Rev. Cub. Ped. 46: 213-223, May.-Jun., 1974

Una solución técnica para hacer un pesquisaje de hemoglobinas a gran escala

Por los Dres.:

LUIS HEREDERO,* HILDA GRANDA,* KLAUS ALTLAND*

Heredero, L. et al. *Una solución técnica para hacer un pesquisaje de hemoglobinas a gran escala.* Rev. Cub. Ped. 46: 3, 1974.

Se plantea una solución técnica al problema de cómo reducir la incidencia de la sicklemia en nuestro país, así como el riesgo a que están expuestos los portadores; por una identificación de estos últimos, y el consejo genético, en los casos de familias con "*alto riesgo*", hemos desarrollado un sistema de pesquisaje electroforético, el cual resulta suficientemente rápido, económico y seguro. El sistema incluye la colección de sangre capilar, y su hemólisis, la documentación de los datos del donante con una rapidez de aproximadamente 50-60 muestras por una persona, en una hora, con un costo de cerca de $1,00 por cada 1 000 muestras, y el análisis electroforético, que incluye la documentación de los resultados en película fotográfica, el que puede ser realizado por una persona a una velocidad de 180 muestras en una hora con un costo de cerca de $1,2 por cada 1 000 muestras. Se utiliza el equipo en el análisis de otros polimorfismos.

INTRODUCCION

Por la alta incidencia del gen de la hemoglobina S en nuestro país, se hace necesario desarrollar medidas preventivas que eviten el riesgo a que se ven sometidos los portadores de la enfermedad producto de los adelantos de la civilización; ejemplo de esto es la anestesia, viajes en avión (*Jones, Binder y Donawho*,[6] condiciones submarinas,[4] intoxicación alcohólica (*Mc Cormick*, 1961)[7] y el riesgo social de las familias con "alto riesgo" genético: familias en que ambos padres son portadores de sicklemia con una probabilidad de 0,25 de tener un hijo enfermo.

Para desarrollar estas medidas es necesario realizar primero la detección de los portadores de la sicklemia.

Distintas técnicas como son la electroforesis, la prueba de sickling (*Diland and Castle*, 1948),[3,2] la prueba de elución diferencial (*Yakulis* y *Heller*, 1961)[10] han sido utilizadas, pero en su lugar las pruebas de solubilidad (*Huntsman* y cols., 1970, *Raper*, 1971, *Canning* y cols., 1972)[5,9,1] recientemente desarrolladas parecen ser superiores por razones económicas y/o de velocidad.

Sin embargo aún persisten inconvenientes:

1. Las pruebas de solubilidad son específicas para Hb S y no detectan otras hemoglobinopatías. No distin-

* Departamento de Genética Médica, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de La Habana.

INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
BIBLIOTECA

guen entre portadores del rasgo sicklémico, sicklemia-hemoglobina C o sicklemia con alta hemoglobina fetal, siendo necesario someter todas las sangres con hemoglobina S a la electroforesis.

2. Las pruebas de solubilidad son dependientes de la concentración de hemoglobina, siendo necesario las determinaciones cuantitativas para una correcta interpretación de los resultados con relación a la hemoglobina S.

3. La prueba de solubilidad automatizada (*Canning* y cols., 1972)[1] elimina los errores al pipetear e incluye determinación de la hemoglobina sin pérdida de velocidad. Sin embargo, a pesar de que el costo en material utilizado (ca $12,000) no puede ser obviado, ya que en un gran *screening* el equipo está totalmente ocupado y no puede ser utilizado para otros propósitos. La técnica electroforética ha sido reconocida como la técnica más poderosa para detectar variantes de hemoglobina, sin embargo, no se ha aplicado en el análisis de poblaciones por problemas de índole económica y de complejidad.

La construcción del sistema de *screening* electroforético que a continuación se describe, elimina los inconvenientes antes expuestos y permite el análisis de gran número de personas.

