

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA LABORATORIO CLINICO



Estudio de Transfusión Feto-Materna en el embarazo a término durante el parto en pacientes aseguradas del Instituto Salvadoreño del Seguro Social, utilizando los métodos de Kleihauer-Betke modificado y el de Singer Chernoff & Singer.

SEMINARIO DE GRADUACION
PRESENTADO POR

BLANCA LUZ CASTRO CAMPOS
ANA LIDIA MIRANDA CARBALLO
BERTHA LUZ CORTEZ BARRIENTOS

PREVIA A LA OPCION DEL TITULO DE:
Licenciado en Laboratorio Clínico



Agosto de 1985

T
616-07561
C355e

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA

ej. 1

ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA-LABORATORIO CLINICO

ESTUDIO DE TRANSFUSION FETO-MATERNA EN EL EMBARAZO A TERMINO DURANTE EL PARTO EN PACIENTES ASEGURADAS DEL INSTITUTO SALVADOREÑO DEL SEGURO SOCIAL, UTILIZANDO LOS METODOS DE KLEI HAUER-BETKE MODIFICADO Y EL DE SINGER CHERNOFF & SINGER.

Por

BLANCA LUZ CASTRO CAMPOS
ANA LIDIA MIRANDA CARBALLO
BERTHA LUZ CORTEZ

Seminario presentado ante el Jurado Calificador de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de El Salvador, en satisfacción parcial de los requerimientos previos a la obtención del Título de Licenciado en Laboratorio Clínico.

Lic. Guadalupe de Barahona
Asesor

AGOSTO 1985

SAN SALVADOR

EL SALVADOR

CENTRO AMERICA



ESTUDIO DE TRANSFUSION FETO-MATERNA EN EL EMBARAZO A TERMINO DURANTE EL PARTO EN PACIENTES ASEGURADAS DEL INSTITUTO SALVADOREÑO DEL SEGURO SOCIAL, UTILIZANDO LOS METODOS DE KLEI HAUER-BETKE MODIFICADO Y EL DE SINGER CHERNOFF & SINGER

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR:

DR. CARLOS OLIVA

DR. GUILLERMO MATA

DR. NOE NOYOLA

AGRADECIMIENTO

A Dios Todopoderoso.

Al Instituto Salvadoreño del Seguro Social, por permitirnos utilizar el material necesario para la realización de este trabajo.

A nuestro Asesor, Lic. Guadalupe Hidalgo de Barahona, quien nos ofreció su tiempo y experiencia.

Al Dr. Rómulo Sosa C., por su acertadas correcciones, que gracias a sus altos conocimientos supo orientarnos durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. German Rodríguez Guardado, por su valiosa y desinteresada colaboración.

A todas aquellas personas que en alguna u otra forma nos ayudaron a realizar este estudio.

DEDICATORIA

QUEREMOS AGRADECER A NUESTROS PADRES, QUIENES
DESPUES DE TANTOS AÑOS DE ABNEGACION, DEDICA
CION Y SACRIFICIO VEN CORONADOS SUS ESFUERZOS
EN UNO DE LOS MAS ALTOS IDEALES DE UN PADRE:
"LA EDUCACION DE SUS HIJOS".

A NUESTROS ESPOSOS E HIJOS QUE CON SU COMPREN
SION Y CARIÑO NOS ESTIMULARON PARA ALCANZAR
NUESTRA META.

BLANCA LUZ,
ANA LIDIA y
BERTA LUZ.

I N D I C E

	<u>Página</u>
I. RESUMEN	i
II. INTRODUCCION	1
III. MATERIALES Y METODOS	6
IV. RESULTADOS	20
V. DISCUSION	25
VI. CONCLUSIONES	28
VII. RECOMENDACIONES	29
VIII. BIBLIOGRAFIA	32

R E S U M E N

El presente trabajo de investigación se verificó con el objeto de establecer un método práctico y confiable para la detección de transfusión feto-materna que cada vez se hace más importante en la práctica de la obstetricia moderna, utilizando en este estudio comparativamente los métodos de Kleihauer-Betke modificado y Singer Chernoff & Singer.

Se procesaron 400 muestras de sangre obtenidas de 200 madres con embarazo a término normal ingresadas en el Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social, que aceptaron su participación en el presente estudio; tomando una muestra de sangre venosa al inicio del trabajo de parto con dilatación cervical 2-3 cm. (Muestra A) y otra a los 10-15 minutos posteriores al alumbramiento (Muestra B).

Al estudiar 50 campos a 100X se encontró positividad en el 10.5% (21 madres) por el método de Kleihauer-Betke modificado y en un 58% (58 madres) por el método de Singer Chernoff & Singer.

Según la experiencia adquirida durante la realización de este estudio y la literatura consultada la técnica de elución ácida (Kleihauer-Betke modificado) es más confiable para detectar hemoglobina fetal, puesto que el otro método detecta cantidades mínimas de otras hemoglobinas diferentes a la hemoglobina fetal que aumentan el porcentaje real obtenido.

