

Prueba de la resistencia al calor

Un test sencillo que permitió el diagnóstico de hemoglobinuria paroxística nocturna

Dr. Nelson Suárez¹ y Dr. Enrique Bódega²

Se presentó el estudio de laboratorio de uno de los primeros casos de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) diagnosticados en Uruguay.

Por lo complejo del cuadro clínico y su expresividad proteiforme, esta rara enfermedad de muy baja frecuencia, 2 x 10⁶ de habitantes, sigue siendo de diagnóstico difícil.

En nuestro caso, el diagnóstico fue facilitado por una prueba de la resistencia al calor, y la realización posterior de las pruebas clásicas: test de Ham y test de hemólisis de la sacarosa.

Dadas las circunstancias que condujeron al diagnóstico, se analizaron distintos aspectos interpretativos que surgieron durante la etapa analítica.

INTRODUCCION

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) es una enfermedad adquirida, caracterizada por la producción de clones de hematíes, que *in vitro* presentan una susceptibilidad especial al complemento (1). Probablemente, el trastorno radica en una *stem-cell* pluripotencial, afectando por ello las tres series hematopoyéticas (2).

Los estudios realizados sobre la sensibilidad al complemento (C'), muestran que hay 3 poblaciones diferentes:

- células HPN I, insensibles al C'
- células HPN II, moderadamente sensibles al C' (3 a 5 veces más sensibles que las células normales)
- células HPN III, sensibles al C' (15 a 25 veces más)

Las células HPN II, pueden coexistir con HPN I y/o HPN III, y la severidad de la enfermedad se relaciona con la proporción de células HPN III (3).

A pesar de la denominación HPN, la hemoglobinuria como síntoma inicial no ocurre en la mitad de los casos, y un 10% nunca lo presenta. Los paroxismos son infrecuentes y en forma excepcional nocturnos (4).

En las formas de HPN hemolítica clásica, con signos

Departamento de Patología Clínica del
Centro de Asistencia del Sindicato Médico del Uruguay
Montevideo - URUGUAY

1. Hematólogo. Laboratorista
2. Prof. Adj. Hematología - Hosp. de Clínicas
Facultad de Medicina, Montevideo-Uruguay

PALABRAS CLAVE:

Hemoglobinuria paroxística - diagnóstico

de anemia hemolítica, hemoglobinemia y hemoglobinuria, el diagnóstico es relativamente fácil (5).

Pero lo proteiforme de la presentación clínica, como enfermedad aislada y primaria —enfermedad HPN—, o asociada a otras patologías —fenómeno HPB—, no siempre permiten el diagnóstico al inicio de la enfermedad (2).

Cuando el clínico se enfrenta al diagnóstico presuntivo de un Síndrome Hemolítico (SH), le es imprescindible que el laboratorio certifique la hiperhemólisis y le ofrezca —dentro de sus limitaciones—, la posibilidad del diagnóstico etiológico del mismo.

Una sola determinación certificará la hiperhemólisis. Se trata de la vida media del Cr⁵¹, que se verá acortada en todo SH cualquiera sea la etiología del mismo.

Algunas veces, el capítulo más problemático, por múltiples razones, es aquel que pretende, a través de pruebas de laboratorio, determinar la posible etiología del proceso.

En el presente trabajo se analizan las circunstancias de laboratorio que condujeron al diagnóstico etiológico de un SH y cuyos estudios fueron compatibles con HPN.

MATERIAL Y METODO

Se estudió un paciente de 24 años de edad, sexo femenino, con anemia crónica de 1 año de evolución. Los datos de laboratorio permitieron establecer un origen hemolítico de la anemia, siendo certificada la hiperhemólisis por el estudio de la sobrevida globular con eritrocitos radiomarcados con Cr⁵¹, que mostró una disminución en grado moderado sin evidencias de secuestación esplénica.