MATERIAL Y METODO

El sistema electroforético incluye la construcción de las siguientes partes principales:

1. Un tanque electroforético para electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con 8 celdas de separación.
2. Dos soportes para la polimerización.
3. 40 cubetas múltiples para la colección y preparación de 1160 muestras de sangre.
4. 1 pipeta múltiple para la aplicación de volúmenes de 150 ul (Tipo 1).
5. 1 pipeta múltiple para la aplicación de volúmenes de 5 ul (Tipo 2).
6. Una fuente de poder.
7. Accesorios para el análisis de otros polimorfismos.

1. El tanque electroforético (Figs. 1 y 2) construido de acrílico, permite la aplicación de dos celdas de separación para el análisis de 60 muestras en una corrida. Por un simple mecanismo las celdas son fijadas a una tira de goma incluida en la parte inferior del tanque superior, produciéndose un absoluto contacto entre ambas. Las celdas son construidas de acrílico para evitar la adhesión del gel de poliacrilamida, y así facilitar la eliminación de éste, sin daño alguno para el gel o la celda.

2. Soportes para la polimerización del gel (Fig. 3). Las celdas de separación son fijadas a una tira de goma que cierra el extremo inferior de las mismas. Los moldes se introducen en la parte superior de las celdas de separación, formando en el gel 30 huecos de 6 mm de distancia central y de un área en el fondo de 2 x 4,5 mm.

3. Cubetas múltiples (Fig. 4). Se construyeron con el objetivo de usar pipetas múltiples para una rápida preparación de las muestras y su transposición rápida al gel. Se facilita la documentación, insertando la hoja con los datos de las 30 muestras colectadas, en una ranura en el fondo de la cubeta.

Los huecos tienen un volumen de aproximadamente 200 ul y una distancia central de 6 mm, idéntica a la distancia de las agujas de las pipetas múltiples.

Para evitar la posibilidad de que las cubetas puedan virarse mientras se trabaja, se construyeron soportes para las mismas.