I N T R O D U C C I O N

Actualmente en la obstetricia se necesita un método práctico y fidedigno para identificar y cuantificar la sangre fetal. La detección de hemorragia y transfusión feto-materna es particularmente importante en mujeres Rh negativo que dan a luz niños Rh positivos, pero también puede serlo en la detección de diversas complicaciones obstétricas en mujeres Rh positivas, (7), tales como: Anemias hipocrómicas, microcíticas a esferocitos desarrollados durante el embarazo, sangramiento ante parto, trauma con patrón sinusoidal fetal, muerte intrauterina, hidropesía fetal no inmunológica y en la detección del origen de la sangre de una punción de amniocentesis sanguinolenta, sangramiento vaginal durante el tercer trimestre y en líquidos gástricos sanguinolentos de neonatos.

La hemorragia feto-materna no es considerada a menudo como una complicación potencial de trauma durante el parto, pero puede ser responsable de la muerte fetal ocurrida en algunos embarazos víctima de trauma. La muerte fetal durante la primera semana después del trauma es bien conocida, presentándose como una complicación el abrupcio de placenta que puede ser determinado por la detección de transfusión feto-materna.

2

La detección de los eritrocitos fetales en la circulación de la madre ha sido objeto de varios estudios. En 1957 fué descrita una técnica por Kleihauer-Betke y asociados, la cual puede identificar eritrocitos del feto en la sangre de la madre incluso desde el primer trimestre (1).

En el adulto normal existen tres hemoglobinas fisiológicas: hemoglobina A, hemoglobina A₂ y hemoglobina F, que difieren en su fracción globínica y que están controladas genéticamente.

La hemoglobina fetal presente en el adulto disminuye desde los seis meses de edad a niveles inferiores de 2 al 5%; si hay una proporción superior a esta cifra en el adulto, debe sospecharse alguna anormalidad.

Se sabe que en el último período del embarazo comienza a sintetizarse la hemoglobina de tipo adulto, y que en el nacimiento la sangre del niño contiene un 80% de hemoglobina fetal (Hb F) y un 20% de hemoglobina adulta (Hb A y Hb A₂) (12,17).

La hemoglobina fetal difiere en muchos aspectos de la hemoglobina adulta, especialmente en su mayor resistencia a la desnaturalización por los álcalis.

El aumento de la hemoglobina fetal en la sangre, así como la presencia de otras hemoglobinas anormales, puede producir los siguientes cuadros: formas reumatismales, formas gástricas con aspectos de cólicos hepáticos o apendicitis agudas, formas nefríticas y formas nerviosas (8).

Casi todos los investigadores aceptan que bastan 0.1 ml. de sangre Rh incompatibles como dosis eficaz para producir una sensibilización, razón por la cual, es importante detectar una transfusión mayor en una mujer Rh negativa (16).

En mujeres no tratadas, la sensibilidad por Rh rara vez surge antes del tercer trimestre en los embarazos no complicados, y casi siempre depende del parto, por tal razón se ha advertido que el comienzo de la respuesta inmunológica primaria depende de la frecuencia y la cantidad de eritrocitos Rh positivos que también pasan a la circulación de la madre. Se ha señalado que existen eritrocitos fetales en un 20 a un 50% en la circulación de las puérperas (16).

Se han desarrollado en los últimos años numerosas técnicas de laboratorio para cuantificar eritrocitos fetales.

Entre estos métodos vale la pena mencionar la medición de los niveles de alfa feto proteína sérica en la embarazada, el método de fluorescencia que permite diferenciar poblacio-

nes celulares entre sí con base en las propiedades de dispersión luminosa, según tamaño y densidad o de la fluorescencia de las células sanguíneas utilizando para esto un microfluorómetro, método de elución ácida como el de Kleihauer-Betke modificado que comercialmente lo encontramos como Fetaldex o como BMC (Boehringer Mannheim Corporation) y métodos de desnaturalización alcalina como el de Singer Chernoff & Singer (1,9,16).

En nuestro país solamente se ha realizado un estudio sobre este tema por Rodríguez G., en 1983, en el cual se encontró un 14% de transfusión feto-materna en mujeres embarazadas del Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS) utilizando para este estudio el método de Kleihauer-Betke modificado. En la actualidad no se está utilizando este método para evidenciar la transfusión feto-materna.

Este porcentaje, aunado a la inquietud de algunos médicos del Departamento de Gineco-Obstetricia de esta institución, nos motivó a verificar el presente trabajo de investigación para estudiar la transfusión feto-materna en el embarazo a término, durante el parto, en pacientes aseguradas del ISSS.

O B J E T I V O S

Son objetivos de esta Investigación:

1. La detección de hemoglobina fetal en un número significativo de muestras de pacientes embarazadas utilizando los métodos de Kleihauer-Betke modificado y el de Singer Chernoff & Singer.
2. La evaluación de los dos métodos utilizados con el propósito de saber cual de ellos es el más práctico, confiable y reproducible, para poder incorporarlo en el laboratorio clínico del Hospital General del ISSS.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio Clínico del Hospital General del Instituto Salvadoreño del Seguro Social. Se procesaron 400 muestras de sangre obtenidas de 200 madres con parto a término, atendidas en el Hospital General del ISSS, y que aceptaron su participación en el presente estudio.

Todas las madres incluidas en este estudio fueron interrogadas anotando en una hoja de entrevista aspectos generales: edad, talla, paridad, parto único o múltiple, vaginal o abdominal, grupo sanguíneo y factor Rh (se adjunta modelo en página N° 31).

