

Instructions For Use

SAS-MX Alkaline Hb-10

Cat. No. 100800

SAS-MX Hb-10 alkaline

Fiche technique

Réf. 100800

SAS-MX Alkalisches Hb-10

Anleitung

Kat. Nr. 100800

Alkaline Hb-10 SAS-MX

Istruzioni per l'uso

Cod. 100800

Hb-10 Alcalina SAS-MX

Instrucciones de uso

No de catálogo 100800

Contents

English	1
Français	7
Deutsch	13
Italiano	20
Español	26

INTENDED PURPOSE

The SAS-MX Alkaline Hb-10 kit is intended for the separation of human haemoglobins by agarose gel electrophoresis.

Haemoglobins (Hb) are a group of proteins whose chief functions are to transport oxygen from the lungs to the tissues and carbon dioxide in the reverse direction. They are composed of polypeptide chains called globin, and iron protoporphyrin haem groups. A specific sequence of amino acids constitutes each of the four polypeptide chains. Each normal haemoglobin molecule contains one pair of alpha and one pair of non-alpha chains. In normal adult haemoglobin (HbA), the non-alpha chains are called beta. The non-alpha chains of foetal haemoglobin are called gamma. A minor (3%) haemoglobin fraction called HbA₂ contains alpha and delta chains. Two other chains are formed in the embryo.

The major haemoglobin in the erythrocytes of the normal adult is HbA and there are small amounts of HbA₂ and HbF. In addition, over 400 mutant haemoglobins are now known, some of which may cause serious clinical effects, especially in the homozygous state or in combination with another abnormal haemoglobin. Wintrobe¹ divides the abnormalities of haemoglobin synthesis into three groups.

- (1) Production of an abnormal protein molecule (e.g. sickle cell anaemia).
- (2) Reduction in the amount of normal protein synthesis (e.g. thalassaemia).
- (3) Developmental anomalies (e.g. hereditary persistence of foetal haemoglobin (HPFH)).

The two mutant haemoglobins most commonly seen are HbS and HbC. Hb Lepore, HbE, HbG-Philadelphia, HbD-Los Angeles, and HbO-Arab may be seen less frequently².

Electrophoresis is generally considered the best method for separating and identifying haemoglobinopathies. The protocol for haemoglobin electrophoresis involves step-wise use of two systems^{3,8}. Initial electrophoresis is performed in alkaline buffers. However, because of the electrophoretic similarity of many structurally different haemoglobins, the evaluation must be supplemented by acid buffer electrophoresis which measures a property other than electrical charge. This method is based on the complex interactions of the haemoglobin with an alkaline electrophoretic buffer and the agarose support. The SAS-MX Alkaline Hb-10 procedure is a simple procedure requiring minute quantities of haemolysate to provide complementary evidence (along with the results from SAS-MX Acid Hb-10 analysis) of the presence of HbS, HbC and HbF as well as several other abnormal hemoglobins.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

All reagents are for in-vitro diagnostic use only. Do not ingest or pipette by mouth any kit component. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information.

COMPOSITION

1. SAS-MX Alkaline Hb Gel

Contains agarose in a Tris / EDTA / Glycine buffer with sodium azide as preservative. The gel is ready for use as packaged.

2. Tris / Borate Buffer Concentrate

Contains concentrated Tris / Borate buffer with sodium azide and thiomersal as preservatives. Dilute the contents of the bottle to 1 litre with purified water and mix well.

3. Acid Blue Stain Concentrate

Contains concentrated Acid Blue stain. Dilute the contents of the bottle to 700ml with purified water. Stir overnight and filter before use. Store in a tightly stoppered bottle.

4. Haemoglobin Lysing Agent

Contains Triton X-100 in purified water with potassium cyanide and thiomersal as preservative. The Lysing Agent is ready for use as packaged.

5. Destain Solution Concentrate

Contains concentrated Destain Solution. Dilute the contents of the bottle to 2 litres with purified water. Store in a tightly stoppered bottle.

6. Other Kit Components

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Sample Application Templates and Blotters A and C to complete 10 gels.

STORAGE AND SHELF-LIFE

1. SAS-MX Alkaline Hb Gel

Gels should be stored at 15...30°C and are stable until the expiry date indicated on the package. DO NOT REFRIGERATE OR FREEZE. Deterioration of the gel may be indicated by 1) crystalline appearance indicating the gel has been frozen, 2) cracking and peeling indicating drying of the gel or 3) visible contamination of the agarose from bacterial or fungal sources.

2. Tris / Borate Buffer

The buffer concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C.

3. Acid Blue Stain

The stain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted stain is stable for 6 months at 15...30°C. It is recommended to discard used stain immediately to prevent depletion of staining capability. Poor staining performance may indicate deterioration.

4. Haemoglobin Lysing Agent

The Lysing Agent should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Particulate contamination or cloudiness may indicate deterioration.

5. Destain Solution

The destain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted destain solution is stable for 6 months at 15...30°C. Cloudiness may indicate deterioration of the destain solution.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 4063 SAS-MX Chamber

Cat. No. 1525 EPS600 Power Supply

Cat. No. 5328 AA₂ Hemo Control

Cat. No. 5329 ASA₂ Hemo Control

Cat. No. 5330 AFSA₂ Hemo Control

Cat. No. 5331 AFSC Hemo Control

Drying oven with forced air capable of 60...70°C

Fixative solution: Mix 500ml of methanol and 500ml of purified water. Add 100ml of glacial acetic acid.

Mix well and store in a tightly stoppered bottle.

Saline solution (0.85% NaCl)

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Freshly collected EDTA or heparin anticoagulated blood is the specimen of choice. Samples can be stored refrigerated at 2...6°C for up to 1 week. For optimal results, saline washed red cells should be used to prepare lysates. This removes possible interference from plasma proteins.

- a) Mix 200µL of well mixed whole blood with 1000µL of saline solution.
- b) Centrifuge to sediment the red cells.
- c) Remove 1000µL of the supernatant and discard.
- d) Add a further 1000µL of saline solution and mix well.
- e) Repeat steps b-d x2.
- f) Following the final centrifugation, remove 1000µL of supernatant and treat the remaining sample as whole blood, or remove all of the supernatant and treat the remaining sample as washed packed cells.

Dilute each patient sample / control to a haemoglobin concentration of 1.0-2.0 g/dL with Haemoglobin Lysing Agent.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. Blot the gel surface with a blotter C, discard the blotter.
2. Align the sample application template with the arrows at the edge of the gel. Place a blotter A on top of the template and rub a finger across the slits to ensure good contact. Remove the blotter and retain for use in step 5.
3. Apply 3µl of sample to each slit and allow to absorb for 5 minutes.
4. Whilst samples are absorbing, pour 30ml of buffer into each inner section of the SAS-MX Chamber.
5. Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained from step 2 and remove both blotter and template.
6. Position the gel in the chamber agarose side down, aligning the positive (+) and negative (-) sides with the corresponding positions on the chamber.
7. Electrophorese the gel: 150 volts, 30 minutes
8. At the end of electrophoresis, dry the gel at 60...70°C. **NOTE:** The drying of the gel should take no more than 5 minutes to prevent diffusion of bands. If this cannot be achieved, fix the gel in fixative solution for 5 minutes prior to drying.
9. Immerse the dry gel in stain solution for 10 minutes.

10. Destain the dry gel in 2 x 1 minute washes of destain solution or until the background is clear.
11. Dry the gel.

INTERPRETATION OF RESULTS

Qualitative Evaluation:

The possible identity of the haemoglobin types present in the samples can be determined by visual evaluation of the completed gel. The Hemo controls provide a marker for band identification.

Quantitative Evaluation:

The relative percent of each haemoglobin type on the gel can be determined by densitometry of the completed gel at 595nm.

Figure 1 shows the possible identity of the most commonly encountered haemoglobin types.

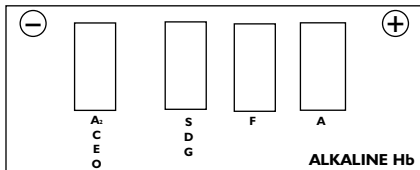


FIG. 1

Most haemoglobin variants cause no discernible clinical symptoms, so are of interest primarily to research scientists. Variants are clinically important when their presence leads to sickling disorders, thalassaemia syndromes, life long cyanosis, haemolytic anaemias or erythrocytosis, or if the heterozygote is of sufficient prevalence to warrant genetic counselling. The combinations of HbS-S, HbS-D-Los Angeles, and HbS-O Arab lead to serious sickling disorders². Several variants including HbH, E-Fort Worth and Lepore cause a thalassaemic blood picture².

The two variant hemoglobins of greatest importance in terms of frequency and pathology are HbS and HbC¹. Sickle cell anaemia (HbSS) is a cruel and lethal disease. It first manifests itself at about 5-6 months of age. The clinical course presents agonising episodes of pain and temperature elevations with anaemia, listlessness, lethargy, and infarct in virtually all organs of the body. The individual with homozygous HbCC suffers mild haemolytic anaemia which is attributed to the precipitation or crystallization of HbC within the erythrocytes. Cases of HbSC disease are characterised by haemolytic anaemia that is milder than sickle-cell anaemia.

The thalassaemias are a group of haemoglobin disorders characterised by hypochromia and microcytosis due to the diminished synthesis of one globin chain (the α or β) while synthesis of the other chain proceeds normally^{9,10}. This unbalanced synthesis results in unstable globin chains. These precipitate within the red cell, forming inclusion bodies that shorten the life span of the cell.

In α -thalassaemias, the α chains are diminished or absent, and in the β -thalassaemia, the β chains are affected. Another quantitative disorder of haemoglobin synthesis, hereditary persistent foetal haemoglobin (HPFH), represents a genetic failure of the mechanisms that turn off gamma chain synthesis at about four months after birth, which results in a continued high percentage of HbF. It is a more benign condition than the true thalassaemias and persons homozygous for HPFH have normal development, are asymptomatic and have no anemia¹⁰.

The most common haemoglobin abnormalities:

Sickle Cell Trait

This is a heterozygous state showing HbA and HbS and a normal amount of HbA₂. Results on citrate agar show haemoglobins in the HbA and HbS migratory positions (zones).