4. Pipeta múltiple (Tipo 1) (Fig. 5).

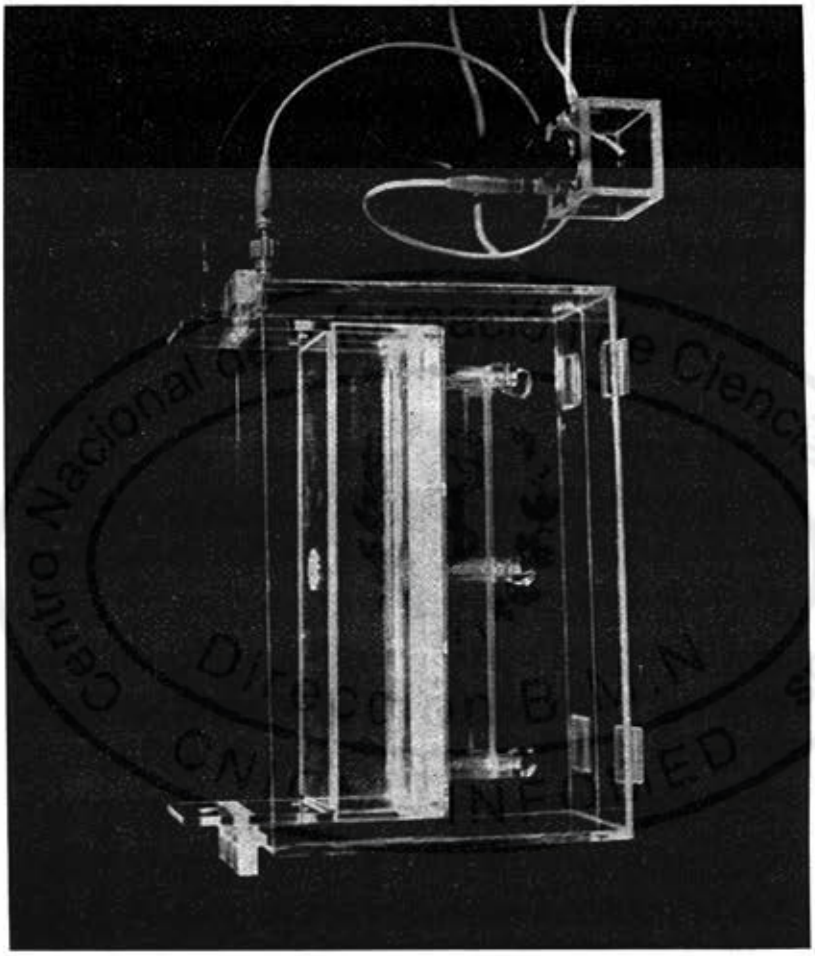

Figura 1

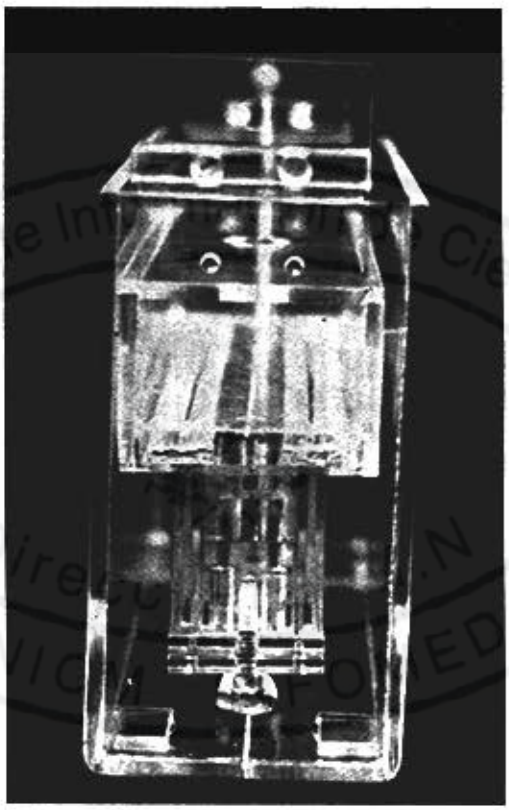

Figura 2

Figura 3

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM IMSOMED

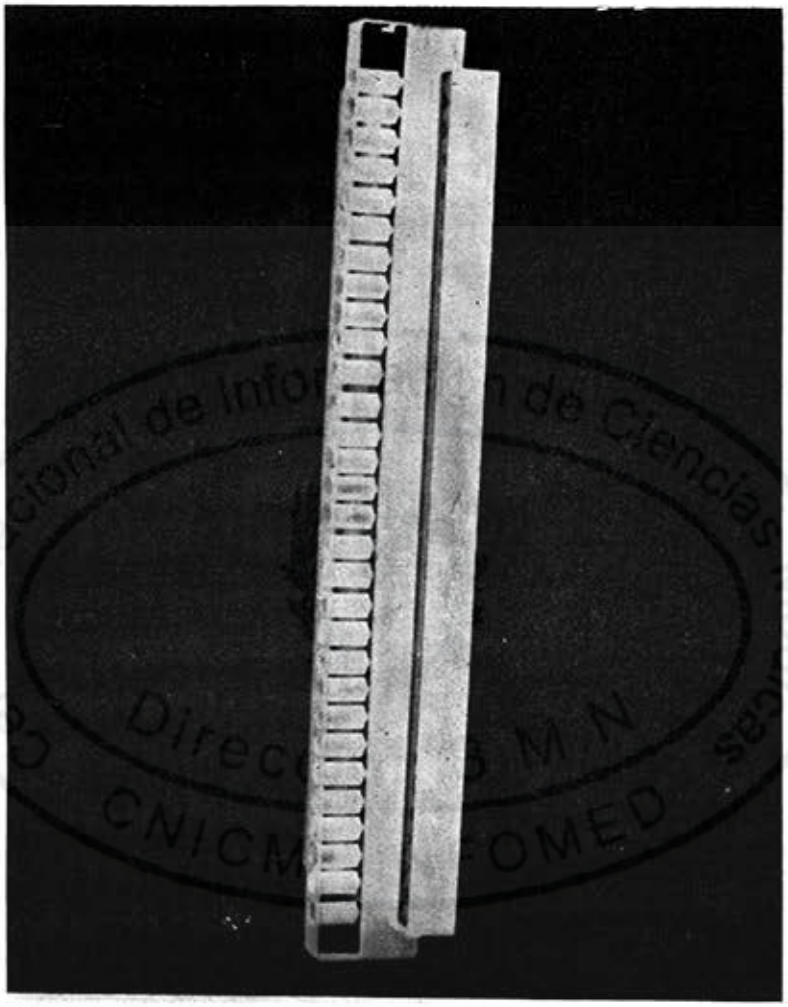

Figura 4

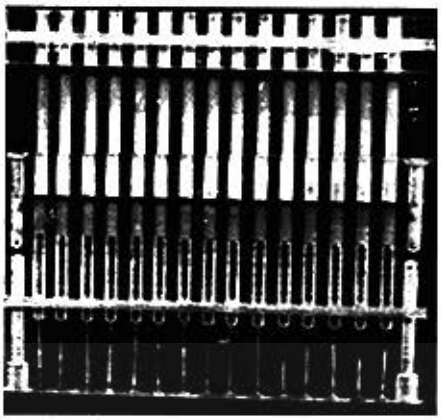

Figura 5

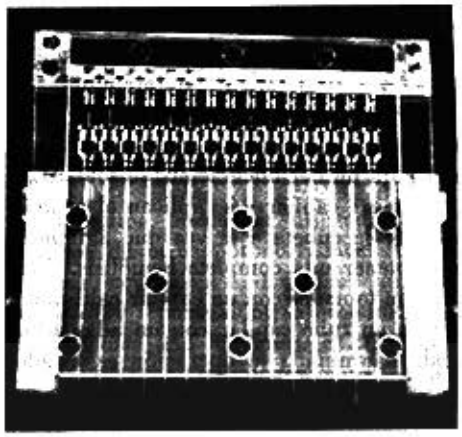

Figura 6

Para volúmenes de 150 ul. Funciona por el movimiento de 15 varillas de PVC de 3 mm de diámetro, en huecos de 3,1 mm de diámetro, hechos en una pieza de acrílico, que se continúan con huecos de 0,9 mm de diámetro, los cuales tienen agujas inoxidables de un diámetro externo apropiado.

Los espacios entre las varillas de PVC y los huecos en el plástico son cerrados en su parte superior, por anillos en forma de O cubiertos con grasa de silicona, obteniéndose así la succión adecuada. Las agujas en los huecos de 0,9 mm de diámetro son fijadas con cera. Para obtener suficiente reproductibilidad en repetidas aplicaciones de idénticos volúmenes, las varillas son fijadas a ambos lados por un mecanismo apropiado.

5. Pipeta múltiple (Tipo 2) (Fig. 6). Para volúmenes de 5 ul. 15 agujas de punción lumbar con un volumen interno de cerca de 6 ul son fijadas a una distancia de 6 mm una de otra entre dos piezas de acrílico. Las cabezas de los alambres internos (mandriles) son fijadas también entre dos piezas de acrílico, las cuales tienen un contacto móvil con las placas que sostienen las agujas. De esta forma se evita la torción de los alambres internos y funciona como un control mecánico hasta el máximo volumen.

Con el objeto de tener un estrecho contacto entre la parte interna de la aguja y el alambre interno, necesario esto para una succión adecuada, las cabezas de las agujas están parcialmente llenas con tape de teflon.

6. Fuente de poder. Consiste en un rectificador de 250 mAmp y 250 volt. colocado en una caja de acrílico de 50×50×50 mm junto con un fusible conectado al polo + y — y una línea para conectar a la red usual. (Ver Fig. 1).

