

FELHASZNÁLÁSI JAVALLAT

A Sigma-Aldrich Fetal Hemoglobin reagensek a magzati hemoglobin vérkenetekből történő savas kimosására, félkvantitatív meghatározására valók. A Fetal Hemoglobin stain reagensek in vitro diagnosztikai használatra javallottak.

Már 1864-ben, Korber¹ felismerte, hogy a magzati hemoglobin ellenállóbb a lúgos denaturálásnak, mint a felnőtteké. A fehérje izolációs és jellemzési technikákban történő fejlődés ahhoz a felfedezéshez vezetett, hogy több megkülönböztető tulajdonság létezik, mely lehetővé teszi a magzati és felnőtt hemoglobin megkülönböztetését. Ezek közé tartozik a magzati hemoglobin (hemoglobin F) savas kimosásnak való ellenállása. Amikor vérkeneteket merítenek savas pufferbe például, akkor a felnőtt hemoglobin kimosódik az eritrocitákból, míg a magzati hemoglobin nem. Ha a vérkeneteket ilyen módon kezelik majd festik, akkor a hemoglobin F-fel rendelkező eritrociták felveszik a festéket, míg a csak felnőtt hemoglobint tartalmazók "szellemként" jelennek meg.

A savas kimosásnak való ellenálláson alapuló magzati hemoglobin kimutatásának tárgylemezes technikáját eredetileg Kleihauer és társai javasolták,² majd később Shepard és társai módosították.³ A Sigma eljárás további javulást mutat ebben a megközelítésben, melyet Oski és Naiman írtak le.⁴

A magzati hemoglobin értékelést néha az esetleges hemorrágia újszülötti meghatározására használják, különösen, ha rectalis vérzésre utaló jelek tapasztalhatók. A hemoglobin F vizsgálatot használják felnőtteknél is bizonyos típusú anémiák diagnosztizálásához. Például, 10-90 % magzati hemoglobinnal találkozhatnak olyan betegeknek, akik thalassémia major-ban szenvednek. Továbbá sarlósejtes betegségben szenvedő betegeknek általában a magzati vér pigmentek kismértékű növekedését figyelik meg.

Rh inkompatibilitás eseteiben egyre mindennaposabb, hogy a magzati anyai vérkeringésbe kerülő vörösvérsejtek immunitási reakcióit elnyomja. A beadandó adott gamma globulin mennyisége, mely anti Rh(D)-t tartalmaz, a magzati-anyai hemorrágia mértéke alapján számítható.⁵

A leírt technika szerint a megfelelően szárított és fixált vérkeneteket egy citrát pufferbe (pH=3,3) merítik 37 °C-on. A felnőtt hemoglobin A (HbA) kioldódik a sejtekből, mivel a magzati hemoglobin (HbF), mely savnak ellenáll, a sejten belül marad és festhető a mikroszkópius vizsgálathoz.

REAGENSEK

CITRATE PHOSPHATE BUFFER CONCENTRATE, Katalógus szám: 285-1
Nátrium-citrát, 0,7 mol/l, nátrium-foszfát, 0,6 mol/l.

ACID HEMATOXYLIN SOLUTION, Katalógus szám: 285-2
Hematoxilín, igazolt, 1 g/l, alumínium-ammónium-szulfát, nátrium-jodát és stabilizátor, pH=3,3.

EOSIN B SOLUTION, Katalógus szám: 285-3
Eozin B, 0,1 %, vizes oldat. Nátrium-azid, 0,1 %, tartósítószerként hozzáadva. Ethanol Fixative, Katalógus szám: 285-8 (80 tff% etil-alkohol)

TÁROLÁSI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ELTARTHATÓSÁG:

A Citrate Phosphate Buffer Concentrate hűtőszekrényben tárolandó (2-8 °C). Mikrobás növekedés esetén megsemmisítendő.