COLECCION DE LA MUESTRA

Se tomaron dos muestras de sangre venosa a cada paciente; una al inicio del trabajo de parto (muestra A) y la otra transcurridos 10-15 minutos después de la extracción de la placenta (muestra B).

Las muestras sanguíneas fueron colectadas por venopunción en tubos al vacío con anticoagulante; recolectándose aproximadamente 4.5 ml. de sangre en tubos que contenían

0.5 mg. de anticoagulante EDTA, teniendo cuidado de hacer en el sitio de venopunción una buena asepsia, colectando la muestra con el menor éstasis sanguíneo para evitar la hemoconcentración y la hemólisis, mezclando inmediatamente y en forma cuidadosa para evitar la formación de microcoágulos, con el objeto de disminuir al máximo la posibilidad de datos falsos por una mala muestra.

MATERIALES

- Sangre con anticoagulante
- Materiales para extracción de sangre (agujas descartables para recolectar sangre al vacío 21 x 1 1/2, sostenedor de tubo al vacío, tubos conteniendo 0.5 mg. de anticoagulante EDTA, algodón y alcohol)
- Láminas porta objeto
- Pipetas serológicas de 1 y 5 ml.
- Tubos de ensayo de 10 ml.
- Tubos cónicos de 15 ml.
- Pipetas Pasteur
- Frascos de Coplin
- Termómetros
- Microscopio
- Centrífuga
- Colorímetro
- Baño de María de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$

- Cronómetro
- Cajas porta láminas
- Bandejas para coloración
- Palillos con algodón
- Embudos plásticos
- Perillas
- Tapones de hule
- Gradillas metálicas
- Papel filtro Whattman N° 42
- Lápiz graso
- Papel parafilm

METODO

Las muestras fueron procesadas por los métodos: Kleihauer-Betke modificado el cual es un método cuantitativo de coloración, y el de Singer Chernoff & Singer que es un método cuantitativo colorimétrico, ambos utilizados en la detección de hemoglobina fetal en la circulación materna.

PRINCIPIOS DE LOS METODOS

El método de Kleihauer-Betke modificado se basa en que la hemoglobina A del eritrocito adulto de la mujer es eluída a través de la membrana celular en presencia de un amortiguador

ácido, pero la hemoglobina fetal intracelular del eritrocito fetal es resistente a la extracción por elución. Cuando se fija una capa fina de sangre en una laminilla y se prepara tiñéndose con eosina B, los eritrocitos que contengan hemoglobina fetal pueden diferenciarse en el microscopio de los eritrocitos fantasma del adulto.

El método de Singer Chernoff & Singer está basado en que después de haber agregado un álcali a una solución de hemoglobina todas las otras hemoglobinas son desnaturalizadas, quedando únicamente en solución la hemoglobina fetal, la cual es determinada fotométricamente y expresada como un porcentaje de la hemoglobina total.

PROCEDIMIENTO

Cada una de las muestras a analizar eran mezcladas por inversión elaborándose posteriormente dos frotis delgados de las muestras rotuladas A y B por paciente, teniendo sumo cuidado de hacer los frotis durante las dos horas subsiguientes a la extracción de la muestra. Los frotis se dejaban secar al aire por 20 minutos antes de ser teñidos por el método de Kleihauer-Betke modificado. Una vez teñidos eran observados al microscopio 50 campos con el objetivo 100X. La cuenta de 5 células fetales en 5,000 eritrocitos era tomado como indicativo de transfusión feto-materna.

La mitad del total de muestras estudiadas fueron además procesadas por el método colorimétrico de Singer Chernoff & Singer de la siguiente manera:

De cada una de las muestras se verificó un hemolizado para liberar las hemoglobinas, éste era mezclado con un álcali para desnaturalizar las hemoglobinas adultas, dejándolo posteriormente reposar a temperatura ambiente por exactamente un minuto. Inmediatamente después era detenida la reacción con sulfato de amonio que también actuaba como un agente precipitante de las hemoglobinas.

Las hemoglobinas así precipitadas se removían por filtración y la hemoglobina resistente al álcali (Hb F) se determinaba fotométricamente a 540 nm y se expresaba como un porcentaje del total de hemoglobina presente en la muestra original. Si el porcentaje obtenido era mayor del 2% se consideraba significativo de transfusión feto-materna.

Controles de sangre adulta, sangre de cordón y una mezcla de ambos eran preparados y procesados en una forma similar en ambos métodos.

Si las muestras no eran procesadas el mismo día se hacía el hemolizado y se congelaba a -20°C hasta la fecha de su determinación.

TECNICA Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LA COLORACION DE
KLEIHAUER-BETKE MODIFICADO.

1. Etanol al 80% fijador

2. Solución de elución:

Solución A: 0.75 g/100 ml. de hamatoxilina en etanol
al 96%

Solución B: Cloruro Férrico (FeCl_3) 2.4g, HCl al 25%
2 ml, aforar con agua destilada a 100 ml.

La solución de elución se prepara mezclando 5 volúmenes de solución A y 1 volumen de solución B, filtradas antes de usarse. Esta solución es estable por aproximadamente cuatro meses.

3. Colorante de contraste: pesar 2.5 g. de eosina B, disolver con agua destilada y aforar a 100 ml. (2).

TECNICA:

1. Hacer frotis sanguíneos frescos y secarlos al aire libre.
2. Inmediatamente después de secados, fijarlos por cinco minutos en etanol al 80%.
3. Lavar rápidamente con agua del grifo y secarlos colocándolos verticalmente durante diez minutos.