Sickle Cell Anaemia

This is a homozygous state showing almost exclusively HbS, although a small amount of HbF may also be present.

Sickle-C Disease

This is a heterozygous state demonstrating HbS and HbC.

Sickle Cell-Thalassaemia Disease

This condition shows HbA, HbF, HbS, and HbA₂.

In Sickle Cell β_0^- -Thalassaemia HbA is absent.

In Sickle Cell β_+^- -Thalassaemia HbA is present in reduced quantities.

Thalassaemia-C Disease

This condition shows HbA, HbF and HbC.

C Disease

This is a homozygous state showing almost exclusively HbC.

Thalassaemia Major

This condition shows HbF, HbA and HbA₂.

LIMITATIONS

Some abnormal haemoglobins have similar electrophoretic mobilities and must be differentiated by other methodologies.

Further testing required:

1. Acid Hb electrophoresis may be a necessary follow up test for confirmation of abnormal haemoglobins detected.
2. Globin chain analysis (both acid and alkaline) and structural studies may be necessary in order to positively identify some of the more rare haemoglobins.
3. Anion exchange column chromatography is the most accurate method for quantitating HbA₂. Helena BioSciences Sickle-Thal Quik Column Method (Cat. No. 5334) for quantitation of HbA₂ in the presence of HbS, or the Helena BioSciences Beta-Thal HbA₂ Quik Column Procedure (Cat. No. 5341) are recommended. HbA₂ quantitation is one of the most important diagnostic tests in the diagnosis of β -thalassaemia trait.
4. Low levels of HbF (1-10%) may be accurately quantitated by radial immunodiffusion using the Helena BioSciences HbF-QuikPlate Procedure (Cat. No. 9325).

REFERENCE VALUES

At birth, the majority of haemoglobin in the erythrocytes of the normal individual is foetal haemoglobin, HbF. Some of the major adult haemoglobin, HbA, and a small amount of HbA₂, are also present. At the end of the first year of life and through adulthood, the major haemoglobin present is HbA with up to 3.7% HbA₂ and less than 2% HbF.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Reproducibility

	Within Gel (n=10)		Between Gel (n=100)	
	Mean (%)	CV (%)	Mean (%)	CV (%)
HbA	45.9	1.6	45.9	1.8
HbF	37.8	1.3	38.1	1.7
HbS	14.5	3.2	14.2	4.4
HbA ₂	1.8	7.8	1.9	17.8

Linearity

The linearity of the method is a function of densitometer specification as well as gel performance. It is recommended that each customer determine the linearity of the method based upon the densitometer in use in the laboratory.

BIBLIOGRAPHY

1. Wintrobe, Maxwell M., Clinical Hematology, 6th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1967. pages 145-167.
2. Fairbanks, V.F., 'The Nomenclature and Taxonomy of Hemoglobin Variants', Diagnostic Medicine, Nov/Dec., 53-58, 1980.
3. Schneider, R.G., Hightower, B.J. and Barwick, R.C., 'Laboratory Identification of the Hemoglobins', Lab Management, 1981; August: 29-43.
4. Center for Disease Control, Laboratory Methods for Detecting Hemoglobinopathies, U.S. Department of Health and Human Services/Public Health Service, 1984.
5. Schneider, R.G., 'Methods for Detection of Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies in the Routine Clinical Laboratory', CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1978.
6. Schneider, R.G., Hightower, B., Hosty, T.S., Ryder, H., Tomlin, G., Atkins, R., Brimhall, B., and Jones, R.T., 'Abnormal Hemoglobins in a Quarter Million People', Blood, 1976; 48(5) : 629-637.
7. Huisman, T.H.J. and Schroeder, W.A., 'New Aspects of the Structure, Function and Synthesis of Hemoglobins'. CRC Press, Cleveland, 1971.
8. Schmidt, R.M., Huisman, T.H.J., and Lehmann, H., The Detection of Hemoglobinopathies. CRC Press, Cleveland, 1974.
9. Weatherall, D.J. and Clegg, J.B., The Thalassemia Syndromes, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972.
10. Lehman, H. and Huntsman, R.G., Man's Haemoglobins, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1974.

UTILISATION

Le kit SAS-MX Hb-10 alcaline est utilisé pour la quantification et la séparation des hémoglobines humaines par électrophorèse en gel d'agarose.

L'hémoglobine (Hb) est un groupe de protéines dont la fonction principale est le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus et du dioxyde de carbone en sens inverse. Les hémoglobines sont composées de chaînes polypeptidiques appelées globines et de groupements protoporphyriques ferreux, les hèmes.

Une séquence spécifique d'acides aminés constitue chacune des quatre chaînes polypeptidiques. Chaque molécule normale d'hémoglobine est constituée de deux chaînes alpha et de deux chaînes non-alpha. Les chaînes non-alpha de l'hémoglobine d'un sujet adulte normal (HbA) sont appelées bêta. Celles de l'hémoglobine fœtale sont appelées gamma. L'HbA₂ (~ 3%) est composée des chaînes alpha et delta. Deux autres chaînes sont formées chez l'embryon.

L'HbA constitue la majeure partie de l'hémoglobine présente dans les érythrocytes d'un adulte normal; l'HbA₂ et l'HbF sont également présentes, mais en moindre quantité. Actuellement, plus de 400 mutants sont connus, certains sont à l'origine de signes cliniques graves et plus particulièrement dans la forme homozygote ou en combinaison avec d'autres hémoglobines anormales. Wintrobe¹ divise la synthèse des hémoglobines anormales en trois groupes.

- (1) Production d'une molécule protéique anormale (par exemple, l'anémie drépanocytaire).
- (2) Réduction de la synthèse de protéines normales (par exemple, la thalassémie).
- (3) Développement d'anomalies (par exemple, la persistance héréditaire de l'hémoglobine F [PHHF]).

Les deux mutants d'hémoglobine les plus couramment rencontrés sont l'HbS et l'HbC. L'Hb Lepore, l'HbE, l'HbG-Philadelphie, l'HbD-Los-Angeles et l'HbO-arabe sont retrouvées moins fréquemment².

L'électrophorèse est considérée comme la meilleure méthode de séparation et d'identification des hémoglobinopathies. La technique d'électrophorèse de l'hémoglobine implique l'utilisation de deux systèmes^{3,8} : d'abord, une électrophorèse en pH alcalin. Du fait de la similarité électrophorétique de beaucoup d'hémoglobines structurellement différentes, l'évaluation doit être complétée par une électrophorèse en pH acide qui met en œuvre d'autres propriétés que la charge électrique.

Cette méthode se base sur une interaction complexe de l'hémoglobine avec un tampon de migration alcalin et le support d'agarose. La procédure SAS-MX Hb-10 alcalin est une technique simple demandant une petite quantité d'hémolysat pour mettre en évidence (grâce aussi aux résultats d'analyse du kit SAS-MX Hb-10 acide) la présence d'HbS, d'HbC et d'HbF ainsi que d'autres hémoglobines anormales.

PRÉCAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostique in-vitro uniquement. Ne pas ingérer ou pipeter à la bouche aucun composant. Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

COMPOSITION

1. **Plaque SAS-MX Hb alcaline**

Contient de l'agarose dans un tampon Tris / EDTA / Glycine additionné d'azide de sodium comme conservateur. Le gel est prêt à l'emploi.

2. **Tampon concentré Tris / Borate**

Contient un tampon Tris / Borate concentré additionné d'azide de sodium et de thimérolal comme conservateurs. Diluer le contenu du flacon dans 1 litre d'eau distillée et bien mélanger.

3. **Colorant bleu acide**

Contient du colorant bleu acide concentré. Dissoudre le contenu du flacon dans 700ml d'eau distillée, laisser sous agitation toute une nuit. Filtrer avant utilisation. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

4. **Hémolysant**

Contient du Triton X-100 en solution aqueuse avec du cyanure de potassium et du thimérolal comme conservateurs. L'hémolysant est prêt à l'emploi.

5. **Solution décolorante**

Contient la solution décolorante concentrée. Diluer le contenu du flacon dans 2 litres d'eau distillée. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

6. **Autres composants du kit**

Chaque kit contient également une fiche technique, des buvards A et C et des masques applicateur échantillons (Template) pour 10 gels.

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. **Plaque SAS-MX Hb alcaline**

Les gels doivent être conservés entre 15...30°C; ils sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. **NE PAS RÉFRIGÉRER OU CONGELER.** Les conditions suivantes indiquent une détérioration du gel: 1) des cristaux visibles indiquant que le gel a été congelé, 2) des craquelures indiquant une déshydratation du gel, 3) une contamination visible, bactérienne ou fongique.

2. **Tampon Tris / Borate**

Le tampon concentré doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C.

3. **Colorant bleu acide**

Le colorant concentré doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le colorant reconstitué est stable 6 mois entre 15...30°C. Il est recommandé de jeter le colorant utilisé afin d'éviter que la capacité de coloration ne diminue. Si la performance de coloration diminue, cela indique une détérioration de la solution colorante.

4. **Hémolysant**

L'hémolysant doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Un aspect floconneux ou une contamination indique une détérioration du produit.

5. **Solution décolorante**

Le décolorant concentré doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le décolorant dilué est stable 6 mois entre 15...30°C. Un aspect floconneux indique une détérioration de la solution décolorante.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 4063 Chambre de migration SAS-MX

Réf. 1525 Générateur EPS600

Réf. 5328 Hémo contrôle AA2

Réf. 5329 Hémo contrôle ASA2

Réf. 5330 Hémo contrôle AFSA2

Réf. 5331 Hémo contrôle AFSC

Étuve de séchage à convection forcée offrant une température entre 60...70°C

Solution fixative: Mélanger 500ml d'eau distillée avec 500ml de méthanol. Ajouter 100ml d'acide acétique glacial. Bien mélanger et conserver en bouteille hermétiquement fermée.

Solution physiologique (0,85% NaCl)

PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS

L'utilisation de sang total fraîchement prélevé sur EDTA ou héparine est fortement recommandée. Les échantillons peuvent être conservés 1 semaine entre 2...6°C. Pour un résultat optimal, les globules rouges doivent être lavés avec de la solution physiologique avant la préparation de l'hémolysat. Cette étape évite l'interaction des protéines plasmatiques.

