

Instructions For Use

SAS- I ALKALINE-Hb

Cat. No. 200900

SAS- I Hb Alcaline
Fiche technique
Réf. 200900

SAS- I Alkalischer-Hb
Anleitung
Kat. Nr. 200900

SAS- I Hb-Alcalina
Istruzioni per l'uso
Cod. 200900

Alcalino-Hb SAS- I
Instrucciones de uso
Nº de catálogo 200900

Contents

English	1
Français	8
Deutsch	15
Italiano	23
Español	30

INTENDED PURPOSE

The SAS-I Alkaline Hb-12 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 frequently².

Electrophoresis is generally considered the best method for separating and identifying haemoglobinopathies. The protocol for haemoglobin electrophoresis involves step-wise use of two systems^{3,4}. 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 alkaline electrophoretic buffer and the agarose support. The SAS-I Alkaline Hb-12 procedure is a simple procedure requiring minute quantities of haemolysate to provide complementary evidence (along with the results from SAS-I Acid Hb-12 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-I Alkaline Hb Gel**

Contains agarose in a Tris / EDTA / Glycine buffer with sodium azide as preservative. The gel is ready for use as packaged.

2. Acid Blue Stain Concentrate

Contains concentrated Acid Blue stain. Dilute the contents of the bottle to 700ml with purified water. Stir overnight and filter before use. Store in a tightly stoppered bottle.

3. 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.

4. Destain Solution Concentrate

Dilute the contents of Destain A to 1 litre with purified water. Then add the contents of Destain B and add a further 1 litre of purified water, slowly.

5. Other Kit Components

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Blotter C to complete 10 gels.

STORAGE AND SHELF LIFE

1. SAS-I Alkaline 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. Acid Blue Stain

The stain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted stain solution 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 of the stain solution.

3. 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.

4. Destain Solution

The destain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. The diluted destain solution is stable for 6 months at 15...30°C.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 210200 Sample Applicator Blades (1 x 10)

Cat. No. 210300 Sample Applicator Blades (5 x 10)

Cat. No. 210100 Disposable sample cups (100)

Cat. No. 3100 REP Prep

Drying oven with forced air capable of 60...70°C

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.

- Mix 200µL of well mixed whole blood with 1000µL of saline solution.
- Centrifuge to sediment the red cells.
- Remove 1000µL of the supernatant and discard.
- Add a further 1000µL of saline solution and mix well.
- Repeat steps b-d x2.
- 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.

For patient samples with a total haemoglobin of 12-15 g/dL dilute 1+4 in Lysing Agent. For controls and samples not in this range, dilute to a haemoglobin concentration of 2.0-3.0 g/dL.

NOTE: For A₂ quantification, samples must be diluted immediately prior to electrophoresis, all samples must be less than 24 hours old.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Pipette 35µl of the sample into the appropriate well of the sample tray or disposable sample cups.
 - i) **SAS-I & SAS-I Plus users:** Use SAS-I sample tray. Carefully place the sample tray onto the applicator drawer. Ensure that the tray is pushed firmly down into position.
 - ii) **SAS-3 users:** Use SPIFE / SAS-3 sample tray. Carefully locate the sample tray using the sample base locating pins. Ensure that the tray is positioned securely.
2. Remove the gel from the packaging and:
 - i) **SAS-I users:** place the gel in the SAS-I, agarose side up, aligning the positive and negative sides with the corresponding electrode posts.
 - ii) **SAS-I Plus users:** dispense 400µL of REP Prep onto the heat sink. Place the gel onto the heat sink, agarose side up, aligning the positive and negative sides with the corresponding electrode posts, taking care to avoid air bubbles under the gel.
 - iii) **SAS-3 users:** place the alignment guide onto the pins and dispense 400µL of REP Prep onto the centre of the chamber. Place the gel into the chamber agarose side up, using the guide, align the positive and negative sides with the corresponding electrode posts, taking care to avoid air bubbles under the gel.
3. Blot the surface of the gel with a blotter C, discard the blotter.
4.
 - i) **SAS-I users:** attach the electrodes onto the top side of the electrode posts so that they are in contact with the gel blocks.
 - ii) **SAS-I Plus users:** (as above). Place the cover over the gel and electrodes and press firmly for 5 seconds to ensure contact.
 - iii) **SAS-3 users:** attach the electrodes onto the the electrode posts so that they are in contact with the gel blocks.
5. Place I applicator blade assembly into the top position on the instrument, (**SAS-3 users:** slot 8).
6. Perform the Alkaline Haemoglobin electrophoresis:
 - i) **SAS-I users:** 120 volts, 40 mins, 1 applications
 - ii) **SAS-I Plus users:** Electrophoresis: 200 volts, 30 mins, 25°C, 1 applications
 - iii) **SAS-3 users:**

Step	Time (mm:ss)	Temperature (°C)	Voltage	Other
Load Sample	00:10	21		Speed 1
Apply Sample	00:10	21		Speed 1*
Electrophoresis	30:00	25	200	

* Use Location I

7. Following electrophoresis, (**SAS-I Plus users:** remove the cover), remove the electrodes and both gel blocks using the Gel Block Remover.
8. Attach the gel to the staining chamber holder.

9. Select the Alkaline Haemoglobin test program on the staining unit and, following the prompts, Stain, Destain and Dry the gel.

a) **SAS-2 (Auto-Stainer)**

Step	Solution	Time (mm:ss)	Port	Temperature(°C)
Stain	Acid Blue Stain	05:00	6	65
Destain	Destain solution	00:30	2	
Dry	—	15:00		
Destain	Destain solution	02:00	2	
Destain	Destain solution	02:00	2	65
Wash	Purified water	01:00	1	
Dry	—	15:00		

b) **SAS-4 (Auto-Stainer)**

Step	Time (mm:ss)	Temperature (°C)	Other
Stain	05:00	70	Recirculate ON
Destain	00:30		Recirculate ON
Dry	15:00		Recirculate ON
Destain	02:00		Recirculate ON
Destain	02:00	63	
Dry	12:00		

c) **Manual**

Follow the sequence listed for the SAS-2 Auto-Stainer, using a staining bath for the Stain, Destain and Wash steps, and a Drying Oven with forced air at 60...70°C for the Dry steps.

10. At the end of the staining cycle, remove the gel from the staining chamber. The gel is now ready for examination.

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.

Quantitative Evaluation: The relative percent of each haemoglobin type on the gel can be determined by densitometry of the completed gel at 595nm.

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

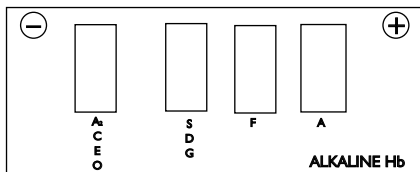


FIG. 1

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. 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 β^0 -Thalassaemia HbA is absent.