Resultados de Laboratorio

Los estudios de laboratorio previos al diagnóstico etiológico del SH mostraron los siguientes resultados:

Glóbulos Blancos	4.3 - 6.8 x 10 ³ /mm ³
Glóbulos Rojos	2.91 - 3.68 x 10 ⁶ /mm ³
Hemoglobina	10.3 - 12.0 gr%
Volumen Corpuscular	
medio	92 - 114 μm ³
Recuento de reticulocitos	0.7 - 2.5%
Recuento de Plaquetas	CANTIDAD NORMAL
Bilirrubina Total	0.90 - 2.0 mg%
Bilirrubina no conjugada	0.70 - 1.4 mg%
Bilirrubina conjugada	0.20 - 0.6 mg%
GOT	24 - 57 mU/ml
GPT	12 - 15.5 mU/ml

Fosfatasa alcalina	139 mU/ml
G-6-PD	NORMAL
Electroforesis de Hb.	NORMAL
Fragilidad osmótica	NORMAL
Sideremia	NORMAL
Fosfatasa alcalina leucocitaria	NORMAL
Hemoglobinuria	NEGATIVO
Hemosiderinuria	NEGATIVO
Mielograma	NORMAL
Sobrevida Globular	DISMINUCION MODERADA

Circunstancias que condujeron al diagnóstico

Las circunstancias que condujeron al diagnóstico fueron casuales.

En la etapa del diagnóstico de laboratorio dirigida a establecer un posible origen auto-inmune del proceso hemolítico, a través de estudios inmunohematológicos, se observó que muestras de sangre sin anticoagulante, incubada a 37°C más de 1 hora, presentaban hemólisis, mientras que otras, anticoaguladas, no la presentaron.

La demostración de que la hemólisis se produjo *in vitro*, se certificaba por la comparación del color de otra muestra de suero obtenido por centrifugación inmediata.

Este comportamiento fue interpretado como "una Prueba de la Resistencia al Calor Positiva" (Prueba serológica menor para HPN).

Las pruebas inmunohematológicas efectuadas —Test de Coombs y crioaglutininas— fueron negativas.

En la interconsulta con el clínico, se decidió estudiar nuevamente al paciente utilizando métodos analíticos que nos permitieran conocer la causa del hecho inusual observado.

Las tomas de muestras fueron realizadas en las condiciones habituales para los estudios de las Anemias Hemolíticas Auto-Inmunes.

ESTUDIOS REALIZADOS

- Test de Coombs Directo e Indirecto
- Crioaglutininas y Crioheolisinas
- Aglutininas y Hemolisinas Calientes
- Hemolisinas Bitérmicas de Donath-Landsteiner (D-L)
 - Test selectivo
 - Test confirmatorio
 - Test de Coombs Indirecto (fase fría)
 - Test de Coombs Indirecto (fase caliente)

- Pruebas selectivas para HPN
 - Prueba de la Resistencia al Calor
 - Prueba selectiva del suero-ácido
 - Prueba selectiva del agua-azúcar
- Pruebas serológicas mayores y confirmatorias para HPN
 - Test de Ham
 - Test de Hemólisis de la sacarosa

RESULTADOS OBTENIDOS

Test de Coombs Directo e Indirecto y Crioaglutininas: NEGATIVO

En el estudio de las Anemias Hemolíticas Auto-Inmunes (A.H.A.I.) —definidas como estados adquiridos de hiperhemólisis que se acompañan de la presencia en la superficie del glóbulo rojo, y a veces en el suero, de inmunoglobulinas que tienen una actividad anticuerpo contra los constituyentes antigénicos de los propios glóbulos rojos del enfermo (8)— es necesario demostrar la sensibilización de la membrana eritrocitaria por globulinas (Ig y/o complemento) a través de la positividad del Test de Coombs Directo, que define por sí sola la enfermedad.

Si bien se puede observar muy raramente, un Test de Coombs Directo negativo en el curso de una anemia hemolítica auto-inmune (2-4% de los casos según Gilliland)(8), por tratarse de anticuerpos de naturaleza IgA —los sueros habituales antiglobulina humana utilizados no tienen actividad para las cadenas alfa— o bien, por el hecho de que el número de moléculas de anticuerpos fijados sobre la membrana sea menor que el estimado para dar una reacción de Coombs positiva —menos de 500 moléculas—, la negatividad del test de Coombs alejaba la posibilidad de que la etiología de la anemia fuera de origen auto-inmune.

En la mayoría de los casos de A.H.A.I. la hemólisis de los eritrocitos sensibilizados son consecuencia de la fagocitosis por las células del sistema retículo-endotelial, especialmente en el hígado y en el bazo —hemólisis extravascular—. En las A.H.A.I. tipo Coombs IgG, el secuestro es fundamentalmente esplénico. El estudio de sobrevida globular del paciente no mostró evidencias de secuestro esplénico.

