

Instructions For Use

SAS-MX Acid HB-10

Cat. No. 100700

SAS-MX Hb-10 Acide

Fiche technique

Réf. 100700

SAS-MX Säure Hb-10

Anleitung

Kat. Nr. 100700

SAS-MX Hb-10 Acida

Istruzioni per l'uso

Cod. 100700

Hb-10 Acida SAS-MX

Instrucciones de uso

No de catálogo 100700

Contents

English	1
Français	7
Deutsch	13
Italiano	19
Español	25

INTENDED PURPOSE

The SAS-MX Acid 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 frequently.²

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 acid electrophoretic buffer and the agarose support. The SAS-MX Acid Hb-10 procedure is a simple procedure requiring minute quantities of haemolysate to provide complementary evidence (along with the results from SAS-MX Alk 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 Acid Hb Gel

Contains agarose in a Citrate / Maleate buffer with sodium azide as preservative. The gel is ready for use as packaged.

2. Citrate / Maleate Buffer Concentrate

Contains a concentrated Citrate / Maleate buffer with sodium azide as preservative. Dilute the contents of the bottle to 500ml with purified water and mix well.

3. Acid Violet Stain Concentrate

Contains concentrated Acid Violet 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. Other Kit Components

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

STORAGE AND SHELF-LIFE

1. SAS-MX Acid 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. Citrate / Maleate 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 15...30°C.

3. Acid Violet 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.

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 / Destain Solution: Mix 200ml of methanol, 100ml of glacial acetic acid and 800ml of purified water. Store in a tightly stoppered bottle.

Saline solution (0.85% NaCl)

Purified water

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 0.5-1.5 g/dL with Haemoglobin Lysing Agent.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

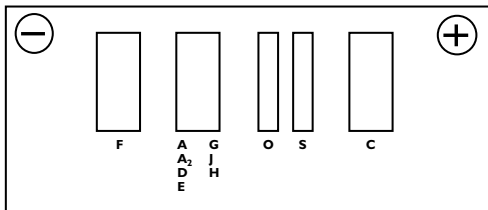
1. Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. Blot the gel surface with a blotter C, discard the blotter.
2. Align the sample application template with the arrows at the edge of the gel. Place a blotter A on top of the template and rub a finger across the slits to ensure good contact. 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 the 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 the blotter and template.
6. Position the gel in the chamber agarose side down, aligning the positive (+) and negative (-) sides with the corresponding positions in the chamber.
7. Electrophorese the gel: 50 volts, 30 minutes
8. Following electrophoresis, immerse the gel in fixative / destain solution for 5 minutes.
9. Immerse the gel in stain solution for 15 minutes.
10. Rinse the gel briefly in fixative / destain solution to remove excess stain, and dry in a drying oven with forced air at 60...70°C.
11. Destain the gel in 2 x 2 minute washes of fixative / destain solution or until the background is clear.
12. Wash the gel briefly in purified water and dry.

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.

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



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 HbC². 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 on cellulose acetate. 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 b⁰-Thalassaemia HbA is absent.

In Sickle Cell b⁺-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 hemoglobins have similar electrophoretic mobilities and must be differentiated by other methodologies.

Further testing required:

1. Globin chain analysis (both acid and alkaline) and structural studies may be necessary in order to positively identify some of the more rare haemoglobins.
2. 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 B-thalassaemia trait.
3. 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

a) **Reproducibility**

The SAS-MX Acid Hb gel is a qualitative system for the identification of haemoglobin bands. Using a control material containing Hb's A, S and A₂, the same band patterns were seen within a single gel and between different gels. No bands were missing and no additional bands were observed between applications.

b) **Sensitivity**

0.08 g/dL per band, determined as the lowest concentration of haemoglobin which was evident as a discrete band on the completed gel.

c) **Linearity**

4 g/dL per band, based upon the maximum concentration of haemoglobin per band which allows separated bands to be satisfactorily resolved from each other without protein overloading. This procedure is not intended for densitometric scanning.