In Sickle Cell β^+ -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.

QUALITY CONTROL

A range of haemoglobin controls are available to aid in the identification of unknown haemoglobin bands and to confirm satisfactory performance of the test.

Cat. No. 5331 AFSC Hemo Control

Cat. No. 5330 AFSA₂ Hemo Control

Cat. No. 5329 ASA₂ Hemo Control

Cat. No. 5328 AA₂ Hemo Control

LIMITATIONS

Some abnormal hemoglobins have similar electrophoretic mobilities and must be differentiated by other methodologies.

Further testing required:

1. Acid Hb electrophoresis may be a necessary follow up test for confirmation of abnormal haemoglobins detected.
2. Globin chain analysis (both acid and alkaline) and structural studies may be necessary in order to positively identify some of the more rare haemoglobins.
3. 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.
4. 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

Reproducibility

	Within Gel (n=10)		Between Gel (n=100)	
	Mean (%)	CV (%)	Mean (%)	CV (%)
HbA	48.9	2.5	50.5	3.9
HbF	32.6	2.5	32.8	3.2
HbS	17.3	3.7	15.6	8.8
HbA ₂	1.2	10.2	1.1	18.2

Linearity

The linearity of the method is a function of densitometer specification as well as gel performance. It is recommended that each customer determine the linearity of the method based upon the densitometer in use in the laboratory.

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-I Hb-12 alcaline 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 globines et de groupements protoporphyriques ferreux, les hèmes. 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 foetale 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 à l'origine de signes 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 alcalin et le support d'agarose. La procédure Hb-12 alcaline est une technique simple demandant de petite quantité d'hémoglobine pour mettre en évidence (grâce aussi aux résultats de l'électrophorèse SAS-I Hb-12 acide), 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-I Hb Alcaline

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

2. Colorant bleu acide

Contient du colorant bleu 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.

3. 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.

4. Solution décolorante

Diluer le contenu de décolorant A avec 1 litre d'eau distillée. Ajouter ensuite le contenu de décolorant B puis, lentement, 1 autres litre d'eau distillée.

5. Autres composants du kit

Chaque kit contient également 1 fiche technique et des buvards C pour 10 gels.

STOCKAGE ET CONSERVATION**1. Plaque SAS-I Hb Alcaline**

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. Colorant bleu 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.

3. 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.

4. Solution décolorante

Le décolorant concentré doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, la solution décolorante est stable 6 mois entre 15...30°C.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 210200 Applicateurs échantillons (1 x 10)

Réf. 210300 Applicateurs échantillons (5 x 10)

Réf. 210100 Cupules échantillons jetables (100)

Réf. 3100 Solution de REP-prep

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

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.

- a) Mélanger 200µl de sang total mélangé avec 1000µl de solution physiologique.
- b) Centrifuger jusqu'à sédimentation des hématies.
- c) Retirer 1000µl de surnageant.
- d) Ajouter à nouveau 1000µl de solution physiologique et mélanger.
- e) Répéter les étapes b à d deux fois.
- f) 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.

Pour les échantillons patient ayant une concentration totale en hémoglobines de 12–15 g/dl, réaliser une dilution 1+4 avec de l'hémolysant. Pour les contrôles et les échantillons hors de cette plage, les diluer pour obtenir une concentration de 2,0–3,0g/dl.

REMARQUE: Pour la quantification de l'HbA₂, les échantillons doivent être dilués juste avant l'électrophorèse et ne doivent pas dater de plus de 24 heures.

MÉTHODOLOGIE

1. Pipeter 35µl d'échantillon dans les puits correspondants du porte-échantillon ou dans les cupules échantillons jetables.
 - i) **SAS-1 et SAS-1 Plus:** Utiliser le porte-échantillon du SAS-1. Placer avec précaution le porte-échantillon sur le chariot applicateur. S'assurer qu'il est solidement mis en place.
 - ii) **SAS-3:** Utiliser le porte-échantillon du SPIFE / SAS-3. Mettre en place le porte-échantillon avec précaution à l'aide des ergots de guidage de l'embase. S'assurer qu'il est solidement mis en place.
2. Sortir le gel de son emballage puis:
 - i) **SAS-1:** Placer le gel dans le SAS-1, agarose vers le haut, en respectant les polarités.
 - ii) **SAS-1 Plus:** Déposer 400µl de REP-prep dans le dissipateur thermique. Placer le gel sur le dissipateur thermique, agarose vers le haut, en respectant les polarités et en veillant à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le gel.
 - iii) **SAS-3:** Placer le guide d'alignement sur les picots et déposer 400µl de REP-prep au centre de la chambre. Placer le gel dans la chambre, agarose vers le haut, en respectant les polarités et en veillant à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le gel.
3. Sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C puis le jeter.
4.
 - i) **SAS-1:** Fixer les électrodes sur la partie supérieure des plots que sorte qu'elles soient en contact avec les ponts d'agarose.
 - ii) **SAS-1 Plus:** (même chose que ci-dessus). Mettre le couvercle sur le gel et les électrodes et faire pression 5 secondes pour assurer un bon contact.
 - iii) **SAS-3:** Fixer les électrodes sur les plots que sorte qu'elles soient en contact avec les ponts d'agarose.
5. Placer l'applicateur en position supérieure dans l'instrument (**SAS-3:** encoche 8).

6. Réaliser l'électrophorèse Hémoglobine Alcaline.
- i) **SAS-I**: 120 volts, 40 min., 1 dépôts.
- ii) **SAS-I Plus**: Électrophorèse: 200 volts, 30 min., 25°C, 1 dépôts.
- iii) **SAS-3**:

Étape	Durée (mm:ss)	Température (°C)	Tension	Autre
Charger échantillon	00:10	21		Vitesse I
Déposer échantillon	00:10	21		Vitesse I*
Électrophorèse	30:00	25	200	

* Utiliser Emplacement I (Loc I)

7. Une fois la migration terminée, (**SAS-I Plus**: enlever le couvercle), enlever les électrodes et les ponts d'agarose à l'aide de la raclette.
8. Fixer le gel sur le support de la chambre de coloration.
9. Sélectionner le programme Hémoglobine Alcaline du module de coloration puis, en suivant les messages, colorer, décolorer et sécher le gel.

a) **SAS-2 (module de coloration)**

Étape	Solution	Durée (mm:ss)	Orifice	Température (°C)
Colorer	Colorant bleu acide	05:00	6	
Décolorer	Solution décolorante	00:30	2	
Sécher	—	15:00		65
Décolorer	Solution décolorante	02:00	2	
Décolorer	Solution décolorante	02:00	2	
Laver	Eau distillée	01:00	1	
Sécher	—	15:00		65

b) **SAS-4 (module de coloration)**

Étape	Durée (mm:ss)	Température (°C)	Autre
Colorer	05:00		Rec ON
Décolorer	00:30		Rec ON
Sécher	15:00	70	
Décolorer	02:00		Rec ON
Décolorer	02:00		Rec ON
Sécher	12:00	63	

c) **Manuel**

Suivre la séquence indiquée pour le SAS-2, en utilisant des bains de colorant, de décolorant et de solution de lavage. Sécher dans une étuve ventilée entre 60...70°C.