Por otro lado, cuando el sitio de destrucción de los eritrocitos se establece en la circulación —hemólisis intravascular—, corresponde a circunstancias que son relativamente raras como consecuencia de la activación del sistema del complemento en la membrana del eritrocito vinculado en las A.H.A.I. a anticuerpos que fijan complemento y son fuertemente hemolíticos: es el caso de las hemolisinas bitérmicas de Donath-Landsteiner (Hemoglobinuria Paroxística a Frigore —HPF—), de naturaleza IgG, o las aglutininas frías —crioaglutininas—, de naturaleza IgM (criohemolisinas o hemolisinas frías). Estos dos tipos de

A.H.A.I. se expresan por Test de Coombs tipo Complemento.

El Test de Coombs directo en el análisis inmunohematológico de un proceso hemolítico, nos permite distinguir en las A.H.A.I. cuatro formas principales según la naturaleza de la globulina que se fija en la membrana del eritrocito: IgG solas; IgG + C'; o C' solo, y la presencia o no en el suero de aglutininas frías de título superior a 1/32:

- A.H.A.I. con Test de Coombs tipo IgG
- A.H.A.I. con Test de Coombs tipo mixto (IgG + C')
- A.H.A.I. con Test de Coombs tipo C'
- A.H.A.I. con presencia de aglutininas frías.

Y una variedad excepcional:

- A.H.A.I. con presencia de hemolisinas bitérmicas (HPF) de Donath-Landsteiner.

Las formas clínicas de evolución de las A.H.A.I. tipo IgG o mixto aparecen de manera progresiva, evolución crónica, con empujes de hiperhemólisis, que puede ser moderada, con buena compresión eritropoyética, o a veces, severa, transformándose en un problema terapéutico de urgencia.

Las A.H.A.I. tipo C' cursan con hiperhemólisis muy atenuadas, generalmente bien compensadas, que solo es puesta de manifiesto por el estudio de la sobrevida globular con eritrocitos radiomarcados con Cr⁵¹, cursando en forma crónica.

Otra forma crónica, la A.H.A.I. con aglutininas frías, tiene una característica esencial y es la presencia de crioaglutininas con un título superior a 1/32, con los mismos estigmas inmunológicos que la anterior: Test de Coombs tipo C'.

La otra forma de A.H.A.I., la HPF es excepcional; la hemólisis aparece bajo la forma de episodios brutales de hiperhemólisis intravasculares, presencia de hemoglobinuria, desencadenada por el frío, y la demostración en el suero de la llamada hemolisina bitérmica, de naturaleza IgG, que se acompaña de Test de Coombs tipo C'.

Los test inmunológicos globulares —Test de Coombs Directo— fueron completados con pruebas serológicas —investigación de crioaglutininas, que definen un tipo de A.H.A.I.— y búsqueda eventual de la presencia en el suero de inmunoglobulinas tipo IgG que no posean estrictamente la misma especificidad que la de los anticuerpos que sensibilizan la membrana eritrocitaria en los casos de A.H.A.I.

Los tres estudios: Test de Coombs Directo e Indirecto, e investigación de crioaglutininas, fueron normales y serán utilizados para correlacionar otros datos de laboratorio obtenidos.

Estudio analítico del comportamiento de muestras de sangre obtenidas con y sin anticoagulantes, e incubadas a diferentes temperaturas y tiempo (Test de la Resistencia al Calor)

Fueron obtenidas muestras de sangre según muestra el esquema de la figura 1. El análisis de los datos obtenidos mostró el siguiente comportamiento en cuanto presencia o ausencia de hemólisis: (Cuadros I y II)

1) Las muestras sin anticoagulantes, incubadas a:

- 0°C, 1 h ausencia de hemólisis
- 20°C, 1 h. ausencia de hemólisis
- 37°C, 10 m ausencia de hemólisis
- 37°C, 1 h. HEMOLISIS

Este comportamiento muestra que los eritrocitos se hemolizan *in vitro* luego de 1 hora de incubación.

2) Las muestras con anticoagulante (EDTA, CITRATO, HEPARINA), incubadas a:

- 37°C, 1 h y hasta 48 h ausencia de hemólisis

3) Las muestras obtenidas sin anticoagulantes e incubadas a:

- 0°C, 30 m y luego a 37°C, 1 h : HEMOLISIS
- 37°C, 30 m y luego a 0°C, 1 h : ausencia de hemólisis