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 acide 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 globine et de groupements protoporphyriques ferreux, l'hème. 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 la cause de situations 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 systèmes³⁻⁸ : 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 acide et le support d'agarose. La procédure SAS-10 Hb acide 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 alcalin) 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 acide**

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

2. **Tampon citrate / maléate concentré**

Contient un tampon concentré citrate / maléate additionné d'azide de sodium comme conservateur. Diluer le contenu du flacon dans 500ml d'eau distillée et bien mélanger.

3. **Colorant violet acide concentré**

Contient du colorant violet 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 thimérosal comme conservateurs. L'hémolysant est prêt à l'emploi.

5. **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 acide**

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 citrate / maléate**

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 violet 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.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 4063 Chambre de migration SAS-MX

Réf. 1525 Générateur EPS600

Réf. 5328 AA₂ Hémo contrôle

Réf. 5329 ASA₂ Hémo contrôle

Réf. 5330 AFSA₂ Hémo contrôle

Réf. 5331 AFSC Hémo contrôle

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

Solution fixative / décolorante : Mélanger 200ml de méthanol avec 100ml d'acide acétique glacial et 800ml d'eau distillée. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

Solution physiologique (0,85% NaCl)

Eau distillée

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 200µl de sang total mélangé avec 1000µl de solution physiologique.
- Centrifuger jusqu'à sédimentation des hématies.
- Retirer 1000µl de surnageant.
- Ajouter à nouveau 1000µl de solution physiologique et mélanger.
- Répéter les étapes b à d deux fois.
- Après la dernière centrifugation, retirer 1000µl 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 0,5 et 1,5g/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 3µl 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 50 volts pendant 30 minutes.
- Une fois l'électrophorèse terminée, plonger le gel dans la solution fixative / décolorante pendant 5 minutes.
- Plonger le gel dans le colorant pendant 15 minutes.
- Rincer le gel brièvement avec la solution fixative / décolorante afin d'éliminer l'excès de colorant puis sécher le gel dans une étuve ventilée entre 60...70°C.

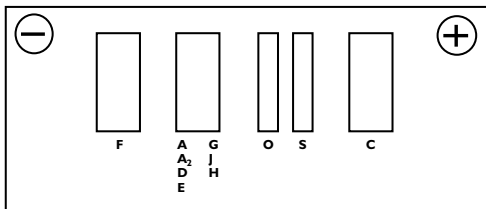
11. Décolorer le gel dans 2 bains successifs de 2 minutes de solution fixative / décolorante ou jusqu'à obtention d'un fond de bande clair.
12. Rincer rapidement sous un jet d'eau distillée et sécher.

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.

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



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'HbC². 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.

Hémoglobinose 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 β₀, l'HbA est absente.

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

Hémoglobinose C-thalassémie

Présence d'HbA, HbF et HbC.

Hémoglobinose 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. 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.
2. 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'HbBS ou la technique Helena BioScience Beta-Thal HbA₂ quick colonne (réf. 5341) sont recommandées. Le dosage de l'HbA₂ est l'un des tests les plus importants pour diagnostiquer un trait thalassémique.
3. De faibles taux d'HbF (1-10%) peuvent être quantifiés par immunodiffusion radiale selon la technique Helena BioScience HbF-Quiplate (réf. 9325)

VALEURS DE RÉFÉRENCE

À la naissance, la majeure partie de l'hémoglobine d'un sujet normal est de l'hémoglobine fœtale, 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

a) **Reproductibilité**

Le kit SAS-MX Hb acide est un système qualitatif servant à l'identification des bandes d'hémoglobines. Avec l'utilisation d'un contrôle contenant HbA, HbS et HbA₂, les mêmes bandes sont observées sur un gel et sur plusieurs gels. Aucune bande ne manque et aucune bande supplémentaire n'est observée entre les différents tests.

b) **Sensibilité**

La méthode est sensible à partir 0,08g/dl par bande, concentration la plus faible qui est mise en évidence par une fine bande une fois le gel terminé.

c) **Linéarité**

La concentration maximale d'hémoglobine par bande permettant d'assurer une bonne séparation et une non-superposition des protéines est de 4g/dl. Cette technique n'est pas destinée à une intégration densitométrique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wintrobe, Maxwell M., Clinical Hematology, 6e édition, Lea and Febiger, Philadelphia, 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., and 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., Philadelphia, 1974.