10. Une fois le cycle de coloration terminé, enlever le gel de la chambre de coloration. Il est alors prêt pour être examiné.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Évaluation qualitative:

Une observation visuelle du gel coloré permet d'identifier les différentes bandes d'hémoglobine des échantillons. Les contrôles utilisés servent de marqueurs de position pour l'identification.

Évaluation quantitative:

Le pourcentage de chaque fraction est obtenu par lecture à l'aide d'un densitomètre à 595nm.

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

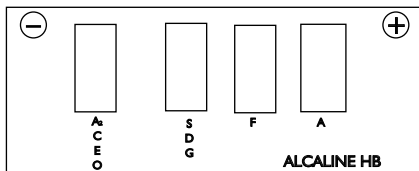


FIG. 1

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 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 β^0 , 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.

CONTRÔLE QUALITÉ

Différents contrôles d'hémoglobines sont disponibles afin d'aider à l'interprétation des bandes d'hémoglobines inconnues et de confirmer la bonne exécution du test.

Réf. 5331 Hémo contrôle AFSC

Réf. 5330 Hémo contrôle AFSA₂

Réf. 5329 Hémo contrôle ASA₂

Réf. 5328 Hémo contrôle AA₂

LIMITES

Certaines hémoglobines anormales ont une mobilité électrophorétique similaire et doivent être identifiées par d'autres méthodes.

Analyses supplémentaires nécessaires:

1. Le kit Hb acide peut être nécessaire pour confirmer la présence d'hémoglobines anormales.
2. 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.
3. 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'HbS 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 le diagnostic d'un trait thalassémique.
4. 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 foetale, 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

Reproductibilité

	Intra-plaque (n=10)		Inter-plaque (n=100)	
	Moyenne (%)	CV (%)	Moyenne (%)	CV (%)
HbA	48,9	2,5	50,5	3,9
HbF	32,6	2,5	32,8	3,2
HbS	17,3	3,7	15,6	8,8
HbA ₂	1,2	10,2	1,1	18,2

Linéarité

La linéarité est fonction des caractéristiques du densitomètre ainsi que des performances du gel.

Il est recommandé à chaque client de déterminer la linéarité de cette méthode en fonction du densitomètre utilisé au sein du laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wintrobe, Maxwell M., Clinical Hematology, 6^e édition, Lea and Febiger, Philadelphie, 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, États-Unis. 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. et 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., Philadelphie, 1974.

ANWENDUNGSBEREICH

Der SAS-I Alkalische Hb-12 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 Sequenz von Aminosäuren bestimmt. Jedes normale Hämoglobinmolekül besteht aus einem Alpha-Ketten- und einem Nicht-Alpha-Ketten-Paar. Im normalen Erwachsenenhäoglobin (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 besteht aus HbA neben kleinen Mengen von HbA₂ und HbF. Darüber hinaus sind über 400 Hämoglobinmutationen bekannt. Davon können einige, vor allem im homozygoten Zustand oder in Kombination mit einem anderen pathologischen Hämoglobin, schwere klinische Krankheitsbilder verursachen. Wintrobe¹ unterscheidet in der Hämoglobinsynthese drei Gruppen von Anomalien.

1. Synthese eines abnormalen Eiweißmoleküls (z. B. bei der Sichelzellenanämie).
2. Verminderung in der Proteinsynthesemenge (z. B. bei der Thalassämie).
3. Entwicklungsanomalien (z. B. hereditäre Persistenz von fetalem Hämoglobin (HPFH)).

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 im Allgemeinen als beste Methode zur Auftrennung 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 eine Elektrophorese im sauren Milieu ergänzt werden, die neben der elektrischen Ladung eine weitere Eigenschaft misst.

Diese Methode beruht auf den komplexen Wechselwirkungen des Hämoglobins mit einem alkalischen Elektrophorese-Puffer unter Mithilfe von Agarose. Das SAS-I Alkalische Hb-12 Verfahren (neben den Ergebnissen der SAS- I Säure Hb-12 Analyse) ist ein einfaches Verfahren, bei dem geringste Mengen von Hämolsat ausreichen, um einen zusätzlichen Nachweis für das Vorhandensein von HbS, HbC und HbF sowie mehreren anderen abnormalen 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. Siehe Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie Informationen zur Entsorgung.

INHALT

1. SAS-I Alkalisches Hb Gel

Enthält Agarose in Tris / EDTA / Glyzinpuffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.

2. „Saures-Blau“ Farbstoffkonzentrat

Enthält konzentrierte „Saures-Blau“ Farbstofflösung. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 700ml verdünnen. Über Nacht rühren und vor dem Gebrauch filtrieren. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

3. Hämoglobin lysierendes Reagenz

Enthält Triton X-100 in dest. Wasser mit Kaliumcyanid und Thiomersal als Konservierungsstoffe. Das lysierende Reagenz ist gebrauchsfertig verpackt.

4. Entfärbelösung-Konzentrat

Den Inhalt Entfärbelösung A mit 1 Liter destilliertem Wasser verdünnen. Danach den Inhalt Entfärbelösung B und weitere 1 Liter destilliertes Wasser langsam hinzufügen.

5. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Methodenbeschreibung sowie ausreichend Blotter C für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-I Alkalisches 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. „Saures-Blau“ Farbstoff

Das Farbstoffkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Farbstofflösung 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.

3. Hämoglobin lysierendes Reagenz

Das lysierende Reagenz sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Teilweise Verunreinigung oder Trübung können auf einen Verfall hinweisen.

4. Entfärbelösung

Das Entfärbekonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Entfärbelösung ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 6 Monate stabil.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 210200 Probenapplikatorröhrchen (1 x 10)

Kat. Nr. 210300 Probenapplikatorröhrchen (5 x 10)

Kat. Nr. 210100 Einweg-Probengefäße (100)

Kat. Nr. 3100 REP-Prep-Lösung

Trockenschrank mit Umluft und einer Temperaturleistung von 60...70°C

Kochsalzlösung (0,85 % NaCl)

Destilliertes Wasser

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Frisch entnommenes EDTA- oder Heparin-Blut ist das Material der Wahl. Proben können bei 2...6°C bis zu einer Woche gelagert werden. Zur Herstellung des Lysats sollte für optimale Resultate mit Kochsalz gewaschene Erythrozyten verwendet werden. Das verhindert mögliche Interferenzen mit Plasmaproteinen.