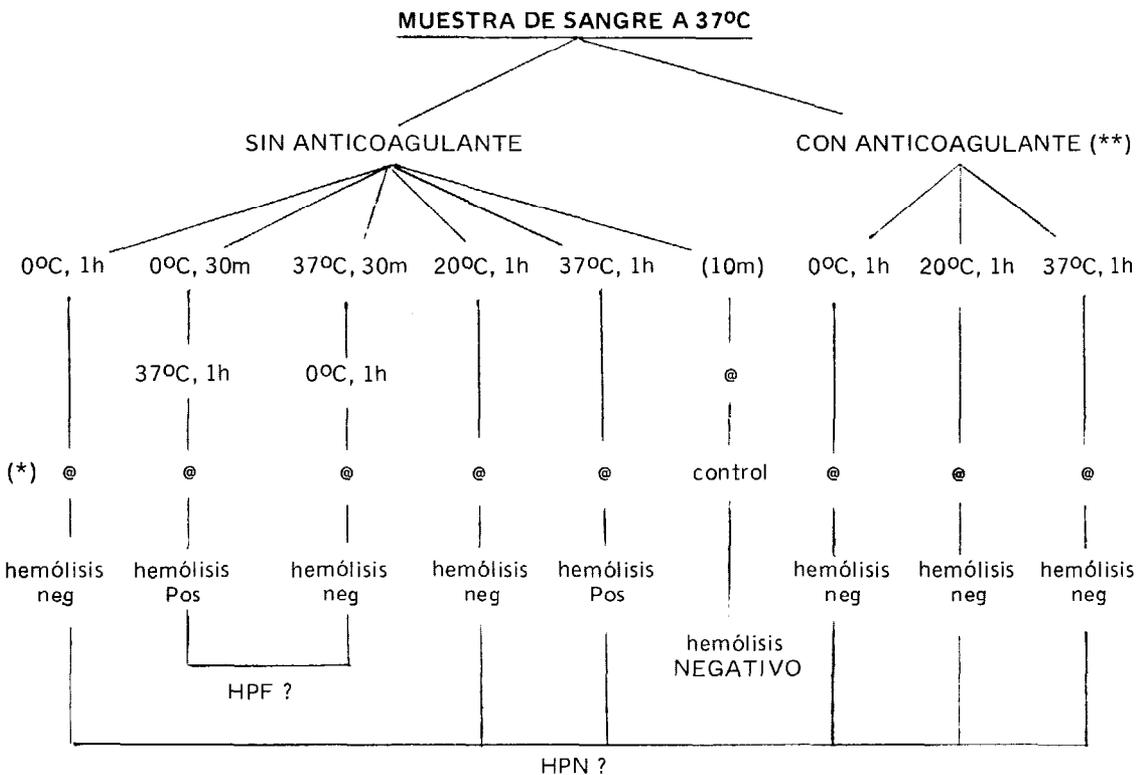
De la interpretación de los datos, estrictamente hablando desde el punto de vista de laboratorio, se planteó tres posibilidades:

- 1) HPF
- 2) HPN
- 3) Hemolisinas calientes

La HPF, está caracterizada por la presencia en el suero de anticuerpos IgG, de especificidad anti-P, que fija complemento, y se pone en evidencia por una reacción en dos tiempos:

- 1) una fase fría: 30 m a 0°C, en la cual la hemolisina se fija (IgG + C'). En esta etapa, se puede demostrar, realizando un Test de Coombs Indirecto y

FIGURA 1



* (@): Centrifugación

** : EDTA, CITRATO, HEPARINA. (La observación se mantuvo hasta 48 hs.)

CUADRO I
Lectura de hemólisis con anticoagulante

Tº	TIEMPO	HEMOLISIS
0°C	60 m	Negativa
20°C	60 m	Negativa
37°C	60 m	Negativa
37°C	48 h	Negativa

CUADRO II
Lectura de hemólisis sin anticoagulante

Tº	TIEMPO	HEMOLISIS
0°C	60 m	Negativa
20°C	60 m	Negativa
20°C	48 h	Negativa
37°C	10 m	Negativa
37°C	30 m	Negativa
0°C	60 m	
0°C	30 m	Positiva
37°C	60 m	Positiva
37°C	60 m	Positiva

lavando los glóbulos rojos con suero fisiológico a 40°C, la presencia de un Test de Coombs tipo mixto (IgG + C').

2) una fase caliente: la lisis aparece al incubar a 37°C, por activación del sistema lítico del complemento, de donde el término hemolisina bitérmica o bifásica.

