

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Os reagentes de hemoglobina fetal da Sigma-Aldrich destinam-se à determinação semi-quantitativa por eluição ácida da hemoglobina fetal em esfregaços sanguíneos. Os reagentes de coloração de hemoglobina fetal destinam-se à "utilização em diagnóstico in vitro".

Já em 1864, Korber¹ determinou que a hemoglobina do feto era mais resistente à desnaturação de álcali do que a de um adulto. Os avanços nas técnicas de isolamento e caracterização de proteínas resultaram na descoberta várias propriedades distintas que possibilitam a diferenciação entre a hemoglobina fetal e a de adulto. Nomeadamente, a resistência da hemoglobina fetal (hemoglobina F) à eluição ácida. Quando os esfregaços sanguíneos são imersos em, por exemplo, tampão ácido, a hemoglobina de adulto é eluída dos eritrócitos, enquanto o mesmo não acontece com a hemoglobina fetal. Se se proceder ao tratamento dos esfregaços sanguíneos desta forma e se forem, subsequentemente, colorados, os eritrócitos que possuem hemoglobina F irão assimilar o corante enquanto os que contêm apenas hemoglobina de adulto irão aparecer como "fantasmas".

A técnica em lâmina para a demonstração da hemoglobina fetal em termos de resistência à eluição ácida foi originalmente proposta por Kleihauer et al.,² e, posteriormente, modificada por Shepard et al.³ O procedimento da Sigma representa um novo avanço nesta abordagem, conforme descrito por Oski e Naiman.⁴

As estimativas da hemoglobina fetal são, por vezes, calculadas para determinar uma possível hemorragia no recém-nascido, especialmente nos casos em que existem indícios de sangramento rectal. O ensaio da hemoglobina F também é aplicado aos adultos para auxiliar o diagnóstico de determinados tipos de anemia. Por exemplo, cerca de 10 a 90 % de hemoglobina fetal é encontrada em doentes com talassemia maior. Além disso, verifica-se normalmente um ligeiro aumento do pigmento sanguíneo fetal em doentes com anemia das células falciformes.

Nos casos de incompatibilidade Rh, cada vez é mais comum uma supressão das reacções imunes em relação aos glóbulos vermelhos que entram na circulação materna a partir do feto. A quantidade de gamaglobulina específica, contendo anti-Rh(D) que deverá ser administrada é calculada com base na avaliação da magnitude da hemorragia fetal/materna.⁵

De acordo com a técnica descrita, os esfregaços sanguíneos, depois de secos e fixados de forma adequada, são imersos num tampão citrato, pH 3,3 a 37 °C. A hemoglobina de adulto A (HbA) dissolve-se das células, enquanto a hemoglobina fetal (HbF) resistente ao ácido, permanece a nível intracelular e poderá ser objecto de coloração para um exame microscópico.

REAGENTES

CONCENTRADO DE TAMPÃO CITRATO-FOSFATO, N.º de Catálogo 285-1

Citrato de sódio, 0,7 mol/L, e fosfato de sódio, 0,6 mol/L.

SOLUÇÃO DE HEMATOXILINA ÁCIDA, N.º de Catálogo 285-2

Hematoxilina, certificada, 1 g/L, sulfato de amónio de alumínio, iodato de sódio e estabilizadores, pH 3,3.

SOLUÇÃO DE EOSINA B, N.º de Catálogo 285-3

Eosina B, 0,1 %, solução aquosa. Azida de sódio, 0,1 %, adicionada como conservante. Fixador de etanol, N.º de Catálogo 285-8 (álcool etílico a 80 % v/v).

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE:

Armazenar o concentrado de tampão citrato-fosfato no frigorífico (2–8 °C). Eliminar se existirem indícios de crescimento microbiano.

Armazenar a solução de tampão citrato-fosfato no frigorífico (2–8 °C). Estável durante 2 semanas. Utilizar uma alíquota fresca todos os dias. Eliminar se existirem indícios de crescimento microbiano.

Armazenar a solução de hematoxilina ácida e a solução de eosina B à temperatura ambiente (18–26 °C). As soluções podem voltar a ser utilizadas se conservadas em recipientes de coloração bem selados num local com uma luz suave.

Armazenar o fixador de etanol à temperatura ambiente. Armazenar devidamente tapado e considerar um líquido inflamável. A solução pode ser reutilizada, mas deverá ser eliminada quando a fixação deixar de ser adequada.

DETERIORAÇÃO:

Eliminar a solução de hematoxilina ácida quando o período necessário para uma coloração adequada ultrapassar os 8 minutos.

PREPARAÇÃO:

A SOLUÇÃO DE TAMPÃO CITRATO-FOSFATO é preparada diluindo 1 volume de concentrado de tampão citrato-fosfato com 9 volumes de água.