ANWENDUNGSBEREICH

Der SAS-MX Säure 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 Erwachsenenähmoglobin (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 pathologischem 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. vererbliches Weiterbestehen von fetalem Hämoglobin).

Die beiden häufigsten Hämoglobinmutationen sind HbS und HbC. Hb Lepore, HbE, HbG-Philadelphia, HbD-Los Angeles und HbO-Arab werden seltener beobachtet².

Die Elektrophorese gilt als die beste Methode zur Trennung und Identifizierung von Hämoglobinopathien. Das Protokoll zur Hämoglobin-Elektrophorese beinhaltet die stufenweise Verwendung zweier Systeme^{3,8}. 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 elektrophoretischen Puffer unter Mithilfe von Agarose. Das SAS-MX Säure Hb-10 Verfahren (neben den Ergebnissen der SAS-MX alkalischen Hb-10 Analyse) ist ein einfaches Verfahren, bei dem geringste Mengen von Hämolyt 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 Säure Hb Gel

Enthält Agarose in einem Citrat-Maleat-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.

2. Citrat-Maleat-Puffer Konzentrat

Enthält einen konzentrierten Citrat-Maleat-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 500ml verdünnen. Gut schütteln.

3. "Saures-Violett" Farbstoffkonzentrat

Enthält konzentrierten "Saures-Violett" Farbstoff. 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 Konservierungsstoffe. Das lysierende Reagenz ist gebrauchsfertig verpackt.

5. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung und genügend Probenauftragsschablonen und Blotter A und C zur Herstellung von 10 Gelen.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-MX Säure 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. Citrat-Maleat-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-Violett" 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. Eine schlechte Färbeleistung kann auf eine Verschlechterung der Färbelösung 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.

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

Fixativ- / Entfärbelösung: 200ml Methanol, 100ml Eisessig und 800ml dest. Wasser mischen. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

Kochsalzlösung (0,85% NaCl)

Dest. Wasser

PROBENENTNAHME 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 durchmischtes 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 0,5 - 1,5g/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 Probe einwirkt, 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: 50 Volt, 30 Minuten
8. Nach der Elektrophorese das Gel 5 Minuten in Fixativ- / Entfärbelösung tauchen.

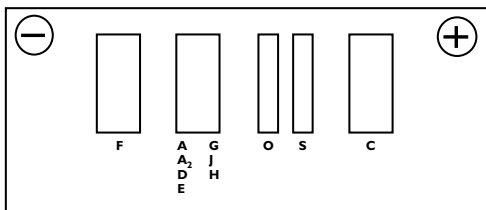
9. Das Gel 15 Minuten in die Färbelösung tauchen.
10. Das Gel in Fixativ- / Entfärbelösung kurz abspülen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. In einem Trockenschrank mit Umluft bei 60...70°C trocknen.
11. Das Gel zweimal für je 2 Minuten in der Fixativ- / Entfärbelösung entfärben oder bis der Gel-Hintergrund klar ist.
12. Gel kurz mit dest. Wasser abspülen und trocknen.

INTERPRETATION 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.

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



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 HbCC 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 auf dem Celluloseacetat. 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-b + -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 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 unterschieden werden.

Weitere notwendige Untersuchungen:

1. Sowohl die saure als auch die alkalische Globinkettenanalyse und Strukturstudien können zur Identifikation einiger der selteneren Hämoglobine notwendig sein.
2. Anionen-Wechselsäulenchromatographie ist die präziseste Methode zur quantitativen Bestimmung von HbA₂. Die Helena BioSciences Sickel-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-Thalassämiemerkmalen.
3. 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 Erwachsenenhäemoglobins, 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

a) Reproduzierbarkeit

Das SAS-MX Säure Hb Gel ist ein qualitatives System zur Identifizierung von Hämoglobinbanden. Bei Einsatz von Kontrollmaterial, das die Hämoglobine HbA, S und A₂ enthielt, wurden die gleichen Bandenmuster innerhalb des einzelnen und zwischen den verschiedenen Gelen beobachtet. Zwischen den Auftragungen fehlten keine Bande und es wurden auch keine zusätzlichen Bande beobachtet.

