

POUŽITÍ

Reagencie fetální hemoglobin Sigma-Aldrich jsou určeny ke kyselému eluci, semikvantitativní determinaci fetálního hemoglobinu v krevních nátěrech. Reagencie fetálního hemoglobinu jsou určeny k "diagnostice in vitro."

Již v roce 1864 rozpoznal Korber,¹ že hemoglobin plodu je více rezistentní na alkalickou denaturaci než hemoglobin dospělého. Pokročilé techniky izolace proteinu a charakterizace vedly k objevu, že existuje mnoho vlastností, které umožňují rozlišit fetální hemoglobin od dospělého. Mezi jinými je to rezistence hemoglobinu (hemoglobin F) vůči alkalické eluci. Například, když se krevní nátěry ponoří do kyselého pufru, hemoglobin dospělého se vyluhuje z erythrocytů, avšak fetální hemoglobin nikoliv. Jsou-li krevní nátěry upraveny tímto způsobem a následně barveny, erythrocyty mající hemoglobin F se zabarví, zatímco erythrocyty pouze s hemoglobinem dospělého se zobrazí pouze jako "duch".

Technika podložních skel pro demonstraci fetálního hemoglobinu s využitím jeho rezistence na alkalickou eluci byla původně navržena Kleihauer a kol.,² a později modifikována Shepardem a kol.³ Postup Sigma představuje další vylepšený postup, popsáný Oskí a Naimanem.⁴

Hodnocení fetálního hemoglobinu se někdy provádí k determinaci možného krvácení u novorozenců, zejména v případech s podezřením na rektální krvácení. Test s hemoglobinem F se též používá u dospělých jako pomůcka v diagnózách určitých typů anemií. Například, z 10-90 % se fetální hemoglobin vyskytl u pacientů s thalassemia major. Navíc byl pozorován malý nárůst fetálního krevního barviva u pacientů se srpkovitou chudokrevností.

Ještě více je to obvyklé u případu nekompatibility Rh při potlačování imunních reakcí na červených krvinkách dodaných z plodu do oběhu matky. Množství specifického pomocného gama globulinu, obsahujícího anti Rh(D) se vypočítalo odhadem množství krvácení plodu a matky.⁵

V souladu s popsanou technikou se krevní nátěry, řádně usušené a fixované, ponořují do citrátového pufru pH 3,3 při 37 °C. Hemoglobin dospělého A (HbA) se vyplaví z buněk, zatímco fetální hemoglobin (HbF) rezistentní na kyselost, zůstane uvnitř buněk a lze ho barvit a zkoumat pod mikroskopem.

REAGENCIE

KONCENTRÁT CITRÁT FOSFÁTOVÉHO PUFRU, katalogové č. 285-1

Citrát sodný, 0,7 mol/L a fosforečnan sodný, 0,6 mol/L.

ROZTOK KYSELÉHO HEMATOXYLINU, katalogové č. 285-2

Hematoxylin, ověřený, 1 g/l, jodičnan sodný, síran hlinito-amonný a stabilizátory, pH 3,3.

ROZTOK EOSIN B, katalogové č. 285-3

Eosin B, 0,1 %, vodný roztok. Azid sodný, 0,1 %, přidáván jako konzervační činidlo. Fixativum ethanol, katalogové č. 285-8 (80 % v/v ethylalkohol)

ULOŽENÍ A STABILITA:

Koncentrát citrát fosfátového pufru skladujte v lednici (2-8 °C). Zlikvidujte, objeví-li se mikrobiální znečištění.

Roztok citrát fosfátového pufru skladujte v lednici (2-8 °C). Stabilní po dobu 2 týdnů. Použijte denní dávku vždy čerstvou. Zlikvidujte, objeví-li se mikrobiální znečištění.

Skladujte roztok kyselého hematoxylinu a roztok Eosin B při pokojové teplotě (18-26 °C). Roztoky lze používat opakovaně, je však třeba je uchovávat v pevně uzavřených barvicích nádobách, chráněné před světlem.

Fixativum ethanol je třeba uchovávat při pokojové teplotě. Uchovávejte pevně uzavřené a jako hořlavou tekutinu. Roztoky lze používat opakovaně, pokud je fixace odpovídající.