Realizando un Test de Coombs Indirecto, con glóbulos rojos luego de la segunda fase, y lavados con suero fisiológico caliente a 37°C, se produce la elución del anticuerpo en aquellos eritrocitos que aún no han sido lisados, obteniéndose un Test de Coombs Indirecto tipo C'. (Cuadro III)

Para el diagnóstico de laboratorio de HPN, se utilizan una serie de pruebas serológicas: (Cuadro IV)

Pruebas Serológicas Menores:

P. de la Resistencia al calor
P. de hemólisis por Anticuerpos fríos

CUADRO III
Test de Coombs para HPF

- (1) Test de Coombs Indirecto = **NEGATIVO**
(Sobre fase fría de incubación)
(Búsqueda de IgG + Complemento)
(Fase de fijación)
- (2) Test de Coombs Indirecto = **NEGATIVO**
(Sobre fase caliente de incubación)
(Búsqueda de Complemento)
(Fase de liberación de IgG)

Resultado =
Test de Coombs para HPF = NEGATIVO

CUADRO IV
Diagnóstico de laboratorio
HPN

MENORES	MAYORES
P. de la resistencia al calor	P. del suero ácido
P. de hemólisis por ác. frío	P. de hemólisis-sucrosa
P. de la trombina	
P. de la inulina	

P. de la Trombina
P. de la Inulina

Pruebas Serológicas Mayores:

P. del suero-ácido
P. de hemólisis de la sacarosa

Para las pruebas diagnósticas de laboratorio de anticuerpos IgM con actividad hemolítica según la temperatura y el pH, nos basamos en algunas características del comportamiento serológico:

- los auto-anticuerpos fríos -IgM- son aglutininas frías que aglutinan a los eritrocitos a baja temperatura y el fenómeno es reversible a 37°C.
- las aglutininas frías de las A.H.A.I. tienen un título elevado a 40°C 1/2000 a 1/100.000 y más, reversibles a 37°C - 45°C totalmente.
- amplitud térmica elevada, con manifestaciones serológicas de actividad a 30°C y más.
- actividad hemolítica, en presencia del complemento, en medio ácido (pH 6.5 a 20°C)(hemolisinas ácidas).

- fijación del complemento *in vivo*, con Test de Coombs tipo C'.
- comúnmente, los anticuerpos fríos IgM tienen actividad anti-I, raramente anti-i u otras especificidades más complejas mucho más raramente.
- Ciertos anticuerpos IgM son activos a 37°C, comportándose como una hemolisina caliente y neutra (pH 7.3).

- b) la ausencia de aglutinación en el tubo No. 3, y la presencia de hemólisis, sugirió la posibilidad de HPN, que debía ser confirmada;
- c) la ausencia de aglutinación y de hemólisis en el tubo No. 4, descartó la presencia de crioaglutininas y crioheolisinas, especialmente en presencia de la baja actividad aglutinante observada en el tubo No. 5;
- d) la presencia de aglutinación en el tubo No. 5, indicó la necesidad de búsqueda de título, amplitud térmica y especificidad en el Sistema li para la crioaglutinina (el título obtenido a 4°C, fue 1/8 -normal hasta 1/32-);
- e) la presencia de hemólisis en el tubo No. 6, sugirió la posibilidad de hemolisina bitérmino de Donath-Landsteiner (PHF).

Estas características de las hemolisinas: ácida, neutra y bitérmica, nos permite distinguir anticuerpos hemolisantes *in vitro* así como tres formas diferentes de A.H.A.I.:

- 1) las hemolisinas ácidas, que se presentan con las aglutininas frías.
- 2) las hemolisinas neutras, que acompañan raramente a las A.H.A.I. de tipo complemento.
- 3) las hemolisinas bitérmicas de Donath-Landsteiner que es excepcional.

Para la sistematización de estos estudios, se realizó primeramente un panel reactivo de pruebas serológicas según el esquema de Cartwright.

El panel reactivo para pruebas presuntivas (Cuadro V) mostró:

- a) ausencia de aglutinación en el tubo No. 2, descartando la presencia de una aglutinina caliente completa (IgM). Pero la presencia de hemólisis, sugirió la presencia de una hemolisina caliente. Si esto fuera así, el pH ácido favorece su actividad (tubo No. 3) y la prueba confirmatoria para HPN debe ser entonces negativa;

Estrictamente hablando desde el punto de vista del laboratorio, surgieron 3 posibilidades diagnósticas:

- 1) Hemolisinas calientes
- 2) Hemoglobinuria Paroxística a Frigore (HPF)
- 3) Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN)