- Mélanger 200 μ l de sang total mélangé avec 1000 μ l de solution physiologique.
- Centrifuger jusqu'à sédimentation des hématies.
- Retirer 1000 μ l de surnageant.
- Ajouter à nouveau 1000 μ l de solution physiologique et mélanger.
- Répéter les étapes b à d deux fois.
- Après la dernière centrifugation, retirer 1000 μ l de surnageant et traiter l'échantillon comme un sang total ou bien retirer tout le surnageant et traiter comme des hématies lavées.

Diluer chaque échantillon / contrôle avec l'hémolysant afin d'obtenir une concentration en hémoglobine entre 1,0 et 2,0g/dl.

MÉTHODOLOGIE

- Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
- Disposer le masque applicateur échantillon en faisant correspondre les flèches avec les 2 fentes latérales. Placer un buvard A sur le masque et passer délicatement le doigt sur les fentes afin d'assurer un contact optimal. Retirer le buvard A et le conserver pour l'étape 5.
- Déposer 3 μ l d'échantillon sur chaque fente et laisser absorber 5 minutes.
- Pendant ce temps, verser 30ml de tampon dans chaque compartiment intérieur de la chambre de migration SAS-MX.
- Une fois l'absorption de l'échantillon terminée, sécher le masque applicateur avec le buvard A conservé à l'étape 2 puis enlever le buvard et le masque applicateur.
- Placer le gel, agarose vers le bas, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
- Faire migrer à 150 volts pendant 30 minutes.
- Une fois la migration terminée, sécher le gel entre 60...70°C. **REMARQUE:** Le gel doit être sec en moins de 5 minutes afin d'éviter la diffusion des bandes. Si cela n'était pas possible, fixer le gel dans un bain de solution fixative pendant 5 minutes avant de le sécher.
- Plonger le gel sec dans le colorant pendant 10 minutes.
- Décolorer le gel sec dans 2 bains successifs de 1 minute de solution décolorante ou jusqu'à obtention d'un fond de bande clair.

11. Sécher le gel.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Évaluation qualitative:

La possibilité d'identifier les différentes bandes d'hémoglobine des échantillons se fait grâce à une observation visuelle du gel coloré. Les contrôles utilisés servent de marqueurs de position pour l'identification.

Évaluation quantitative:

Le pourcentage de chaque fraction est obtenu par lecture à l'aide d'un densitomètre à 595 nm.

La figure 1 montre la position des hémoglobines les plus communément rencontrées.

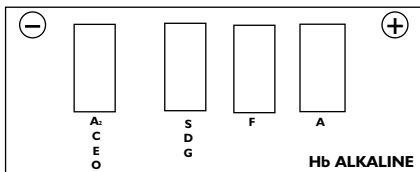


FIG. 1

La majeure partie des variants d'hémoglobine ne donnent pas de symptômes cliniques, mais présentent un intérêt pour la recherche scientifique. Les variants sont importants d'un point de vue médical lorsque leur présence implique des désordres cliniques (syndromes thalassémiques, cyanoses, anémies hémolytiques ou érythrocytaires) ou lorsque le signe hétérozygote prévaut pour garantir un conseil en génétique. La combinaison de HbS-S, HbS-D-Los-Angeles et HbS-O-arabe conduit à une falciformation grave². Plusieurs variants comme HbH, E-Fort Worth et Lepore produisent un trait thalassémique.

Les deux variants d'hémoglobine les plus importants en terme de fréquence et de pathologie sont l'HbS et l'HbC³. L'anémie drépanocytaire (HbSS) est une pathologie importante et létale. Elle se manifeste dans les 5-6 premiers mois de la vie. Le tableau clinique se présente avec des épisodes de fortes fièvres et de douleurs avec anémie, d'apathie, de léthargie et des lésions dans tous les organes du corps.

Les patients avec une hémoglobine HbCC homozygote souffrent d'anémie hémolytique qui est attribuée à la précipitation ou la cristallisation de l'HbC dans les érythrocytes. Dans le cas d'HbSC, elle se caractérise par une anémie hémolytique moins sévère qu'avec l'anémie falciforme.

Les thalassémies sont un groupe caractérisé par des désordres comme l'hypochromie et la microcytose dues à une diminution de la synthèse d'une chaîne de globine (α ou β) alors que la synthèse des autres chaînes se produit normalement^{9,10}. Cette synthèse non homogène provoque une instabilité des chaînes de globine. Celles-ci précipitent dans les globules rouges, formant des inclusions et réduisant la vie des hématies.

Dans l' α -thalassémie, ce sont les chaînes alpha qui sont diminuées ou absentes alors que, dans la β -thalassémie, il s'agit des chaînes bêta. Un autre désordre quantitatif de synthèse d'hémoglobine, la persistance héréditaire de l'hémoglobine F (PHHF), est un défaut génétique dans le mécanisme de synthèse et de transformation de la chaîne gamma qui intervient dans les 4 mois après la naissance, et qui se traduit par un fort pourcentage en HbF. Il s'agit d'une situation bénigne par rapport aux vraies thalassémies ou aux patients homozygotes. Pour la PHHF, le développement est normal, c'est-à-dire asymptomatique et sans anémie¹⁰.

Voici les hémoglobinopathies les plus communes:

Trait drépanocytaire

C'est un état hétérozygote montrant HbA, HbS et un taux normal d'HbA₂ en acétate de cellulose. Les résultats en pH acide montrent la présence d'hémoglobines migrant en position A et S.

Drépanocytose

C'est un état homozygote montrant presque uniquement de l'HbS, avec parfois un faible taux d'HbF.

Hémoglobinoses S-C

C'est un état hétérozygote avec HbS et HbC.

Thalasso-drépanocytose

Il y a présence d'HbA, HbF, HbS et HbA₂.

Dans la thalasso-drépanocytose β^0 , l'HbA est absente.

Dans la thalasso-drépanocytose β^+ , l'HbA est présente mais en faible quantité.

Hémoglobinoses C-thalassémie

Présence d'HbA, HbF et HbC.

Hémoglobinoses C

C'est un état homozygote montrant exclusivement de l'HbC.

Thalassémie majeure

Présence d'HbF, HbA et HbA₂.

LIMITES

Certaines hémoglobines ont une migration électrophorétique similaire et doivent être identifiées par d'autres méthodes.

Méthodes disponibles:

1. Le kit Hb acide peut être nécessaire pour confirmer la présence d'hémoglobines anormales.
2. Il est possible que l'analyse des chaînes de globine (en milieu alcalin et acide) et l'étude structurale soient nécessaires pour arriver à identifier de façon positive certaines hémoglobines rares.
3. La colonne échangeuse d'anions est la méthode la plus appropriée pour le dosage de l'HbA₂. La technique Helena BioScience Sickle-Thal quick colonnes (réf. 5334) pour la quantification de l'HbA₂ en présence d'HbS ou la technique Helena BioScience Beta-Thal HbA₂ quick colonne (réf. 5341) sont recommandées. Le dosage de l'HbA₂ est un des tests les plus importants pour le diagnostic d'un trait thalassémique.
4. De faibles taux d'HbF (1-10%) peuvent être quantifiés par immunodiffusion radiale selon la technique Helena BioScience HbF-Quiplat (réf. 9325).

VALEURS DE RÉFÉRENCE

À la naissance, la majeure partie de l'hémoglobine d'un sujet normal est de l'hémoglobine foetale, HbF. Des traces des hémoglobines adultes HbA et en moindre quantité HbA₂ sont aussi présentes. Dès la fin de la première année et durant toute la vie adulte, l'hémoglobine principale est l'HbA avec maximum de 3,7% d'HbA₂ et moins de 2% d'HbF.

PERFORMANCES

Reproductibilité

	Intra-plaque (n=10)		Inter-plaque (n=100)	
	Moyenne (%)	CV (%)	Moyenne (%)	CV (%)
HbA	45.9	1.6	45.9	1.8
HbF	37.8	1.3	38.1	1.7
HbS	14.5	3.2	14.2	4.4
HbA ₂	1.8	7.8	1.9	17.8

Linéarité

La linéarité est fonction des caractéristiques du densitomètre ainsi que des performances du gel. Il est recommandé à chaque client de déterminer la linéarité de cette méthode en fonction du densitomètre utilisé au sein du laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wintrobe, Maxwell M., Clinical Hematology, 6^e édition, Lea and Febiger, Philadelphie, 1967, pages 145-167.
2. Fairbanks, V.F., 'The Nomenclature and Taxonomy of Hemoglobin Variants', Diagnostic Medicine, nov./déc., 53-58, 1980.
3. Schneider, R.G., Hightower, B.J. et Barwick, R.C., 'Laboratory Identification of the Hemoglobins', Lab Management, 1981; août : 29-43.
4. Center for Disease Control, Laboratory Methods for Detecting Hemoglobinopathies, U.S. Department of Health and Human Services/Public Health Service, 1984.
5. Schneider, R.G., 'Methods for Detection of Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies in the Routine Clinical Laboratory', CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1978.
6. Schneider, R.G., Hightower, B., Hosty, T.S., Ryder, H., Tomlin, G., Atkins, R., Brimhall, B. et Jones, R.T., 'Abnormal Hemoglobins in a Quarter Million People', Blood, 1976; 48(5) : 629-637.
7. Huisman, T.H.J. et Schroeder, W.A., 'New Aspects of the Structure, Function and Synthesis of Hemoglobins'. CRC Press, Cleveland, 1971.
8. Schmidt, R.M., Huisman, T.H.J., et Lehmann, H., The Detection of Hemoglobinopathies. CRC Press, Cleveland, 1974.
9. Weatherall, D.J. et Clegg, J.B., The Thalassemia Syndromes, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972.
10. Lehman, H. et Huntsman, R.G., Man's Haemoglobins, J.B. Lippincott Co., Philadelphie, 1974.

ANWENDUNGSBEREICH

Der SAS-MX Alkalische Hb-10 Kit ist zur Auftrennung von menschlichem Hämoglobin durch Elektrophorese im Agarose-Gel bestimmt.

