dos criterios: el color resultante de la desnaturalización alcalina y el tiempo necesario para obtener este viraje. El hemolizado de HbA cambia rápidamente de rosado a negro al añadir el NaOH, en cambio el de HbF hace un viraje lento a marrón claro.

Un factor a considerar es la edad de gestación, pues el eritrocito fetal recibe la incorporación de la HbA a partir de las 28-34 semanas, pero se ha comprobado que ello no afecta el resultado de esta prueba (9).

Ahora bien, nos hemos propuesto cómo evaluar prospectivamente la utilidad de desnaturalización alcalina con NaOH en la identificación de las HbF y HbA, a fin de considerarla diagnóstica, para ello tenemos dos objetivos específicos: el primero, determinar cuál es la concentración óptima de NaOH que permite la discriminación entre ambas hemoglobinas, y segundo, conocer su seguridad y simplicidad diagnóstica.

MATERIAL Y MÉTODO

A fin de estudiar la mejor concentración de NaOH que permita la identificación de HbF o HbA se tomaron prospectivamente 100 muestras de sangre del cordón umbilical en la sala de partos del Departamento de Obstetricia y Ginecología, las madres estaban entre las 36 y 42 semanas de gestación, y 100 muestras, de sangre de mujeres no embarazadas.

Las muestras fueron recabadas en inyectadoras

estériles de 20 cm³, inmediatamente fueron transferidas a tubos, con ácido etilenediaminetetra-acético (EDTA). Los hemolizados se hicieron al añadir agua destilada en una proporción de 5 a 1, de ello se tomó 0,25 ml y se colocó en un tubo de ensayo para la prueba, éste contiene 0,5 ml de sangre. Luego se añadió 0,125 ml de NaOH de diversas concentraciones (0,2 N; 0,4 N; 0,6 N y 0,8 N) a cada tubo de prueba, agitando suavemente. Se registró el tiempo en segundos (s) empleado para obtener un cambio de color (8).

Con el fin de análisis se calcularon los tiempos promedios de cada concentración, tanto para los hemolizados fetales y adultos, expresados en Cuadro y Figura, se compararon luego empleando la prueba de Student.

Con el objeto de establecer la seguridad y simplicidad de la prueba se emplearon observadores ciegos para valorar la utilidad de la desnaturalización alcalina en la identificación de sangre fetal y del adulto, se prepararon de manera codificada y aleatoria 40 hemolizados adultos y 40 fetales, los cuales se presentaron a 4 observadores a los cuales se les dio una demostración previa de los resultados; a cada tubo se le añadió 0,125 ml de 0,2 N de NaOH y se les pidió que identificaran el tipo de sangre en base a su color y tiempo empleado para su viraje.

RESULTADOS

Los resultados de los hemolizados expuestos al NaOH se resumen en el Cuadro 1 y Figura 1, se expresan los tiempos promedios obtenidos en relación con las concentraciones de NaOH. En general el hemolizado adulto cambia rápidamente de rosado a negro en un tiempo que es directamente proporcional a la concentración: 0,2 N (4,86 s), 0,4 N (1,89 s), 0,6 N (0,91 s), y 0,8 N (0,06 s).

El hemolizado fetal cambia lentamente de rosado a marrón claro, y se torna marrón oscuro o negro en varios minutos, siendo también la velocidad de cambio proporcional a la concentración de hidróxido de sodio: 0,2 N (15,62 s), 0,4 N (5,75 s), 0,6 N (3,56 s), y 0,8 N (1,80 s).

La diferencia promedio del tiempo de cambio de color para la hemoglobina adulta y fetal en cada concentración reveló que fue máximo para la concentración de 0,2 N con 10,76 s, lo que demuestra que esta concentración es la que tiene mayor capacidad de diferenciar las hemoglobinas basado en el tiempo y cambio de color, con diferencia estadística significativa en cada una de las concen-

traciones ($p = < 0,001$).

Para la validación de la prueba en ensayo ciegos se tomaron un total de 80 hemolizados (40 adultos y 40 fetales). Se empleó la concentración de 0,2 N de NaOH, identificando los observadores ciegamente si era hemolizado fetal o adulto; todos los hemolizados fueron correctamente identificados en fetal o adulto. La fuerza o poder de análisis para este tamaño de muestra indica que el máximo error teórico es menor de 8%, con 95% de certeza.