ZHORŠENÍ:

Zlikvidujte roztok kyselého hematoxylinu, když doba požadovaná pro vhodné zbarvení překročí dobu doporučenou v postupu o více než 8 minut.

PŘÍPRAVA:

ROZTOK CITRÁT FOSFÁTOVÉHO PUFRU se připraví zředěním 1 jednotky koncentrátu citrát fosfátového pufru s 9 jednotkami vody.

Roztoky kyselého hematoxylinu, Eosin B a fixačního ethanolu jsou připraveny k okamžitému použití.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagenty. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

US prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Koncentrát citrát fosfátového pufru je DRÁŽDIVÝ. Riziko vážného poškození očí. Dráždí dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Použijte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí.

Kyselý roztok hematoxylinu je TOXICKÝ. Toxický při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice.

Roztok Eosion B je ŠKODLIVÝ. Škodlivé při požití. Azid sodný může reagovat s olovem a mědí a vytvářet vysoce hořlavé sloučeniny.

Roztok EDTA je ŠKODLIVÝ. Škodlivé při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Použijte vhodné ochranné oděvy.

Ethanolové fixativum je HOŘLAVÉ a DRÁŽDIVÉ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Udržujte mimo zdrojů zapalení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Použijte vhodné ochranné oděvy. Zasažené orgány: Nervy a játra.

EU Prohlášení o rizicích a bezpečnosti (Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná)

Koncentrát citrát fosfátového pufru je DRÁŽDIVÝ. Riziko vážného poškození očí. Dráždí dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Použijte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí.

Kyselý roztok hematoxylinu je ŠKODLIVÝ. Škodlivé při požití.

Roztok Eosin B je ŠKODLIVÝ. Škodlivé při požití.

Ethanolové fixativum je VYSOCE HOŘLAVÉ. Vysoce hořlavý. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Udržujte mimo zdrojů zapalení - zákaz kouření.

Roztok EDTA je ŠKODLIVÝ. Škodlivé při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Použijte vhodné ochranné oděvy.

POSTUP

ODBĚR VZORKŮ:

Doporučuje se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Lze použít kapilární nebo žilní krev. Kapilární krev se může přenést přímo do čistého mikroskopického skla. Žilní krev přeneste do zkumavky s obsahem EDTA nebo oxalátu. Pro zjednodušení, použijte 1-2 kapky 2 % roztoku EDTA, katalogové č. 285-4, na každý mL krve (1 kapka = 1 mg). Ačkoli bylo hlášeno, že směs krve a EDTA lze používat až do 2 týdnů, je-li uchovávána v lednici,³ jiné studie došly k závěru, že tyto směsi by měly být testovány okamžitě.⁶ Nátěry je třeba připravovat do 24 hodin od odběru u oxalátu.⁷ Při použití vzorků novorozence se doporučuje zředit krev 0,85 % fyziologickým roztokem, protože tyto vzorky mají vysoký obsah HbF. Krevní nátěry nejsou stabilní a musí být testovány ihned po přípravě.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Mikroskop

Mikroskopická sklička, krycí sklička

Barvicí stojan / nádoby Coplin

Vodní lázeň, 37 °C

Ethanolové fixativum, katalogové č. 285-8, 80 % v/v ethylalkohol

POZNÁMKY:

Za účelem kontroly kvality se doporučuje zařadit krev z normálního jedince (HbA) a z novorozence nebo kojence (HbF) do každé série testů. Barr a Shafer⁸ zjistili, že fixovaná pozitivní kontrolní sklička pupečnické krve v EDTA lze uchovávat až 1 rok, jsou-li skladována při -20 °C v uzavřené lepenkové krabici. Avšak EDTA negativní kontroly se nevyplavují, jsou-li skladovány déle než 2 měsíce při -20 °C. Vědečtí pracovníci doporučují připravovat pozitivní i negativní kontrolní nátěry na stejné skličko, neboť tak je vidět rychle a zřetelně rozdíl jako pomůcka při odečítání testovacích sklíček.