4. Después de secos poner los frotis por veinte segundos en solución de elución, lavándolos inmediatamente.
5. Finalmente colocarlos por dos minutos en la coloración de contraste (Eosina B).
6. Lavarlos nuevamente y secarlos al aire libre.

Las células fetales se tiñen de rojo, los restos de los eritrocitos adultos de rosado y los leucocitos de gris (2) (Ver láminas en página N° 14).

CALCULO:

Se puede cuantificar el número de eritrocitos fetales transmitidos a la madre de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Número de células teñidas}}{\text{Número de células no teñidas}} \times \text{volumen sanguíneo materno estimado} = \text{ml. de sangramento feto materno}$$

De donde:

Número de células no teñidas = 5,000 este número se obtiene de observar 50 campos de \pm 100 células por campo a 100X, haciendo el conteo en la parte del ex tendido donde los glóbulos rojos no estén superpuestos.

Número de células teñidas = igual o mayor a 5 células.

Volumen sanguíneo estimado = 2,400 se obtiene de multiplicar el valor promedio de los hematócritos por el valor promedio del peso en kilogramos de las pacientes estudiadas.

Fórmula utilizada

$$\text{Factor} = \bar{X} \text{ Ht} \times \bar{X} \text{ Kgr.}$$

Sustituyendo:

$$\bar{X} \text{ Ht} = 37.1$$

$$\bar{X} \text{ Kgr.} = 64.7$$

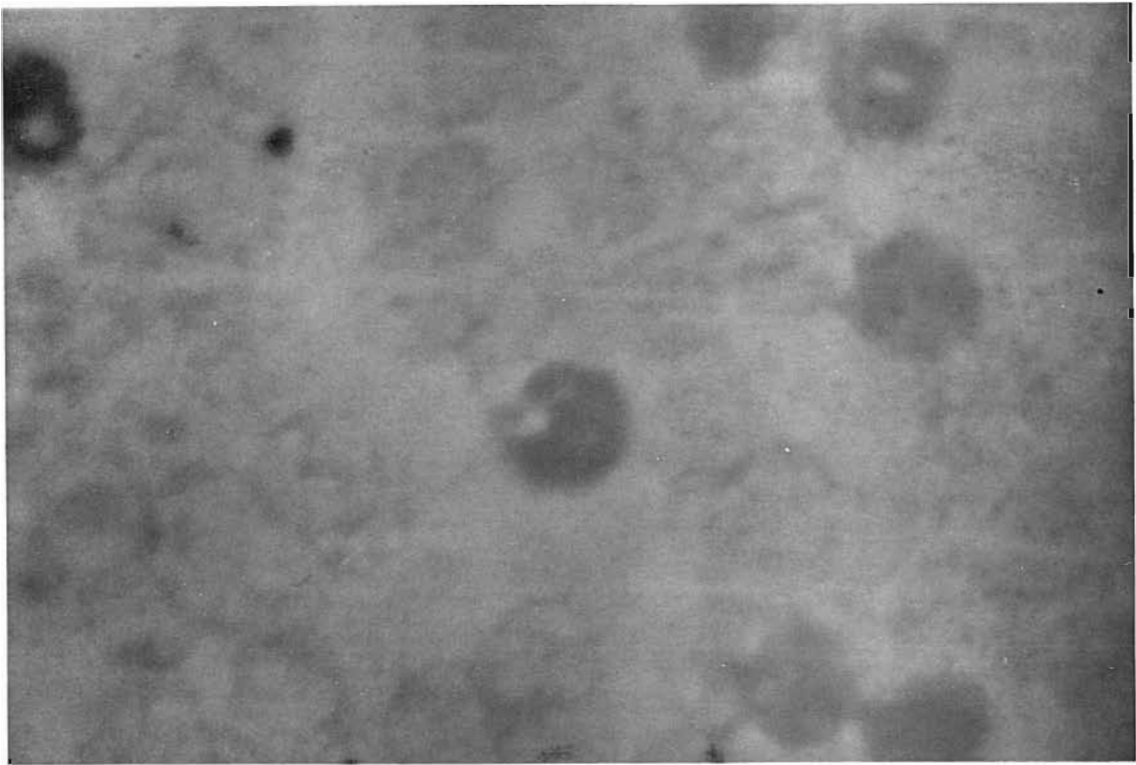
$$\text{Factor} \quad 37.1 \times 64.7$$

$$\text{Factor} \quad 2,400$$

De donde:

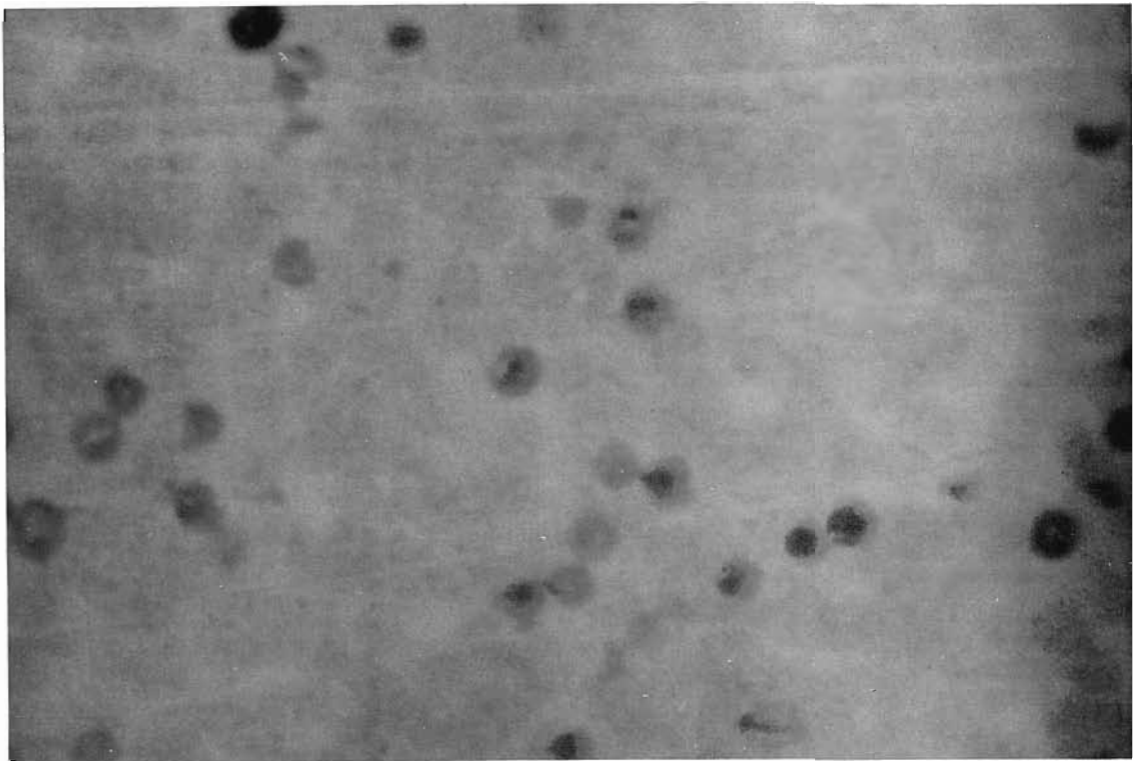
$$\bar{X} \text{ Ht} = \text{Valor promedio de los hematócritos}$$

$$\bar{X} \text{ Kgr.} = \text{Valor promedio de los pesos en kilogramos}$$



LAMINA # 1

Frotis de sangre venosa en los cuales se observan los eritrocitos fetales de color rojo contra un fondo de residuos de células adultas cuya hemoglobina ha sido eluida. Las células que se tiñen intensamente de gris son Leucocitos de la madre (Lámina 1 observada a 100X, lámina 2 observada a 40X).



LAMINA # 2

TECNICA Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LA DESNATURALIZACION
ALCALINA PARA HEMOGLOBINA FETAL, POR EL METODO DE SINGER
CHERNOFF & SINGER

1. Hidróxido de sodio 1/12 N.

Pesar 3.3 g de NaOH, disolverlos en agua destilada y aforar a un litro. Almacenar a 4°C en frascos plásticos.

2. Sulfato de Amonio saturado al 50% (solución precipitante).

Pesar 390 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ disolverlos en 500 ml. de agua fría. Agitar hasta que esté saturado.

Diluir 400 ml. del sobrenadante con 400 ml. de agua; agregar 2 ml. de HCl 10 N.

3. Acido Clorhídrico 10 N.

Medir 83.7 ml. de HCl concentrado y aforar a 100 ml. con agua destilada.

TECNICA

A. Preparación de solución de hemoglobina.

1. En un tubo de centrifuga graduado, poner 5 ml. de sangre anticoagulada, centrifugar por 5 minutos a 3000 rpm.
2. Separar el plasma y luego lavar los eritrocitos 3 veces con solución salina. Después de la última lavada remover la solución salina. Anotar el volumen de eritrocitos empacados.
3. Por cada 1 ml. de células agregar 1.4 ml. de agua destilada y 0.4 ml. de tolueno. Agitar vigorosamente por 5 minutos y luego centrifugar por 15 minutos a 3000 rpm.
4. Remover la capa superior de tolueno absorbiéndola con un hisopo.
5. Remover la solución de hemoglobina introduciendo una pipeta Pasteur a través del tapón de material estromático.
6. Filtrar la solución de hemoglobina con papel Whattman N° 42. El filtrado debe ser transparente.

B. Determinación de Hemoglobina Total

Agregar 0.02 ml. de solución de hemoglobina a 5 ml. de agua destilada.

Leer D.O. a 540 nm en el espectofotómetro o en Klett utilizando el filtro verde N° 54 (5).

C. Determinación de Hemoglobina Fetal.

Verificar los siguientes pasos en duplicado.

1. Medir 1.6 ml. de NaOH 1/12 N, en cada uno de los tubos de ensayo 12 x 75.

Colocar los tubos en baño de María a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 minutos para equilibrar la temperatura.

2. Agregar 0.1 ml. de solución de hemoglobina y simultáneamente comenzar a cronometrar; lavar la pipeta con la mezcla 6 veces; agitar el tubo suavemente por 10 segundos. Todos estos pasos deben de tomar aproximadamente 20 segundos.
3. Exactamente un minuto después de efectuada la mezcla se le agrega la solución de sulfato de amonio al 50%, invertir el tubo seis veces.
4. Filtrar luego a través de papel filtro Whattman N° 42. El filtrado debe ser totalmente transparente.