Para descartar o confirmar la HPF, se realizó (Cuadros III y VI) el Test confirmatorio de Donath-Landsteiner así como Test de Coombs Indirecto en fase fría y caliente de esta prueba. El Test de Coombs fue realizado a 4°C y 37°C, luego de cada fase de incubación, y los glóbulos rojos fueron lavados con solución salina fisiológica a esas temperaturas. Se usó:

- suero problema
- suero problema acidificado
- suero problema acidificado más complemento acidificado

CUADRO V
Reacciones características para pruebas presuntivas (Cartwright)

Tubo	Acido	t ^o y Tiempo		LECTURA		AGLUTININA		HEMOLISINA		HPF	HPN
				Aglut.	Hemol.	Caliente	Fría	Caliente	Fría		
1	0	37°C,	10 m		0						
2	0	37°C,	1.5 h	0	2+	NO		x ?			x ?
3	+	37°C,	1.5 h	0	3+	NO		x ?			x ?
4	+	20°C,	1.5 h	0	0		NO		NO		
5	0	2°C,	1.5 h	±	0		SI		NO		
6	0	2°C, 37°C,	0.5 h 1 h	0	3+					x ?	x ?

CUADRO VI
Prueba de Donath-Landsteiner confirmatoria

Tubo	Suero 0.5 ml	Gr. 50% 0.05 ml	tº y Tiempo	Resultados Esperados para la Prueba Positiva	Resultados Obtenidos
1	E	E	2°C, 30 m; 37°C, 1 h	+	Positivo
2	E + N	E	2°C, 30 m; 37°C, 1 h	+	Positivo
3	E. Inact.	E	2°C, 30 m; 37°C, 1 h	0	Negativo
4	E	N	2°C, 30 m; 37°C, 1 h	+	Negativo
5	N	E	2°C, 30 m; 37°C, 1 h	0	Negativo
6	E	E	37°C, 1 h	0	Positivo*
7	N	E	37°C, 1 h	0	Negativo
8	N	N	37°C, 1 h	0	Negativo

Resultado: FALSO POSITIVO (*)
Interpretación = NEGATIVO para HPF

- complemento acidificado (control)
- con pool de glóbulos rojos sin tratamiento enzimático
- con pool de glóbulos rojos pre-tratados con enzimas (bromelina, técnica de las dos etapas).

El resultado del Test de Coombs Indirecto fue negativo.

El test confirmatorio de D-L para Hemoglobinuria Paroxística a Frigore (Cuadro VI), se comportó como falso positivo, ya que en el tubo No. 6, con glóbulos rojos y suero problema, incubados en fase única y a 37°C 1 h, mostraba hemólisis, lo que invalidaba la lisis de los tubos 1 y 2, así como la negatividad encontrada para el tubo No. 4, se contraponía a lo esperado para Hemoglobinuria Paroxística a Frigore.

Para confirmar o descartar hemolisinas calientes y HPN, se efectuaron los test selectivos y confirmatorios para HPN. Un test positivo para HPN, descartaría la posibilidad para hemolisinas calientes positivas.

Se realizó primero la prueba del agua-azúcar (Cuadro VII), cuyo resultado fue positivo.

Para los test confirmatorios de HPN, se usaron las pruebas de Ham (Cuadro VIII) y la de hemólisis de

la sacarosa (Cuadro IX).

El análisis del Test de Ham, no hubo hemólisis en los tubos 1, 3, 4, 6 y 7, y hemólisis en los tubos 2 y 5 (1 1/2 a 2+), siguiendo el comportamiento esperado para un test de Ham positivo.

El test de la hemólisis de la sacarosa (Cuadro IX) mostró un 24% de lisis, siendo positivo para HPN.

DISCUSION

La prueba de la resistencia al calor, descrita por Ham en 1937 y propuesta por Hegglin y Maier en 1944 (5), es un test sencillo que nos sirvió de utilidad para orientarnos en el diagnóstico etiológico de un síndrome hemolítico. Obligó a realizar una serie de pruebas para descartar desde el punto de vista del laboratorio, algunas interferencias interpretativas, y posteriormente realizar los test clásicos para diagnóstico de HPN.

Tres de las pruebas usadas, la prueba de la resistencia al calor, el test de Ham y la hemólisis de la sacarosa, tienen algunas limitaciones.

