

**APLICACIÓN**

Los reactivos de hemoglobina fetal de Sigma-Aldrich están diseñados para la determinación semicuantitativa de la elución ácida de la hemoglobina fetal en extensiones de sangre. Los reactivos de tinción de la hemoglobina fetal son "para uso diagnóstico *in vitro*."

Ya en 1864, Korber¹ descubrió que la hemoglobina del feto era más resistente a la desnaturalización alcalina que la de los adultos. Los avances en las técnicas de aislamiento y caracterización de proteínas han propiciado el descubrimiento de la existencia de varias propiedades distintivas que hacen posible diferenciar la hemoglobina fetal de la adulta. Entre ellas, se encuentra la resistencia de la hemoglobina fetal (hemoglobina F) a la elución ácida. Cuando las extensiones de sangre se sumergen en tampón ácido, por ejemplo, la hemoglobina adulta se eluye de los eritrocitos, pero la hemoglobina fetal, no. Si las extensiones de sangre se tratan de esta manera y luego se tiñen, los eritrocitos con hemoglobina F adquirirán la tinción, mientras que aquellos que contienen sólo hemoglobina adulta aparecerán como "fantasmas".

La técnica de portaobjetos para la demostración de la hemoglobina fetal en relación con su resistencia a la elución ácida, fue propuesta por primera vez por Kleihauer y cols.², y más tarde fue modificada por Shepard y cols.³ El procedimiento de Sigma mejora aún más este enfoque según lo describen Oski y Naiman⁴.

Las estimaciones de la hemoglobina fetal algunas veces se hacen para determinar posibles hemorragias en el recién nacido, especialmente en casos en los que existen signos de sangrado rectal. El ensayo de hemoglobina F también se aplica a adultos como ayuda en el diagnóstico de ciertos tipos de anemia. Por ejemplo, en pacientes con talasemia mayor la hemoglobina fetal se encuentra en un 10–90 %. Asimismo, generalmente se observan pequeños aumentos de pigmento de sangre fetal en pacientes con drepanocitosis.

En los casos de incompatibilidad de Rh, cada vez es más común suprimir las reacciones inmunes a los hematíes que pasan a la circulación materna desde el feto. La cantidad de gammaglobulina específica que contiene el anti-Rh(D) a administrar, se calcula evaluando la magnitud de las hemorragias feto-maternas⁵.

Según la técnica descrita, las extensiones de sangre, debidamente secas y fijadas, se sumergen en un tampón citrato de pH 3,3 a 37 °C. La hemoglobina adulta A (HbA) se disuelve fuera de las células, mientras que la hemoglobina fetal (HbF), que es ácidoresistente, permanece en el interior de las células y puede ser teñida para proceder al examen microscópico.

REACTIVOS

CONCENTRADO DE TAMPÓN FOSFATO-CITRATO, número de catálogo 285-1
Citrato sódico, 0,7 mol/l, y fosfato sódico, 0,6 mol/l.

SOLUCIÓN DE HEMATOXILINA ÁCIDA, número de catálogo 285-2
Hematoxilina certificada, 1 g/l, sulfato de amonio y aluminio, yodato sódico y estabilizantes, pH 3,3.

SOLUCIÓN DE EOSINA B, número de catálogo 285-3
Eosina B, 0,1 %, solución acuosa. Azida sódica, 0,1 %, como conservante. Fijador de etanol, número de catálogo 285-8 (80 % v/v, alcohol etílico).

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacenar el concentrado de tampón fosfato-citrato en el frigorífico (2–8 °C). Desechar si el crecimiento microbiano es evidente.

Almacenar la solución de tampón fosfato-citrato en el frigorífico (2–8 °C). Estable durante 2 semanas. Usar una alícuota fresca cada día. Desechar si el crecimiento microbiano es evidente.

Almacenar las soluciones de hematoxilina y eosina B a temperatura ambiente (18–26 °C). Las soluciones se pueden reutilizar si se almacenan en frascos de tinción herméticos con luz atenuada.

Almacenar el fijador de etanol a temperatura ambiente. Almacenar herméticamente cerrado y como líquido inflamable. La solución puede utilizarse varias veces, pero debe desecharse si la fijación no es la adecuada.

DETERIORO:

Desechar la solución de hematoxilina ácida cuando el tiempo requerido para obtener la tinción adecuada supere en más de 8 minutos el tiempo recomendado.

PREPARACIÓN:

La SOLUCIÓN DE TAMPÓN FOSFATO-CITRATO se prepara diluyendo 1 parte de concentrado de tampón fosfato-citrato en 9 partes de agua.

Las soluciones de hematoxilina ácida y eosina B, y el fijador de etanol se suministran listos para su uso.