- a) 200µl gut gemischtes 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 mischen.
- e) Die Schritte b) bis d) zwei Mal wiederholen.
- f) Nach dem letzten Zentrifugieren 1000µl Überstand entfernen und die verbleibende Probe wie Vollblut behandeln. Es kann auch der gesamte Überstand entfernt und die verbleibende Probe als gewaschenes Erythrozytenkonzentrat behandelt werden.

Patientenproben mit einem Gesamt-Hämoglobin von 12-15g/dl 1+4 mit lysierendem Reagenz verdünnen. Kontrollen und Proben außerhalb dieses Bereichs auf eine Hämoglobinkonzentration von 2,0-3,0g/dl verdünnen. **BITTE BEACHTEN:** Zur Quantifizierung von A₂ müssen die Proben unmittelbar vor der Elektrophorese verdünnt werden. Proben dürfen nicht älter als 24 Stunden sein.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. 35µl Probe in die entsprechende Vertiefung der Probenplatte oder Einweg- Probengefäße pipettieren.
 - i) **SAS-I & SAS-I Plus Benutzer:** SAS-I Probenplatte verwenden. Die Probenplatte vorsichtig auf den Applikatoreinschub stellen. Darauf achten, dass die Platte in Position fest eingerastet ist.
 - ii) **SAS-3 Benutzer:** SPIFE / SAS-3 Probenplatte verwenden. Mit den Haltestiften der Probenbasis die Probenplatte vorsichtig einrichten. Sicherstellen, dass die Platte richtig eingesetzt ist.
2. Das Gel aus der Verpackung nehmen und:
 - i) **SAS-I Benutzer:** Gel in das SAS-I (Agarose nach oben) legen. Die positiven und negativen Seiten auf die passenden Elektrodenhalter ausrichten.
 - ii) **SAS-I Plus Benutzer:** 400µl REP-Prep-Lösung auf die Kühlplatte verteilen. Das Gel mit der Agaroseseite nach oben auf die Kühlplatte legen, positive und negative Seite an den passenden Elektrodenhaltern ausrichten. Darauf achten, dass unter dem Gel keine Luftblasen sind.
 - iii) **SAS-3 Benutzer:** Die Führungsschiene auf die Stifte setzen und 400µl REP Prep auf die Kammermitte verteilen. Das Gel mit der Agaroseseite nach oben in die Kammer legen und mit Hilfe der Schiene die positive und negative Seite an den passenden Elektrodenhaltern ausrichten. Darauf achten, dass unter dem Gel keine Luftblasen sind.
3. Die Geloberfläche mit einem Blotter C blotten, Blotter verwerfen.
4.
 - i) **SAS-I Benutzer:** Die Elektroden oben auf den Elektrodenhaltern befestigen, damit sie mit den Gelblöcken in Kontakt sind.
 - ii) **SAS-I Plus Benutzer:** (wie oben). Die Abdeckung über Gel und Elektroden geben und für einen guten Kontakt 5 Sekunden lang fest aufdrücken.
 - iii) **SAS-3 Benutzer:** Die Elektroden auf den Elektrodenhaltern befestigen, damit sie mit den Gelblöcken in Kontakt stehen.
5. 1 Applikatoramm-Halterung in der oberen Position auf dem Gerät anbringen, (**SAS-3 Benutzer:** Schlitz 8).

6. Alkalische Hämoglobin-Elektrophorese durchführen:
- i) **SAS-I Benutzer:** 120 Volt, 40 Min., 1 Applikationen
 - ii) **SAS-I Plus Benutzer:** Elektrophorese: 200 Volt, 30 Min., 25°C, 1 Applikationen
 - iii) **SAS-3 Benutzer:**

Schritt	Dauer (mm:ss)	Temperatur (°C)	Spannung	Anderes
Probenaufnahme	00:10	21		Geschwindigkeit I
Probenapplikation	00:10	21		Geschwindigkeit I*
Elektrophorese	30:00	25	200	

* Platz I verwenden

7. Nach der Elektrophorese, (**SAS-I Plus Benutzer:** Abdeckung entfernen), Elektroden entfernen sowie beide Gel-Blöcke mit dem Gel-Block-Entfernen.
8. Das Gel an der Halterung der Färbekammer befestigen.
9. Am Färbegerät Testprogramm „Alkalisches Hämoglobin“ auswählen und, den Eingabeaufforderungen folgend, das Gel färben, entfärben und trocknen.

a) SAS-2 (Auto-Stainer)

Schritt	Lösung	Dauer (mm:ss)	Anschluss	Temperatur (°C)
Färben	„Saures Blau“ Farbstoff	05:00	6	
Entfärben	Entfärbelösung	00:30	2	
Trocknen	—	15:00		65
Entfärben	Entfärbelösung	02:00	2	
Entfärben	Entfärbelösung	02:00	2	
Waschen	Destilliertes Wasser	01:00	1	
Trocknen	—	15:00		65

b) SAS-4 (Auto-Stainer)

Schritt	Dauer (mm:ss)	Temperatur (°C)	Andere
Färben	05:00		Umlauf EIN
Entfärben	00:30		Umlauf EIN
Trocknen	15:00	70	
Entfärben	02:00		Umlauf EIN
Entfärben	02:00		Umlauf EIN
Trocknen	12:00	63	

c) Manuell

Dem für den SAS-2 Auto-Stainer angegebenen Ablauf folgen. Zum Färben, Entfärben und Waschen ein Färbepad und zum Trocknen einen Trockenschrank mit Umluft und einer Temperatur von 60...70°C verwenden.

10. Am Ende des Färbeprozesses das Gel aus der Färbekammer nehmen. Das Gel kann nun ausgewertet werden.

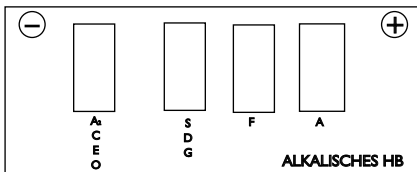
AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**Qualitative Auswertung:**

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 Banden-Erkennung.

Quantitative Auswertung:

Der relative prozentuale Anteil der einzelnen Hämoglobin-Typen auf dem Gel kann durch Densitometrie des fertigen Gels bei 595 nm ermittelt werden.

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

**ABB. 1**

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 schweren Sichelzellenanämien². Mehrere Varianten, darunter HbH, E-Fort Worth und Lepore, verursachen ein für die 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 eine hämolytische Anämie, leichter als bei der Sichelzellenanämie, charakterisiert.