Prueba de la Resistencia al calor: (prueba serológica menor). No es específica. En las anemias con glóbu-

CUADRO VII
Pruebas selectivas para HPN

(1) Test del "agua-azúcar"

Tubo	Sacarosa 10% en H ₂ O destilada ml	Sangre Citratada Enfermo ml	Sangre t ^o Citratada Normal ml	Centrifugación	Lectura de Hemólisis
1	0.9	0.1	—	+	Positiva
2	0.9	—	0.1	—	Negativo

Resultado: Pruebas selectivas para HPN = POSITIVO

CUADRO VIII
Test de HAM

Tubo	t ^o	Tiempo	Gr. 50% 0.05 ml	Suero 0.5 ml	HCl 0.2 N 0.05 ml	pH Alc.	Centrifugación	Resultados Esperados para la Prueba Positiva	Lectura de Hemólisis
1	37°C	1 h	E	E	—	Alc	+	Negativo	Negativo
2	37°C	1 h	E	E	Ac	—	+	Positivo	Positivo
3	37°C	1 h	E	N. Inact.	Ac	—	+		Negativo
4	37°C	1 h	E	N	—	Alc	+		Negativo
5	37°C	1 h	E	N	Ac	—	+	Positivo	Positivo
6	37°C	1 h	N	E	—	Alc	+		Negativo
7	37°C	1 h	N	E	Ac	—	+		Negativo

Resultado = Test de HAM POSITIVO

los rojos marcadamente esferocíticos y en ciertas anemias auto-inmunes, también es positivo.

Prueba de Ham: se presenta positiva en dos circunstancias:

1) con glóbulos rojos problema esferocíticos y suero acidificado con o sin complemento (glóbulos rojos pre-lífticos);

2) con células HEMPAS (multinuclearidad eritroblástica hereditaria con test del suero-ácido positivo) con la siguiente característica:

— Presencia de lisis con sistemas de glóbulos rojos problema y algunos sueros acidificados (pero no todos) a pH 6.5.

Ausencia de lisis con sistemas de glóbulos rojos problema y suero acidificado autólogo.

CUADRO IX
Test de Hemólisis de la Sacarosa

Tubo	Tiempo	T°	Sacarosa ml	Gr. 50% Problema ml	Suero Normal Fresco Compatible ml	0,04% de Amonio en H ₂ O dest. ml	Volumen Final	Centrifugación	Cl Na 90/00
1	1 h	20°C	0.90	0.05	0.05	0	1 ml	+	4 ml
2	1 h	20°C	0.95	0.05	0	0	1 ml	+	4 ml
3	1 h	20°C	0.95	0	0.05	0	1 ml	+	4 ml
4	1 h	20°C	0	0.05	0	0.95	1 ml	+	4 ml

LECTURA = DO contra blanco de agua

Normal = < 5%
Dudoso = 5-10%
Positivo = > 10%

$$\% \text{ LISIS} = \frac{DO_1 - (DO_2 + DO_3)}{DO_4 - DO_2}$$

Resultado = 24% de LISIS

POSITIVO para HPN

CUADRO X
Datos de Laboratorio. (Resumen)

- (1) Test de Coombs D e I = NEGATIVO
- (2) Aglutininas frías = POSITIVO 1/8 (NORMAL hasta 1/32)
- (3) Hemolisinas frías = NEGATIVO
- (4) Aglutininas calientes = NEGATIVO
- (5) Hemolisinas calientes = NEGATIVO
- (6) Hemolisinas bi térmicas de D-L = NEGATIVO
 - Test selectivo = POSITIVO
 - Test confirmatorio = NEGATIVO
 - Test de Coombs Ind. (Fase fría) = NEGATIVO
 - Test de Coombs Ind. (Fase caliente) = NEGATIVO
- (7) Estudios presuntivos para HPN:
 - Prueba de la resistencia al calor = POSITIVO
 - Prueba selectiva del suero acidificado = POSITIVO
 - Prueba selectiva del agua-azúcar = POSITIVO
- (8) Pruebas confirmatorias:
 - Test de la Sacarosa = POSITIVO
 - Test de Ham = POSITIVO

La aglutinación y lisis que presentan las células HEMPAS con algunos sueros acidificados, está mediada por un anticuerpo IgM/anti-HEMPAS (6). Las células HEMPAS tienen de común con las células HPN: una anomalía de proteína de membrana, la glicoforina (3). El test de hemólisis de la sacarosa es, sin embargo, negativo (5).