Hämoglobine (Hb) bezeichnen Proteingruppen, deren Hauptfunktion im Transport von Sauerstoff aus der Lunge zu den Geweben und dem Transport von Kohlendioxid in umgekehrter Richtung besteht. Sie setzen sich aus Polypeptidketten (Globine) und Eisenprotoporphyrinen als Haem-Gruppen zusammen.

Jede der vier Polypeptidketten ist durch eine spezifische Aminosäuresequenz bestimmt. Jedes normale Hämoglobinmolekül besteht aus einem Paar Alpha-Ketten und einem Paar Nicht-Alpha-Ketten. Im normalen Erwachsenen-Hämoglobin (HbA) werden die Nicht-Alpha-Ketten als Beta-Ketten bezeichnet.

Die Nicht-Alpha-Ketten fetalen Hämoglobins werden als Gamma-Ketten bezeichnet. HbA₂ ist eine kleine Hämoglobinfraktion von 3%, die sowohl Alpha- als auch Delta-Ketten enthält. Zwei weitere Ketten werden im Embryo gebildet.

Der Hauptanteil des Hämoglobins in den Erythrozyten eines gesunden Erwachsenen ist HbA. Daneben findet man kleine Mengen von HbA₂ und HbF. Darüber hinaus sind über 400 Hämoglobinmutationen bekannt. Davon können einige, vor allem im homozygoten Zustand oder in Kombination mit anderem pathologischen Hämoglobin, schwere klinische Krankheitsbilder verursachen. Wintrobe¹ unterscheidet drei Gruppen von Anomalien in der Hämoglobinsynthese.

- (1) Synthese eines anormalen Eiweißmoleküls (z.B. bei der Sichelzellenanämie).
- (2) Verminderung der Proteinsynthesemenge (z.B. bei der Thalassämie).
- (3) Entwicklungsanomalien (z.B. Hereditäre Persistenz fetalen Hämoglobins [HPFH]).

Die beiden häufigsten Hämoglobinmutationen sind HbS und HbC. Hb Lepore, HbE, HbG-Philadelphia, HbD-Los Angeles und HbO-Arab werden seltener beobachtet.²

Die Elektrophorese gilt als die beste Methode zur Trennung und Identifizierung von Hämoglobinopathien. Das Protokoll zur Hämoglobin-Elektrophorese beinhaltet die stufenweise Verwendung zweier Systeme^{3,4}. Die erste Elektrophorese wird in einem alkalischen Puffermilieu durchgeführt. Da sich jedoch die strukturell verschiedenen Hämoglobine elektrophoretisch ähneln, muss die Auswertung durch Säure-Puffer-Elektrophorese ergänzt werden, da hier neben der elektrischen Ladung eine weitere Eigenschaft gemessen wird.

Diese Methode beruht auf den komplexen Wechselwirkungen des Hämoglobins mit einem alkalischen Elektrophorese-Puffer unter Mithilfe von Agarose. Das SAS-MX Alkalische Hb-10 Verfahren (neben den Ergebnissen der SAS-MX Säure Hb-10 Analyse) ist ein einfaches Verfahren, bei dem geringste Mengen von Hämolytat ausreichen, um zusätzlichen Nachweis für das Vorhandensein von HbS, HbC und HbF sowie mehreren anderen anomalen Hämoglobinen zu liefern.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien sind nur zur in-vitro-Diagnostik bestimmt. Nicht einnehmen oder mit dem Mund pipettieren. Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie die Informationen zur Entsorgung.

INHALT

1. SAS-MX Alkalische Hb Gel

Enthält Agarose in Tris/EDTA/Glyzinpuffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.

2. Tris-Borat-Pufferkonzentrat

Enthält konzentrierten Tris-Borat-Puffer mit Natriumazid und Thiomersal als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 1 Liter verdünnen. Gut schütteln.

3. „Saures-Blau“ Farbstoffkonzentrat

Enthält konzentrierte „Saures-Blau“ Farbstofflösung. Den Inhalt der Flasche auf 700ml mit dest. Wasser verdünnen. Über Nacht rühren und vor dem Gebrauch filtrieren. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

4. Hämoglobin lysierendes Reagenz

Enthält Triton X-100 in dest. Wasser mit Kaliumcyanid und Thiomersal als Konservierungsmittel. Das lysierende Reagenz ist gebrauchsfertig verpackt.

5. Entfärbelösung-Konzentrat

Enthält konzentrierte Entfärbelösung. Den Inhalt der Flasche auf 2 Liter mit dest. Wasser verdünnen. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

6. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Methodenbeschreibung sowie die zur Durchführung der Elektrophorese notwendigen Auftragschablonen und Blotter A und Blotter C für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-MX Alkalische Hb Gel

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. NICHT IM KÜHLSCHRANK ODER TIEFKÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN! Der Zustand des Gels kann sich verschlechtern. Dafür gibt es folgende Merkmale: 1) Kristallisation weist auf vorangegangenes Einfrieren hin, 2) Risse und Ablösen weisen auf ein Austrocknen des Gels hin, und 3) sichtbare Kontamination der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

2. Tris-Borat-Puffer

Das Pufferkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verdünnter Puffer ist bei 15...30°C für 2 Monate stabil.

3. „Saures-Blau“ Farbstoff

Das Farbstoffkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Der verdünnte Farbstoff ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 6 Monate stabil. Es wird empfohlen, benutzten Farbstoff sofort zu entsorgen, um eine Minderung der Färbeleistung zu verhindern. Schlechte Färbeleistung kann auf Verfall hinweisen.

4. Hämoglobin lysierendes Reagenz

Das Lyse-Reagenz sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum auf dem Etikett stabil. Teilweise Verunreinigung oder Trübung können auf einen Verfall hinweisen.

5. Entfärbelösung

Das Entfärbekonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verdünnte Entfärbelösung ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 6 Monate stabil. Trübung kann auf den Verfall der Entfärbelösung hinweisen.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 4063 SAS-MX Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Kat. Nr. 5328 AA2 Hämokontrolle

Kat. Nr. 5329 ASA2 Hämokontrolle

Kat. Nr. 5330 AFSA2 Hämokontrolle

Kat. Nr. 5331 AFSC Hämokontrolle

Trockenschrank mit Umluft und einer Temperaturleistung von 60...70°C.

Fixierlösung: 500ml Methanol mit 500ml dest. Wasser mischen. 100ml Eisessigsäure hinzufügen.

Gut vermischen und in einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

Kochsalzlösung (0,85% NaCl)

PROBENTNAHME UND VORBEREITUNG

Frisch entnommenes EDTA- oder Heparin-Blut als Material der Wahl. Proben können bei 2...6°C bis zu einer Woche gelagert werden. Für optimale Resultate sollte zur Herstellung des Lysats in Kochsalzlösung gewaschene Erythrozyten verwendet werden. Somit werden mögliche Interferenzen mit Plasmaproteinen entfernt.

- a) 200µl gut durchmisches Vollblut mit 1000µl NaCl-Lösung mischen.
- b) Zentrifugieren, um die Erythrozyten zu sedimentieren.
- c) 1000µl des Überstands entfernen und verwerfen.
- d) Weitere 1000µl Kochsalzlösung hinzufügen und gut vermischen.
- e) Die Schritte b) bis d) zwei Mal wiederholen.
- f) Nach dem letzten Zentrifugieren und Entfernen von 1000µl Überstand die verbleibende Probe wie Vollblut behandeln. Es kann auch der gesamte Überstand entfernt und die verbleibende Probe als gewaschenes Erythrozytenkonzentrat behandelt werden.

Alle Patientenproben / Kontrollproben mit Hämoglobin lysierendem Reagenz verdünnen, bis eine Hämoglobinkonzentration von 1,0 -2,0g/dl erreicht ist.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. Das Gel aus der Verpackung nehmen und auf ein Papiertuch legen. Die Geloberfläche mit einem Blotter C blotten und Blotter verwerfen.
2. Die Auftragschablone so auf das Gel legen, dass die Pfeile am Rand des Gels liegen. Blotter A auf die Schablone legen und mit einem Finger über die Schlitze der Schablone streichen, um eine gute Haftung zu gewährleisten. Blotter A entfernen und ihn bis zur Verwendung in Schritt 5 beiseite legen.
3. 3µl Probe in die jeweiligen Schablonenschlitze pipettieren. Probe für 5 Minuten ins Gel diffundieren lassen.
4. Während die Proben diffundieren, 30ml Puffer in jeden der inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen.
5. Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 2 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
6. Das Gel in die Kammer spannen, Agarose nach unten, und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).
7. Gel-Elektrophorese durchführen: 150 Volt, 30 Minuten

8. Nach Beendigung des Elektrophoreselaufs das Gel bei 60...70°C trocknen. **BITTE BEACHTEN:** Der Trockenvorgang sollte nicht länger als 5 Minuten dauern, da sonst Diffusionsphänomene auftreten können. Die Proteine können aber auch vor dem Trocknen 5 Minuten in Fixierlösung fixiert werden.
9. Das trockene Gel 10 Minuten in der Färbelösung färben.
10. Das trockene Gel zweimal für je 1 Minuten in der Entfärbelösung entfärben oder bis der Gel-Hintergrund klar ist.
11. Gel trocknen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Qualitative Auswertung:

Die mögliche Identität der Hämoglobintypen in den Proben kann durch visuelle Auswertung des fertigen Gels bestimmt werden. Die Hämo-Kontrollen dienen als Marker für die Bandenerkennung.

Quantitative Auswertung:

Der relative prozentuale Anteil jedes Hämoglobin-Typs auf dem Gel lässt sich durch Densitometrie des fertigen Gels bei 595 nm ermitteln.

Abbildung 1 zeigt die mögliche Identität der am häufigsten vorkommenden Hämoglobin-Typen.

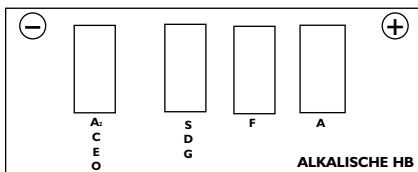


ABB. 1

Die meisten Hämoglobinvarianten verursachen keine erkennbaren klinischen Symptome und sind somit in erster Linie von wissenschaftlichem Interesse. Varianten sind von klinischer Bedeutung, wenn ihre Anwesenheit zu Sichelzellenanämie, Thalassämiesyndromen, lebenslanger Zyanose, hämolytischen Anämien oder Erythrozytose führt, oder wenn der heterozygote Zustand von signifikanter Prävalenz ist und eine genetische Beratung erforderlich macht². Die Kombination von HbS-S, HbS-D-Los Angeles und HbS-O Arab führt zu schwerwiegenden Sichelzellenanämien². Mehrere Varianten darunter HbH, E-Fort Worth und Lepore verursachen ein Thalassämie typisches Blutbild².