b) Empfindlichkeit

Die Sensitivität beträgt 0,08g/dl pro Bande und wurde durch die niedrigste Hämoglobin-Konzentration ermittelt, die als eine diskrete Bande auf dem fertigen Gel zu sehen war.

c) Linearität

Die Linearität beträgt 4g/dl. Sie basiert auf der maximalen Hämoglobinkonzentration pro Band, die es erlaubt, getrennte Bande zufrieden stellend ohne Eiweißüberladung voneinander zu isolieren. Diese Methode ist nicht zum densitometrischen Scannen bestimmt.

LITERATUR

1. Wintrobe, Maxwell M., Clinical Hematology, 6th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1967. Seite 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.

PRINCIPIO

Il kit SAS-MX Hb-10 acida è stato formulato per l'identificazione dell'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 (ad 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 acido e il supporto di agarosio. La procedura SAS-MX Hb-10 acida è un semplice procedimento che richiede quantità ridotte di emolisato per fornire prove complementari (insieme ai risultati dell'analisi SAS-MX Hb-10 Alk) 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. Riferirsi alle schede tecniche e dati di sicurezza per le avvertenze sui componenti dei Kit.

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

Contengono agarosio in un tampone Citrato / Maleato con sodio azide come conservante. Il gel è pronto all'uso nella confezione fornita.

2. Tampone Citrato / Maleato concentrato

Contiene tampone concentrato di Citrato / Maleato con sodio azide come conservante. Diluire il contenuto del flacone con 500ml di acqua distillata e miscelare bene.

3. Colorante acido viola concentrato

Contiene colorante acido viola concentrato. Diluire l'intero contenuto del flacone con 700ml di 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 così come viene fornito.

5. 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 acido Hb SAS-MX

Il gel deve essere conservato a 15...30°C, ed è stabile 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 Citrato / Maleato

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

3. Colorante acido viola

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta. 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 della soluzione colorante.

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 con presenza di particelle o torbidità possono indicare il deterioramento.

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

Cod. 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 / decolorante: Mescolare 200ml di metanolo, 100ml di acido acetico glaciale e 800ml di acqua distillata. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

Soluzione fisiologica (0,85% NaCl)

Acqua distillata

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.

- a) Miscelare 200µL di sangue intero mescolato bene con 1000µL di soluzione fisiologica.
- b) Centrifugare per sedimentare gli eritrociti.
- c) Rimuovere 1000µL di soprannatante e gettarlo via.
- d) Aggiungere altri 1000µL di soluzione fisiologica e mescolare bene.
- e) Ripetere due volte i punti b-d.
- f) 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, in una concentrazione di emoglobina di 0,5-1,5 g/dL.

PROCEDURA

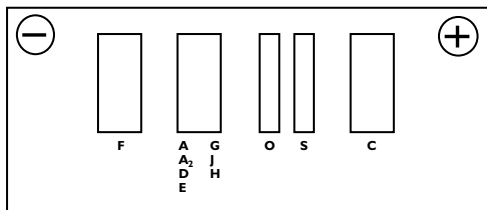
1. Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Asciugare la superficie del gel con un blotter C e poi eliminarlo.
2. Applicare la mascherina di semina allineandola con i punti laterali del gel. Porre un blotter A sopra alla mascherina ed effettuare una leggera pressione con le dita sulle fessure per verificare il corretto contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per il passaggio 5.
3. Applicare 3µl di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 5 minuti.
4. Durante l'assorbimento dei campioni, collocare 30ml di tampone in ogni compartimento interno della camera di migrazione.
5. Dopo l'assorbimento del campione, asciugare la mascherina con il blotter A, conservato dal passaggio 2, quindi eliminare mascherina e blotter.
6. Posizionare il gel nella camera, con il lato dell'agarosio rivolto verso il basso, allineando i lati positivi (+) e negativi (-) alle posizioni corrispondenti nella camera.
7. Sottoporre il gel ad elettroforesi a 50 volt per 30 minuti
8. Al termine dell'elettroforesi, immergere il gel in soluzione fissativa / decolorante per 5 minuti.
9. Immergere il gel nella soluzione colorante per 15 minuti.
10. Sciacquare brevemente il gel nella soluzione fissativa / decolorante per rimuovere il colorante in eccesso, e asciugare in un forno di essiccazione ad aria forzata a 60...70°C.
11. Decolorare il gel in 2 bagni di soluzione fissativa / decolorante per 2 minuti ciascuno, fino ad ottenere un fondo chiaro.
12. Sciacquare velocemente il gel con acqua distillata e asciugare.