A Citrate Phosphate Buffer Solution hűtőszekrényben tárolandó (2-8 °C). 2 hétig felhasználható. Friss részt használjanak mindennap. Mikrobás növekedés esetén megsemmisítendő.

Az Acid Hematoxylin Solution és az Eosin B Solution szobahőmérsékleten tárolandó (18-26 °C). Az oldatok újra felhasználhatók, ha szorosan tömített festőedényben tárolják félfhomályban.

Az etanol fixálószer szobahőmérsékleten tárolandó. Szorosan tömítve, gyúlékony folyadékként tárolják. Az oldat újra felhasználható, de meg kell semmisíteni, ha a fixálás nem megfelelő.

TÖNKREMETEL:

Az Acid Hematoxylin Solution megsemmisítendő, ha a megfelelő festéshez szükséges idő meghaladja a 8 percet.

ELŐKÉSZÍTÉS:

A CITRATE PHOSPHATE BUFFER SOLUTION-t 1 térfogatnyi Citrate Phosphate Buffer Concentrate 9 térfogatnyi vízzel való hígításával készítik.

Az Acid Hematoxylin Solution, az Eosin B Solution és az Ethanol Fixative használatra kész.

ÖVINTÉZKEDÉSEK:

A laboratóriumi reagensekkel történő munka során a szokásos övintézkedéseket be kell tartani. Hulladék-megsemmisítés az összes helyi, állami, tartományi vagy nemzeti szabály figyelembevételével. A legfrissebb kockázati, veszély vagy biztonsági információkat lásd az Anyagbiztonsági adatlapban.

Az Amerikai Egyesült Államok kockázati és biztonsági mondatai

A Citrate Phosphate Buffer Concentrate IRRITATÍV. Súlyos szemkárosodást okozhat. Bőrizgató hatású, izgatja a légutakat. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőöltözetet, védőkesztyűt és szem-/arcvédőt kell viselni.

Az Acid Hematoxylin Solution MÉRGEZŐ (TOXIKUS). Lenyelve mérgező (toxikus). Szem- és bőrizgató hatású, izgatja a légutakat. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Baleset vagy rosszullet esetén azonnal orvost kell hívni.

Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni Megfelelő védőruházatot és védőkesztyűt kell viselni.

Az Eosin B Solution ÁRTALMAS. Lenyelve ártalmas. A nátrium-azid reakcióba léphet az ólom és réz vízvezetékkel és rendkívül robbanékony vegyületeket képez.

Az EDTA Solution ÁRTALMAS. Belélegezve, bőrrel érintkezve és lenyelve ártalmas. Megfelelő védőruházatot kell viselni.

Az Ethanol Fixative GYÚLÉKONY és IRRITATÍV. Szem- és bőrizgató hatású, izgatja a légutakat. Gyújtóforrásoktól távol tartandó. - Dohányozni tilos! Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőruházatot kell viselni. Célszervek: Idegek és máj.

Az Európai Unió kockázati és biztonsági mondatai (Az anyagot még nem teljesen vizsgálták)

A Citrate Phosphate Buffer Concentrate IRRITATÍV. Súlyos szemkárosodást okozhat. Bőrizgató hatású, izgatja a légutakat. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőöltözetet, védőkesztyűt és szem-/arcvédőt kell viselni.

Az Acid Hematoxylin Solution ÁRTALMAS. Lenyelve ártalmas.

Az Eosin B Solution ÁRTALMAS. Lenyelve ártalmas.

Az Ethanol Fixative RENDKÍVÜL GYÚLÉKONY. Rendkívül gyúlékony. Az edényzet hermetikusan lezárva tartandó. Gyújtóforrásoktól távol tartandó. - Dohányozni tilos!

Az EDTA Solution ÁRTALMAS. Belélegezve, bőrrel érintkezve és lenyelve ártalmas. Megfelelő védőruházatot kell viselni.