5. Leer la D.O. a 540 nm o con filtro verde N° 54.

Esta es la D.O. de la hemoglobina fetal. Promediar el valor de las dos determinaciones.

CALCULO

La dilución de la hemoglobina fetal es de 1:51, la de la hemoglobina no tratada es de 1:251 la proporción es $\frac{51}{251}$ ó 0.203.

$$\frac{\text{D.O. hemoglobina fetal}}{\text{D.O. hemoglobina total}} \times 0.203 \times 100 = \% \text{ de hemoglobina fetal (5,10)}$$

CONTROLES

Se utilizaron como controles positivos para las dos técnicas, sangre de cordón y como control negativo sangre de adulto del sexo masculino aparentemente sano.

En la técnica de Kleihauer-Betke modificado se preparaba otro control mezclando partes iguales de sangre de cordón con sangre de adulto del sexo masculino. Las sangres eran previamente tipeadas para evitar la aglutinación y hemólisis al efectuar la mezcla. Este control era verificado con el objeto de descartar cualquier duda en la identificación celular.

Los controles eran corridos cada vez que se verificaban

las pruebas de la misma manera que las muestras de los pacientes. Sirviéndonos para descartar el mal funcionamiento de los reactivos, comprobar la sensibilidad y reproducibilidad de los métodos e identificar falsos positivos y negativos.

RESULTADOS

Para la realización de este estudio se seleccionaron 200 madres de la población asegurada de la zona metropolitana. De las cuales se obtuvieron 400 muestras, 200 de ellas fueron tratadas únicamente por el método de Kleihauer-Betke modificado y 200 fueron procesadas, además por el método de desnaturalización alcalina de Singer Chernoff & Singer.

Determinándose el porcentaje de transfusión feto-materna en las muestras de la población estudiada, para cada uno de los dos métodos. Obteniendo en el primer método de 200 pacientes 21 (10.5%) casos positivos y 179 (89.5%) casos negativos, en el segundo método de 100 pacientes 58 (58%) casos positivos y 42 (42%) casos negativos.

C U A D R O 1

RESULTADOS GLOBALES DE LAS 200 PACIENTES PROCESADAS POR EL METODO
DE KLEIHAUER-BETKE MODIFICADO

TOTAL DE CASOS ESTUDIADOS	CASOS NEGATIVOS	% DE CASOS NEGATIVOS	CASOS POSITIVOS	% DE CASOS POSITIVOS
200	179	89.5%	21	10.5%

En este cuadro se observa que de los 200 casos analizados por el método de Kleihauer-Betke modificado, en 21 (10.5%) de los casos se encontraron eritrocitos fetales en número igual o mayor de 5 eritrocitos en 50 campos a 100X, considerándolos como positivos a sangramiento feto-materno; y el resto 179 (89.5%) de la población estudiada fue negativa.

PORCENTAJE DE POSITIVIDAD OBTENIDA EN LAS MUESTRAS "A" Y "B" DE LAS
200 PACIENTES PROCESADAS POR EL METODO DE KLEIHauer-BETKE MODIFICADO

TOTAL DE CASOS POSITIVOS	N° DE CASOS EN MUESTRA "A"	% DE CASOS EN MUESTRA "A"	N° DE CASOS EN MUESTRA "B"	% DE CASOS EN MUESTRA "B"
21	5	23.81%	21	100%

Este cuadro representa el porcentaje de positividad en las muestras A y B de las 200 pacientes por Kleihauer-Betke modificado, obteniéndose 5 (23.81%) casos positivos en la muestra A y 21 (100%) casos positivos en la muestra B; porcentaje calculado en relación al total de casos positivos. Obervando una mayor positividad en la muestra B debido a que era obtenida 10 minutos después del parto, donde había una mayor posibilidad de transfusión fetomaterna por el trauma.

C U A D R O 3

VOLUMENES SANGUINEOS Y PORCENTAJES CALCULADOS DE TRANSFUSION FETO-MATERNA
EN LAS MUESTRAS POSITIVAS "A" Y "B" DE LAS 200 PACIENTES PROCESADAS POR
EL METODO DE KLEIHauer-BETKE MODIFICADO

RANGO DE TRANSFUSION FETO-MATERNA EN MILILITROS	N° DE CASOS EN MUESTRA "A"	% DE CASOS EN MUESTRA "A"	N° DE CASOS EN MUESTRA "B"	% DE CASOS EN MUESTRA "B"
< - 2	2	1.0%	9	4.5%
3 - 4	1	0.5%	7	3.5%
5 - 6	1	0.5%	1	0.5%
7 - 8	1	0.5%	1	0.5%
9 - 10	0	0.0%	1	0.5%
11 - 12	0	0.0%	1	0.5%
13 - 14	0	0.0%	1	0.5%

En este cuadro se observa, que en la muestra A se obtuvieron menores volúmenes de transfusión feto-materna que en la muestra B, en donde se obtuvo hasta 13 ml. de T.F.M. Los mayores porcentajes 4.5% y 3.5% de T.F.M. se observa en los rangos comprendidos entre < - 2 y 3 - 4 ml. respectivamente en la muestra B, y en la muestra A el mayor porcentaje (1%) se observa en el rango que comprende < - 2 ml. Aproximadamente el 99% de los casos positivos fueron menores de 13 ml.