Normální rozsahy⁹

Věk	Fetální hemoglobin (%)
Při narození	50-90
2 roky	0-4
2 roky	0-2

Krajní hodnoty byly pozorovány u:

Aplastické anemie^{3,9}

Erythremické myelózy⁹

nemoci hemoglobinu H⁹

Dědičná perzistence hemoglobinu F^{3,10}

Dědičná sférocytická anemie⁹

Thalassemia major (40-90 % fetálního hemoglobinu)⁹

Thalassemia major (5-10 % fetálního hemoglobinu)^{3,9}

Srpkovitá anemie^{3,9}

Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měly by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

POSTUP:

1. Roztok citrát fosfátového pufru zahřejte na 37 °C v nádobě Coplin nebo barvicí nádobě.
 2. Použijte čisté označené mikroskopické sklíčko a udělejte tenký nátěr krve. Připravte KONTROLNÍ sklíčko, použijte pozitivní krev HbF (pupečnicková krev) a krev z normálního dospělého. Sušte na vzduchu asi 10 minut.
 3. Fixujte sklíčka ponořením do fixačního ethanolu, katalogové č. 285-8, na 5 minut, důkladně propláchněte pod tekoucí vodou a usušte.
 4. Ponořte TESTOVACÍ a KONTROLNÍ sklíčka do předem zahřátého roztoku citrát fosfátového pufru při 37 °C na 5 minut. Po 1 a 3 minutách od ponoření zamíchejte. K dosažení potřebných výsledků je třeba úroveň míchání přizpůsobit. Opláchněte řádně v destilované vodě a dobře usušte na vzduchu, **aby se** netvořily barevné artefakty.
 5. Proveďte barvení po dobu 3 minut v roztoku kyselého hematoxylinu, katalogové č. 285-2. Propláchněte sklíčka v destilované vodě a odstraňte zbytek vody.
 6. Proveďte kontrastní barvení po dobu 4 minut v 0,1 % roztoku Eosin B, katalogové č. 285-3. Opláchněte řádně v destilované vodě a dobře usušte na vzduchu.
 7. Zakryjte **suchá** sklíčka a zkoumejte pod olejovým objektivem (1000X). Nepřítomnost HbF je prokázána buňkami "duchy", přičemž zadržovaný HbF způsobuje, že buňky se zobrazují jasně červeně. Ne **přidávejte** olej přímo na sklíčko.
- POZNÁMKA: Lze použít i zvětšení 400X, ale je možné, že výsledky se nebudou odečítat snadno.

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. 285
Předchozí revize: 2003-10
Revidováno: 2005-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Egyesült Királyság

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Podíl erythrocytů s obsahem fetálního hemoglobinu lze stanovit několika způsoby. Při studiu krevního materiálu za účelem stanovení počtu buněk s obsahem HbF, doporučují Oski a Naiman⁴ následující postup:

1. Zjistit celkový počet erythrocytů na 5 polích a stanovit průměrný počet na jedno pole.
2. Potom zjistit počet hluboce zbarvených erythrocytů s obsahem HbF na asi 30 polích a stanovit průměrný počet na jedno pole.
3. Vypočítat procento erythrocytů s obsahem HbF na základě celkového počtu erythrocytů na jedno pole.

Výsledky se udávají jako procentuální vyjádření přítomnosti HbF.

Studie citlivosti: Podle Oski a Naimana⁴ je tato metoda schopná detekovat již tak malé množství jako je 0,1 mL fetální krve v mateřském oběhu.

Studie reprodukovatelnosti: Použitím sérií čerstvých krevních vzorků byly připraveny kopie každého sklíčka a upraveny různými nahodilými šaržemi barviva.⁶ Mikroskopické hodnocení prokázalo identické výsledky pro každý krevní vzorek.

Korelační studie: Byly připraveny směsi pupečnickové krve a kompatibilní krve z dospělého, aby se získaly vzorky s rozsahem koncentrací HbF od 26-66 %.⁶ Krevní směsi byly testovány popsáním způsobem a chemicky analyzovány pomocí alkalické denaturační metody.¹⁰ Procentuální hodnota HbF vykazovala průměrnou odchylku mezi metodami ve výši asi 7 %.

Pokud se zjištěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

REFERENCE

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 hemoglobin 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 63103USA 314-771-5765
Technické služby: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-3122
nebo e-mailujte na clintech@sial.com
Objednávky: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

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