7. Accesorios. Incluyen celdas de separación de 90 mm, 60 mm y 30 mm de longitud, con adaptadores para fijar las celdas al tanque superior, así como también al soporte para la polimerización.

Para variar el voltaje del rectificador, éste se conecta a un regulador de voltaje y a un transformador de suficiente capacidad. Estos accesorios se utilizan para el análisis de otros polimorfismos.

Método de colección de sangre. Análisis de las muestras y documentación

1. *Colección de sangre y registro de datos.*

Con la pipeta del Tipo 1 se llenan los 30 huecos de la cubeta múltiple, con 150 ul

de una solución hemolizante, que contiene saponina al 2% y sacarosa al 6%. Tanto la hoja de documentación como la cubeta múltiple tienen la misma numeración. Una vez registrados los datos del primer donante en la hoja de documentación, se toman 10 ul de sangre capilar y se aplican al primer hueco de la cubeta a la vez que agitamos para obtener una completa hemólisis. Los 10 ul son tomados con un capilar calibrado, unido a un tubo capilar con un adaptador bucal. Terminada la operación es lavado sucesivamente en agua, alcohol y agua para su reutilización. El contacto entre la gota y el capilar se realiza a cierta distancia del punto de perforación, para evitar de esa forma el riesgo de una posible infección cruzada.

Cuando han sido colectadas y hemolizadas 29 muestras, la hoja de documentación se dobla varias veces y se inserta en la parte inferior de la cubeta múltiple. Los huecos son sellados con una cinta adhesiva pudiendo hacerse el transporte del lugar de colección al lugar de análisis.

2. *Electroforesis*

Dos celdas de separación son fijadas al soporte de polimerización y 24 ml de una mezcla de las siguientes soluciones son añadidas.

6 ml de Sol 1:

30 g Acrilamida
0,8 g Bisacrilamida
añadir hasta 100 ml de agua

6 ml de Sol 2:

9,07 g Tris
12 ml de ClH
0,24 ml TEMED
añadir hasta 100 ml de agua (ph 9,1 a 25° C)

12 ml de Sol 3:

0,28 g Amoniopersulfato
añadir hasta 100 ml de agua.

Los moldes mantenidos en una solución de *orwo flow* al 1% se introducen en la parte superior de las celdas.

Mientras la acrilamida polimeriza en las celdas, 150 ul de un hemolizado de una muestra de sangre conocida, por ejemplo de las variantes más frecuentes Hb S o Hb C es añadida al hueco número 30 de las cubetas múltiples que van a ser analizadas. Los números de las dos primeras cubetas son escritos en las celdas de separación.

Cuando la polimerización ha terminado (tiempo de polimerización 5 minutos) los moldes se eliminan y los orificios en la parte superior del gel, son lavados con *buffer* superior del electrodo.

Con la pipeta múltiple Tipo 2, 60 muestras con un volumen aproximado de 4 ul se transfieren de las cubetas al gel.

Las celdas se fijan al tanque superior y se añaden 0,5l y 1,5l, de *buffer* superior e inferior del electrodo.

Buffer superior del electrodo
2,58 g Tris
1.74 g Glicina
añadir hasta 1 lt de agua (pH 8,9 a 25° C)

Buffer inferior del electrodo
7,25 g Tris
30 ml ClH 1N
añadir hasta 1 lt de agua (pH 8,1 a 25° C)

El tanque superior se introduce en el inferior y se equilibran los niveles de búfers en ambos tanques para evitar la diferencia en la presión hidrostática. El tanque es conectado a la fuente de poder y esta última a 220 volt. de la línea AC.

3. *Documentación de los resultados* (Ver Fig. 7).

Cuando termina la separación, las celdas junto con las hojas de documentación son fotografiadas y después se realiza el diag-

Figura 7

nóstico por simple inspección. Las hemoglobinas atípicas, se señalan en la hoja de documentación.