ELJÁRÁS

MINTA BEGYŰJTÉSE:

Javasolt a minta begyűjtését az M29-A2 NCCLS dokumentum szerint végezni. Semmilyen ismert módszer nincs, mely teljesen biztosítja, hogy a vérminták vagy a szövet ne terjedjen fertőzést. Ezért, minden vér származék vagy szövetminta esetlegesen fertőzőnek tekintendő.

Hajszáleres vagy vénás vér használható. A hajszáleres vér közvetlenül átvihető egy tiszta mikroszkóp tárgylemezre. A vénás vért egy olyan csőbe kell tenni, mely EDTA-t vagy oxalátot tartalmaz. Kényelmi szempontból használjanak 1-2 csepp 2 %-os EDTA oldatot, katalógus szám: 285-4, a vér 1 ml-hez (1 csepp = 1 mg). Habár a vér-EDTA keverékekről azt mondják, hogy 2 hétig is felhasználhatók, ha hűtve tárolják,⁶ más tanulmányok szerint viszont azonnal vizsgálni kell az ilyen keverékeket.⁷ A keneteket az oxalátba gyűjtött vérből 24 órán belül el kell készíteni.⁷ Az újszülöttek mintáit használva, javasolt, hogy a vért hígítsák fel 0,85 % sóoldattal, mivel az ilyen minták HbF tartalma magas. A vérkeneteket nem stabilak, az elkészítés után azonnal vizsgálandók.

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT SPECIÁLIS ANYAGOK:

Mikroszkóp

Mikroszkóp tárgylemezek, fedőlemezek

Festőállvány/Coplin edények

Vízfürdő, 37 °C

Ethanol Fixative, Katalógus szám: 285-8 (80 tff% etil-alkohol)

MEGJEGYZÉSEK:

Minőségellenőrzés miatt javasolt, hogy normál felnőtt (HbA) és újszülött vagy csecsemő (HbF) vért is vizsgáljanak mindenkor. Barr and Shafer⁸ szerint a köldökzsinór vérből származó fixált pozitív kontroll lemezek EDTA-ban tartósíthatók maximum 1 évig -20 °C-on, tömített kartondobozban. Azonban az EDTA negatív kontrollok nem mosnak ki teljesen, ha több, mint 2 hónapig tárolták -20 °C-on. Ezek a kutatók azt javasolják, hogy ugyanazon a tárgylemezen készítsék el a pozitív és negatív keneteket, biztosítva ezzel a tiszta és gyors kontrasztot a vizsgálati lemezek leolvasása során.

normál tartományok⁹

Életkor	magzati hemoglobin (%)
születéskor	50-90
2 év	0-4
2 év	0-2

Túl nagy értékeket figyeltek meg a következő esetekben:

- aplasztikus anémia^{9,9}
- eritrémias mielózis⁹
- Hemoglobin H betegség⁹
- A hemoglobin F örökletes megmaradása^{9,10}
- Örökletes szferocitikus anémia⁹
- Thalassémia major (40-90 % magzati hemoglobin)⁹
- Thalassémia minor (5-10 % magzati hemoglobin)^{9,9}
- Sarlósejtes anémia^{9,9}

Az ilyen eljárásból kapott adatok csak segítségként szolgálnak a diagnózishoz és egyéb klinikai diagnosztikai vizsgálatokkal vagy információkkal együtt át kell vizsgálni.

ELJÁRÁS:

1. A Citrate Phosphate Buffer Solution-t fel kell melegíteni 37 °C-ra egy Coplin edényben vagy festőedényben.
2. Tiszta, címkézett mikroszkóp tárgylemezeket használva, készítsenek vékony vérkeneteket. Készítsenek KONTROLL lemezeket pozitív HbF vért (köldökzsinór-vér) és normál felnőtt vért használva. Levegőn szárítsák körülbelül 10 percre.
3. Fixálják a tárgylemezeket 5 percre Ethanol Fixative-ba, katalógus szám: 285-8, merítve, öblítsék alaposan csapvízben és szárítsák levegőn.
4. Merítsék a VIZSGÁLATI és KONTROLL lemezeket előmelegített Citrate Phosphate Buffer Solution-ba 5 percre 37 °C-on. 1 és 3 percnyi merítés után keverjék fel. A keverék mértéke változtatható, hogy a legjobb eredményeket kapják. Öblítsék alaposan desztillált vízben és szárítsák meg teljesen levegőn, a festési változásokat elkerülendő.