PRECAUCIONES:

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Deshacerse de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales. Consultar la Hoja de datos de seguridad del material para obtener información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

Declaración de riesgos y seguridad (EE.UU.)

El concentrado de tampón fosfato-citrato es IRRITANTE. Riesgo de daño grave para los ojos. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro.

La solución de hematoxilina ácida es TÓXICA. Tóxica en caso de ingestión. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Usar ropa y guantes protectores adecuados.

La solución de eosina B es PERJUDICIAL. Perjudicial en caso de ingestión. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre para formar compuestos altamente explosivos.

La solución de EDTA es PERJUDICIAL. Perjudicial por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Llevar ropa protectora adecuada.

El fijador de etanol es INFLAMABLE e IRRITANTE. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada. Órganos a los que afecta: nervios e hígado.

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.) (Precaución: sustancias en proceso de prueba)

El concentrado de tampón fosfato-citrato es IRRITANTE. Riesgo de daño grave para los ojos. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro.

La solución de hematoxilina ácida es PERJUDICIAL. Perjudicial en caso de ingestión. La solución de eosina B es PERJUDICIAL. Perjudicial en caso de ingestión.

El fijador de etanol es ALTAMENTE INFLAMABLE. Altamente inflamable. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejado de las llamas – no fumar.

La solución de EDTA es PERJUDICIAL. Perjudicial por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Llevar ropa protectora adecuada.

PROCEDIMIENTO**RECOGIDA DE LAS MUESTRAS:**

Se recomienda que la recogida de las muestras se lleve a cabo de acuerdo con las directrices del documento M29-A2 de la NCCLS. Ningún método de prueba puede garantizar la completa seguridad de que las muestras de sangre o tejido no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

Puede utilizarse sangre capilar o venosa. La sangre capilar puede ser transferida directamente a un portaobjetos de microscopio limpio. La sangre venosa debe ponerse en un tubo con EDTA u oxalato. A efectos prácticos, utilice 1–2 gotas de solución de EDTA al 2 %, número de catálogo 285-4, por mililitro de sangre (1 gota = 1 mg). Aunque se ha informado de que las mezclas sangre-EDTA son satisfactorias si se utilizan dentro de las 2 semanas cuando están en el frigorífico⁶, otros estudios han concluido que tales mezclas deben ser analizadas rápidamente⁶. Las extensiones deben prepararse dentro de las 24 horas de la recogida de sangre en oxalato⁷. Con las muestras de recién nacido, se recomienda diluir la sangre con 0,85 % de solución salina, dado que tales muestras tienen un alto contenido de HbF. Las extensiones de sangre no son estables y deben ser analizadas inmediatamente después de la preparación.

MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

Microscopio
Portaobjetos de microscopio, cubreobjetos
Gradilla de tinción/vasos de Coplin
Baño de agua a 37 °C
Fijador de etanol, número de catálogo 285-8 (80 % v/v, alcohol etílico)

NOTAS:

Para fines de control de calidad, se recomienda incluir sangre de adulto normal (HbA) y de recién nacido o lactante (HbF) en todas las series de pruebas. Barr y Shafer⁸ informan de que los portaobjetos de control positivo fijados, procedentes de sangre del cordón umbilical en EDTA, pueden ser conservados hasta 1 año a –20 °C, en una caja de cartón hermética. Sin embargo, los controles negativos de EDTA no se eluyen completamente tras haber sido almacenados durante más de 2 meses a –20 °C. Estos investigadores sugieren la preparación de extensiones positivas y negativas en el mismo portaobjetos, para poder obtener contrastes claros y rápidos como referencia para la lectura de los mismos.

Rangos normales⁹

Edad	Hemoglobina fetal (%)
Al nacimiento	50–90
< 2 años	0–4
> 2 años	0–2

Se observan valores excesivos en:

Anemia aplásica^{3,9}
Mielosis eritrémica⁹
Enfermedad por hemoglobina H⁹
Persistencia de hemoglobina F hereditaria^{3,10}
Anemia esferocítica hereditaria⁹
Talasemia mayor (40–90 % de hemoglobina fetal)³
Talasemia menor (5–10 % de hemoglobina fetal)^{3,9}
Anemia drepanocítica^{3,9}

Los datos obtenidos mediante este procedimiento sólo sirven como ayuda en el diagnóstico y deben ser revisados junto con otras pruebas clínicas o información de diagnóstico.