Los geles son eliminados con una placa de plástico del grosor apropiado y las celdas se mantienen en agua desionizada para su posterior utilización.

RESULTADOS Y DISCUSION

El método descrito permite el análisis de 130 muestras en una hora por persona, incluyendo documentación de los resultados por fotografía, inspección del ferograma, anotación en la hoja de documentación de las hemoglobinas atípicas y eliminación del gel de las celdas de separación.

El uso de la pipeta múltiple Tipo 2 en la aplicación de las muestras al gel, confiere una mayor velocidad en el análisis.

El sistema de búferes discontinuos concentra las muestras una vez que entran al gel y junto con el rectificador de corriente conectado a 220 volt. línea AC que suministra un voltaje de cerca de 50 volt. por cm— hace que la separación entre Hb A y Hb S ocurra en 5 min. y entre Hb A y Hb C en 2 min. La cantidad de hemoglobina utilizada hace innecesario el colorear el gel para la visualización de la separación de éstas, incluyendo Hb A_2. El pequeño diámetro del gel y lo preciso de las zonas reduce la energía total usada para la separación y permite por tanto, el uso de los búferes del electrodo 15-20 veces.

El equipo puede ser utilizado para el análisis de otros polimorfismos. Con las mismas condiciones descritas para Hb. pueden ser separadas otras proteínas como Tf humanas, Hp humanas, PCHE, G6PD, LDH humanas, Hb bovinos, Tf bovinos, etc., solamente se requiere modificar algunas condiciones como son preparación de la muestra, reducción del gradiente de voltaje para enzimas, usando un regulador de voltaje en serie con un rectificador, el empleo de celdas de separación de distintas dimensiones, etc.

Lo rápido y económico de este sistema permite su empleo en el análisis de poblaciones, que como la de Cuba, tienen esta carga genética y que a la vez son países que no tienen un alto desarrollo económico, como para poder emprender esta tarea con los métodos más costosos y menos precisos anteriormente descritos. Ver Cuadro I (Cálculo económico para el análisis electroforético de hemoglobinas en 1000 personas).

DISCUSION

Teniendo en cuenta que este equipo permite el análisis de gran número de muestras en forma rápida y económica, su empleo debe destinarse a determinados hospitales, por ejemplo hospitales provinciales, donde las ventajas de éste pueden aprovecharse al máximo (análisis de 1000 muestras por una persona en 8 horas de trabajo).

Las muestras obtenidas en los distintos lugares de la provincia pudieran ser remitidas al hospital, usando el sistema de colección descrito en este trabajo o algún otro como la conservación en capilares heparinizados o en papel de filtro.

Se discutió la necesidad de combinar la prueba electroforética con la prueba de solubilidad, así como el empleo de esta última o que por las condiciones materiales no fuera factible realizar la prueba electroforética en que el número de muestras a analizar fuera pequeño. Es necesario entonces lograr una prueba de solubilidad de fácil reproducibilidad, para lo cual se discutió la posibilidad de tener los reactivos necesarios para la misma envasados en forma apropiada.

CUADRO I

CALCULO ECONOMICO PARA EL ANALISIS ELECTROFORETICO DE HEMOGLOBINAS EN 1000 PERSONAS

	Colección de sangre	Análisis electroforético	Fotodocumentación
Materiales	$ 0,50	$ 0,70	$ 1,00
Horas de trabajo	20	5	— *
Total	$ 2,20 y 25 horas de trabajo		

* *Se incluyen en análisis electroforético.*

SUMMARY

Heredero, L. et al. *A technical procedure for performing a large-scale hemoglobin screening.* Rev. Cub. Ped. 46: 3, 1974.