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.

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



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, spassatezza, 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 su acetato di cellulosa. 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. 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.
2. 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-tallemico.
3. Livelli bassi di emoglobina F (1-10%) possono essere quantificati accuratamente mediante immunodiffusione radiale utilizzando la procedura HbF-QuiPlate di Helena BioSciences (Cod. 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

a) Riproducibilità

Il gel acido Hb SAS-MX è un sistema qualitativo per identificare bande di emoglobina. Utilizzando un materiale di controllo contenente le HbA, S e A₂, gli stessi modelli delle bande sono stati riscontrati in un unico gel e fra gel diversi. Non è stata rilevata la mancanza di alcuna banda e non si sono osservate bande aggiuntive fra le applicazioni.

b) Sensibilità

0,08 g/dL per banda, determinati come la concentrazione più bassa di emoglobina presente come banda discreta sul gel completato.

c) Linearità

4 g/dL per banda sulla base della concentrazione massima di emoglobina per banda che consente alle bande separate di essere distinte in modo soddisfacente senza sovraccarico di proteine. Questa procedura non è finalizzata alla scansione densitometrica.

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 kit Hb-10 ácida SAS-MX tiene por objeto 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 hemogrupos de protoporfirina de 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 homocigoso o en combinación con otras hemoglobinas anormales. Wintrobe¹ divide las anomalías de síntesis de la hemoglobina en tres grupos:

1. Producción de moléculas proteicas anormales (por ejemplo, anemia falciforme).
2. Reducción de la cantidad de síntesis de proteínas normales (por ejemplo, talasemia).
3. Desarrollo de anomalías (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^{3,8}. 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 ácido y el soporte de agarosa. El procedimiento Alcalino Hb-12 de SAS-10 es un método sencillo que requiere pequeñas cantidades de hemolisatos para obtener una evidencia complementaria (junto con los resultados del análisis Ácido Hb-12) de la presencia de HbS, HbC y HbF así como de otras varias hemoglobinas anormales.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos son exclusivamente para uso 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 Ácida SAS-MX**

Contiene agarosa en un tampón citrato/maleato con azida de sodio como conservante. El gel viene envasado listo para usar.

2. **Concentrado Tampón Citrato / Maleato**

Contiene concentrado tampón de Citrato / Maleato con azida de sodio como conservante. Diluir el contenido del frasco en 500ml de agua purificada y mezclar bien.

3. **Colorante Violeta Ácido**

Contiene colorante violeta ácido concentrado. Diluir el contenido del vial en 700ml de agua purificada. 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 purificada con cianuro potásico y tiomersal como conservantes. El agente lisinador viene envasado listo para usar.

5. **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 Ácida SAS-MX**

Los geles han de almacenarse a una temperatura entre 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 resecaimiento del gel, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. **Tampón Citrato / Maleato**

El concentrado tampón debe almacenarse a una temperatura entre 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...30°C.

3. **Colorante Violeta Ácido**

El colorante concentrado debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. La solución colorante preparada es estable durante 6 meses a una temperatura entre 15...30°C. Es aconsejable desechar inmediatamente el colorante usado para prevenir el agotamiento de su capacidad de coloración. Unos malos resultados de coloración pueden ser indicio de deterioro de la solución colorante.