5. Fessék a tárgylemezeket 3 percig Acid Hematoxylin Solution-ban (katalógus szám: 285-2). Öblítsék le a tárgylemezeket desztillált vízben és rázzák le a felesleges vizet.
6. Fessék után a tárgylemezeket 4 percig 0,1 %-os Eosin B Solution-ban, katalógus szám: 285-3. Öblítsék le alaposan desztillált vízben és levegőn szárítsák.
7. Helyezzenek **száraz** fedőlemezt a tárgylemezre és vizsgálják olajmerítéssel (1000X). A HbF hiánya nyilvánvaló a szellemsejtek jelenlétével, míg a visszatartott HbF miatt a sejtek élénk vörösek. Ne **vigyenek** a tárgylemezre közvetlenül olajat.
MEGJEGYZÉS: 400X-os nagyítás használható, de a kapott nagyobb mezőt nehezebb megszámlálni.

A Sigma-Aldrich, Inc garantálja, hogy termékei megfelelnek a jelen és egyéb Sigma-Aldrich publikációkban közölt információkkal. A vevő köteles a termék(ek) megfelelőségét az adott felhasználáshoz meghatározni. További kikötések és feltételek alkalmazhatók. Lásd a számla vagy csomagolás hátsó oldalát a további eladási kikötések és feltételek tekintetében.

Eljárás száma: 285
Korábbi felülvizsgálás: 2003-10
Felülvizsgálva: 2005-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Velká Británia

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

A magzati hemoglobinban lévő eritrocita arány sokféleképpen értékelhető. Anyai vért tanulmányozva a HbF-et tartalmazó sejtek miatt, Oski és Naiman⁴ a következőket javasolta:

1. Számolják meg 5 mezőben az eritrociták összes számát és határozzák meg a mezőnkénti átlagot.
2. Ezután számolják meg a mélyen festett HbF-et tartalmazó eritrocitákat körülbelül 30 mezőben és határozzák meg a mezőnkénti átlagot.
3. Számolják ki a HbF-et tartalmazó eritrociták százalékát a mezőnkénti összes eritrocita száma alapján.

Az eredmények a jelenlévő HbF százalékában jelennek meg.

Érzékenységi vizsgálatok: Oski and Naiman⁴ szerint ez a módszer már képes kimutatni 0,1 ml magzati vért az anyai vérkeringésben.

Reprodukálhatósági vizsgálatok: Friss vérminták sorozatát használva mindegyikből másolatot készítenek több különböző festék tétellel kezelve különböző okokból.⁹ A mikroszkópikus értékelés alapvetően azonos eredményeket tárt fel mindegyik vérminta esetében.

Korrelációs vizsgálatok: Köldökzsinór vér és megfelelő anyai vér keverékeit készítették el, hogy mintákat kapjanak 26-66 % HbF koncentráció tartománnyal.⁸ A vérkeverékeket a leírt technikával vizsgálták illetve egy lúgos denaturációs módszerrel kémiaiilag.¹⁰ A százalékos HbF értékek körülbelül 7 % átlagos különbséget mutattak a módszerek között.

Ha a megfigyelt eredmények eltérnek a várttól, vegyék fel a kapcsolatot a Sigma Aldrich műszaki szolgálatával.

IRODALOMJEGYZÉK

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 USA 314-771-5765
Technical Service: 800-325-5832 vagy hívják 314-771-3122
vagy küldjenek e-mail-t a clintech@sial.com címre
To Order: 800-325-3010 or call collect 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

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