RESULTADOS COMPARATIVOS DE LAS 100 PACIENTES PROCESADAS POR LOS METODOS
DE KLEIHAUER-BETKE MODIFICADO Y SINGER CHERNOFF & SINGER

TOTAL DE CASOS ESTUDIADOS	PORCENTAJE DE CASOS POSITIVOS		PORCENTAJE DE CASOS NEGATIVOS	
	KLEIHAUER-BETKE MODIFICADO	SINGER CHERNOFF & SINGER	KLEIHAUER-BETKE MODIFICADO	SINGER CHERNOFF & SINGER
100	11%	58%	89%	42%

Aquí se representan los 100 casos estudiados por los dos métodos, observándose una positividad en el de Kleihauer-Betke modificado de un 11% y en el de Singer Chernoff & Singer de un (58%).

Este último porcentaje fue obtenido de sumar todas aquellas hemoglobinas cuyos resultados fueron iguales o mayores del 2% como nos lo indicaba el método. No significando esto que el método de Singer Chernoff & Singer sea el más exacto.

DISCUSION

El método de Kleihauer-Betke modificado según la literatura consultada es una de las primeras técnicas descritas para detectar eritrocitos fetales en la circulación de la embarazada. El resultado de positividad obtenida por este método en el presente trabajo fue del 10.5% cifra que es similar a la reportada por la literatura (11%) y menor a la citada por Rodríguez en 1983 (14%). (11,15).

Resultado obtenido a pesar de las dificultades que se presentaron durante el desarrollo del presente estudio como fueron la escasa referencia bibliográfica de trabajos similares, la falta de experiencia y de conocimientos en la técnica. Sin embargo afirmamos que este método es mucho más confiable que el de Singer Chernoff & Singer, por las razones que posteriormente se detallan.

Por el método de Singer Chernoff & Singer se obtuvo una positividad del 58%; porcentaje obtenido basándonos en que los niveles normales de hemoglobina fetal para este método en adultos es menor del 2%.

Pero este resultado no demuestra que el método de Singer Chernoff & Singer sea el más confiable, ya que según la bibliografía (4) se ha aceptado que el método no es muy exacto cuando la mezcla de hemoglobina contiene menos del 10% de hemoglobina fetal y ciertamente no es nada exacta a niveles de 2% y

3%; a tales niveles se sabe que alguna hemoglobina A se está midiendo como hemoglobina fetal.

Se han tenido reportes que con este método se pueden medir, además de la hemoglobina fetal, las hemoglobinas Alexandra, Bart's y Cypriot que tienen una resistencia a la desnaturación alcalina igual que la hemoglobina fetal, pudiendo ser detectadas cantidades significativas de estas hemoglobinas que aumentaría considerablemente el porcentaje total obtenido.

Beaven y otros concluyeron que el método de Singer Chernoff & Singer está sujeto a un error de un 5% a un 10% sobre el rango de 10% a 100% de hemoglobina fetal.

Queremos aclarar que el porcentaje mayor obtenido por este método en este trabajo fue del 6%, no llegando a un 10% como lo indican los autores. Siendo evidente que este método no es recomendable por las causas anteriormente mencionadas.

Consideramos que una de las aplicaciones clínicas del presente trabajo es la profilaxis de la sensibilización Rh, el cual falla en 1% a 2% en las parejas ABO compatibles, esto se debe en parte a que hay sangramiento feto-materno ante parto con subsecuente sensibilización y a un excesivo sangramiento feto materno al momento del parto, por lo que la dosis co-

rriente de inmunoglobulina Rh es inadecuada ya que una sola dosis de 300 microgramos de inmunoglobulinas anti Rh neutraliza únicamente 30 ml. de sangre fetal Rh positiva, o 15 ml. de eritrocitos conglomerados (paquete globular).

En este trabajo obtuvimos un caso de una paciente Rh positiva a la cual se le detectó una transfusión feto-materna de 60 ml. cosa que pudo haber ocurrido en una paciente Rh negativa ratificando así lo anteriormente expuesto.

La cuantificación de hemoglobina fetal también puede ser útil en la detección de transfusión feto-materna ocurrida a la madre antes del parto con sensibilización ulterior (16).

C O N C L U S I O N E S

Según los resultados obtenidos podemos concluir:

- 1^a) Que el método de KLEIHAUER-BETKE modificado es una técnica práctica y sencilla para la detección de eritrocitos fetales, siendo una de las mayores ventajas de la prueba el corto tiempo de su realización, el uso de cantidades mínimas de reactivo, su fácil preparación y la obtención de estos en el comercio; además de que en la actualidad se cuenta con reactivos en estuches comerciales que hacen la técnica más cómoda y rápida (12).

- 2^a) Que el método de SINGER CHERNOFF & SINGER no es nada específico ni confiable; por otra parte hay que agregar que la prueba no es práctica ni sencilla y que tiene como desventaja la inestabilidad de los reactivos, el tiempo prolongado de su realización, la utilización de material excesivo, el cuidado de mantener la temperatura adecuada y los tiempos exactos.

En razón de lo anterior, concluimos la no utilización de esta prueba como un método para la detección de hemoglobina fetal.