Die beiden wichtigsten Hämoglobinvarianten hinsichtlich Häufigkeit und Pathologie sind HbS und HbC². Sichelzellenanämie (HbSS) ist eine schwere, tödlich verlaufende Erkrankung. Sie tritt zuerst im fünften bis sechsten Lebensmonat auf. Der klinische Verlauf ist durch schwere Schmerz- und Fieberschübe, kombiniert mit Anämie, Lethargie und einem Infarktgeschehen in so gut wie allen Organen charakterisiert.

Der Patient mit homozygotem HbC leidet unter einer leichten hämolytischen Anämie, die auf Ausfällung oder Kristallisierung von HbC innerhalb des Erythrozyten zurückzuführen ist. Fälle von HbSC-Erkrankung sind durch hämolytische Anämie, die leichter als die Sichelzellenanämie ist, charakterisiert.

Thalassämien sind eine Gruppe von Hämoglobinsynthesestörungen, die durch Hypochromasie und Mikrozytose charakterisiert sind. Die Störung wird durch die verminderte Synthese einer Globinkette (der Alpha- oder Beta-Kette) hervorgerufen, während die Synthese der anderen Kette normal verläuft^{9,10}. Durch diese ungleiche Synthese kommt es zur Bildung von instabilen Globinketten. Diese fallen innerhalb der Erythrozyten als Einschlusskörper aus, und verkürzen somit die Lebensdauer der Zelle.

Bei der Alpha-Thalassämie sind die Alpha-Ketten entweder vermindert oder fehlen ganz, während bei der Beta-Thalassämie die Beta-Ketten betroffen sind. Eine weitere quantitative Störung der Hämoglobinsynthese, die hereditäre Persistenz fetalen Hämoglobins (HPFH), ist ein genetisch bedingtes Versagen des etwa im vierten Lebensmonat auftretenden Abschaltens der Gammakettensynthese, die zu einem ständig erhöhten HbF-Anteil führt. Es handelt sich dabei um eine weniger schwerwiegende Erkrankung als die echte Thalassämie und HPFH homozygote Patienten entwickeln sich normal ohne Symptome und Anämie¹⁰.

Die am häufigsten vorkommenden Hämoglobinanomalien:

Sichelzellenanämiemerkmal

Hierbei handelt es sich um die heterozygote Form mit HbA und HbS sowie einer normalen Menge von HbA₂. Die Resultate auf dem Citratagar zeigen Hämoglobine in den HbA- und HbS-Wanderpositionen (-zonen).

Sichelzellenanämie

Hierbei handelt es sich um die homozygote Form mit fast ausschließlicher Präsenz von HbS, obwohl auch eine geringe Menge von HbF vorhanden sein kann.

Sichelzell-Hämoglobin-C Krankheit

Dies ist die heterozygote Form, die HbS und HbC aufweist.

Sichelzellthalassämie

Diese Erkrankung weist HbA, HbF, HbS und HbA₂ auf.

Bei der Sichelzell-Beta-Thalassämie fehlt HbA.

Bei der Sichelzellen-β⁺-Thalassämie ist HbA in verminderter Menge präsent.

Thalassämie-C Erkrankung

Diese Erkrankung weist HbA, HbF und HbC auf.

Die C-Erkrankung

Hierbei handelt es sich um die homozygote Form mit Anwesenheit von fast ausschließlich HbC.

Thalassaemia major

Diese Erkrankung weist HbF, HbA und HbA₂ auf.

EINSCHRÄNKUNGEN

Einige der abnormalen Hämoglobine haben ähnliche elektrophoretische Bewegungsmuster und müssen durch andere Untersuchungsmethoden differenziert werden.

Weitere notwendige Untersuchungen:

1. Säure Hb ist eventuell eine weitere, notwendige Untersuchung, um die Anwesenheit von abnormalem Hämoglobin zu bestätigen.
2. Sowohl die saure als auch die alkalische Globinkettenanalyse und Strukturstudien können zur Identifikation einiger der selteneren Hämoglobine notwendig sein.

- Anionen-Wechselsäulenchromatographie ist die präziseste Methode zur quantitativen Bestimmung von HbA₂. Die Helena BioSciences Sickle-Thal Quik Column Methode (Kat. Nr. 5334) zur quantitativen Bestimmung von HbA₂ in Anwesenheit von HbS oder die Helena BioSciences Beta-Thal HbA₂ Quik Column Methode (Kat. Nr. 5341) werden empfohlen. Die HbA₂-Quantifizierung ist einer der wichtigsten Tests zur Diagnose von Beta-Thalassämieerkrankungen.
- Niedrige HbF-Werte (1-10%) können mit der radialen Immundiffusion der Helena BioSciences HbF-QuikPlate Methode (Kat. Nr. 9325) quantitativ genau bestimmt werden.

REFERENZWERTE

Bei der Geburt besteht der Hauptanteil des Hämoglobins in den Erythrozyten normaler Neugeborener aus fetalem Hämoglobin (HbF). Es sind außerdem ein gewisser Anteil HbA, dem Hauptanteil des Erwachsenen-Hämoglobins, und ein geringer Anteil an HbA₂ vorhanden. Der Hauptanteil des Hämoglobins am Ende des ersten Lebensjahres und beim Erwachsenen ist das HbA, mit einem HbA₂-Anteil von bis zu 3,7% und weniger als 2% HbF.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Reproduzierbarkeit

	Intra-Assay (n=10)		Inter-Assay (n=100)	
	Mittelwert (%)	CV (%)	Mittelwert (%)	CV (%)
HbA	45.9	1.6	45.9	1.8
HbF	37.8	1.3	38.1	1.7
HbS	14.5	3.2	14.2	4.4
HbA ₂	1.8	7.8	1.9	17.8

Linearität

Die Linearität der Methode ist abhängig von der Densitometer-Spezifikation sowie der Leistung des Gels. Es wird jedem Kunden empfohlen, die Linearität der Methode mit dem im Labor verwendeten Densitometer selbst zu bestimmen.

LITERATUR

- Wintrobe, Maxwell M., Clinical Hematology, 6th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1967. Seite 145-167.
- Fairbanks, V.F., 'The Nomenclature and Taxonomy of Hemoglobin Variants', Diagnostic Medicine, Nov/Dec., 53-58, 1980.
- Schneider, R.G., Hightower, B.J. and Barwick, R.C., 'Laboratory Identification of the Hemoglobins', Lab Management, 1981; August: 29-43.
- Center for Disease Control, Laboratory Methods for Detecting Hemoglobinopathies, U.S. Department of Health and Human Services/Public Health Service, 1984.
- Schneider, R.G., 'Methods for Detection of Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies in the Routine Clinical Laboratory', CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1978.
- Schneider, R.G., Hightower, B., Hosty, T.S., Ryder, H., Tomlin, G., Atkins, R., Brimhall, B., and Jones, R.T., 'Abnormal Hemoglobins in a Quarter Million People', Blood, 1976; 48(5) : 629-637.
- Huisman, T.H.J. and Schroeder, W.A., 'New Aspects of the Structure, Function and Synthesis of Hemoglobins'. CRC Press, Cleveland, 1971.

8. Schmidt, R.M., Huisman, T.H.J.,and Lehmann, H., The Detection of Hemoglobinopathies. CRC Press, Cleveland, 1974.
9. Weatherall, D.J. and Clegg, J.B., The Thalassemia Syndromes, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972.
10. Lehman, H. and Huntsman, R.G., Man's Haemoglobins, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1974.

PRINCIPIO

Il kit Alkaline Hb-10 SAS-MX è stato formulato per la separazione delle emoglobine umane mediante elettroforesi in gel di agarosio.

Le emoglobine (Hb) sono un gruppo di proteine la cui funzione principale è trasportare l'ossigeno dai polmoni ai tessuti e l'anidride carbonica in direzione opposta. Sono costituite da catene di polipeptidi chiamate globine, e gruppi eme di protoporfirina di ferro.

Una sequenza specifica di amminoacidi costituisce ciascuna delle quattro catene polipeptidiche. Ogni molecola di emoglobina fisiologica contiene una coppia di catene alfa e una di catene non-alfa. Nell'emoglobina di un adulto normale (HbA), le catene non-alfa sono definite catene beta.

Le catene non-alfa dell'emoglobina fetale sono definite catene gamma. Una frazione minore di emoglobina (3%) chiamata HbA₂ contiene catene alfa e delta. Nell'embrione si sono formate altre due catene.

L'emoglobina principale negli eritrociti dell'adulto normale è l'HbA; vi sono anche modeste quantità di HbA₂ e di HbF. Inoltre, si conoscono attualmente più di 400 emoglobine mutanti, alcune delle quali possono causare effetti clinici gravi, specialmente nello stato omozigote o in combinazione con un'altra emoglobina anomala. Wintrobe¹ suddivide le anomalie della sintesi dell'emoglobina in tre gruppi.

- (1) Produzione di una molecola proteica anomala (p.es. anemia drepanocitica).
- (2) Riduzione della quantità della normale sintesi proteica (p.es. talassemia).
- (3) Anomalie dello sviluppo (p.es. persistenza ereditaria di emoglobina fetale - HPFH).

Le due emoglobine mutanti più comunemente riscontrate sono l'HbS e l'HbC. Le Hb Lepore, HbE, HbG-Philadelphia, HbD-Los Angeles, e HbO-Arab si riscontrano meno frequentemente².

L'elettroforesi è generalmente considerata il miglior metodo per distinguere ed identificare le emoglobinopatie. Il protocollo per l'elettroforesi emoglobinica comprende l'uso di due sistemi utilizzati in fasi diverse^{3,8}. L'elettroforesi iniziale viene effettuata in tamponi alcalini. Tuttavia, a causa della somiglianza elettroforetica di molte emoglobine strutturalmente diverse, la valutazione deve essere integrata da elettroforesi a tampone acido al fine di misurare una proprietà diversa dalla carica elettrica.