A solução de hematoxilina ácida, a solução de eosina B e o fixador de etanol estão prontos para serem utilizados.

PRECAUÇÕES:

Deverão ser aplicadas as precauções normais relativamente ao manuseamento de reagentes laboratoriais. Eliminar os resíduos de acordo com todos os regulamentos locais, estaduais, regionais ou nacionais. Consultar a ficha de dados de segurança dos materiais para obter informações mais actualizadas sobre os riscos, perigos ou segurança.

Declarações de risco e segurança dos EUA

O concentrado de tampão citrato-fosfato é IRRITANTE. Risco de lesões oculares graves. Irritante para as vias respiratórias e pele. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediatamente e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face adequados.

A solução de hematoxilina ácida é TÓXICA. Tóxica em caso de ingestão. Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediatamente e abundantemente com água e consultar um médico. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente um médico (mostrar-lhe o rótulo se possível). Usar vestuário de protecção e luvas adequadas.

A solução de eosina B é NOCIVA. Nociva em caso de ingestão. A azida de sódio poderá reagir com as canalizações de chumbo e cobre formando compostos altamente explosivos.

A solução de EDTA é NOCIVA. Nociva por inalação, em contacto com a pele e em caso de ingestão. Usar vestuário de protecção adequado.

O fixador de etanol é INFLAMÁVEL e IRRITANTE. Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediatamente e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção adequado. Órgãos alvo: Nervos e fígado.

Declarações de risco e segurança da UE (Atenção: Ainda não foram realizados todos os testes para estas substâncias)

O concentrado de tampão citrato-fosfato é IRRITANTE. Risco de lesões oculares graves. Irritante para as vias respiratórias e pele. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediatamente e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face adequados.

A solução de hematoxilina ácida é NOCIVA. Nociva em caso de ingestão.

A solução de eosina B é NOCIVA. Nociva em caso de ingestão.

O fixador de etanol é ALTAMENTE INFLAMÁVEL. Altamente inflamável. Manter o recipiente adequadamente fechado. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar.

A solução de EDTA é NOCIVA. Nociva por inalação, em contacto com a pele e em caso de ingestão. Usar vestuário de protecção adequado.

PROCEDIMENTO

COLHEITA DE AMOSTRAS:

Recomenda-se que a colheita de amostras seja realizada de acordo com o documento M29–A2 da NCCLS. Nenhum método de teste conhecido poderá garantir totalmente que as amostras sanguíneas ou de tecido não irão transmitir infecções. Por essa razão, todos os derivados sanguíneos ou amostras de tecido deverão ser considerados potencialmente infecciosos.

Pode ser utilizado sangue capilar ou venoso. O sangue capilar pode ser directamente transferido para uma lâmina de microscópio limpa. O sangue venoso deverá ser adicionado a um tubo contendo EDTA ou oxalato. Por uma questão de conveniência, utilizar 1 a 2 gotas de solução de EDTA a 2 %, N.º de Catálogo 285-4, por cada mL de sangue (1 gota = 1 mg). Embora as misturas de sangue e EDTA tenham sido referidas como sendo satisfatórias para serem utilizadas durante, no máximo, 2 semanas quando refrigeradas,³ outros estudos concluíram que estas misturas deverão ser analisadas imediatamente.⁶ Os esfregaços deverão ser preparados no espaço de 24 horas após a colheita de sangue em oxalato.⁷ Nos casos em que se utilizam amostras do recém-nascido, recomenda-se que o sangue seja diluído com solução salina a 0,85 %, uma vez que este tipo de amostras tem um teor elevado de HbF. Os esfregaços sanguíneos não permanecem estáveis e deverão ser analisados imediatamente após a sua preparação.

MATERIAIS ESPECIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS:

Microscópio

Lâminas para microscópio, soluções de protecção

Suporte de coloração/jarras de Coplin

Banho-maria, 37 °C

Fixador de etanol, N.º de Catálogo 285-8, álcool etílico a 80 % v/v

NOTAS:

Para fins de controlo de qualidade, recomenda-se que seja incluído o sangue colhido de um adulto normal (HbA) e de um recém-nascido ou lactante (HbF) em cada série de testes. Barr e Shafer⁸ referiram que as lâminas de controlo positivo de sangue do cordão fixadas em EDTA podem ser conservadas até 1 ano a –20 °C, numa embalagem de cartão selada. No entanto, os controlos negativos de EDTA não apresentam uma eluição completa depois de terem sido armazenados durante um período superior a 2 meses a –20 °C. Estes investigadores sugerem a preparação de esfregaços positivos e negativos na mesma lâmina; fornecendo, assim, contrastes claros e rápidos como referência na leitura das lâminas de teste.