RECOMENDACIONES

El estudio de elución por ácido constituye una forma fidedigna de detectar y cuantificar los eritrocitos fetales, teniendo este método una utilidad clínica en diversas situaciones obstétricas, tanto en mujeres Rh negativas como en mujeres Rh positivas; al indicar una coloración de Kleihauer-Betke modificado en la sangre periférica de la embarazada se puede detectar transfusión feto-materna en: Hidropesía fetal, Hemorragia prenatal, Traumatismo abdominal o uterino, Patrones sinusoidales en el latido fetal, Obito fetal, Neonato anémico, Madre Rh negativa que da a luz a un niño Rh positivo, Post amniocéntesis.

EN OTROS, PARA DIFERENCIAR ENTRE LAS SANGRES MATERNAS Y FETALES COMO EN:
Hemorragia vaginal (en sangre obtenida), Amniocéntesis hemorrágica (en sangre aspirada), Líquido gástrico sanguinolento aspirado, o en heces sanguinolentas en el neonato y Poliglobulina fetal, para descartar transfusión feto-materna.

ESTE METODO PUEDE SER UTILIZADO TAMBIEN EN MEDICINA INTERNA PARA EVALUAR:
Anemias microcíticas hipocrómicas, Persistencia de hemoglobina fetal en el adulto que tiene relación con una variedad de enfermedades hematológicas como: Talasemias, Anemias a célu-

las falciformes, Leucemias mieloides de la infancia y en una gran variedad de neoplasias.

Esperamos que en base a estas recomendaciones todas aquellas instituciones relacionadas con Ginecología y Obstetricia se interesen en establecer esta prueba con el fin de evitar riesgos posteriores a una transfusión feto-materna.

HOJA DE ENCUESTA

N° de Expediente _____ N° Correlativo _____

Fecha: _____

Nombre: _____

Profesión: _____

Calidad A _____ B _____ Típo Rh _____

Peso _____ Talla _____

Edad _____ Paridad _____

Características del Embarazo: Único _____ Múltiple _____

Características del tiempo de Paridad:

Duración _____

Inducción _____

Espontáneo _____

Cesárea _____

Patología Asociada:

Monitoreo _____

Trauma _____

Niño Pálido _____

Trazo Monitor _____

Placenta _____

BIBLIOGRAFIA

1. Chamberlain Ernest M. et al, Obstetric and Gynecology. A comparison of acid-elution techniques ad alpha fetopro_{te}in levels of the detection fetomaternal bleeding. 143:8, 82. p.p. 912-916.
2. Dacie, J.V. and Lewis S.M. Practical Haematology. 4a. Edición, 1970.
3. Haesslein Hanns C. Isoimmunización. Manual of Obstetrics. Diagnosis and Therapy. 1a. Edición, abril 1980, pp. 247-255.
4. Henry, Cannon, Winkelman, Clinical Chemistry Principles and Technics. 2a. Edition, 1974, p.p. 1178-1180.
5. Henry Richard J. Clinical Chemistry. Principles and Technics. 2a. Edición 1974, p.p. 1178-1182 y 111-118.
6. Kimball Lloyd L.M.D., Miya Fred MD. et al, Obstetrics & Ginecology. Intrapartum fetomaternal bleeding in Rh negative. 56:3, 80 p.p. 285-287.
7. Lele Amol S. MD. et al, Obstetrics and Gynecology. Feto

maternal bleeding following diagnostic amniocentesis.
60:1, 82 p.p. 60-63.

8. Lattanzio E. y A. Molinelli de Leporati, Revista Asoc. Bioquímica Argentina. Determinación de hemoglobina fetal en diferentes anemias. 35, 70 p.p. 135-139.
9. Lachman, E. Hingley Susan M., Bates Gillian et al, British Medical Journal, Detection and measurement of fetomaternal haemorrhage: Serum Alfa-fetoprotein and Kleinhauer technique. 1, 77, p.p. 1377-1379.
10. Mible John B., Laboratory Medicine-Hematology. Seg. Edición, p.p. 845-848.
11. Ness Paul M. MD. Am. J. Obstetrics Gynecology. The assessment of fetal maternal and enzyme-linked antiglobulin test for Rh immune globulin recipients. 143, 82 p.p. 788.
12. Platt W.R., Atlas de Hematología, 1a. Edición JIMS editorial Barcelona 1972, p.p. 141-143.
13. Richker Rex G. and Wennberg Richard P. MD. Obstetrics and Gynecology, Fetomaternal transfusion following trauma. Wennberg. 61:2, 83.

14. Rote, Neal S. Fisiopatología de la Isoinmunización por Rh. Clinicas Obstétricas y Ginecológicas. Isoinmunización en el embarazo. 2, 82, p.p. 261.
15. Rodríguez G., Detección y Cuantificación de Sangramiento fetomaterno intraparto en embarazo a término utilizando el test de Kleihauer-Betke modificado.
16. Scott James R., Warenk; James C. Fisiopatología de la isoinmunización en el embarazo. 2, 82, p.p. 295-300.
17. Sanford Todd, Diagnóstico Clínico para el laboratorio, Salvat Editores, S. A. Barcelona 1978, p.p. 221-222.
18. Wintrob Max Well M. Clínica hematology, 7a. Edición, 1974, p.p. 53-55.