Thalassämien gehören zu einer Gruppe von Störungen der Hämoglobin-Synthese, 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 instabiler 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 Hämoglobin-Synthese, die hereditäre Persistenz fetalen Hämoglobins (HPFH), ist ein genetisch bedingtes Versagen des etwa im vierten Lebensmonat auftretenden Aussetzens der Gammaketten-Synthese, die zu einem ständig erhöhten HbF-Anteil führt.

Es handelt sich dabei um eine mildere Form der echten¹⁰ Thalassämie, und HPFH homozygote Patienten entwickeln sich normal, ohne Symptome und Anämie .

Die am häufigsten vorkommenden Hämoglobinanomalien:

Sichelzellenanämie-Merkmal

Hierbei handelt es sich um die heterozygote Form mit HbA und HbS, sowie einer normalen Menge von HbA₂. 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.

Sichelzell-Thalassämie

Diese Erkrankung weist HbA, HbF, HbS und HbA₂ auf.

Bei der Sichelzell-Beta-Thalassämie fehlt HbA.

Bei der Sichelzellen-β⁺-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 eine homozygote Form mit Anwesenheit von fast ausschließlich HbC.

Thalassaemia major

Diese Erkrankung weist HbF, HbA und HbA₂ auf.

QUALITÄTSKONTROLLE

Es stehen eine Reihe von Hämoglobin-Kontrollen zur Verfügung, die die Identifikation unbekannter Hämoglobin-Banden unterstützen und eine zufrieden stellende Leistung des Tests bestätigen.

Kat. Nr. 5331 AFSC Häm-Kontrolle

Kat. Nr. 5330 AFSA₂ Häm-Kontrolle

Kat. Nr. 5329 ASA₂ Häm-Kontrolle

Kat. Nr. 5328 AA₂ Häm-Kontrolle

EINSCHRÄNKUNGEN

Eingige anormale Hämoglobine haben eine ähnliche elektrophoretische Mobilität und müssen durch andere Testmethoden unterschieden werden.

Weitere notwendige Untersuchungen:

1. Säure Hb ist eventuell eine weitere notwendige Untersuchung, um die Anwesenheit von abnormalem Hämoglobin zu bestätigen.
2. Sowohl die saure als auch die alkalische Globinketten-Analyse können neben Strukturstudien zur Identifikation einiger der selteneren Hämoglobine notwendig sein.

- Anionen-Wechselsäulen-Chromatographie ist die präziseste Methode zur quantitativen Bestimmung von HbA₂. Die Helena BioSciences Sickle-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 des Beta-Thalassämie-Merkmal.
- Niedrige HbF-Werte (1-10%) können mit der radialen Immundiffusion der Helena BioSciences HbF-QuiPlate Methode (Kat. Nr. 9325) quantitativ genau bestimmt werden.

REFERENZWERTE

Bei der Geburt besteht bei normalen Neugeborenen der Hauptanteil des Hämoglobins in den Erythrozyten aus fetalem Hämoglobin HbF. Es ist außerdem ein gewisser Anteil HbA, dem Hauptanteil des Erwachsenenämoglobins, 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**Reproduzierbarkeit**

	Intra-Assay (n=10)		Inter-Assay (n=100)	
	Mittelwert (%)	VK (%)	Mittelwert (%)	VK (%)
HbA	48,9	2,5	50,5	3,9
HbF	32,6	2,5	32,8	3,2
HbS	17,3	3,7	15,6	8,8
HbA ₂	1,2	10,2	1,1	18,2

Linearität

Die Linearität der Methode ist von der Densitometer-Spezifikation sowie der Leistung des Gels abhängig. Es wird jedem Kunden empfohlen, die Linearität der Methode mit dem im Labor verwendeten Densitometer selbst zu bestimmen.

LITERATUR

- Wintrobe, Maxwell M., Clinical Hematology, 6th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1967. Seite 145-167.
- Fairbanks, V.F., 'The Nomenclature and Taxonomy of Hemoglobin Variants', Diagnostic Medicine, Nov/Dec., 53-58, 1980.
- Schneider, R.G., Hightower, B.J. and Barwick, R.C., 'Laboratory Identification of the Hemoglobins', Lab Management, 1981; August: 29-43.
- Center for Disease Control, Laboratory Methods for Detecting Hemoglobinopathies, U.S. Department of Health and Human Services/Public Health Service, 1984.
- Schneider, R.G., 'Methods for Detection of Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies in the Routine Clinical Laboratory', CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1978.
- 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.
- 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-I Hb-12 alcalina è stato formulato per la separazione delle 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 aminoacidi 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 (p.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 Hb O-Arab si riscontrano meno frequentemente.²

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 diverse³⁻⁸. 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 alcalino e il supporto di agarosio. La procedura SAS-I Hb-12 alcalina è un semplice procedimento che richiede quantità ridotte di emolisato per fornire prove complementari (insieme ai risultati dell'analisi SAS-I Hb-12 acida) 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 del Kit.

COMPOSIZIONE**1. Gel SAS-I Hb alcalina**

Contiene agarosio in un tampone tris / EDTA / glicina con sodio azide come conservante. Il gel è pronto all'uso così come viene fornito.

2. Colorante concentrato Acido Blu

Ogni flacone contiene colorante Acido Blu. Diluire l'intero contenuto del flacone con 700ml di acqua distillata. Agitare "overnight" e filtrare prima dell'uso. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

3. Agente lisante per emoglobina

Contiene Triton X-100 in acqua distillata con cianuro di potassio e tiomersale come conservante. L'agente lisante è pronto all'uso.

4. Soluzione decolorante concentrata

Diluire il contenuto di decolorante A con 1 litri di acqua distillata. Poi aggiungere lentamente il contenuto di decolorante B e altri 1 litri di acqua distillata.

5. Altri componenti del kit

Ciascun kit contiene un foglio procedurale ed un numero sufficiente di blotter C per completare 10 gel.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. Gel SAS-I Hb alcalina

I gel devono essere conservati a 15...30°C e sono stabili 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. Colorante Acido Blu

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. La soluzione decolorante diluita 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.

3. Agente lisante per emoglobina

L'agente lisante deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Contaminazione particellare o torbidità possono indicare deterioramento.

4. Soluzione decolorante

La soluzione decolorante concentrata deve essere conservata a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. La soluzione decolorante diluita è stabile per 6 mesi a 15...30°C.

MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE

Cod. N. 210200 Lamelle di applicazione dei campioni (1 x 10)

Cod. N. 210300 Lamelle di applicazione dei campioni (5 x 10)

Cod. N. 210100 Coppette per campioni monouso (100)

Cod. N. 3100 Preparazione REP

Forno di essiccazione ad aria forzata con temperature di 60...70°C

Soluzione fisiologica (0,85% NaCl)

Acqua distillata

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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 e conservati 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 fare 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 impaccate lavate.