PROCEDIMIENTO:

1. La solución de tampón fosfato-citrato debe calentarse a 37 °C en un vaso de Coplin o en un plato de tinción.
 2. Utilizando portaobjetos de microscopio limpios y etiquetados, preparar extensiones de sangre finas. Preparar portaobjetos de CONTROL utilizando sangre HbF positiva (cordón umbilical) y sangre adulta normal. Secar al aire durante unos 10 minutos.
 3. Fijar los portaobjetos sumergiendo fijador de etanol, número de catálogo 285-8, durante 5 minutos, aclarar bien con agua del grifo y secar al aire.
 4. Sumergir los portaobjetos de PRUEBA y de CONTROL en solución de tampón fosfato-citrato precalentada a 37 °C durante 5 minutos. Agitar tras 1 y 3 minutos de inmersión. El grado de agitación puede variarse para conseguir los resultados deseados. Aclarar bien con agua destilada y secar al aire **completamente** para evitar artefactos de tinción.
 5. Teñir los portaobjetos durante 3 minutos en solución de hematoxilina ácida, número de catálogo 285-2. Aclarar los portaobjetos con agua destilada y sacudir el exceso de agua.
 6. Contrateñir los portaobjetos durante 4 minutos en solución de eosina B, número de catálogo 285-3, al 0,1 %. Aclarar bien con agua destilada y secar al aire.
 7. Colocar cubreobjetos **secos** en el portaobjetos y examinar mediante inmersión de aceite (1000X). La ausencia de HbF se evidencia mediante la presencia de células fantasma, mientras que la HbF retenida hace que las células aparezcan de color rojo brillante. **No** aplicar aceite directamente en el portaobjetos.
- NOTA: Puede utilizarse una ampliación de 400X, pero el campo resultante será más grande y más difícil de contar.

Sigma-Aldrich, Inc. garantiza que sus productos concuerdan con la información contenida en ésta y otras publicaciones de Sigma-Aldrich. El comprador debe determinar la idoneidad de los productos para su uso particular. Es posible que deban aplicarse términos y condiciones adicionales. En el reverso de la factura o del albarán se incluyen los términos adicionales y las condiciones de venta.

Procedimiento número 285

Revisión anterior: 2003-10

Revisión: 2005-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham TW20 9BD Reino Unido

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La proporción de eritrocitos con hemoglobina fetal puede estimarse de diferentes formas. Al estudiar la sangre materna para ver las células con contenido de HbF, Oski y Naiman⁴ recomendaron lo siguiente:

1. Contar el número total de eritrocitos en 5 campos y determinar el promedio por campo.
2. Seguidamente, contar el número de eritrocitos con HbF que hayan quedado profundamente teñidos en unos 30 campos, y determinar el promedio por campo.
3. Calcular el porcentaje de eritrocitos con HbF basándose en el número total de eritrocitos por campo.

Los resultados se informan como porcentaje de HbF presente.

Estudios de sensibilidad: Según Oski y Naiman⁴, este método es capaz de detectar valores tan bajos como 0,1 ml de sangre fetal en la circulación materna.

Estudios de reproducibilidad: Utilizando una serie de muestras de sangre fresca, se prepararon portaobjetos replicados de cada una de ellas, que se trataron con diferentes lotes de tinción en ocasiones distintas⁶. El examen microscópico reveló resultados esencialmente idénticos con cada muestra de sangre.

Estudios de correlación: Se prepararon mezclas de sangre del cordón umbilical y sangre adulta compatible, para producir muestras con concentraciones de HbF entre el 26–66 %⁶. Las mezclas de sangre se examinaron mediante la técnica descrita y se analizaron químicamente mediante el método de desnaturalización alcalina¹⁰. Los valores en porcentaje de HbF mostraron una diferencia media de aproximadamente un 7 % entre métodos.

Si los resultados observados varían de los esperados, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Sigma-Aldrich.

REFERENCIAS

1. Korber E: Cited by H Bischoff. Inaugural Dissertations. Dorpat Ztschr Exp Med 48:472, 1926
2. Kleihauer E, Braun H, Betke K: Demonstration von fetalem hamoglobin in der erythrocyten eines blutausstrichs. Klin Wochenschr 35:637, 1957
3. Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp 110:293, 1962
4. Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp 62–63
5. Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp 320–322
6. Data obtained by Sigma-Aldrich
7. Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol 40:487, 1963
8. Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol 42:54, 1976
9. Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511–512
10. Bauer JD, Ackermann PG, Toro G: Bray's Clinical Laboratory Methods, 7th ed. Mosby, St. Louis (MO), 1968. pp 170–171

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 EE.UU. +1 314 771 5765

Servicio Técnico: a cobro revertido al +1 314 771 3122

o por correo electrónico a clintech@sial.com

Para realizar pedidos: a cobro revertido al +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemania 49-7329-970