4. **Agente lisinador de hemoglobina**

El agente lisinador debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. 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 de secado con ventilación forzada con capacidad de 60...70°C

Solución decolorante/fijadora: Mezclar 200ml de metanol, 100ml de agua purificada y 100ml de ácido acético cristalizado. Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

Solución Salina (0,85% NaCl)

Agua purificada.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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

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

Diluir la muestra / controles de cada paciente en una concentración de hemoglobina de 0,5 -1,5 g/dL con el agente lisanador de hemoglobina.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

- Sacar 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 A y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 5.
- Aplicar 3µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 5 minutos.
- Mientras la muestra es absorbida, verter aproximadamente 30ml del concentrado tampón en cada hueco interior de la cámara SAS-MX.
- Finalizada la absorción, secar la plantilla con secante A conservado 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: 50 voltios, 30 minutos
- Finalizada la electroforesis, sumergir el gel en solución decolorante/fijadora durante 5 minutos.
- Sumergir el gel seco en la solución colorante durante 15 minutos.

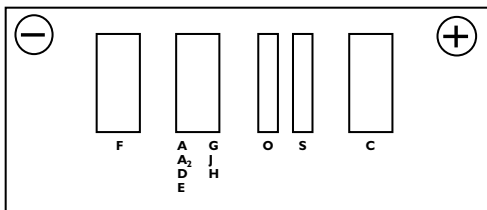
10. Aclarar el gel brevemente en solución decolorante/fijadora para retirar el exceso de colorante y secar, secando el horno de ventilación forzada a una temperatura entre 60...70°C.
11. Decolorar el gel mediante 2 lavados de 2 segundos cada uno con la solución decolorante/ fijadora, o hasta que el fondo esté limpio.
12. Lavar el gel brevemente en agua purificada y secar.

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.

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



La mayor parte de las variantes de hemoglobina no producen síntomas clínicos a simple vista, por ello son el punto de mira de 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 predomina lo suficiente 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 talasémicos².

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. En primer lugar se manifiesta a los 5 ó seis años de vida. El curso clínico presenta episodios agonizantes de dolor y aumento de la temperatura además de anemia, apatía, letargo, e infarto en prácticamente todos los órganos del cuerpo. El individuo con HbC homocigoto 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 la anemia hemolítica que es menos grave que la anemia falciforme.

Las talasemias son un grupo de trastornos de la hemoglobina que se caracterizan por la hipocromia y la microcitosis debido a la síntesis reducida de una cadena de globina (α o β) mientras que la síntesis de la otra procede normalmente de ^{9,10}. Esta síntesis desproporcionada 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, 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 anemia.

Las anomalías más comunes de la hemoglobina:

Rasgos de hematíes falciformes.

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

Anemia falciforme.

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

Enfermedad por hematíes falciformes tipo C.

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

Enfermedad por talasemia falciforme.

Esta condición muestra la presencia de HbA, HbF, HbS y HbA₂.

En la talasemia falciforme b₀, no hay presencia de HbA.

En la talasemia falciforme b₊, HbA está presente en cantidades reducidas.

Enfermedad por talasemia tipo C.

Esta condición muestra presencia de HbA, HbF y HbC.

Enfermedad tipo C.

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

Talasemia principal.

Esta condición 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. El análisis de cadenas de globinas (tanto ácidas como alcalinas) y estudios estructurales pueden ser necesarios para identificar positivamente algunas de las hemoglobinas más raras.
2. La cromatografía de columna de permutación 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 b.
3. 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

a) **Reproductibilidad.**

El gel Hb Ácida SAS-MX Acid es un sistema cuantitativo para la identificación de bandas de hemoglobina. Al utilizar material de control que contienen Hb's A, S y A₂, se observaron los mismos modelos de bandas en un mismo gel y en diferentes geles. Estaban todas las bandas y no se observaron bandas adicionales entre las aplicaciones.

b) **Sensibilidad.**

0.08g/dL por banda, determinadas como la concentración más baja de hemoglobina evidente como una banda discreta en el gel completado.

c) **Linealidad.**

4g/dL por banda, basado en la concentración máxima de hemoglobina por banda, lo que permite distinguir de forma satisfactoria diferentes bandas sin sobrecarga de proteína. Este procedimiento no está pensado para realizar escáner densiométrico.

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