Per i campioni dei pazienti con un'emoglobina totale di 12-15 g/dL diluire 1+4 in agente lisante. Per i controlli e i campioni non compresi in questo range, diluire ad una concentrazione di emoglobina di 2,0-3,0 g/dL.

NOTA: Per la quantificazione dell'A₂ i campioni devono essere diluiti immediatamente prima dell'elettroforesi; tutti i campioni devono essere stati prelevati da meno di 24 ore.

PROCEDURA

1. Pipettare 35µl di campione nel pozzetto appropriato del vassoio per campioni o nelle coppette per campioni monouso.
 - i) **Per gli utilizzatori di SAS-I e SAS-I Plus:** Utilizzare il vassoio per campioni SAS-I. Collocare con cautela il vassoio per campioni sul cassetto di applicazione. Assicurarsi che il vassoio sia saldamente inserito in posizione.
 - ii) **Per gli utilizzatori di SAS-3:** Utilizzare il vassoio per campioni SPIFE / SAS-3. Collocare con cautela il vassoio per campioni utilizzando i fermi di posizionamento della base di campioni. Assicurarsi che il vassoio sia posizionato saldamente.
2. Rimuovere il gel dalla confezione e:
 - i) **Per gli utilizzatori di SAS-I:** Collocare il gel nel SAS-I con l'agarosio rivolto verso l'alto, allineando i lati positivo e negativo con i puntali degli elettrodi corrispondenti.
 - ii) **Per gli utilizzatori di SAS-I Plus:** Distribuire 400µL di preparazione REP sul dissipatore di calore. Collocare il gel sul dissipatore di calore con l'agarosio rivolto verso l'alto, allineando i lati positivo e negativo rispetto ai corrispondenti puntali degli elettrodi, prestando attenzione ad evitare bolle d'aria sotto il gel.
 - iii) **Per gli utilizzatori di SAS-3:** Collocare la guida di allineamento sui fermi e distribuire 400µL di preparazione REP sul centro della camera. Collocare il gel nella camera con l'agarosio rivolto verso l'alto; utilizzando la guida, allineare i lati positivo e negativo rispetto ai corrispondenti puntali degli elettrodi, prestando attenzione ad evitare bolle d'aria sotto il gel.
3. Asciugare la superficie del gel con un blotter C, quindi gettarlo.
4.
 - i) **Per gli utilizzatori di SAS-I:** fissare gli elettrodi sul lato superiore dei puntali, in modo tale che entrino a contatto con i blocchi di gel.
 - ii) **Per gli utilizzatori di SAS-I Plus:** (come sopra). Sistemare il coperchio sul gel e sugli elettrodi e premere con decisione per 5 secondi per consentire il contatto.

iii) **Per gli utilizzatori di SAS-3:** fissare gli elettrodi sul lato superiore dei puntali, in modo tale che entrino a contatto con i blocchi di gel .

5. Collocare un gruppo di lamelle di applicazione nella parte superiore dello strumento (**per gli utilizzatori di SAS-3:** slot 8).
6. Eseguire l'elettroforesi alcalina dell'emoglobina:
 - i) **Per gli utilizzatori di SAS-I:** 120 Volt per 40 minuti, 1 applicazioni
 - ii) **Per gli utilizzatori di SAS-I Plus:** Elettroforesi: 200 Volt per 30 minuti, 25°C, 1 applicazioni
 - iii) **Per gli utilizzatori di SAS-3:**

Fase	Tempo (mm:ss)	Temperatura (°C)	Tensione	Altro
Caricare campione	00:10	21	Velocità I	
Applicare campione	00:10	21	Velocità I*	
Elettroforesi	30:00	25		200

* Utilizzare l'impostazione I

7. In seguito all'elettroforesi (**per gli utilizzatori di SAS-I Plus:** rimuovere il coperchio), rimuovere gli elettrodi ed entrambi i blocchi di gel utilizzando il Gel Block Remover.
8. Fissare il gel al supporto della camera di colorazione.
9. Selezionare il programma del test alcalino sull'emoglobina sull'unità di colorazione e, seguendo le indicazioni, colorare, decolorare ed asciugare il gel.

a) SAS-2 (Auto-Stainer)

Fase	Soluzione	Tempo (mm:ss)	Presi	Temperatura (°C)
Colorare	Colorante Acido Blu	05:00	6	
Decolorare	Soluzione decolorante	00:30	2	
Asciugare	—	15:00		65
Decolorare	Soluzione decolorante	02:00	2	
Decolorare	Soluzione decolorante	02:00	2	
Lavare	Acqua distillata	01:00	1	
Asciugare	—	15:00		65

b) SAS-4 (Auto-Stainer)

Fase	Tempo (mm:ss)	Temperatura (°C)	Altro
Colorare	05:00		Ricircolo ON
Decolorare	00:30		Ricircolo ON
Asciugare	15:00	70	
Decolorare	02:00		Ricircolo ON
Decolorare	02:00		Ricircolo ON
Asciugare	12:00	63	

c) Manuale

Seguire la sequenza indicata per il SAS-2 Auto-Stainer, utilizzando un bagno colorante per le fasi di colorazione, decolorazione e lavaggio, nonché un forno di essiccazione ad aria forzata a 60...70°C per le fasi di essiccazione.

10. Al termine del ciclo di colorazione, rimuovere il gel dalla camera di colorazione. Ora il gel è pronto per essere esaminato.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Valutazione qualitativa:

La possibile identità dei tipi di emoglobina presenti nei campioni può essere determinata mediante la valutazione visiva del gel ottenuto. Gli emocontrolli forniscono un marker per l'identificazione della banda.

Valutazione quantitativa:

La percentuale relativa di ciascun tipo di emoglobina sul gel può essere determinata per densitometria del gel ottenuto a 595nm.

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

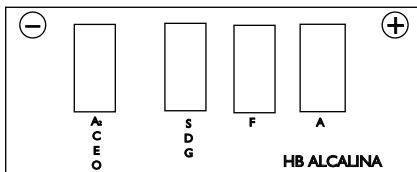


FIG. I

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, spossatezza, 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:

Tratto dell'anemia drepanocitica

È uno stato eterozigote che presenta l'HbA, l'HbS e una quantità normale di emoglobina A₂. 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.

CONTROLLO QUALITÀ

Sono disponibili una serie di controlli dell'emoglobina per facilitare l'identificazione di bande di emoglobina sconosciute e per confermare l'esito soddisfacente dell'esame.

Cod. N. 5331 AFSC Emocontrollo

Cod. N. 5330 AFSA₂ Emocontrollo

Cod. N. 5329 ASA₂ Emocontrollo

Cod. N. 5328 AA₂ Emocontrollo

LIMITAZIONI

Alcune emoglobine anomale hanno mobilità elettroforetiche simili e devono essere differenziate mediante altre metodologie.