A technical procedure for reducing the incidence of sickle-cell anemia in our country, as well as the risk of carriers of this disease is presented. An electrophoretic screening method comprising the identification of carriers and the genetic advice in "high-risk" families, which is sufficiently rapid, unexpensive and safe, has been developed by us. This method includes the collection and hemolysis of capillary blood, documentation of the donor's data at an approximate speed of 50-60 samples per subject in one hour and with a cost of about $1 000 per each 1 000 samples, and electrophoretic analysis, which includes the documentation of results of photographic films and can be performed by one person at a speed of 180 samples per hour and with a cost of about $1 20 per each 1 000 samples. The same equipment is used in the analysis of other polymorphisms.

RESUME

Heredero, L. et al. *Une solution technique pour faire une recherche d'hémoglobines à grande échelle.* Rev. Cub. Ped. 46: 3, 1974.

Il s'agit de donner une solution technique à la réduction de l'incidence de sicklémie dans notre pays, ainsi que d'éviter le risque des porteurs. Afin d'identifier dans ces derniers et dans le conseil génétique des familles avec un "haut risque", nous avons développé un système de recherche é lectrophorétique, lequel est très rapide, économique et sur. Le système inclut la collection de sang capillaire et son hémolise, la documentation des données du donneur (50-60 prélèvements par personne dans l'heure) avec un coût près de $1 000 pour 1 000 prelevements, et l'analyse électroforétique en incluant la documentation des résultats dans de filmes, pouvant être fait pour personne à une vitesse de 180 prélèvements dans 1 heure avec un coût 1,2 environ pour 1 000 prélèvements. L'équipement est employé dans l'analyse d'autres polymorphismes.

РЕЗЮМЕ

Эредеро Л., и др. Техническое решение для проведения исследования гемоглобина в большом масштабе. **Rev. Cub. Ped. 46: 3, 1974.**

Предлагаеьтся техническое решение для вопроса о том, как снизить частоту серповидноклеточной гемолитической анемии в нашей стране. Описывается риск, которому подлежат больные. Дается генетический совет семьям с "большим риском" и описывается система электрофоретического исследования, разработанного авторами, которая является быстрой, надежной и экономичной. В метод включается сбор капиллярной крови, ее гемолиз, составлении документации с данными о доноре с быстротой около 50-60 проб на каждого человека в час и со стоимостью примерно I 000 песо на каждых I 000 проб. Кроме того включается электрофоретический анализ со сбором данным на фотографическом снимке. Это может делать один человек со скоростью I80 проб за час со стоимостью около I,2 песо на каждые I 000 проб. Установка используется при изучение других полиморфизмов.

BIBLIOGRAFIA

1.—*Canning D. M., et al.* An automated screening technique for the detection of sickle cell hemoglobin. J. Clin. Path. *25:* 330-334, 1972.

2.—*Canning D. M., R. G. Huntsman.* An assesment of sickledex as an alternation to the sickling test. J. Clin. Path., Nov. 1970.

3.—*Daland G. A., H. B. Castle.* 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.

4.—*Green R. I., et al.* The sickle cell and altitude B. M. J. *4:* 593-595, 1971.

5.—*Huntsman R. G., et al.* A rapid whole blood solubility test to diferentiate the sickle cell trait from sickle cell anaemia. J. Clin. Path. *23:* 282-283, 1970.

6.—*Jones S. R., et al.* Sudden death in sickle cell trait. Medical Intelligence *282:* 323-325, 1970.

7.—*Mc. Cormick W. F.* Abnormal hemoglobin II The Pathology of sickle cell trait. The American Journal of Medical Science *32:* marzo de 1961.

8.—*Nage R. L., R. M. Bookchin.* Simplified automated solubility test for the detection of hemoglobin S Aplicable to Mass Screening. Am. J. Clin. Path. *59:* 300, 1973.

9.—*Raper A. B.* Solubility test for Hb S (Letter). B.M.J. *1:* 460, 1971.

10.—*Yakulis V. J., P. Heller.* An elution test for the visualization of hemoglobin S in blood smears. Blood *24:* 198, 1973.

Recibido el trabajo: Enero 17, 1974