DISCUSIÓN

Cuadro 1
Resultados de hemolizados ante el OHNa

OHNa	Hemolizado adulto	Hemolizado fetal	Diferencia tiempo promedio segundos	Prueba de Student
	N	Tiempo $\bar{X} \pm DS$		
0,2	4,86 \pm 1,49	15,62 \pm 3,83	10,76	*26,24
0,4	1,89 \pm 0,60	5,75 \pm 0,60	3,86	*21,44
0,6	0,91 \pm 0,06	3,56 \pm 1,38	2,65	*18,93
0,8	0,06 \pm 0,19	1,80 \pm 1,13	1,74	*15,82

* $p < 0,001$

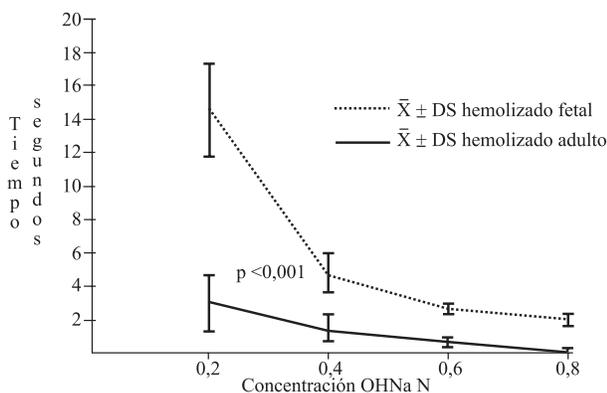


Figura 1. Resultados de los hemolizados ante el NaOH.

El desarrollo tecnológico es un recurso que se ha incorporado al ejercicio médico diario, sin bien ello ha sido provechoso en el manejo de diversas patologías, aumentó la complejidad en el ejercicio de la medicina, y por otra parte ha encarecido la misma; es por esto que se buscan y justifican los

métodos simples y útiles.

En esta oportunidad hemos evaluado la utilidad de la desnaturalización alcalina del NaOH para la identificación de la HbA y la HbF, empleando la técnica de Apt modificada (8).

Los resultados han demostrado de una manera contundente que la mejor concentración útil de NaOH es la 0,2 N, deslinda ambos hemolizados en el factor tiempo y cambio de color, teniendo la HbA una reacción casi de inmediato a color negro, mientras que con la HbF hay un cambio tardío a marrón claro, estos resultados son coincidentes con lo reportado por Moir y Holbrook (8), quienes emplean este método en el estudio de sangre posterior a cordocentesis.

Esta técnica tiene además a su favor el hecho de que amerita equipo médico simple, tubo de ensayo, pipeta, agua, pequeña cantidad de sangre, un cronómetro, e NaOH 0,2N; por otra parte es muy económico, y no requiere un personal altamente entrenado.

Por todo ello llena los requisitos para ser implementada al ser una prueba sencilla, rápida, económica y segura.

La validación de la interpretación con observador a ciega y con un entrenamiento escaso dio alto resultado de utilidad y mínima posibilidad de error, cuestión que apuntala más la factibilidad de su empleo en cualquier ambiente donde se requiera su uso.

Entre los factores de error a tomar en cuenta están la edad de gestación y la incorporación de la HbA al glóbulo rojo fetal, pero ello se ha estudiado y comprobado que su efecto es despreciable (7,9), lo que si debe someterse a consideración es la posibilidad de hemoglobinopatías y anemias fetales, para ello pueden emplearse otras pruebas confirmatorias (4-6).

En relación a la proporción de hemoglobina mínima para dar una prueba positiva o útil, escapó al objetivo de nuestra investigación, sin embargo, realizamos algunas pruebas a manera de ensayo, al mezclar sangre adulta y fetal con fluidos maternos como orina, flujos, líquido amniótico, con resultados alentadores, lo que nos estimula a profundizar la investigación.

Queremos concluir señalando que de acuerdo a los resultados obtenidos la prueba de la desnaturalización alcalina de la hemoglobina empleando el NaOH permite de una manera clara, fácil y útil la identificación de la hemoglobina fetal y la del adulto pudiendo incorporarse en los recursos diagnósticos.

REFERENCIAS

1. Agüero O. Hemoglobina fetal. *Gac Méd Caracas* 1961;70:265-281.
2. Agüero O. Fetal hemoglobin in premature, term and prolonged pregnancies. *Obstet Gynecol* 1962;19:257.
3. Agüero O, Ziri V. Hemoglobina fetal en sangre materna. *Acta Ginec (Madrid)* 1965;16:357.
4. Richards S, Miller M. Bloody tap amniocentesis: Discrimination between fetal and maternal blood by means of hemoglobin electrophoresis. *Am J Obstet Gynecol* 1983;145:837-840.
5. Van Selm M, Kanhai H, Van Loon A. Detection of feto-maternal haemorrhage associated with cordocentesis using serum alpha-fetoprotein and the Kleihauer technique. *Prenat Diagn* 1995;15:313-316.
6. Foriestier F, Cox W, Daffos F, Rainaut M. The assessment of fetal blood samples. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:1184-1188.
7. Apt L, Downey W. Melena neonatorum: A simple test for the differentiation of adult and fetal hemoglobin in bloody stools. *J Pediatr* 1955;47:6-12.
8. Moir N, Holbrook I. Application of the hemoglobin alkaline denaturation test to determine the fetal origin of blood: Applicability to funipuncture. *Obstet Gynecol* 1993;81:793-796.
9. Bard H, Makowski E, Mesdua G, Battaglia F. The relative rates of synthesis of hemoglobins A and F in immature red cell of newborn infants. *Pediatrics* 1970;45:766-772.