Ulteriori esami necessari:

1. L'elettroforesi acida delle emoglobine può essere un test di controllo necessario per la conferma delle emoglobine anomale rilevate.
2. Può essere necessario effettuare l'analisi della catena globinica (sia acida sia alcalina) e alcuni studi strutturali al fine di identificare positivamente alcune delle emoglobine più rare.
3. 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. N. 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. N. 5341). La quantificazione dell'emoglobina A₂ è uno dei test diagnostici più importanti per la diagnosi del tratto beta-tallemico.
4. Livelli bassi di emoglobina F (1-10%) possono essere quantificati accuratamente mediante immunodiffusione radiale utilizzando la procedura HbF-QuiPlate di Helena BioSciences (Cod. N. 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**Riproducibilità**

	Entro il gel (n=10)		Tra gel (n=100)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
HbA	48.9	2.5	50.5	3.9
HbF	32.6	2.5	32.8	3.2
HbS	17.3	3.7	15.6	8.8
HbA ₂	1.2	10.2	1.1	18.2

Linearità

La linearità del metodo è una funzione della specificazione densitometrica nonché delle prestazioni del gel. Si raccomanda ad ogni cliente di determinare la linearità del metodo sulla base del densitometro in uso nel laboratorio.

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 SAS-I Alcalino Hb-12 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 grupos heme de protoporfirina con 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 homocigótico o en combinación con otras hemoglobinas anormales. Wintrobe divide las anomalías de síntesis de la hemoglobina en tres grupos:

1. Producción de moléculas proteínicas 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 alcalino y el soporte de agarosa. El procedimiento Alcalino Hb-12 de SAS-I 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 SAS-I Alcalino - Hb**

Contiene agarosa en un tampón Tris – EDTA - Glicina, con azida de sodio como conservante. El gel viene envasado listo para usar.

2. Colorante azul ácido concentrado.

Contiene colorante concentrado azul ácido. Disolver el contenido del vial en 700ml con agua destilada. Dejar agitando durante toda la noche y filtrarlo antes del uso. Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

3. Agente lisinador de hemoglobina

Contiene Triton X-100 en agua destilada con cianuro potásico y tiomersal como conservantes. El agente lisinador viene envasado listo para usar.

4. Solución decolorante concentrada.

Diluya el contenido de decolorante A en 1 litro de agua destilada. A continuación, añada el contenido de decolorante B y añada lentamente un poco más de 1 litro de agua destilada.

5. Otros componentes del kit

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y secante C hasta completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ**1. Gel SAS-I Alcalino - Hb**

Los geles han de almacenarse a 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. **NO REFRIGERAR NI CONGELAR.** El deterioro del gel puede estar indicado por: 1) apariencia cristalina, indicativo de que el gel ha sido congelado, 2) agrietamiento y descamación, indicativo del resecamiento del gel, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. Colorante azul ácido.

El colorante concentrado ha de almacenarse a 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. La solución colorante preparada es estable durante 6 meses a 15 - 30°C. Es aconsejable desechar inmediatamente el colorante usado para evitar el agotamiento de su capacidad de coloración. Unos malos resultados en la coloración pueden ser indicio de deterioro de la solución colorante.

3. Agente lisinador de hemoglobina

El agente lisinador ha de almacenarse a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase. La aparición de contaminación con partículas o turbidez puede ser indicio de deterioro.

4. Solución decolorante

El concentrado decolorante debe guardarse a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. La solución decolorante diluida es estable hasta 6 meses a 15...30°C.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Nº de catálogo 210200 Aplicadores de muestras 1 x 10

Nº de catálogo 210300 Aplicadores de muestras 5 x 10

Nº de catálogo 210100 Vasos de recogida de muestras desechables 100

Nº de catálogo 3100 REP Prep

Horno con aire a presión con capacidad para alcanzar 60...70°C

Solución Salina (NaCl al 0,85%)

Agua destilada

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se ha de elegir como espécimen sangre recién obtenida anticoagulada con EDTA o heparina. Las muestras se pueden guardar refrigeradas a 2...6°C hasta una semana. Para conseguir unos resultados óptimos, se emplearán glóbulos rojos lavados con la solución salina para preparar lisatos. Así se eliminan posibles interferencias de proteínas de plasma.

- a) Mezclar 200µl de sangre entera bien mezclada con 1.000µl de solución salina.
- b) Centrifugar para sedimentar los glóbulos rojos.
- c) Extraer 1000µl del sobrenadante y desecharlo.
- d) Añadir otros 1000µl de solución salina y mezclar bien.
- e) Repetir los pasos b - d por dos veces.
- f) Tras el centrifugado final, retirar 1000µl del sobrenadante y tratar el resto de la muestra como sangre entera, o retirar todo el sobrenadante y tratar el resto de la muestra como células centrifugadas lavadas.

Para las muestras de pacientes con un nivel total de hemoglobinas de 12-15 g/dl, diluir 1+4 en agente lisonador. Para controles y muestras que no se encuentren entre esos valores, diluir en una concentración de hemoglobina de 2,0-3,0 g/dl.

NOTA: Para la cuantificación de A₂, deben diluirse las muestras inmediatamente antes de la electroforesis. Todas las muestras deben tener menos de 24 horas.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Con una pipeta, introducir 35µl de la muestra en la cavidad correspondiente de la bandeja de muestras o en vasos de recogida de muestras desechables.
 - i) **Usuarios de SAS-1 y SAS-1 Plus:** Utilizar la bandeja de muestras de SAS-1. Colocar cuidadosamente la bandeja con la muestra en la gaveta del aplicador. Asegurarse de que la bandeja está firmemente introducida en su posición.
 - ii) **Usuarios de SAS-3:** Utilizar la bandeja de muestras de SPIFE / SAS-3. Colocar cuidadosamente la bandeja con la muestra utilizando los pasadores de localización de la base de la muestra. Asegurarse de que la bandeja está en una posición segura.
2. Sacar el gel del envase y:
 - i) **Usuarios de SAS-1:** colocar el gel en el SAS-1, con la agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo y negativo con los bordes de los electrodos correspondientes.
 - ii) **Usuarios de SAS-1 Plus:** pipetear 400µL de REP Prep en el disipador térmico. Colocar el gel en el disipador térmico, con el lado de agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo y negativo con los bordes, teniendo cuidado de evitar las burbujas aéreas debajo del gel.
 - iii) **Usuarios de SAS-3:** colocar la guía de alineación en los pasadores y pipetear 400µL de REP Prep en el centro de la cámara. Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia arriba, utilizar la guía para alinear los lados positivo y negativo con los bordes, teniendo cuidado de evitar las burbujas aéreas debajo del gel
3. Secar la superficie del gel con un secante C y luego desechar el secante.
4.
 - i) **Usuarios de SAS-1:** conectar los electrodos a la parte superior de los bordes, de forma que estén en contacto con los bloques de gel.
 - ii) **Usuarios de SAS-1 Plus:** (igual que el anterior). Colocar la cubierta del gel sobre el gel y los electrodos, presionar con firmeza durante 5 segundos para asegurar un buen contacto.
 - iii) **Usuarios de SAS-3:** conectar los electrodos a los bordes, de forma que estén en contacto con los bloques de gel.
5. Colocar 1 unidad del aplicador en la posición del instrumento (**usuarios de SAS-3:** ranura 8).