Tale metodo si basa sulle complesse interazioni dell'emoglobina con un tampone elettroforetico alcalino e il supporto di agarosio. La procedura Alkaline Hb-10 SAS-MX è un semplice procedimento che richiede quantità ridotte di emolisato per fornire prove complementari (insieme ai risultati dell'analisi SAS-MX Acid Hb-10) della presenza di HbS, HbC e HbF e di molte altre emoglobine anomale.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti devono essere utilizzati esclusivamente per diagnosi in vitro. Non ingerire né pipettare con la bocca i componenti del kit. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti.

COMPOSIZIONE**1. Gel SAS-MX Alkaline Hb**

Contiene agarosio in un tampone tris / EDTA / glicina con sodio azide come conservante. Il gel è pronto all'uso nella confezione fornita.

2. Tampone concentrato tris / borato

Contiene un tampone concentrato tris / borato con sodio azide e tiomersale come conservanti. Diluire l'intero contenuto del flacone con 1 litro di acqua distillata e miscelare bene.

3. Colorante concentrato Acido Blu

Contiene colorante concentrato Acido Blu. Diluire l'intero contenuto del flacone a 700ml con acqua distillata. Agitare "overnight" e filtrare prima dell'uso. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

4. Agente lisante per emoglobina

Contiene Triton X-100 in acqua distillata con cianuro di potassio e tiomersale come conservanti. L'Agente lisante è pronto all'uso.

5. Soluzione decolorante concentrata

Contiene soluzione decolorante concentrata. Diluire l'intero flacone a 2 litri con acqua distillata. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

6. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene inoltre un foglio procedurale, blotter A e C, mascherine per l'applicazione del campione, in quantità sufficiente per 10 piastre di gel.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ**1. Gel SAS-MX Hb alcalina**

I gel devono essere conservati a 15...30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. **NON REFRIGERARE NÉ CONGELARE.** Il deterioramento del gel può essere indicato da 1) formazioni cristalline per effetto di congelamento, 2) screpolature e fessurazione per effetto di essiccamento oppure, 3) contaminazione visibile dell'agarosio causata da batteri o funghi.

2. Tampone tris / borato

Il tampone concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C.

3. Colorante Acido Blu

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. Il colorante diluito è stabile per 6 mesi a 15...30°C. Si raccomanda di gettare immediatamente il colorante utilizzato per evitare la riduzione della capacità di colorazione. Risultati insoddisfacenti della colorazione possono indicare un deterioramento.

4. Agente lisante per emoglobina

L'agente lisante deve essere conservato a 15...30°C e rimane stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Contaminazione particellare o torbidezza possono indicare deterioramento.

5. Soluzione decolorante

La soluzione decolorante concentrata deve essere conservata a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sulla bottiglia. La soluzione decolorante diluita è stabile per 6 mesi a 15...30°C. La presenza di torbidezza può indicare il deterioramento della soluzione decolorante.

MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE

Cod. N. 4063 Camera SAS-MX

Cod. 1525 Alimentatore EPS600

Cod. 5328 AA₂ Emocontrollo

Cod. 5329 ASA₂ Emocontrollo

Cod. 5330 AFSA₂ Emocontrollo

Cod. 5331 AFSC Emocontrollo

Forno di essiccazione ad aria forzata con temperature di 60...70°C

Soluzione fissativa: Mescolare 500ml di metanolo e 500ml di acqua distillata. Aggiungere 100ml di acido acetico glaciale. Mescolare bene e conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

Soluzione fisiologica (0,85% NaCl)

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Il campione di sangue raccolto con EDTA o il sangue anticoagulato con eparina rappresentano il campione da preferire. I campioni possono essere refrigerati a 2...6°C fino a 1 settimana. Per risultati ottimali, è opportuno utilizzare gli eritrociti lavati con la soluzione fisiologica per la preparazione dei lisati. Questo procedimento elimina le eventuali interferenze da proteine plasmatiche.

- Miscelare 200µL di sangue intero mescolato bene con 1000µL di soluzione fisiologica.
- Centrifugare per sedimentare gli eritrociti.
- Rimuovere 1000µL di soprannatante e gettarlo via.
- Aggiungere altri 1000µL di soluzione fisiologica e mescolare bene.
- Ripetere due volte i punti b-d.
- In seguito alla centrifugazione finale, rimuovere 1000µL di soprannatante e trattare il campione rimanente come sangue intero, o rimuovere tutto il soprannatante e trattare il campione rimanente come cellule lavate ravvicinate.

Diluire ciascun campione/controllo del paziente, con agente lisante per emoglobina, ad una concentrazione di emoglobina di 1,0-2,0 g/dL.

PROCEDURA

- Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Asciugare la superficie del gel con un blotter C e poi eliminarlo.
- Allineare la mascherina per l'applicazione del campione rispetto alle frecce presenti sul bordo del gel. Porre un blotter A sopra alla mascherina ed effettuare una leggera pressione con le dita sulle fessure per verificare il corretto contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per il passaggio 5.
- Applicare 3µl di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 5 minuti.
- Durante l'assorbimento dei campioni, collocare 30ml di tampone in ogni compartimento interno della camera SAS-MX.
- Dopo l'assorbimento del campione, asciugare leggermente la mascherina con il blotter A, conservato dal passaggio 2, quindi eliminare mascherina e blotter.
- Collocare il gel nella camera, con il lato dell'agarosio rivolto verso il basso, e allineando il segno positivo (+) ed il negativo (-) con le corrispondenti posizioni nella camera.
- Sottoporre il gel ad elettroforesi: 150 Volt per 30 minuti.
- Al termine dell'elettroforesi, essiccare il gel a 60...70°C. **NOTA:** L'essiccamento del gel non dovrebbe richiedere più di 5 minuti, in modo tale da evitare la diffusione delle bande. Se questo non è possibile, fissare il gel per 5 minuti in soluzione fissativa prima dell'asciugatura.
- Immergere il gel asciutto nella soluzione colorante per 10 minuti.

10. Decolorare il gel essiccato in 2 bagni di soluzione decolorante per 1 minuto ciascuno oppure fino ad ottenere un fondo chiaro.
11. Asciugare il gel.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Valutazione qualitativa:

La possibile identità dei tipi di emoglobina presenti nei campioni può essere determinata per mezzo di una valutazione visiva del gel completato. Gli emocontrolli forniscono un marker per l'identificazione della banda.

Valutazione quantitativa:

La percentuale relativa di ciascun tipo di emoglobina sul gel può essere determinata per densitometria del gel ottenuto a 595nm.

La figura 1 mostra la possibile identità dei tipi di emoglobina riscontrati più frequentemente.

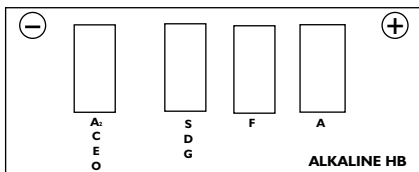


FIG. 1

La maggior parte delle varianti emoglobiniche non determinano alcun sintomo clinico distinguibile, pertanto risultano particolarmente interessanti per i ricercatori. Le varianti sono clinicamente importanti quando la loro presenza conduce a disturbi come anemia drepanocitica, sindromi talassemiche, cianosi cronica, anemie emolitiche o eritrocitosi, oppure se l'eterozigote ha una diffusione sufficiente per giustificare una consulenza genetica. Le combinazioni di HbS-S, HbS-D-Los Angeles, e HbS-O Arab generano seri disturbi di anemia drepanocitica². Diverse varianti comprendenti HbH, E-Fort Worth e Lepore determinano un quadro ematologico talassemico².

Le due emoglobine varianti di maggiore importanza in termini di frequenza e patologia sono l'HbS e l'HbC₂. L'anemia drepanocitica (HbSS) è una patologia spietata e letale. Si manifesta per la prima volta a circa 5-6 mesi di età. L'andamento clinico presenta episodi di agonia, dolore e innalzamenti della temperatura, accompagnati da anemia, spossatezza, letargia, e infarto praticamente in tutti gli organi del corpo.

L'individuo con HbCC omozigote soffre di lieve anemia emolitica, attribuita alla precipitazione o cristallizzazione di emoglobina C all'interno degli eritrociti. I casi di emoglobinopatia SC sono caratterizzati da anemia emolitica, una forma più lieve rispetto all'anemia drepanocitica.

Le talassemie sono un gruppo di emoglobinopatie caratterizzate da ipocromia e microcitosi dovute alla ridotta sintesi di una catena di globina (la α o la β) mentre la sintesi dell'altra catena procede normalmente^{9,10}. Questa sintesi squilibrata determina catene globiniche instabili. Queste precipitano nell'eritrocita, formando corpi inclusi che accorciano la durata di vita della cellula.

Nelle talassemie di tipo α , le catene α sono in numero inferiore al normale o assenti, mentre nella talassemia β il problema riguarda le catene β . Un altro disturbo quantitativo della sintesi dell'emoglobina, la persistenza di emoglobina fetale ereditaria (HPFH), rappresenta una disfunzione genetica dei meccanismi che interrompono la sintesi della catena gamma a circa quattro mesi dalla nascita, provocando una continua alta percentuale di HbF. Si tratta di una condizione meno grave rispetto alle talassemie vere e proprie; i pazienti omozigoti con persistenza di emoglobina fetale persistente hanno uno sviluppo normale, non presentano sintomi e non hanno alcuna anemia¹⁰.

Le anomalie emoglobiniche più frequenti sono:

Costituzione genetica eterozigote per l'anemia drepanocitica

È uno stato eterozigote che presenta l'HbA, l'HbS e una quantità normale di emoglobina A₂. I risultati su agar citrato presentano le emoglobine nelle posizioni migratorie emoglobina A e emoglobina S (zone).

Anemia drepanocitica

Si tratta di uno stato omozigote che mostra quasi esclusivamente emoglobina S, sebbene possa essere presente anche una modesta quantità di emoglobina F.

Anemia drepanocitica

Si tratta di uno stato eterozigote che presenta l'HbS e l'HbC.

Talassodrepanocitosi

Questa condizione presenta le emoglobine A, F, S, e A₂.