Intervalos normais⁹

Idade	Hemoglobina fetal (%)
À nascença	50–90
< 2 anos	0–4
> 2 anos	0–2

Os valores excessivos são observados nos casos de:

Anemia aplástica^{3,9}

Eritrémia aguda⁹

Doença da Hemoglobina H⁹

Persistência hereditária da hemoglobina F^{3,10}

Anemia esferocítica hereditária⁹

Talassemia maior (40–90 % de hemoglobina fetal)⁹

Talassemia menor (5–10 % de hemoglobina fetal)⁹

Anemia das células falciformes^{3,9}

Os dados obtidos com este procedimento servem apenas para auxiliar o diagnóstico e deverão ser analisados em conjunto com outros testes de diagnóstico ou informações clínicas.

PROCEDIMENTO:

1. Pré-aquecer a solução de tampão citrato-fosfato a 37 °C numa jarra de Coplin ou numa placa de coloração.
2. Utilizando lâminas de microscópio limpas e identificadas, realizar esfregaços sanguíneos finos. Preparar as lâminas de CONTROLO utilizando sangue HbF positivo (sangue do cordão) e sangue de adulto normal. Deixar secar ao ar durante, aproximadamente, 10 minutos.
3. Fixar as lâminas, imergindo-as em fixador de etanol, N.º de Catálogo 285-8, durante 5 minutos, lavar abundantemente com água da torneira e deixar secar ao ar.
4. Imergir as lâminas de TESTE e CONTROLO na solução de tampão citrato-fosfato pré-aquecida a 37 °C durante 5 minutos. Agitar ao fim de 1 a 3 minutos de imersão. O grau de agitação poderá variar de modo a que sejam obtidos os resultados pretendidos. Lavar bem com água destilada e deixar secar **completamente** ao ar para evitar artefactos de coloração.
5. Proceder à coloração das lâminas, durante 3 minutos em solução de hematoxilina ácida, N.º de Catálogo 285-2. Lavar as lâminas com água destilada e sacudir o excesso de água.
6. Realizar uma contracoloração das lâminas durante 4 minutos em solução de eosina B a 0,1 %, N.º de Catálogo 285-3. Lavar bem com água destilada e deixar secar ao ar.
7. Colocar uma solução de protecção **seca** na lâmina e examinar utilizando a técnica de imersão em óleo (1000X). A ausência de HbF é evidente pela presença de células fantasmas enquanto a HbF retida resulta em células com uma cor vermelha viva. **Não** aplicar o óleo directamente na lâmina.

NOTA: É possível utilizar uma ampliação de 400X, mas o campo resultante de maior dimensão poderá ser mais difícil de contabilizar.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A proporção de eritrócitos que contêm hemoglobina fetal pode ser calculada de várias formas. Relativamente ao estudo do sangue materno quanto à demonstração de células contendo HbF, Oski e Naiman⁴ recomendam o seguinte:

1. Proceder à contagem do número total de eritrócitos em 5 campos e determinar o número médio por campo.
2. Em seguida, contar o número de eritrócitos fortemente colorados contendo HbF em cerca de 30 campos e determinar o número médio por campo.
3. Calcular a percentagem de eritrócitos que contêm HbF com base no número total de eritrócitos por campo.

Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de HbF presente.

Estudos de sensibilidade: De acordo com Oski e Naiman⁴ este método tem capacidade para detectar um volume tão reduzido como 0,1 mL de sangue fetal na circulação materna.

Estudos de reprodutibilidade: Utilizando uma série de amostras de sangue fresco, foram preparadas lâminas em duplicado de cada uma e foram tratadas com diferentes lotes de corantes em ocasiões separadas.⁵ O exame microscópico revelou resultados essencialmente idênticos com cada amostra de sangue.

Estudos de correlação: Foram preparadas misturas de sangue do cordão e de sangue de adulto compatível, para obter amostras com concentrações de HbF no intervalo de 26 a 66 %.⁶ As misturas sanguíneas foram examinadas através da técnica descrita e analisadas quimicamente utilizando um método de desnaturação de álcali.¹⁰ A percentagem de valores de HbF revelou uma diferença média de cerca de 7 % entre os métodos.

Se os resultados observados forem diferentes dos esperados, contactar a Assistência Técnica da Sigma-Aldrich para mais informações.

BIBLIOGRAFIA

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 EUA +1 314 771 5765
Assistência Técnica: chamada paga no destino +1 314 771 3122
ou endereço de correio electrónico: clintech@sial.com
Para encomendar: chamada paga no destino +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

A Sigma-Aldrich, Inc. garante que os seus produtos estão em conformidade com as informações contidas nesta e em outras publicações da Sigma-Aldrich. O comprador deverá determinar a adequação do(s) produto(s) ao fim particular a que se destinam. Poderão aplicar-se termos e condições adicionais. Consultar o verso da factura ou carta de porte para mais informações sobre os termos e condições de venda adicionais.

Procedimento N.º 285
Revisão Anterior: 2003-10
Revisto: 2005-01



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