Test de hemólisis de la sacarosa: el test es válido siempre que:

- 1) las soluciones de sacarosa sean de reciente preparación;
- 2) que la lectura de hemólisis se haga con medios fotométricos;
- 3) los resultados sean considerados como válidos

**CUADRO XI
TEST DE HAM**

Los resultados positivos deben cumplir con los fundamentos establecidos por Ham en 1937:

Resultados Positivos con Sistemas:

- Eritrocitos problema
- Suero normal acidificado, o
- Suero del paciente acidificado
- pH 6.5
- Sin inactivar

RESULTADOS NEGATIVOS CON SISTEMAS:

- Eritrocitos normales
- Suero del paciente acidificado
- pH 6.5
- Sin inactivar

RESULTADOS NEGATIVOS CON SISTEMAS:

- Eritrocitos problema
- Suero normal acidificado, o
- Suero del paciente acidificado
- pH 6.5
- Inactivado a 56°C 30 minutos

- con lisis superiores al 10%. Lisis de menos del 5% son negativas, y entre 5-10% dudosas;
- 4) esta prueba puede ser positiva en algunas enfermedades, como Leucemia Mieloblástica Aguda y eritroleucemia, aunque la prueba es confiable con lisis superiores al 10% (7).

En el caso de nuestro paciente, estudios previos de sangre periférica que mostraron una anemia macrocítica y una prueba de fragilidad osmótica normal, sirvieron para eliminar causas de error de interpretación.

- 1) las soluciones de sacarosa sean de reciente preparación;
- 2) que la lectura de hemólisis se haga con medios fotométricos;
- 3) los resultados sean considerados como válidos con lisis superiores al 10%. Lisis de menos del 5% son negativas, y entre 5-10% dudosas;
- 4) esta prueba puede ser positiva en algunas enfermedades, como Leucemia Mieloblástica Aguda y eritroleucemia, aunque la prueba es confiable con lisis superiores al 10% (7).

Correspondencia:

Dr. Nelson Suárez
Las Heras 1873
Montevideo - Uruguay

Résumé

On présente l'étude de laboratoire de l'un des premiers cas de HPN diagnostiqués en Uruguay.

C'est par sa complexité clinique et par son expression protéiforme que cette rare maladie à fréquence très basse (2×10^6 habitants) reste toujours à diagnostic difficile.

Dans notre cas, le diagnostic devint plus facile grâce à une épreuve de résistance à la chaleur et à la postérieure réalisation des examens classiques —test de HAM et test d'hémolyse de la saccharose.

Vues les circonstances qui ont conduit au diagnostic, on a analysé de différents aspects interprétatifs surgis pendant l'étape analytique.

Summary

A report is made of the laboratory study of one of the first cases of nocturnal paroxysmal hemoglobinuria.

Owing to the complexity of the clinical picture and its multifaceted expression, this rare condition, of very scanty occurrence (2×10^6 inhabitants), remains of difficult diagnosis.

In the case reported upon, diagnosis was facilitated by a heat resistance test and the subsequent performance of classical tests, namely, Ham's test and the saccharose hemolysis test.

Owing to the circumstances leading to diagnosis, various interpretative features arising during the analytic stage, were dealt with.

Bibliografía

- 1) **CERVANTES, F et al:** Actividad de acetilcolinesterasa eritrocitaria en la hemoglobinuria paroxística nocturna y su relación con la expresividad clinicobiológica de la enfermedad. *Sangre*, 1979; 24: 1061.
- 2) **CERVANTES, F et al:** Hemoglobinuria paroxística nocturna. *Estudio de veintidós casos y revisión de la literatura*. *Sangre*, 1979; 24: 534.
- 3) **ROSSE, WF; PARKER, Ch.J:** Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria: *Clinics in Haematology*, 1985; 14: 106.
- 4) **RUIZ-ARGUELLES, GJ; MORALES-ACEVES, R; LABARDINI, JR; KRAUZ-WEISMAN, A:** Hemoglobinuria paroxística nocturna. Experiencia de 30 años en el Instituto Nacional de la Nutrición (México). *Sangre*, 1981; 26: 467.
- 5) **SIRCHIA, G; LEWIS, SM:** Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. *Clín, Hematol.*, 1976, 3.
- 6) **BIRD, GWG:** *Lectins and Polyagglutination. Clinical Practice of Blood Transfusion*, 1981: 139-40.
- 7) **DAVIDSOHN, I; NELSON, DA:** Métodos empleados en el análisis de sangre. *Diagnóstico clínico por el laboratorio*. 6a. Ed., Barcelona, Salvat, 1981: 226-7.
- 8) **GOUEMOND, M; SALMON, CH:** Les anémies hémolytiques auto-immunes. *En su: Immuno Hematologie et immunogénétique*. Paris, Flammarion, 1981: 393-5.