Nella talassodrepanocitosi beta zero è assente l'emoglobina A.

Nella talassodrepanocitosi beta più, l'HbA è presente in quantità ridotte.

Malattia talassemica C

Questa condizione presenta le Hb A, F e C.

Malattia da emoglobina C

Si tratta di uno stato omozigote che presenta quasi esclusivamente l'emoglobina C.

Talassemia Major

Questa condizione presenta l'HbF, la A e la A₂.

LIMITAZIONI

Alcune emoglobine anomale hanno mobilità elettroforetiche simili e devono essere differenziate mediante altre metodologie.

Ulteriori esami necessari:

1. L'elettroforesi acida delle emoglobine può essere un test di controllo necessario per la conferma delle emoglobine anomale rilevate.
2. È possibile effettuare l'analisi della catena globinica (sia acida sia alcalina) e alcuni studi strutturali al fine di identificare positivamente alcune delle emoglobine più rare.
3. La cromatografia a colonna a scambio anionico rappresenta il metodo più accurato per quantificare l'emoglobina A₂. Si raccomanda il metodo a colonna Quik Sickle-Thal di Helena BioSciences (Cod. 5334) per la quantificazione dell'emoglobina A₂ in presenza di emoglobina S, o la procedura a colonna Quik HBA₂ Beta-Thal di Helena BioSciences (Cod. 5341). La quantificazione dell'emoglobina A₂ è uno dei test diagnostici più importanti per la diagnosi del tratto beta-talassemico.
4. Livelli bassi di emoglobina F (1-10%) possono essere quantificati accuratamente mediante immunodiffusione radiale utilizzando la procedura HbF-QuiPlate di Helena BioSciences (Cod. N. 9325).

VALORI DI RIFERIMENTO

Alla nascita, la maggior parte di emoglobina negli eritrociti dell'individuo normale è emoglobina fetale, HbF. È presente anche una parte della più importante emoglobina adulta, l'HbA, e una piccola quantità di HbA₂. Al termine del primo anno di vita e in età adulta, l'emoglobina principale presente è l'HbA, di cui fino a 3.7% di HbA₂ e meno di 2% di HbF.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI**Riproducibilità**

	Entro il gel (n=10)		Tra il gel (n=100)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
HbA	45.9	1.6	45.9	1.8
HbF	37.8	1.3	38.1	1.7
HbS	14.5	3.2	14.2	4.4
HbA ₂	1.8	7.8	1.9	17.8

Linearità

La linearità del metodo è una funzione della specificazione densitometrica nonché delle prestazioni del gel. Si raccomanda ad ogni cliente di determinare la linearità del metodo sulla base del densitometro in uso nel laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Wintrobe, Maxwell M., Clinical Hematology, 6th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1967. pages 145-167.
2. Fairbanks, V.F., 'The Nomenclature and Taxonomy of Hemoglobin Variants', Diagnostic Medicine, Nov/Dec., 53-58, 1980.
3. Schneider, R.G., Hightower, B.J. and Barwick, R.C., 'Laboratory Identification of the Hemoglobins', Lab Management, 1981; August: 29-43.
4. Center for Disease Control, Laboratory Methods for Detecting Hemoglobinopathies, U.S. Department of Health and Human Services/Public Health Service, 1984.
5. Schneider, R.G., 'Methods for Detection of Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies in the Routine Clinical Laboratory', CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1978.
6. Schneider, R.G., Hightower, B., Hosty, T.S., Ryder, H., Tomlin, G., Atkins, R., Brimhall, B., and Jones, R.T., 'Abnormal Hemoglobins in a Quarter Million People', Blood, 1976; 48(5) : 629-637.
7. Huisman, T.H.J. and Schroeder, W.A., 'New Aspects of the Structure, Function and Synthesis of Hemoglobins'. CRC Press, Cleveland, 1971.
8. Schmidt, R.M., Huisman, T.H.J., and Lehmann, H., The Detection of Hemoglobinopathies. CRC Press, Cleveland, 1974.
9. Weatherall, D.J. and Clegg, J.B., The Thalassemia Syndromes, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972.
10. Lehman, H. and Huntsman, R.G., Man's Haemoglobins, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1974.

USO PREVISTO

El objetivo del kit Hb-10 alcalina SAS-MX es la separación de hemoglobinas humanas por electroforesis con gel de agarosa.

Las hemoglobinas (Hb) son un grupo de proteínas cuya principal función es transportar oxígeno desde los pulmones a los tejidos y dióxido de carbono en sentido inverso. Están formadas por cadenas de polipéptidos denominadas globinas y grupos heme de protoporfirina con hierro.

Cada una de las cuatro cadenas de polipéptidos está constituida por una secuencia específica de aminoácidos. Cada molécula de hemoglobina normal contiene un par de cadenas alfa y otro par de cadenas no alfa. En la hemoglobina normal adulta (HbA), las cadenas no alfa se denominan beta.

Las cadenas no alfa de la hemoglobina fetal se denominan gamma. Una fracción menor de hemoglobina (3%), denominada HbA₂, contiene cadenas alfa y delta. Otras dos cadenas se forman en el embrión. La hemoglobina predominante en los eritrocitos de un adulto normal es la HbA, y hay pequeñas cantidades de HbA₂ y HbF. Además, en la actualidad se conocen alrededor de 400 hemoglobinas mutantes, algunas de ellas causantes de efectos clínicos graves, especialmente en estado homocigótico o en combinación con otras hemoglobinas anormales. Wintrobe divide las anomalías de síntesis de la hemoglobina en tres grupos:

- (1) Producción de moléculas proteínicas anormales (por ejemplo, anemia falciforme).
- (2) Reducción de la cantidad de síntesis de proteínas normales (por ejemplo, talasemia).
- (3) Anomalías del desarrollo (por ejemplo, persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH)).

Las dos hemoglobinas mutantes más comúnmente observadas son HbS y HbC. Hb Lepore, HbE, HbG-Filadelfia, HbD Los Ángeles y HbO Arabia aparecen con menor frecuencia².

En general, la electroforesis está considerada el mejor método de separación e identificación de hemoglobinopatías. El protocolo de electroforesis de la hemoglobina implica la aplicación paso a paso de dos sistemas^{3,4}. La electroforesis inicial se realiza en tampones alcalinos. No obstante, debido a la similitud electroforética de muchas hemoglobinas estructuralmente diferentes, la evaluación debe complementarse con una electroforesis de tampón ácido que mide una propiedad distinta de la carga eléctrica.

Este método se basa en las interacciones complejas de la hemoglobina con un tampón electroforético alcalino y el soporte de agarosa. El procedimiento SAS-MX Alkaline Hb-10 es un método sencillo que requiere pequeñas cantidades de hemolisatos para obtener una evidencia complementaria (junto con los resultados del SAS-MX Acid Hb-10) de la presencia de HbS, HbC y HbF así como de otras varias hemoglobinas anormales.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos están destinados únicamente para diagnóstico in-vitro. No ingerir ni chupar con la boca ningún componente del kit. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

COMPOSICIÓN**1. Gel Hb alcalina SAS-MX**

Contiene agarosa en un tampón Tris –EDTA- Glicina, con azida de sodio como conservante. El gel viene envasado listo para usar.

2. Concentrado tampón de Tris-Borato.

Contiene concentrado tampón de Tris-borato con azida de sodio y tiomersal como conservantes. Disolver el contenido del frasco en 1 litro de agua destilada y mezclar bien.

3. Colorante azul ácido concentrado.

Contiene colorante concentrado azul ácido. Disolver el contenido del vial en 700ml con agua destilada. Dejar agitando durante toda la noche y filtrarlo antes del uso. Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

4. Agente lisinador de hemoglobina

Contiene Triton X-100 en agua destilada con cianuro potásico y tiomersal como conservantes. El agente lisinador viene envasado listo para usar.

5. Solución decolorante concentrada.

Contiene solución decolorante concentrada. Diluir el contenido del frasco en 2 litros con agua destilada. Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

6. Otros componentes del kit

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y suficientes plantillas de aplicación de la muestra y secantes A y C, hasta completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ**1. Gel Hb alcalina SAS-MX**

Los geles han de almacenarse a 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. NO REFRIGERAR NI CONGELAR. El deterioro del gel puede ser indicado por: 1) apariencia cristalina, indicativo de que el gel ha sido congelado, 2) agrietamiento y descamación, indicativo del resecamiento del gel, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. Concentrado tampón de Tris-Borato.

El concentrado tampón ha de almacenarse a una temperatura a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El tampón diluido permanece estable durante 2 meses a una temperatura entre 15 y 30°C.

3. Colorante azul ácido.

El colorante concentrado ha de almacenarse a 15 ...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. El colorante diluido permanece estable durante 6 meses a 15...30°C. Es aconsejable desechar inmediatamente el colorante usado para prevenir el agotamiento de su capacidad de tinción. Un mal rendimiento de tinción puede indicar deterioro.

4. Agente lisinador de hemoglobina

El agente lisinador debe guardarse a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. La aparición de contaminación con partículas o turbidez puede ser indicio de deterioro.

5. Solución decolorante

El concentrado decolorante debe guardarse a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. La solución decolorante diluida es estable durante 6 meses a 15...30°C. La aparición de turbidez puede ser indicio de deterioro de la solución decolorante.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Nº de catálogo 4063 Cámara SAS-MX

Nº de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600

no de catálogo 5328 AA₂ Hemocontrol

no de catálogo 5329 ASA₂ Hemocontrol

no de catálogo 5330 AFSA₂ Hemocontrol

no de catálogo 5331 AFSC Hemocontrol

Horno con aire a presión capaz de alcanzar 60...70°C

Solución fijadora: Mezclar 500ml de metanol y 500ml de agua destilada. Añadir 100ml de ácido acético cristalizado. Mezclar bien y guardar en un frasco herméticamente cerrado.

Solución Salina (NaCl al 0,85%)

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra de elección consistirá en sangre recién obtenida anticoagulada con EDTA o heparina. Las muestras se pueden guardar refrigeradas a una temperatura entre 2...6°C hasta una semana. Para conseguir unos resultados óptimos, se emplearán glóbulos rojos lavados con la solución salina para preparar lisatos. Así se eliminan posibles interferencias de proteínas de plasma.