6. Realizar la electroforesis alcalina de hemoglobina:

i) **Usuarios de SAS-I:** 120 voltios, 40 min., 1 aplicaciones

ii) **Usuarios de SAS-I Plus:** Electroforesis: 200 voltios, 30 min., 25°C, 1 aplicaciones

iii) **Usuarios de SAS-3:**

Paso	Hora (mm:ss)	Temperatura (°C)	Voltaje	Otros
Cargar muestra	00:10	21		Velocidad I
Aplicar muestra	00:10	21		Velocidad I*
Electroforesis	30:00	25	200	

* Utilizar posición I

7. Después de la electroforesis, (**Usuarios de SAS-I Plus:** retirar la cubierta), retirar los electrodos y ambos bloques de gel utilizando el extractor de bloques de gel.

8. Sujetar el gel al soporte de la cámara de coloración.

9. Seleccionar el programa de prueba de hemoglobina alcalina y, siguiendo las instrucciones, colorear, decolorar y secar el gel.

a) **SAS-2 (Colorante automático):**

Paso	Solución	Hora (mm:ss)	Puerto	Temperatura (°C)
Colorear	Colorante azul ácido	05:00	6	
Decolorar	Solución decoloradora	00:30	2	
Secar	—	15:00		65
Decolorar	Solución decoloradora	02:00	2	
Decolorar	Solución decoloradora	02:00	2	
Lavar	Agua destilada	01:00	1	
Secar	—	15:00		65

b) **SAS-4 (Colorante automático):**

Paso	Hora (mm:ss)	Temperatura (°C)	Otros
Colorear	05:00		Recirculación ON
Decolorar	00:30		Recirculación ON
Secar	15:00	70	
Decolorar	02:00		Recirculación ON
Decolorar	02:00		Recirculación ON
Secar	12:00	63	

c) **Manual**

Seguir la secuencia mencionada para el Colorante Automático SAS-2, utilizando un baño de coloración para los pasos de colorear, decolorar y lavar, y un horno de secado con aire a presión a 60...70°C para los pasos de secado.

10. Finalizado el ciclo de coloración, sacar el gel de la cámara de coloración. Ahora, el gel está listo para ser examinado.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Evaluación cualitativa:

Puede determinarse la posible identidad de los tipos de hemoglobina presentes en las muestras mediante evaluación visual del gel completado. Los Hemocontroles proporcionan un marcador para la identificación de bandas.

Evaluación cuantitativa:

El porcentaje relativo de la presencia en el gel de cada tipo de hemoglobina puede determinarse mediante densitometría del gel completado a 595 nm.

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

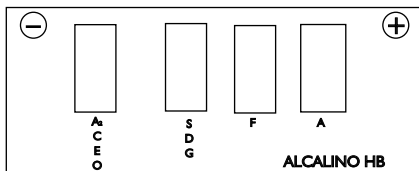


FIG. 1

La mayor parte de las variantes de hemoglobina no producen síntomas clínicos a simple vista, por ello son de interés fundamentalmente para 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 tiene la suficiente prevalencia 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, como 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. Se manifiesta por primera vez a los 5-6 meses de vida. El curso clínico presenta episodios de dolor intensísimo y aumento de la temperatura además de anemia, apatía, letargo, e infarto en prácticamente todos los órganos del cuerpo. El individuo con HbCC homocigótica padece anemia hemolítica leve que se atribuye a la precipitación o cristalización de HbC en los eritrocitos. Los casos de enfermedad HbSC se caracterizan por anemia hemolítica que es menos grave que la anemia falciforme. Las talasemias son un grupo de trastornos de la hemoglobina que se caracterizan por hipocromia y microcitosis debido a la síntesis reducida de una cadena de globina (α o β) mientras que la síntesis de la otra se produce normalmente^{9,10}. Esta síntesis desequilibrada 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, la 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 anemia¹⁰.

Las anomalías más comunes de la hemoglobina:

Rasgo anemia falciforme.

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

Anemia falciforme.

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

Enfermedad falciforme-C.

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

Enfermedad falciforme-talasemia.

Este trastorno muestra la presencia de HbA, HbF, HbS y HbA₂.

En la enfermedad falciforme-talasemia β^- , no hay presencia de HbA.

En la enfermedad falciforme β^+ - talasemia, HbA está presente en cantidades reducidas.

Talasemia-C.

Este trastorno muestra presencia de HbA, HbF y HbC.

Enfermedad C.

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

Talasemia mayor

Este trastorno muestra la presencia de HbF, HbA y HbA₂.

CONTROL DE CALIDAD

Hay disponible una gama de controles de hemoglobina que ayudan a la identificación de bandas desconocidas de hemoglobinas y que permiten confirmar el resultado satisfactorio de la prueba.

Nº de catálogo 5331 AFSC Hemocontrol

Nº de catálogo 5330 AFSA₂ Hemocontrol

Nº de catálogo 5329 ASA₂ Hemocontrol

Nº de catálogo 5328 AA₂ Hemocontrol

LIMITACIONES

Algunas hemoglobinas anormales tienen movilidades electroforéticas similares y deben diferenciarse aplicando otras metodologías.

Otras pruebas adicionales necesarias son:

1. La electroforesis de Hb ácida puede ser una prueba de control necesaria para confirmar las hemoglobinas anormales detectadas.
2. Pueden ser necesarios el análisis de cadenas de globinas (tanto ácidas como alcalinas) y estudios estructurales para identificar positivamente algunas de las hemoglobinas más raras.
3. La cromatografía de columna de intercambio 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 5341) para HbA₂. La cuantificación de HbA₂ es una de las pruebas de diagnóstico más importantes en el diagnóstico de rasgos de talasemia β .

4. 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

Reproductibilidad

	Dentro del Gel (n=10)		Entre distintos geles (n=100)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
HbA	48,9	2,5	50,5	3,9
HbF	32,6	2,5	32,8	3,2
HbS	17,3	3,7	15,6	8,8
HbA ₂	1,2	10,2	1,1	18,2

Linealidad

La linealidad del método está en función de la especificación del densitómetro así como de las características del gel.

Es aconsejable que cada cliente determine la linealidad del método basándose en el densitómetro utilizado en el laboratorio.

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