- Mezclar 200µl de sangre entera bien mezclada con 1.000µl de solución salina.
- Centrifugar para sedimentar los glóbulos rojos.
- Extraer 1000µl del sobrenadante y desecharlo.
- Añadir otros 1000µl de solución salina y mezclar bien.
- Repetir los pasos b - d por dos veces.
- Tras el centrifugado final, retirar 1000µl del sobrenadante y tratar el resto de la muestra como sangre entera, o retirar todo el sobrenadante y tratar el resto de la muestra como células centrifugadas lavadas.

Diluir la muestra / controles de cada paciente hasta una concentración de hemoglobina de 1,0 –2,0 g/dl con el agente lisanador de hemoglobina.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

- Extraer el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Secar la superficie del gel con un secante C y luego desechar el secante.
- Alinear la plantilla de aplicación de la muestra con las flechas existentes en el borde del gel. Aplicar un secante A sobre la parte superior de la plantilla y frotar con un dedo a lo largo de las rejillas para asegurar un buen contacto. Retirar el secante y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 5.
- Aplicar 3µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 5 minutos.
- Mientras las muestras se absorben, verter 30ml del concentrado tampón en cada hueco interior de la cámara SAS-MX.
- Finalizada la absorción de la muestra, secar la plantilla con el secante A que se conserva del paso 2 y retirar el secante y la plantilla.
- Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia abajo, alineando los lados positivo (+) y negativo (-) con las posiciones correspondientes en la cámara.
- Realizar la electroforesis del gel: 150 voltios, 30 minutos
- Finalizada la electroforesis, secar el gel a 60...70°C. **NOTA:** Al secar el gel, no debe tardarse más de 5 minutos para evitar la difusión de las bandas. De no poderse lograr esto, poner el gel en solución fijadora durante 5 minutos antes de proceder al secado.
- Sumergir el gel seco en la solución tinción durante 10 minutos.

10. Decolorar el gel mediante 2 lavados de 1 minuto cada uno con la solución decolorante, o hasta que el fondo esté limpio.
11. Secar el gel.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Evaluación cualitativa:

La posible identidad de los tipos de hemoglobina presentes en la muestra puede determinarse mediante una evaluación visual del gel completado. Los Hemocontroles proporcionan un marcador para la identificación de bandas.

Evaluación cuantitativa:

El porcentaje relativo de la presencia en el gel de cada tipo de hemoglobina puede determinarse mediante densitometría del gel completado a 595nm.

La figura 1 muestra la posible identidad de los tipos de hemoglobina que se han encontrado con más frecuencia.

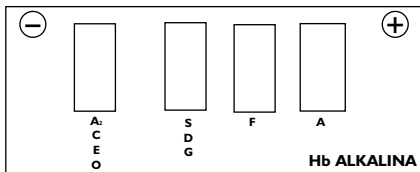


FIG. 1

La mayor parte de las variantes de hemoglobina no producen síntomas clínicos a simple vista, por ello son de interés fundamentalmente para los científicos investigadores. Las variantes son clínicamente importantes cuando su presencia lleva a trastornos falciformes, síndromes de talasemia, cianosis de larga duración, anemias hemolíticas o eritrocitosis, o si el heterocigoto tiene la suficiente prevalencia como para justificar el consejo genético. Las combinaciones de HbS-S, HbS-D-Los Ángeles, y HbS-O Arab producen trastornos falciformes graves². Algunas variantes incluyendo HbH, E-Fort Worth y Lepore provocan cuadros sanguíneos talasémicos.

Las dos variantes de hemoglobina más importantes en cuanto a frecuencia y patología son: HbS y HbC₂. La anemia falciforme (HbSS) es una enfermedad cruel y mortal. Se manifiesta por primera vez a los 5-6 meses de vida. El curso clínico presenta episodios de dolor intensísimo y aumento de la temperatura además de anemia, apatía, letargo, e infarto en prácticamente todos los órganos del cuerpo.

El individuo con HbCC homocigótica padece anemia hemolítica leve lo que se puede atribuir a la precipitación o cristalización de HbC en los eritrocitos. Los casos de enfermedad HbSC se caracterizan por anemia hemolítica que es menos grave que la anemia falciforme.

Las talasemias son un grupo de trastornos de la hemoglobina que se caracterizan por hipocromia y microcitosis debido a la síntesis reducida de una cadena de globina (α o β) mientras que la síntesis de la otra se produce normalmente^{9,10}. Esta síntesis desequilibrada da como resultado cadenas de globina poco estables. Estas se precipitan en el interior de los hematíes, formando cuerpos de inclusión que acortan la vida media de la célula.

En la talasemia alfa, las cadenas alfa disminuyen o desaparecen y en la beta, las cadenas beta están afectadas. Otro trastorno cuantitativo de la síntesis de la hemoglobina, la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH), representa un fallo genético de los mecanismos que cortan la síntesis de la cadena gamma aproximadamente a los cuatro meses después del nacimiento, lo que da como resultado un continuo porcentaje elevado de HbF. No es una enfermedad tan grave como la verdadera talasemia y las personas homocigóticas por el HPFH tienen un desarrollo normal, no tienen síntomas e incluso no padecen anemia¹⁰.

Las anomalías más comunes de la hemoglobina:

Rasgo anemia falciforme.

Es un estado heterocigótico que muestra presencia de HbA y HbS y una cantidad normal de HbA₂. Los resultados con agar citrato muestran la presencia de hemoglobinas en las posiciones (zonas) migratorias HbA y HbS.

Anemia falciforme.

Se trata de un estado homocigótico que muestra la presencia casi exclusiva de HbS, aunque también puede estar presente una pequeña cantidad de HbF.

Enfermedad falciforme-C.

Es un estado heterocigótico que muestra presencia de HbS y HbC.

Enfermedad falciforme-talasemia.

Este trastorno muestra la presencia de HbA, HbF, HbS y HbA₂.

En la enfermedad falciforme-talasemia, no hay presencia de HbA.

En la enfermedad falciforme β^+ - talasemia, HbA está presente en cantidades reducidas.

Enfermedad talasemia-C.

Este trastorno muestra presencia de HbA, HbF y HbC.

Enfermedad C.

Se trata de un estado homocigótico que muestra la presencia casi exclusiva de HbC.

Talasemia mayor

Este trastorno muestra la presencia de HbF, HbA y HbA₂.

LIMITACIONES

Algunas hemoglobinas anormales tienen movilidades electroforéticas similares y deben diferenciarse aplicando otras metodologías.

Otras pruebas adicionales necesarias son:

1. La electroforesis de Hb ácida puede ser una prueba de control necesaria para confirmar las hemoglobinas anormales detectadas.
2. Pueden ser necesarios el análisis de cadenas de globinas (tanto ácidas como alcalinas) y estudios estructurales para identificar positivamente algunas de las hemoglobinas más raras.
3. La cromatografía de columna de intercambio aniónica es el método más preciso para la cuantificación de HbA₂. Se recomiendan el método de columna Quik para talasemia falciforme de Helena BioSciences (no de catálogo 5334) para la cuantificación de HbA₂ ante la presencia de HbS, o el procedimiento de columna Quik para talasemia beta de Helena BioSciences (no de catálogo 29 5341) para HbA₂. La cuantificación de HbA₂ es una de las pruebas de diagnóstico más importantes en el diagnóstico de rasgos de talasemia β .
4. Niveles bajos de HbF (1 - 10%) se pueden cuantificar con exactitud mediante inmunodifusión radial utilizando el procedimiento HbF-QuiPlate de Helena BioSciences (no de catálogo 9325).

VALORES DE REFERENCIA

Al nacer, la mayoría de la hemoglobina en los eritrocitos de un individuo normal es hemoglobina fetal, HbF. También hay presencia de algo de la principal hemoglobina adulta, HbA, y una pequeña cantidad de HbA₂. Al término del primer año de vida y durante la vida adulta, la principal hemoglobina presente es HbA, con hasta un 3,7% de HbA₂ y menos de un 2% de HbF.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES**Reproductibilidad**

	Dentro del Gel (n=10)		Entre distintos geles (n=100)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
HbA	45.9	1.6	45.9	1.8
HbF	37.8	1.3	38.1	1.7
HbS	14.5	3.2	14.2	4.4
HbA ₂	1.8	7.8	1.9	17.8

Linealidad

La linealidad del método está en función de la especificación del densitómetro así como de las características del gel. Es aconsejable que cada cliente determine la linealidad del método basándose en el densitómetro utilizado en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wintrobe, Maxwell M., *Clinical Hematology*, 6ª Edición, Lea y Febiger, Philadelphia, 1967. páginas 145-167.
2. Fairbanks, V.F., 'The Nomenclature and Taxonomy of Hemoglobin Variants', *Diagnostic Medicine*, Nov/Dic., 53-58, 1980.
3. Schneider, R.G., Hightower, B.J. y Barwick, R.C., 'Laboratory Identification of the Hemoglobins', *Lab Management*, 1981; agosto: 29-43.
4. Centro para el control de enfermedades, prácticas de laboratorio para detectar las patías de las hemoglobinas, EE.UU. Departamento de Salud y Servicios Humanos/Servicio de Salud Pública, 1984.
5. Schneider, R.G., 'Methods for Detection of Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies in the Routine Clinical Laboratory', *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1978.
6. Schneider, R.G., Hightower, B., Hosty, T.S., Ryder, H., Tomlin, G., Atkins, R., Brimhall, B., y Jones, R.T., 'Abnormal Hemoglobins in a Quarter Million People', *Blood*, 1976; 48(5) : 629-637.
7. Huisman, T.H.J. y Schroeder, W.A., 'New Aspects of the Structure, Function and Synthesis of Hemoglobins'. CRC Press, Cleveland, 1971.
8. Schmidt, R.M., Huisman, T.H.J. y Lehmann, H., *The Detection of Hemoglobinopathies*. CRC Press, Cleveland, 1974.
9. Weatherall, D.J. y Clegg, J.B., *The Thalassemia Syndromes*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972.
10. Lehman, H. y Huntsman, R.G., *Man's Haemoglobins*, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1974.

helena | BioSciences Europe

www.helena-biosciences.com

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442

Email: info@helena-biosciences.com

